



**ALZHEİMER TİPİ DEMANS VE KORONER ARTER
HASTALARINDA ASETİLKOLİNESTERAZ GEN
EKSPRESYONU VE BAZI BİYOMARKİR DÜZEYLERİNİN
BELİRLENMESİ VE ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİM
AKTİVİTESİNİN BELİRLENEREK BAZI FENOLİK
BİLEŞİKLERİN BU ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE *İN
VİTRO* ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Mesut IŞIK

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

2015

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ALZHEİMER TİPİ DEMANS VE KORONER ARTER
HASTALARINDA ASETİLKOLİNESTERAZ GEN EKSPRESYONU
VE BAZI BİYOMARKIR DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ VE
ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN
BELİRLENEREK BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN BU ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE *İN VİTRO* ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Mesut IŞIK

KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı

ERZURUM
2015

Her hakkı saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

**ALZHEİMER TİPİ DEMANS VE KORONER ARTER HASTALARINDA
ASETİLKOLİNESTERAZ GEN EKSPRESYONU VE BAZI
BİYOMARKİR DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ VE
ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN BELİRLENEREK
BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN BU ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE *İN VİTRO*
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR danışmanlığında, Mesut IŞIK tarafından hazırlanan bu çalışma, 11/12/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (5./2.)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYİOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Harun BUDAK

İmza :

Üye : Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hakan SÖYÜT

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 02.01/2016 tarih ve 02/23 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2014/182

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

ALZHEİMER TİPİ DEMANS VE KORONER ARTER HASTALARINDA ASETİLKOLİNESTERAZ GEN EKSPRESYONU VE BAZI BİYOMARKİR DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ VE ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN BELİRLENEREK BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN BU ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE *İN VİTRO* ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Mesut IŞIK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Bir demans türü olan Alzheimer hastalığı nörodejeneratif hastalığın en yaygın şeklidir. Alzheimer hastalığı farklı epigenetik olaylar ile genetik faktörlerin kombinasyonu sonucu meydana gelmektedir. Ayrıca, oksidan ve anti-oksidan sistemler arasındaki dengenin oksidan sistemler lehine bozulmasıyla ortaya çıkan oksidatif stres, koroner arter ve Alzheimer gibi birkaç hastalığın meydana gelmesine neden olmaktadır. Çünkü oksidatif metabolik reaksiyonlar ve onların yan ürünleri sürekli olarak koroner arter ve Alzheimer hastalığı patogeneğinde rol oynamıştır. Bununla birlikte, Alzheimer hastalığı kolinesteraz metabolizmasında değişiklikler ve dejenerasyon ile ilgilidir. Asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörleri hastalığın semptomatik tedavisinde kullanılmaktadır. Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde kullanılan AChE inhibitörleri oksidatif hasardan hücreleri koruduğuna ve antioksidan üretimini artırdığına dair kanıtlar vardır. Bu çalışma 28 Alzheimer, 21 koroner arter hastası ve 28 sağlıklı birey üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, AChE aktivitesi ve oksidatif stres biyomarkırları plazmada belirlenerek daha sonra asetilkolinesteraz (ACHE) kantitatif gen ekspresyonu Alzheimer ve koroner arter tanısı alan hastaların lökositlerinde araştırıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda, Alzheimer ve koroner arter hastalarında kontrol grubuna göre plazma protein karbonil düzeyi ve ACHE mRNA ekspresyonunun arttığı, plazma –SH düzeyinin azaldığı gözlemlendi. Plazma AChE aktivitesi ve MDA düzeyinde, eritrosit AChE aktivitesinde ise hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. Bununla beraber, çalışmanın diğer aşamasında AChE enzimi insan serumundan amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi olarak saflaştırıldı. Daha sonra insan serum AChE enzim aktivitesi üzerine bazı fenolik bileşiklerin etkileri araştırıldı. İnhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşikler için Lineweaver-Burk grafikleri ile K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri tespit edildi.

2015, 155 sayfa

Anahtar Kelimeler: Alzheimer, Real-Time PCR, gen ekspresyonu, oksidatif stres asetilkolinesteraz, inhibisyon

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

**DETERMINATION OF SOME BIOMARKER LEVELS AND
ACETYLCHOLINESTERASE GENE EXPRESSION IN PATIENTS
ALZHEIMER'S TYPE DEMENTIA AND CORONARY ARTERY, AND
INVESTIGATION OF THE EFFECT *IN VITRO* ON THIS ENZYME ACTIVITY OF
SOME PHENOLIC COMPOUNDS, BY DETERMINING THE
ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY**

Mesut IŞIK

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Biochemistry Division

Supervisor: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of neurodegenerative disorder with dementia. Alzheimer disease occurs as result of a combination of genetic factors with different epigenetic events. Besides, oxidative stress, which is defined as the disruption of the physiological balance between oxidant and antioxidant systems is caused to occur various diseases such as coronary artery and Alzheimer disease. Because, oxidative metabolic reactions and their by-products have played a role in coronary artery and Alzheimer disease pathogenesis. In addition, Alzheimer's disease is related with alterations and degeneration in the metabolism of cholinesterase. Acetylcholinesterase (AChE) inhibitors are used in symptomatic therapy of the disease. There are evidence that AChE inhibitors used in the the symptomatic therapy of Alzheimer's disease protect cells from oxidative damage and increase production of antioxidants. This study were performed on 28 adult patients with Alzheimer, 21 adult patients with coronary artery and 28 healthy persons as control subjects. In study, AChE activity and oxidative stress biomarkers are assayed in plasma, than quantitative gene expression of ACHE was investigated in leukocytes of patients diagnosed with Alzheimer and coronary artery. As the result of study, Alzheimer and coronary artery patients were observed that the plasma protein carbonyl (PC) levels and ACHE mRNA expression were increased, the plasma -SH levels were decreased with regard to control group. No statistical significant relation has been found on plasma MDA levels and AChE activity, erythrocyte AChE activity between patients and control groups. In addition, in another stage of this study, AChE was partially purified with ammonium sulphate precipitation from human serum. Then, effects of phenolic compounds on human serum AChE enzyme activities were investigated. For phenolic compounds that exhibit inhibitory effect were determined inhibition types and K_i constants by the help Lineweaver-Burk curves.

2015, 155 pages

Keywords: Alzheimer, Real-Time PCR, gene expression, oxidative stress, acetylcholinesterase, inhibition

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR yönetiminde, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimleriyle bana her zaman yol gösteren, hoşgörü ve sabırla her konuda beni destekleyerek her türlü yardım ve desteği sağlayan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Kimya Bölümü Biyokimya Bilim Dalı öğretim üyelerinden değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYİOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e, Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLU'na ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Harun BUDAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında bilgi ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli grup arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Dr. Zuhale ALİM'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Namık KILINÇ'a, Sayın Yeliz DEMİR'e, Sayın Hatice Esra ASLAN'a, Sayın Abdullah TUNÇ'a ve Sayın Ali ARAZ'a, numunelerin toplanmasında yardımcı olan Erzurum Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi doktorlarından Sayın Uzman Dr. Aslan YILMAZ ve Sayın Uzman Dr. Muhammet Emin NALDAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi doktora çalışmalarım sırasında da maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen ve beni destekleyen ailemin tüm fertlerine teşekkürlerimi sunarım.

Mesut IŞIK

Aralık, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Serbest Radikaller.....	3
1.2. Oksidatif Stres	13
1.2.1. Serbest radikallerin lipitlere etkisi.....	14
1.2.2. Serbest radikallerin proteinlere olan etkisi.....	17
1.2.2.a. Protein oksidasyonunun temel mekanizmaları	18
1.2.2.b. Protein ve aminoasitlerde oksidasyona bağlı yapısal değişimler	19
1.2.3. Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA'ya etkisi.....	23
1.3. Tiyol Gruplarının Antioksidan Etkisi.....	26
1.4. Gen Ekspresyonu.....	27
1.4.1. Transkripsiyon.....	28
1.4.2. Translasyon	31
1.4.3. Gen ekspresyonunun denetimi ve düzenlenmesi.....	34
1.4.4. Gen ekspresyon analiz yöntemleri	41
1.4.4.a. Real-Time PCR.....	42
1.5. Asetilkolinesteraz Enzimi (EC 3.1.1.7).....	44
1.5.1. Asetilkolinesterazın genetik özellikleri ve aktif merkezi	46
1.6. Çalışmada Kullanılan Fenolik Bileşikler	49
1.6.1. 3,5-dihidroksi benzoik asit	51
1.6.2. 4-hidroksi benzoik asit	51
1.6.3. Gallik asit	52
1.6.4. Kafeik asit.....	52
1.6.5. Vanilik asit	53

1.6.6. Hidrokinon.....	54
1.6.7. Klorojenik asit	54
1.6.8. Tannik asit	55
1.6.9. 1,2-Dihidroksi benzoik asit	56
1.6.10. Fenol.....	56
2. KAYNAK ÖZETLERİ	57
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	64
3.1. Materyal.....	64
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	64
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	65
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	66
3.1.4. Deneyde kullanılacak kanın temini	67
3.2. Real Time PCR Yöntemi.....	68
3.2.1. Kandan total RNA izolasyonu.....	68
3.2.1.a. Kandan izole edilen RNA'ların kantitatif tayini.....	71
3.2.2. RT-PCR (Reverse Transkriptaz) ile cDNA kütüphanesi elde etme	71
3.2.2.a. Sentezlenen cDNA'nın kontrolü	72
3.2.3. Primer ve prob dizaynı.....	73
3.2.3.a. Primer ve prob dizaynı için gen sekansına ulaşılması	73
3.2.4. Kantitatif gen ekspresyonu (Real-Time PCR)	84
3.2.4.a. Multipleks Real-Time PCR uygulaması.....	86
3.2.4.b. Real-Time PCR sonuçlarının hesaplanması	88
3.3. Plazmada Lipidler ve Proteinlerin Oksidatif Modifikasyonları ve Total Tiyol Düzeyinin Belirlenmesi	90
3.3.1. Malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi	90
3.3.2. Protein karbonil miktarının belirlenmesi.....	92
3.3.3. Total tiyol miktarının belirlenmesi.....	93
3.4. Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi Tayini	94
3.4.1. Eritrosit hemolizatının hazırlanması	95
3.4.2. Eritrosit asetilkolinesteraz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	95
3.4.3. Plazma asetilkolinesteraz enzim aktivitesinin belirlenmesi	96
3.5. Protein ve Hemoglobin Tayini	98

3.5.1. Bradford (Coommassie Blue) metodu ile protein tayini	98
3.5.2. Bradford protein tayininin uygulanışı	98
3.5.3. Eritrosit hemoglobin miktarının belirlenmesi	99
3.6. İnsan Serum AChE Enziminin Kısmi Saflaştırılması	100
3.6.1. Amonyum sülfat çöktürmesi	100
3.6.2. Diyaliz	101
3.7. Serum AChE Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Fenolik Bileşiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar	101
3.8. İstatistiksel Analiz	101
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	103
4.1. Real Time PCR Yöntemi.....	103
4.1.1. Kandan elde edilen RNA ve cDNA konsantrasyonu kantitatif tayini bulgusu	103
4.1.2. Elde edilen cDNA'ların GAPDH geniyle ısı döngüsü PCR'da kontrol edilmesi	105
4.1.3. Standart eğri ve amplifikasyon verimliliği inceleme sonucu	105
4.1.4. Real Time PCR yöntemiyle ACHE geninin ifade varlığının kan örneklerinde incelenmesi	106
4.1.5. Real Time PCR sonuçları	107
4.1.6. GAPDH ve ACHE gen ekspresyon bulgularının değerlendirilmesi	108
4.2. Malondialdehit, Protein Karbonil ve Total Tiyol Düzeyi Sonuçları	109
4.2.1. Malondialdehit (MDA) miktarı sonuçları	109
4.2.2. Protein karbonil miktarı sonuçları	110
4.2.3. Total tiyol miktarı sonuçları	111
4.3. Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi	111
4.3.1. Eritrosit asetilkolinesteraz enzim aktivite sonuçları	111
4.3.2. Plazma asetilkolinesteraz enzim aktivite sonuçları	112
4.4. Protein ve Hemoglobin Tayini	113
4.4.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik	113
4.5. İnsan Serum AChE Enziminin Kısmi Saflaştırılması	113
4.5.1. Amonyum sülfat çöktürmesi	113

4.6. Serum AChE Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Fenolik Bileşiklerin	
Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları	115
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	125
KAYNAKLAR	140
EKLER	154
EK 1	154
ÖZGEÇMİŞ	156



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

GSH	İndirgenmiş glutatyon
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
AOPP	Proteinlerin ileri oksidasyon ürünleri
ASCh	Asetiltiyokolin
ATP	Adenozintrifosfat
A β	β Amiloid
DNA	Deoksiribonükleikasit
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
dNTP	Deoksिनुकлеотидтрифосфат
DTNB	5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
E.C.	Enzim komisyon numarası
EÜ	Enzim ünitesi
Fe ²⁺	Ferro demir
Fe ³⁺	Ferik demir
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
Hb	Hemoglobin
HNE	4-hidroksi-2-nonenal
HO [•]	Hidroksil radikali
I	İnhibitör
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
LOO [•]	Peroksil radikali
MCI	Hafif kognitif bozukluk
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Haberci RNA

nm	Nanometre
O ₂	Oksijen
O ₂ ^{•-}	Süperoksit radikali
ONOO ⁻	Peroksinitrit anyonu
PAS	Periferik anyonik bölgesi
PC	Protein karbonil
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PUFA	Poliansatüre yağ asitleri
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Devir/dakika
RT-PCR	Revers transkriptaz PCR
TBA	Tiyobarbütirik asit
TCA	Trikloroasetik asit
UV	Morötesi ışın

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Serbest radikal ve reaktiflerin oluşumu	6
Şekil 1.2. Araşidonik asidin otooksidasyonu mekanizması	7
Şekil 1.3. Lipidler, DNA, RNA ve proteinlerin oksijen bağımlı modifikasyonları	13
Şekil 1.4. Yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanması.....	15
Şekil 1.5. Lipid peroksidasyonu.....	15
Şekil 1.6. Malondialdehit (MDA).....	16
Şekil 1.7. Proteinlerde lizin rezidülerinin non-enzimatik oksidasyonu	20
Şekil 1.8. Proteinlerde oksidasyona bağlı karbonil gruplarının oluşumu	21
Şekil 1.9. Glikasyon, glikoksidasyon ve çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) peroksidasyon ürünleriyle reaksiyonları sonucu protein karbonillerinin oluşumu	23
Şekil 1.10. Hidroksil radikalının pirimidinlerle reaksiyonu	25
Şekil 1.11. Ökaryotlarda RNA transkripsiyonu.....	29
Şekil 1.12. Ökaryotlarda RNA'nın transkripsiyon sonrası işlenmesi.....	30
Şekil 1.13. Protein sentezi.....	33
Şekil 1.14. 1,6-Allolaktoz ve IPTG'nin açık formülleri	36
Şekil 1.15. Laktoz operonunda baskılama mekanizması	37
Şekil 1.16. Laktoz operonunda indüklenme mekanizması	38
Şekil 1.17. E.coli'de triptofan operonu	39
Şekil 1.18. Triptofan operonunda yapısal genlerin indüklenmesinin gösterimi	40
Şekil 1.19. Triptofan operonunda yapısal genlerin baskılanmasının gösterimi.....	40
Şekil 1.20. Asetilkolin metabolizması	45
Şekil 1.21. AChE geni şeması.....	47
Şekil 1.22. Enzimin anyonik ve esteratik bölgesini gösteren AChE'nin aktif bölgesinin genel gösterimi	48
Şekil 1.23. 3,5-dihidroksi benzoik asit molekülünün yapısal formülü	51
Şekil 1.24. 4-hidroksi benzoik asit molekülünün yapısal formülü	52
Şekil 1.25. Gallik asit molekülünün yapısal formülü	52
Şekil 1.26. Kafeik asit molekülünün yapısal formülü	53

Şekil 1.27. Vanilik asit molekülünün yapısal formülü	53
Şekil 1.28. Hidrokinon molekülünün yapısal formülü	54
Şekil 1.29. Klorojenik asit molekülünün yapısal formülü	54
Şekil 1.30. Tannik asit molekülünün yapısal formülü	55
Şekil 1.31. 1,2-Dihidroksi benzoik asit molekülünün yapısal formülü	56
Şekil 1.32. Fenol molekülünün yapısal formülü	56
Şekil 3.1. Eritrositlerin hemoliz edilmesiyle santrifüj sonrası çöken lökositler	69
Şekil 3.2. Kandan total RNA izolasyonu	70
Şekil 3.3. Primer ve prob dizayn etmede kullanılan NCBI ana sayfası	73
Şekil 3.4. Primer prob dizayn etmek için kullanılan NCBI organizma seçim sayfası	74
Şekil 3.5. İlgili genin temel özelliklerini gösteren NCBI sayfası	74
Şekil 3.6. Aranılan insan geninin özellikleri	75
Şekil 3.7. İlgili genin sekansının bulunduğu internet veri tabanını	75
Şekil 3.8. ACHE genine ait kodlanan ve kodlanmayan bölgeleri gösteren veritabanı	76
Şekil 3.9. İlgili genin başka genlerle homolojisinin kontrol edildiği organizma seçim sayfası	77
Şekil 3.10. Gen sekansının homolojisinin kontrol edildiği organizmaya özgü blast sayfası	78
Şekil 3.11. İlgili genin başka genlerle homoloji oranını gösteren blastlama sonucu	79
Şekil 3.12. Multipleks Real-Time PCR yönteminde kullanılacak primer ve prob dizaynı şematik özeti	80
Şekil 3.13. Dizayn edilen primer ve problemlerin optimum değerlerinin girildiği NCBI internet veri tabanı	81
Şekil 3.14. Çoğaltılacak gen bölgesinin başka genlerle homolojisinin kontrol edildiği blastlama sayfası	82
Şekil 3.15. Asetilkolinesteraz genin farklı çok sayıda transkript varyantı gösteren blastlama sonucu	83
Şekil 3.16. mRNA sekansı üzerinde primer ve problemlerin gösterimi	83
Şekil 3.17. Real-Time PCR reaksiyonu sırasında hedef gen primer ve problemlerinin çalışma şekli	86

Şekil 3.18. Tez kapsamında yapılan multipleks Real-Time PCR yönteminde kullanılan sıcaklık döngüsü.....	88
Şekil 3.19. MDA standart grafiği.....	91
Şekil 3.20. PC için protein standart grafiği.....	93
Şekil 3.21. Total tiyol standart grafiği	94
Şekil 3.22. Hemogloblin tayini için kullanılan standart grafik	99
Şekil 4.1. GAPDH geni için Agaroze jelinde yürütülen PCR ürünlerinin görüntüsü	105
Şekil 4.2. Real Time PCR amplifikasyon standart eğri ve grafiği.....	106
Şekil 4.3. AChE geni için agaroz jelinde yürütülen Real Time PCR ürünlerinin görüntüsü	107
Şekil 4.4. Hasta ve kontrol gruplarında GAPDH geninin mRNA ekspresyon seviyesini gösteren amplifikasyon eğrisi.....	108
Şekil 4.5. Hasta ve kontrol grubu AChE mRNA ekspresyon seviyesi	109
Şekil 4.6. Hasta ve kontrol grubu MDA seviyesi	110
Şekil 4.7. Hasta ve kontrol grubu protein karbonil miktarı	110
Şekil 4.8. Hasta ve kontrol grubu total tiyol miktarı.....	111
Şekil 4.9. Hasta ve kontrol grubu eritrosit AChE enzim aktivitesi.....	112
Şekil 4.10. Hasta ve kontrol grubu plazma AChE enzim aktivitesi.....	112
Şekil 4.11. Bradford yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik	113
Şekil 4.12. Amonyum sülfat çöktürme aralığını gösteren grafik.....	114
Şekil 4.13. Kafeik asit'in serum AChE enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren Aktivite (%)-[Kafeik Asit] grafiği.....	115
Şekil 4.14. Serum AChE enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı kafeik asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	116
Şekil 4.15. 3,5-Dihidroksi benzoik asit'in serum AChE enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren Aktivite (%)-[3,5-Dihidroksi Benzoik Asit] grafiği	116
Şekil 4.16. Serum AChE enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı 3,5 Dihidroksi benzoik asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	117
Şekil 4.17. 4-Hidroksi benzoik asit'in serum AChE enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren Aktivite (%)-[4-Hidroksi Benzoik] grafiği	117

Şekil 4.18. Serum AChE enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı 4-Hidroksi benzoik asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	118
Şekil 4.19. Vanilik asit'in serum AChE enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren Aktivite (%)-[Vanilik Asit] grafiği	118
Şekil 4.20. Serum AChE enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı vanilik asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	119
Şekil 4.21. Hidrokinon serum AChE enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren Aktivite (%)-[Hidrokinon] grafiği.....	119
Şekil 4.22. Serum AChE enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı hidrokinon konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	120
Şekil 4.23. Kafeik asit'in serum AChE enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren Aktivite (%)-[Klorojenik Asit] grafiği	120
Şekil 4.24. Serum AChE enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Klorojenik asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	121
Şekil 4.25. Tannik asit'in serum AChE enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren Aktivite (%)-[Tannik Asit] grafiği	121
Şekil 4.26. Gallik asit'in serum AChE enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren Aktivite (%)-[Gallik Asit] grafiği	122
Şekil 4.27. 1,2-Dihidroksi benzoik asit'in serum AChE enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren Aktivite (%)-[1,2-Dihidroksi Benzoik Asit] grafiği	123
Şekil 4.28. Fenol'ün serum AChE enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren Aktivite (%)-[Fenol] grafiği	123
Şekil 5.1. Oksidatif stresin hastalık oluşumuna etkisi	133

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Serbest radikal ve reaktiflerin kaynakları	4
Çizelge 1.2. Bazı önemli reaktif oksijen ve azot türleri	11
Çizelge 1.3. Oksidasyona yatkın olan amino asitler ve oksidasyon ürünleri.....	20
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve satın alındığı firmalar.....	64
Çizelge 3.2. Çalışmalar sırasında faydalanılan alet ve cihazlar	65
Çizelge 3.3. Kontrol ve hasta gruplarının yaş ve cinsiyete göre dağılımı	68
Çizelge 3.4. Tez kapsamında yapılan multipleks Real-Time PCR yönteminde kullanılmak üzere sipariş edilen primer ve problemlerin sekansları ve bazı nicel değerleri.....	84
Çizelge 3.5. Multipleks Real Time PCR karışımı (25 µl için).....	87
Çizelge 3.6. Asetilkolinesteraz aktivitesi için 1,5 ml'lik kuvarz küvetlere kullanılan çözeltiler.....	96
Çizelge 3.7. Asetilkolinesteraz aktivitesi için 1,5 ml'lik kuvarz küvetlere kullanılan çözeltiler.....	97
Çizelge 4.1. İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık dereceleri.....	104
Çizelge 4.2. İzole edilen total RNA'dan sentezlenen cDNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık dereceleri.....	104
Çizelge 4.3. Hasta ve kontrol grubunda GAPDH ve AChE ortalama Ct değerleri	108
Çizelge 4.4. İnsan serum AChE enziminin kısmi saflaştırılması.....	114
Çizelge 4.5. Serum AChE'nin kafeik asit konsantrasyonuyla değişen % aktivite değerleri	115
Çizelge 4.6. Serum AChE'nin 3,5-Dihidroksi benzoik asit konsantrasyonuyla değişen % aktivite değerleri.....	116
Çizelge 4.7. Serum AChE'nin 4-Hidroksi benzoik asit konsantrasyonuyla değişen % aktivite değerleri.....	117
Çizelge 4.8. Serum AChE'nin vanilik asit konsantrasyonuyla değişen % aktivite değerleri	118

Çizelge 4.9. Serum AChE'nin hidrokinon konsantrasyonu ile değişen % aktivite değerleri	119
Çizelge 4.10. Serum AChE'nin klorojenik asit konsantrasyonu ile değişen % aktivite değerleri	120
Çizelge 4.11. Serum AChE'nin tannik asit konsantrasyonu ile değişen % aktivite değerleri	121
Çizelge 4.12. Serum AChE'nin gallik asit konsantrasyonu ile değişen % aktivite değerleri	122
Çizelge 4.13. Serum AChE'nin 1,2-Dihidroksi benzoik asit konsantrasyonu ile değişen % aktivite değerleri.....	122
Çizelge 4.14. Serum AChE'nin fenol konsantrasyonu ile değişen % aktivite değerleri	123
Çizelge 4.15. AChE aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren bazı fenolik bileşiklerin K_i değerleri ve inhibisyon türleri	124

1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı hafıza, öğrenme, karar verme, iletişim kurma ve günlük aktivitelerini yerine getirme yeteneğini yavaş yavaş hasara uğratan ilerleyici, nörodejeneratif bir beyin hastalığıdır (Kocaelli *et al.* 2002). Hastalık ilk olarak 1906 yılında Dr. Alois Alzheimer tarafından 65 yaş üstü bireylerde görülebilen bir demans (beyin hücrelerinde hasara neden olan, mental fonksiyonlarda yıkım oluşturan) türü olarak tanımlanmıştır (Reiman *et al.* 1996; Kocaelli *et al.* 2002). Adını buradan alan Alzheimer hastalığı şu anda dünya çapında 35 milyon kişiyi etkilemekte ve 2050’de 115 milyon kişiyi etkilemesi öngörülmektedir. Alzheimer hastalığı, kalp hastalıkları ve kanserden sonra sağlık harcamasında üçüncü sırada olup senelik maliyeti tahmini 250 milyar dolar olarak hesaplanmaktadır (Winblad *et al.* 2006). Bu hastalarda bilinen tedavi yöntemi olmadığından ve erken teşhis etmekte bir ilerleme katedilmemesi nedeniyle belirgin bir hafıza kaybı ve fonksiyonel düşüş ilerlemektedir (Mapstone *et al.* 2014). Hastalığın nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte çeşitli risk faktörleriyle ilişkilidir (Kocaelli *et al.* 2002). Bunlar yaş, cinsiyet, oksidatif hasar, aile yaşam hikayesi, genetik ve kalp-beyin arasındaki ilişki gibi faktörlerdir (Hofman *et al.* 1997; Tang *et al.* 1998).

Son on yılda Alzheimer hastalığı konusunda yapılan çalışmaların çoğu hastalığın patogenezinde oksidatif stres mekanizmaları ve bu mekanizmaların önemi üzerine odaklanmıştır. Alzheimer hastalığının etiyolojisi ve patogenezinde oksidatif stres ve serbest radikallerin rol oynadığına dair kanıtlar artmaktadır (Perry *et al.* 2002). Meydana gelen bu oksidatif hasarların genler üzerine de bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. (Aksenov and Markesbery 2001). Alzheimer hastalığında görülen β amiloid ($A\beta$) toksisitesi, nörotransmitter katabolizması, mitokondriyal fonksiyonların bozulması ve lipid peroksidasyon artışı serbest radikal üretimi ile ilişkilendirilmiştir (Öztekin 2000).

Alzheimer hastalığı için önerilen plazma ve serum biyokimyasal markırları, oksidatif stress, lipid metabolizması, amiloid plak oluşumu ve vasküler hastalıklar gibi

patofizyolojik süreçler sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu hastalık ile birçok nörotransmitter sistem (kolinerjik, nonkolinerjik, serotonerjik, dopaminerjik, aminoasiderjik ve nöropeptiderjik) değişim göstermektedir. Alzheimer hastalığının moleküler mekanizmasının açıklanmasında amiloid kaskat ve kolinerjik hipotez olmak üzere iki temel hipotez kabul görmektedir (Parihar and Hemnani 2004). Kolinerjik hipoteze göre, Alzheimer hastalığı asetilkolinesteraz (AChE) ve kolin asetiltransferaz (ChAT) gibi kolinerjik belirleyicilerin değişimiyle ilişkilidir. Ayrıca, bu hipoteze göre Alzheimer hastalarında mediyal ön loptaki kolinerjik nöronların dejenerasyonunu takiben kavrama bozuklukları da görülebilmektedir. Bu nedenle de kolinerjik anormallikler ve Alzheimer hastalığı arasında direkt bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Çünkü Alzheimer hastalarında görülen A β toksisitesi; oksidatif stres, eksitotoksosite, enerji kaybı, inflamasyon ve apoptozisi içeren olası mekanizmalar yoluyla nöronal ölüme sebep olur (Parihar and Hemnani 2004). Alzheimer hastalığının başlaması ile birlikte gerçekleşen nöron ve akson kaybı, daha düşük düzeylerde asetilkolin (ACh) salınımına neden olur. Düşük konsantrasyondaki nörotransmitter düzeylerinde sinir iletilerinin devamlılığını sağlamak daha güç bir hal alır. Bu ACh düzeylerini arttırmak için uygulanacak yöntem ACh'yi yıkan AChE enziminin baskılanmasıdır. Çalışmalar, AChE inhibisyonuna bağlı ACh düzey artışlarının, Alzheimer hastalığının erken evrelerindeki kognitif yetmezliği iyileştirebileceğini göstermiştir (Chaudiere and Ferrari 1999).

Kolinerjik belirleyici olan bu AChE aynı zamanda kan damarları içinde esnekliği sağlayan asetilkolini hidroliz ettiği için koroner arter hastalığı üzerinde de bir etkiye sahiptir. (Collins *et al.* 1995). Yapılan bazı çalışmalara göre kolinerjik sistemlerin anjiyogenezin (yeni damarların oluşması) düzenlenmesinde bir role sahip olduğu vurgulanmıştır. Kolinerjik sistemde düzenleyici bir etki gösteren ve Alzheimer hastaları için kullanılan bazı AChE inhibitörlerinin, kardiyovasküler hastalarda anjiyogenezin (yeni damarların oluşması) artmasında rolü olduğu vurgulanmıştır (Yoshihiko *et al.* 2010).

Bu çalışma; Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Erzurum Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kardiyoloji ve Nöroloji bölümüne 2014 yılında başvuran ve tedavi görmekte olan Alzheimer ve koroner arter hastaları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hastaların lökositlerinde Real-Time PCR yöntemi ile ACHE gen ekspresyon düzeyi ve spektrofotometrik yöntemle plazma oksidatif stres markırları olarak bilinen protein karbonil içeriği (PC), total tiyol ve malondialdehit (MDA) düzeyleri incelenmiştir. Bu hastalıklara bağlı olarak oksidatif stress markırları ve ACHE gen ekspresyon düzeylerinin değişkenlik gösterip göstermediği belirlenmeye çalışılmıştır. Bilindiği gibi ortaya çıkan oksidatif hasar ve gen ekspresyonundaki değişimi minimize etmek için doğal antioksidanlar önemlidir. Bu antioksidanların bir kısmı fenolik bileşiklerdir. Çalışmada bazı fenolik bileşiklerin insan serumundan kısmi saflaştırılan AChE enzim aktivitesi üzerine *in vitro* etkileri incelenmiş, kinetik analizlerle inhibisyon tipi belirlenmeye çalışılmıştır. Çünkü, özellikle belirli enzimlerin aktivitelerindeki değişiklikler metabolik ve hatta kalıtsal bozuklukları ortaya çıkarmakta ve bunlara bağlı olarak ortaya çıkan hastalıkların tanısında önem arz etmektedir.

Çalışmada elde edilen sonuçlar, Alzheimer ve koroner arter hastalığının patofizyolojisi, tedavisi ve yeni ilaç geliştirilmesi üzerine yapılmakta olan araştırmalara ışık tutabilmesi açısından önemlidir.

1.1. Serbest Radikaller

Kuantum kimyasına göre bir bağ yapısına ancak iki elektron girebilir. Atomlarda bulunan bu elektron çiftleri, orbital olarak adlandırılan bölgelerde birbirlerine zıt yönde hareket eder. Elektronlar çift halde bulundukları zaman oldukça stabildirler. İnsan vücudunun neredeyse tüm elektronları, elektron çifti halinde bulunur. Stabil olan bu elektron çiftleri ayrılıp başka bir atom veya molekül ile bağ oluşturabilirler veya birlikte kalıp atom veya molekülün yapısına da katılabilirler. Elektron çiftleri ayrıldığı zaman, atomun veya molekülün elektron orbital sisteminde en dış orbitalinde, paylaşılmamış elektron kalırsa, o atom ya da molekül serbest radikal olarak tanımlanır. Serbest radikaller eşleşmemiş bir ya da daha fazla elektrona sahip, bağımsız olarak varlığını

sürdürebilme yeteneğindeki türler olarak tanımlanmaktadır. Radikaller çeşitli yollarla diğer moleküllerle reaksiyona girme yeteneğindedir. Eşleşmemiş elektron veya elektronlar meydana gelen kimyasal türün manyetik bir alana çekilmesine neden olur ve bu kimyasal türün reaktivitesini artırır (Halliwell and Chirico 1993; Bircan 2007; Kalay 2011).

Serbest radikaller organizmada endojen veya ekzojen faktörler nedeni ile oluşabilir. Endojen faktörlere; doğal metabolik süreçler ve zararlı dış etmenlerin metabolizmadaki reaksiyonlarını sayabiliriz. Örnek olarak moleküler oksijen, aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle hayati öneme sahiptir. Aerobik hücre metabolizması sırasında moleküler oksijen, serbest oksijen radikallerine dönüşür (Stahl and Sies 2002). Bu serbest radikaller; protein, enzim, lipitler ve nükleik asitlere zarar vererek hücrenin yapı ve fonksiyonunu bozarlar (Aydın vd 2001; Bircan 2007). Ekzojen faktörlere ise; radyasyon, çevre kirliliği, dengesiz beslenme, ısı şoku, sigara, stres, toksik maddelerle temas ve obeziteyi sayabiliriz. Serbest radikal ve reaktiflerin bazı endojen ve ekzojen kaynakları Çizelge 1.1’de gösterilmiştir (Atkins and Carey 1999).

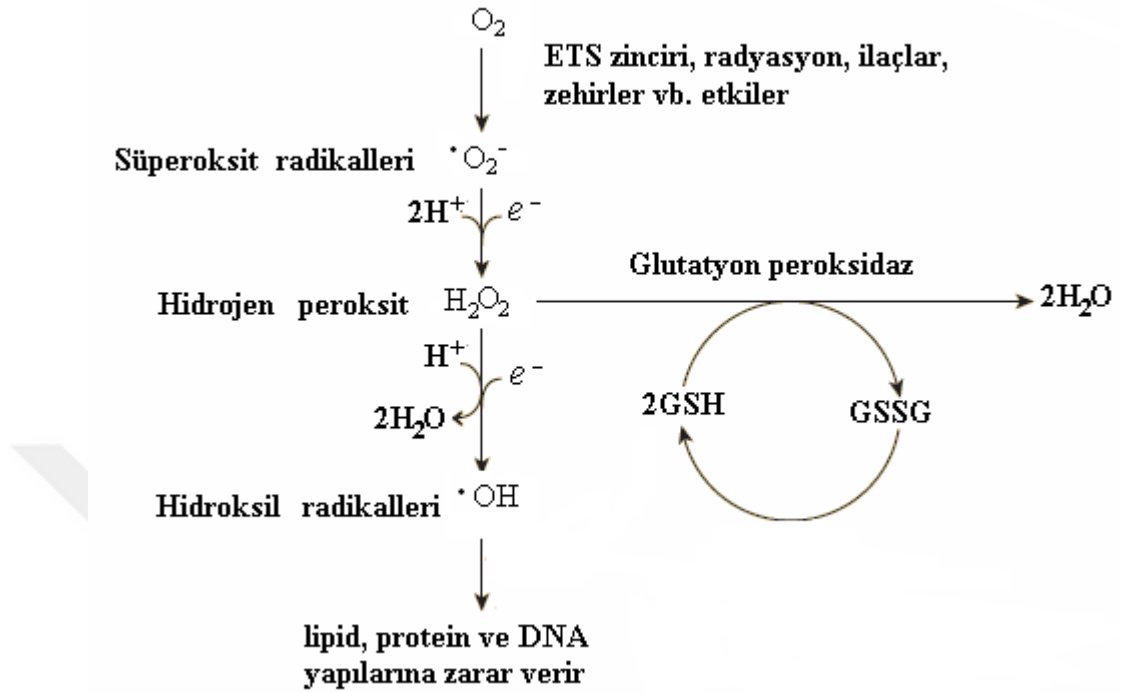
Çizelge 1.1. Serbest radikal ve reaktiflerin kaynakları (Atkins and Carey 1999)

Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
Mitokondrial elektron transport zinciri	Diyet faktörleri
Redoks reaksiyonları	Sigara dumanı
Fagositik ve endotelial hücrelerdeki	Zararlı ışınlar (x-ray, UV)
Oksidatif reaksiyonlar	Ksenobiyotikler
Otooksidasyon reaksiyonları	İlaçlar
Araşidonik asit metabolizması	Organik solventler
Enzimler (Ksantin oksidaz, NADPH oksidaz vs.)	Pestisitler

Mitokondriyal elektron transport zinciri

Mitokondriyal elektron transport zinciri reaktif oksijen türlerinin (ROS) önemli bir kaynağıdır. Glikoliz, yağ asitleri ve TCA devrinde oluşan NADH ve FADH₂'de bulunan yüksek indirgeme potansiyeline sahip elektronlar, mitokondri iç membranında elektron transport sistemi adı verilen bir yolla moleküler oksijene (O₂) transfer edilir. Mitokondriyal elektron transport sisteminde, elektronların O₂'ye transferi sırasında oksijenin kısmi indirgenmiş ürünleri oluşur. Bu ürünler çok reaktif yapıdadırlar ve biyomoleküllerin yapılarına girerek dönüşümsüz zarar görmelerine sebep olurlar (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

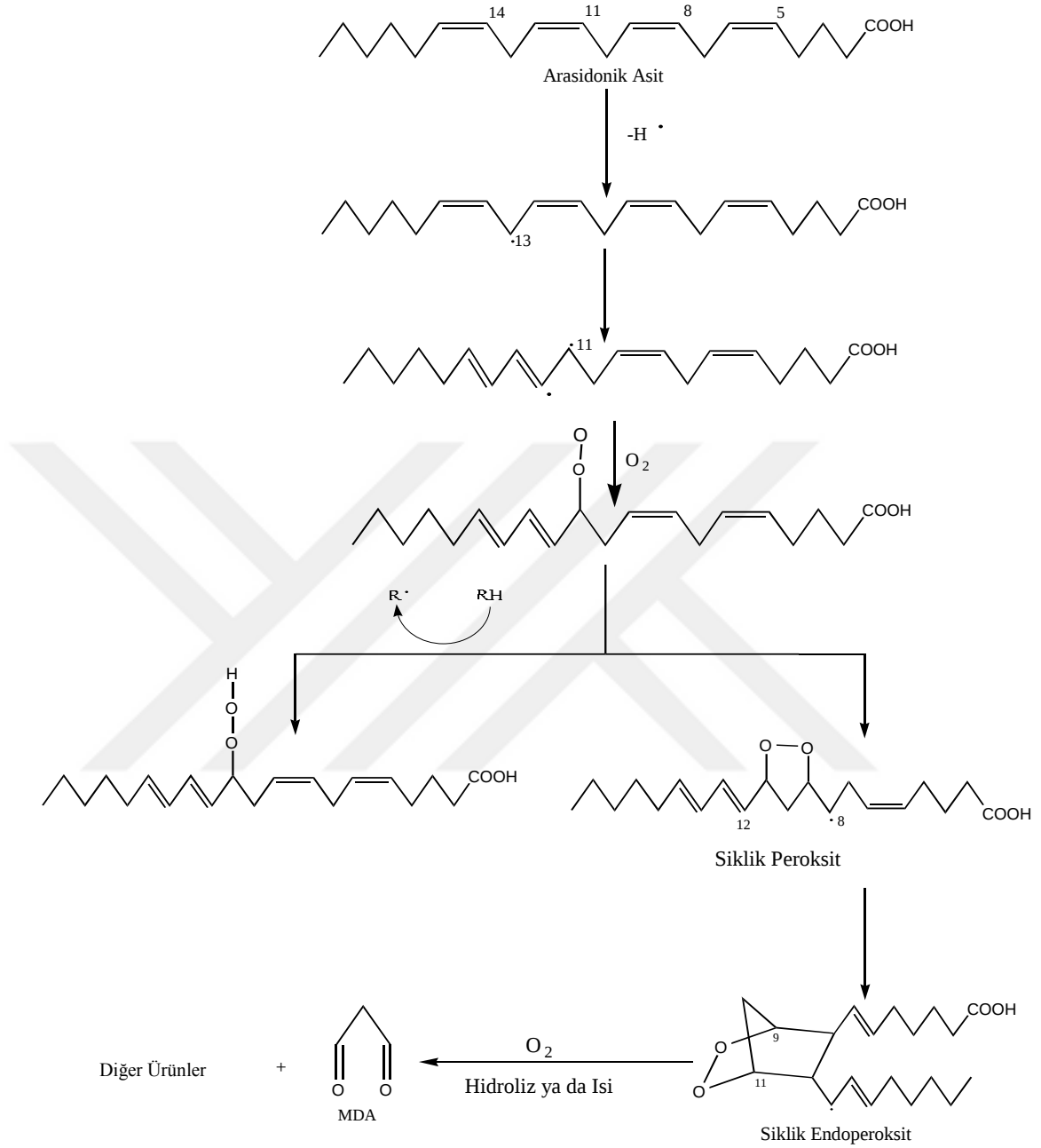
Yaşamın devamı için havanın moleküler oksijenini (O₂) tükettiğimizi biliyoruz. Total oksijen tüketimimizin %90'ından fazlasından elektron transport zinciri (solunum zinciri), %5-10'undan da diğer oksijen gerektiren reaksiyonlar sorumludur. Elektron transport zincirinde moleküler oksijen, yakıtlardan (glukoz, yağ asidi ve amino asitlerin karbon iskeleti) türeyen NADH ve FADH₂'den elektronları alarak suya indirgenir. Bu yolda oksijen molekülünün kuvvetli oksitleyici gücü, ATP'nin yüksek enerjili fosfat bağı haline dönüştürülür (Akkuş 1995). Süperoksit ve H₂O₂ üretimi mitokondriyal oksijen tüketiminin %1-2'si kadardır. Hidrojen peroksit mitokondriden sitoplazmaya salındığı halde O₂^{•-} salınamaz. İntramitokondriyal SOD, O₂^{•-}'i H₂O₂'e dönüştürerek hücreleri oksidatif hasardan korur. Metabolizmada oluşan ve dış kaynaklı radikal ve reaktiflerin oluşum yolları Şekil 1.1'de gösterilmiştir (Yapar 2006; Bursal 2009).



Şekil 1.1. Serbest radikal ve reaktiflerin oluşumu

Araşidonik asit metabolizması

Araşidonik asit metabolizması ROS'un önemli bir kaynağıdır. Araşidonik asit hücre membranında bulunan bir yağ asididir. Fagositik hücrelerin uyarılması, protein kinaz ve fosfolipaz enzimlerinin aktivasyonuna ve hücre membranından araşidonik asit salınmasına neden olur. Bu yolla ara peroksi bileşikleri ve hidroksil radikalleri meydana gelir. Bu lipid peroksidasyonunun ilk ürünleri olan hidro ve endoperoksidler, daha sonra yeni zincirleme reaksiyonları başlatabilecek radikal ürünleri meydana getirebilir. Araşidonik asitin enzimatik olarak yükseltgenmesi sonucu süperoksit gibi serbest radikaller ara ürün olarak oluşur. Kimyasal ajanlardan da reaktif ara ürünler oluşur. Reaktif ara ürünler ve serbest radikaller hedef yapılarla etkileşerek intraselüler hasara sebep olurlar (Akkuş 1995; Aydın vd 2001; Yapar 2006).



Şekil 1.2. Araşidonik asidin otooksidasyonu mekanizması (Gülçin 2002)

Redoks döngüsü

Bazı kimyasal ajanlar *in vivo* ortamda p-450 sistemine girmeden önce alternatif bir redoks döngüsü ile ortadan kaldırılmaya çalışılırken serbest radikal oluşur. Oluşan bu serbest radikal çok kararsız olduğu için başka bir ana bileşiğe dönüşme eğilimi

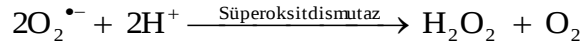
göstermektedir. Bu özelliğinden dolayı ortamdaki oksijenle kolaylıkla etkileşime girer ve süperoksit radikali oluşur. En tehlikeli süperoksit radikali bu şekilde oluşuyor olsa da oluşabilecek oksidatif hasar gerçekleşen zincir reaksiyonları sonucunda en aza indirgenmektedir (Aydın vd 2001).

Daha başka yollardan organizmada serbest radikal oluşmaktadır. Bunlar; otooksidasyon reaksiyonları, hem (demir) metabolizması, peroksidatif oksidasyon, pürin oksidasyonu, aminoasit oksidasyonu, yağ asitlerinin β - oksidasyonu olarak sayılabilir (Bircan 2007). Serbest radikaller oldukça reaktif ve kısa ömürlü oldukları için yakalanmaları ve belirlenmeleri zordur. Serbest radikallerin fonksiyonlarını açıklamak ya da üretildiklerini doğrulamak için; en son ürünleri ya da radikalle uyarılan reaksiyonların ürünlerini araştırmak gerekir (Sachdev and Davies 2008).

Bu serbest radikallerden biri olan moleküler oksijen (O_2) biradikaldir. Ortaklanmamış iki elektron taşır. Ortaklanmamış iki elektrondan biri uyarılır ve spinini değiştirirse singlet oksijen olarak bilinen (1O_2) oksidan meydana gelir (Turrens 2003). Bu singlet oksijen; moleküler oksijenin yüksek enerji ile uyarılmış formudur. Biyolojik sistemlerde fotosentez reaksiyonları sırasında oluşmaktadır. Uyarılan bu formun reaktivitesi çok yüksektir. Bulundurduğu bu yüksek enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde vererek yeniden oksijene dönüşebilir veya kovalent tepkimelere girer. Karbon karbon çift bağları ile tepkimeye girme eğilimi yüksektir (Stahl and Sies 2002).

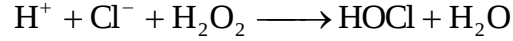
Moleküler oksijenin oksidatif fosforilasyon esnasında NADPH-oksidaz ya da ksantin oksidaz gibi enzimlerin katalizörlüğünde bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali oluşur (Stahl and Sies 2002). İndirgeyici moleküler oksijene bir elektron verip kendisi oksitlenirken süperoksit radikali meydana gelir. Süperoksit anyon radikali nispeten stabil olduğundan esleşmemiş elektronu ile değil, yükü ile tanımlanmaktadır. Süperoksit, arterlerde ve merkezi sinir sisteminde haberci bir molekül olarak düşünülmüştür (Fantel 1996). Biyolojik sistemlerdeki kararsızlığı ve zayıf membran geçirgenliğinin olması bazı araştırmacıların intrasellüler ulak olarak sınırlı olduğunu düşünmelerine neden olmuştur (Saran and Bors 1994). Süperoksit

radikalinin süperoksit dismutaz (SOD) enzim katalizörlüğünde konsantrasyonu azalır (Halliwell 1984). Burada süperoksit radikali SOD enziminin etkisi ile proton alarak aşağıdaki reaksiyonda gösterildiği gibi hidrojen peroksit oluşumuna sebep olur.



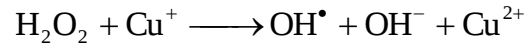
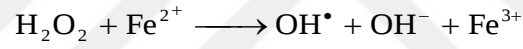
Spontan reaksiyon fizyolojik pH'da yavaş gerçekleşir. Ancak SOD tarafından katalizlendiğinde hızlıdır ve nispeten pH'dan bağımsız olarak ilerler (Fantel 1996). Organizmada en az üç farklı süperoksit dismutaz enzimi vardır. Biri mitokondriyal matraste yer alan manganez formudur (Mn-SOD). Ayrıca iki adet bakır ve çinko formu (Cu, Zn-SOD) bulunmaktadır. Bunlardan biri sitozolde ve diğeri çeşitli ekstrasellüler sıvılarda yer alır (Fantel 1996). Moleküler oksijene bir elektron bağlanmasıyla oluşan süperoksit anyonu bir serbest radikal olmasına karşın çok fazla reaktif değildir. Lipid membranların geçirgenlik yeteneğini azaltır ve bu nedenle üretildiği kompartmanda çevrili olarak bulunur. Süperoksit, özellikle solunum zinciri ile birlikte mitokondriyal membranın iç yüzeyinde elektrondan zengin aerobik bir ortamda kendiliğinden oluşmaktadır. Süperoksit ve ayrıca hidrojen peroksit iskemi-reperfüzyonda aktive olan flavoenzimler, örneğin, ksantin oksidaz, tarafından endojen olarak da üretilmektedir (Nordberg and Arnér 2001).

Hidrojen peroksit; oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle veya süperoksitin enzimatik veya non-enzimatik dismutasyonu sonucu oluşur. Ortaklanmamış elektrona sahip olmadığı için nonradikal özelliğe sahip bir ROS'dir. Hidrojen peroksitin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin sebebi; demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalinin öncüsü olarak davranmasıdır. Yani demir ve bakır gibi atomlarla tepkimeye girerek çok güçlü bir reaktif olan hidroksil radikalini (OH•) oluşturur. Hidrojen peroksit kolayca hücre içerisine girebilir ve hem gruplarında Fe^{2+} 'in yapısına girerek bunları güçlü oksitleyici durumlarına getirebilmektedir. Ayrıca hidrojen peroksit reaktif bir ürün olan hipokloröz asiti (HOCl) oluşturmaktadır (Halliwell 1984; Keha ve Küfrelioğlu 2000).

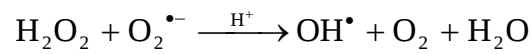


Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde ROS kapsamına girer ve serbest radikal oluşumunda önemli bir rol oynar. Çünkü geçiş metallerinin varlığında hidrojen peroksit, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu ile en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini ($\text{OH}^\bullet$) oluşturur (Stahl and Sies 2002; Sun *et al.* 2008). Hidroksil radikali oksijenin var olduğu durumlarda çeşitli radikal reaksiyonlarının başlatılması ve uyarılmasında kritik bir rol oynar. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları olarak adlandırılan bu tepkimeler aşağıda gösterilmiştir (Fantel 1996; Halliwell 2000; Nordberg and Arner 2001; Cheng *et al.* 2002).

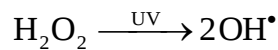
Fenton reaksiyonları:



Haber-Weiss reaksiyonu:



Ayrıca hidrojen peroksitin UV ışınlarının etkisiyle hidroksil radikaline dönüştüğü bilinmektedir.



Oluşan bu hidroksil radikali; lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi biyomoleküllere çok güçlü bir şekilde saldırarak, oksitleyip yapılarında kalıcı hasarlar bırakan ve yarı ömrü 10^{-9} saniye gibi çok kısa olan bir ROS'dur. Hidrojen peroksit ise özellikle

proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle, biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 nin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirir (Ak 2006; Işık 2012).

Metabolizmada süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalinden başka ROS ile reaktif azot türleri de vardır. Bu radikal ve reaktif türlerinden bazıları Çizelge 1.2’de gösterilmiştir (Gümüştas ve Atukeren 2008).

Çizelge 1.2. Bazı önemli reaktif oksijen ve azot türleri (Gümüştas ve Atukeren 2008)

Reaktif oksijen türleri		Reaktif azot türleri	
Süperoksit radikali	$O_2^{\bullet-}$	Nitrik oksit radikali	$NO^{\bullet}$
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Azot dioksit radikali	$NOO^{\bullet}$
Hidroksit radikali	$OH^{\bullet}$	Peroksinitrit radikali	$ONOO^{\bullet}$
Hipokloröz asit	$HOCl$	Nitröz asit	HNO_2
Singlet oksijen	1O_2	Nitrozil katyonu	NO^+
Organik radikaller	$RO^{\bullet}, R^{\bullet}, R-S^{\bullet}$	Nitroksi anyonu	NO^-
Peroksil radikali	$RCOO^{\bullet}$	Peroksinitrit	$ONOO^-$

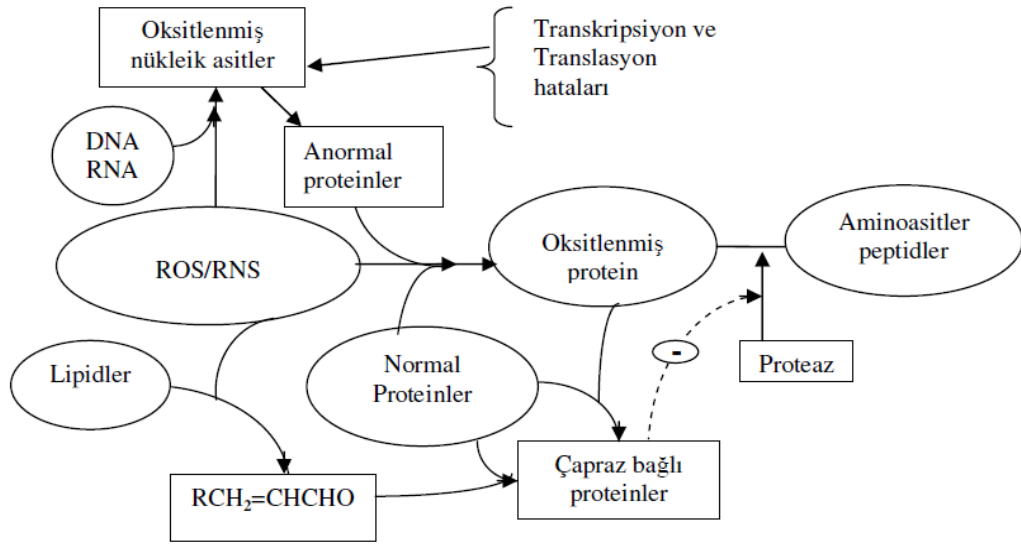
Diğer bir oksijen içeren reaktif azot türü olan nitrik oksit (NO), biyoloji ve tıpta yoğun olarak araştırılmaktadır (Fantel 1996). Bu NO, nitrik oksit sentetaz enzimi ile L-arjinin’in L-sitrullin’e okside olması sonucunda meydana gelir (Griffith and Stuehr 1995). Nitrik oksit, vazodilatör mesajı endotelyumdan düz kasa taşıyan bir enerji aktarıcısı olarak, sentral ve periferel sinirsel aktarımda ve bağışıklıkta aktif rol alır. Aynı zamanda NO’nun damar genişletici rolü iyi bilinmektedir (Lowenstein and Snyder 1992). NO ve süperoksit anyon radikalinin damar durumunun belirleyicileri olarak antagonist biçimde işlev gösterdikleri öne sürülmüştür. Yarı ömrü saniyeler boyutunda olduğundan NO’nun *in vivo* ekstrasellüler mesaj dönüştürücü olarak görev yapmak için

yeterince stabil olan tek oksijen radikali olduğu belirtilmiştir. NO'nun yarı ömrü tiyollerle reaksiyon yoluyla önemli ölçüde artırılabilir. Bu reaksiyon NO biyoaktivitesini koruyan fakat saatler boyutunda yarı ömre sahip olan S-nitrozotiyol türevlerini oluşturur (Saran and Bors 1994).

Nitrik oksit serbest radikal ailesinin farklı bir üyesini temsil eder ve çeşitli yönlerden $O_2^{\cdot-}$ ile benzerdir; eşleşmemiş elektronuna rağmen birçok biyomolekülle hemen etkileşime girmez. Diğer taraftan farklı serbest radikallerle (örneğin, peroksil ve alkil radikaller) kolayca reaksiyona girerek temelde daha az reaktif molekülleri üretirler. Bu nedenle aslında bir serbest radikal süpürücüsü olarak görev yapmaktadır; örneğin, NO'nun hücre membranlarında lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Rubbo *et al.* 2000). Eğer $O_2^{\cdot-}$, NO ile paralel olarak yüksek miktarlarda üretilirse, bu ikisi birbirleriyle etkileşerek oldukça sitotoksik olan OONO $^{\cdot}$ (peroksinitrit) radikalinin üretimine sebep olurlar (Beckman and Koppenol 1996). Peroksinitrit birçok biyomolekülle doğrudan bir- veya iki-elektron reaksiyonuna girebilir, hızlıca CO $_2$ ile reaksiyona girerek oldukça reaktif peroksokarboksilat (ONOOCO $^{2-}$) oluşturabilir veya proton alarak peroksonitroz asit olarak ya OH $^{\cdot}$ ve $\cdot$ NO $_2$ oluşturmak için hemolize uğrar ya da yeniden nitrat (NO $_3$) oluşturur. Peroksinitritin bu değişik reaksiyonlarının bireysel hızları, pH'ya, sıcaklığa ve çevresel ortamda bulunan bileşenlerin tiplerine bağlıdır (Radi *et al.* 2001). Peroksinitrit, doğrudan veya reaksiyon ürünleri vasıtasıyla, çoğu iltihaplı hastalıkta gözlemlendiği gibi, LDL'yi yükseltgeyebilir, seruloplazmine zarar vererek bakır iyonlarını salabilir ve genellikle değişik proteinlerde bulunan tirozin kalıntılarına saldırabilir (Halliwell 1997; Nordberg and Arner 2001).

Aerobik organizmalarda oluşan en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir ve bunlara ROS adı verilmektedir. Bu ROS insan vücudunda normal metabolik prosesler sonucunda sürekli olarak üretilmektedir (Langseth 1995). Birçok fizyolojik proseste önemli bir rol oynayan oksijen serbest radikallerinin, vücuttaki birçok oksidatif biyokimyasal reaksiyonun başlıca yan ürünü olduğu ve biyolojik moleküllere etki ederek çeşitli hastalıklara neden olan hücre ya da doku hasarına yol açtığı bilinmektedir (Hoffmann and Garewal 1995; Yen and Chen 1995). Aynı zamanda

yüksek konsantrasyonlarda ROS sistemleri; nükleik asitleri, lipidleri ve proteinleri okside edebilir. DNA ve RNA'nın okside formları transkripsiyon/translasyon hatalarına neden olur ve böylece anormal protein sentezleri oluşur. Bu yapılar ise ROS'un etkilerine daha duyarlıdır (Şekil 1.3) (Grune *et al.* 1995).



Şekil 1.3. Lipidler, DNA, RNA ve proteinlerin oksijen bağımlı modifikasyonları (Grune *et al.* 1995)

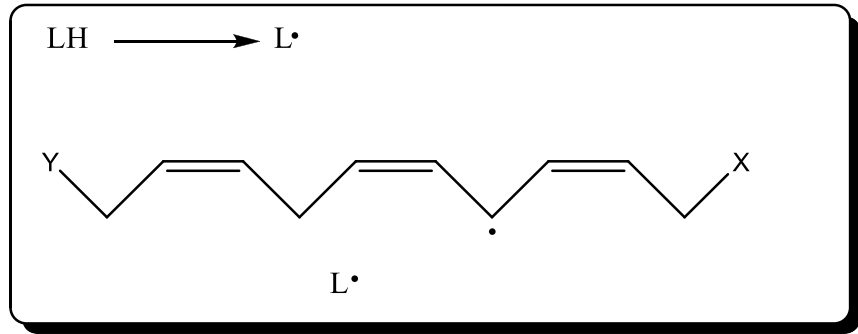
1.2. Oksidatif Stres

Antioksidan savunma sisteminin azalması ya da ROS üretiminin artması; ROS - antioksidan dengesini bozar (Oruç 2010). Canlı organizmada patolojik olarak normalden daha çok serbest radikal üretilmesi ya da antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalması sonucunda artan serbest radikaller, hücrenin bileşenleri ile etkileşerek hücrede hasara neden olurlar. Oluşan bu hasar hücrenin ölümüyle de sonuçlanabilir (Akyol 2004). Oksidan ve antioksidan arasındaki dengenin bozulması oksidatif stres olarak tanımlanır ve oksidatif hasarın başlamasına neden olur (Oruç 2010).

Hücreler normal koşullarda orta dereceli oksidatif stresi, antioksidan savunma mekanizmalarının sentezini gen ekspresyonundaki değişiklikler yoluyla düzenleyerek ortadan kaldırabilir. Fakat oksidatif stres yüksek düzeylere ulaştığı zaman oksidasyon ürünlerine karşı adaptasyon sağlanamaz ise hücrede hasar oluşabilir. DNA, protein ve lipidleri içeren tüm biyomoleküllerin oksidatif hasarı kardiyovasküler ve nörodejenaratif hastalıklar, kanser gibi birçok hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Sies 1991; Nordberg and Arner 2001).

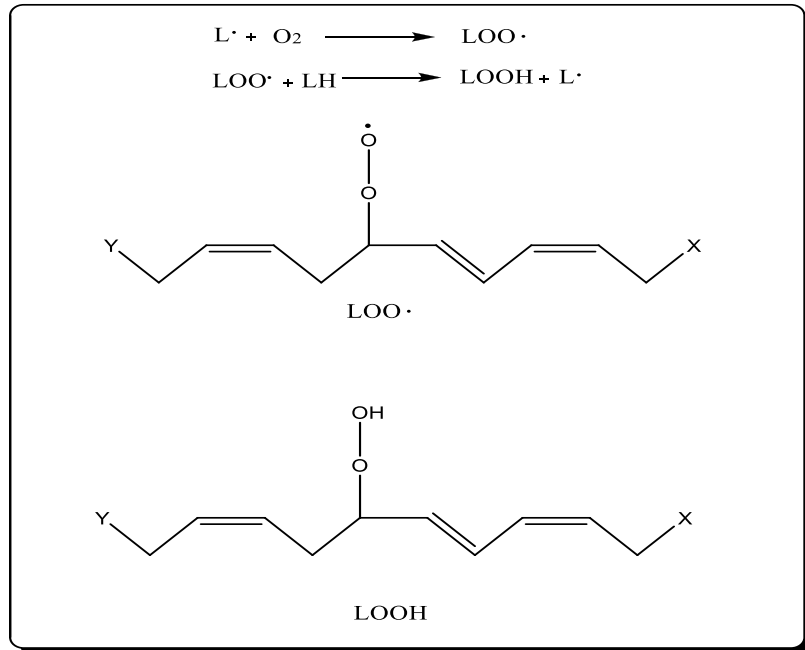
1.2.1. Serbest radikallerin lipidlere etkisi

Serbest radikallerin lipitler üzerindeki en önemli etkileri lipit peroksidasyonudur (Halliwell and Gutteridge 2007). Lipit peroksidasyonu; zar fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan, böylece zar lipit yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan bir olaydır (Altıntaş 2006). Membran fonksiyonlarını zayıflatır, membran geçirgenliğini azaltır ve membrana bağlı çoğu enzimin inaktivasyonuna neden olur (El-Gendy *et al.* 2010). Membran lipitlerinin temel bileşeni olan kolesterol ve çoklu doymamış yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolaylıkla reaksiyona girebilir (Bircan 2007). Lipit peroksidasyonu serbest radikallerin membrandaki doymamış yağ asitlerini etkilemesi ile başlar (Canoruç *et al.* 2001). Lipit peroksidasyonu bir zincir tepkimesi şeklinde başlar ve daha ileri peroksidasyonu başlatacak serbest radikaller için kaynak oluşturur. Kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri (L[•]) ve lipid peroksit radikallerinin (LOO[•]) oluşması, ROS'un neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna "nonenzimatik lipid peroksidasyonu" denir. Hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri poliansatüre yağ asitleridir (PUFA). Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar (Esterbauer *et al.* 1992; Murray *et al.* 1996).



Şekil 1.4. Yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanması

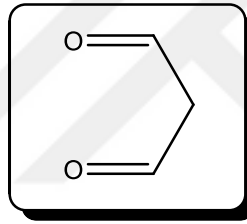
Lipid radikali ($L\cdot$) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin ($L\cdot$) moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri ($LOO\cdot$) oluşur. Lipid peroksit radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipidperoksitlerine ($LOOH$) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder (Cheeseman 1993).



Şekil 1.5. Lipid peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksitlerinin (LOOH) yıkılımı geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Plazma membranı ve subsellüler organel lipid peroksidasyonu serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve geçiş metallerinin varlığında artar. Lokal olarak hidrojen peroksitten (H_2O_2) Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali ($OH^\cdot$) oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir.

Lipid peroksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir (Burtis and Ashwood 1999).



Şekil 1.6. Malondialdehit (MDA)

MDA kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle lipid peroksidasyonu sonucu oluşan son ürünlerden birisi de kolaylıkla teşhis edilebilen ve oksidatif stres ölçümlerinde kullanılan MDA molekülüdür (Tietz 1995; Canoruç *et al.* 2001). Bu MDA uzun ömürlü ve yüksek reaktiviteye sahiptir (Rio *et al.* 2005). Nükleik asitler, enzimler, proteinlerin amino grupları ve tiyoller için yüksek afinite göstermesi nedeniyle MDA hücreler için son derece toksiktir (Oropesa *et al.* 2009). Membran fonksiyonlarının yavaşlamasına, membran akıcılığının azalmasına, membran reseptör ve enzimlerinin inaktive olmasına, Ca^{2+} iyonlarının membrandan geçişlerinin artmasına neden olmaktadır (Canoruç *et al.* 2001).

1.2.2. Serbest radikallerin proteinlere olan etkisi

Protein oksidasyonu, ROS ($\text{OH}\cdot$, H_2O_2 gibi) ve diğer hasar verici serbest radikaller ile direkt olarak veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu indirek olarak indüklenen, proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır (Gülbahar 2007).

Proteinlerde *in vivo* olarak meydana gelen oksidatif değişiklikler, proteinlerin rol oynadığı çeşitli hücresel fonksiyonları etkiler. Reseptörlerin, sinyal ileti mekanizmalarının, yapısal proteinlerin, transport sistemlerinin ve enzimlerin rol oynadığı hücresel olaylar oksidatif protein hasarından etkilenir. Oksidatif protein hasarı, protein karbonil (PC) düzeylerindeki artış ve protein tiyol düzeylerindeki azalma ile karakterizedir. ROS'un proteinlerle etkileşimi sonucunda histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda aminoasit kalıntısında veya peptit omurgasında meydana gelen oksidatif hasar sonucunda PC ürünleri meydana gelir. PC düzeylerinin saptanmasının oksidatif protein hasarını belirlemede duyarlı bir yöntem olduğu bildirilmektedir. Diğer taraftan serbest radikaller proteinlerdeki tiyol gruplarının oksidasyonuna neden olur. Protein tiyolleri (PSH) antioksidan fonksiyonlarını peroksidasyonu başlatan oksidanları tutarak gösterir. Böylelikle vitamin E ve lipitler oksidatif ataktan korunur (Çakatay *et al.* 2000).

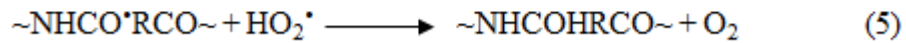
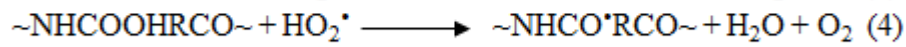
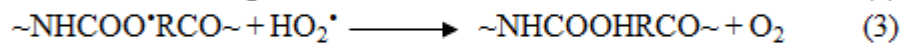
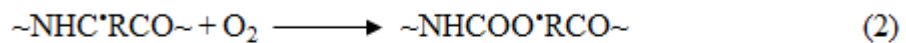
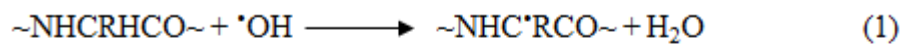
Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçlarını; yüksek miktarlarda radikal oluşumu ve bu reaksiyonların zincir şeklinde devam etmesi, proteinin normal katlanmasında görülen bozukluk, omurga fragmentasyonu, yan zincir gruplarındaki oksidasyon, protein agregasyonu ve dimerleşme, proteinlerin yapısal bozulmalarına bağlı olarak görülen işlevsel kayıplar, enzim aktivitesindeki azalma, gen düzenlenmesi ve transkripsiyonundaki görülen değişimler, apoptoz ve nekrozun uyarılması ve hücre sinyal yollarında modifikasyon şeklinde sıralayabiliriz (Davies *et al.* 1999; Shacter 2000; Hawkins and Davies 2001).

ROS tarafından proteinlerin oksidatif modifikasyonu, bir dizi bozukluk ve hastalığın etiolojisi ile ilerlemesinde rol oynar (Dalle-Donne *et al.* 2003). Protein

oksidasyonundan sorumlu ajanlar arasında; kimyasal reaktifler, mitokondrial elektron transport zincirindeki sızıntılar, ultraviyole ışınları, aktif fagositlerin oksidatif patlama aktivitesi, lipid peroksitleri, ilaçlar ve metabolitleri ile oksidoredüktaz enzimler sayılabilir (Tetik *et al.* 2007).

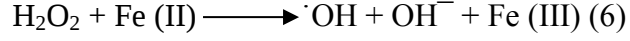
1.2.2.a. Protein oksidasyonunun temel mekanizmaları

Proteinlerin (aminoasitler, peptidler) ROS tarafından oksidasyonunu içeren temel mekanizmalar üzerine yapılan çalışmalarda, proteinler, $\text{OH}\cdot$ veya $\text{OH}\cdot/\text{O}_2^{\cdot-}$ karışımlarına ya da iyonize radyasyona maruz bırakılmıştır. Bu çalışmalarda $\text{OH}\cdot$ 'nin, proteinin polipeptid omurgasından bir H atomunun ayrılmasına aracılık ettiği bir reaksiya, C-C merkezli bir radikalın oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (reaksiyon 1). Aerobik şartlar altında bu yapı moleküler oksijenle kolayca reaksiyona girerek peroksil radikalini oluşturur (reaksiyon 2). Yeni ürün, süperoksidin protonlanmış formu ile reaksiyona girerek alkil peroksid yapısını oluşturur (reaksiyon 3). Alkil peroksidin süperoksidlerle daha ileri reaksiyonları alkoksil radikali (reaksiyon 4) ve hidroksil türevlerini (reaksiyon 5) meydana getirir (Garrison 1987).



Alternatif bir yol olarak reaksiyon 1'deki karbon merkezli radikal, diğer karbon merkezli protein türevleriyle reaksiyon verebilir ve C-C çapraz bağlı protein türevleri oluşur. Reaksiyon 2'de oluşan peroksil radikal türevleri farklı veya aynı protein molekülündeki diğer bir aminoasit rezidüsünden H atomu kopararak karbon merkezli radikal türevleri oluşturabilir. Reaksiyon 4'de oluşan alkoksil radikali ise peptid bağ kırılmasına sebep olabilir. Bu reaksiyonlar süperoksit ve hidroksil radikallerinin

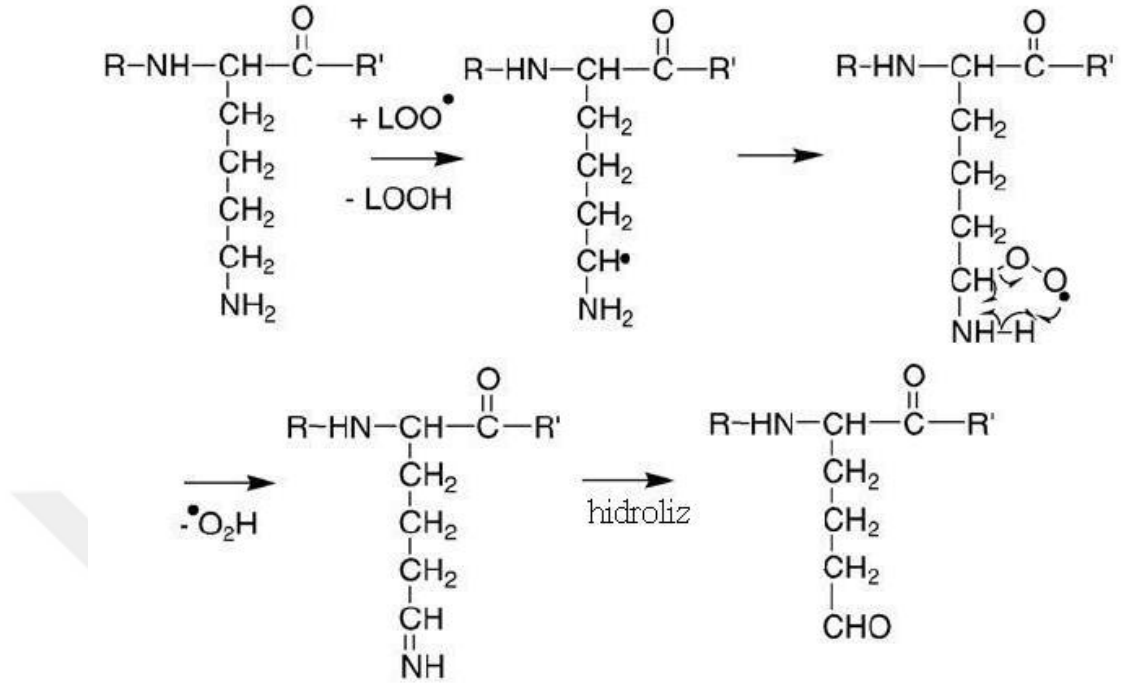
etkisiyle gerçekleşmesine rağmen, aynı etki Fenton reaksiyonu ile *in vivo* şartlarda hidroksil radikalının oluşumuyla da meydana gelebilir (reaksiyon 6) (Garrison 1987).



Fe (II) + H⁺ yapısı reaksiyon 3, 4 ve 5'te gösterilen HO₂· ile yer değiştirebilir (Stadtman 2001).

1.2.2.b. Protein ve aminoasitlerde oksidasyona bağlı yapısal değişimler

Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca mekanizmalar, PC içeriğinin artmasına yol açan metal katalizli protein oksidasyonu, protein tiol gruplarının kaybı, ileri protein oksidasyon ürünlerinin oluşumudur (Halliwell 1997; Netto *et al.* 2002; Arai *et al.* 2005). PC ürünleri histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi aminoasitler üzerinden ROS'un proteinlerle etkileşimiyle veya proteinlerin peptid omurgasında oluşan oksidatif hasarla meydana gelir (Alderman *et al.* 2002). Proteinlerin lizin, arjinin, prolin ve treonin rezidülerinin yan zincirlerinin metal katalizli oksidasyonu protein karbonil türevlerinin oluşumuna yol açar (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Proteinlerde lizin rezidülerinin non-enzimatik oksidasyonu (Uchida 2003)

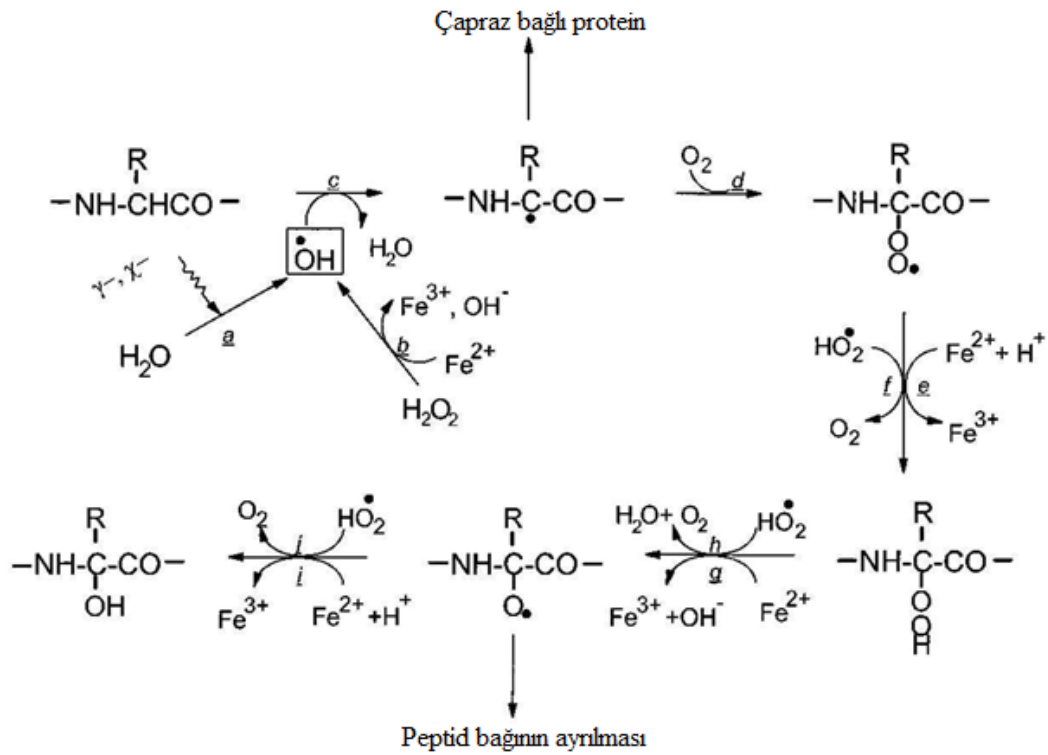
Proteinlerdeki lizin rezidülerinin non-enzimatik oksidasyonu ile primer oksidasyon ürünü olan α -amino adipik semialdehid oluşur (Şekil 4.8) (Requena *et al.* 2003; Uchida 2003). Aminoasitlerin oksidasyon ürünleri Çizelge 1.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. Oksidasyona yatkın olan amino asitler ve oksidasyon ürünleri (Shacter 2000)

Amino asit	Oksidasyon ürünleri
Metionin	Metionin sülfoksit, metionin sülfon
Tirozin	3,4-Dihidroksifenilalanin, tirozin-tirozin çapraz bağları
Histidin*	2-Oksohistidin, asparagin, aspartik asit
Arginin*	Glutamik semialdehit, 5-hidroksi-2-amino valerik asit
Lizin*	Lizin hidroperoksitleri ve hidroksitleri, α -aminoadipik semialdehit
Prolin*	2-Pirrolidon, 4- ve 5-hidroksiprolin, glutamik semialdehit
Treonin	2-Amino-3-ketobutirik asit
Glutamik asit	Oksalik asit, pirüvik asit

* Protein karbonil oluşumuna yol açan amino asitler

Aminoasitlerin α -karbon atomlarının veya $-R$ yan zincirlerinin oksidatif modifikasyonuna ve bu modifikasyonun ardından oluşan protein karbonil türevlerinin artmasına yol açan primer modifikasyon reaksiyonları Şekil 1.8'de gösterilmiştir (Alderman *et al.* 2002; Stadtman and Levine 2003).



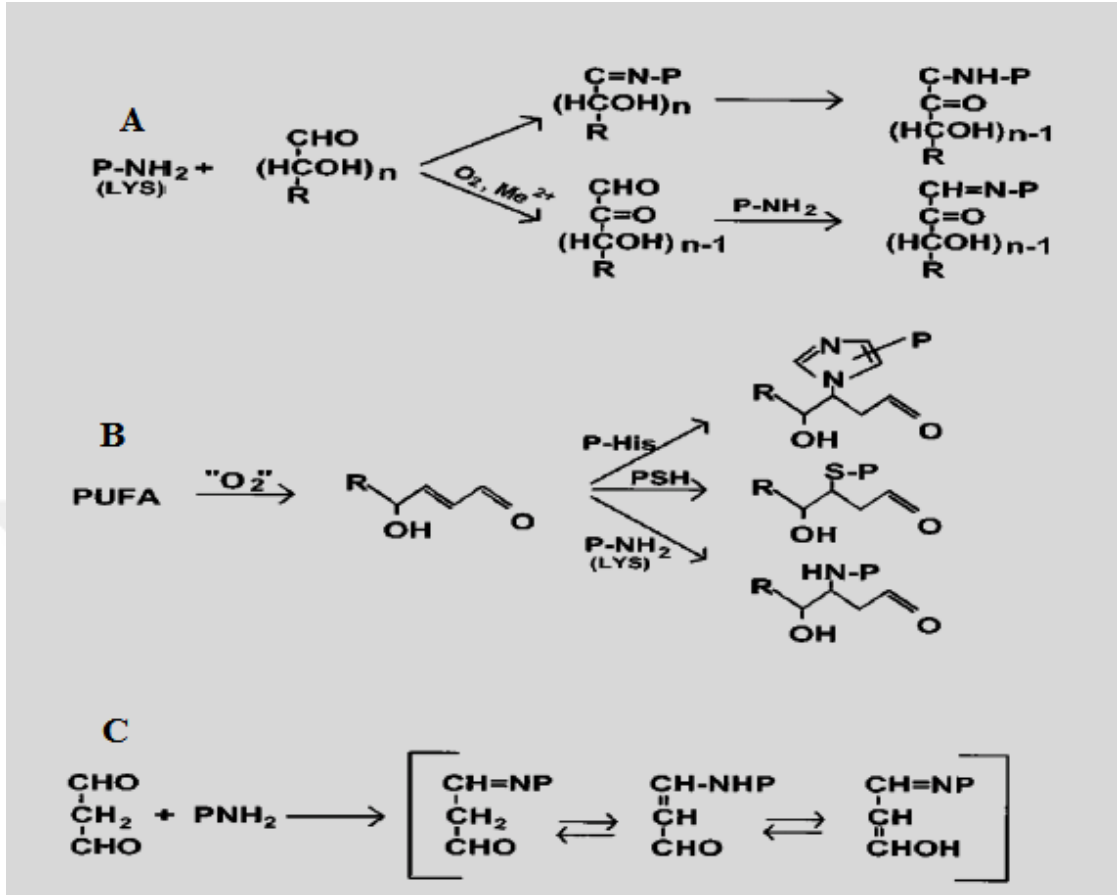
Şekil 1.8. Proteinlerde oksidasyona bağlı karbonil gruplarının oluşumu (Stadtman and Levine 2003)

Reaksiyon c'de gösterildiği gibi α -karbon atomlarından $OH^\bullet$ 'nin ve α -hidrojen atomunun çıkması sonucu karbon merkezli radikal bir aminoasit meydana gelmektedir. Bu reaksiyonda yer alan hidroksil radikali su molekülünün x ve γ ısınları etkisi ile veya H_2O_2 'in metal katalizli yıkımından açığa çıkabilir (reaksiyon a,b). Moleküler oksijenin devreye girmesi ile alkil peroksit meydana gelir (reaksiyon d). Devam eden reaksiyonla birlikte bir hidroksi protein türevi oluşur (reaksiyon h,j). Fe^{+2} ve Cu^+ varlığı $HO_2^\bullet$ ile birlikte reaksiyon basamaklarını etkiler (reaksiyon e,g,i). Ayrıca bu metabolik yolda alkil, alkilperoksil, alkoksil radikal ara ürünleri oluşmaktadır. Bu ara ürünler aynı veya

farklı protein molekülündeki R yan zincirleriyle reaksiyona girerek yeni karbon merkezli radikaller oluştururlar. Oluşan bu radikaller ile üstteki reaksiyonların tekrarı gerçekleşir. Oksijen yokluğunda alkil peroksit oluşumu engellenir (reaksiyon d). Reaksiyon c'nin ürünü olan karbon merkezli radikal diğer bir karbon merkezli radikal ile reaksiyona girerek çapraz bağlı proteinlerin oluşumuna yol açar (Alderman *et al.* 2002; Stadtman and Levine 2003).

Protein karbonilleri sadece proteinlerin direkt oksidasyonu ile değil, aynı zamanda indirgeyici şekerler veya poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) oksidasyon ürünleri ile proteinlerin fonksiyonel gruplarının etkileşimi ile de oluşabilirler (Stadtman 1992; Stadtman 1993). Proteinlerdeki karbonil grupları, lipid peroksidasyonu sırasında üretilmiş aldehidlerle (4-hidroksi-2-nonenal, malondialdehid) ilişki nedeniyle oluşabilir (Şekil 1.9.B) (Uchida and Stadtman 1993). Proteinlerle indirgenmiş şekerlerin reaksiyonlarının veya onların lizin rezidülerinin oksidasyon ürünleri (glikasyon ve glikoksidasyon reaksiyonları) ile reaksiyonları sonucu karbonil türevleri (ketoaminler, ketoaldehidler, deoksiozonlar) oluşabilir (Şekil 1.9a). Ayrıca proteinlerde α , γ ışınları ve metal katalizli oksidasyona bağlı reaksiyonlarla karbonil grupları oluşabilmektedir (Baynes 1996).

Proteinlerde karbonil gruplarının varlığı, protein oksidasyonunun indikatörüdür. Bu protein oksidasyonu yaşlanma, oksidatif stres ve bir kısım hastalıklara neden olur (Levine *et al.* 1994).



Şekil 1.9. Glikasyon, glikoksidasyon ve çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) peroksidasyon ürünleriyle reaksiyonları sonucu protein karbonillerinin oluşumu (A. Protein lizil amino gruplarıyla (P-NH₂) şekerlerin reaksiyonu. B. Protein lizin (P-NH₂), histidin (P-his) veya sistein (PSH) rezidülerine 4-hidroksi-2-nonenal'ın Michael reaksiyonu ile eklenmesi. C. Lipid peroksidasyon ürünleriyle, MDA ve protein amino gruplarının (PNH₂) reaksiyonu) (Uchida and Stadtman 1993)

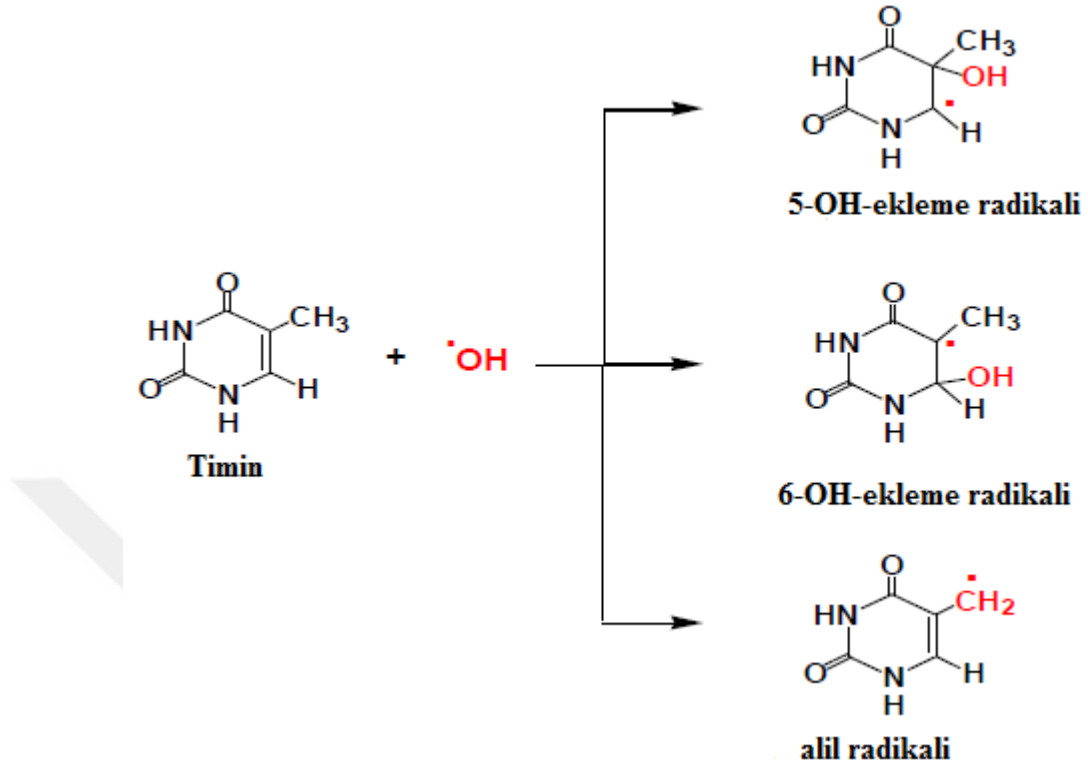
1.2.3. Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA'ya etkisi

DNA serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücre mutasyonu ve ölümüne yol açar. ROS, DNA çift sarmalının ayrılmasına ve nükleik asitlerdeki baz değişimlerine neden olur (Halliwell and Gutteridge 1984).

DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli katyonları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyon durumundadır. Fe^{2+/3+} ve Cu^{1+/2+} iyonları ya negatif

yüklü DNA'ya sürekli bağlı bulunurlar ya da oksidatif stres altında hücre içi demir ve bakır içeren proteinlerden serbestleşerek DNA'ya bağlanırlar. Bu bağlanma ile DNA'yı H_2O_2 'nin hedefi haline getirirler. Oksidatif DNA hasarını açıklamak için fenton reaksiyonları ve nükleaz aktivasyon hipotezleri öne sürülmüştür. Fenton reaksiyonlarına göre; $OH\cdot$ radikalleri DNA'ya doğrudan saldırarak hasar oluşturur. $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 radikalleri ise DNA'da doğrudan hasar yapmaz. Fakat süperoksit güçlü bir oksitleyicidir ve guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküller ile daha kolay tepkimeye girer (Halliwell and Gutteridge 1984). $OH\cdot$ radikalinin DNA üzerine etkili olabilmesi için DNA'nın çok yakınında oluşması gerekmektedir. Olası mekanizma membranlardan kolayca difüze olabilen H_2O_2 'in çekirdekte Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile $OH\cdot$ radikali oluşturmasıdır (Halliwell and Gutteridge 1984; Güzel 2006).

Serbest radikallerin etkisiyle DNA'da görülen değişimler; zincir kırılmaları, pürin ve pirimidin bazlarında parçalanma, DNA denatürasyonu gibi olaylardır (Yu 1994). Hidroksil radikali bazlarla ve deoksiribozla reaksiyona girerek bazı değişikliklere neden olur. DNA'nın yakınında bir yerlerde hidroksil radikali meydana gelirse pürin ve pirimidin bazlarını etkileyerek mutasyonlara neden olabilir. Hidroksil radikali nükleik asitlerdeki doymuş karbon atomlarından hidrojen çıkarır ya da çift bağlara katılma tepkimeleri gerçekleştirir (Şekil 1.10) (Tekkes 2006).



Şekil 1.10. Hidroksil radikalının pirimidinlerle reaksiyonu (Dizdaroğlu *et al.* 2002)

Çekirdek DNA'sına göre mitokondriyal DNA (mtDNA)'da oksidatif baz hasarının fazla şekillenmesinin olası nedenleri, mtDNA'nın en önemli hücre içi ROS kaynağı olması, DNA hasarı onarım sisteminin çekirdek DNA'sına göre yetersiz olması ve yaşa bağlı olarak mtDNA'da mutasyonlarda artış görülmesi olarak bildirilmektedir (Atmaca ve Aksoy 2009). Mitokondri iç zarı oksidatif fosforilasyondan ötürü ROS'un büyük ölçüde üretildiği yerdir. Normal metabolizma ürünleri olan ROS, DNA'da çeşitli bozulmalara, özellikle kopmalara yol açar. Mitokondri DNA'sında, normal durumdakinden farklı olarak ortaya çıkan oksitlenmiş bazların, çekirdek DNA'sındakilerden 16 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu durum, ROS'un mtDNA'da çok sayıda hasar meydana getirebileceğini göstermektedir. Günümüze kadar yapılmış olan araştırmalar fizyolojik yaşlanma, prematür yaşlanma semptomları; Alzheimer hastalığı, diyabet, kalp yetersizliği, sağırılık, optik sinir dejenerasyonu, birçok ilerleyici kas hastalığı ve kanser gibi yaşlanma ile sıklıkları artan hastalıkların mutasyona uğramış DNA içeren disfonksiyonel mitokondrilerin varlığı ile ilgili olduğunu ortaya koymuştur (Öğüt ve

Atay 2012). Aslında düşük düzeylerde oksidatif DNA hasarı minimal hata riski ile etkin bir şekilde onarılabilmektedir. Ancak, DNA onarım enzimleri ve DNA polimeraz'ın oksidatif stres altında hasar görmesi, doğru replikasyon ve transkripsiyon olasılığını azaltmaktadır. DNA'daki oksidatif hasar yaşam ile bağdaşmayan yüksek düzeylere ulaştığında ise hücre ölümü gerçekleşmektedir. Bazı patolojik durumlardan kaynaklanan mitokondrial DNA'daki mutasyonlar RNA moleküllerini de etkilemektedir. Buna bağlı olarak bazı mitokondrial proteinlerin sentezi bozulmakta ve ATP sentezi baskılanmaktadır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2009). RNA'nın oksidasyonu ve bunun sonucundaki biyolojik etkileri ise, DNA ile karşılaştırıldığında daha az çalışılmıştır. RNA'nın geniş bir sitozolik yayılıma sahip olması, tek iplikli olması, nükleer DNA'daki gibi koruyucu histonlarla çevrili olmayışı ve tamir mekanizmasının DNA'ya göre zayıf olması nedeniyle reaktif türlerin hedefi olabilir. DNA'daki oksidatif modifikasyonlar gibi kalıtsal ve mutajenik olmaması da tespitini güçleştirmektedir (Bircan 2007).

1.3. Tiyol Gruplarının Antioksidan Etkisi

Organizma hasarlı moleküllerin onarılması ve oksidatif stresin etkilerinin hafifletilmesi için farklı sistemlere sahiptir. Öncelikli savunma serbest radikallerin ve ROS'un uzaklaştırılmasında görevli enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlarla olur (El-Gendy *et al.* 2010). Antioksidanların etkileri iki şekilde olmaktadır. Bu etkilerinden ilki; serbest radikal oluşumunun engellenmesi şeklindedir ve bunu da; başlatıcı reaktif türevlerini uzaklaştırarak, katalitik metal iyonlarını uzaklaştırarak ya da oksijeni uzaklaştırarak veya konsantrasyonunu azaltarak gerçekleştirmektedir. İkinci etkisi ise; oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesidir.

Plazmanın başlıca antioksidanları arasında, vitamin E, seruloplazmin, transferin ve tiyol bileşikleri yer almaktadır. İntrasellüler antioksidanlar olarak da rol oynayan tiyol bileşikleri içerisinde en önemlisi içerdiği sistein nedeniyle indirgenmiş glutatyondur (GSH). Hücrelerden kan dolaşımına salınan GSH'nin büyük kısmı eritrositlerde toplandığından; plazma GSH düzeyleri nispeten düşüktür. Tiyol bileşiklerinin selektif olarak HOCl ve kloraminleri yakaladığı bilinmektedir. Bu nedenle plazmada HOCl'yi

yakalayan en önemli antioksidanın tiyol olduğu söylenebilir. Plazmada, askorbik asit gibi diğer antioksidanlarla karşılaştırıldığında; albüminin içerdiği serbest tiyol grupları nedeniyle, HOCl'ye karşı yaklaşık 10 kat daha büyük antioksidan kapasiteye sahip olduğu gösterilmiştir. Serbest tiyol grubu içeren bileşikler, radikallerle direkt veya indirekt reaksiyona girerek ya da protein üzerindeki serbest tiyol gruplarıyla reversibl bağlar oluşturarak, proteinlerin oksidatif hasara uğramalarını önleyebilmektedirler. Plazmada total peroksil radikal yakalama sürecinde ilk olarak tiyoller tüketildiğinden, plazma tiyol düzeylerinin tayini, proteinlerin serbest oksijen radikali aracılı oksidasyondan ne denli etkilendiklerini göstermesi bakımından önem taşımaktadır (Erçin 2010).

Tiyol gurubu içeren GSH; glutamat, sistein ve glisinden oluşan, intraselüler konsantrasyonu daha fazla olan bir tripeptittir. Biyolojik olarak iki önemli yapıyı (tiyol grubu ve γ -glutamin bağı) yapısında bulundurur. Yapısındaki sisteinin tiyol grubundan ve yüksek konsantrasyonundan dolayı hücre içinde önemli bir antioksidan olan glutatyonun %99'dan fazlası indirgenmiş formda bulunur (Katı 2010). Önemli bir indirgeyici güç olan GSH; hücre içi proteinlerin, sistein, dihidrolipoat ve koenzim A gibi moleküllerin tiyol gruplarının, α -tokoferol, askorbat gibi antioksidan moleküllerin korunmasında ve DNA'nın deoksiribonükleozid öncüllerinin oluşması için ribonükleotidlerin indirgenmesinde kullanılır. GSH ayrıca hücreleri oksidatif hasara, radyasyona, toksik bileşiklere karşı korur. Tiyol grubu içeren GSH gibi moleküller membran bileşiklerini koruyarak hücre membranını oksidan hasara karşı korumaktadır. Ayrıca serbest radikallerle direk reaksiyonu ile glutatyon peroksidazlara (GSH-Px) ve glutatyon S-transferazlara (GST) substrat olmasıyla bir antioksidan olarak davranmaktadır (Meister 1983; Meister 1988; Meister 1991).

1.4. Gen Ekspresyonu

Genler, hücrelerin ve dolayısıyla da canlıların kalıtsal karakterlerinin, yaşamları için gerekli olan proteinlerin, enzimlerin, diğer makro- ve mikromoleküllerin kodlarını taşıyan, kromozom üzerinde lokalize olmuş, değişik uzunlukta (kodladığı proteinin

büyüklüğüne göre) DNA sekanslarıdır. Genler, aynı zamanda, canlılardaki bütün, genetik, biyokimyasal, fizyolojik, vs. olayların denetimini, doğru yönde ilerlemesini de kontrol ederler (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Genden proteine bilgi akışı değişik adımları içermektedir. DNA'da saklanan kalıtsal bilginin, özgün yapı ve fonksiyonları olan polipeptidlere dönüştürülmesi gereklidir. Ancak DNA, bu iş için tek başına bir başlangıç oluşturamaz. Önce DNA'daki baz çiftlerinin dizileri, RNA'nın bilgi aktaran haberci molekülüne geçirilir (Transkripsiyon). Bunlar gen ürünleri için bir başlangıç oluştururlar. Son basamakta oluşan polipeptidlerin amino asit dizilimleri, mRNA'daki kodon dizilimlerine karşılık gelirler (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

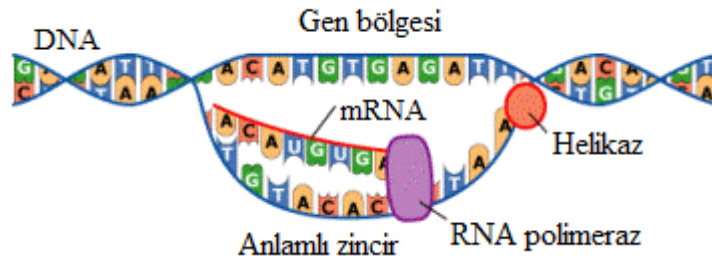


1.4.1. Transkripsiyon

DNA'daki nükleotid baz dizisinin, RNA'da karşıt gelen diziye çevrilmesidir. Önce, DNA'nın bir iplikçisindeki nükleotid dizisi, ona karşıt komplementer RNA molekülüne dönüştürülür, DNA heliksi açılır ve 3'-5' yönündeki DNA iplikçisi, RNA'ya dönüşüm için bir başlangıç oluşturur. RNA 5'-3' yönünde sentezlenir. Translasyon için kullanılan RNA iplikçisi, kodlayan DNA iplikçisi ile aynı oryantasyona sahiptir. Transkripsiyon, kompleks enzimler aracılığı ile gerçekleşir (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

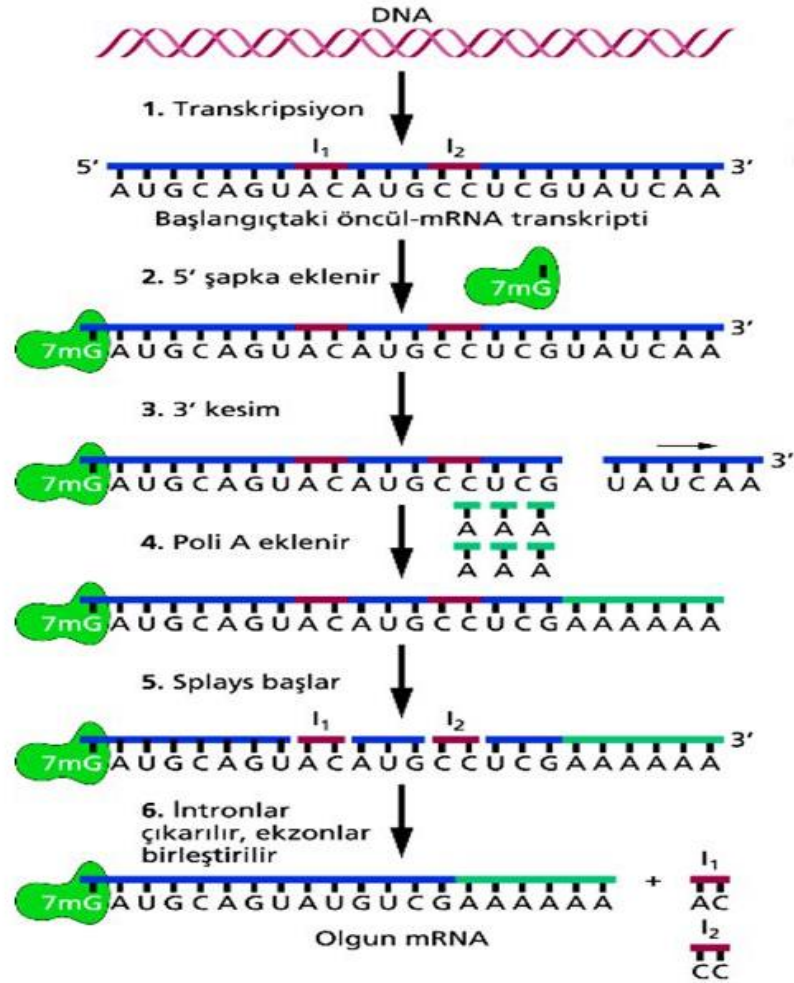
Gen ekspresyonundaki ilk adım, bir DNA iplikçisinin, komplementer RNA'ya dönüşümü yani 'transkripsiyon'dur. Transkripsiyon faktörleri denilen bir çok protein bir transkripsiyon kompleksi oluşturur ve bu kompleks, DNA'ya bağlanır. Transkripsiyon, RNA polimeraz enzimi ile katalizlenir. Ökaryotlardaki RNA polimerazlar kompleks proteinlerdir ve üç farklı enzim ihtiva ederler. Transkripsiyon, DNA'nın spesifik bir pozisyonundan başlar. Bu pozisyon, bir genin hemen başlangıcında (5' ucunda)'dır.

Transkripsiyon başlangıç noktası "promoter" olarak isimlendirilir. Promotör kısa bir DNA nükleotid dizisi olup, RNA polimeraza bağlanarak, transkripsiyonun başlamasını düzenlemektedir. Transkripsiyon başlama noktasının hemen üzerinde iki belirgin promotör bölgesi tanımlanabilir. Bu diziler, çok iyi korunmuşlardır (consensus sequences). Prokaryotlarda, altı bazlık (TATAAT) ve (TTGACA) şeklinde diziler, genin başlangıcından sırasıyla 10 ve 35 bazlık mesafelerde yer alırlar ve "box" (kutu) olarak tanımlanırlar. Ökaryotlarda, bu promoter dizilerde farklılık bulunmaktadır. Başlangıçta, RNA polimeraz, DNA çift sarmalına bağlanır. Bu noktada DNA açılmaya başlar ve RNA sentezi uzama ile devam eder. Polimeraz DNA boyunca hareket ettikçe, RNA oluşur. Polimerazın hemen ardından, DNA tekrar kapanmaya başlar. Sonunda, RNA polimeraz, DNA'dan uzaklaştırılır (Keha ve Küfrevioğlu 2004).



Şekil 1.11. Ökaryotlarda RNA transkripsiyonu

Ribozomların protein sentezi yapmak için okuduğu RNA molekülü "mesajcı RNA"dır. Prokaryotlarda RNA polimerazın ürettiği RNA ile ribozomların okuduğu mRNA aynı moleküldür. Ökaryotlarda ise transkript bir takım işlemlerden geçtikten sonra olgun mRNA olur. Bu noktada, durağan olmayan öncül transkriptin oluşması tamamlanır. Durağan olmadığından hemen modifikasyona uğrar. Bu bakımdan Şekil 1.13'de gösterildiği gibi işlem görmemiş mRNA'ya "öncül mRNA" da denir (Keha ve Küfrevioğlu 2004).



Şekil 1.12. Ökaryotlarda RNA'nın transkripsiyon sonrası işlenmesi (Anonymous 2015)

Ökaryotların, üç tane RNA polimerazı vardır, bunlar pol I, pol II, pol III'dür. Bu enzimler üç farklı gen sınıfını transkribe ederler. Düzenleyici diziler, oldukça kısa DNA dizilerinden oluşurlar. Her dizi, transkripsiyon faktörleri olan bir spesifik protein için bir bağlanma noktası oluşturur. RNA polimeraz I, nükleolde bulunur, 5S, 8S, 18S ve 28S'lik ribozomal RNA'ların karşılığı olan genleri kopya eder. Nükleol aynı zamanda ribozomların oluştuğu yerdir. Sitoplazmada sentezlenen ribozomal proteinler buraya taşınarak ribozomlar inşa edilir. Ribozomlar daha sonra nükleus membranındaki gözeneklerden (pores) geçerek sitoplazmaya yani görev yaptıkları bölmeye transfer olurlar. 5S rRNA ve diğer bütün tRNA'larla birlikte bazı küçük nükleer ve sitoplazmik RNA'lar nükleoplazmada bulunan RNA polimeraz III tarafından sentezlenir.

mRNA'ların ön bileşikleri olan büyük uzun RNA zincirleri ise (hnRNA'lar), yine nükleoplazmada yer alan RNA polimeraz II tarafından yapılır. Küçük nükleer RNA genlerinin önemli bir bölümü de yine RNA polimeraz II tarafından transkripsiyona uğrar. Bakteriyal RNA polimeraz ise bütün RNA çeşitlerini sentezler (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

1.4.2. Translasyon

mRNA'daki kodonları oluşturan nükleotid dizileri, translasyon sırasında amino asit sekansına dönüştürülür. Translasyon başlangıç kodonunda (AUG) başlar. Amino asitler transfer RNA (tRNA) ile sıralanarak dizi tanımlanır. Her amino asidin, kendine spesifik tRNA'sı vardır. Bu tRNA'nın antikodon kısmı, mRNA'daki kodona antiparalel komplementerdir (anti-kodon). Yapılan araştırmalar, farklı hücre tiplerinde 30 ve 50 çeşit tRNA bulunduğunu göstermiştir. mRNA üzerinde amino asitleri şifreleyen 61 çeşit kodon mevcut olduğuna göre, 2 alternatif ortaya çıkmaktadır: ya her kodon her mRNA'da kullanılmaktadır veya bir tRNA birden fazla kodona bağlanabilmektedir. İncelemeler ikinci şıkkın doğru olduğunu göstermiştir. Mesela, antikodon dizilisi GAA olan tRNA^{Phe} hem UUU, hem de UUC kodonlarına bağlanabilmektedir. Kodon-antikodon eşleşmesinin antiparalel olduğu göz önüne alındığında,

tRNA 3' AAG 5' 3' AAG 5'

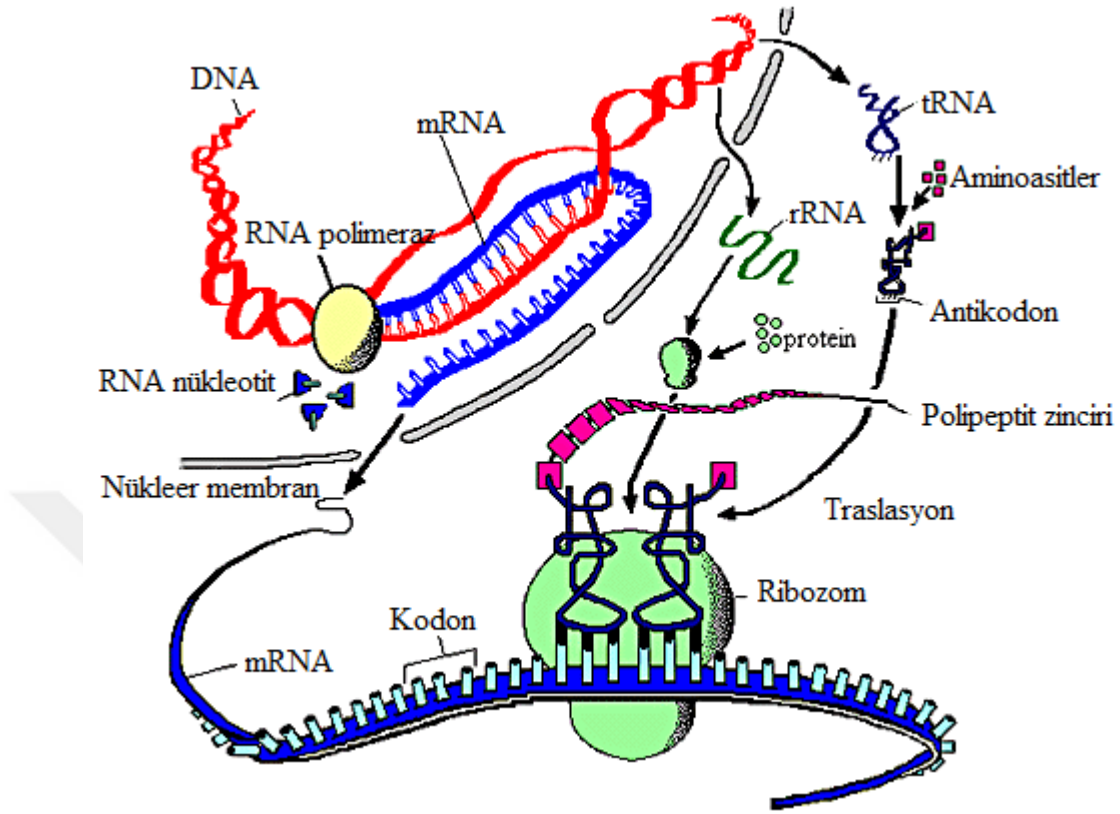
mRNA 5' UUU 3' 5' UUC 3'

eşleşmelerinden, antikodonun 5' bazının bazen Watson-Crick tarzından sapma gösterdiği görülmektedir. Yapılan araştırmalar antikodonun 5' bazlarının mRNA kodonlarının 3' bazlarıyla aşağıdaki gibi eşleşerek, bir çeşit tRNA'nın birden fazla kodona bağlanabilmesini sağlamaktadır. Bu olaya "wobble" hipotezi, antikodonun 5' bazına da "wobble" bazı denilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

<u>Wobble bazı</u>	<u>3' kodon bazı</u>
G	U veya C
U	G veya A
I	U, C veya A
A	yalnız U
C	yalnız G

Translasyon (protein sentezi) hücre çekirdeği dışında, sitoplazmada ribozomlarda oluşur. Ribozomlar, protein ve RNA moleküllerinden (rRNA) meydana gelir. Translasyon başlangıcında mRNA, ribozom ve tRNA kompleksi oluşur.

İkinci basamak elongation (uzama) evresidir. Bir sonraki kodon tarafından belirlenen amino asit, diziye eklenir ve üç fazlı bir uzama siklüsü gelişir. Kodon tanınması, bir sonraki amino aside peptid bağlanması ve ribozomun mRNA'nın 3' yönüne doğru hareketidir. mRNA'da stop kodonlarından (UAA, UGA ve UAG) birisine ulaşıldığında translasyon sona erer. Oluşan polipeptid zinciri, ribozomu terk eder (Keha ve Küfrevioğlu 2004).



Şekil 1.13. Protein sentezi (<http://imgarcade.com/1/protein-synthesis-biology>)

Polipeptid zincirlerinin çoğunda kovalent modifikasyonlar (değişim) meydana gelir. Bu değişimler ya polipeptid zinciri ribozom üzerindeyken veya sentez tamamlanıp ribozomdan ayrıldıktan sonra olabilir. Değişimler translasyon başladıktan sonra ortaya çıktığı için, bunlara “post-translasyonel (translasyon sonrası) modifikasyonlar” denmiştir. Polipeptid zincirinden bazı amino asit dizilerinin uzaklaştırılması, protein aktivitesi için gerekli bazı kimyasal grupların kovalent bağla eklenmesi gibi değişimler olabilir. Post-translasyonel modifikasyonlara ait bazı örnekler aşağıda verilmiştir (Keha ve Küfrelioğlu 2004).

Hücre dışına salgılanmak üzere sentezlenen proteinlerin çoğu önce büyük, öncül moleküller halindedir. Bu öncül moleküller hücre içinde inaktiftirler. Özelleşmiş bazı endoproteaz enzimleri ile protein zincirlerinden bazı kısımlar uzaklaştırılır. Böylece aktif protein molekülü oluşur ve hücre dışına salınır. Zimojenler salgılanan enzimlerin inaktif halidir. Zimojenler etki edecekleri yere gelince kırılarak aktifleşirler. Örneğin;

pankreatik bir zimojen olan tripsinojen ince bağırsaklarda aktif tripsin haline dönüşür. Enzimlerin zimojen halinde sentezlenmesi, hücrenin kendi ürünleri tarafından hazmedilmesini önler. Enzimler ve yapısal proteinlere çeşitli kimyasal gruplar, kovalent olarak bağlanabilir. Böylece bu maddeler aktifleşebilir veya inaktifleşebilirler. Böyle modifikasyonlara ait bazı örnekler aşağıda verilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Protein yapısında bulunan serin, treonin amino asitlerinin hidroksil gruplarında daha az olarak da tirozinde fosforilasyon görülür. Bu fosforilasyon reaksiyonlarını bir grup protein kinaz enzimleri katalizler. Defosforilasyonu ise yine hücre içinde bulunan protein fosfatazlar gerçekleştirir. Fosforilasyon sonrası proteinin fonksiyonel aktivitesi artabilir veya azalabilir.

Hücre zarının yapısına katılacak veya hücre dışına salgılanacak proteinlerin çoğunda karbohidrat zincirleri vardır. Karbohidratlar serin veya treonin amino asitlerinin hidroksil gruplarına (O-bağlı) veya asparagin'in amino grubuna (N-bağlı) bağlanmıştır. Endoplazmik retikulum ve Golgi cihazında şekerler sırasıyla takılırlar. Bu olaya glikozilasyon denir.

Diğer kovalent modifikasyonlar arasında bir proteinin fonksiyonel aktivitesi için gerekli olan modifikasyonlar sayılabilir. Örneğin; bir vitamin olan biyotin, karboksilaz enzimlerine kovalent olarak bağlanır. Ancak bundan sonra bu enzimler katalitik aktif olurlar (Champe and Harvey 1997).

1.4.3. Gen ekspresyonunun denetimi ve düzenlenmesi

Ökaryot ve prokaryotlardaki genetik bilgilerin proteine dönüştürülmesinin, yani, genetik ifadenin (genetic expression) denetimi ve düzenlenmesinde, en önemli basamak transkripsiyonun başlangıç safhasıdır. Hücrelerin her proteine, her anda aynı oranda ihtiyacı bulunmaz. Beslenme ortamının, içinde bulunduğu şartların, dışarıdan alınan sinyallerin ve özellikle çok hücrelilerdeki her bir hücrenin fonksiyon ve yapı farklılığının sonucu olarak, bazı metabolik yolların hızlanması ve bazılarının da

yavaşlaması icap eder. Dolayısıyla buralarda görev alan proteinlerin ve enzimlerin sentezlerinin baskılanması veya aktif hale getirilmesi gerekir (Küfrevioğlu 2003).

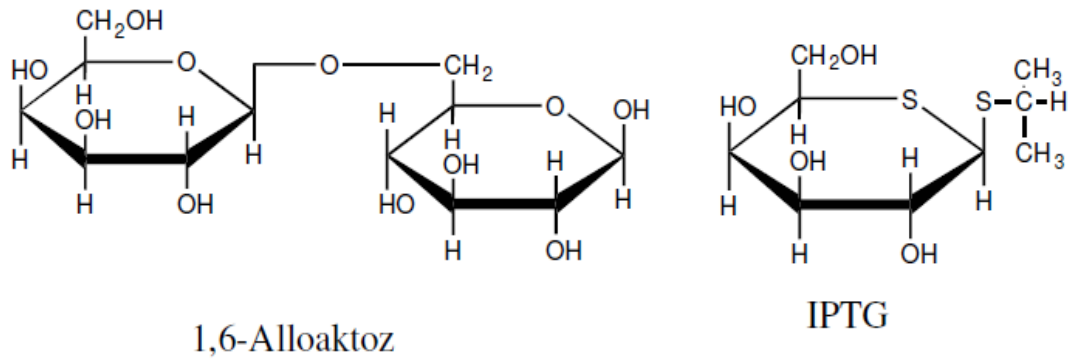
Prokaryotlarda "operon" modeliyle bazı örnekleri açıklanan transkripsiyonun bu düzenlenme mekanizması, çok hücreli ökaryotlarda çok daha karmaşık ve bir çok faktörün rol aldığı bir olaydır. Aslında bir gen yapısında, transkripsiyonu düzenleyen "transkripsiyon" elementlerinin (TE) bulundurulması. Promoterler, RNA polimerazları bağlayan ve transkripsiyonun başlangıç noktasını belirleyen başlatıcılardır. Transkripsiyon elementleri ise, transkripsiyon faktörleri (TF) adı verilen çeşitli proteinleri bağlayarak transkripsiyon hızını düzenleyen DNA üzerindeki dizilişlerdir. TE ökaryotik protein genlerinde +1 noktasından önce, mRNA kodlayan dizilişlerinden sonra ve hatta bu dizilişlerin içindeki intronlar da bile yer alabilir. Bazen TE, promoter bölgeden binlerce baz ötede bulunabilir ve daha başka genlerin kontrolünde de rol oynayabilir. TE bazı hormon ve sinyallere cevabın (HRE-hormone response element), transkripsiyonun hızlandırılmasının (enhancers) ve yavaşlatılıp, baskılanmasının (silencers, repressors) düzenlendiği DNA bölgeleri olarak sınıflandırılabilir. Bu bölgelere, hormon-reseptör komplekslerinin de aralarında bulunduğu, birbirinden farklı yapıda olan ve farklı şekillerde aktifleştirilen yüzlerce çeşit transkripsiyon faktörlerinden bir veya birkaçı bağlanarak, ökaryotik gen ekspresyonunu düzenlerler (Küfrevioğlu 2003).

Ökaryotlardaki gen ekspresyon regülasyonu, potansiyel olarak pek çok seviyede olabilir; (1) transkripsiyonel kontrol (2) transkripsiyon sonrası kontrol (öncül-mRNA'nın işlenmesi gibi), (3) sitoplazmaya aktarım, (4) mRNA kararlılığı, (5) translasyonel kontrol (hangi mRNA'nın translasyona uğrayacağını seçimi), (6) protein ürünlerinin translasyon sonrası değişiklikleridir (Klug 2000).

Prokaryotlardaki genetik ifadenin düzenlenmesi mekanizmasının operon modeliyle açıklandığı yukarıda ifade edilmişti. Operonlar bakterilerde çok sayıda genlerin kümелendiği ve bu genlerin regülasyonunu da sağlayan dizilişleri taşıyan DNA bölgeleridir. Bakterilerde açıklığa kavuşturulan ilk operon E.coli'deki laktoz operonudur

(lac operon). *E.coli*, karbon kaynağı olarak laktozu kullanabilir. Bu şeker metabolizmasında rol alan en önemli enzim, laktozu galaktoz ve glukozu hidrolizleyen β -galaktozidaz'dır. Laktozlu bir ortamda yaşayan bir *E.coli* hücresi bu enzimden binlerce molekül ihtiva eder. Karbon kaynağı olarak gliserol veya glukoz gibi başka bileşikler kullanan bakterilerde β -galaktozidaz moleküllerinin sayısı çok daha azdır. Yani β -galaktozidaz indüklenebilir bir enzimdir. Bu enzim ile birlikte, aynı gen tarafından galaktosit permeaz ve tiyogalaktosit transasetilaz enzimleri de sentezlenir. Permeaz, laktozun bakteri hücresi membranından geçişini sağlayan bir transport proteini iken, transasetilazın hücrede laktozun sindirilmesi ile ortaya çıkan toksik yan ürünlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Klug 2000; Küfrevioğlu 2003).

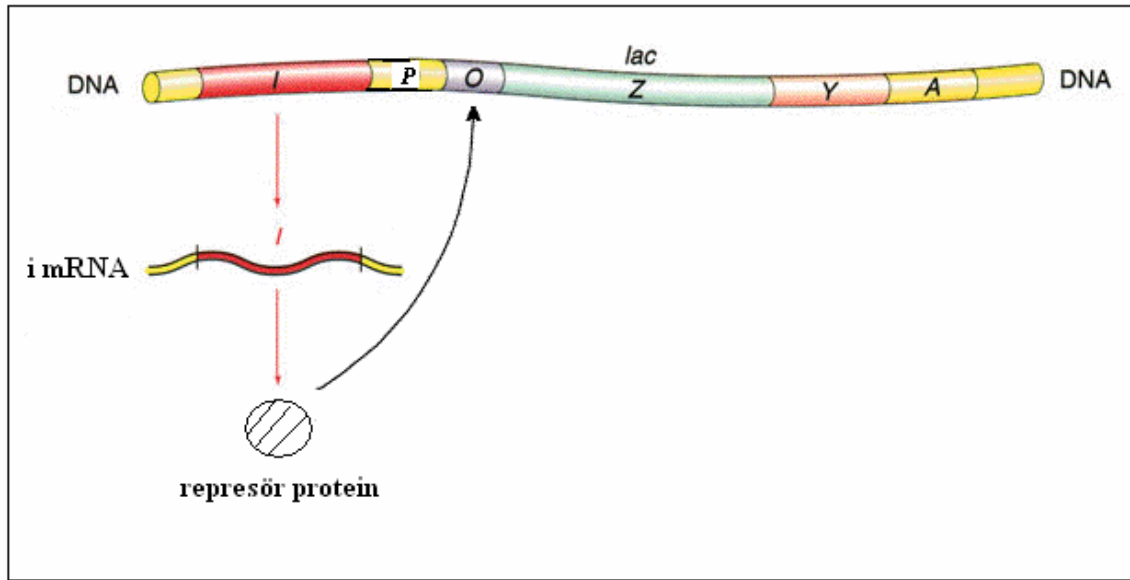
E.coli'de bu enzimlerin fizyolojik indükleyicisi olarak laktozun transglukasyonu ile oluşan allolaktoz görev yapmaktadır (Şekil 1.15). Bu bileşiğin oluşumu indüksiyon öncesi hücrede mevcut olan az miktarda β -galaktozidaz molekülleri tarafından katalizlenmektedir. Yapılan çalışmalar izopropiltiyogalaktosid (IPTG) gibi metabolize olmayan bazı bileşiklerin de indükleyici olduğunu göstermiştir (Küfrevioğlu 2003).



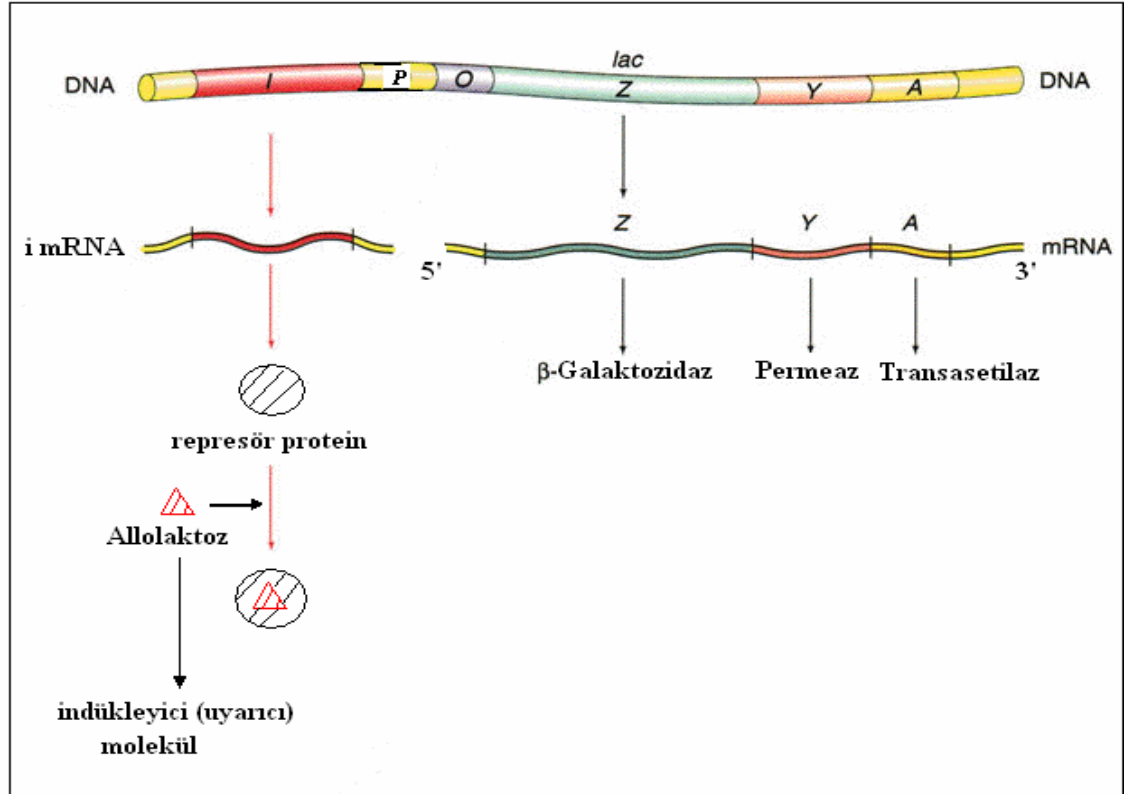
Şekil 1.14. 1,6-Allolaktoz ve IPTG'nin açık formülleri

Söz konusu olan laktoz operonunun genetik elemanlarını bir regülatör (düzenleyici) gen, bir operatör gen ve bir seri yapısal genler oluşturmaktadır. Regülatör gen, operatör genle etkileşebilen ve protein yapısında molekül olan bir represör meydana getirir.

Operatör gen kontrol ettiği yapısal genlerin bitişiğinde bulunur. Operatör gen ve beraberindeki yapısal genlere bir arada operon adı verilir. Laktoz operonunda “i geni” regülatör geni, “o geni”, operatör geni “z, y ve a” genleri de yapısal genleri temsil etmektedir. Ayrıca RNA polimerazın bağlanması için “p” ile gösterilen bir promoter bölgesi vardır. *E.coli* ortamında laktoz yoksa “i geni”nden mRNA sentezlenir bundan da represör protein oluşur. Represör proteinin “o” operatör gene bağlanması RNA polimerazın aktivitesini engeller ve böylece z, y, a yapısal genlerin transkripsiyonu engellenir (Şekil 1.16). Laktozlu ortamda *E.coli*’nin laktozu içeri taşıması ve sindirmesi gerektiğinden hücre içerisinde allolaktoz sentezlenir, allolaktoz represör proteine bağlanarak onu ortamdan uzaklaştırır, uzaklaşan represör “o geni”ne bağlanamayınca yapısal genler transkripsiyona uğrar daha sonra proteinler sentezlenir (Şekil 1.17). Bu durumda laktozun, bu enzimler ile hücreye taşınması, parçalanması ve sindirimi gerçekleşmiş olur (Lodish *et al.* 2001; Klug 2002; Keha ve Küfrevioğlu 2004; Lehninger 2005).



Şekil 1.15. Laktoz operonunda baskılama mekanizması (Keha ve Küfrevioğlu 2004)



Şekil 1.16. Laktoz operonunda indükleme mekanizması (Keha ve Küfrevioğlu 2004)

P : promoter bölge (RNA polimerazın bağlandığı bölge).

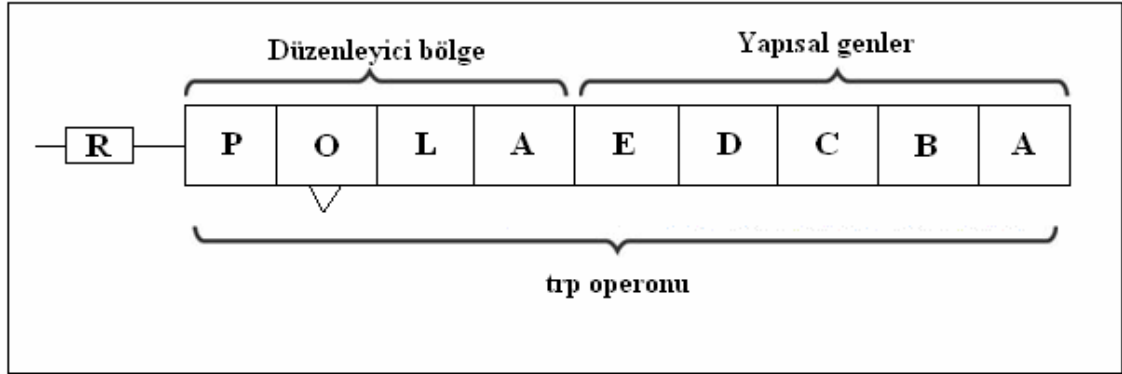
O : operatör bölge

lacZ : β -galaktozidaz geni

lacY : permeaz geni

lacA : transasetilaz geni

E.coli'de triptofan biyosentezinde yer alan enzimlerin genleri farklı bir operon oluşturur. Enzimlerin ortamda bulunuşunu bu operon kontrol eder. Uyarılabilen lac operonun aksine trp operonu baskılanabilen bir sistemdir (Şekil 1.18). Ortamda triptofan varsa, oluşan aktif baskılayıcı, yapısal genlerin ekspresyonunu kapatır (Klug 2002).



Şekil 1.17. *E.coli*'de triptofan operonu (Keha ve Küfrevioğlu 2004)

R : represör proteini kodlayan gen

P : promoter bölge

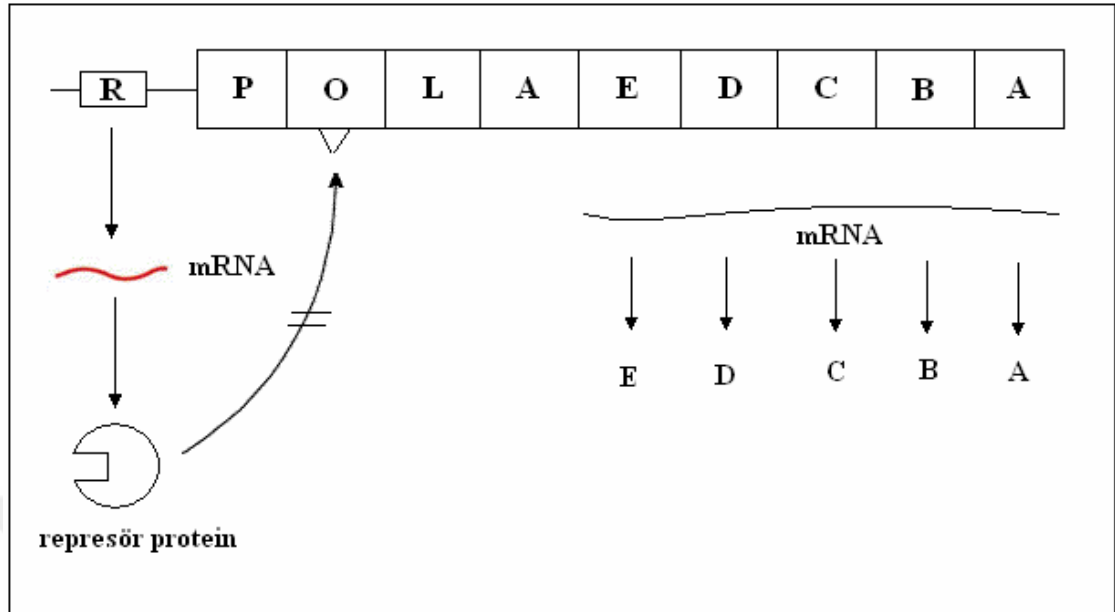
O : operatör bölge

L : lider dizi

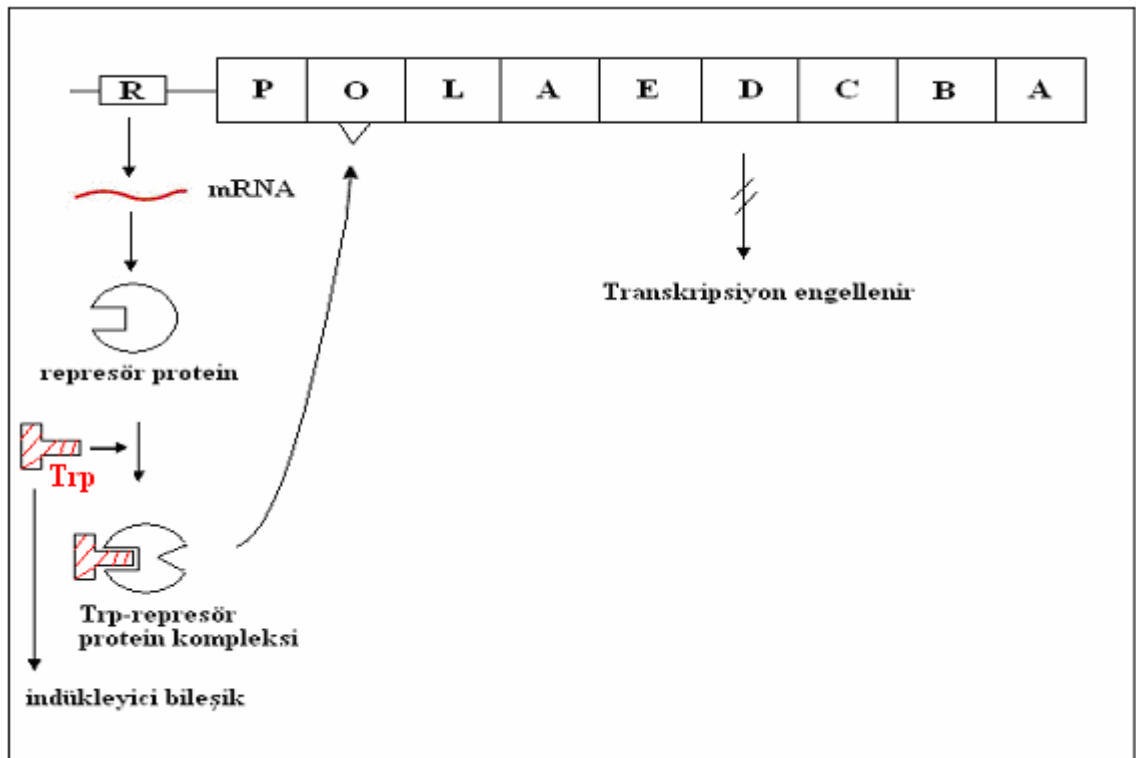
A : attenuatör

E, D, C, B ve A : yapısal genler

Triptofanın sentezini sağlayan başlıca beş yapısal gene karşılık gelen protein tek başına sentezlenir. Triptofan operonu lac operon modelinden farklılık gösterir. Lac operonunda “I” genine karşılık gelen represör protein oluştuktan sonra “O” genine bağlanarak yapısal genlerin transkripsiyonunu önlemekteydi. Triptofan operonunda ise “R” genine karşılık represör bir protein oluşur. Ortamda triptofan yoksa bu “O” genine bağlanamaz bağlanamayınca yapısal genlerin transkripsiyonu gerçekleşir (Şekil 1.19). Triptofanın varlığında ise direkt olarak triptofanın represör proteine bağlanmasıyla konformasyonu değişerek “O” genine bağlanır ve bunun sonucu olarak yapısal genlerin transkripsiyonu engellenir (Şekil 1.20).



Şekil 1.18. Triptofan operonunda yapısal genlerin indüklenmesinin gösterimi (Keha ve Küfrelioğlu 2004)



Şekil 1.19. Triptofan operonunda yapısal genlerin baskılanmasının gösterimi (Keha ve Küfrelioğlu 2004)

Triptofan operonunda düzenleyici bölgede lider dizisi (L) adı verilen bir bölgenin olduğu ve lider dizi içerisinde Attenuatör (A) adı verilen bir bölgenin olduğu belirlenmiştir. Attenüasyon güç kaybı anlamına gelmektedir. Yüksek triptofan konsantrasyonunda attenuasyon gerçekleşir. Prokaryotlarda transkripsiyon ve translasyon eş zamanlı olarak gerçekleşir. Buna göre, yüksek triptofan konsantrasyonunda lider dizinin üzerinde transkripsiyonun devam ettiği ancak 140 nükleotid sentezlendikten sonra mRNA sentezinin sonlandığı görülmüştür, bu sırada eş zamanda translasyon gerçekleşmekte translasyon sırasında triptofana karşılık gelen UGG kodonlarının bulunduğu bölgeden geçilerek protein sentezi UGA stop kodonunda durmaktadır. Bu olay lider dizi üzerinde olur bu olay sonunda lider diziye karşılık gelen mRNA saç tokası şeklini alan bir yapı kazanarak transkripsiyonun devamı engellenir. Düşük triptofan konsantrasyonunda ise yine lider dizi üzerinde transkripsiyon devam ederken eş zamanlı olarak translasyon da devam etmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Triptofana karşılık gelen UGG kodonlarına gelindiğinde bunlara karşılık amino asit taşıyan tRNA olmadığından ribozom duraklar ve protein sentezi hemen gerçekleşmez. Bunun sonucu olarak mRNA üzerinde saç tokası yapısı oluşmaz attenuasyon asılır, lider diziden sonraki beş yapısal gen birbiri ardına transkripsiyona uğrar (Lodish *et al.* 2001; Klug 2002; Keha ve Küfrevioğlu 2004; Lehninger 2005).

1.4.4. Gen ekspresyon analiz yöntemleri

Günümüzde protein yapısındaki modifikasyonlar ve protein-protein etkileşimlerinin incelenmesi amacıyla protein çalışmaları kullanılırken, hücre ve dokularda fizyolojik veya patolojik bir etkinin cevabının incelenebilmesi amacıyla mRNA ekspresyon çalışmalarına başvurulmaktadır. Bilinen kantitatif protein ekspresyon analizlerinin başında “western blot” tekniği gelmektedir. Western blot, dokudan izole edilen proteinlerin antijen-antikor tanıma özgülüğü tekniğine dayalı olarak tanımlanması prensibi ile çalışmaktadır. Organ, doku ve hücrelerin mRNA düzeyinde incelenebilmesi, özgül olarak gen düzeyinde kantitatif analiz fırsatı vermektedir. mRNA ekspresyon

analizleri “Northern blot, RT-PCR ve mikroarray” tekniği ile gerçekleştirilebilmektedir. Northern blot tekniği, mRNA’ların bir membrana transferi sonrası, radyoaktif işaretli probalar ile hibridizasyonu esasına dayanmaktadır. RT-PCR (Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu) tekniğinde mRNA üzerinden revers transkriptaz enzimi ile cDNA sentezlenir ve gene özgül primerler ile PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) gerçekleştirilir. Bu teknik ile gen ekspresyonu semikantitatif veya kantitatif olarak analiz edilebilir.

Semi-kantitatif RT-PCR tekniği ile farklı fizyolojik veya patolojik durumlarda, hücre veya doku seviyesinde bir genin ekspresyonunun olup olmadığı belirlenebilir, ayrıca izlenen ekspresyon değişikliğinin bir diğer örnek veya örnek grubu ile karşılaştırması yapılabilir. İncelenen gen veya hedef dizinin kopya sayısının bilinmesinin gerektiği hallerde kantitatif RT-PCR yöntemi kullanılmaktadır. Kantitatif RT-PCR analizleri, özellikle Real Time PCR cihazları kullanılarak gen ekspresyon miktarının sayısal olarak belirlenebildiği çalışmalardır (Yüzbaşıoğlu 2008).

1.4.4.a. Real-Time PCR

1988 yılında “thermus aquaticus” bakterisinden saflaştırılan, ısıya dayanıklı polimerazın (taq polimeraz) kullanımı ile birlikte DNA zincirinin önceden belirlenen bir bölgesini çoğaltmak için kullanılan PCR, moleküler genetik alanında devrim niteliği taşıyan bir yöntemdir. Son yıllarda PCR’da sıcaklık döngülerini sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, Real-time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur (Higuchi *et al.* 1993). Real Time PCR teknolojisini ilk defa Higuchi ve arkadaşları tarafından 1992 ve 1993 yıllarında geliştirilmiştir (Higuchi *et al.* 1992; Higuchi *et al.* 1993).

Real Time PCR, DNA amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesi ile kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir. Yöntem için özel deteksiyon sistemine sahip bir PCR cihazı gerekmektedir. Gen anlatımının analizini değiştiren bu metod ile geleneksel PCR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. Ekstra

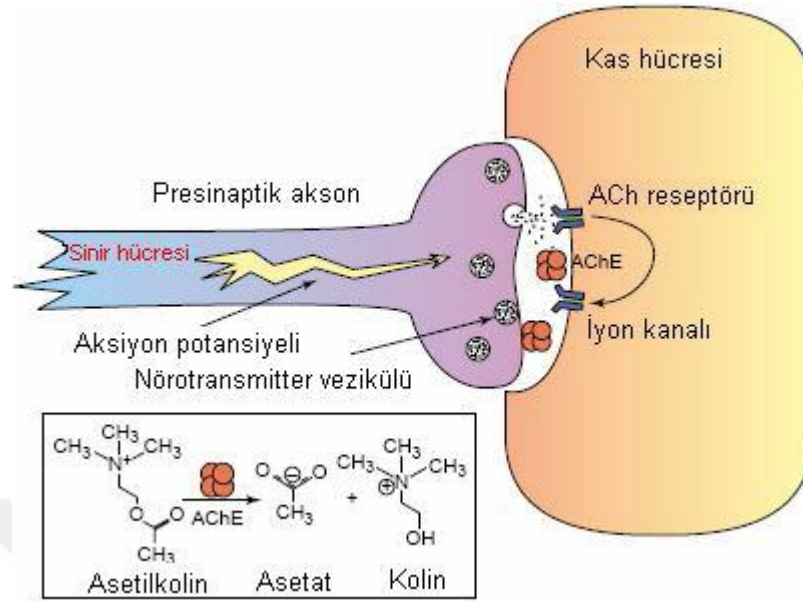
görüntülemeye gerek duyulmaması, nitelik ve nicelik yönünden kısa sürede çok sayıda örneği analiz edebilmesi, sonuçların kantitatif olarak verilmesi, dizilemeye gerek kalmadan tek nükleotid farklılıklarının saptanabilmesi ve tüpte uygulandığı için kontaminasyon riskini en aza indirmesi yöntemin avantajları arasındadır. Bu yönüyle bilim ve tıp alanındaki çalışmalarda nükleik asit miktarı belirleme analizleri içerisinde en etkili tekniğin Real-time PCR olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca ürün analizinin agaroz jel elektroforezi ve DNA veya RNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi basamakları ortadan kaldırmaktadır. Klasik PCR ile ise çok karmaşık bir örnekten herhangi bir nükleik asit dizisini analiz etmek için çok sayıda döngüsel işlemle istenilen miktarda çoğaltmak mümkündür. Ancak bu işlem tek başına matematiksel olarak ürün miktarı hakkında bilgi sağlamamakla birlikte sonrasında da ürün miktarını net olarak belirlemek oldukça güçtür (Rasmussen *et al.* 2001). Bu özellikleri göz önüne alındığında, Real-time PCR; gen ifadenmesinin ölçümü, kanser genetiği, kromozomlardaki sayısal ve yapısal bozuklukların (mutasyon) analizi, enfeksiyon hastalıklarının tanısı ve tedavi takibi, DNA hasarının belirlenmesi (mikrosatellit instabilitesi), epigenetik araştırmaları (metilasyon belirlenmesi), kemik iliği transplantasyonu sonrası minimal rezidüel hastalık (MRD) ve kimerizmin izlenmesi, anne kanından izole edilen tek hücreden prenatal tanı ve hemoglobinopatilerin prenatal tanısı gibi giderek artan kullanım alanları ile mikrobiyoloji ve moleküler genetik laboratuvarlarında yaygın olarak tercih edilmektedir (Foy and Parkes 2001; Dietmaier and Hofstädter 2001).

Real Time PCR uygulamalarında normalizasyon amacı ile çeşitli koşullarda ekspresyonu değişmediği bilinen (en az etkilenen) bir referans (Housekeeping) gene ihtiyaç vardır (Bustin 2002). Özellikle farklı bireylerden alınan ya da aynı bireyden farklı dönemlerde alınan örneklerle yapılan çalışmalarda, ilgilenilen genin ekspresyon düzeyinin incelenebilmesi için dokularda ekspresyonu değişmediği varsayılan bir başka gen ürününün mRNA'sı ile normalizasyon yapılması gereklidir. İlgilenilen genin ekspresyon düzeyi, referans gen olarak kullanılan housekeeping genin ekspresyon düzeyine oranlanır. Bu oranlamayla amaçlanan izole edilen RNA miktarı ve sentezlenen cDNA miktarının getirdiği örnekler arası başlangıç farklılıklarını, deneysel hataları

normalize etmektir. Bu nedenle farklı doku ve hücre tiplerinde, hedef genlerin ekspresyon düzeyinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, önce referans olarak kullanılacak housekeeping genin doğru seçilmesi gereklidir. Çalışmalarda kullanılacak housekeeping genin ekspresyon düzeyi, ne kadar az değişkenlik göstererek sabit kalırsa, hedef genin ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için o kadar güvenilir bir referans olacaktır. Bu amaçla en yaygın kullanılan genlerden birisi de gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) genidir (Jung *et al.* 2007).

1.5. Asetilkolinesteraz Enzimi (EC 3.1.1.7)

AChE membrana bağlı bir enzimdir. Beyinin gri cevherinde, sinir hücrelerinde, kasta, akciğer, dalak, plazma ve eritrositlerde bulunur (Milatovic and Schetinger 2000). Aynı zamanda sarkoplazmik retikulum, lökosit, trombosit, kemik iliği ve plasentada mevcuttur (Wilson and Nachmansohn 1954). AChE kolinerjik sinapsiste nörotransmitter asetilkolini hidroliz ederek birkaç fiziksel olayın düzenlenmesinde önemli rol oynar. Hidroliz edilen bu asetilkolin büyük biyolojik öneme sahip bir esterdir. Beyindeki nörotransmitter ACh'nin sinaptaki varlığı AChE enziminin etkinliğine bağlıdır. Üretilen ACh presinaptik nöronlardaki veziküllerde depolanır ve bu veziküller, nörona sinir uyarısı geldiğinde içeriğini sinaptik aralığa döker (Tucek 1978; Guyton and Hall 2000). Sinaptik aralığa salınan ACh moleküllerinin çoğu postsinaptik reseptörlere bağlanır. Reseptörlere bağlanmayan ACh molekülleri AChE tarafından hidroliz edilir. Postsinaptik nörona bağlanan ACh molekülleri, sinir uyarısının diğer nörona iletilmesinin ardından reseptörden ayrılır ve AChE tarafından hidroliz edilir. Açığa çıkan kolin yeniden kullanılmak üzere presinaptik nörona gönderilir (Şekil 1.21) (Temel 2008).



Şekil 1.20. Asetilkolin metabolizması

Alzheimer hastalığının başlaması ile birlikte gerçekleşen nöron ve akson kaybı daha düşük düzeylerde asetilkolin salınımına neden olur. Sonuç olarak, konsantrasyondaki nörotransmitter düzeylerinde sinir iletilerinin devamlılığının sağlanması ve bilgilerin aktarımı daha güç bir hal alacaktır. Bu durumu düzeltmek için uygulanacak yöntemlerden biri günümüzde zor olan asetilkolinin benzeri maddelerin verilmesidir. Asetilkolin düzeylerini arttırmak için uygulanacak bir diğer yöntem ise asetilkolini yıkan AChE enziminin baskılanmasıdır. Çalışmalar AChE inhibisyonuna bağlı asetilkolin düzey artışlarının, Alzheimer hastalığının erken evrelerindeki kognitif defisiti iyileştirebileceğini göstermiştir. Kolinerjik eksikliğin klinik tablo ile olan yakın ilişkisi nedeniyle asetilkolinin sinaptik aralıkta daha uzun kalmasını sağlama amacı, günümüzde hastalığın semptomatik tedavisinde en sık uygulanan stratejidir. Bu amaca yönelik olarak çoğunlukla kolinesteraz enzim inhibitörleri kullanılmaktadır (Şahin 2002; Thacker 2003). Kolinerjik belirleyici olan bu AChE aynı zamanda kan damarları içinde esnekliği sağlayan asetilkolini hidroliz ettiği için koroner arter hastalığı üzerinde de bir etkiye sahiptir (Collins *et al.* 1995). Yapılan bazı çalışmalara göre kolinerjik sistemlerin anjiyogenezin (yeni damarların oluşması) düzenlenmesinde bir role sahip olduğu vurgulanmıştır. Kolinerjik sistemde düzenleyici bir etki gösteren ve Alzheimer hastaları için kullanılan bazı AChE inhibitörlerinin, kardiyovasküler hastalarda

anjyogenezin (yeni damarların oluşması) artmasında rolü olduğu vurgulanmıştır (Yoshihiko *et al.* 2010).

Alzheimer ve koroner arter gibi hastalıkların asetilkolin eksikliği ile derin bir bağlantısı olduğu için AChE enzimini inhibe eden bazı ilaçlar bu hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. AChE enzimini inhibe eden bu ilaçlara kolinesteraz inhibitörleri veya antikolinesterazlar denilmektedir. Kolinesteraz inhibitörleri AChE'nin yıkımını inhibe ederek anjyogenezisantral ve periferik kolinerjik fonksiyonu güçlendirmektedir. Bu inhibitörler, enzimi tersinir veya tersinir olmayan şekilde inhibe ederek asetilkolin hidrolizini engeller ve reseptörler üzerinden artmış bir etkinin ortaya çıkmasına neden olurlar (Ercan 2002).

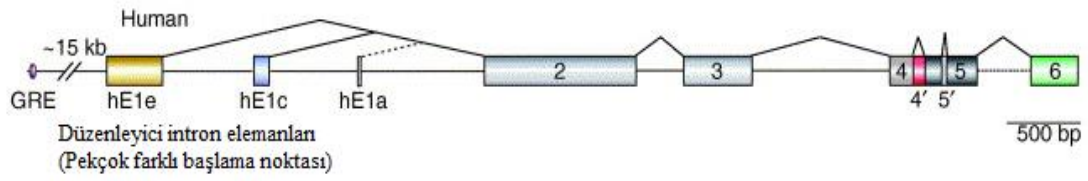
AChE ayrıca, amiloid β -protein ($A\beta$) plakların birikimini hızlandırıcı rol oynamaktadır. AChE, $A\beta$ ile etkileşerek enzimin periferik anyonik bölgesinin (PAS) yakınında bulunan bir amino asit havuzu yoluyla amiloid fibril oluşumunu artırır. AChE inhibitörü moleküller, AChE'nin ya sadece periferik anyonik bölgesi ile ya da hem periferik anyonik bölgesi hem de katalitik bölgesi (CAS) ile etkileşip $A\beta$ birikimini de engelleyebilmektedirler (Inestrosa *et al.* 1996; Ferrari *et al.* 2001; Anand *et al.* 2012). β amiloid ve serbest radikal üretimi arasında çift yönlü bir ilişki vardır. Oksidatif süreç yalnızca β -amiloidin agram β -amiloide dönüşmesi sırasında gerçekleşmez aynı zamanda β -amiloidin kendisinde serbest radikal üretir. β -amiloid vasküler endotel hücrelerle etkileşir süperoksit radikalleri ve lipid peroksidasyonuna neden olan okside edici ajanlar üretir. Bu veri β -amiloidin serbest radikallerin üretilmesinde ve nörodejeneratif hastalıklarda rol oynadığını göstermektedir (Christen 2000).

1.5.1. Asetilkolinesterazın genetik özellikleri ve aktif merkezi

Omurgalı canlılarda AChE ve bütirilkolinesterazı (BKE) kodlayan iki farklı kolinesteraz geni bulunmaktadır. Kolinesterazlar birden fazla transkripsiyon başlatma bölgesi içeren, alternatif gen dizilimlerine izin verebilen özellikte bir gen bölgesi tarafından kodlanmaktadır. Sentezlenen kolinesterazların katalitik bölgeleri ve amino asit sayıları

aynı olmakla birlikte, farklı karboksil uç peptit dizilimlerine sahiptirler (Massoulie 2002; Massoulie *et al.* 2008). İntron elemanları arasındaki başlama noktalarının çeşitliliğinden kaynaklı farklı gen bölgelerinin birleştirilmesi sonucu kolinesterazlarda çeşitli özelliklerde moleküler formlar oluşmaktadır (Massoulie 2002; Massoulie *et al.* 2008).

AChE geni, insanda 7. kromozomun uzun kolunun 22. bölgesinde yer alan, altı ekson içeren ve 7 kilobaz uzunluğunda bir gendir. AChE'nin kolinerjik sinir iletiminin düzenlenmesi ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. AChE gen lokusunda oluşan ve protein ekspresyonunu etkileyen mutasyonlar çeşitli patolojik koşullara sebep olmaktadır (Gibney *et al.* 1990; Getman *et al.* 1992).

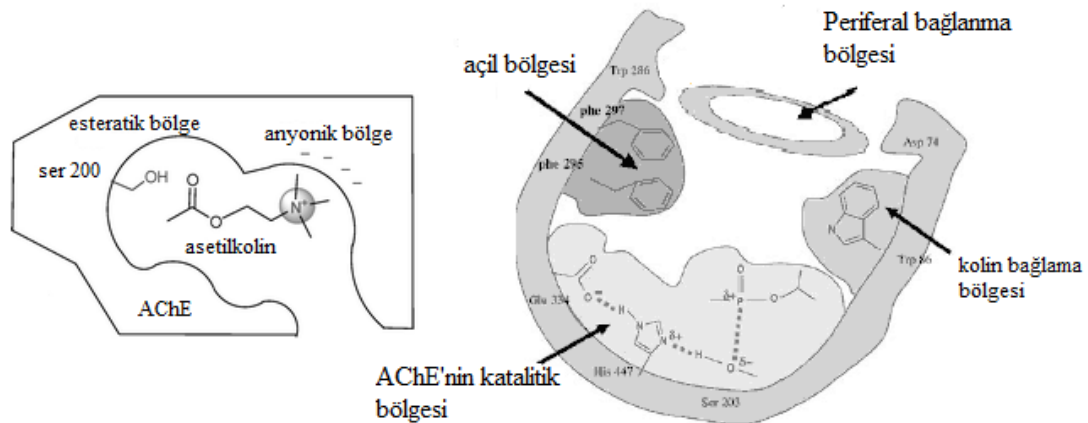


Şekil 1.21. AChE geni şeması

AChE sinir iletiminin durdurulmasında yaşamsal bir öneme sahip olduğundan AChE geni canlılarda korunmuştur. Bunun bir sonucu olarak AChE'nin genetik olarak çeşitlilik göstermediği öne sürülmüştür (Getman *et al.* 1992). Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda AChE öncül mRNA'sında alternatif kırılma işlemi sonrası farklı protein ürünlerinin olduğu saptanmıştır (Pisanti *et al.* 2014). AChE mRNA varyantları, geninin 5 'ucunda pekçok farklı başlama noktası kullanımından hem de ekzon 4, 5 ve 6 alternatif birleştirmeden kaynaklanan birden çok izoforma sahiptir (Meshorer and Soreq 2006). Bu farklı AChE varyantlarının karboksi uç kısmındaki dizileri farklılık göstermektedir. Buna göre sinaptik AChE (AChE -S), eritrosit AChE'si (AChE -E) ve tümüyle transkribe edilen AChE varyantı (read-through) (AChE-R) olarak sınıflandırılmaktadırlar. Sinaptik AChE varyantı, karboksi uç kısmında sistein rezidüsü içermektedir, bu sisteinler disülfid köprüsü oluşturarak dimerizasyon gerçekleşmesini kolaylaştırmaktadır. Eritrosit AChE'sinin karboksil uç kısmında bulunan glisin transamidasyona uğrayarak etanolamin-glukan-fosfatidilinositol (GPI) ile birleşir ve

olgun eritrosit yüzey AChE'sinin üç boyutlu yapısı tamamlanmış olur. AChE, eritrosit membranlarında, sinir dokusu ve iskelet kaslarında bulunur. Eritrosit AChE aktivitesi, sinir sistemi AChE fonksiyonu ile paralel seviyededir. AChE -R varyantı ise monomer bir yapıdır (Soreq and Seidman 2001; Perry *et al.* 2002).

Kolinesterazların karboksil uç kısmındaki amino asitler çeşitlilik göstermekle birlikte korunmuş durumdadır ve bu amino asitler katalitik üçlü adı verilen enzimin aktif merkezini oluşturmaktadır (Chatonnet and Lockridge 1989). Her AChE molekülünün alt birimi başına bir adet aktif merkezi bulunmaktadır. Perifer anyonik bölge ve merkezdeki esteratik bölge aktif merkezin ana bileşenleridir (Nair and Hunter 2004; Bulut vd 2013). Anyonik bölgede glutamat rezidüsü, esteratik bölgede serin amino asidine ait -OH grubu ve imidazol halkası mevcuttur. Esteratik bölgeye ek olarak aktif merkezde açıl bölgesi ve kolin bağlama alt bölgesi bulunmaktadır. Bu bölgede kolin bağlayıcı alt birim katyonik ligandlara daha kolay bağlanabilmektedir. Anyonik bölgelere bağlanmayı sağlayan kısım ise periferik anyonik bölge olarak adlandırılmaktadır (Augustinsson *et al.* 1974; Rosenberry and Scoggin 1984; Nair and Hunter 2004).



Şekil 1.22. Enzimin anyonik ve esteratik bölgesini gösteren AChE'nin aktif bölgesinin genel gösterimi

AChE'nin aktif merkezinde yer alan anyonik bölge asetilkoline bağlandığında asetilkolinin yapısında bulunan ester bağı enzimin esteratik bölgesine yaklaşır ve hidroliz sırasında asetil grubunun esteratik bölgedeki serin rezidüsüne bağlanması mümkün olmaktadır (Nair and Hunter 2004). Bu bölge hem katalitik etkinliğin düzenlenmesine (substrat inhibisyonu) hem de AChE'nin pek çok inhibitör ile etkileşimine aracılık eder. AChE'nin β amiloid yumak oluşumuna yol açan katalitik olmayan rolünün gerçekleşmesinde periferik anyonik bölge önemlidir (Grisaru *et al.* 1999; Talesa 2001).

1.6. Çalışmada Kullanılan Fenolik Bileşikler

Benzen halkası içeren organik maddeler genel olarak “fenolik bileşikler” olarak bilinmektedirler. ‘Fenol’ adıyla bilinen hidroksibenzen, bir başka deyişle bir adet hidroksil grubu taşıyan benzen, fenolik bileşiklerin en basit şeklidir. Diğer tüm fenolik bileşikler hidroksibenzenden türemişlerdir (Hulme 1971; Cemeroğlu ve Acar 1986).

Yaygın olarak kullanılan ismi polifenoller olan fenolik bileşikler bitkilerde fazla miktarda bulunan, meyve ve çiçeklere renklerini veren, bitkileri çeşitli çevresel stres faktörlerine karşı koruyan, benzen halkasına hidroksil grubu bağlı olan kimyasal bileşiklerdir (Kahkonen *et al.* 1999; Ergün *et al.* 2002; Cemeroğlu *et al.* 2004). Bu bileşikler, lipidlerin ve diğer biyomoleküllerin (protein, karbohidrat, nükleik asitler) serbest radikaller tarafından okside olmalarını engellemek için aromatik halkalarındaki hidroksil gruplarında bulunan hidrojeni verebilmektedirler (Burda and Oleszek 2001). Fenolik asitler ve onların türevlerinin bu antioksidan kapasiteleri aromatik halkaya bağlı hidroksil gruplarının konumuna ve sayısına bağlıdır (Gülçin 2012). Fenolik bileşikler doğal antioksidan maddelerdir ve bu bileşiklerin antioksidan etkisi, serbest radikalleri temizleme (Rice-Evans *et al.* 1995), metal iyonlarla bileşik oluşturma (metal şelatlama) ve singlet oksijen oluşumunu engelleme ile azaltma (Rice-Evans *et al.* 1995) gibi özelliklerinden ve genellikle fenol radikalının rezonans kararlılığından dolayı meydana gelmektedir (Fessenden and Fessenden 1990).

Fenolik maddelerin biyoyararlılığı onların molekül büyüklüğü, çözünürlük vb. özellikleri tarafından belirlenen absorblanma ve metabolize olma yeteneklerine bağlıdır. Yapısal olarak fenolik bileşikler bir aromatik halkaya bağlı hidroksil grupları ile karakterize edilir ve basit fenolik maddelerden daha karmaşık yapıları polimerize bileşiklere kadar geniş bir yelpaze içinde yer alırlar. Fenolik asitler mono ve polisakkaritler ile konjuge olmuş, bir ya da daha fazla fenolik gruba bağlı veya ester ve metil esterlerin fonksiyonel türevleri halinde bulunabilirler (Balasundram *et al.* 2006).

Fenolik asitler, bitkilerin kokusundan, tatlarından, renklerinden sorumludurlar ve sadece küçük bir grubu doğada serbest olarak bulunmaktadır. Bu tür bileşiklerin gıdalarda bulunması besinlerin kararlılığını, rengini, kokusunu, besin değerini ve kalitesini de belirgin şekilde etkilemektedir (Robbins 2003). Bundan dolayı fenolik asitler gıdalarda raf ömrünü uzatmak için koruyucu maddeler olarak kullanılabilmektedirler. Ayrıca fenolik asit içeren pek çok bitkide bazı hastalıklarda tedavi edici olarak kullanılmaktadır (Bektaş 2005). Fenolik bileşikler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluşturmaktadırlar (Shahidi and Wanasundara 1992; Moure *et al.* 2001). Bu bileşikler meyve, sebze, baharat, tahıl ve içecekler gibi bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunmaktadır (Katiyar and Mukhtar 1997).

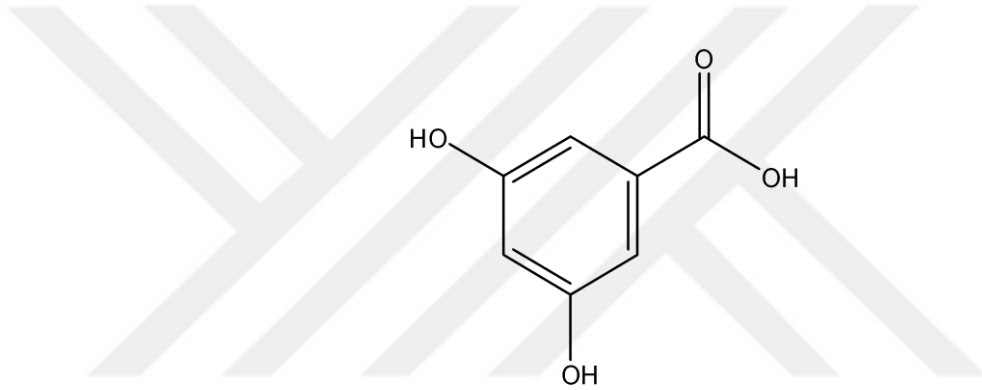
Son yıllarda bitkisel kökenli gıdalarda bulunan fenolik bileşiklerin yoğun bir şekilde incelenmesi, bunların insan sağlığı ile yakından ilişkisi olduğunun saptanmasından ve özellikle de kanser oluşumunu azalttığı yönündeki epidemiyolojik bilgilerden kaynaklanmaktadır.

Fenolik asitler, özellikle kanser ve koroner kalp hastalıkları gibi ölümcül hastalıklara karşı koruyucu etkide bulunma potansiyelleri nedeniyle üzerinde oldukça yaygın çalışmalar yapılan önemli bileşiklerdir (Mattila *et al.* 2002). Bununla birlikte anti-allerjik, antienflamatuvar (iltihap oluşumunu önleyici), antimikrobiyal, antioksidan, antitrombotik (kan pıhtılaşmasını engelleyici) ve vasodilatory (damar genişletici) olmak üzere pek çok etkisi olduğu kanıtlanmış ve bu yararlı etkilerinin temel sebebinin ise

antioksidan özellik göstermelerinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Balasundram *et al.* 2006).

1.6.1. 3,5-Dihidroksi benzoik asit

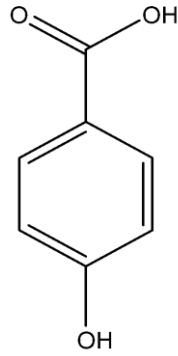
Molekül formülü $C_7H_6O_4$ ve molekül kütlesi 154,12 g/mol'dür. α -Resorsilik asit olarak da bilinir. Erime noktası 236-238°C'dir. Sudaki çözünürlüğü çok az iken etanolde çözünürlüğü yüksektir.



Şekil 1.23. 3,5-dihidroksi benzoik asit molekülünün yapısal formülü

1.6.2. 4-Hidroksi benzoik asit

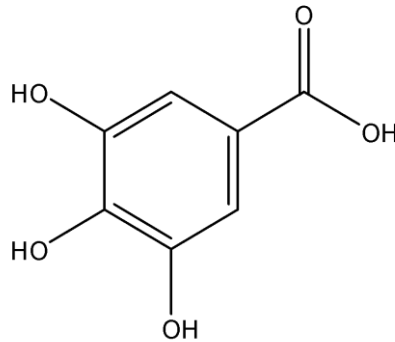
Molekül formülü $C_7H_6O_3$ ve molekül kütlesi 138,12 g/mol olan fenolik asit türevidir. Erime noktası 214-217°C'dir. p-Hidroksi benzoik asit olarak da adlandırılır. Beyaz kristaller şeklinde bulunur. Suda çözünürlüğü az olmasına rağmen alkol, eter ve asetonda oldukça iyi çözünür (Anonim 2007).



Şekil 1.24. 4-hidroksi benzoik asit molekülünün yapısal formülü

1.6.3. Gallik asit

Gallik asit (3,4,5-trihidroksibenzoik asit) bitkilerde doğal olarak üretilen bir polifenoldür (Stanely *et al.* 2009). Molekül formülü $C_7H_6O_5$ ve molekül kütlesi 170,12 gr/mol'dür. Erime noktası $251^{\circ}C$ 'dir. Bazı hastalıkların riskini azalttığı bilinmektedir (Hsu and Yen 2007). En önemli kaynağının çay olduğu bilinmektedir (Gupta *et al.* 2007). Ayrıca kestane ve üzümde de bulunmaktadır (Stanley *et al.* 2009).

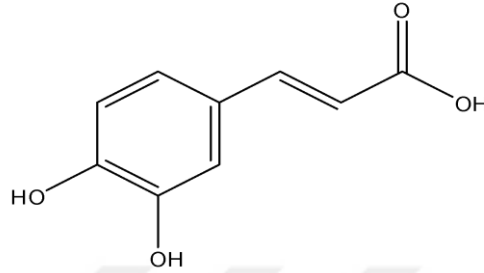


Şekil 1.25. Gallik asit molekülünün yapısal formülü

1.6.4. Kafeik asit

Molekül formülü $C_9H_8O_4$, molekül kütlesi 180,16 g/mol'dür. 3,4-dihidroksi sinnamik asit olarak da adlandırılır. Sarı kristalize halde bulunur. Erime noktası $223-225^{\circ}C$ 'dir.

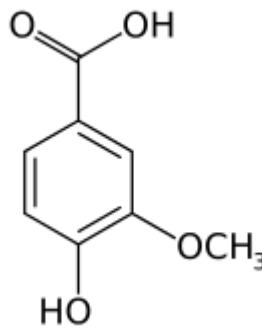
Sıcak suda ve alkolde çözünürlüğü oldukça iyidir (Anonim 2007). Doğal bir fenolik asit olduğu için pek çok bitkide bulunmaktadır. Elma, üzüm, erik, yulaf gibi çeşitli meyvelerde bulunmaktadır (Huang and Ferraro 1991).



Şekil 1.26. Kafeik asit molekülünün yapısal formülü

1.6.5. Vanilik asit

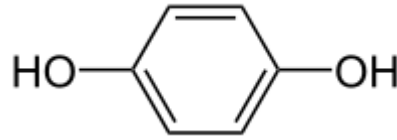
Molekül formülü $C_8H_8O_4$, molekül kütlesi 168,14 g/mol olan dihidroksibenzoik asit türevidir. 4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit olarak da adlandırılır. Açık sarı kristalize halde bulunur. Erime noktası $210-213^{\circ}C$ 'dir. Sıcak su, benzen, eter, kloroform ve alkolde çözünür. Bugüne kadar bilinen bitkilerde vanillik asitin en yüksek miktarı *Angelica sinensis* kökünde bulunur. Bu bitki geleneksel Çin tıbbında kullanılan Çin'e endemik bir bitkidir (Duke 1992). Açaı hurma (*Euterpe oleracea*) meyvesinden elde edilen Açaı yağı da vanilik asit açısından zengindir (Pacheco 2008).



Şekil 1.27. Vanilik asit molekülünün yapısal formülü

1.6.6. Hidrokinon

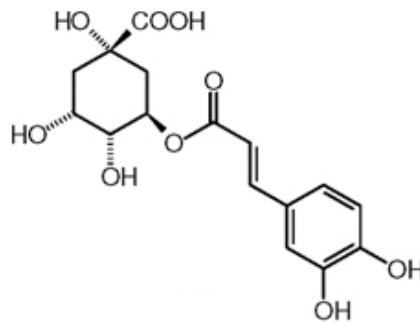
Molekül formülü $C_6H_4(OH)_2$, molekül kütlesi 110,11 g/mol olan fenol tipinde aromatik organik bileşiktir. Kimyasal yapısı bir benzen halkasına para konumda bağlı iki hidroksil grubundan oluşur. Benzene-1,4-diol olarak da adlandırılır. Beyaz tanecikli halde bulunur. Erime noktası $172^{\circ}C$ 'dir. Su, eter ve alkolde çözünür. Hidrokinon yaygın iki üç yöntemle endüstriyel olarak üretilir.



Şekil 1.28. Hidrokinon molekülünün yapısal formülü

1.6.7. Klorojenik asit

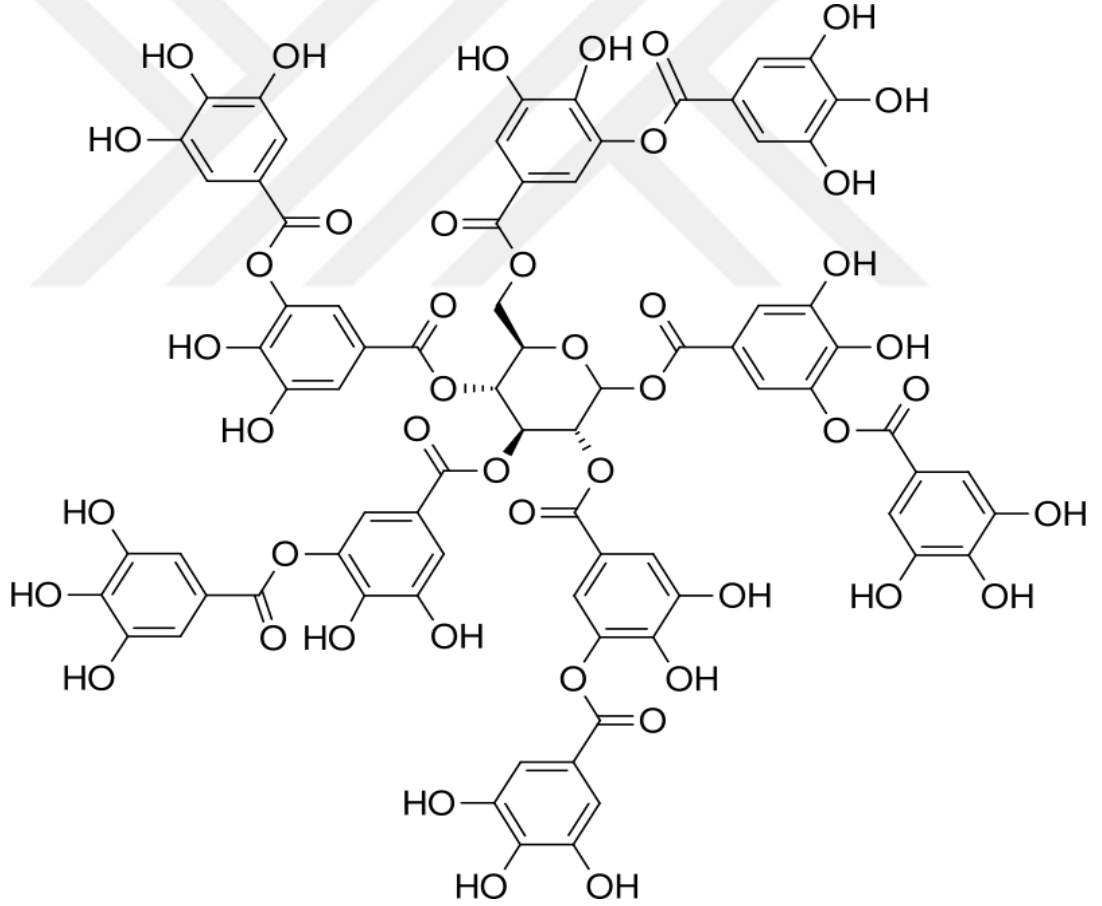
Molekül formülü $C_{16}H_{18}O_9$, molekül kütlesi 354,31 g/mol ve kafeik asit esteri olan doğal bir bileşiktir. 3-O-kafeoilkinik asit olarak da adlandırılır. Erime noktası $207-209^{\circ}C$ 'dir. Aseton, DMSO ve etanolde çözünür. Bu bileşik önemli bir biyosentetik ara ürünüdür (Boerjan 2003). Birçok bitkide bulunan ana fenolik bileşiklerden biridir (Cheng and Crisosto 1995; Clifford 2003).



Şekil 1.29. Klorojenik asit molekülünün yapısal formülü

1.6.8. Tannik asit

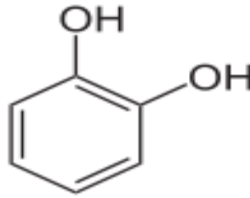
Molekül formülü $C_{76}H_{52}O_{46}$, molekül kütlesi 1701,19 g/mol'dür. Tanen olarak da adlandırılır. Açık sarı-kahverengi toz halde bulunur. Erime noktası en fazla 200°C'dir. Suda az, alkol ve asetonda iyi çözünür. Ticari tanik asit, genellikle *Caesalpinia spinosa* ve *Rhus coriaria* gibi bitkilerden elde edilir. Bu bileşiğin kan pıhtılaşmasını hızlandırma, kan basıncını azaltma, serum lipit düzeyini azaltma, karaciğer nekrozu azaltma ve immun sistemini düzenleme gibi birçok fizyolojik etkilere neden olduğu bildirilmektedir (Chung *et al.* 1998).



Şekil 1.30. Tannik asit molekülünün yapısal formülü

1.6.9. 1,2-Dihidroksi benzoik asit

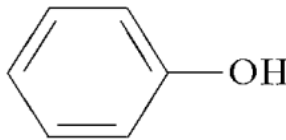
Molekül formülü $C_6H_6O_2$, molekül kütlesi 110,1 g/mol olan katekol olarak bilinen organik bir bileşiktir. 3,4-dihidroksi sinamik asit olarak da adlandırılır. Kahverengi kristal halde bulunur. Erime noktası $245^{\circ}C$ 'dir. Su, asetat ve eterde çözünür. İlk olarak kateşin bitki ekstraktından damıtılarak keşfedilmiştir. Katekol hidrojen peroksit kullanılarak fenol hidroksilasyon ile endüstriyel olarak üretilir. Katekol az miktarlarda polifenol oksidaz enzimi ile meyve ve sebzelerde doğal olarak meydana gelir.



Şekil 1.31. 1,2-Dihidroksi benzoik asit molekülünün yapısal formülü

1.6.10. Fenol

Molekül formülü C_6H_6O , molekül kütlesi 99,11 g/mol olan ve karbolik asit olarak da bilinen fenol aromatik organik bir bileşiktir. Kristalize katı halde bulunur. Erime noktası $40,5^{\circ}C$ 'dir. Sıcak suda çözünür.



Şekil 1.32. Fenol molekülünün yapısal formülü

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bazı hastalıklar enzimlerin sentezi esnasında genetik yönden saptanan anormalliklere bağlıdır. Hücre harabiyeti olduğunda bazı enzimler plazma ve seruma salınır. Bu tür enzim aktivitelerinin ölçümü tıbbi bozuklukların tanısında önemli bir yaklaşım olarak görülür. Çoğu enzimler hayati olayların düzenlenmesinde rol aldıklarından dolayı bunların aktivitelerindeki artış ve azalışlar, hücrelerin normal fonksiyonlarının bozulmasına ve bazı hastalıklara neden olmaktadır (Ersoy ve Bayşu 1986). Bunun en iyi örneklerinden biri olan Alzheimer hastalığında beyinde nörotransmitterler azalmaktadır. Alzheimer hastalığında en çok azalma gösteren nörotransmitter asetilkolindir (Pillay *et al.* 2003). Düşük nörotransmitter düzeylerinde sinir iletilerinin devamlılığını sağlamak daha güç bir hal alır. ACh düzeylerini artırmak için uygulanacak yöntem ACh'yi yıkan asetilkolinesteraz (AChE) enziminin baskılanmasıdır. Bundan dolayı genellikle kolinesteraz enzim inhibitörleri kullanılmaktadır. Kolinerjik belirleyici olan AChE aynı zamanda kan damarları içinde esnekliği sağlayan asetilkolini hidroliz ettiği için koroner arter hastalığı üzerinde de önemli bir etkiye sahiptir (Collins *et al.* 1995). Yapılan bazı çalışmalara göre kolinerjik sistemlerin anjiyogenezin (yeni damarların oluşması) düzenlenmesinde bir role sahip olduğu vurgulanmıştır. Kolinerjik sistemde düzenleyici bir etki gösteren ve Alzheimer hastaları için kullanılan bazı AChE inhibitörlerinin, kardiyovasküler hastalarda anjiyogenezin (yeni damarların oluşması) artmasında rolü olduğu vurgulanmıştır (Yoshihiko *et al.* 2010).

Serebrospinal sıvı, plazma ve kan hücrelerindeki AChE aktivitesi ve enzim izoformlarındaki değişimlerin araştırılması Alzheimer hastalarında santral kolinerjik sistem durumunu yansıtacaktır. Serebrospinal sıvı örneklerinde yapılan çalışmalarda Alzheimer hastalarında AChE aktivitesinin anlamlı düzeyde azalma (% 16) gösterdiği saptanmıştır (Ceballos-Picot *et al.* 1992).

Alzheimer hastalığı sürecinde beyin AChE aktivitesi azalırken bütirilkolinesteraz (BuChE) aktivitesi değişmez ya da %40-90 oranında artış gösterir. Sonuç olarak AChE aktivitesi oranı sürekli olarak artar. Sağlıklı grupta serebrospinal sıvıda AChE

aktivitesinin yaşlanma ile arttığını, orta dereceli Alzheimer hastalarında değişiklik göstermediğini ileri süren çalışmalar vardır. Aynı zamanda Alzheimer hastalarında serebrospinal sıvı AChE aktivitesi azaldığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Giacobini *et al.* 2002).

Literatürde Alzheimer hastalığı ile ilişkili olarak periferik sistemdeki kolinesteraz değişimleri ile ilgili sınırlı sayıda veri olsa da AChE aktivitesindeki azalmanın beyin ile sınırlı olmadığı bilinmektedir (Rakonczay *et al.* 2005).

Kennedy *et al.* (1999) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmadan elde edilen veriler, rivastigminin serebrospinal sıvıda önemli derecede (%40) inhibisyona neden olurken eritrosit AChE üzerinde minimal (%3) inhibisyona neden olduğunu göstermektedir.

Xiao *et al.* (2000) tarafından yapılan bir çalışmada AChE inhibitörleri (Huperazin A ve takrin) uygulamasının, A β maruziyeti sonucunda PC12 hücrelerinde oluşan oksidatif stresin azaltılmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Her iki kolinesteraz inhibitörünün de A β 'nın oluşturduğu aşırı MDA üretimini inhibe ettiğini gösteren kanıtlar elde edilmiştir.

Oksidatif stres ve buna bağlı biyolojik etkilerin birçok hastalıkla ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Bunlar arasında kalp damar hastalıkları, diyabet, kronik renal yetmezlik, bazı kanser türleri, nöro-dejeneratif hastalıklar, katarakt, respiratuar distress sendromu, romatoid artrit gibi bazı otoimmün hastalıklar ve enfeksiyon hastalıkları bulunmaktadır (Zima *et al.* 1995; Elahi *et al.* 2009). Son yıllarda, ateroskleroz patofizyolojisinde lipid peroksidasyonunun yanısıra protein oksidasyonunun da rolü olduğu anlaşılmıştır. Protein oksidasyonu, proteinlerin ROS veya oksidatif stres ürünleri ile modifikasyonu sonucu meydana gelir. Bu ROS amino asitlerin yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna ve protein fragmentasyonuna neden olurlar (Dean *et al.* 1997). Yapılan çalışmalar vücut proteinlerinin çok çeşitli ajanlar tarafından (serbest radikaller, MDA ve konjuge dien gibi lipid peroksidasyon ürünleri, aktive makrofajlar, demir ve bakır gibi redoks aktif metaller, UV ve gama ışınları, ozon, sigara, çeşitli ilaçlar ve metabolitleri vs.) okside edilebileceğini göstermiştir (Berlett and

Stadtman 1997). Kardiyovasküler hastalıklara yol açması bakımından lipit peroksidasyonun etkilerini açıklayan önemli literatür bilgilerine rastlanırken, protein oksidasyonu ve kardiyovasküler hastalıklar arasındaki ilişki hakkında oldukça az bilgiye rastlanmaktadır (Serdar *et al.* 2006).

Kalousová *et al.* (2005) ateroskleroza olan 42 hasta ve 21 sağlıklı kontrol ile yaptıkları bir çalışmada protein oksidasyonu belirteçlerinden serum proteinlerin ileri oksidasyon ürünleri (AOPP) seviyeleri ölçülmüş olup hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Kaneda *et al.* (2002) tarafından koroner arter hastalığı şüphesiyle anjiyografi uygulanarak 140'ının sağlıklı, 252'sinin koroner arter hastası olduğu tespit edilen toplam 392 katılımcı (230'u sigara kullanıcısı, 99'u diyabetik olan) ile yaptıkları bir çalışmada plazma AOPP seviyesi ($\mu\text{mol/l}$) kontrol grubuna göre hasta grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Oksidatif stresin endotel disfonksiyonunun yanı sıra normal trombosit fonksiyonlarını da bozarak kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Trombosit fonksiyonları ile oksidatif stres ilişkisini araştıran çalışmalarda, trombositler tarafından üretilen ROS'un oksidatif stresi ve lipid peroksidasyonunu uyardığı ve kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür. Trombositler ve diğer vasküler kaynaklardan açığa çıkan bu ROS içinde, özellikle süperoksit anyonunun oksidatif stresin önemli bir kaynağı olduğu, nitrik oksit (NO) biyolojik aktivitesini azalttığı ve trombosit agregasyon yanıtını arttırdığı gösterilmiştir (Rubbo *et al.* 1994).

Surekha *et al.* (2007) tarafından 150 sağlıklı erişkin ve 150 anjiyografik olarak miyokard infarktüsü geçirdikleri tespit edilen hasta grubu olmak üzere toplam 300 katılımcı ile yapılan bir çalışmada; plazma MDA düzeylerini (nmol/mL) miyokard infarktüsü geçiren hastaların olduğu grupta $6,78 (\pm 1,80)$, kontrol grubunda ise $1,92 (\pm 0,56)$ olarak bulmuşlardır ($p < 0,01$).

Tamer *et al.* (2002) tarafından her iki cinsiyet grubunu içeren 30 sağlıklı kontrol ve koroner arter hastası oldukları anjiyografik olarak tespit edilen 45 hasta ile yaptıkları bir çalışmada; serum MDA düzeyleri karşılaştırılmış kontrol grubuna göre hasta grubunda MDA düzeyi belirgin olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

Kanbağı vd (2000) tarafından anjiyografik incelemeler sonucu tespit edilen 50 koroner arter hastası ve 17 sağlıklı birey ile yapılan bir çalışmada serum MDA düzeylerinin koroner arter hastalarında sağlıklı bireylere göre anlamlı bir farklılık oluşturmadığı bildirilmektedir.

Serbest radikaller proteinlerdeki –SH gruplarının oksidasyonuna neden olmaktadır. Glutasyon, sistein, albumin ve diğer yapılarıdaki protein –SH grupları oksidasyon zincirini kırma özelliğine sahip önemli antioksidanlardır. Bu antioksidanların oksidatif hasara karşı hassas olduğu ve koroner arter hastalığı, romatoid artrit ve diabetes mellitus gibi oksidatif hasarın meydana geldiği bazı hastalıklarda miktarının düştüğü gösterilmiştir (Erçin 2010).

Farklı hastalarda yapılan birçok çalışmada genellikle -SH gruplarında oksidatif stresle birlikte azalma olduğu saptanmıştır. Tip II diabetli hastalarda yapılan çalışmalarda total -SH değerlerinde azalma (Colier *et al.* 1990; Ceriello *et al.* 1997) bulunurken, Tip I diabetlilerle yapılan çalışmada (Asayama *et al.* 1993) plazma –SH düzeylerinde farklılık bulunamamıştır. Soszynski and Bartosz (1997) tarafından yapılan bir çalışmada oksidatif stres varlığında eritrosit membran –SH gruplarında bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Asayama *et al.* (1993)'ya göre Tip I diabetli genç hastalarda serum -SH düzeyleri incelenmiş sağlıklı bireylere göre bir farklılık bulunamamıştır.

Colier *et al.* (1990) tarafından yapılan bir çalışmada, plazma –SH seviyesinin kontrol grubu ile mukayese edildiğinde Tip II diabetlilerde anlamlı düzeyde düştüğü gösterilmiştir. Kadota *et al.* (1991) tarafından yapılan bir çalışma koroner arter hastalarında oksidatif strese bağlı olarak serum albumin -SH gruplarının belirgin olarak düşük olduğunu göstermiştir. Albümin ve total –SH içeriğinin koroner arter hastalığının

şiddetiyle orantılı olarak azaldığını göstermiştir. Forgione *et al.* (2002) tarafından yapılan bir çalışmada tiyol gruplarının oksidasyonunun ve daha önemlisi GPx'in hücresel formunun ekspresyonunun baskılanması ROS'de artışa neden olacağı bildirilmiştir.

Morrison *et al.* (1999) tarafından yapılan bir çalışmada kontrol grubu (n=78) ve koroner arter hastalığı olan (n=81) katılımcılarda serum total GSH düzeyleri karşılaştırılmış ve koroner arter hastalığı olan gruptaki ($3,20 \pm 2,2$) serum total GSH düzeyleri kontrol grubundan ($4,35 \pm 2,1$) belirgin olarak düşük bulunmuştur ($p < 0,0009$).

Alzheimer hastalığının patojenezinde protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonu ve ROS oluşumu ile etkili olan oksidatif stresin varlığı kesin bir şekilde gösterilmiştir (Dalle-Donne *et al.* 2003). Oksidatif stresin, Alzheimer hastalığında primer mi, yoksa sekonder bir olay mı olduğu kesin olmasa da, nöronal kayba yol açan önemli bir nörodejeneratif faktör olduğu açıktır (Butterfield and Lauderback 2002). Yaşlanmış beyinde sıklıkla görülen oksidatif hasar, Alzheimer hastalığında daha da şiddetli olarak görülmektedir (Dalle-Donne *et al.* 2003).

Oksidatif hasar yaşla ortaya çıkmaktadır. Fakat Alzheimer hastalarında daha fazla orandadır. Hensley *et al.* (1995) protein karbonil içeriğinin Alzheimer hastalarının hipokampuslarında %42 oranında beyin bölgesinde ise %37 oranında arttığını bulmuşlardır. Protein karbonil (PC) düzeyindeki bu artışın Alzheimer hastalarının beyinlerindeki proteinlerin kontrole mukayese edildiğinde daha çok karbonilasyona uğramasından dolayı meydana geldiğini ortaya atmışlardır.

PC düzeyi hem görünür patomorfolojik değişiklikler olmadan nöronların hücre gövdelerinde hemde nörofibriler anormallikleri olan nöronların hücre gövdelerinde artış göstermektedir (Aksenov *et al.* 2001).

Alzheimer hastalığında PC düzeylerinin β -amiloid plaklar bakımından zengin olan hipokampus ve inferior parietal lobülde arttığı, az dejeneratif özellik gösteren

serebellumda ise değişmediği gösterilmiştir (Hensley *et al.* 1995).

Dubinina *et al.* (2000) tarafından yapılan bir çalışmada depresyon hastalarında 2,4-dinitrofenilhidrazin ile PC grupları ölülmüş ve bu hastalarda protein oksidasyonunun yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır. Smith *et al.* (1994) tarafından yapılan bir çalışmada ise Alzheimer hastalarında otopside alınan beyin örneklerinde PC gruplarının kontrollere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bunun nedeninin ise beyinde oksidasyonun daha fazla olmasının bir göstergesi olduğu ve yaşla birlikte arttığı vurgulanmıştır.

Manuela *et al.* (2010) tarafından yapılan bir çalışmada hafif kognitif bozukluk (MCI) olan hastaların serumunda kontrol grubu ile mukayese edildiğinde MDA düzeyinde istatistiksel olarak önemli bir artış olduğu bulunmuştur ($F(2,42)=90$, $p<0.0005$). Aynı zamanda post hoc analizi ile MCI ve Alzheimer gruplarının serum MDA düzeyinde kontrol grubu ile mukayese edildiğinde istatistiksel olarak önemli bir artış olduğu bildirilmiştir ($p<0.0002$). Bu istatistiksel farklılık MCI ve Alzheimer grupları arasında da bulunmuştur ($p<0.0005$).

Çeşitli alışmalar Alzheimer hastalarında oksidatif hasar belirtilerini ortaya atmaktadır. Marchasson *et al.* (2001) tarafından yapılan bir çalışmada aldehit gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin (4-hidroksinonenal (HNE)) plazmada yüksek olduğu bulunmuştur. Lipid peroksidasyon ürünlerinin artışı ile antioksidan olarak bilinen askorbat ve α -tokoferol miktarı azalmıştır.

Çeşitli alışmalar, Alzheimer gibi diğer nörodejeneratif hastalıklarda lipid peroksidasyon ürünlerinde bir artış olduğunu göstermiştir (Dei *et al.* 2001). 4-Hidroksi-2-nonenal olarak akrolein ve izoprostanlar gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin seviyeleri, Alzheimer hastalarının beyin, CSF ve plazmasında arttığı bulunmuştur (Montine *et al.* 2002).

Szelenyi *et al.* (1982) tarafından yapılan bir çalışmada insan periferel kanındaki T hücrelerinde AChE aktivitesi tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Tayebati *et al.* (2002) tarafından yapılan bir çalışmada Western ve immnositokimyasal analizi ile T ve B hücrelerinde AChE ekspresyonu tespit edilmiştir.

Berson *et al.* (2008) tarafından RT-PCR yöntemi ile yapılan bir çalışmada Alzheimer hastalarının nöronlarında AChE-S mRNA düzeylerinin kontrollere göre anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Bununla birlikte, RT-PCR'ın aksine FISH analizinde ise AChE-R mRNA düzeyinde önemli derecede artış saptanmıştır. Yang *et al.* (2002) tarafından yapılan bir çalışmada semikantitatif analizler sonucu apoptotik hücrelerde AChE mRNA düzeyinin 5,34 kata kadar arttığı gösterilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve satın alındığı firmalar

Etanol	Sigma-Aldrich
4-Hidroksi Benzoik Asit	Sigma-Aldrich
3,5-Dihidroksi Benzoik Asit	Sigma-Aldrich
Hidroklorik Asit (HCl)	Sigma-Aldrich
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich
Sodyum Asetat	Sigma-Aldrich
Sodyum Fosfat	Sigma-Aldrich
Etopropazin	Sigma-Aldrich
Asetiltiyoklolin İyodür	Sigma-Aldrich
Sodyum Klorür	Sigma-Aldrich
TCA	Sigma-Aldrich
Potasyum Ferrisiyanür	Sigma-Aldrich
Potasyum Siyanür	Sigma-Aldrich
Coomessie Brilliant Blue G-250	Sigma-Aldrich
Sodyum Bikarbonat	Sigma-Aldrich
Magnezyum Klorür	Sigma-Aldrich
Tiyobarbiturik Asit	Sigma-Aldrich
DMSO	Sigma-Aldrich
DNPH	Sigma-Aldrich
Etanol	Sigma-Aldrich
Gallik Asit	Sigma-Aldrich
Potasyum Fosfat	Sigma-Aldrich

Çizelge 3.1. (devam)

DTNB	Sigma-Aldrich
Trizma	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
Salisilik Asit	Sigma-Aldrich
QIAamp RNA Blood Mini Kit	Qiagen
FastStart TaqMan Probe Master	Roche
Primer 0,02 UMol	Methabion
5 FAM / 3 TAMRA	Qiagen
5 CYS / 3 BHQ--2	Qiagen
SuperScript III First-Strand cDNA kit	Invitrogen

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar**Çizelge 3.2. Çalışmalar sırasında faydalanılan alet ve cihazlar**

Soğutmalı Santrifüj	Hermle Z 323 K (Germany)
Spektrofotometre	Beckman Coulter
Spektrofotometre	Optizen Pop
pH metre	Mettler Toledo
1, 1,5 ve 3 mL'lik Kuvarz Küvetler	Merck
1,5-2 mL'lik Tüpler ve Raklar	Eppendorf
15 mL'lik Falkon Tüpler ve Raklar	Eppendorf
Karıştırıcı (Vorteks)	IKA Vortex 4 Basic
Hassas Terazi	Gec Avery
Derin Dondurucu (-86)	New Brunswick Premium U410
Otomatik Pipet	Eppendorf
Çalkalayıcı	Midi Dual 14
Magnetik Karıştırıcı	IKA C-MAG HS7

Çizelge 3.2. (devam)

Saf Su Cihazı	Barnstead Easy Pure UV/U
Su Banyosu	Nüve
Kar Makinesi	Scotsman AF-20
Güç Kaynağı	Thermo EC EC 135-90
Nanodrop	Thermo Scientific Multiscan GO USA
Otoklav	HMC HIRAYAMA
PCR	BIO RAD C1000 Thermal Cyclers
Real-Time PCR	Qiagen Rotor-Gene Q
UV Görüntüleme Cihazı	Vilber Lourmat
Mini Santrifüj	AOSHENG
(-20°C'ye kadar)	Sanyo Medical Freezer, Uğur
(-80°C'ye kadar)	Sanyo Ultra Low

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir.

1. Coomassie brillant blue G-250 renk reaktifi (Protein tayininde kullanılan stok çözelti): 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi saf su ile 1 litreye tamamlandı.

2. Standart serum albumin çözeltisi (Protein tayininde kullanılan standart çözelti): Standart serum albumin çözeltisi (1 mg/ml; protein tayini için kullanılan çözelti): 1 mg standart serum albuminin 1 ml saf suda çözülmesiyle hazırlandı.

3. 5, 5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) çözeltisi: 0,396 g DTNB alındı ve 100 mL 0,1 M (pH:7,4) Fosfat Tamponunda çözüldü.

4. Asetiltiyokolin (ASCh) çözeltisi: 0,082 g asetiltiyokolin iyodür alındı 10 ml saf suda çözüldü.

5. 0,1 M (pH:7,4) Fosfat Tamponu : 1,78 g sodyum fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 95 mL destile suda çözüldü. 0,27 g potasyum fosfat (KH_2PO_4) ise 20ml saf suda çözüldü. Hazırlanan potasyum fosfat çözeltisiyle sodyum fosfat tamponunun pH'ı 7,4'e ayarlandı ve hacmi destile suyla 100ml ye tamamlandı.

6. 1 mM EDTA 3,4 mM EDTA çözeltisi: 0,042 g EDTA alındı ve 100 mL saf suda çözüldü.

7. Eritrosit hemolizat çözeltisi: 1 mM EDTA ve 0,5% Triton X-100 içeren 0,1 M 100 ml sodyum fosfat (pH 7,4) tamponu hazırlandı.

8. 0,5% Triton X-100 çözeltisi: 50 µl Triton X-100 alınarak 0,1M Na_2HPO_4 pH=7,4 tamponu ile 10 mL'ye tamamlandı.

9. 10 mM DNPH çözeltisi: Özkütlesi 1,19 gr/mol olan % 37'lik HCl çözeltisinden 2 N HCl stok çözeltisi hazırlandı. Bir behere 0,0198 g DNPH ekleyip folyoya sarıldı. Stoktan birer ml ekleyerek DNPH sıcakta çözüldü (DNPH (molekül ağırlığı : 198,14 g HCl:36,5 g).

10. Drapkin çözeltisi: 1 gram sodyum bikarbonat, 0,050 gram potasyum siyanit, 0,200 gram potasyum ferri siyanit bir miktar distile suda çözülerek hacmi litreye tamamlanır.

11. TBA (%2 w/v) çözeltisi: 200 mg katı TBA az miktarda NaOH içeren 10 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

12. Trikloroasetik asit çözeltisi (TCA; %20 w/v): 10 gr katı TCA, 50 ml suda çözülerek hazırlandı.

13. Tris tampon (pH 8,2, 0,2 M): 1,2 g Trizma Base, 40 mL saf suda çözülüp pH'ı 8,2'ye ayarlandıktan sonra toplam hacim 50 mL'ye tamamlanarak +4°C'de saklandı.

3.1.4. Deneyde kullanılacak kanın temini

Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenen 2014/182 nolu proje ile gerçekleştirilen bu çalışma Erzurum Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik kurulunca onaylanmıştır (EK 1). Erzurum Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji Polikliniğine başvuran 28 Alzheimer hastasından alınan periferik kan ve Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi

Kardiyoloji Polikliniğine başvuran 21 koroner arter hastasından ve kontrol grubunu oluşturan 28 sağlıklı bireyden alınan periferik kan kullanıldı.

Çizelge 3.3. Kontrol ve hasta gruplarının yaş ve cinsiyete göre dağılımı

Parametreler	Alzheimer Grup (n = 28)	Koroner Arter Grup (n = 21)	Kontrol Grup (n = 28)
Yaş	67.33 ± 2.39	68.15 ± 2.41	65.43 ± 2.39
Bayan/Erkek	17/11	7/14	15/13

Veriler ortalama ± S.D. olarak ifade edilmiştir

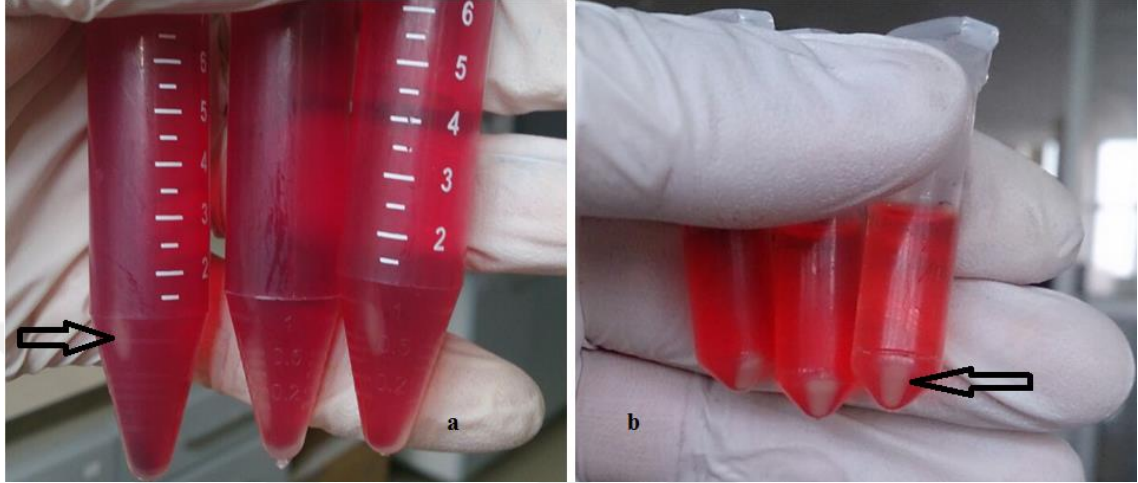
Kontrol ve hasta gruplarının 3 mL kan örneği EDTA'lı tüplere alındı. Alınan kanlar hiç bekletilmeden 1-2 saat içinde lökositlerden RNA izolasyonu yapıldı ve cDNA eldesine kadar -80°C'de saklandı. Aynı zamanda alınan bu kanlardan enzim aktivitelerini ve bazı biyomarkır düzeylerini belirlemek amacıyla eritrosit ve plazmalar ayrıldı. Hazırlanan plazma ve eritrosit paketleri çalışılncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.2. Real Time PCR Yöntemi

3.2.1. Kandan total RNA izolasyonu

Hemolize edilmiş lökosit örneklerinden Qiagen RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA izolasyonları yapıldı. Bu amaçla, 15ml'lik falkon tüpler hazırlandı. Her bir birey için 1 ml tam kan tüplere konuldu. Kan örneğinin 5 katı kadar buffer EL eklendi. 10-15 dakika buzda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 650 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi (Şekil 3.1a). Pellete dokunmadan üstteki kısım yavaşça dökülerek başta eklenen örnek miktarının 2 katı kadar buffer EL ekleyip hafifçe vorteks yapıp pelletin dağılması sağlandı. 650 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Dipteki pellete dokunmadan üstteki kısım dikkatlice döküldü (Şekil 3.1b). Bu şekilde lökositler ayrılmış oldu. Ayrılmış olan bu lökositler eritrositlerden tamamen uzaklaştırıldıktan sonra lökositleri

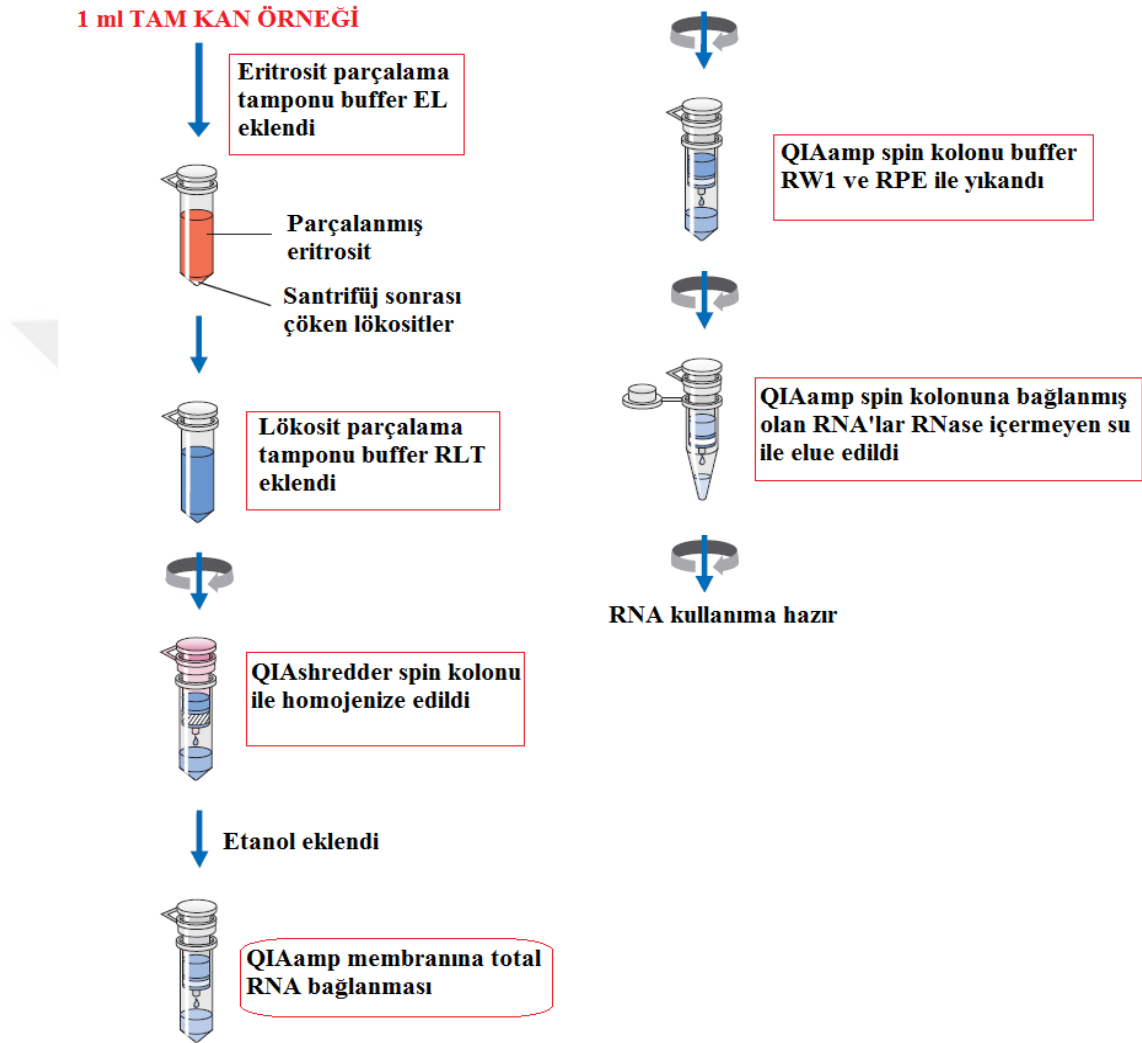
parçalamak için daha önceden hazırlanan β merkaptotanol içeren RLT solüsyonundan 600 μ l eklendi.



Şekil 3.1. Eritrositlerin hemoliz edilmesiyle santrifüj sonrası çöken lökositler

Pellet iyice sıvı hale gelinceye kadar pipetaj yapıldı. Karışım mor renkli spin kolonlara aktarılarak yüksek devirde 2 dakika santrifüj edildi. Üstteki filtreli olan spin kolon atıldı, alttaki karışımın olduğu toplama tüpünün içerisine 600 μ l %70'lik alkol eklendi ve pipetaj ile karıştırıldı. Daha sonra karışımdan 600 μ l alınarak beyaz renkli spin kolonuna aktarıldı ve 11000 rpm'de 20 saniye santrifüj edildi. Alta toplanan sıvı kısım dökülüp kalan kısmı da spin kolona aktarılıp yine 11000 rpm'de 20 saniye santrifüj edilerek alttaki kısım atıldı ve spin kolonlar yeni 2 ml'lik toplama tüplerine alındı. Spin kolon üzerine 700 μ l buffer RW1 eklendi ve 11000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Alttaki kısım atılarak spin kolonlar yeni 2 ml'lik toplama tüplerine alındı. Spin kolon üzerine 500 μ l buffer RPE eklendi ve 11000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Alttaki kısım atılarak spin kolonlar yeni 2 ml'lik toplama tüplerine alındı. Spin kolon üzerine ikinci kez total RNA'yı safsızlıklardan arındırmak için 500 μ l buffer RPE eklendi ve 11000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Alttaki kısım atılarak spin kolonlar yeni 2 ml'lik toplama tüplerine alındı. Spin kolonundan RPE'yi tamamen uzaklaştırmak için hiçbir şey eklemeyen boş olarak 13200 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve spin kolonlar 1,5'lik ependorf tüplere alındı. Spin kolon üzerine 30 μ l RNase free water eklendi ve 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi (Şekil 3.2). Elde edilen total RNA'nın

konsantrasyonu nanodrop cihazı ile spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra - 80°C’de saklandı.



Şekil 3.2. Kandan total RNA izolasyonu

Bu yöntem RNA'nın silika jel yapısında bir membrana bağlanmasını temel almaktadır. İşlem sırasında hücreler lizisle parçalandı, ortamdaki RNase'lar denatüre edilerek etkisizleştirildi ve diğer moleküllerle birlikte RNA'nın açığa çıkması sağlandı. Daha sonra ortama etanol eklenerek RNA'nın bağlanma özelliği artırıldı. Elde edilen çözelti spin kolona yüklenerek RNA'nın santrifüj sonrası ortamdaki tüp içindeki silika-jel

yapısındaki membrana bağlanması sağlandı. Kontaminan maddeler yıkama yoluyla membrandan uzaklaştırıldı.

3.2.1.a. Kandan izole edilen RNA'ların kantitatif tayini

İzole edilen RNA'ların kantitatif analizi Nanodrop cihazı ile (OD_{260} ve OD_{280} nm'de) gerçekleştirildi. RNA preparasyonlarının yaklaşık saflığı, 260 ve 280 nm'deki absorbands oranıyla (A_{260}/A_{280}) belirlenmektedir.

3.2.2. RT-PCR (Reverse Transkriptaz) ile cDNA kütüphanesi elde etme

Reaksiyonun prensibi sırasıyla belirli bir ısıda ikincil yapılardaki RNA'nın açılması; mRNA'nın gelişigüzel bir bölgesine primerin bağlanması; uygun sıcaklık, iyon yükü, pH ve sentez için gerekli nükleotidlerin varlığında primerlerin üzerinden mRNA'nın dizilimine uygun komplementer cDNA'nın sentezlenmesi ve yüksek ısıda enzimin inaktive edilerek reaksiyonun durdurulması şeklindedir. Çalışılan tüm örneklerde revers transkripsiyon yöntemiyle cDNA sentezi yapıldı. Bu amaçla cDNA kütüphanelerinin hazırlanmasında Invitrogen şirketinden satın alınan SuperScript III First-Strand cDNA sentez kiti kullanıldı ve yöntem üretici firmanın prosedürü doğrultusunda aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

Kit bileşenleri;

1. 50 ng/ μ L Random primer
2. 10 pg-5 μ g total RNA yada 10 pg-500 ng mRNA
3. 10 mM dNTP mix

Kit bileşenleri steril bir mikrosantrifüj tüpüne konularak toplam hacim ddH₂O ile 10 μ L'ye tamamlanıp herhangi bir kontaminasyonun önlenmesi açısından proteinlerin denatürasyonu için tüpler 65°C'de 5 dk ısıtıldıktan sonra 2 dk buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. Kısa bir süre santrifüj edilerek üzerine daha önceden hazırlanmış olan cDNA sentez karışımı eklendi.

cDNA sentez karışımı;

SuperScript® III RT (200 U/μL) :	1 μL
0,1 M RNaseOUT™ (40 U/μL) :	1 μL
10x RT buffer :	2 μL
25 mM MgCl ₂ :	4 μL
0,1 M DTT :	2 μL
Toplam karışım :	10 μL

Mikrosantrifüj yardımıyla çeperdeki damlaların tüpün alt kısmında toplanması sağlandı. Karışım, primerin RNA kalıbındaki uygun bölgelere bağlanması amacıyla 25°C’de 10 dk inkübasyona bırakıldı. Mikrosantrifüjle örneklerin tüpün alt kısmında toplanması sağlandı. Tüpler termal döngü cihazına (Thermal Cycler) yerleştirildi. PCR programı 50°C’de 50 dk ve 85°C’de 5 dk olacak şekilde ayarlandı. 50°C’de 50 dk süreyle RNA’lar revers transkriptaz enzimi yardımı ile cDNA’ya dönüştürüldü. 85°C’de 5 dk süreyle de revers transkriptaz enzimi inaktive edildi. Böylece total RNA’dan cDNA sentezi gerçekleşmiş oldu. Oluşan cDNA örnekleri “Real Time PCR yöntemi ile cDNA’nın çoğaltılması” aşamasına kadar -20°C’de saklandı. Bu yöntemde random hekzamer primerleri ile RNA dizisi üzerindeki özgün olmayan noktalardan cDNA sentezi başlatılarak tüm RNA’nın kalıp olarak kullanılması sağlanmaktadır.

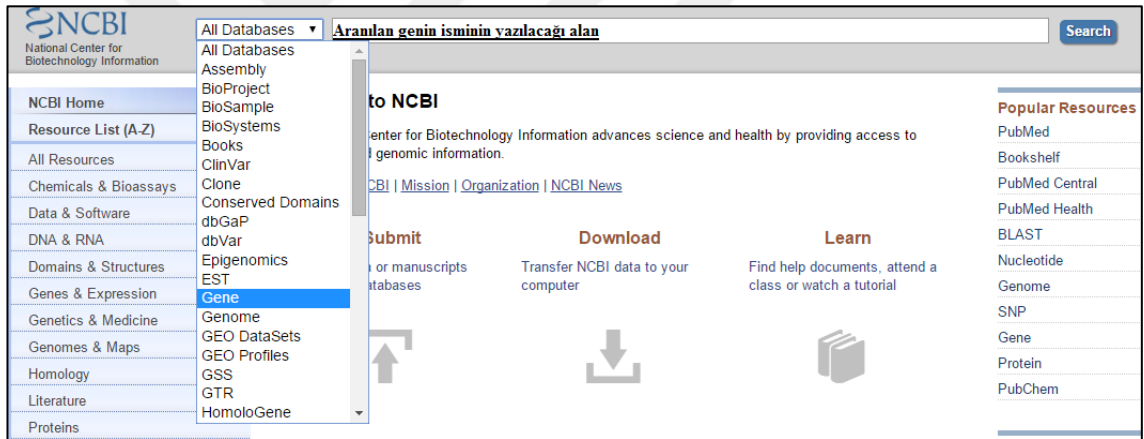
3.2.2.a. Sentezlenen cDNA’nın kontrolü

RT-PCR ile sentezlenen cDNA’ların GAPDH geni için spesifik primerler kullanarak gerçekleştirilen PCR işlemiyle elde edilen PCR ürünü, agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve görüntüleme sistemi vasıtasıyla değerlendirildi. Bu referans GAPDH geninin PCR’da amlifiye olması cDNA kütüphanesinin sentezlendiği anlamına gelmektedir.

3.2.3. Primer ve prob dizaynı

3.2.3.a. Primer ve prob dizaynı için gen sekansına ulaşılması

Tez kapsamında çalışılan GAPDH ve Asetilkolinesteraz (ACHE) genlerinin primer ve prob dizaynı için National Center for Biotechnology Information (NCBI) databazı kullanılmıştır. Bunun için NCBI ana sayfası (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)’na gidilerek Şekil 3.3’deki gibi “All databases” bölümünden “Gene” seçeneği seçildi ve arama kutucuğuna gen bilgisi (kısa veya uzun adı ya da ID numarası) girilerek “search” butonu tıklanıp Şekil 3.4’deki organizma seçim sayfasına ulaşıldı.



Şekil 3.3. Primer ve prob dizayn etmede kullanılan NCBI ana sayfası

Şekil 3.4’de gösterilen organizma seçim sayfasının alt bölümünden ilgili gen için çalışılacak organizma seçimi yapıldı. Bu tez çalışmasında kullanılan organizma insan olduğundan “*Homo sapiens*” seçeneği tıklanarak Şekil 3.5’deki organizmaya ait gen bilgilerini içeren sayfaya ulaşıldı.

Gene

[Create alert](#) [Advanced](#)

Display Settings: ☒ Tabular, 20 per page, Sort by Relevance [Send to:](#) ☐

Did you mean AChE as a gene symbol?
Search Gene for AChE as a symbol.

Results: 1 to 20 of 344 [See also 15 discontinued or replaced items.](#)

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases
☐ Ache ID: 11423	acetylcholinesterase [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Chromosome 5, NC_000071.6 (137285849..137294466)	
☐ ACHE ID: 43	acetylcholinesterase (Yt blood group) [<i>Homo sapiens</i> (human)]	Chromosome 7, NC_000007.14 (100889994..100896686, complement)	ACEE, ARACHE, N-ACHE, YT

clear

Filters: [Manage Filters](#)

Results by taxon

Top Organisms [\[Tree\]](#)

- [Homo sapiens \(35\)](#)
- [Mus musculus \(19\)](#)
- [Rattus human \(primates\)](#)
- [Strongylocentrotus purpuratus \(4\)](#)
- [Cavia porcellus \(3\)](#)
- [All other taxa \(271\)](#)

[More...](#)

Şekil 3.4. Primer prob dizayn etmek için kullanılan NCBI organizma seçim sayfası

İlgilendiğimiz genin hangi organizma için aratıldığını gösteren Şekil 3.5’deki sayfada altı çizili olarak vurgulanan linke “**aranılan gen**” tıklanarak ilgili genin kromozomdaki yeri,

gen ürünü olan enzimin fonksiyonları vb bulunur. NCBI Reference Sequences (RefSeq) başlığı altında “mRNA” tuşuna basılarak genin cDNA’sı elde edildi. Genin spesifik probunun dizaynında kullanılacak ilgili genin sekansına böylece ulaşılmış oldu (Şekil 3.6).

Gene

[Create alert](#) [Advanced](#)

Display Settings: ☒ Tabular, 20 per page, Sort by Relevance [Send to:](#) ☐

Results: 1 to 20 of 35 Selected: 1 [Showing Current items.](#)

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases	MIM
☒ Aranılan gen ID: 43	acetylcholinesterase (Yt blood group) [<i>Homo sapiens</i> (human)]	Chromosome 7, NC_000007.14 (100889994..100896686, complement)	ACEE, ARACHE, N-ACHE, YT	100740

Filters: [Manage Filters](#)

Find related data

Database:

[Find items](#)

[Search details](#)

Şekil 3.5. İlgili genin temel özelliklerini gösteren NCBI sayfası

Gene

Gene

Advanced

Search

Display Settings: ☒ Full Report

Send to: ☒

ACHE acetylcholinesterase (Yt blood group) [*Homo sapiens* (human)]

Gene ID: 43, updated on 26-Jul-2015

Summary

Official Symbol: ACHE provided by HGNC

Official Full Name: acetylcholinesterase (Yt blood group) provided by HGNC

Primary source: HGNC:HGNC:108

See related: Ensembl: ENSG00000087085, HPRD:00010, MIM:100740, Vega: OTTHUMG00000157033

Gene type: protein coding

RefSeq status: REVIEWED

Organism: *Homo sapiens*

Lineage: Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorhini; Catarrhini; Hominidae; Homo

Table of contents

Summary

Genomic context

Genomic regions, transcripts, and products

Bibliography

Phenotypes

Variation

HIV-1 interactions

Pathways from BioSystems

Interactions

General gene information

Markers, Homology, Gene Ontology

General protein information

NCBI Reference Sequences (RefSeq)

Şekil 3.6. Aranılan insan geninin özellikleri

Nucleotide

Nucleotide

Advanced

Search

Display Settings: ☒ GenBank

Send: ☒

Human acetylcholinesterase (ACHE) mRNA, complete cds

GenBank: M55040.1

FASTA Graphics

Go to: ☒

LOCUS: HUMACHE 2218 bp mRNA linear PRI 09-JUN-1995

DEFINITION: Human acetylcholinesterase (ACHE) mRNA, complete cds.

ACCESSION: M55040

VERSION: M55040.1 GI:177974

KEYWORDS: acetylcholinesterase.

SOURCE: Homo sapiens (human)

ORGANISM: *Homo sapiens*

Change region shown

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Şekil 3.7. İlgili genin sekansının bulunduğu internet veri tabanını

Gen ayrıntılarının bulunduğu Şekil 3.7’deki sayfanın sol bölümünde dikey olarak sıralanmış gene ait olan çeşitli bilgileri içeren linkler mevcuttur. Bu linklerden birisi olan kodlanan sekans “CDS” tıklanarak ilgilendiğimiz genin kodlanan bölgesi işaretlendi. Bu bölgenin belirlenmesi dizayn edilecek primer ve probun hangi bölgeden yapılacağı konusunda kolaylık sağlar. Şekil 3.8’de tez kapsamında çalışılan genlerden biri olan ACHE genine ait kodlanan bölge koyu zeminle işaretli olarak gösterilmektedir.

1	ctctcccctc	atcttttgcca	acctgccccca	cctcctctgc	agctgagcga	taacccttgg
61	gccgacagtg	ccctaatactc	ctccctcctg	gcttctcgac	cgacccttca	ccctttccct
121	ttctttctcc	cagcagacgc	cgccctgccct	gcagccatga	ggcccccgca	gtgtctgctg
181	cacacgcctt	ccctggcttc	cccactcctt	ctcctcctcc	tctggctcct	gggtggagga
241	gtgggggctg	agggccggga	ggatgcagag	ctgctgggtg	cggtgcgtgg	gggcccggctg
301	cggggcattc	gcctgaagac	ccccgggggc	cctgtctctg	ctttcctggg	catccctttt
361	gcccagccac	ccatgggacc	ccgtcgcttt	ctgccaccgg	agcccaagca	gccttgggtca
421	ggggtggtag	acgctacaac	cttcagaggt	gtctgctacc	aatatgtgga	cacctataac
481	ccaggttttg	agggcaccga	gatgtggaac	cccaaccgtg	agctgagcga	ggactgcctg
541	tacctcaacg	tgtggacacc	atacccccg	cctacatccc	ccaccctgtg	cctcgtctgg
601	atctatgggg	gtggcttcta	cagtggggcc	tcctccttgg	acgtgtacga	tggccgcttc
661	ttggtacagg	ccgagaggac	tgtgctgggtg	tccatgaact	accgggtggg	agcctttggc
721	ttcctggccc	tgccggggag	ccgagaggcc	ccgggcaatg	tgggtctcct	ggatcagagg
781	ctggccctgc	agtgggtgca	ggagaacgtg	gcagccttcg	ggggtgaccc	gacatcagtg
841	acgctgtttg	gggagagcgc	gggagccgcc	tcggtgggca	tgcacctgct	gtccccgccc
901	agccggggcc	tgttccacag	ggcctgtgctg	cagagcgggtg	cccccaatgg	accctggggc
961	acggtgggca	tgggagaggc	ccgtcgaggg	gccacgcagc	tggccacact	tgtgggctgt
1021	cctccaggcg	gcactgggtg	gaatgacaca	gagctggtag	cctgccttcg	gacacgacca
1081	gcgcaggtcc	tgggtgaacca	cgaatggcac	gtgctgcctc	aagaaagcgt	cttcgggttc
1141	tccttcgtgc	ctgtggtaga	tggagacttc	ctcagtgaca	cccagaggcc	cctcatcaac
1201	gcgggagact	tccacggcct	gcagggtgctg	gtgggtgtgg	tgaaggatga	gggctcgtat
1261	tttctggttt	acggggcccc	aggcttcagc	aaagacaacg	agtctctcat	cagccgggcc
1321	gagttcctgg	ccgggggtgcg	ggtcggggtt	ccccaggtaa	gtgacctggc	agccgaggct
1381	gtggtcctgc	attacacaga	ctggctgcat	cccagggacc	cggcacgcct	gagggaggcc
1441	ctgagcgatg	tgggtgggca	ccacaatgtc	gtgtgccccg	tggcccagct	ggctggggca
1501	ctggctgccc	aggggtgccc	ggtctacgcc	tacgtctttg	aacaccgtgc	ttccacgctc
1561	tcctggcccc	tgtggatggg	ggtgccccac	ggctacgaga	tgcagttcat	ctttgggatac
1621	cccctggacc	cctctcgaaa	ctacacggca	gaggagaaaa	tcttcgcccc	gcgactgatg
1681	cgatactggg	ccaactttgc	ccgcacaggg	gatcccaatg	agccccgaga	ccccaaggcc
1741	ccacaatggc	ccccgtacac	ggcgggggct	cagcagtagc	ttagtctgga	cctgcggccg

Şekil 3.8. ACHE genine ait kodlanan ve kodlanmayan bölgeleri gösteren veritabanı

Gen sekansının bulunduğu sayfada organik bazlar arasında periyodik olarak boşluklar ve satır sayıları mevcuttur. Bu satır sayıları ve boşluklar sonraki işlemlerin kontrollü olarak yürütülmesinde bir engeldir. Bunun için sekans sayfasının en üst kısmında “FASTA” seçeneğine tıklanarak boşluklar ve sıra sayıları kaldırıldı. Bu işlem, ilgili genin organizmanın başka genleri ile homolojisinin olup olmadığını kontrol etmede kullandığımız blastlama sayfasında bize hız kazandırır. FASTA seçeneği ile ulaşılan sekans Microsoft Word sayfasına kopyalanıp kodlanan bölge işaretlendi.

İlgili genin organizmanın başka genleri ile homoloji oranının kontrol edilmesi için tüm gen sekansı (kodlanan+kodlanmayan) blastlanmalıdır. Blastlama, doğru primer ve

probların dizayn edilmesinde önemlidir. Tüm gen sekansı kopyalanıp blastlama sayfasına (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) gidilip Şekil 3.9'daki gibi organizma (Human) seçimi yapılarak Şekil 3.10'daki organizmaya ait blast sayfasına ulaşıldı. Blastlama işleminin organizmaya özgü blast sayfasından yapılması, dizayn edilecek primer ve probun sadece o organizmaya özgü olarak çalışılmasında ve aynı organizmanın başka genlerini çoğaltma ihtimalinin önüne geçilmesinde büyük önem arzeder. İstenirse dizayn edilen primer ve problemlerin başka organizmalarda çalışıp çalışmayacağı aynı şekilde Şekil 3.9'daki organizma blast sayfası kullanılarak istenilen organizma için kontrol edilebilir.

NCBI BLAST Home

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. [more...](#)

BLAST Assembled Genomes

Find Genomic BLAST pages:

GO

Enter organism common name, scientific name, or tax id.

- ☐ Human
- ☐ Mouse
- ☐ Rat
- ☐ Cow
- ☐ Pig
- ☐ Dog
- ☐ Rabbit
- ☐ Chimp
- ☐ Guinea pig
- ☐ Fruit fly
- ☐ Honey bee
- ☐ Chicken
- ☐ Zebrafish
- ☐ Clawed frog
- ☐ Arabidopsis
- ☐ Rice
- ☐ Yeast
- ☐ Microbes

Basic BLAST

Choose a BLAST program to run.

nucleotide blast	Search a nucleotide database using a nucleotide query <i>Algorithms:</i> blastn, megablast, discontinuous megablast	blastx	Search protein database using a translated nucleotide query
protein blast	Search protein database using a protein query <i>Algorithms:</i> blastp, psi-blast, phi-blast, delta-blast	tblastn	Search translated nucleotide database using a protein query
		tblastx	Search translated nucleotide database using a translated nucleotide query

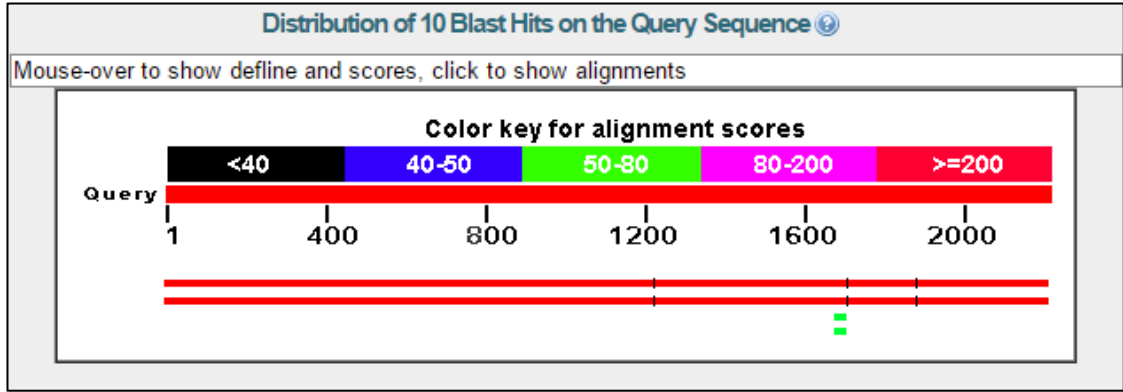
Şekil 3.9. İlgili genin başka genlerle homolojisinin kontrol edildiği organizma seçim sayfası

Şekil 3.10'daki açılan sayfaya ilgili genin sekansı yapıştırılıp başka genlerle homolojisini araştırmak için BLAST butonuna tıklandı.

Şekil 3.10. Gen sekansının homolojisinin kontrol edildiği organizmaya özgü blast sayfası

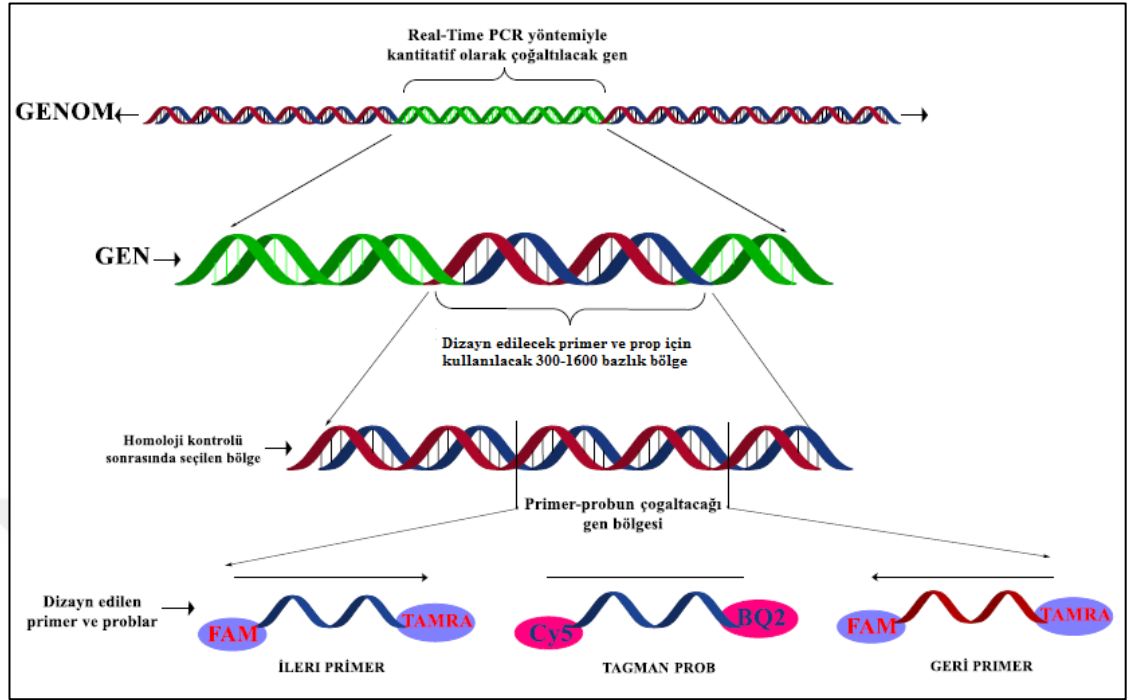
Tüm genin blastlanmasının amacı, o genin başka genlerle homoloji gösteren bölgelerini belirlemektir. Bu işlem, primer-prob dizaynında bu bölgelerden kaçınılmasında bize yarar sağlar. Diyazn edilen primer ve problemlerin bu bölgelerin dışından seçilmesi, Real-Time PCR reaksiyonu sırasında yanlışlıkla başka genlerin çoğaltılmasını önler. Tez çalışması kapsamında kullandığımız genlerin primer ve prob dizaynları, bu süreçlere dikkat edilerek yapıldı.

Blast butonu tıklandıktan sonra görüntülenen homoloji belirleme sayfası Şekil 3.11’de verilmiştir. Şekil 3.11’de görülen kırmızı homoloji çizgilerinin üzerine gelindiğinde, ilgili genin hangi genlerle ne oranda ve hangi bölgelerde homolojilerinin olduğu görülür. Böylece dizayn edilecek primer ve probun, genin hangi bölgesinden seçileceği belirlenir.



Şekil 3.11. İlgili genin başka genlerle homoloji oranını gösteren blastlama sonucu

Bu sonuca göre genin spesifik probunu elde etmek için gen sekansında en iyi bölge seçimi yapılmalıdır. Bunun için Şekil 3.11'e göre 0-1600 arasındaki bölgede, bu bölgenin tamamına karşılık olarak diğer genlerle homolojinin hemen hemen hiç bulunmadığı anlaşılmaktadır. İlgili genin homoloji bölgeleri belirlendikten sonra, bu bölgelerin dışında 300-1600 arası diziliş seçilerek primer-prob dizaynı yapmak üzere <http://frodo.wi.mit.edu/> sayfasına gidildi. Açılan sayfada dizayn edeceğimiz primer ve problemlerin optimum değerleri Şekil 3.13'de verildiği gibi girilerek sayfanın en alt kısmında bulunan "Pick Primer" butonuna tıklandı. Optimum değerlerle dizaynı gerçekleştirilmeyen ya da kısmen gerçekleşen primer ve problemlerin optimum değerlerinde (önemsizden önemliye) küçük değişiklikler yapılarak yeni primer ve prob önerileri elde edildi. Primer ve problemlerden amacımıza uygun olanlar seçilerek Real-Time PCR yönteminde kullanılmak üzere METABION şirketinden sipariş edildi.



Şekil 3.12. Multipleks Real-Time PCR yönteminde kullanılacak primer ve prob dizaynı şematik özeti (Koçpınar 2015)

General Primer Picking Conditions

Primer Size Min: 19 Opt: 20 Max: 21
 Primer Tm Min: 59 Opt: 60.0 Max: 61 Max Tm Difference: 100.0 [Table of thermodynamic parameters:](#) Breslauer et al. 1986 ▾
 Product Tm Min: Opt: Max:
 Primer GC% Min: 45 Opt: 50 Max: 55
 Max Self Complementarity: 8.00 Max 3' Self Complementarity: 3.00
 Max #N's: 0 Max Poly-X: 3
 Inside Target Penalty: Outside Target Penalty: 0 [Note: you can set Inside Target Penalty to allow primers inside a target](#)
 First Base Index: 1 CG Clamp: 0
 Concentration of monovalent cations: 50.0 Salt correction formula: Schildkraut and Lifson 1965 ▾
 Concentration of divalent cations: 0.0 Concentration of dNTPs: 0.0
 Annealing Oligo Concentration: 50.0 (Not the concentration of oligos in the reaction mix but of those annealing to template.)
☒ Liberal Base ☐ Show Debugging Info ☒ Do not treat ambiguity codes in libraries as consensus ☐ Lowercase masking
 Pick Primers Reset Form

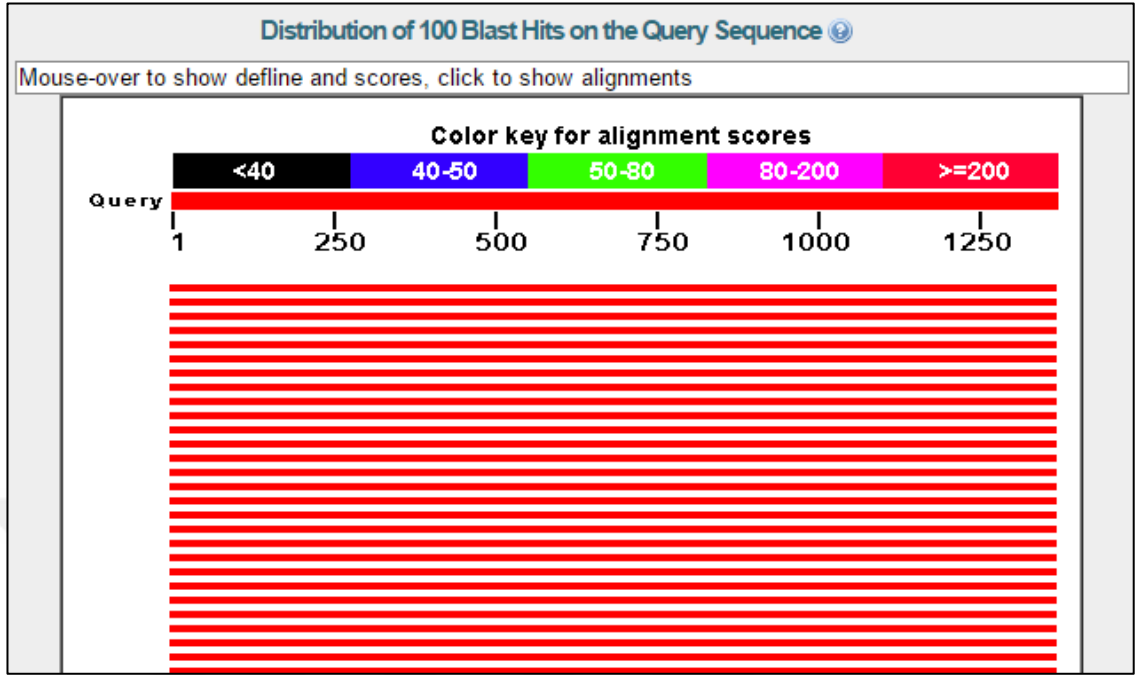
Hyb Oligo Size Min: 19 Opt: 20 Max: 23
 Hyb Oligo Tm Min: 69 Opt: 70 Max: 71
 Hyb Oligo GC% Min: 45 Opt: 50 Max: 55
 Hyb Oligo Self Complementarity: 12.00 Hyb Oligo Max 3' Self Complementarity: 12.00
 Max #N's: 0 Hyb Oligo Max Poly-X: 3
 Hyb Oligo Mishyb Library: NONE ▾ Hyb Oligo Max Mishyb: 12.00
 Hyb Oligo Min Sequence Quality: 0
 Hyb Oligo Conc of monovalent cations: 50.0 Hyb Oligo DNA Concentration: 50.0
 Hyb Oligo conc of divalent cations: 0.0 Hyb Oligo [dNTP]: 0.0

Objective Function Penalty Weights for Hyb Oligos (Internal Oligos)

Hyb Oligo Tm Lt: 1.0 Gt: 1.0
 Hyb Oligo Size Lt: 1.0 Gt: 1.0
 Hyb Oligo GC% Lt: 0.0 Gt: 0.0
 Hyb Oligo Self Complementarity: 0.0
 Hyb Oligo #N's: 0.0
 Hyb Oligo Mishyb: 0.0
 Hyb Oligo Sequence Quality: 0.0
 Pick Primers Reset Form

Şekil 3.13. Dizayn edilen primer ve problemlerin optimum değerlerinin girildiği NCBI internet veri tabanı

Primer ve prob dizaynı yapılırken dikkat edilmesi gereken noktalardan bazıları da dizayn edilen primer ve problemlerin, adenin ya da timin nükleotidi ile başlayıp guanin ya da sitozin nükleotidi ile bitmesidir. Ayrıca dizayn edilen primer ve problemlerin dimer oluşturmalarını ve spesifik olmayan bağlanmalarını engellemek amacıyla art arda 4 tane aynı bazın tekrar etmemesi gerekir. İstenirse bu gibi durumları daha ayrıntılı kontrol etmek amacıyla bioedit gibi bilgisayar programları kullanılabilir. Dizayn edilen primer ve problemler sipariş edilmeden önce yeni bir blastlama ile homolojilerinin kontrol edilmesinde yarar vardır.



Şekil 3.14. Çoğaltılacak gen bölgesinin başka genlerle homolojisinin kontrol edildiği blastlama sayfası

Tez kapsamında dizayn edilen her primer ve prob ikinci bir blastlama ile homolojileri kontrol edildi. Bizim dizayn ettiğimiz genin elde ettiğimiz cDNA kütüphanesinde ACHE geninden başka genlerle homolojisinin olmadığı belirlendi (Şekil 3.14). Fakat ACHE'nin farklı çok sayıda transkript varyantı bulunmaktadır (Şekil 3.15).

Çizelge 3.4. Tez kapsamında yapılan multipleks Real-Time PCR yönteminde kullanılmak üzere sipariş edilen primer ve probaların sekansları ve bazı nicel değerleri

Genes	Primer ve probes	Diziliş (5'→3')	Tm Sıcaklığı (°C)	%GC oranı
GAPDH	Forward primer	GGTTCTCCTTCGTGCCTGT	59,95	63,16
	Reverse primer	AGCCCTCATCCTTCACCAC	59,50	61,11
	Taqman probe	GCCCTCATCAACGCGGGAGA	70,33	60,00
AChE	Forward primer	GACACCCACTCCTCCACCT	60,25	57,89
	Reverse primer	TCCACCACCCTGTTGCTG	60,06	57,89
	Taqman probe	TGACGCTGGGGCTGGCATTG	70,10	65,00

3.2.4. Kantitatif gen ekspresyonu (Real Time PCR)

PCR, DNA üzerinde seçilen bir ya da daha fazla bölgenin *in vitro* olarak çoğaltılması yöntemidir. Moleküler alanda oldukça sık kullanılan bu yöntem temel alınarak gradientli PCR, multipleks PCR, nested PCR ve Real-Time PCR gibi türleri geliştirilmiştir (Gönül 2013). Son yıllarda, PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi ve floresan ışımaya tekniklerinin moleküler genetik yöntemlerde kullanıma girmesi, genetik çalışmalara büyük bir ivme kazandıran Real-Time PCR olarak bilinen yöntemin geliştirilmesinin temeli olmuştur. Real-Time PCR teknolojisi, DNA'nın ya da mRNA örneklerinin çoğaltılması ve ürünlerinin miktarını floresan boyalar yardımıyla gerçek zamanlı olarak tespit edebilen popüler bir yöntemdir (Günel ve Aydın 2009).

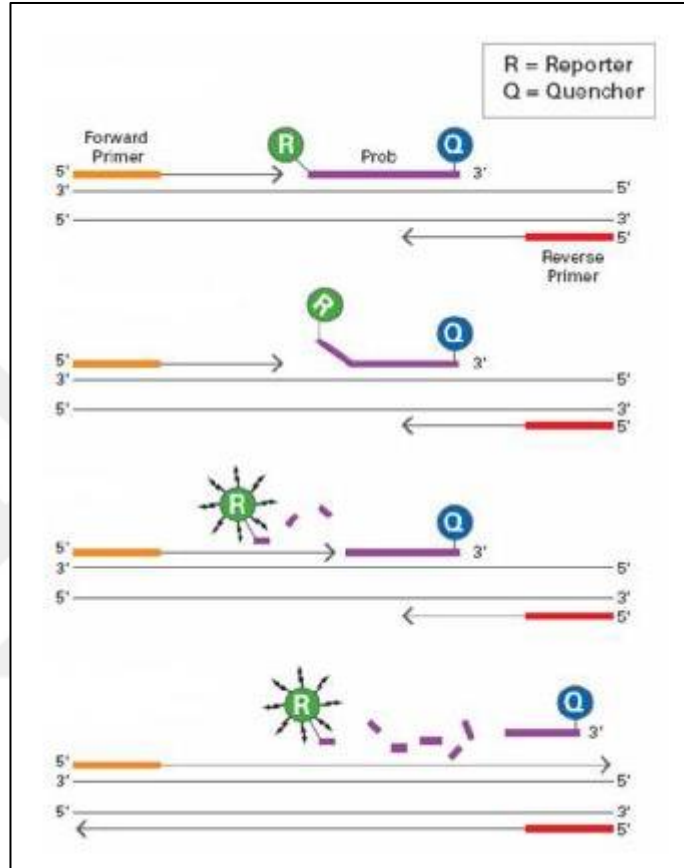
Bu yöntemde ekstra görüntülemeye gerek duyulmaması, nitelik ve nicelik yönünden kısa sürede çok sayıda örneği analiz edebilmesi, sonuçların kantitatif olarak verilmesi, dizilemeye gerek kalmadan tek nükleotid farklılıklarının saptanabilmesi ve tüpte uygulandığı için kontaminasyon riskini en aza indirmesi yöntemin avantajları arasındadır. Bu yönüyle bilim ve tıp alanındaki çalışmalarda nükleik asit miktarı belirleme analizleri içerisinde en etkili tekniğin Real Time PCR olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca bu teknik, ürün analizinin agaroz jel elektroforezi ve DNA veya

RNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi basamakları ortadan kaldırmaktadır. (Rasmussen *et al.* 2001).

Real-Time PCR tekniği ile DNA ve mRNA dizileri eş zamanlı olarak çoğaltılmış ve belirlenebilmiştir. Bununla birlikte reaksiyon süresi boyunca oluşan ürünün miktarını Real-Time PCR sırasında gözlenebilmiştir. Amplifikasyonun her basamağının takip edilebilmesi Real Time PCR'ı özel kılan en önemli özelliğidir. Amplifikasyon eğrileri üzerinde tüm amplifikasyon profili gözlenebilmektedir. Bu imkan reaksiyon için kullanılan primerler ve hedefe özgü floresan işaretli problemler ile sağlanır (Wilhelm and Pingoud 2003; Kubista *et al.* 2006). Gen ifadenme çalışmalarında en çok kullanılan problemlerden biri TaqMan problemlerdir. Real-time PCR'ın bir uygulaması olan TaqMan sisteminde 5' ve 3' uçlarından floresans maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır.

Tez kapsamında yapılan Real-Time PCR çalışmalarında prob'un 5' ucunda haberci (reporter) florokrom (6-carboxyfluorescein = 6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı (quencher) florokrom (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine = TAMRA) floresan işaretli hedef gen probu ve 5' ucunda raporör florokrom (Cy5), 3' ucunda baskılayıcı florokrom (BQ2) olan floresan işaretli referans gen Taqman problemleri kullanılarak kantitatif gen ekspresyonları ölçüldü. Real-Time PCR reaksiyonu sırasında prob, denaturasyon ile tek zincirli hale getirilen cDNA hedef molekül üzerinde primerlerin (forward primer ve reverse primer) bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raporör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması prob'un bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için taq DNA polimeraz enzimi 5' → 3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Prob yıkımının oluşumu, prob ve hedef bölge arasındaki hibridizasyonu bozmakla baskılayıcının raporör üzerindeki etkinliğini yok eder. Böylece baskılayıcının etkinliğinden uzaklaşan raporör florokrom sinyal oluşturur. Her döngüde çoğaltılan hedef bölge primer etkinliğine göre bir öncekinin yaklaşık iki katına çıkacağından sinyal şiddeti de buna paralel olarak artar. Belirli sayıda döngü sonrasında sinyal şiddeti Real Time PCR

cihazı tarafından FAM ve Cy5'e spesifik dalga boylarında algılanıp kantitatif olarak Ct değeri şeklinde ifade edilir.



Şekil 3.17. Real-Time PCR reaksiyonu sırasında hedef gen primer ve problemlerinin çalışma şekli (Anonim 2008)

3.2.4.a. Multipleks Real-Time PCR uygulaması

Multipleks Real Time PCR uygulaması, normal Real Time PCR uygulamasından farklı olmayıp hedef gen (çalışılan gen) ve referans genin (housekeeping) aynı tüp içerisinde kantitatif olarak değerlendirilmesidir. Referans gen genellikle temel hücresel fonksiyonların gerçekleştirilmesi için gerekli olan, organizmanın her hücresinde eksprese olduğu bilinen bir gendir (Küfrevioğlu vd 2011). Tek tüpte iki genin değerlendirilmesi, hedef gen ve referans gen olmak üzere iki reaksiyonun oluşacağı, dolayısıyla iki farklı Ct değeri elde edileceği anlamına gelir. Ayrıca bu durum malzeme israfını

önleyeceğinden, normal Real Time PCR yöntemini ekonomikleştirir. Multipleks Real Time PCR yöntemi sonrasında elde edilen hedef gen ekspresyonu Ct değerleri, referans gen ekspresyonu Ct değerleri ile kıyaslanarak değerlendirme yapılır.

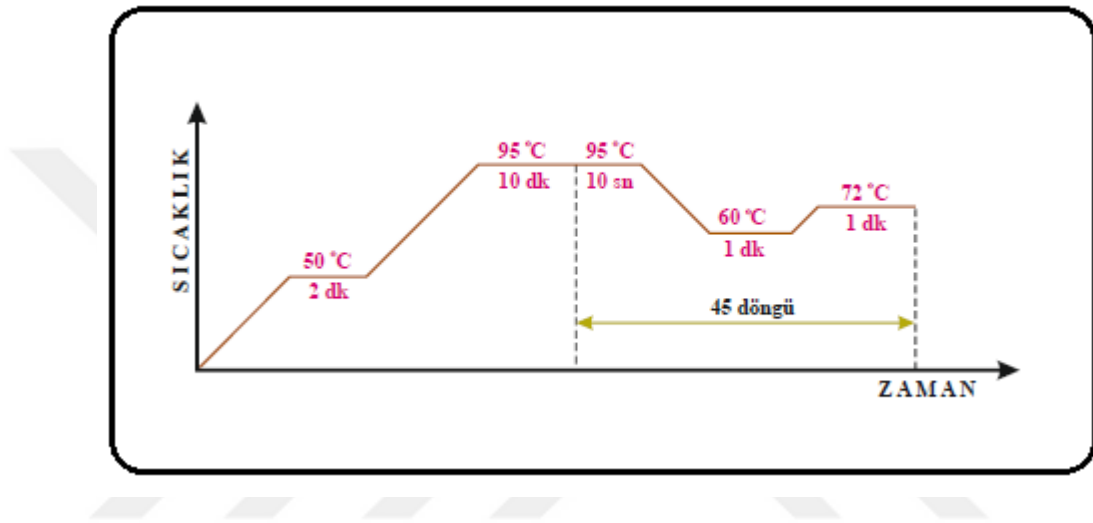
Tez kapsamında yapılan deneylerde Real Time PCR metodunun bir versiyonu olan, hem hedef gen prob ışımlarının hem de referans gen prob ışımlarının tek tüpte ölçüldüğü Multipleks Real Time PCR metodu kullanıldı. Bu amaçla sağlıklı ve hasta gruplarından alınan lökositlerden sentezlenen cDNA örnekleri kullanılarak gerçekleştirilen kantitatif Multipleks Real Time PCR denemeleri, istatistiksel güvenilirlik açısından iki kez tekrarlandı.

Daha önce Real Time PCR yönteminde kullanmak üzere çalışılacak GAPDH referans geni ve ACHE hedef gen bölgesine özgü primerler ve Fam-Tamra ve Cy5-BQ2 etiketli probalar dizayn edilmişti. Multipleks Real Time PCR uygulaması için dizayn edilen primer-problar ve diğer maddeler, Çizelge 3.5'deki gibi karıştırılarak her örneğin tüp karışımı elde edildi. tüplere eşit miktarlarda konulan bu karışım üzerine her tüp için cDNA örneği 2,5 µL ilave edilerek kantitatif Multipleks Real Time PCR reaksiyonu Qiagen Rotor-Gene Q Real-Time PCR cihazı yardımıyla gerçekleştirildi. Her örnek reaksiyonu sonuçların istatistiksel güvenilirliği açısından 2'şer kez tekrarlandı.

Çizelge 3.5. Multipleks Real Time PCR karışımı (25 µl için)

Bileşenler	Final Konsantrasyonu	Miktar (µL)
TaqMan® Probe Master Mix	1X	12,5
Probe hedef gen	0,6 pmol	0,15
Probe GAPDH	0,6 pmol	0,15
Forward Primer hedef gen	0,2 pmol	0,25
Forward Primer GAPDH	0,2 pmol	0,25
Reverse Primer hedef gen	0,2 pmol	0,25
Reverse Primer GAPDH	0,2 pmol	0,25
cDNA (50 ng)	120 ng/ µl	2-3
ddH₂O (Steril)	-	8,7

Real Time PCR yönteminde kullanılan sıcaklık döngüsü Şekil 3.18’de gösterildiği gibi 50°C’de 2 dk ön inkübasyondan sonra denaturasyon için 95°C’de 10 dk bekletilip ve sonrasında denaturasyon için 95°C’de 10 saniye, primer bağlanması için 60°C’de 1 dk ve polimerizasyon için 72°C’de 1 dk olmak üzere toplam 45 döngü PCR işlemine maruz bırakıldı.



Şekil 3.18. Tez kapsamında yapılan multipleks Real-Time PCR yönteminde kullanılan sıcaklık döngüsü

3.2.4.b. Real-Time PCR sonuçlarının hesaplanması

Real Time PCR ile elde edilen gen ürünlerinin kantifikasyonu için bir çok yöntem geliştirilmiştir. Çalışmamızda “Komperatif $\Delta\Delta C_t$ ” yöntemi kullanılmıştır. Kalibratör olarak endojen kontrol de dediğimiz bir referans genden ve karşılaştırma yapabilmek için de kontrol grubundan faydalanılır. Bir hedef genin bir kontrol gene göre relatif ekspresyonuna bakılır. Düşük yoğunlukta sentezlenen genlerin ekspresyon çalışmaları için çok uygun bir yöntemdir. Kantitatif analizde normalizasyon için referans (housekeeping) gen olarak GAPDH kullanıldı. Referans gen genellikle temel hücresel fonksiyonların gerçekleştirilmesi için gerekli olan bir organizmanın her hücresinde bulunan temel bir gendir (Butte *et al.* 2001).

Bu yöntemde önce hasta ve kontrol grubu örneklerinin ortalama Ct değerleri hem GAPDH hem de AChE için ayrı ayrı hesaplandı. Daha sonra AChE ortalama değerinden GAPDH ortalama değeri çıkarılarak ayrı ayrı hasta ve kontrol gruplarının ΔCt değerleri ve bunlara ait standart sapma değerleri hesaplandı. Kontrol grubu ΔCt değeri hasta grubu ΔCt değerinden çıkarılarak $\Delta\Delta Ct$ değeri bulundu. Bu değer $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne uygulanarak hasta grubunun AChE ekspresyonunun kontrol grubuna göre kaç kez artmış ya da azalmış olduğu GAPDH gen ekspresyonu internal kontrol olarak kullanılıp relatif olarak belirlendi.

$$\text{Kontrol } \Delta Ct = \text{Kontrol Ct (hedef)} - \text{Kontrol Ct (GAPDH)}$$

$$\text{Örnek } \Delta Ct = \text{Örnek Ct (hedef)} - \text{Örnek Ct (GAPDH)}$$

$$\Delta\Delta Ct = [(\text{Örnek } \Delta Ct)_{\text{ort.}} - (\text{Kontrol } \Delta Ct)_{\text{ort.}}]$$

$$\text{Hedef gen (hedef) mRNA miktarı} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Referans ve hedef genlerin eşik döngü değeri (threshold cycle = Ct) değerleri genlerin kantitatif miktarlarını belirten ifadeler olup Real Time PCR uygulamalarında önemli bir parametredir. Ct değeri, amplifikasyon sırasında tespit edilen floresan ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısıdır. Başka bir ifade ile üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. Farklı PCR reaksiyonlarında yer alan kalıp örneklerin miktarı Ct değerleri karşılaştırılarak öngörülebilir (Wong and Medrano 2005). Florimetrik PCR yöntemi ile yapılan kantitasyon çalışmalarında, kalıp DNA miktarı bilinen standart örneklerle ait Ct değerleri ile incelenen örneğin Ct değeri karşılaştırılarak kantitasyon yapılmaktadır. Bu nedenle, kantitatif PCR analizlerinde standart olarak tanımlanan kontrol örneklerine ihtiyaç vardır. Standart örnek olarak içinde bulunan kalıp DNA miktarı bilinen örneklerle yapılan çalışmalara mutlak kantitasyon adı verilir. İyi ekspresyon sağlayan bir örneğin seri dilusyonları standart olarak kullanılabilir. Bu çalışmalarda önemli olan standartlar arasındaki kalıp oranının tekrarlanabilir ve ölçülebilir olmasıdır. Bu tip çalışmalara göreceli kantitasyon (relative quantitation) adı

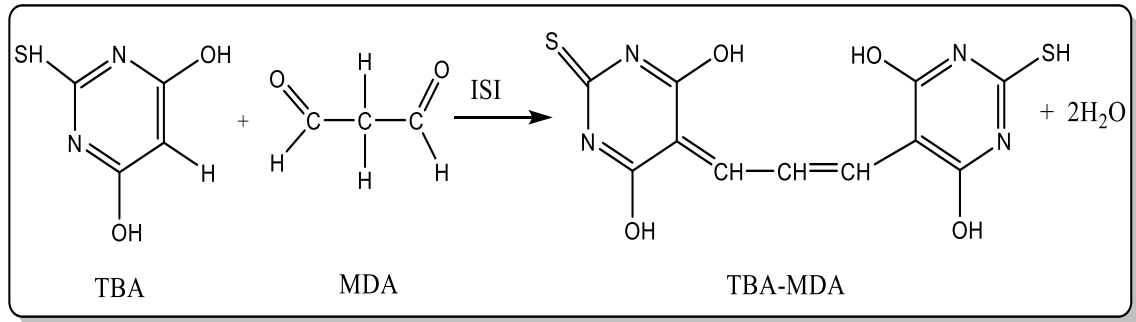
verilir (Pfaffl 2001). Bir standart örnekten seri dilüsyonlar hazırlanır. Standart dilüsyonlara varsayılan bir konsantrasyon miktarı atfedilir ve genellikle bu miktar “varsayılan birim” (arbitrary unit) olarak ifade edilir. Bu standartlar kullanılarak, atfedilen konsantrasyon değerlerine karşılık gelen dilüsyonların Ct değerleri belirlenerek kantitasyon için gerekli olan regresyon eğrisi çizilir. Bu eğri standart eğri olarak da ifade edilmektedir. Kantitasyon aşamasında, örneklerin Ct değerlerinin regresyon eğrisi üzerinde hangi atfedilen değeri temsil ettiklerine bakılarak göreceli bir miktar belirlenir. Bu şekilde kantitatif PCR verilerinin analizinde; mutlak ve göreceli kantitasyon kullanılır.

Bu tez çalışmasında Real Time PCR reaksiyonları hazırlanırken, standart eğrilerin çizilebilmesi amacıyla herhangi bir kontrol gurubundan elde edilen c-DNA örneğinden 1/10, 1/100, 1/1000 ve 1/10000 şeklinde seri dilüsyonlar hazırlanmıştır ve ölçümlerin değerlendirilmesi aşamasında analiz programı ile standart eğriler çizildi. Deneylerde tüm cDNA örnekleri ve standart örnekler aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde 2’şer kez çalışılarak bu üç ölçümün ortalaması analizlerde kullanılmıştır. Bunun amacı, deneysel hataları ve farkları azaltmaktır.

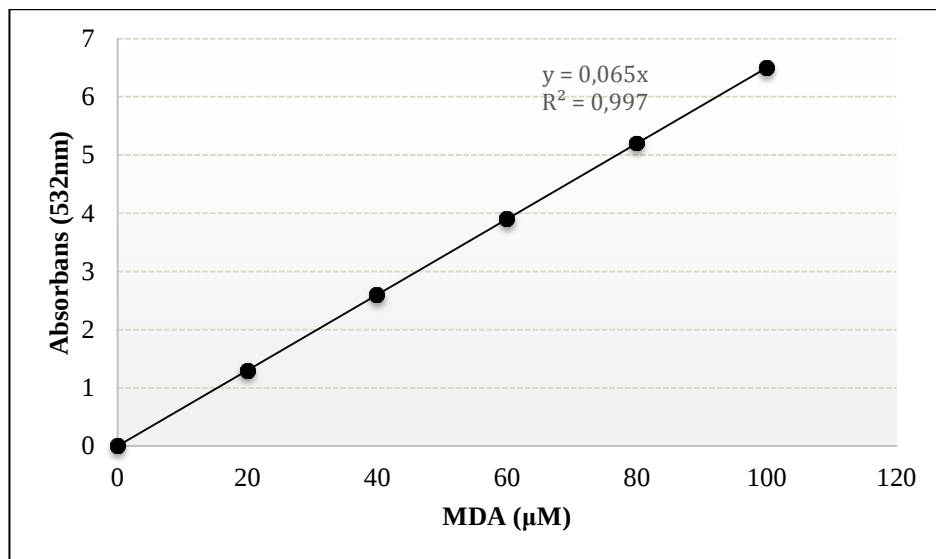
3.3. Plazmada Lipidler ve Proteinlerin Oksidatif Modifikasyonları ve Total Tiyol Düzeyinin Belirlenmesi

3.3.1. Malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi

Hücre membranının lipoprotein yapısındaki poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu yan ürün olarak MDA oluşur (Oropesa *et al.* 2009). MDA düzeyi plazma, eritrositlerde ve eritrosit zarında ölçülmüştür. Lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden olan MDA, oksidasyonun dolaylı bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. MDA düzeyi Dahle yöntemi ile ölçülmüştür. Dahle’nin spektrofotometrik yöntemi temel olarak MDA ile tiyobarbiturik asitin (TBA) oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm dalga boyunda verdiği absorbansın ölçülmesine dayanmaktadır (Dahle 1962).



Kapaklı cam deney tüplerine 1 ml %10'luk TCA konuldu, üzerlerine 0,2 ml numune eklenerek vorteksle karıştırıldı. Elde edilen karışımların ağızları kapatılarak 90 °C'de 15 dakika inkübe edildiler. İnkübasyon sonrası soğuk su altında soğutulan numuneler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrası elde edilen süpernatantlardan 0,5 ml ayrı tüplere aktarıldı, bunların üzerlerine eşdeğer hacimde % 0,8'lik TBA ilave edildi ve tekrar 80 °C'de 30 dakika inkübe edildiler. İnkübasyon sonrası tekrar soğuk su altında soğutulan numuneler, 532 nm'de kör karşı absorbansları okutuldu. Kör tüpüne de numune yerine 0,5 ml distile su konularak aynı işlemler yapıldı. MDA düzeyinin saptanmasında MDA standardının verdiği absorbanstan yararlanıldı. Bu amaçla tetraetoksipropan (MA: 220,3; d=0.92; %96) MDA standardı olarak kullanıldı. Elde edilen sonuçlar $\mu\text{mol/L}$ cinsinden MDA değerleri verildi.



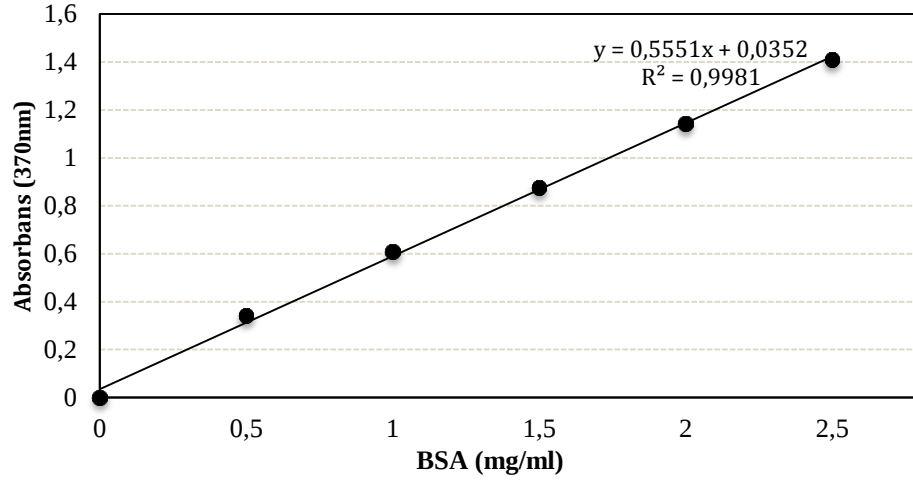
Şekil 3.19. MDA standart grafiği

3.3.2. Protein karbonil miktarının belirlenmesi

Protein oksidasyonunda reaktif karbonil grupların artışı oksidatif stresin kanıtı olarak gösterilmektedir. Protein karbonil (PC) grupları Levine ve arkadaşlarına göre 2,4-dinitrofenilhidrazin ile proteinlerin karbonil gruplarının reaksiyonu sonucu hidrazon oluşması prensibine dayanarak spektrofotometrik olarak 370 nm’de analiz edilerek ölçülmüştür (Levine *et al.* 1994).



Örnekler %10 triklorasetik asit (TCA; w/v) ile çöktürüldükten sonra 12000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi. Örnekler, 2 M DNPH’li HCl ve 2 M DNPH’siz HCl eklendikten sonra oda sıcaklığında bir çalkalayıcıda bir saat boyunca karıştırıldı. Bu süre bitiminde örnekler tekrar %10 TCA ile çöktürülüp ve 12000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi. Çöktürülen protein peletleri etanol: etil asetat (1:1 v/v) ile yıkanarak serbest DNPH solüsyonunun uzaklaştırılması sağlandı. Daha sonra 12000 rpm de tekrar 3 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz dışarı atılarak bu işlem iki kez daha tekrarlandı. Elde edilen protein peletlerine, 20 mM potasyum fosfat tampon içeren 5 M üre (pH: 2,3’e HCl ile ayarlanmıştır) eklendi ve herhangi bir çözünmeyen madde kalmaması için tekrar santrifüj edildi. Daha sonra, çözünmeyenleri çöktürmek için 10000 rpm’de 5 dk santrifüj uygulanıp 370 nm’de numuneler köre karşı okundu. Örneklerin oksidatif stres biyomarkırı olarak kullanılan karbonil grup içerikleri nmol karbonil/mg protein cinsinden hesaplandı.

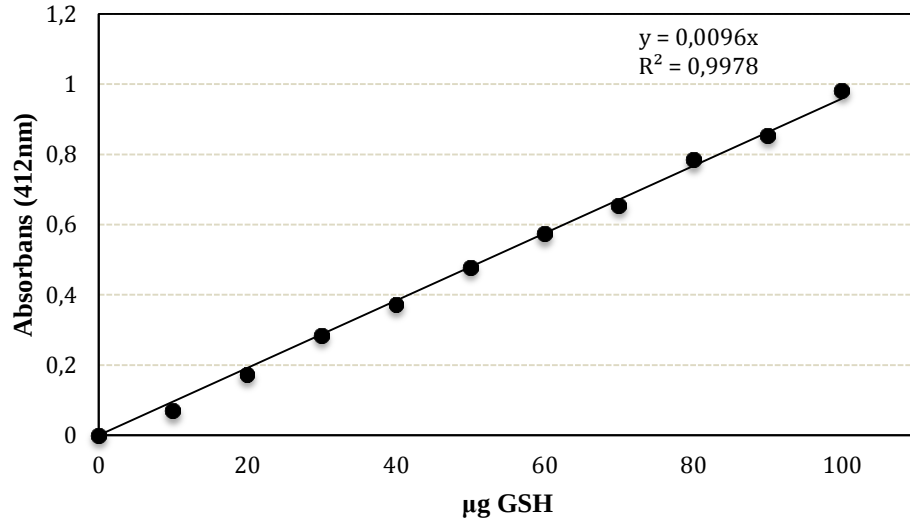


Şekil 3.20. PC için protein standart grafiği

3.3.3. Total tiyol miktarının belirlenmesi

Yöntemin esası DTNB'nin serbest tiyol grupları tarafından yükseltgenip 2-nitro-5-merkaptobenzoik asite dönüşmesine dayanır. Bu bileşiğin renk siddetine bağlı olarak tiyol gruplarının miktarı tespit edilir (Sedlak and Lindsay 1968).

Deney ve kör olarak alınan 2 tüpten deney tüpüne 250 μL örnek, köre ise 250 μL deiyonize su eklendi. Her iki tüpede 750 μL Tris tampon (pH 8,2, 0,2M) ve 50 μL DTNB (0,01M) eklenip vortekslendi. Son hacim 3950 μL metanol ilavesiyle 5 mL'ye tamamlandı. Tüpler 15 dakika süre ile karanlıkta vortekslenmek suretiyle inkübe edildi. Numunenin absorbansı köre karşı 412 nm'de okundu. Oluşan 2-nitro 5-merkaptobenzoik asitin molar ekstinksiyon katsayısı ($13100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak total tiyol konsantrasyonu hesaplandı.

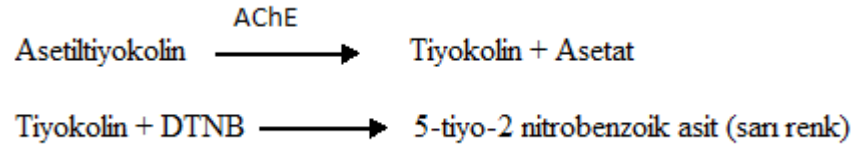


Şekil 3.21. Total tiyol standart grafiği

3.4. Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi Tayini

Kolinesteraz aktivite tayini, güçlü antikolinesteraz aktivitesi taşıyan insektisitlerle oluşan akut ve kronik zehirlenme olaylarında tedaviye yön verilmesi bakımından klinik yönden önemlidir. Serum ve eritrosit kolinesteraz aktivite değerleri çeşitli patolojik durumlarda anlamlı bir klinik veri olarak kabul edilmektedir.

Ellman yöntemi, doku homojenatı, hücre süspansiyonu, plazma ve insan eritrositleri gibi örneklerde AChE aktivitesinin fotometrik olarak ölçülmesine imkan tanımaktadır. Yöntemin prensibi şöyledir; AChE, asetiltiyokolinin tiyokolin ile asetata parçalanması reaksiyonunu katalizleyen bir enzimdir. AChE aktivitesi, tiyokolin ile DTNB arasındaki reaksiyonun sonucunda oluşan 5-tiyo-2-nitrobenzoik asitin verdiği sarı rengin yoğunluğunun belirli bir dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmesi ile belirlenmektedir (Ellman *et al.* 1961).



3.4.1. Eritrosit hemolizatının hazırlanması

Eritrositleri tam olarak ayırmak için kanlar 3 ml'lik hemogram tüpünde 10 dakika 2400 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüplerin üst kısmındaki sıvı ve lökosit tabakası dikkatli bir şekilde alındı (Axen ve Ernback 1971). Böylece eritrositler ve lökositler birbirinden ayrılmış oldu. Eritrositlerin lökosit tabakasından tamamen arındırılması için 3 kez %0,9'luk NaCl ile yıkandı ve bir pastör pipeti yardımıyla üzerindeki sıvı ve lökosit tabakası uzaklaştırıldı. Elde edilen eritrosit numunesi üzerine ise 50 katı 1 mM EDTA ve 0.5% Triton X-100 içeren 0.1 M sodyum fosfat (pH 7.4) tamponu ilave edildi (Axen ve Ernback 1971; Worek *et al.* 1999). Daha sonra 14000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek hücre zarları ve diğer safsızlıklar elimine edildi. Bu şekilde AChE aktivitesi için eritrosit hemolizatı hazırlanmış oldu (Beydemir 2004).

3.4.2. Eritrosit asetilkolinesteraz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Eritrosit AChE aktivitesi ölçümü Ellman yöntemi ile gerçekleştirildi. Asetiltiyokolin yodür AChE enzimi katalizörlüğünde tiyokolin ve asetata dönüşür. Oluşan tiyokolinin ditiyobisnitrobenzoat (DTNB) ile reaksiyonu sonucu sarı renkli kompleks oluşmaktadır. Meydana gelen bu sarı rengin Elman metoduna göre 412 nm'de eritrositlerde ise hemoglobinin bozucu etkisinden dolayı modifiye edilmiş Elman metodu yöntemiyle aktivite ölçümü 436 nm'de 5 dakika absorbans değişimleri kaydedilerek dakikadaki absorbans değişimi hesaplandı. Dakikadaki absorbans değişiminden faydalanarak enzim ünitesi hesaplandı ve Hb değerine bölünerek enzim aktivitesi U/gHb olarak verildi (Worek *et al.* 1999). AChE enzim aktivitesini ölçmek için toplam küvet hacimleri çizelgedeki gibidir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. Asetilkolinesteraz aktivitesi için 1,5 ml'lik kuvarz küvetlere kullanılan çözeltiler

Kullanılan Maddeler	Kör (µl)	Örnek (µl)
Fosfat tamponu (0.1M, pH 7.4)	1000	1000
DTNB (10 mM)	50	50
Eritrosit hemolizat (1/50)	-	50
Su	75	25
Karışım 37°C 'de 10 dk inkübe edildi		
ASCh (28.4 mM)	25	25
Toplam hacim	1150	1150

Hesaplama;

$$\text{AChE aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta\text{OD}}{10,6} \times \frac{V_t}{V_o} \times f$$

ΔOD : 436 nm'de optik dansitenin dk. başına değişimi

V_t : Toplam küvet hacmi

V_o : Örnek hacmi

f : Seyreltme faktörü

10,6: 436 nm'de asetiltiyokoliniyodür'ün indirgenmesi sonucu okunan OD, sabit değeridir.

3.4.3. Plazma asetilkolinesteraz enzim aktivitesinin belirlenmesi

İnsan kan plazması AChE enzim aktivitesi Ellman yöntemiyle belirlendi. Bu yöntemin esası, reaksiyon esnasında oluşan sarı renkli 2-nitro-5 tiyobenzoat'ın pH 7,4'de spektrofotometrik yöntemle 412 nm'de ölçülmesi esasına dayanır. Substrat olarak tiyokolin esteri kullanıldı (Ellman 1961). Dakikadaki absorbans değişiminden faydalananarak enzim ünitesi hesaplandı ve protein değerine bölünerek enzim aktivitesi

U/mg protein olarak verildi. Plazma AChE enzim aktivitesini ölçmek için toplam küvet hacimleri çizelgedeki gibidir (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Asetilkolinesteraz aktivitesi için 1,5 ml'lik kuvarz küvetlere kullanılan çözeltiler

Kullanılan Maddeler	Kör (µl)	Örnek (µl)
Fosfat tamponu (0.1M, pH 7.4)	1000	1000
DTNB (10 mM)	50	50
Plazma	-	50
Su	80	25
Etopropazin	-	5
Karışım 37°C 'de 10 dk inkübe edildi		
ASCh (28.4 mM)	25	25
Toplam hacim	1155	1155

Hesaplama;

$$\text{AChE aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta\text{OD}}{13,6} \times \frac{V_t}{V_o} \times f$$

ΔOD : 412 nm'de optik dansitenin dk. basına değişimi

V_t : Toplam küvet hacmi

V_o : Örnek hacmi

f : Seyreltme faktörü

13,6: 412 nm'de asetiltiyokoliniyodür'ün indirgenmesi sonucu okunan OD, sabit değeridir.

3.5. Protein ve Hemoglobin Tayini

3.5.1. Bradford (Coommassie Blue) metodu ile protein tayini

Doku örneklerinde veya süpernatantlarda bulunan protein miktarlarını ölçmek için pek çok yöntem kullanılır. Bunlardan birisi Bradford (Coommassie Blue) metodu ile protein tayin yöntemidir. 595 nm dalga boyunda gerçekleştirilen ve oldukça duyarlı olan bu yöntem, 5-100 µg/mL aralığında bulunan protein miktarlarının ölçümünde kullanılmaktadır (Bradford 1976). Bradford (Coommassie Blue) metodu ile protein tayini, organik boyaların proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek renk oluşturması esasına dayanır. Bradford yöntemi Coomasie brilliant blue (parlak mavisi) G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki proteinlere bağlanarak, değişik renk şiddetinde mavi renkli çözeltiler ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilmiştir. Protein tayini sırasında mavi rengin oluşmasında proteinin amino asit bileşimi (özellikle arjinin gibi bazik amino asitler ve aromatik amino asitler) önemlidir. Yöntemde kullanılan ana esas, kullanılan boyanın normalde 465 nm dalga boyunda absorbans verirken, protein ile bağlanma sonrasında 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermesidir.

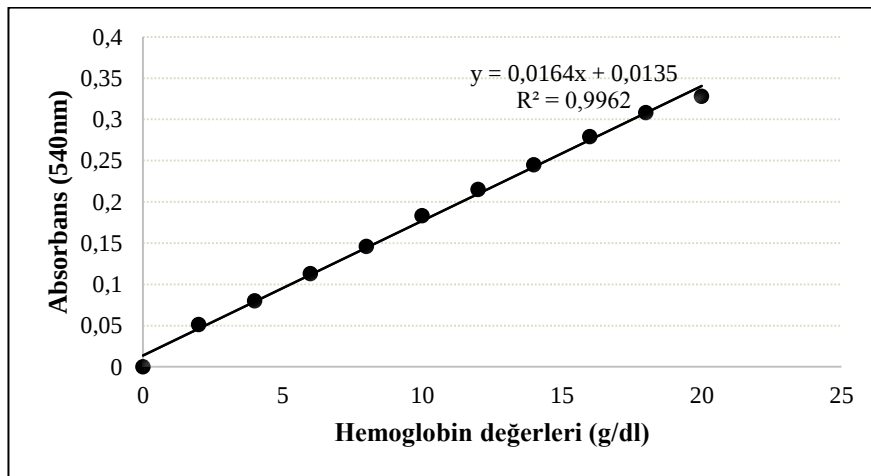
3.5.2. Bradford protein tayininin uygulanışı

Bu metodda öncelikli olarak kullanılacak kör ve örnek sayısını hesaba katarak en az 5 mL hacme sahip olan deney tüpleri ayarlandı. Bu çalışmada her plazma örneği (10 µL plazma 90 µL dH₂O) şeklinde 10 kat seyreltildi. Örneğin bizim çalışmamızda kullanılan 4 örnek için şu prosedür ile protein tayini yapıldı: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlanarak 4900 µl ml renklendirme reaktifi tüplere ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. Protein tayini yapılacak numuneler için de aynı yöntem uygulandı ve standart grafikten miktar tayini yapıldı. Bu tüplerdeki boya ve protein bağlanmalarının tam olarak gerçekleşerek oluşan kapalı mavi rengin sabitlenmesi için numuneler laboratuvar şartlarında en az 10 dk inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında numunelerin köre karşı absorbansları 595 nm’de ölçüldü. Elde edilen absorbans sonuçları aynı plazmadan bakılan enzim aktivitelerinin EU/mg hesaplamalarında ortak kullanıldı.

3.5.3. Eritrosit hemoglobin miktarının belirlenmesi

Drapkin çözeltisinde bulunan ferrisiyanür Hb'deki +2 değerlikli demiri (ferro= Fe^{2+}) +3 değerlikli demire (Ferrik= Fe^{3+}) çevirerek methemoglobine dönüştürür. Sonra potasyum siyanür ile birleşerek stabil bir molekül olan siyanmethemoglobin meydana gelir. Siyanmethemoglobinin 540 nm’de ölçülen absorbansı hemoglobin ile doğru orantılıdır (Fairbanks *et al.* 1999). Çalışmamızda EDTA’lı tüplere alınan kan 2400 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santifüj sonrası üstte kalan plazma ve beyaz küre tabakası aspire edildi. Ardından eritrosit %0.9’luk NaCl solüsyonu ile 3 defa yıkandı. Her yıkama sonrası 2400 rpm’de 10’ar dakika santrifüj edildi. Her santrifüj sonrası süpernatant aspire edilerek atıldı. Hazırlanan eritrosit paketinden 50 µl alınıp bir başka tüpe aktarıldı. Yıkanan eritrositler soğuk distile su ile 2 ml’ye tamamlandı. Vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra +4°C’de 15 dakika bekletildi. Hazırlanan hemolizattan 10 µl tüpe alındı, üzerine drapkin reaktifinden 3 ml eklendi ve tüpler iyice çalkalanıp 15 dk oda ısısında bekletildi. Standart olarak hemoglobin, kör olarak da drapkin çözeltisi kullanılarak tüm örnekler 540 nm dalga boyunda ölçüldü.



Şekil 3.22. Hemoglobin tayini için kullanılan standart grafik

3.6. İnsan Serum AChE Enziminin Kısmi Saflaştırılması

3.6.1. Amonyum sülfat çöktürmesi

Proteinler çok değerlikli elektrolitler oldukları için iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında, protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su molekülleri, amonyum sülfat tuzundaki iyonlar tarafından çekilir ve proteinler çöker (salting-out). Amonyum sülfat çöktürmesi proteinlerin bu özellikleri esasına dayanmaktadır.

Çalışmada insan serumu sırasıyla %0-20, %20-40, %40-60, %60-80 ve %80-100 aralıklarında katı amonyum sülfat ile çöktürüldü. Çöktürme işlemlerinden sonra +4°C, 10000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen pelletler, 1 mM EDTA ve %0,5 Triton X-100 içeren 0,1 M sodyum fosfat (pH 7,4) tamponu içerisinde çözülerek aktivite ölçümü yapıldı ve çöktürme aralığı belirlendi. Her defasında çökelekte ve süpernatantda enzim aktivitesine bakıldı. Amonyum sülfatın homojenatta çözünme işlemi buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile yapıldı. Katı amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formülden hesaplandı.

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V: Enzim çözeltisinin hacmi

S₁: 1'in kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

S₂: 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

Yapılan işlemler sonucunda AChE aktivitesinin tamamının %20-80 aralığında çöktüğü belirlendi. Daha sonra kısmi saflaştırma için %20-80 amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı. Elde edilen numune 10000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve çökelek çözünebileceği minimum fosfat tamponunda (0,1 M NaH₂PO₄,

pH=7,4) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sırasında ortamın sıcaklığı buz banyosuyla düşük tutulmaya çalışıldı.

3.6.2. Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numune diyaliz torbasına yerleştirilerek üç saat süreyle 1 litre diyaliz tamponuna (50 mM Na-fosfat pH:7,4) karşı diyaliz edildi. Diyaliz işlemi +4°C’de gerçekleştirildi.

3.7. Serum AChE Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Fenolik Bileşiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Bu çalışmada serum AChE enzim aktivitesi üzerine bazı fenolik bileşiklerin etkisi *in vitro* şartlarda araştırıldı. AChE enzimi üzerine fenolik bileşiklerin inhibisyon ve aktivasyon kinetiği çalışıldı. Bu çalışmada insan serum AChE enzimi materyal olarak kullanıldı. IC₅₀ değerleri şöyle bulundu; enzim üzerine fenolik bileşiklerin 5-6 farklı konsantrasyonda ilave edildi. İlave edilen inhibitör sonrası enzim aktiviteleri hesaplandı. % inhibisyon-I grafikleri çizildi. Bu grafiklerden her bir fenolik bileşiğin IC₅₀ değerleri hesaplandı. IC₅₀ değeri ise aktivitenin %50 inhibisyonu için gerekli olan inhibitör konsantrasyonudur. Kinetik çalışmanın bu aşamasında her bir fenolik bileşik için 5 farklı substrat ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonunda çalışıldı. Sonuçlar Lineweaver-Burk grafiğine dönüştürüldü.

3.8. İstatistiksel Analiz

Tez kapsamında çalışılan ACHE mRNA ekspresyon seviyesi, bazı oksidatif biyomarkır düzeyleri ve protein seviyesinde enzim aktivite sonuçları kontrol ve hasta gruplarında karşılaştırıldı. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows 15 programı ile yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme One-way ANOVA testi ve sonrasında Post-hoc LSD testi kullanılarak yapılmıştır. İstatistik programı yardımıyla yapılarak elde edilen p değerleri (p>0,05:

önemsiz “ns”), ($p<0,05$: önemli “*”), ($p<0,01$: çok önemli “**”), ($p<0,001$ veya $p<0,0001$: yüksek derecede önemli “***”) şeklinde ifade edilerek yıldızlarla simgelendi.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen analizler için kullanılan kan örnekleri sağlıklı ve hasta bireylerden (Alzheimer ve koroner arter hastası) toplandı. Hasta ve kontrol gruplarından alınan 3 mL kan örneği EDTA'lı tüplere alındı. Alınan kanların enzim aktivitelerini belirlemek için eritrosit ve plazmalar ayrıldı ve daha sonra kandan lökositleri ayırarak RNA izolasyonu yapıldı. cDNA'ya dönüştürüldükten sonra ekspresyon analizi için uygun hale getirildi ve kantitatif gen ekspresyon seviyesi belirlendi. Çalışmada bazı oksidatif stres markırların, enzim aktivitesinin ve bu enzim geninin ekspresyon seviyesinin kontrol grubundan farkı hasta gruplarının kan örneklerinde gözlemlenmiş oldu.

4.1. Real Time PCR Yöntemi

4.1.1. Kandan elde edilen RNA ve cDNA konsantrasyonu kantitatif tayini bulgusu

İzole edilen RNA örneklerinin saflığı ile ilgili karşılaştırma olanağı sunan 260/280 oranı saf bir şekilde elde edilen RNA örnekleri için 2.0'dır. Eğer bu değer kayda değer şekilde düşükse kirliliğin olduğu varsayılır ve elde edilen RNA'nın içinde proteinlerin, fenollerin ya da diğer kirlleticilerin varlığını işaret eder. Bununla birlikte solüsyon pH'ındaki küçük değişikliklerde bu değer değişmesine neden olabilir. Asitlik bu oranı aşağı çekerken bazlık yukarı çekerek değerlerin değişmesine neden olabilir. Tez kapsamında izole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık derecedeleri nanodrop (Thermo Scientific Multiskan GO) cihazı ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları 260 nm dalga boyunda ölçüm yaparak, saflık dereceleri ise 260/280 oranı ile spektrofotometrik olarak belirlendi. Kontrol ve hasta bireylerin lökositlerinden izole edilen total RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık dereceleri Çizelge 4.1'de verildi.

Çizelge 4.1. İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık dereceleri

Gruplar	RNA saflığı (260/280)	ng/μl
Kontrol Grubu	1,9199 ± 0.261	88,45
Alzheimer Grubu	1,9676 ± 0.261	83,50
Koroner Arter Grubu	2,0176 ± 0.161	40,45

Kullanılan RNA örnek konsantrasyonlarının birbirinden farklı olması, Real Time PCR cihazının farklı Ct değerleri vermesine neden olduğundan dolayı genlerin mRNA ekspresyon sonuçlarının güvenilirliğinin azalmasına sebep olur. Bu nedenle Real Time PCR uygulaması gerçekleştirilmeden önce kullanılan RNA örnek konsantrasyonları eşitlendi.

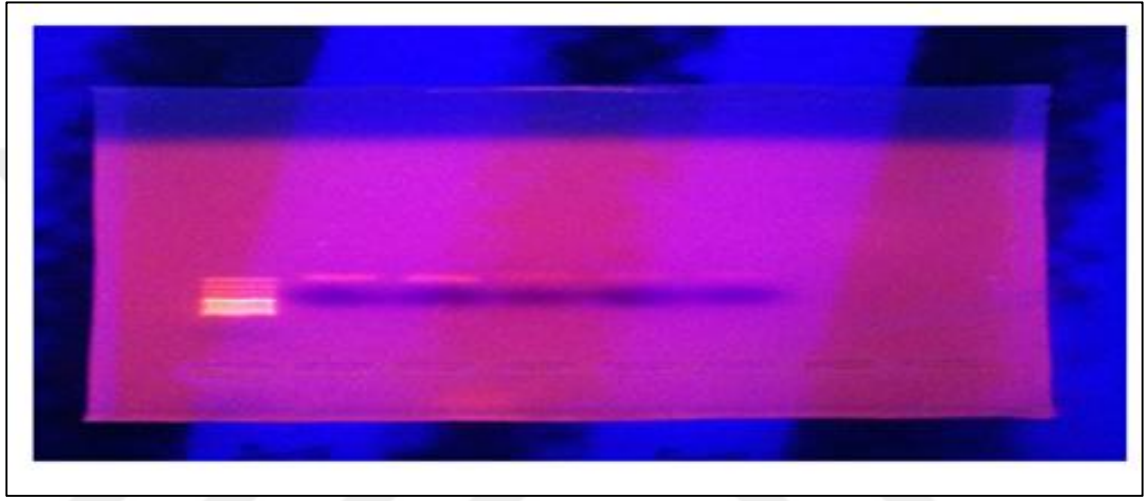
Elde edilen total RNA’lardan cDNA sentezi, BIO-RAD C1000TM Thermal Cycler cihazı yardımıyla gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA örneklerinin konsantrasyonları nanodrop cihazı (Thermo Scientific Multiskan GO) ile ölçüldü. Kontrol ve hasta bireylerin lökositlerinden izole edilen total RNA’dan sentezlenen cDNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık dereceleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. İzole edilen total RNA’dan sentezlenen cDNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık dereceleri

Gruplar	cDNA saflığı (260/280)	ng/μl
Kontrol Grubu	1,74 ± 0.019	1641,84
Alzheimer Grubu	1,78 ± 0.015	1779,34
Koroner Arter Grubu	1,85 ± 0.025	1556,75

4.1.2. Elde edilen cDNA'ların GAPDH geniyle ısı döngüsü PCR'da kontrol edilmesi

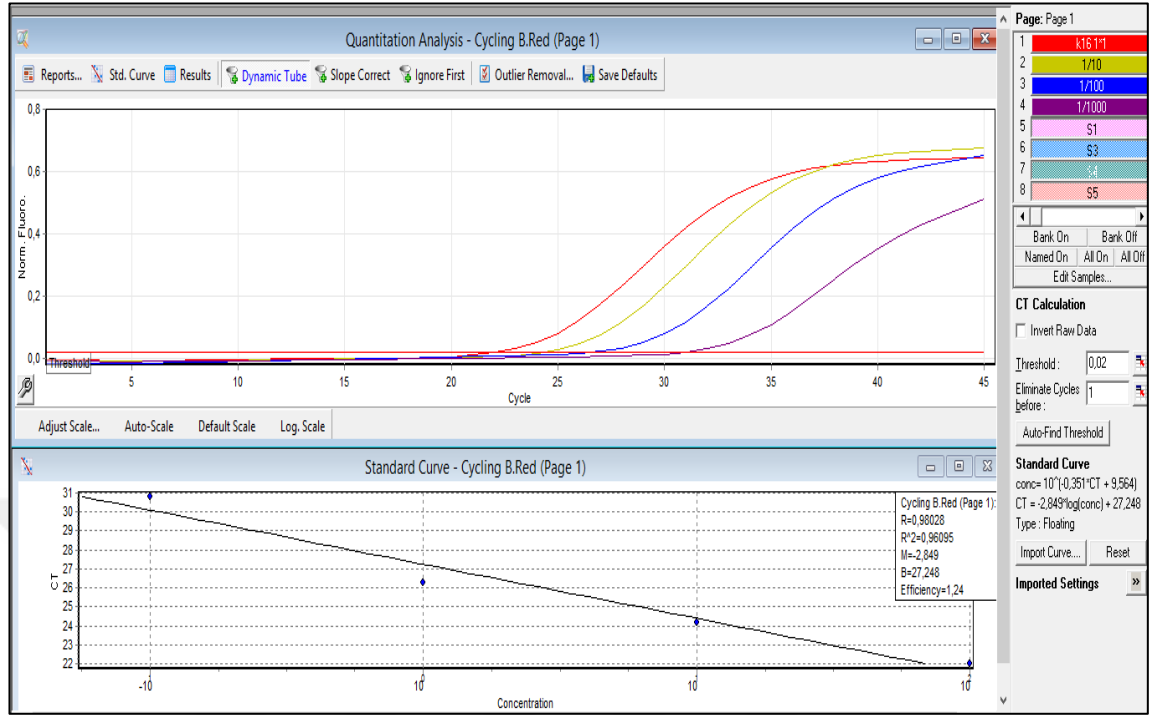
Elde edilen PCR ürünleri (cDNA) %2 agaroz jelinde ve 90V'ta yürütüldükten sonra 113 bç. uzunluğunda beklenen GAPDH geni gözlemlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. GAPDH geni için Agaroz jelinde yürütülen PCR ürünlerinin görüntüsü

4.1.3. Standart eğri ve amplifikasyon verimliliği inceleme sonucu

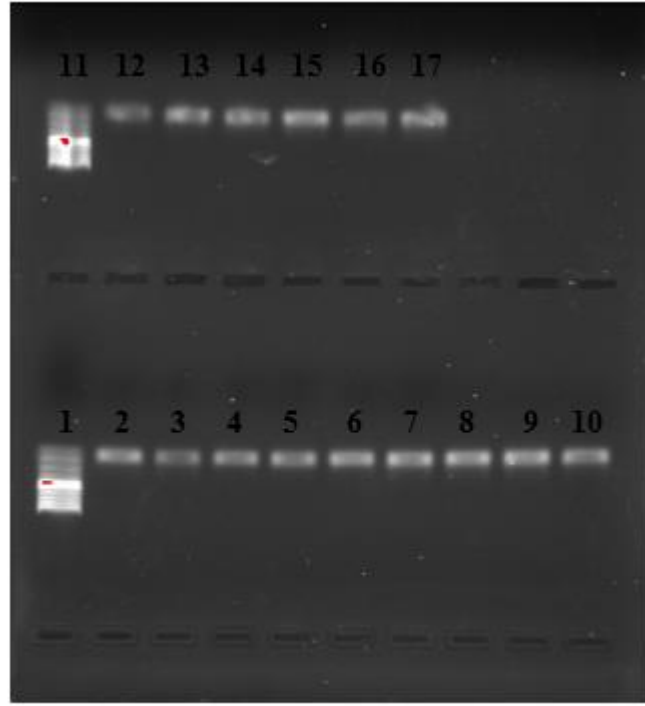
Göreceli kantitasyon için standart örnek seri dilüsyonlarının (1/10, 1/100, 1/1000 ve 1/10000) Ct değerleri ile amplifikasyon eğrileri ve bu eğriler kullanılarak çizilen standart grafik bir örnek olarak Şekil 4.2'de verilmiştir. Hedef ve referans genlerinin amplifikasyon verimliliğinde hiçbir engelleyici etki gözlenmedi ($E=2.0$). Bu nedenle bütün hesaplamalar $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülün kullanılarak yapıldı. Örnek olarak GAPDH geninin standart grafiği verilmiştir.



Şekil 4.2. Real Time PCR amplifikasyon standart eğri ve grafiği

4.1.4. Real Time PCR yöntemiyle ACHE geninin ifade varlığının kan örneklerinde incelenmesi

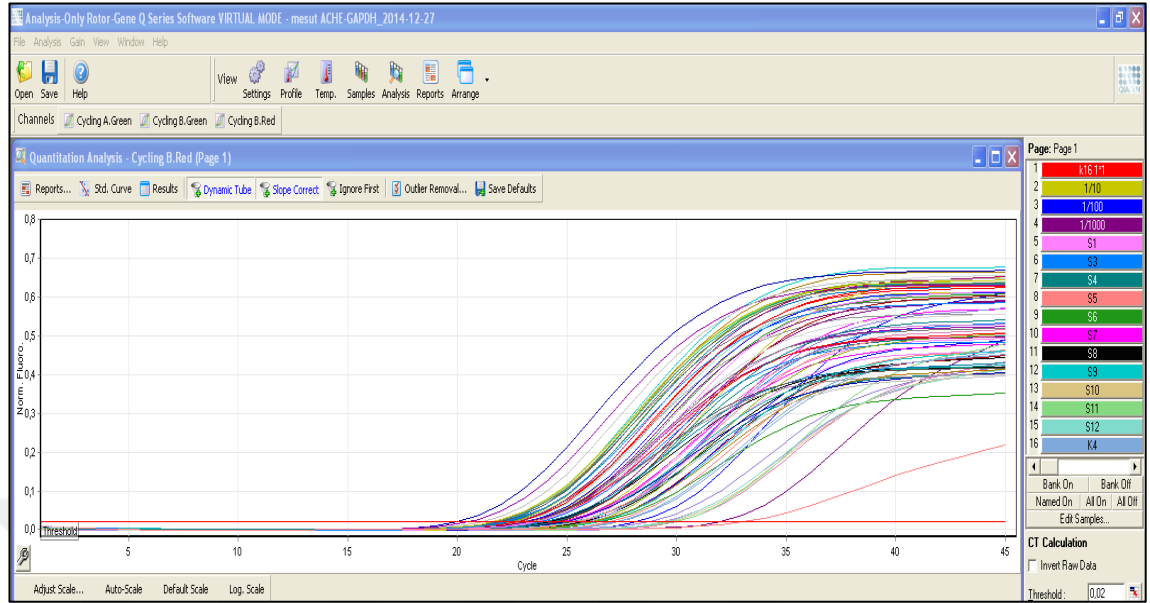
Elde edilen Real Time PCR ürünleri %2 agaroz jelde ve 90V'ta yürütüldükten sonra 120 bç. uzunluğunda ACHE geninin varlığı kan örneklerinde incelendi. (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. AChE geni için agaroz jelinde yürütülen Real Time PCR ürünlerinin görüntüsü
(Markır 1 ve 11 Alzheimer 3,5, 7, 8, 14, 15 ve17 Kontrol 2, 4, 6, 9, 10, 12 ve 13)

4.1.5. Real Time PCR sonuçları

Real Time PCR reaksiyonu sonucunda her gen için amplifikasyon eğrisi gözlendi. GAPDH genine ait mRNA ekspresyon seviyesini gösteren amplifikasyon eğrisi Şekil 4.4’de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Hasta ve kontrol gruplarında GAPDH geninin mRNA ekspresyon seviyesini gösteren amplifikasyon eğrisi

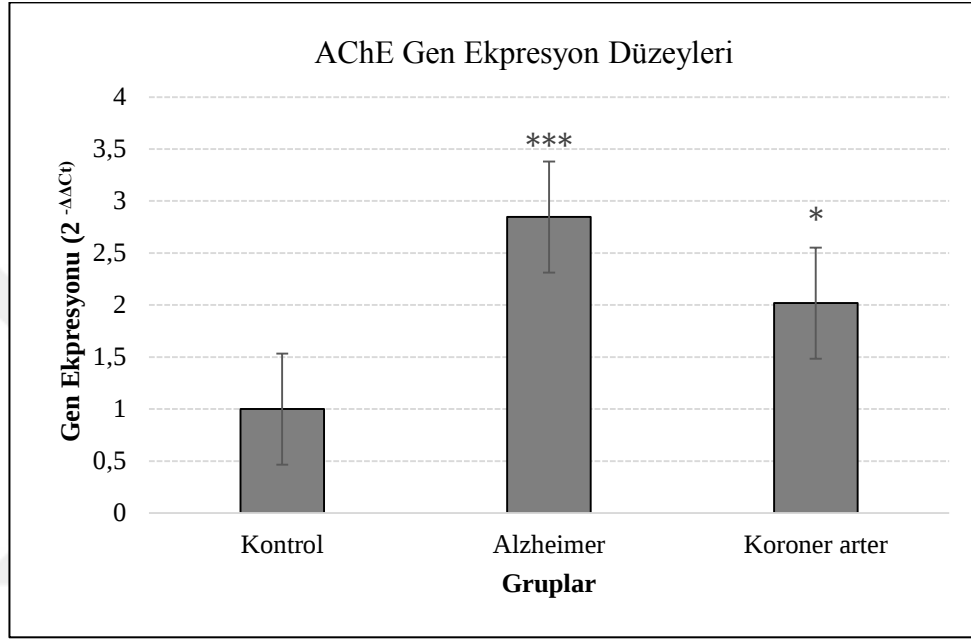
4.1.6. GAPDH ve ACHE gen ekspresyon bulgularının değerlendirilmesi

Hasta ve kontrol grubunda GAPDH ve ACHE genlerinin ortalama Ct değerleri Çizelge 4.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Hasta ve kontrol grubunda GAPDH ve AChE ortalama Ct değerleri

Gruplar	GAPDH (Ct)	ACHE (Ct)	p değeri
Kontrol Grubu	23,89 ± 2.61	35,08 ± 0,96	-
Alzheimer Grubu	26,35 ± 2.08	34,44 ± 1,09	0,000
Koroner Arter Grubu	24,08 ± 2.03	34,88 ± 1,06	0,046

Gruplarda ACHE geninin mRNA ekspresyon sonuçları incelendiğinde Alzheimer ve koroner arter gruplarında kontrollere göre önemli bir artışın olduğu Şekil 4.5’de görülmektedir.

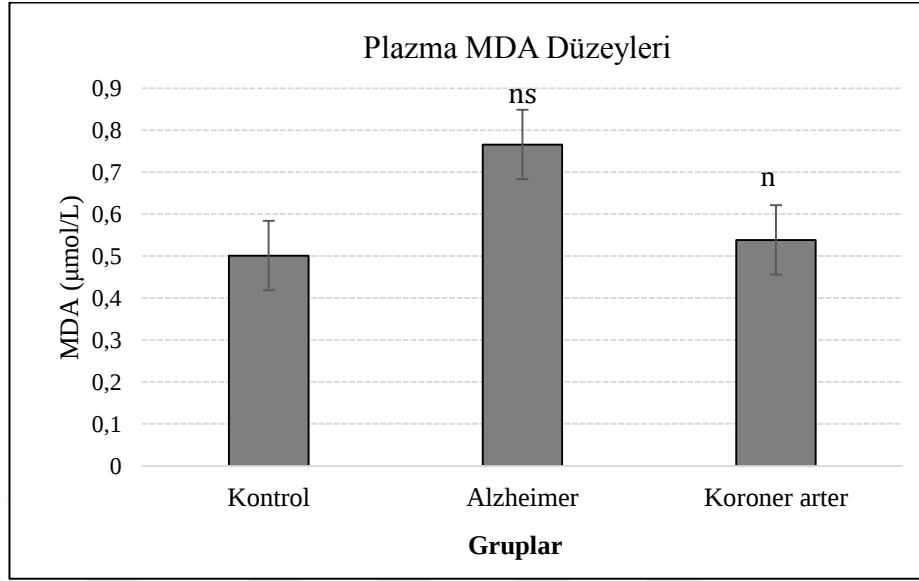


Şekil 4.5. Hasta ve kontrol grubu ACHE mRNA ekspresyon seviyesi

4.2. Malondialdehit, Protein Karbonil ve Total Tiyoil Düzeyi Sonuçları

4.2.1. Malondialdehit (MDA) miktarı sonuçları

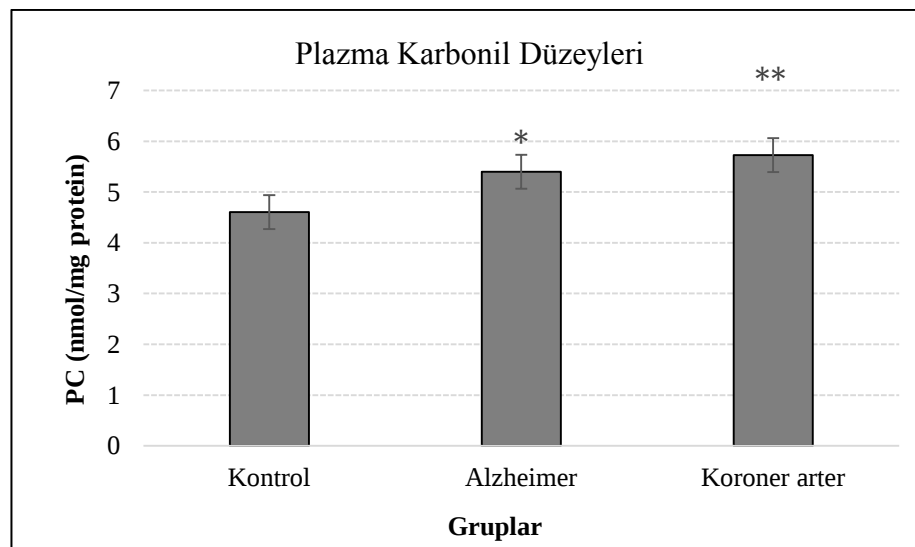
Gruplarda lipid peroksidasyon göstergesi olan MDA seviyesi sonuçları incelendiğinde Alzheimer ve koroner arter gruplarında kontrollere göre önemsiz bir artışın olduğu Şekil 4.6’da görülmektedir.



Şekil 4.6. Hasta ve kontrol grubu MDA seviyesi

4.2.2. Protein karbonil miktarı sonuçları

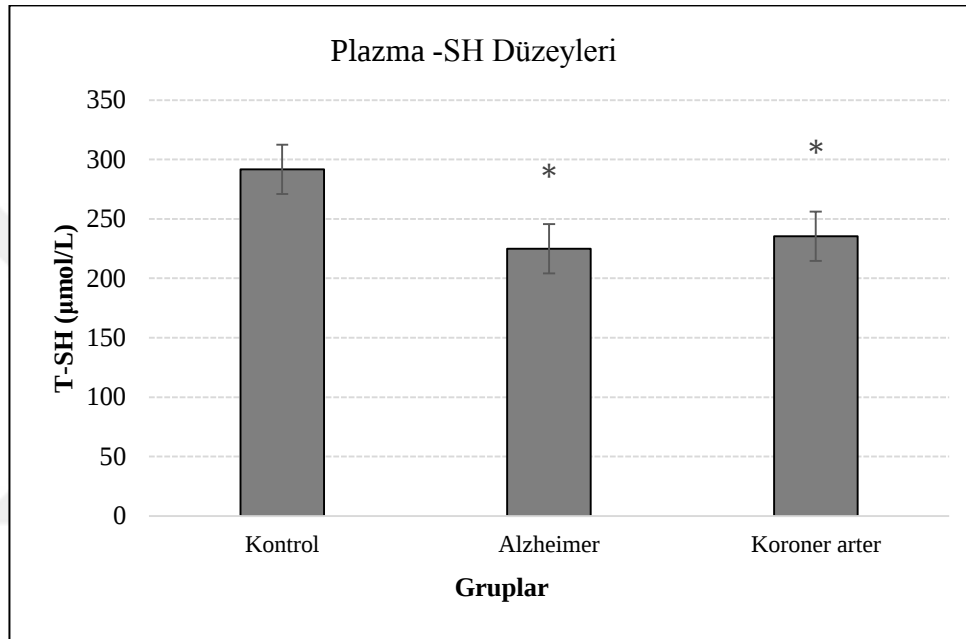
Gruplarda protein oksidasyon göstergesi olan Protein karbonil (PC) seviyesi sonuçları incelendiğinde Alzheimer ve koroner arter gruplarında kontrollere göre önemli bir artışın olduğu Şekil 4.7’de görülmektedir.



Şekil 4.7. Hasta ve kontrol grubu protein karbonil miktarı

4.2.3. Total tiyol miktarı sonuçları

Gruplarda antioksidan göstergesi olan total tiyol seviyesi sonuçları incelendiğinde Alzheimer ve koroner arter gruplarında kontrollere göre önemli bir azalışın olduğu Şekil 4.8’de görülmektedir.

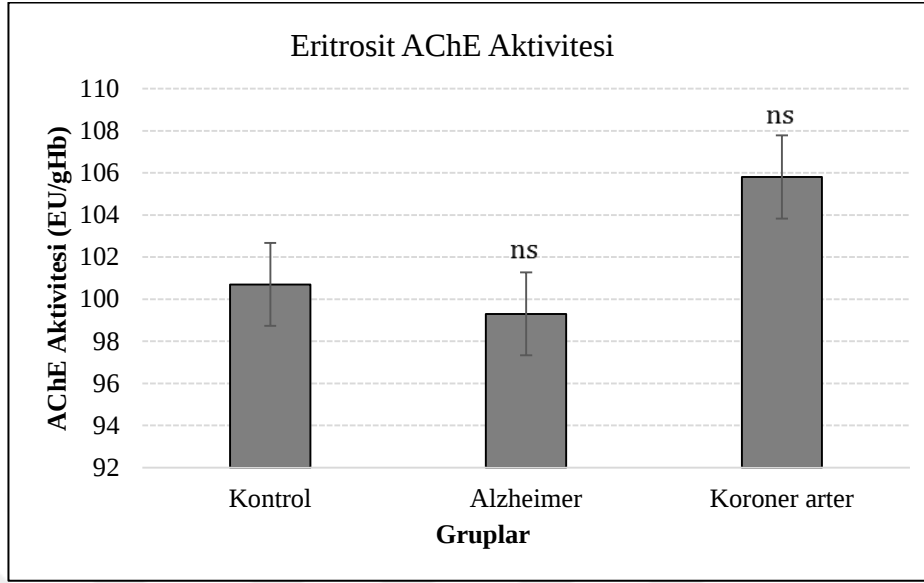


Şekil 4.8. Hasta ve kontrol grubu total tiyol miktarı

4.3. Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi

4.3.1. Eritrosit asetilkolinesteraz enzim aktivite sonuçları

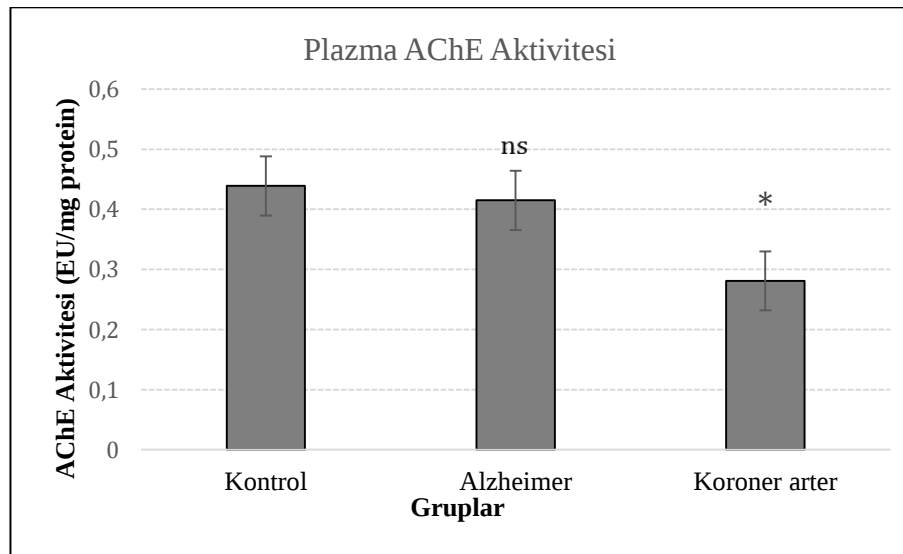
Gruplarda AChE enzim aktivitesi sonuçları incelendiğinde Alzheimer gruplarında kontrollere göre önemsiz bir azalış olurken koroner arter gruplarında kontrollere göre önemsiz bir artış olduğu Şekil 4.9’da görülmektedir.



Şekil 4.9. Hasta ve kontrol grubu eritrosit AChE enzim aktivitesi

4.3.2. Plazma asetilkolinesteraz enzim aktivite sonuçları

Gruplarda AChE enzim aktivitesi sonuçları incelendiğinde Alzheimer gruplarında kontrollere göre önemsiz bir azalış olurken koroner arter gruplarında kontrollere göre önemli bir azalış olduğu Şekil 4.10'da görülmektedir.

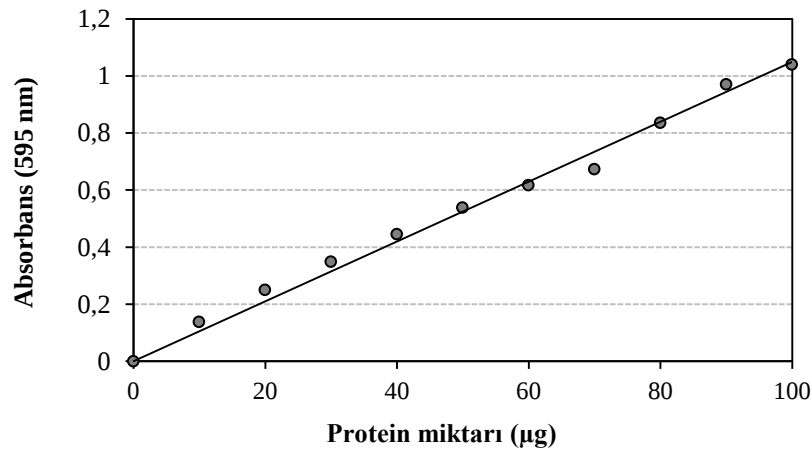


Şekil 4.10. Hasta ve kontrol grubu plazma AChE enzim aktivitesi

4.4. Protein ve Hemoglobin Tayini

4.4.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik

Kantitatif protein tayininde Coomassie Brilliant Blue yöntemi kullanıldı (Bradford 1976). Coomassie Brilliant Blue yöntemi için önce bir standart eğri hazırlandı. İnsan kanıyla hazırlanan hemolizat ve saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarı bu eğriye göre belirlendi. Kantitatif protein miktarları Şekil 4.11’de elde edilen grafikten hesaplandı (R^2 : 0,9917).

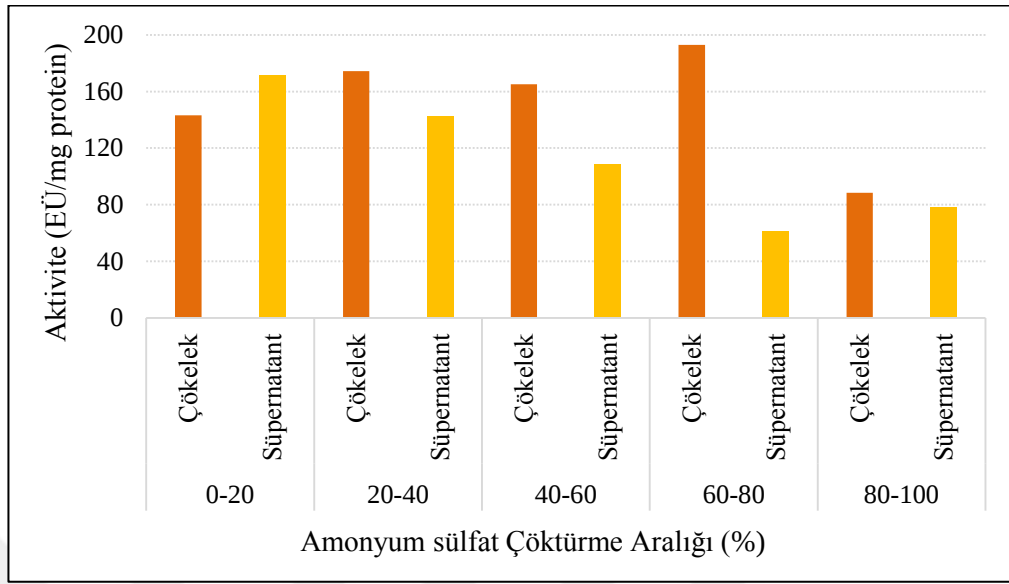


Şekil 4.11. Bradford yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik

4.5. İnsan Serum AChE Enziminin Kısmi Saflaştırılması

4.5.1. Amonyum sülfat çöktürmesi

Amonyum sülfat çöktürmesi Bölüm 3.6.1’de anlatıldığı gibi yapıldı. Her santrifüj işleminden sonra hem süpernatantta hemde çökelekte aktivite bakılarak çöktürme aralığı %20-80 olarak belirlendi. Amonyum sülfat çöktürme işlemi buz banyosunda magnetik karıştırıcı ile yapıldı.



Şekil 4.12. Amonyum sülfat çöktürme aralığını gösteren grafik

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen örnek 10000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen pelletler, 1 mM EDTA ve %0,5 Triton X-100 içeren 0,1 M sodyum fosfat (pH 7,4) tamponu içerisinde çözüldü. Elde edilen numune diyaliz torbasına yerleştirilerek hazırlanan 1 litrelik diyaliz tamponuna (50 mM Na-fosfat pH:7,4) karşı +4°C’de üç saat süreyle diyaliz edildi.

Çizelge 4.4. İnsan serum AChE enziminin kısmi saflaştırılması

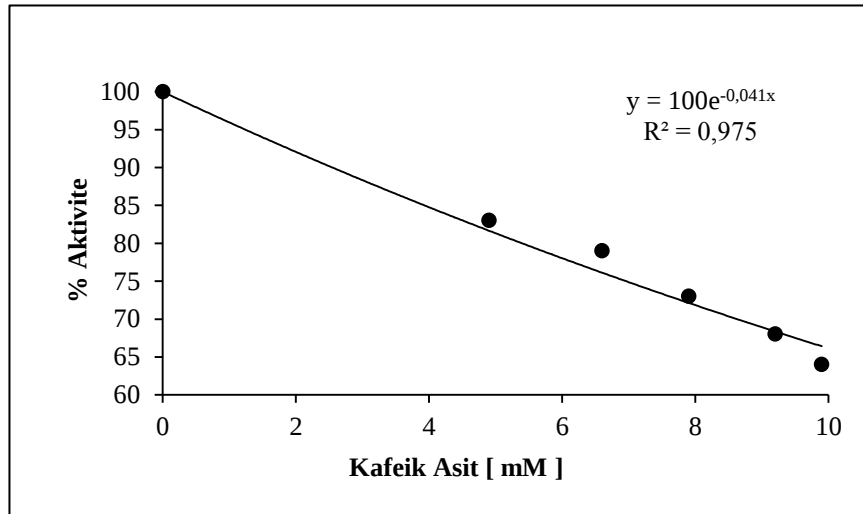
Saflaştırma basamağı	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EÜ)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Serum çözeltisi	7,28	25	6,1	152,5	182	1,19	100	1
Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	4,02	15	5,19	77,865	60,3	0,77	33,1	0,65

4.6. Serum AChE Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Fenolik Bileşiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları

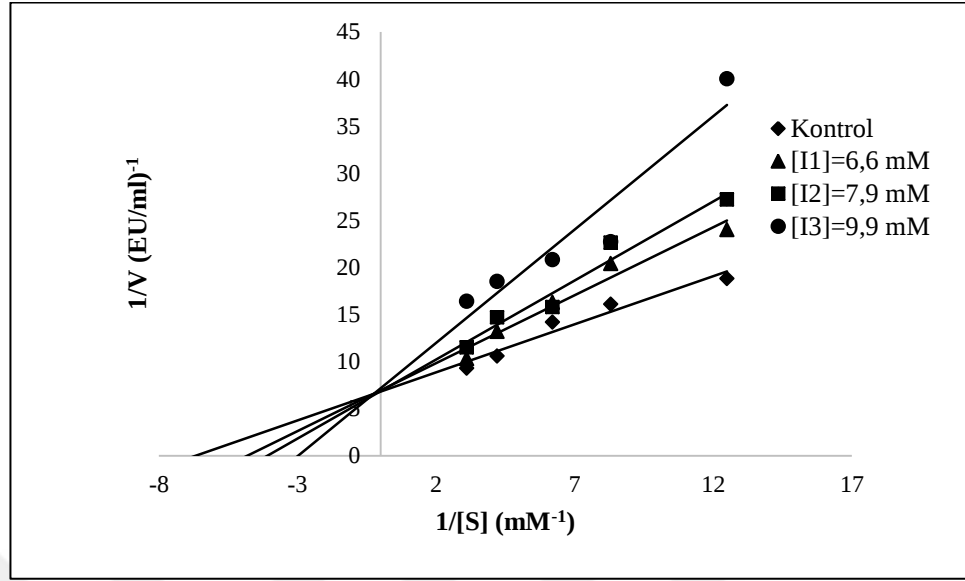
Bu çalışmada serum AChE enzim aktivitesi üzerine bazı fenolik bileşiklerin etkisi *in vitro* şartlarda araştırılmıştır. İnhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin K_i değerlerini belirlemek amacıyla serum AChE enzim aktivitesini yarıya düşüren fenolik bileşik konsantrasyonu ve diğer üç sabit fenolik bileşik konsantrasyonlarında uygun beş farklı substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir fenolik bileşik türevi için aktivite(%)-[I] ve K_i grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden her bir fenolik bileşik türevi için K_i değerleri hesaplandı.

Çizelge 4.5. Serum AChE'nin kafeik asit konsantrasyonuyla değişen % aktivite değerleri

%Aktivite	100	83	79	73	68	64
[Kafeik Asit] mM	0	4,9	6,6	7,9	9,2	9,9



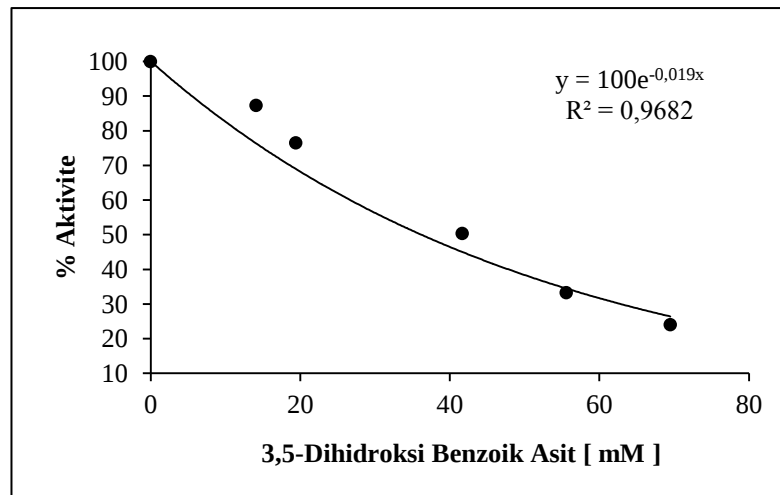
Şekil 4.13. Kafeik asit'in serum AChE enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren Aktivite (%)-[Kafeik Asit] grafiği



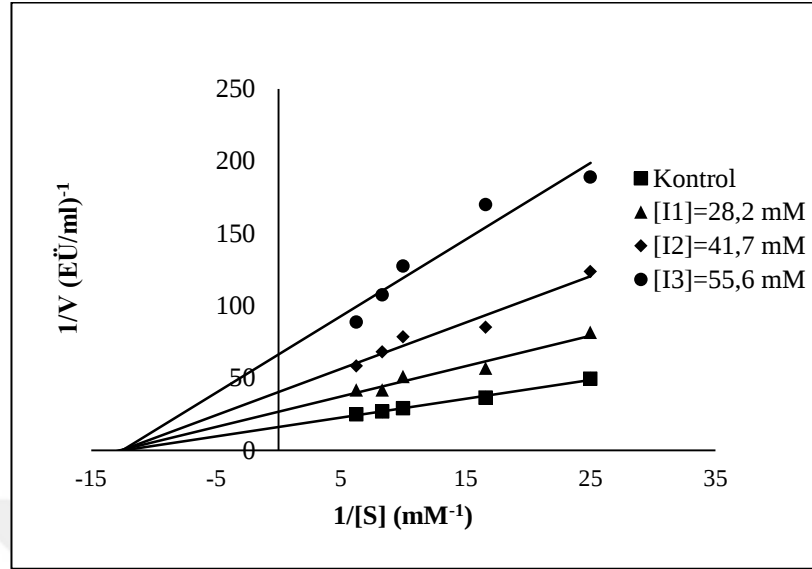
Şekil 4.14. Serum AChE enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı kafeik asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.6. Serum AChE'nin 3,5-Dihidroksi benzoik asit konsantrasyonu ile değişen % aktivite değerleri

%Aktivite	100	87,3	76,5	50,3	33,3	24
[3,5-Dihidroksi Benzoik Asit] mM	0	14,1	19,4	41,7	55,6	69,5



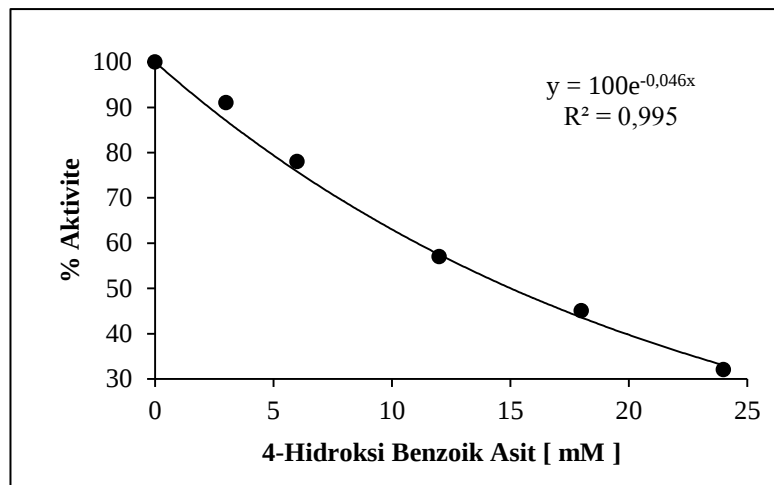
Şekil 4.15. 3,5-Dihidroksi benzoik asit'in serum AChE enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren Aktivite (%)-[3,5-Dihidroksi Benzoik Asit] grafiği



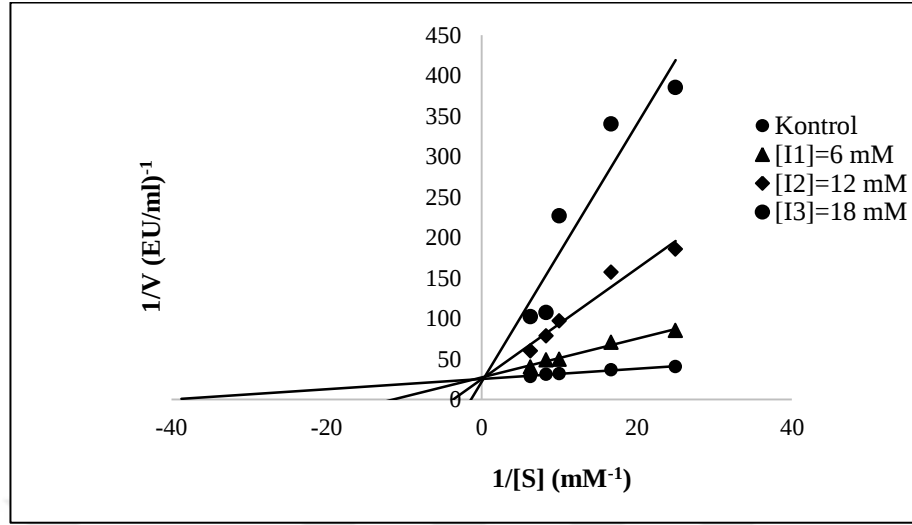
Şekil 4.16. Serum AChE enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı 3,5 Dihidroksi benzoik asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.7. Serum AChE'nin 4-Hidroksi benzoik asit konsantrasyonuyla değişen % aktivite değerleri

%Aktivite	100	91	78	57	45	32
[4-Hidroksi benzoik asit] mM	0	3	6	12	18	24



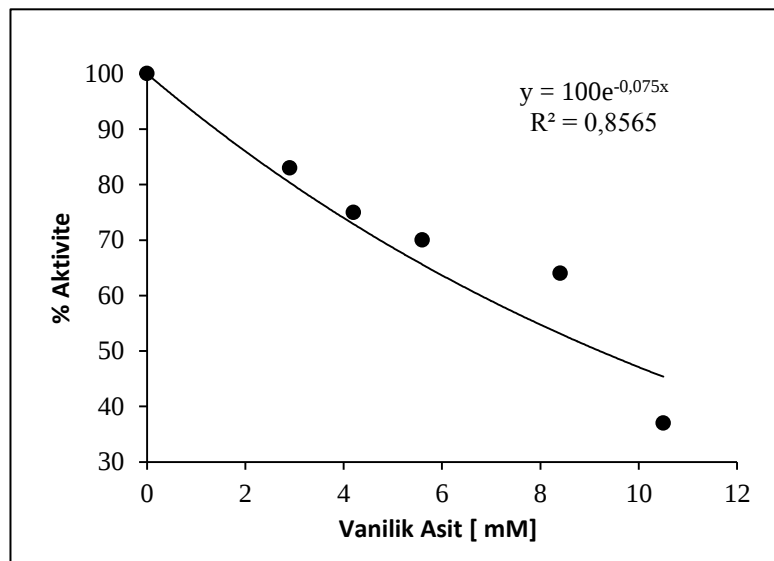
Şekil 4.17. 4-Hidroksi benzoik asit'in serum AChE enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren Aktivite (%)-[4-Hidroksi Benzoik] grafiği



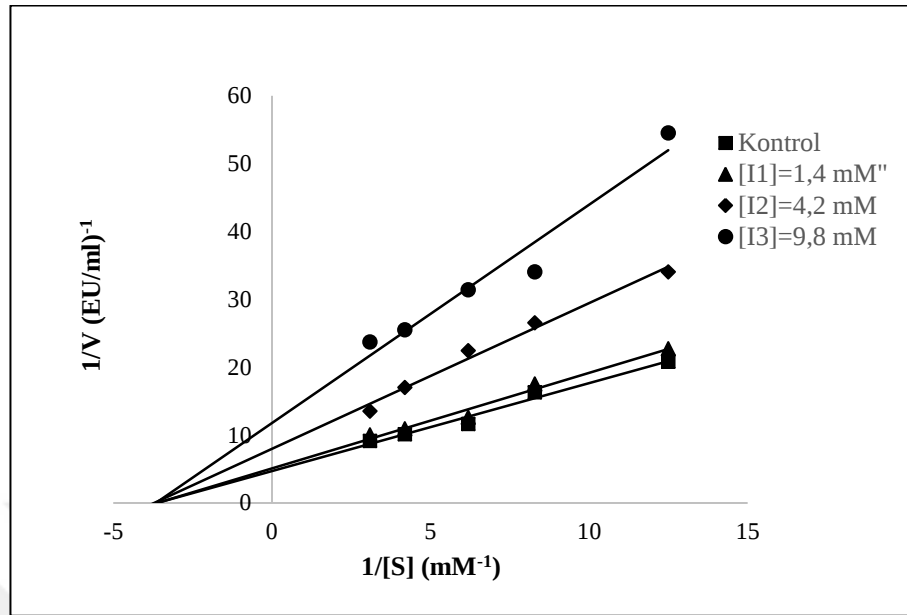
Şekil 4.18. Serum AChE enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı 4-Hidroksi benzoik asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.8. Serum AChE'nin vanilik asit konsantrasyonu ile değişen % aktivite değerleri

%Aktivite	100	83	79	73	68	64
[Vanilik Asit] mM	0	4,9	6,6	7,9	9,2	9,9



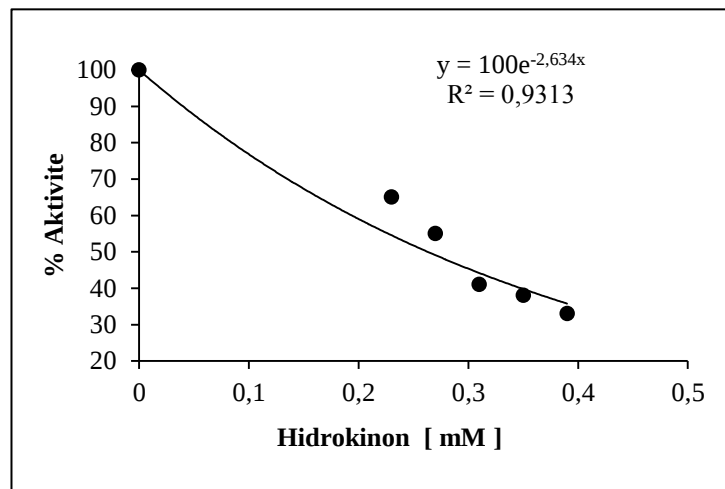
Şekil 4.19. Vanilik asit'in serum AChE enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren Aktivite (%)-[Vanilik Asit] grafiği



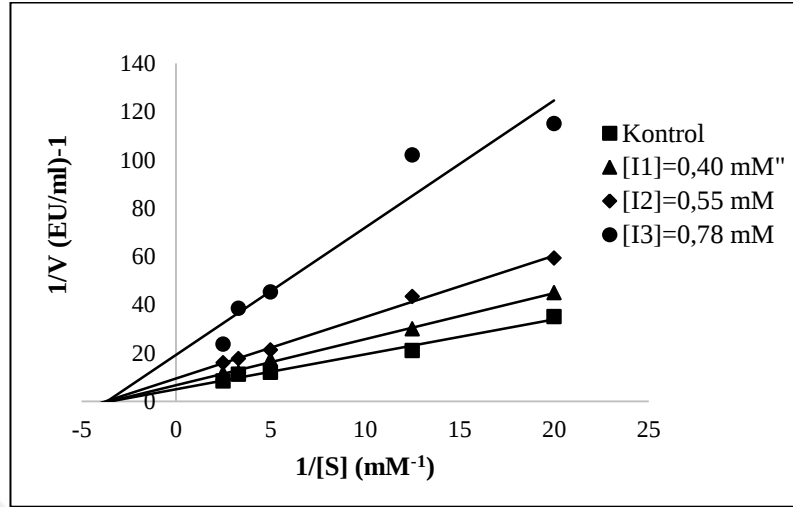
Şekil 4.20. Serum AChE enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı vanilik asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.9. Serum AChE'nin hidrokinon konsantrasyonuyla değişen % aktivite değerleri

%Aktivite	100	65	55	41	38	33
[Hidrokinon] mM	0	0,23	0,27	0,31	0,35	0,39



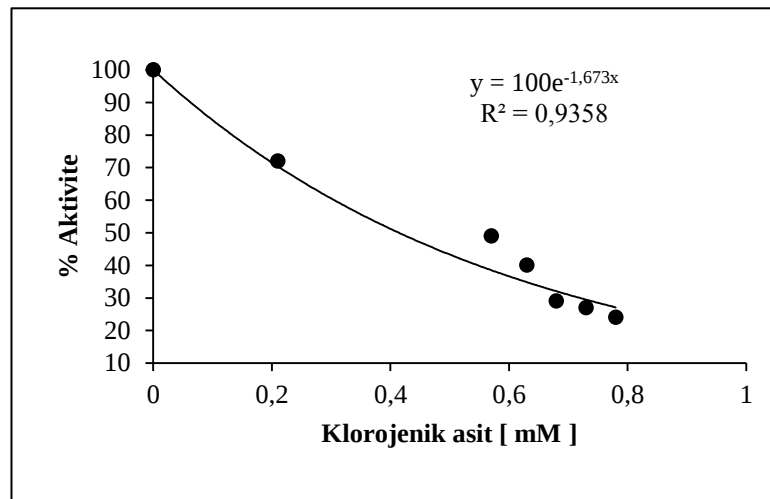
Şekil 4.21. Hidrokinon serum AChE enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren Aktivite (%)-[Hidrokinon] grafiği



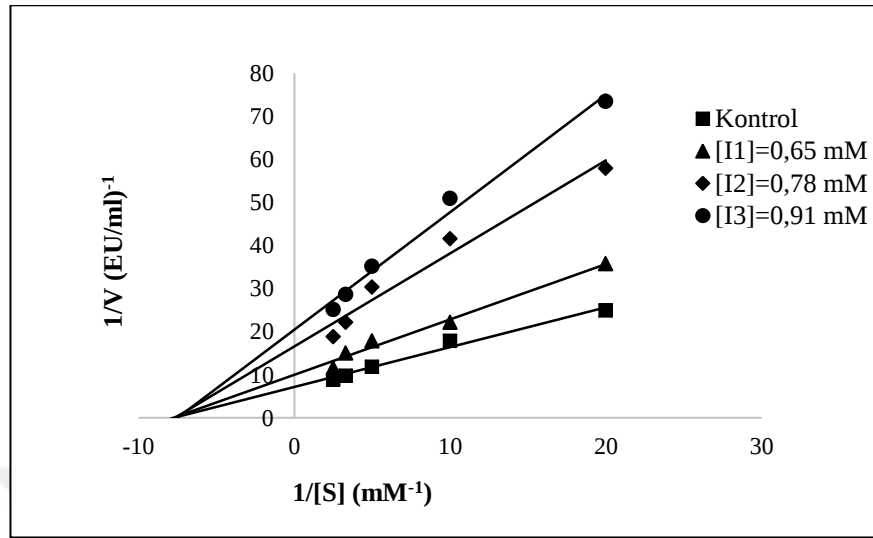
Şekil 4.22. Serum AChE enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı hidrokinon konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.10. Serum AChE'nin klorojenik asit konsantrasyonu ile değişen % aktivite değerleri

%Aktivite	100	72	49	40	29	27
[Klorojenik Asit] mM	0	0,21	0,57	0,63	0,68	0,73



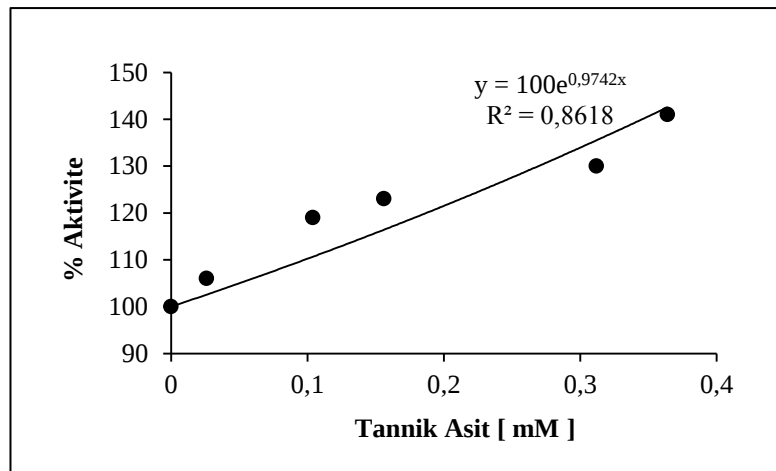
Şekil 4.23. Klorojenik asit'in serum AChE enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren Aktivite (%)-[Klorojenik Asit] grafiği



Şekil 4.24. Serum AChE enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Klorojenik asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.11. Serum AChE'nin tannik asit konsantrasyonu ile değişen % aktivite değerleri

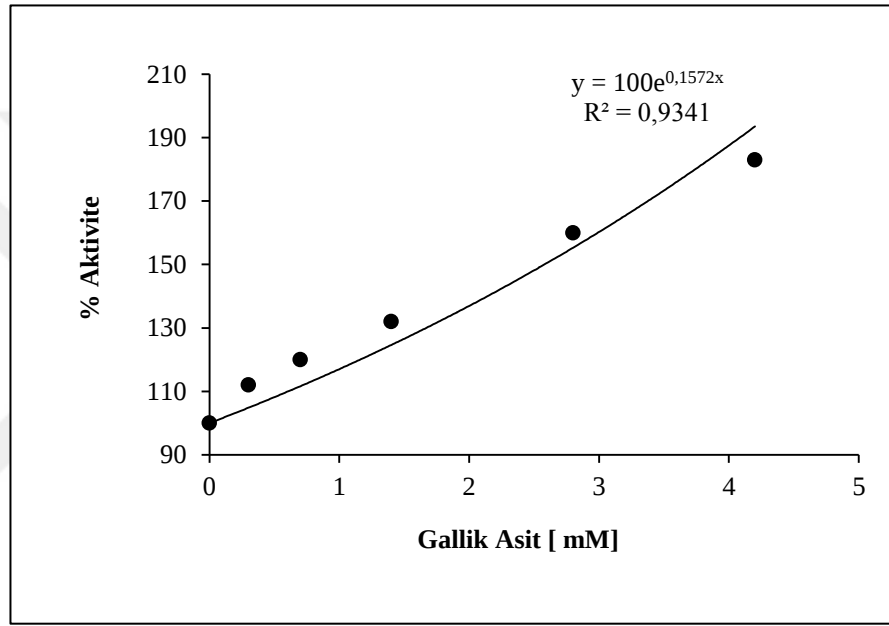
%Aktivite	100	106	119	123	130	141
[Tannik Asit] mM	0	0,026	0,104	0,156	0,312	0,364



Şekil 4.25. Tannik asit'in serum AChE enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren Aktivite (%)-[Tannik Asit] grafiği

Çizelge 4.12. Serum AChE'nin gallik asit konsantrasyonuyla değişen % aktivite değerleri

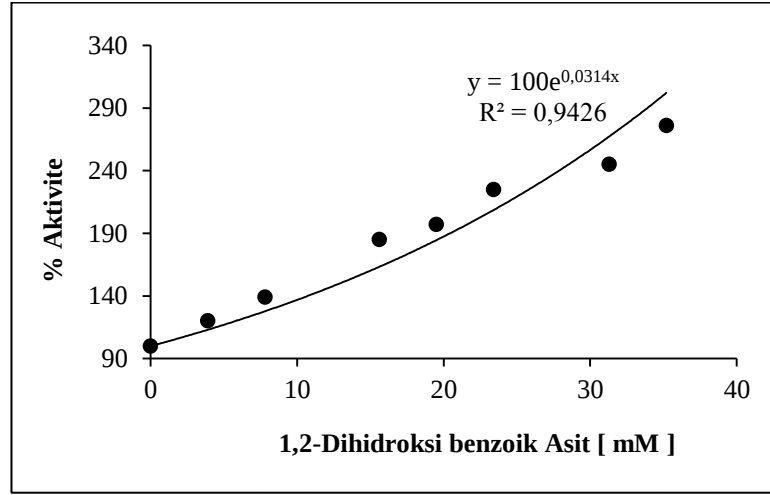
%Aktivite	100	112	120	132	160	183
[Gallik Asit] mM	0	0,3	0,7	1,4	2,8	4,2



Şekil 4.26. Gallik asit'in serum AChE enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren Aktivite (%)-[Gallik Asit] grafiği

Çizelge 4.13. Serum AChE'nin 1,2-Dihidroksi benzoik asit konsantrasyonuyla değişen % aktivite değerleri

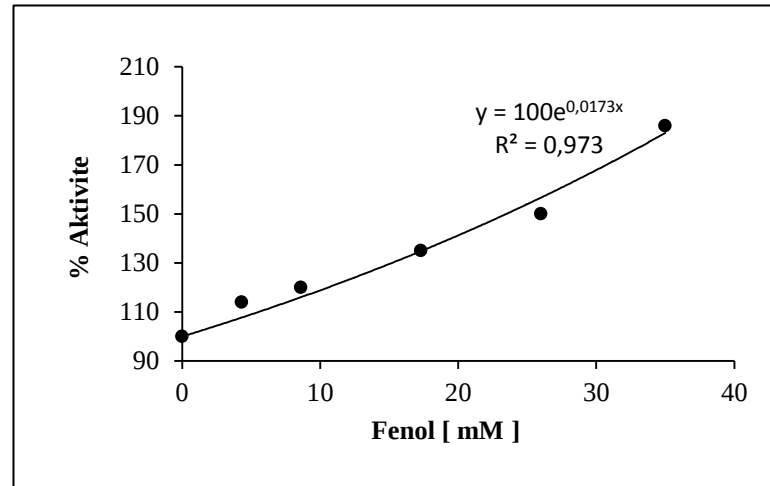
%Aktivite	100	120	139	185	197	245
[1,2-Dihidroksi benzoik Asit] mM	0	3,9	7,8	15,6	19,5	31,3



Şekil 4.27. 1,2-Dihidroksi benzoik asit'in serum AChE enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren Aktivite (%)-[1,2-Dihidroksi Benzoik Asit] grafiği

Çizelge 4.14. Serum AChE'nin fenol konsantrasyonuyla değişen % aktivite değerleri

%Aktivite	100	114	120	135	150	186
[Fenol] mM	0	14,1	19,4	41,7	55,6	69,5



Şekil 4.28. Fenol'ün serum AChE enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren Aktivite (%)-[Fenol] grafiği

Çizelge 4.15. AChE aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren bazı fenolik bileşiklerin K_i değerleri ve inhibisyon türleri

İnhibitör	IC ₅₀ (mM)	K _i değerleri	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon türü
Kafeik Asit	16,8	16,5	12,4	Yarışmalı
		12,5		
		8,2		
3,5-Dihidroksi Benzoik Asit	36,3	41,7	29,2	Yarışmasız
		28,2		
		17,7		
4-Hidroksi Benzoik Asit	15	2,4	1,4	Yarışmalı
		1,2		
		0,6		
Vanilik Asit	9,2	17,3	9,9	Yarışmasız
		6,1		
		6,5		
Hidrokinon	0,26	1,2	0,7	Yarışmasız
		0,5		
		0,3		
Klorojenik Asit	0,41	1,6	0,9	Yarışmasız
		0,6		
		0,5		

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tez kapsamında sağlıklı bireylerde, Alzheimer tipi demans ve koroner arter hastalarında asetilkolinesteraz (ACHE) gen ekspresyonunun kantitatif değişimi, oksidatif stres markırları olarak bilinen protein karbonil (PC) içeriği, total tiyol ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ve asetilkolinesteraz (AChE) enzim aktivitesi belirlenmiştir. Daha sonra bazı fenolik bileşiklerin serum AChE enzim aktivitesi üzerine *in vitro* etkileri incelenmiştir.

Birçok araştırma grubu, insanlar ve deney hayvanlarında yaptıkları çalışmalarda plazma, eritrosit, karaciğer ve kalp gibi dokularda prooksidan-antioksidan dengeyi inceleyerek nörodejeneratif ve kalp hastalığı ile oksidatif stres arasındaki ilişkiyi çözmeye çalışmışlardır ve bu araştırmalar hala devam etmektedir.

Serbest radikaller, hücre metabolizması sırasında meydana gelen biyokimyasal redoks reaksiyonları ile ortaya çıkan çiftleşmemiş elektrona sahip moleküllerdir. (Freeman and Crapo 1982; Lunec and Blake 1990). Bu radikaller direkt ve dolaylı yollardan pek çok hastalığın ortaya çıkmasında önemli rol oynarlar. Ateroskleroza bağlı olarak ilerleyen diyabet, miyokardiyal enfarktüs, katarakt, kanser, romatoid artrit, solunum, sinir ve üriner sistem hastalıkları ile oksidatif stresin arttığı bildirilmiştir. Birçok araştırmacı tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda, yaşlanma sürecinde antioksidan enzim aktivitelerinde önemli değişiklikler ve lipid peroksidasyonunda artış olduğu bildirilmektedir (Ak *et al.* 1994). Bu sonuçlara göre yaşa bağlı olarak oksidasyonun artmasıyla birçok hastalıklar meydana gelmektedir.

Oksidasyona neden olan serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA ve karbohidratlar gibi tüm önemli biyomoleküllere etki ederek yapılarının bozulmalarına neden olurlar (Budak *et al.* 2014). Biyolojik sistemlerde üretilen Reaktif oksijen türleri (ROS), hidroksil radikali (OH $\cdot$), süperoksit anyonu (O $_2^{\cdot-}$), peroksil radikali (RCOO $\cdot$), nitrik oksit (NO), ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H $_2$ O $_2$) gibi serbest radikaller

oksidatif stresin ortaya çıkmasında en önemli faktörlerdir (Babior 2000). Normal bir hücrede pro-oksidan ve antioksidan denge halindedir. Ancak, bu denge antioksidanların seviyeleri azaldığında veya oksidanlardaki artışın engellenemediği durumda antioksidanlar tarafından pro-oksidanlara doğru değişebilir. Bu durum, oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır (Sies 1991; Nordberg and Arner 2001; Gülçin 2012).

Hücreler normal koşullarda orta dereceli oksidatif stresi ve antioksidan savunma mekanizmalarının sentezini gen ekspresyonundaki değişiklikler yoluyla düzenleyerek ortadan kaldırabilir. Fakat oksidatif stres yüksek düzeylere ulaştığı zaman oksidasyon ürünlerine karşı adaptasyon sağlanamaz ise hücrede hasar oluşabilir. Protein, DNA ve lipidleri içeren tüm biyomoleküllerin oksidatif hasarının kardiyovasküler, nörodejenaratif ve kanser gibi birçok hastalıklarla ilişkilendirilmesi antioksidan çalışmalarına olan ilgiyi artırmıştır (Sies 1991; Nordberg and Arner 2001; Gülçin 2012).

Doku hasarları sonucu fagositlerin aktivasyonu veya parçalanmış hücrelerden geçiş metal iyonlarının yayılması sonucu serbest oksijen türleri oluşabilmektedir. Oluşan serbest radikaller enzim ve proteinlerin yapılarında bulunan aminoasitlerin tiyol gruplarını da oksitleyerek deaktive ederler. Ayrıca hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini de oksitleyerek önemli ölçüde hücre hasarlarına da neden olmaktadır (Haugaard 1968; Pacific *et al.* 1991). Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü olan MDA, üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açmasının yanı sıra enzim aktivitesinin ve iyon geçirgenliğinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara da neden olur. Uzun ömürlü ve yüksek reaktiviteye sahip olan MDA, enzimler, nükleik asitler, tiyoller ve proteinlerin amino grupları için yüksek afinite göstermesi nedeniyle hücreler için son derece toksiktir (Oropesa *et al.* 2009). Membran fonksiyonlarının yavaşlamasına, membran akıcılığının azalmasına, membran reseptör ve enzimlerinin inaktive olmasına, Ca^{2+} iyonlarının membrandan geçişlerinin artmasına neden olduğu bilinmektedir (Canoruç *et al.* 2001).

Lipid peroksidasyonu sonucu terminal karbonil gruplarıyla bileşik oluşturan MDA, bu lipoproteinlerle etkileşim yeteneğinde olduğundan oksidatif hasar göstergesi olarak geniş çapta kullanılmaktadır. Bu modifiye lipoproteinlerin makrofajlar tarafından alınarak köpük hücrelerine dönüştürülmesi, aterosklerotik plak gelişimi ve aterogenezin ilerlemesinde önemli bir faktördür (Sevanian and Hochstein 1985; Esterbauer *et al.* 1992). Bu nedenle peroksidasyon sürecinin değerlendirilmesinde, peroksit oluşturan oksidan mekanizması, peroksit uzaklaştıran antioksidan sistem ve lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA dikkate alınmalıdır (Surekha *et al.* 2007).

Yagi (1984) tarafından yapılan bir çalışmada lipid peroksidasyon ürünlerindeki artışın ateroskleroz için bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Çünkü dolaşımdaki serbest oksijen radikalleri damar çeperi üzerinde toksik etki ile mevcut ateroskerozu artırırken, oksidatif stres sonucunda eritrosit membran geçirgenliğindeki değişikliklerin hemolize yol açtığı ve sonuçta hipoksik bölgeye oksijen taşıma kapasitesinin azaldığı belirtilmiştir.

Tamer *et al.* (2002) tarafından yapılan bir çalışmada 30 sağlıklı ve koroner arter hastası oldukları anjiyografik olarak tespit edilen 45 hasta da serum MDA düzeyleri karşılaştırılmış hasta grubunda kontrol grubuna göre MDA seviyesi belirgin olarak yüksek bulunmuştur. Kanbağı vd (2000) anjiyografik incelemeler sonucu tespit edilen 50 koroner arter hastası ve 17 sağlıklı birey ile yaptıkları bir çalışmada ölçülen serum MDA düzeylerinin koroner arter hastalarında sağlıklı bireylere göre anlamlı bir farklılık göstermediğini tespit etmişlerdir.

Bizim bulgularımızda lipid peroksidasyonu göstergesi olan MDA seviyesi sonuçları incelendiğinde Alzheimer ve koroner arter gruplarında kontrollere göre önemsiz bir artışın olduğu Şekil 4.6'da görülmektedir.

Bazı hasta gruplarında MDA seviyesinin yüksek bulunması, aktif hastalık döneminde oksidatif stres artışının hastalık şiddeti ile ilişkili olduğunu doğrulamaktadır. Lipid peroksidasyonu oksidatif stresin bir göstergesidir ve MDA gibi peroksidasyon son

ürünlerinin miktarının belirlenmesi ile lipid oksidasyonu olduğu söylenebilir (Greilberger *et al.* 2008). Lipid peroksidasyon ürünlerindeki artışın oluşturacağı metabolik hasarlar antioksidan savunma sistemi tarafından bertaraf edilir. Çalışmamızda hasta gruplarında spektrofotometrik yöntemle ölçülen MDA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamaması, Alzheimer ve koroner arter hastalarında plazma antioksidan kapasitesinin artan lipid peroksidasyon ürünlerine karşı adaptif bir cevap olarak arttığını ve lipid peroksidasyonunu en aza indirdiğini göstermektedir.

Son dönemde yapılan çalışmalar, plazma gibi kompleks bir sistemde antioksidan kapasitesi azaldığında, proteinlerin oksidatif hasarın hedefi olduklarını göstermektedir. Oksidasyon ve koagülasyon sistemi pek çok enzim inhibitörü için olduğu gibi, plazma proteinlerinin fonksiyonlarını da değiştirmektedir (Kılıç 2007). Bu durum araştırmacıları, protein oksidasyonunun bir göstergesi olan PC grupları varlığının bazı hastalıklar ve transkripsiyon/translasyon hataları ile ilişkili olup olmadığının merak edilmesiyle protein oksidasyonu üzerinde araştırmaya yöneltmiştir.

Bu çalışmada plazma proteinlerinin oksidasyon durumunu araştırmak için PC içeriği tayini bir parametre olarak kullanılmıştır. Bu ise, amino asit yan zincirlerindeki değişimi içeren bir oksidasyon olgusunu takip etmemize olanak sağlar. (Oates and Salem 1991). Protein karbonil içeriği, o-tirozinin plazmadaki düzeyleri ile ilişkilidir. o-Tirozinin serumdaki varlığı, proteinlerin metal katalizli oksidasyonuna bağlı olarak gösterilmiştir (Laeuwenburgh *et al.* 1997). Önceki çalışmalar proteinlerde bazı aminoasitlerin (prolin, arginin, lizin, treonin) metal-iyon katalizli reaksiyonlarla oksidatif saldırıya uğradığında treoninden 2-amino-3-ketobütirik asid, pirolinden 2-pirolidon gibi karbonil türevlerinin oluşmakta olduğunu rapor etmişlerdir (Stadtman 1993). Aynı zamanda hücrelerde okside olan lipid ve proteinler normal proteinleri okside ederek protein-protein çapraz bağlarının oluşumuyla PC'lerin miktarını artırırılar. Bu nedenle, plazma proteinlerinde karbonil grup miktarlarının ölçülmesi, plazma proteinlerinin oksidasyon durumunun değerlendirilmesinde güvenilir bir metod olarak görülmektedir.

Yapılan çalışmalar vücut proteinlerinin çok çeşitli ajanlar tarafından (serbest radikaller,

MDA ve konjuge dien gibi lipid peroksidasyon ürünleri, bakır ve demir gibi redoks aktif metaller, UV ve gama ışınları, sigara, ozon, çeşitli ilaçlar ve metabolitleri vs.) okside edilebileceğini göstermiştir (Berlett and Stadtman 1997). Kardiyovasküler hastalıklara yol açması bakımından lipid peroksidasyonun etkilerini açıklayan önemli literatür bilgilerine rastlanırken, protein oksidasyonu ve kardiyovasküler hastalıklar arasındaki ilişki hakkında oldukça az bilgiye rastlanmaktadır (Serdar *et al.* 2006).

Kalousová *et al.* (2005) tarafından ateroskleroz olan 42 hasta ve 21 sağlıklı kontrol grupları üzerine yapılan çalışmada protein oksidasyon belirteçlerinden serum proteinlerin ileri oksidasyon ürünleri (AOPP) seviyelerinde hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmadığı belirtilmiştir. Kaneda *et al.* (2002) koroner arter hastalığı şüphesiyle anjiyografi uygulanan ve 140'ı sağlıklı, 252'si koroner arter hastası olduğu tespit edilen toplam 392 katılımcı (230'u sigara kullanıcısı, 99'u diyabetik olan) ile yaptıkları bir çalışmada, plazma AOPP düzeyi ($\mu\text{mol/l}$) kontrol grubunda hasta grubuna göre daha düşük olduğu bulunmuştur.

Bu çalışmada protein oksidasyon göstergesi olan PC seviyesi sonuçları incelendiğinde Alzheimer ve koroner arter gruplarında kontrollere göre önemli bir artışın olduğu belirlenmiştir. Protein moleküllerindeki oksidatif hasarın göstergesi olarak en yaygın kullanılan biyoindikatör protein karbonilasyonudur. Proteinler süperoksit ve nitrikoksitin reaksiyonu sonucu oluşan güçlü bir oksidan olan peroksinitritle modifiye olabilirler. Peroksinitrit, nitrotirozini oluşturarak tirozin rezidülerinin nitrasyonuna neden olabilir. Hem protein karbonil hemde peroksinitritle modifiye olan proteinler Alzheimer ve diğer nörodejeneratif hastalıkta artış gösterirler (Smith *et al.* 1996; Smith *et al.* 1997).

PC miktarının artışı reaktif oksijen türlerinin aşırı birikiminden kaynaklanabilir ve bu artış oksidatif hasarın açık bir göstergesi haline gelebilir. Alzheimer ve koroner arter hastalarında plazma PC miktarının anlamlı bir şekilde artması aktif hastalık sırasında ROS'un daha da arttığını düşündürmektedir. Bu ise sürekli olarak oluşan ROS'a karşı plazma antioksidan kapasitesinin yetersiz kalmasından kaynaklanır. Artan aşırı ROS

sebebiyle oksidan-antioksidan dengesi bozulmakta, eşleşmemiş elektron sahibi reaktif türler hücrelerin normal bileşeni olan protein makromoleküllerine saldırmakta; böylece hücrede yapısal modifikasyona sebep olarak hücrenin normal fonksiyonunu yerine getirmesine engel olmaktadır. PC türevlerinin oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları amino asitlerin α - karbon atomlarının veya R yan zincirlerinin oksidatif modifikasyonlarından ve bu modifikasyonları takiben meydana gelen reaktif oksijen aracılı peptit ayrılması reaksiyonundan oluşmaktadır. ROS'nin proteinlerle etkileşimi sonucunda, histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda amino asit oksidasyonu sonucu PC ürünleri meydana gelir. Bu hastalarda ROS'ye karşı antioksidan savunma sistemlerinin etkilenmesi sonucu meydana gelen oksidatif stres, kardiyovasküler ve nörodejeneratif gibi birçok hastalıklar için kritik öneme sahiptir. PC seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek çıkması, bu hastalarda oksidatif stresin meydana getirdiği protein hasarının göstergesi olup literatür ile uyumludur.

Antioksidanlar, günümüzde içinde bulundukları besinler, yaygın kullanım özellikleri ve koroner kalp ve bazı nörodejeneratif gibi hastalıklardan korunma ve tedavisindeki yeri sebebiyle ilgi çekmeye devam etmektedir. Antioksidanlar, aynı ortamda okside olabilen bir maddeye göre daha az bulunmasına rağmen, o maddenin oksidasyonunu önleyen veya geciktiren madde olarak tanımlanabilirler. Antioksidanların fizyolojik rolleri, kimyasal reaksiyonlar sonucunda ortaya çıkan serbest radikallerin dokuya zararını önlemektir (Hertog *et al.* 1995).

Oksidatif protein hasarı, PC düzeylerindeki artış ve protein tiyol düzeylerindeki azalma ile karakterizedir. Serbest radikallerin proteinlerdeki tiyol (-SH) gruplarının oksidasyonuna yol açtığı bildirilmiştir. Glutasyon, sistein, albumin ve diğer yapılardaki protein -SH grupları oksidasyon zincirini kırma özelliğine sahip önemli antioksidanlardır. Bunların en önemli görevi, enzim ve proteinlerin -SH gruplarının indirgenmesi ile redükte formlarının yeterli düzeylerde kontrolünü sağlamaktır. Tiyol grubuna sahip birçok enzim okside olarak ya da O_2 'nin direkt etkisiyle hızla aktivitelerini yitirirler. İşte GSH kendisi okside olup tiyol gruplarını tekrar indirgeyerek bunların aktivasyonunu sağlar. Özellikle H_2O_2 'nin elimine edilmesinde GSH'ın

oksidlenebilirliğinden faydalanılır (Carlberg and Mannervik 1985; Akkuş 1995; Erçin 2010).

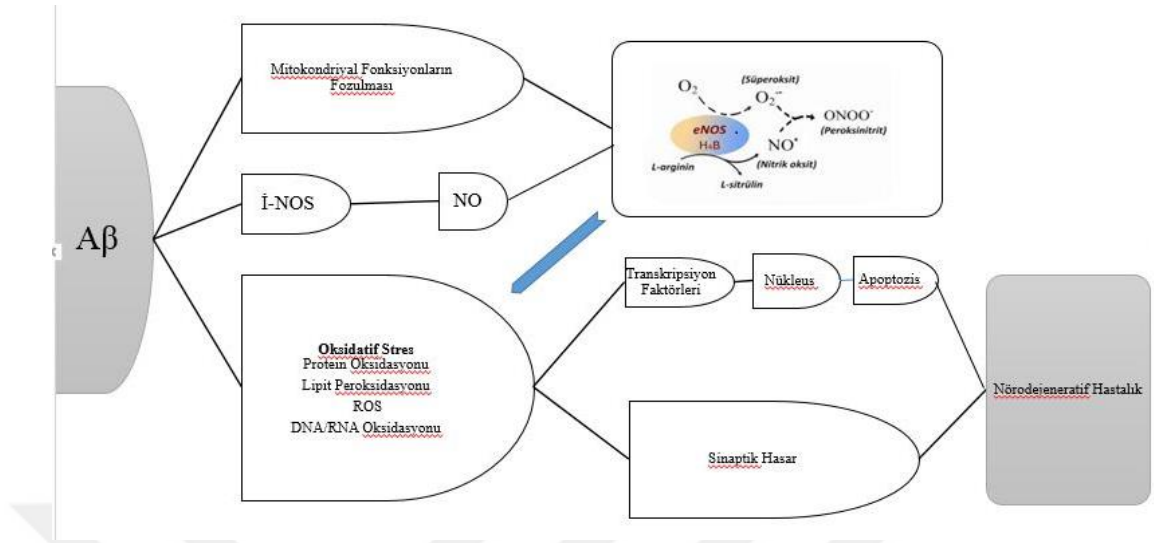
Bazı hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda genellikle -SH gruplarında oksidatif stresle birlikte bir azalma saptanmıştır. Soszynski and Bartosz (1997) tarafından yapılan bir çalışmada oksidatif stres varlığında eritrosit membran -SH gruplarında azalma olduğu tespit edilmiştir. Kadota *et al.* (1991) tarafından yapılan bir çalışma, oksidatif strese bağlı olarak koroner arter hastalarında serum albumin -SH gruplarının belirgin olarak azaldığını gösterirken. Asayama *et al.* (1993) ise Tip I diabetli genç hastalarda serum -SH düzeylerini incelemişler ve sağlıklı bireylere göre bir farklılık bulamamışlardır. Forgione *et al.* (2002) tarafından yapılan bir çalışmada tiyol gruplarının oksidasyonu ve daha önemlisi GPx'in hücrel formunun ekspresyonunun baskılanması, ROS'de artışa sebep olabileceği bildirilmiştir. Morrison *et al.* (1999) tarafından yapılan bir çalışmada kontrol grubu (n=78) ve koroner arter hastalığı olan (n=81) katılımcılarda serum total GSH düzeyleri karşılaştırılmış ve koroner arter hastalığı olan grupta ($3,20 \pm 2,2$) serum total GSH düzeylerinin kontrol grubundan ($4,35 \pm 2,1$) belirgin olarak düşük olduğu bulunmuştur.

Sülfidril gruplarının total seviyesi Alzheimer hipokampuslarında değişmez fakat SH grupları içeren proteinlerin seviyeleri azalır (Aksenov and Markesbery *et al.* 2001). Burada sülfidril gruplarından ziyade SH grupları içeren proteinler oksidatif hasara karşı antioksidan savunmada görev alabileceği söylenebilir. Bizim çalışmamızda antioksidan olan total tiyol seviyesinin Alzheimer ve koroner arter gruplarında kontrollere göre önemli bir şekilde düşük olduğu Şekil 4.8'de görülmektedir.

Alzheimer ve koroner arter hastalarının plazmasında antioksidan özellik gösteren total tiyol gruplarının azalması, ROS'ye karşı plazma antioksidan kapasitesinin yetersiz kalması sonucu tiyol grubu içeren moleküllerin oksidatif hasara maruz kalmasından dolayı meydana gelebileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda oksidatif hasara karşı düzenleyici rol alan koruyucu genlerin yetersizliği bu hasta gruplarının plazmalarında protein tiyol gruplarının oksidatif hasara uğramasını önleyemeyeceği tahmin

edilmektedir. Yapılan diğer araştırmalarda –SH içeren antioksidan sentezinin bazı nörodejeneratif hastalarda artabileceği bildirilmiştir. Çünkü bu antioksidanların oksidatif stres durumunda sentezindeki artış amacı, oksidatif hasara yol açacak oksidanların zararlı etkilerini en aza indirmeye çalışmak olabileceği bu yüzden de tiyol gruplarında bir azalma meydana gelebileceği öngörülmektedir. Çalışmamızda Alzheimer ve koroner arter hastalarında total tiyol içeriğinin azalması beklenen bir durumdur. Total tiyol seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük çıkması bu hastalarda oksidatif stresin meydana getirdiği hasarın göstergesi olup ROS'ye karşı plazma antioksidan kapasitesinin yetersiz kalmasından kaynaklanır.

DNA molekülü serbest radikaller için önemli bir hedeftir ve kolaylıkla hasara uğrayabilir (Hagen 1986; Sonntag *et al.* 2004). İyonize edici radyasyona maruz kalınması ve biyokimyasal reaksiyonlarla oluşan serbest radikaller DNA'ya hasar vererek hücrede mutasyona neden olurlar. Sitotoksik etki, büyük oranda nükleik asitlerin baz modifikasyonlarından kaynaklanan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer değişikliklere bağlıdır. Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer. Hidrojen peroksit zarlardan kolayca geçip hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücrede fonksiyon bozukluğuna ve hatta hücre ölümüne neden olabilir (Meram ve Aktaran 2002; Özkan ve Fışkın 2004). DNA bünyesinde Cu^{2+} iyonları G-C'ce zengin bölgelerde en çok bulunduğu, en fazla oksidatif hasara maruz kalan baz guanindir. Bu iyonların polianyonik karakterde olan özellikle de DNA'nın guanin bazlarına yüksek afinite ile bağlandığı ve H_2O_2 ile etkileşime girerek DNA hasarını başlattığı gösterilmiştir. Rocha *et al.* (2012) tarafından hidroksiüre ile tedavi edilen orak hücre anemili hastalarda periferik kandaki lökositlerde DNA hasarının araştırılması amacıyla alkalik comet testi kullanılarak yapılan çalışmada; hasta grubu kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek oranda DNA hasarı tespit edilmiştir.



Şekil 5.1. Oksidatif stresin hastalık oluşumuna etkisi

Son zamanlarda ACh nörotoksitesinin belirgin bir şekilde AChE gibi endojen faktörler ile düzenlenmiş olduğu bildirilmektedir. Alzheimer beyinlerinde AChE sadece ACh'yi hidrolize etmez, aynı zamanda olgun senil plakların amiloid çekirdeği ile de ağırlıklı olarak ilişkilidir. Bazı biyokimyasal çalışmalar AChE aktivitesinin amiloid plaklar içinde ve etrafında arttığını göstermiştir. Aynı zamanda AChE, amiloid fibril ve yüksek derecede toksik AChE-A β komplekslerinin oluşumuna sebep olur (Inestrosa *et al.* 1996; Alvarez *et al.* 1998). AChE-A β komplekslerinin neden olduğu nörotoksite daha fazla nörodejenerasyonu tetiklediği bildirilmiştir. AChE amiloid oluşumunu hızlandırdığından dolayı bu enzimin inhibitörlerinin kullanılması Alzheimer hastalığının tedavisinde önemli olabileceği düşünülmektedir (Inestrosa *et al.* 2005).

Apoptotik nöronların yüksek düzeyde AChE salgılamasıyla nörotoksik plakların oluşumu artabilir. Bu kademeli ilerleme Alzheimer hastalarında görülen nöronal kaybın ilerlemesine neden olur (Yang *et al.* 2002).

Berson *et al.* (2008) tarafından RT-PCR yöntemi ile yapılan bir çalışmada Alzheimer hastalarının nöronlarında AChE-S mRNA düzeylerinin kontrollere göre anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Bununla birlikte, RT-PCR'ın aksine FISH analizinde ise AChE-R mRNA düzeyinde önemli derecede artış saptanmıştır. Böylece, Alzheimer

hastalarının hipokampal nöronlarında AChE-S mRNA daha az üretilirken AChE-R mRNA kontrollere mukayese edildiğinde daha çok üretilmektedir. Yang *et al.* (2002) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada semikantitatif analizler sonucu apoptotik hücrelerde AChE mRNA düzeyinin 5,34 kata kadar arttığı gösterilmiştir. Memelilerde AChE-R'nin aşırı ekspresyonu yaş ve birçok stres faktörleri ile ortaya çıkar (Meshorer and Soreq 2006). Çalışmamızda Alzheimer ve koroner arter hastalarının lökositlerinde ACHE kantitatif gen ekspresyonunda anlamlı derecede artış tespit edilmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre lökositlerde ACHE'nin mRNA ekspresyon düzeyindeki artışa oksidatif stres ve β amiloidin ($A\beta$) yüksek düzeyinin neden olabileceği söylenebilir. Mevcut sonuç aynı zamanda ACHE'nin apoptotik hücre ölümü sürecinde önemli bir rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır. Bu çalışmanın Alzheimer hastalığının önlenmesi ya da tedavisinde ACHE mRNA ekspresyon seviyesini azaltmak için yeni çalışmalara ışık tutması beklenmektedir.

Sonuç olarak, Alzheimer ve koroner arter hastalarında oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla yapmış olduğumuz çalışmamızda, Alzheimer ve koroner arter hastalarında plazma PC düzeyi ve ACHE mRNA ekspresyon seviyesinin arttığı, plazma -SH düzeyinin azaldığı gözlemlendi. Plazma AChE aktivitesi, MDA düzeyi ve eritrosit AChE aktivitesinde ise hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı saptanmıştır. Hasta gruplarında PC ve total tiyol seviyelerinin anlamlı olarak farklı çıkması oksidatif stress ile meydana gelen protein ve lipid oksidasyonunun değerlendirilmesi açısından önemlidir.

Oksidatif stresin, Alzheimer hastalığında primer mi, yoksa sekonder bir rol mü oynadığı kesin olmasa da, nöronal kayba yol açan önemli bir nörodejeneratif faktör olduğu açıktır (Butterfield and Lauderback 2002). Yaşlanmış beyinde sıklıkla görülen oksidatif hasar, Alzheimer hastalığında daha da şiddetli olarak görülmektedir (Dalle-Donne *et al.* 2003).

Nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığının başlaması ile birlikte gerçekleşen nöron ve akson kaybı daha düşük düzeylerde asetilkolin salınımına neden

olur. Bu durumu düzeltmek için uygulanacak yöntemlerden biri günümüzde zor olan asetilkolin benzeri maddelerin verilmesidir. Asetilkolin düzeylerini arttırmak için uygulanacak bir diğer yöntem ise asetilkolini hidroliz eden AChE enziminin baskılanmasıdır. Çalışmalar AChE inhibisyonuna bağlı asetilkolin düzey artışlarının, Alzheimer hastalığının erken evrelerindeki kognitif defisiti iyileştirebileceğini göstermiştir. Bu amaca yönelik olarak çoğunlukla kolinesteraz enzim inhibitörleri kullanılmaktadır (Şahin 2002; Thacker 2003).

Kolinerjik belirleyici olan AChE aynı zamanda kan damarları içinde esnekliği sağlayan asetilkolini hidroliz ettiği için koroner arter hastalığı üzerinde de bir etkiye sahiptir. (Collins *et al.* 1995). Yapılan bazı çalışmalara göre kolinerjik sistemlerin, anjiyogenezin (yeni damarların oluşması) düzenlenmesinde bir role sahip olduğu vurgulanmıştır. Alzheimer hastaları tarafından kullanılan kolinerjik sistemde düzenleyici bir etki gösteren bazı AChE inhibitörlerinin, kardiyovasküler hastalarda da anjiyogenezin (yeni damarların oluşması) düzenlenmesinde bir rolü olduğu vurgulanmıştır (Yoshihiko *et al.* 2010).

Alzheimer ve koroner arter gibi hastalıkların asetilkolin eksikliği ile derin bir bağlantısı olduğu için AChE enzimini inhibe eden bazı ilaçlar bu hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. AChE enzimini inhibe eden bu ilaçlara kolinesteraz inhibitörleri veya antikolinesterazlar denilmektedir. Kolinesteraz inhibitörleri AChE'nin hidroliz etkisini inhibe ederek anjiyogenez ve periferik kolinerjik fonksiyonu güçlendirmektedir. Bu inhibitörler, enzimi tersinir veya tersinir olmayan şekilde inhibe ederek asetilkolin hidrolizini engeller (Ercan 2002). Bu amaçla, hem Aβ fibril oluşumunu bozan hem de kolinerjik hipoteze fayda sağlayacak olan iki yönlü etkili inhibitörlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır.

Hidrojen peroksit tarafından başlatılan lipid peroksidasyonunun AChE aktivitesini etkilediği bilinmektedir. Hidrojen peroksit AChE enzimi üzerinde direkt olarak etki gösterebilir. Eritrosit AChE aktivitesinin H₂O₂ etkisinde inhibe olduğu, düşük hidrojen peroksit konsantrasyonlarında ise aktive olduğu ve aynı zamanda AChE aktivitesinin

H₂O₂ tarafından düzenlendiği yapılan bazı çalışmalarla gösterilmiştir (Molochkina *et al.* 2005).

Yapılan çalışmalar, AChE inhibitörü olan kumarin türevlerinin enzimle etkileşimi sırasında, kumarin halkasının öncelikle AChE'nin periferik anyonik bölgesi (PAS) ile; benzilamino, fenilpiperazin ya da anilino gibi kumarin halkasına bağlı amin fonksiyonel gruplarının da AChE'nin katalitik bölgesi ile etkileşime girdiklerini göstermiştir. Kumarinin yapısal özelliklerinin anlaşılması, AChE inhibisyonu ve buna ek olarak beta sekretazın (BACE) inhibisyonu ile Aβ birikimini azaltma ve monoamin oksidaz (MAO) inhibisyonu gibi farmakolojik aktiviteleri artırıcı etkiye sahip yeni analogların dizaynına ve sentezine yardımcı olmaktadır. Kumarin türevleri ayrıca nöronların, Aβ-kaynaklı oksidatif strese ve serbest radikallere karşı korunmasını da sağlamaktadır (Anand *et al.* 2012).

Bu Aβ ve serbest radikal üretimi arasında çift yönlü bir ilişki vardır. Oksidatif süreç yalnızca Aβ'nin ağırlıklı olarak Aβ'ya dönüşmesi sırasında gerçekleşmez aynı zamanda Aβ'nin kendisinde serbest radikal üretir. Aβ vasküler endotel hücrelerle etkileşir süperoksit radikalleri ve lipid peroksidasyonuna neden olan okside edici ajanlar üretir. Bu veri Aβ'nin serbest radikal üretilmesinde ve nörodejeneratif hastalıklarda rol oynadığını göstermektedir (Christen 2000).

Kolinesterazların aktif merkezinin yer aldığı girinti 20 Å derinliğindedir. Aktif merkez girintisini oluşturan amino asitler AChE'de aromatik yapıda, bütirilkolinesteraz (BKE)'de ise alifatiktir (Bodur *et al.* 2001; Masson *et al.* 1997; Vellom *et al.* 1993). Kolinesterazlarda, periferik anyonik ve esteratik bölgelere ait aspartik asit ve triptofan her iki kolinesterazda da korunmuştur. AChE'de Asp72. ve Trp84. pozisyonunda iken BKE'de Asp70 ve Trp 82. konumundadır. Kolinesterazlarda, Asp70 karşısında bulunan Tyr332 arasında hidrojen bağı bulunmaktadır. Bu bağ hareketli omega "Ω" ilmeğinde yer alan Cys65 ve Cys92 ile etkileşir. AChE'de pozitif yüklü substratlar periferik anyonik bölgedeki Trp279, Tyr70 ve Tyr121'e bağlanma eğilimi göstermektedir. Ayrıca AChE'de Tyr341 aktif merkez yüzeyinden katalitik merkeze substrat iletimini

sağlamaktadır. Kolinesterazların aktif merkezinde yer alan tirozin kalıntıları, yapılarında bulunan hidroksil gruplarının da etkisiyle substrat veya inhibitörlerle katyon π etkisi ile enzim ile oluşturulan kompleksle kararlı bir yapı kazanmaktadır (Nachon *et al.* 1998; Masson *et al.* 2001; Chiou *et al.* 2015).

Memelilerin AChE'sinde pozitif yüklü substratlarının açıl gruplarının esteratik bölgesine komşu açıl bağlayan cebe yerleşmesini kısıtlayan Phe 298 ve Phe 290 yerine BKE'de bu amino asitlerin sırasıyla Leu ve Val olması nedeniyle, uzun açıl gruplu kolin esterlerine afinitesinin daha fazla olduğu ileri sürülmektedir (Radic *et al.* 1993; Massoulie *et al.* 1993; Masson *et al.* 1996).

Çalışmamızda serum AChE enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren bazı fenolik bileşikler için K_i sabitlerinin belirlenmesi işleminde Lineweaver-Burk grafiği kullanıldı. Sonuçların hassas bulunabilmesi için her inhibisyon çalışması için üç farklı inhibitör konsantrasyonunda $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.22- 4.24). Grafik çiziminde Microsoft-Excel programından faydalanılmıştır. K_i değerlerine göre yapılan sıralama IC_{50} değerleri ile ilgili yapılan sıralama ile aynıdır. Hidrokinon için üç sabit inhibitör konsantrasyonunda hesaplanan K_i sabitlerinin ortalaması 0,7 mM, klorojenik asit için ise 0,9 mM olarak bulundu. Çizilen Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla K_i sabitleri hesaplanarak inhibitörlerin inhibisyon tipleri belirlenmiştir. Buna göre hidrokinon, klorojenik asit, vanilik asit ve 3,5-dihidroksi benzoik asit AChE enzimini yarışmasız olarak inhibe ettikleri bulunmuştur. Bu inhibitörler enzimin aktif bölgesi dışında bir bölgeye bağlanmış ve enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek inhibitör etkisi göstermiştir.

Serum AChE enzimi üzerine fenolik bileşiklerin aktivatör etkisini anlamak için ise aktivatör konsantrasyonuna karşı % aktivite grafiği çizildi. Grafiği çizmek için 4-6 farklı aktivatör konsantrasyonunda çalışıldı. Tannik asit, gallik asit, 1,2-Dihidroksi benzoik asit ve fenol için bu konsantrasyonlar Çizelge 4.13-4.14'de gösterilmiştir. Bu 4 fenolik bileşiklerin tümü serum AChE enzimi üzerine aktivasyon etkisi gösterdi. En yüksek aktivatör etkisini ise 0,3 mM konsantrasyonunda % 141 ile tannik asit gösterdi.

Bazı fenolik bileşiklerin AChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisinin olduğu gözlemlendi. Bu durum AChE aktif merkez girintisinde yer alan fenilalanin rezidüleri ile fenolik bileşiklerin arasında katyon π etkileşimlerinin yanı sıra, kovalent bağlanmanın da olabileceğini düşündürmektedir. Fenolik bileşikler büyüktür küçük doğru molekül kütlelerine göre sıralandığında hidrokinon < 4-hidroksi benzoik asit < 3,5-dihidroksi benzoik < vanilik asit < kafeik asit < klorojenik asit < tannik asit şeklinde elde edilir. AChE enzimini yarışmalı olarak inhibe eden 4-hidroksi benzoik asit ve kafeik asit bileşiklerinden düşük molekül kütlesi ve küçük molekül yapısına sahip olan 4-hidroksi benzoik asit AChE'yi daha çok inhibe etmiştir. Çünkü 4-hidroksi benzoik asitin yapısının küçük oluşu ile aktif merkez girintisi hacmi küçük olan AChE'nin periferik anyonik bölgesine pozitif yüklü bir substrat gibi daha kolay bağlanarak inhibisyon etkisi gösterdiği söylenebilir. AChE enziminin aktif merkezindeki açıl bağlayan cebe yerleşmesini kısıtlayan Phe 298 ve Phe 290 daha büyük molekül kütleli tannik asitin aktif merkeze girişini engellemiş olabileceği düşünülebilir. Yarışmasız olarak inhibe eden inhibitörler ise enzimin aktif bölgesi dışında bir bölgeye bağlanır ve enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek inhibisyon etkisi gösterirler.

Kinetik çalışmalarda kullandığımız fenolik bileşikler ve onların türevlerinin antioksidan kapasiteleri, aromatik halkaya bağlı hidroksil gruplarının konumuna ve sayısına bağlı olduğu bildirilmiştir (Gülçin 2012). Fenolik bileşikler doğal antioksidan maddelerdir ve bu bileşiklerin antioksidan etkisi, serbest radikalleri temizleme (Rice-Evans *et al.* 1995), metal iyonlarla bileşik oluşturma (metal şelatlama) ve singlet oksijen oluşumunu engelleme ile azaltma (Rice-Evans *et al.* 1995) gibi özelliklerinden ve genellikle fenolün rezonans kararlılığından dolayı meydana gelmektedir (Fessenden and Fessenden 1990).

Fenolik asitler, özellikle kanser ve koroner kalp hastalıkları gibi ölümcül hastalıklara karşı koruyucu etkide bulunma potansiyelleri nedeniyle üzerinde oldukça yaygın çalışmalar yapılan önemli bileşiklerdir (Mattila *et al.* 2002). Bununla birlikte anti-allerjik, antienflamatuvar (iltihap oluşumunu önleyici), antimikrobiyal, antioksidan, antitrombotik (kan pıhtılaşmasını engelleyici) ve vasodilatör (damar genişletici) olmak

üzere pek çok etkisi olduğu kanıtlanmış ve bu yararlı etkilerinin temel sebebinin ise antioksidan özellik göstermelerinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Balasundram *et al.* 2006).

Kolinesteraz inhibitörlerinin geliştirilmesi, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklardaki asetilkolin yetersizliğini ve serbest radikal oluşumunu ortadan kaldırabilir. Bu nedenle, fenolik bileşik/kolinesteraz inhibisyon mekanizmasının açıklanması nörodejeneratif hastalıkların tanı ve tedavisinde klinik açıdan büyük önem taşımaktadır.



KAYNAKLAR

- Ak, H., Dingiloğlu, N.T., Habif, S., Kültürsay, H., Bayındır, O., Onat, T., 1994. Plasma lipid peroxidation, Vit. E, superoxide dismutase and glutathione peroxidase alterations in coronary atherosclerosis. *Tr J Med Sci*, 26, 11-15.
- Ak, T., 2006. Curcuminin antioksidan ve antiradikal özelliklerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, 10-45, Konya.
- Aksenov, M.Y., Aksenova, M.V., Butterfield, D.A., Geddes, J.W., Markesbery, W.R., 2001. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 103, 373-383.
- Akyol, O., 2004. Şizofrenide oksidatif stres. *Kocatepe Tıp Dergisi*, (5), 15-25, Afyon.
- Alderman, C.J.J., Shah, S., Foreman, J.C., Chain, B.M., Katz, D.R., 2002. The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function. *Free Radic. Biol. Med*, 32, 377-385.
- Altıntaş, S., 2006. Kahramanmaraş'ta Bazı İş Kollarında Çalışan Boya İşçilerinde Plazma ve Eritrosit Membran Sialik Asit, Glutasyon, Plazma Nitrik Oksit ve Lipid Peroksidasyonu Düzeylerinin Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Anand, P., Singh, B., Singh, N., 2012. A Review on Coumarins as Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 1175-1180.
- Anonim, 2007. <http://en.wikipedia.org/wiki/Phenols>.
- Anonim, 2008. http://www.e-oligos.com/eoweb/products/images/taqman_assay.jpg
- Anonymous, 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10524>.
- Anonymous, 2015. <http://slideplayer.biz.tr/slide/3104626>
- Arai, H., Berlett, B.S., Chock, P.B., Stadtman E.R., 2005. Effect of bicarbonate on ironmediated oxidation of low-density lipoprotein. *J. Embo*, 102, 10472-10477.
- Asayama, K., Uchida, N., Nakane, T., Hayashibe, H. Dobashi, K., Amemiya, S., Kato, K., Nakazawa, S., 1993. Antioxidants in the serum of children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Free Rad Bio & Med*, 15, 597-602.
- Atkins, C.R. Carey, A.F., 1999. Organik kimya, kısa ve öz. (Ç. G. Okay ve Yılmaz Yıldırım). Ankara: Bilim Kitabevi, 235-253.
- Atmaca, E., Aksoy, A., 2009. Oksidatif DNA hasarı ve kromatografik yöntemlerle tespit edilmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(2), 79-83.
- Augustinsson, K.B., Bartfai, T., Mannervik, B., 1974. A steady-state kinetic model of butyrylcholinesterase from horse plasma. *Biochem. J*, 141, 825-834.
- Aydın, A., Sayal, A., Işimer, A., 2001. Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi. Ankara, GATA Basımevi, 10-59.
- Babior, B.M., 2000. Phagocytes and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*, 109, 33-44.

- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99,191-203.
- Baynes, J.W., 1996. The role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, 40, 405-412.
- Beckham, J.S., Koppenol, W.H., 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol*, 271, c1424-c1437.
- Bektaş, N., 2005. Bazı fenolik asitler ve kombinasyonlarının antioksidan aktivitelerinin değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*, 272, 203-13.
- Beydemir, Ş., Gülçin İ., 2004. Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte *in vitro* and from rat erythrocyte *in vivo*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19(2), 193-197.
- Bircan, F.S., 2007. Endotoksemi Oluşturulan Kobayların Dalak Dokusunda 3-Nitrotirozin Oluşumu ve Taurinin Antioksidan Etkisinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 3-7.
- Bodur, E., Neşe Ç.A., Tezcan, E.F., 2001. Inhibition Effects of Benactyzine and Drofenine on Human Serum Butyrylcholinesterase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 386 (1), 25-29.
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol*, 54, 519-46.
- Bourdel-Marchasson, I., Delmas-Beauvieux, M.-C., Peuchant, E., Richard-Harston, S., Decamps, A., Reignier, B., Emeriau, J.-P., Rainfray, M., 2001. Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. *Age Ageing*, 30, 235-241.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Budak, H., Ceylan, H., Erdoğan, O., 2014. Expression of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase in Oxidative Stress Induced By Long-Term Iron Toxicity in Rat Liver. *Journal Of Biochemical And Molecular Toxicology*, 28(5), 217-23.
- Bulut, S., Bodur, E., Colak, R., Turnagol, H., 2013. Effects of conjugated linoleic acid supplementation and exercise on post-heparin lipoprotein lipase, butyrylcholinesterase, blood lipid profile and glucose metabolism in young men. *Chem Biol Interact*, 203 (1), 323-329.
- Burda, S., Oleszek, W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2774-2777.
- Bursal, E., 2009. Kivi Meyvesinin (*Actinidia deliciosa*) Antioksidan ve Antiradikal Aktivitelerinin Belirlenmesi, Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 6-9, Erzurum.
- Burtis, C.A., 1999. Ashwood, E.R., Tietz Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.

- Bustin, S. A., 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR). trends and problems Journal of Molecular Endocrinology, 29, 23–39.
- Butterfield, D.A., Lauderback, C.M., 2002. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid β -peptide associated free radical oxidative stress. Free Radic Biol Med, 32, 1050-1060.
- Canoruç, N., Çiçek, R., Atamer, A., Dursun, M., Turgut, C., Güneli, E. and Canoruç, F., 2001. Protective effects of vitamin e selenium and allopurinol against stress-induced ulcer formation in rats. Turkish Journal of Medical Sciences, 31(3), 199-203.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. Methods Enzymol, 113, 484-490.
- Ceballos-Picot, I., Trivier, J.M., Nicole, A., Sinet, P.M., Thevenin, M., 1992. Age-related modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione related enzyme activities in human erythrocyte. Clin Chem, 38, 1, 66-70.
- Cemeroğlu, B., Acar, J., 1986. Meyve ve sebze İşleme Teknolojisi. Gıda Tek. Derneği, No:6, 513.
- Cemeroğlu, B., Yemenicioglu, A., Ozkan, M., 2004. Meyve ve sebzelerin bileşimi, meyve sebze işleme teknolojisi 2. Baskı, Başkent Matbaacılık, Ankara.
- Ceriello, A., Bortolotti, N., Falletti, E., Taboga, C., Tonutti, L., Crescentini, A., Motz, E., Lizzio, S., Russo, A., Bartoli, E., 1997. Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDDM patients. Diab Care, 20, 194-7.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., Ferrier, D.R., 1997. Lippincott's Illustrated reviews serisinden: Biyokimya, 2, 33-4.
- Chatonnet, A., Lockridge, O., 1989. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. Biochem J, 260 (3), 625-634.
- Chaudiere, J., Ferrari, I., 1999. Intracellular antioxidants: form chemical to biochemical mechanisms. Food And Chem. Toxicol, 37, 949-962.
- Cheeseman, K.H., 1993. Lipit Peroxidation and Cancer in DNA and Free Radicals, Edited by halliwell and O.L aruoma pp. 109-144, Ellis Horwood, London.
- Cheng, F.C., Jen, J.F. and Tsai, T.H., 2002. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. Journal of Chromotography B, 781(1), 481-496.
- Cheng, G.W., Crisosto, C.H., 1995. Browning Potential, Phenolic Composition, and Polyphenoloxidase Activity of Buffer Extracts of Peach and Nectarine Skin Tissue. J. Amer. Soc. Hort. Sci, 120 (5), 835–838.
- Chiou, S.Y., Weng, T.T., Lin, G.Z., Lu, R.J., Jian, S.Y., Lin, G., 2015. Molecular docking of different inhibitors and activators to butyrylcholinesterase. J Biomol Struct Dyn, 33(3), 563-72.
- Chipperfield, B., Smith T.A.D., Moyes Isabel C. A., 2004. Plazma cholinesterase activity in dementias, depressions and schizophrenia. Int J Geriatr, 2, 4, 247-254.
- Christen Y., 2000. Oxidative Stres And Alzheimer Disease. Am J Clin Nutr, 71, 621-9.
- Chung, K.T., Wong, T.Y., Wei, Cheng, I., Huang, Y.W., Lin, Y., 1998. Tannins and Human Health: A Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 38 (6), 421–64.

- Clifford, M. N., 2003. 14. The analysis and characterization of chlorogenic acids and other cinnamates. In C. Santos-Buelga & G. Williamson (Eds.). *Methods in Polyphenol Analysis*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, pp. 314–337.
- Colier, A., Wilson, R., Bradley, H., Thomson, J.A., 1990. Small M. Free radical activity in type 2 diabetes. *Diab Med*, 7, 27-30.
- Collins, P., Rosano, G.M., Sarrel, P.M., Ulrich, L., Adamopoulos, S., Beale, C.M., McNeill, J.G., Philip Poole-Wilson, A., 1995. 17 beta-estradiol attenuates acetylcholineinduced coronary arterial constriction in women but not men with coronary heart disease. *Circulation*, 92, 24–30.
- Çakatay, U., Telci, A., Yılmaz, İ. A., Akçay, T., Sivas, A., 2000. The effect of aging on plasma oxidative protein damage. *Cerrahpaşa Journal Medicine*, 31(4), 220-223.
- Dahle, L., 1962. The thiobarbituric acid reaction and the autooxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch. Biochem. Biophys*, 98, 253-261.
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A., 2003. Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Mol Med*, 9, 169-176.
- Davies, M.J., Fu S., Wang H., Dean R.T., 1999. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med*, 27, 1151-1163.
- De Ferrari, G.V., Canales, M.A., Shin, I., Weiner, L.M., Silman, I, Inestrosa, N.C., 2001. A Structural Motif of Acetylcholinesterase That Promotes Amyloid β -Peptide Fibril Formation. *Biochemistry*, 40, 10447-10457.
- Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M.J., 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*, 324, 1-18.
- Dei, R., Takeda, A., Niwa, H., Li, N.Y., Watanabe, M., 2001. Lipid peroxidation and advanced glycation end products in the brain in normal aging and in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 104, 113–22.
- Dietmaier, W., Hofstädter, F., 2001. Detection of microsatellite instability by Real Time PCR and hybridization probe melting point analysis. *Lab Invest*, Oct;81(10), 1453-6.
- Dizdaroğlu, M., Jaruga, P., Birincioğlu, M., Rodriguez, H., 2002. Free Radical- Induced Damaged to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radical Bio Med*, 32(11), 1102-1115.
- Dubinina, E.E., Morozova, M.G., Leonova, N.V., Gamper, N.L., Soliternova, I.B., Nuller, I.L, Butoma, G.B., Kovrugina, S.V., 2000. Oxidative modification of blood proteins in patient with psychiatric disorders (depression, depersonalization) ; *Vopr Med Khim*, 46, 398- 409.
- Duke, J.A., 1992. *Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants*. CRC Press, 999 edition. ISBN 978-0-8493-3865-6.
- Elahi, M.M., Kong, Y.X., Matata, B.M., 2009. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2, 259-69.
- El-Gendy, K. S., Aly, N.M., Mahmoud, F.H., Kenawy, A. and El-Sebae, A.K.H., 2010. The role of vitamin c as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 215-221.
- Ercan, S.Z., 2002. Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan kolinesteraz inhibitörleri. *Demans dergisi*, 2,5-9.

- Erçin U, 2010. Koroner arter hastalığında kanda oksidatif stres parametreleri ve selenyum düzeylerinin klinik bulgularla ilişkisi. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Uzmanlık Tezi.
- Ergün, A., Tuncer, ŞD., Colpan, İ., Yalcın, S., Yıldız, G., Kucukersan M.K., Kucukersan, S., Onol, A.G., Muğlalı, O.H., Şehu, A., 2002. Yemler, Yem Hijyeni Ve Teknolojisi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Pozitif Matbaacılık, 465 s., Ankara.
- Ersoy, E., Bayşu, N., 1986. Biyokimya ders kitabı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi yayınları No:408.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jurgens, G., 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*, 13, 341-390.
- Fairbanks, V.F., Klee, G.G. 1999. Biochemical aspects of hematology. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry* 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1696-1697.
- Fantel, A.G., 1996. Reactive oxygen species in developmental toxicity: Review and hypothesis. *Teratology*, 53, 96-217.
- Fessenden, R.J., Fessenden, J.S., 1990. *Organic Chemistry*, Brooks/Cole Publishing Company, Pacific Grove, California. 4th ede.
- Forgione, M.A., Weiss, N., Heydrick, S., Cap, A., Klings, E.S., Bierl, C., Eberhardt, R.T., Farber, H.W., Loscalzo, J., 2002. Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282, 1255–1261.
- Foy, C.A., Parkes, H.C., 2001. Emerging Homogeneous DNA-based Technologies in the Clinical Laboratory. *Clinical Chemistry*, 47, 990–1000.
- Freeman, B.A., Crapo, I.D., 1982. Biology of disease-free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 47, 412.
- Garrison, W.M., 1987. Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem. Rev*, 87: 381-398.
- Getman, D., Eubanks, J., Camp, S., Evans, G., Taylor, P., 1992. The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7. *American journal of human genetics*, 51 (1), 170.
- Giacobini, E., Spiegel, R., Enz, A., Veroff, A.E., Cutler, N.R., 2002, Inhibition of acetyl- and butyryl-cholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: correlation with cognitive benefit. *J Neural Transm*, 109, 7-8, 1053-1065.
- Gibney, G., Camp, S., Dionne, M., MacPhee-Quigley, K., Taylor, P., 1990. Mutagenesis of essential functional residues in acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87 (19), 7546-7550.
- Gönül, N., 2013. Karaciğer Spesifik Tip60 Nakavt Farelerde karbonik anhidraz enzimlerinin (I,II ve VII) Ekspresyon Analizi. Y. Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Greilberger, C., Koidl, M., Greilberger, M., Lamprecht, K., Schroecksnadel, F., Leblhuber, D., Aksenov, M.Y., Markesbery, W.R., 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's diseases. *Neurosci Lett*, 302, 141–5.

- Griffith, O.W., Stuehr, D.J., 1995. Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol*, 57, 707-736.
- Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D., Soreq H., 1999. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J. Biochem*, 264, 672-686.
- Grune, T., Reinheckel, T., Joshi, M., Davies, K.J.A., 1995. Biology of nitric oxide signaling. *J. Biol. Chem*, 270, 2344-2351,
- Gupta, N., Gupta, S., Mahmood, A., 2007. Gallic acid inhibits brush border disaccharidases in mammalian intestine. *Nutrition Research*, 27, 230-235.
- Gülbahar, Ö., 2007. Protein oksidasyonunun mekanizması, önemi ve yaşlılıkla ilişkisi. *Turkish Journal of Geriatrics*, 10(1), 43-48.
- Gülçin, I., 2002. Isrgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı in vivo etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- Günel, T., Aydınli, K., 2009. Real-Time PCR” ve Uygulama Alanları. *Derleme. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2, 43-45.
- Güzel, S., 2006. Romatoid artrit ve ailesel akdeniz ateşi hastalıklarında oksidan statü. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Hagen, U., 1986. Current aspects on the radiation induced base damage in DNA. *Radiat Environ Biophys*, 25(4), 261-71.
- Halliwell, B., Auroma, O.I., 1991. DNA damage by oxygen-derived species its mechanism and measurement in mammalian systems. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 281(1), 9-19.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 2007. *Free radicals in biology and medicine*. (Fourth edition). New York: Oxford University Press, 617-783.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219(1), 1-14.
- Halliwell, B., 1984. Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance. *Medical Biology*, 62(2), 71-77.
- Halliwell, B., 1997. Antioxidants and human diseases: a general introduction. *Nutr. Rev*, 55, s44-s52.
- Halliwell, B., 1997. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo. *FEBS Lett*, 411, 157-160.
- Halliwell, B., Clement, M.V., Long, L.H., 2000. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*, 486, 10-13.
- Hawkins, C. L., Davies, M. J., 2001. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochimica Biophysica Acta*, 1504(2-3), 196-219.
- Hensley, K., Hall, N., Subramaniam, R., Cole, P., Harris, M., Aksenov, M., Aksenova, M., Gabbita, S.P., Wu, J.F., Carney, J.M., 1995. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem*, 65, 2146-2156.
- Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., 1995. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the 7 countries study. *Arch Intern Med*, 155, 381-386.

- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R., 1992. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Biotechnology*, 10, 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993. Kinetic PCR analysis: Realtime monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11(9), 1026-30.
- Hoffman, R.M. and Garewal, H.S., 1995. Antioxidants and the prevention of coronary heart disease. *Arch. Intern. Med*, 155, 241-246.
- Hofman, A., Ott, A., Breteler, M.M., Bots, M.L., Slooter, A.J., van Harskamp, F., van Duijn, C.N., Van Broeckhoven, C., Grobbee, D.E., 1997. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet*, 349 (9046), 151-4.
- Hsu, C.L., Yen, G. C., 2007. Effects of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. *British Journal of Nutrition*, 98, 727-735.
- Hulme, A.C., 1971. The Biochemistry of fruits and their products. A.R.C. Food Research Institute, Norwich, England Vol. 2, 172-205.
- Inestrosa, N.C., Alvarez, A., Perez, C.A., Moreno, R.D., Vicente, M., Linker, C., Casanueva, O.I., Soto, C., Garrido, J., 1996. Acetylcholinesterase Accelerates Assembly of Amyloid-Beta-Peptides into Alzheimer's Fibrils: Possible Role of the Peripheral Site of the Enzyme. *Neuron*, 16, 881-891.
- Işık, M., 2012. *Helichrysum Plicatum* Dc. Ve *Phlomis Pungens* L. Bitkilerinin Antioksidan Aktivitelerinin Mukayesesi. Yüksek Lisans Tezi, Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzincan.
- Jung, M., Ramankulov, A., Roigas, J., Johannsen, M., Ringsdorf, M., Kristiansen, G., Jung, K., 2007. In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. *BMC Mol Biol*, Jun, 8(1), 47.
- Kadota, K., Yoshiki, Y., Hattori, M.Y., Kawai, C., 1991. Decreased sulfhydryl groups of serum albumin in coronary artery disease. *Jap Circ J*, 55, 937-41.
- Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen M., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-3962.
- Kalay, Z., 2011. Topikal EGF Uygulamasının Dorsolateral Eksizyonel Yaralarda Oksidan Olaylara Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 38-49, Ankara.
- Kalousová, M., Žák, A., Soukupová, J., Štípek, S., Malbohan, I.M., Zima, T., 2005. Advanced Glycation and Oxidation Products in Patients with Atherosclerosis. *Čas Lék čes*, 144, 385-389.
- Kanbağlı, Ö., Doğru-Abbasoğlu, S., Özdemirler, G., Aykaç-Toker, G., Uysal, M., 2000. Oksidatif Stres Göstergesi Olarak Serumda Total Sülfhidril Düzeyleri ve Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi. *Istanbul Tıp Fak Derg*, 63(3), 264-267.
- Kaneda, H., Taguchi, J., Ogasawara, K., Aizawa, T., Ohno, M., 2002. Increased Level of Advanced Oxidation Protein Products in Patients With Coronary Artery Disease. *Atherosclerosis*, 162, 221-225.
- Katı, Ö., 2010. Korozif Özofagus Yanıklarında N-Asetil Sistein Etkinliğinin Erken ve Geç Dönemde Histopatolojik ve Biyokimyasal Değişikliklerle Değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Ankara, 14-16.

- Katiyar, S.K., Mukhtar, H., 1997. Tea Antioxidants in cancer chemoprevention. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement*, 27, 59-67.
- Keha, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2000. *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum.*
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004. *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum.*
- Kennedy, J.S., Polinsky, R.J., Johnson, B., Loosen, P., Enz, A., Laplanche, R., Schmidt, D., Mancione, L.C., Parris, W.C, Ebert, M.H., 1999. Preferential cerebrospinal fluid acetylcholinesterase inhibition by rivastigmine in humans. *J Clin Pharmacol*, 19, 6, 513-521,
- Kılıç, A., 2007. *Plazmada Okside Protein Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.*
- Klug, W.S., Cummings, R.M., 2002. *Genetik kavramlar (Çeviri: C. Öner) Palme Yayıncılık.*
- Kocaelli, H., Yaltınık, M., Yargic, LI., Ozbas, H., 2002. Alzheimer's disease and dental management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 93 (5),521-4.
- Koçpınar, E.F., 2015. *Tip60 geninin oksidatif stres üzerine etkisinin karaciğer spesifik tip60 nakavt farelerde araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.*
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bangtsson, M., Forootan, A., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27(2-3), 95-125.
- Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003. *Gen ekspresyon analizi ve mikroarrayler,(Editörler: Telefoncu A., Küfrevioğlu, Ö.İ, Pazarlıoğlu N.) Biyoinformatik-1 S.167-175.*
- Laeuwenburgh, C., Rasmussen, J.E., Hsu, F.F., Mueller, D.M., Pennathu, S., Heinecke, J.W., 1997. Mass spectrometric quantification of markers for protein oxidation by tyrosyl radical copper, and hydroxyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques. *J. Biol. Chem*, 272, 3520-3526.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. *Principles of Biochemistry, 3.Baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Kılıç N.), Palme Yayıncılık.*
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E. 1994. Carbonyls assays for determination of oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.* 23,346–357.
- Livak, K.J., Flood, S.J.A., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K., 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Gen. Res.*, 4, 357-362.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant - stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42(8), 656-666.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., 2001. *Molecular Cell Biology, 4nd edition, pp.248-251, W.H. Freeman and Company, New York.*
- Lowenstein, C.J., Snyder, S.H., 1992. Nitric oxide, a novel biological messenger. *Cell*, 70, 705-707.
- Lunec, J., Blake, D., 1990. *Oxygen free radicals: Their relevance to disease processes, 189- 212, Ed. R.D. Cojhen, Balliere Tindall, London.*
- Manuela, P., Alin, C., Lucian, H., Bogdan, S., Walther, B., Cristinel, S., 2010. Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mildcognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 469, 6–10.
- Mapstone, M., Cheema, A.K., Fiandaca, M.S., Zhong, X., Mhyre, T.R., MacArthur, L.H., Hall, W.J., Fisher, S.G., Peterson, D.R., Haley, J.M., 2014. Plasma

- phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nature Medicine*, 20(4), 415-418.
- Masson, P., Froment, M.T., Bartels, C.F., Lockridge, O., 1996. Asp70 in the peripheral anionic site of human butyrylcholinesterase. *Eur J Biochem*, 235 (1- 2), 36-48.
- Masson, P., Legrand, P., Bartels, C.F., Froment, M.T., Schopfer, L.M., Lockridge, O., 1997. Role of aspartate 70 and tryptophan 82 in binding of succinylthiocholine to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*, 36 (8), 2266-2277.
- Masson, P., Xie, W., Froment, M.T., Lockridge, O., 2001. Effects of mutations of active site residues and amino acids interacting with the Omega loop on substrate activation of butyrylcholinesterase. *Biochim Biophys Acta*, 1544 (1-2), 166-176.
- Massoulié, J., 2002. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals*, 11 (3), 130-143.
- Massoulié, J., Perrier, N., Noureddine, H., Liang, D., Bon, S., 2008. Old and new questions about cholinesterases. *Chem Biol Interact*, 175 (1-3), 30-44.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Vallette, F.M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol*, 41 (1), 31- 91.
- Mattila, P., Kumpulainen, J., 2002. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3660-3667.
- Meister, A., 1983. Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220, 472-477.
- Meister, A., 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal of Biological Chemistry*, 263(33), 17205-17208.
- Meister, A., 1991. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis and its reversal; application in research and therapy. *Pharmacology Therapeutics*, 51(2), 155-185.
- Meram, İ., Aktaran, Ş., 2002. Serbest Radikallerin Biomoleküller Üzerine Etkileri. *Arşiv*, 11,299.
- Meshorer, E., Soreq, H., 2006. Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. *TRENDS in Neurosciences*, 29(4), 216-224.
- Molochkina, E.M., Zorina, O.M., Fatkullina, L.D., Goloschapov, A.N., Burlakova, E.B., 2005, H₂O₂ Modifies membrane structure and activity of acetylcholinesterase. *Chem. Biol. Interact*, 157-158,353-434.
- Montine, T.J., Neely, M.D., Quinn, J.F., Bed, M.F., Markesbery, W.R., 2002. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. *Free Radical Biol Med*, 33. 626-6
- Morrison, J.A., Jacobsen, D.W., Sprecher, D.L., Robinson, K., Khoury, P., Daniels, S.R., 1999. Serum Glutathione in Adolescent Males Predicts Parental Coronary Heart Disease. *Circulation*, 100, 2244-2247.
- Moure, A., Cruz, JM., Franco, D., Dominguez, M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, MJ., Parajo, JC., 2001. Natural antioxidants from residual source. *Food Chemistry*, 72, 145.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, R.A. and Rodwell, V.W., 1996. Harper'in Biyokimyası (çev. N. Dikmen ve T. Özgünen), 162.
- Nachon, F., Ehret-Sabatier, L., Loew, D., Colas, C., van Dorsselaer, A., Goeldner, M., 1998. Trp82 and Tyr332 Are Involved in Two Quaternary Ammonium Binding

- Domains of Human Butyrylcholinesterase as Revealed by Photoaffinity Labeling with [3H]DDF. *Biochemistry*, 37 (29), 10507- 10513.
- Nair, V.P., Hunter, J.M., 2004. Anticholinesterases and anticholinergic drugs. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, 4 (5), 164-168.
- Netto, L.E.S., Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi A.E., 2002. Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage. *Methods in Enzymol.* Vol. 348, 260-70.
- Nordberg, J., Arner, E.S.J., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 1287-1312.
- Oates, A.M., Salem, H.H., 1991. The binding and regulation of protein S by neutrophils. *Blood Coagul. Fibrinol*, 2, 601-607.
- Oropesa, A.L., Garcia-Camero, J.P., Soler, F., 2009. Glutathione and malondialdehyde levels in common carp after exposure to simazine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27(1), 30-38.
- Oruç, E.Ö., 2010. Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96(3), 160-166.
- Öğüt, S., Atay, E., 2012. Yaşlılık ve oksidatif stres. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 19(2), 68-74.
- Özkan, A., Fışkın, K., 2004. Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*, 14, 52-60.
- Öztekin, M.F., 2000. Alzheimer hastalığının tedavisi, *Demans dizisi*, 2, 66-76.
- Pacheco-Palencia, L.A., Mertens-Talcott, S., Talcott, S.T., 2008. Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from Acai. *J Agric Food Chem*, 56 (12), 4631–4636.
- Parihar, MS., Hemnani, T., 2004. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *J Clin Neurosci*, 11, 5, 456-467.
- Perry, C., Sklan, E.H., Birikh, K., Shapira, M., Trejo, L., Eldor, A., Soreq, H., 2002. Complex regulation of acetylcholinesterase gene expression in human brain tumors. *Oncogene*, 21 (55), 8428-8441.
- Perry, G., Cash, A.D., Smith, M.A., 2002. Alzheimer Disease And Oksidative Stress. *J Biomed Biotechnol*, 2, 3, 120-123.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45-e45.
- Pillay, R., Maharaj, D.S., Daniel, S., Daya, S., 2003. Acetylcholine reduces cyanideinduced superoxide anion generation and lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 27, 61-64.
- Pisanti, S., Picardi, P., Ciaglia, E., D'Alessandro, A., Bifulco, M. 2014. Novel prospects of statins as therapeutic agents in cancer. *Pharmacological Research*, 88 (0), 84-98.
- Radi, R., Pelufo, G., Alvarez, M.N., Naviliat, M., Cayota, A., 2001. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic. Biol. Med*, 30, 463-488.
- Radic, Z., Pickering, N.A., Vellom, D.C., Camp, S., Taylor, P., 1993. Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, 32 (45), 12074-12084.

- Rakonczay, Z., Horvath, Z., Juhasz, A., Kalman, J., 2005. Peripheral cholinergic disturbances in alzheimer disease. *Chem Biol Interact.*, 157-158, 233-238.
- Rasmussen, R., Meuer, S., Wittwer, C., Nakagawara, K., 2001. Quantification on the LightCycler, Rapid Cycle Real-time PCR. 21-35.
- Reiman, E.M., Caselli, R.J., Yun, L.S., Chen, K., Bandy, D., Minoshima, S., Thibodeau, S.N., Osborne, D., 1996. Preclinical evidence of Alzheimer's disease in persons homozygous for the epsilon 4 allele for apolipoprotein E. *N Engl J Med*, 334 (12), 752-8.
- Requena J.R., Levine R.L., Stadtman E.R., 2003. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino acids*, 25, 221-226.
- Rice-Avans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenol flavonoids. *Free Radical Research*, 22, 375-383.
- Rio, D.D., Stewart, A.J. and Pellegrini, N., 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Disease*, 15(4), 316-328.
- Robbins, R.J., 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Food Composition Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, USA*, 10, 2866-2887.
- Rocha, L.B., Dias Elias, D.B., Barbosa, M.C., Bandeira, I.C., Gonçalves, R.P., 2012. DNA damage in leukocytes of sickle cell anemia patients is associated with hydroxyurea therapy and with HBB*S haplotype. *Mutat. Res-Gen. Tox. En*, 12, 749(1-2), 48-52.
- Rosenberry, T.L., Scoggin, D., 1984. Structure of human erythrocyte acetylcholinesterase. Characterization of intersubunit disulfide bonding and detergent interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 259 (9), 5643-5652.
- Rubbo, H., Radi, R., Anselmi, D., Kirk, M., Barnes, S., Butler, J., Eiserich, J.P., Freeman, B.A., 2000. Nitric oxide reaction with lipid peroxyl radicals spares alpha-tocopherol during lipid peroxidation. Greater oxidant protection from the pair nitric oxide/alpha-tocopherol than alpha-tocopherol/ascorbate. *J. Biol. Chem*, 275, 10812-10818.
- Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., Freeman, B.A., 1994. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem*, 269, 26066-75.
- Sachdev, S. and Davies, K.J.A., 2008. Production, detection and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), 215-223.
- Saran, M., Bors, W., 1994. Signalling by O₂ and NO: How far can either radical, or any specific reaction product, transmit a message under in vivo conditions? *Chem. Biol. Interact*, 90, 35-45.
- Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25(1), 192-205.
- Serdar, Z., Aslan, K., Dirican, M., Sarandöl, E., Yeşilbursa, D., Serdar, A., 2006. Lipid and Protein Oxidation and Antioxidant Status in Patients With Angiographically Proven Coronary Artery Disease. *Clinical Biochemistry*, 39, 794-803.

- Sevanian, A., Hochstein, P., 1985. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu Rev Nutr*, 5, 365-390.
- Shacter, E., 2000. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev*, 32, 307-326.
- Shahidi F., Wanasundara, KJ., 1992. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 32, 67-103.
- Sies, H., 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, 91, 31S-38S.
- Smith, M.A., Perry, G., Richey, P.L., Sayre, L.M., Anderson, V.E., Beal, M.F., Kowall, N., 1996. Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature*, 382 (6587), 120 – 121.
- Smith, M.A., Richey Harris, P.L., Sayre, L.M., Beckman, J.S., Perry, G., 1997. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J. Neurosci*, 17 (8), 2653 – 2657.
- Smith, M.A., Richey, P.L., Taneda, S., Kutty, R.K., Sayre, L.M., Monnier, V.M., Perry, Andgeorge., 1994. Advanced Maillard reaction end products, free radicals, and protein oxidation in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 738, 447-454.
- Sonntag, D.M., De Boer, J., Medvedovic, M., Baxter, C.S., LeMasters, G., Talaska, G., 2004. Mutational biases associated with potential iron-binding DNA motifs in rodent lacI and human p53 mutational databases. *Mutat Res*, 550(1-2), 73-88.
- Soreq, H., Seidman, S., 2001. Acetylcholinesterase new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2 (4), 294-302.
- Soszynski, M., Bartosz, G., 1997. Decreases in accessible thiols as an index of oxidative damage to membrane proteins. *Free Radic Bio & Med*, 23, 463-9.
- Stadtman, E.R., 1992. Protein Oxidation and Aging. *Science*, 257, 1220-1224.
- Stadtman, E.R., 1993. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem*, 62, 797-821.
- Stadtman, E.R., 2001. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann. New York. Acad. Sci*, 928, 22-38.
- Stadtman, E.R., Levine R.L., 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25, 207-218.
- Stahl, W., Sies, H., 2002. Introduction: reactive oxygen species. *Research Monographs*, 1-2.
- Stanely, P., Prince, M., Priscilla, H., Devika, P. T., 2009. Gallic acid prevents lysosomal damage in isoproterenol induced cardiotoxicity in Wistar rats. *European Journal of Pharmacology*, 139, 139-143.
- Sun, Y., Yin, Y., Zhang, J., Yu, H., Wang, X., Wu, J. and Xue, Y., 2008. Hydroxyl radical generation and oxidative stress in *Carassius auratus* liver, exposed to pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(2), 446- 453.
- Surekha, R.H., Srikanth, B.B., Jharna, P., Ramachandra, R.V., Dayasagar, R.V., Jyothy, A., 2007. Oxidative stress and total anti oxidant status in myocardial infarction Singapore. *Med J*, 48, 137-142
- Şahin, H.A. 2002. Asetilkolin, kolinesterazlar ve alzheimer hastalığı. *Demans Dergisi*, 2, 69-73.
- Şekeroğlu, A. Z., Şekeroğlu, V., 2009. Oksidatif mitokondrial hasar ve yaşlanmadaki önemi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2(2), 69-74.

- Talesa, V.N., 2001. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech AgeingDev*, 122, 1961-1969.
- Tamer, L., Sucu, N., Polat, G., Ercan, B., Aytacoglu, B., Yücebilgiç, G., Ünlü, A., Dikmengil, M., Atik, Ugur., 2002. Decreased Serum Total Antioxidant Status and Erythrocyte-Reduced Glutathione Levels Are Associated with Increased Serum Malondialdehyde in Atherosclerotic Patients. *Archives of Medical Research*, 33, 257-260.
- Tang, M.X., Stern, Y., Marder, K., Bell, K., Gurland, B., Lantigua, R., Andrevvs, H., Feng, L., Tycko, B., Mayeux, R., 1998. The APOE-epsilon4 allele and the risk of Alzheimer disease among African Americans, whites, and Hispanics. *Jama*, 279 (10), 7515.
- Tekkes, Y., 2006. Streptozotosin ile Diabet Oluşturulmuş Farelerde Aspirin ve E Vitaminin Dokularda Lipit Peroksidasyonu ve Antioksidan Sisteme Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Temel, H.E, 2008. Demanslı hastalarda asetilkolinesteraz aktivitesi ve oksidatif stresin asetilkolinesteraz enzim inhibitörleri ile değişimi. Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Tetik, Ş., Uras, F., Yardımcı, T., 2007. Protein oxidation: basic view on characterization, detection and consequences. *Advances in Molecular Medicine*, (3), 63-67.
- Thacker, P.D., 2003. Surprising discovery with Alzheimer's medication. *Drug Discovery, Today*. 1, 8- 9.
- Tietz, N.W., 1995. *Clinical Guide to Laboratory Tests*. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania.
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Physiological Society*, 552(2), 335-344.
- Uchida K., 2003. Histidine and lysine as targets of oxidative modification. *Amino acids*, 25, 249-257.
- Uchida, K., Stadtman, E.R., 1993. Covalent modification of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate. *J. Biol. Chem*, 268, 6388-6393.
- Vellom, D.C., Radic, Z., Li, Y., Pickering, N.A., Camp, S., Taylor, P., 1993. Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry*, 32 (1), 12-17.
- Wilhelm, J., Pingoud, A., 2003. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem*, 4(11), 1120-8.
- Wilson, B. and Nachmansohn, D., 1954. In 'Ion transport across membranes' (HT Clarke Ed). Acedemic Press, Newyork 35.
- Winblad, B., Wimo, A., Joönsson, L., 2006. The worldwide direct costs and costs of informal care of dementia. *Alzheimer's Dem*, 2, S19-S20.
- Wittwer, C., Meuer, S., 2001. Rapid cycle real-time PCR: Methods and applications, *Rapid Cycle Real-time PCR*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1-8.
- Wong, M. L., Medrano, J. F., 2005. Review: Real Time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85.
- Xiao, Xq., Wang, R., Tang, X.C., 2000. Huperazine A And tacrine attenuate β amyloid peptide-induced oxidative injury. *J Neurosci Res*, 61, 564-549.
- Yagi, K., 1984. Increased lipid peroxides initiate atherosclerosis. *Bioassays*, 1, 58-60.

- Yapar, B.S., 2006. Alfa Lipoik Asidin Rat Karaciğer Homojenatlarında İndüklenmiş Lipid Peroksidasyonuna Etkisi, Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Edirne, 12-13.
- Yen, G.C., Chen, H.Y., 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agr. Food Chem*, 43 (1), 27-32.
- Kakinuma, Y., Furihata, M., Akiyama, T., Arikawa, M., Handa, T., Katare, R.G., Sato, T., 2010. Donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor against Alzheimer's dementia, promotes angiogenesis in an ischemic hindlimb model. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48, 680–693.
- Yu, B.P., 1994. Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, (74), 139-162.
- Yüzbaşıoğlu, A., 2008. Dejenerasyon sürecindeki kas dokusunda housekeeping genlerin ekspresyon düzeyinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- Zima, T., Stipek, S., Tesar, V., Nemecek, K., Mechurova, A., 1995. Free radicals in the pathogenesis of selected diseases. *Cas Lek Cesk*, 134, 291-5.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Giresun’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Giresun’da tamamladı. 2006’da girdiği İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 2010 yılında mezun oldu. Aynı yıl içerisinde başladığı Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Bilim dalı master programını 2012 yılında tamamladı. Müteakiben Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Bilim dalında sürdürdüğü doktora programını 2015 yılında bitirdi.

