

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esin SÖNMEZ

**AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZ HASTALARINDA
SÜPEROKSİT DİSMUTAZ ENZİMİNİN MOLEKÜLER
DÜZEYDE İNCELENMESİ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2019

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZ HASTALARINDA SUPEROKSİT
DİSMUTAZ ENZİMİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ**

Esin SÖNMEZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 25/06/2019 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Gülüzar ATLI
DANIŞMAN

.....
Doç.Dr.Salih ÇETİNER
ÜYE

.....
Prof. Dr. Nizami DURAN
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: TYL-2016-7470

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZ HASTALARINDA
SÜPEROKSİT DİSMUTAZ ENZİMİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE
İNCELENMESİ

Esin SÖNMEZ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Gülüzar ATLI
Yıl: 2019, Sayfa: 45
Jüri : Prof. Dr. Gülüzar ATLI
: Doç.Dr. Salih ÇETİNER
: Prof. Dr. Nizami DURAN

Amyotrofik lateral skleroz (ALS) yetişkinlerde en sık rastlanan nöromüsküler hastalıklardan bir tanesidir. Hastalığın oluşumunda farklı genlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Bu genler içerisinde Cu/Zn Süperoksit Dismutaz (SOD1) geni en fazla mutasyona uğrayan genlerden bir tanesidir. SOD1 geni süperoksidin moleküler oksijen ve hidrojen peroksitide inaktivasyonunu katalizleyen ve antioksidan savunmada rol oynayan süperoksit dismutaz enzimini kodlamaktadır. Bu nedenle yapılan çalışmada Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Nöroloji polikliniğine başvuran ve ALS tanısı konulan 36 hastadan SOD1 geninin 1. ekzon ve intron bölgesinde rs17881180 mutasyon varlığı SANGER DNA dizi analiz ile araştırılmıştır. SOD1 geninin 1. ekzon bölgesinde hiçbir hastada mutasyon saptanmamışken altı hastada intronik varyantlar tespit edilmiştir. İki hastada homozigot formda, dört hastada heterozigot formda intronik varyant belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarımıza göre hastalarda mutasyon saptanmaması olgu sayımızın az olmasından ya da sporadik ALS olgularında SOD1 geninde mutasyon oranının düşük olmasından kaynaklanıyor olabilir. İtronik varyantların ise hastalıkla ilgili pek bilgilendirici olmadığı daha sonraki çalışmalarda daha fazla olgu ve daha fazla gen gruplarının birlikte çalışılmasının hastalığın anlaşılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Amyotrofik lateral skleroz, Süperoksit dismutaz, Mutasyon

ABSTRACT

MSc THESIS

THE MOLECULAR ANALYSIS OF SUPEROXIDE DISMUTASE ENZYME IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS PATIENTS

Esin SÖNMEZ

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Gülüzar ATLI
Year: 2019, Pages: 45
Jury : Prof. Dr. Gülüzar ATLI
: Assoc. Prof. Dr. Salih ÇETİNER
: Prof. Dr. Nizami DURAN

Amyotrophic lateral sclerosis is one of the most common neuromuscular diseases in adulthood. It is thought that different genes play an important role in the development of this disease. Cu, Zn SOD1 gene is one of the most mutated genes among those genes. SOD1 gene encodes the superoxide dismutase enzyme, which catalyzes the inactivation of superoxide into oxygen and hydrogen peroxide and playing role in antioxidant defence. Therefore, in this study, we investigated the presence and incidence of the first exon and intron of SOD 1 gene (rs1781180) mutation with SANGER DNA sequence analysis in 36 patients who consulted to the Neurology Department, Balcalı Hospital of Cukurova University. No mutation was detected in the first exon of the SOD1 gene while six intronic variants were found in patients. We detected that intronic variants in two patients had homozygous and in four patients had heterozygote. Accordingly our results; we suggested that the absence of mutations in patients may be due to the restricted number of cases or the low rate of mutation in the SOD1 gene in sporadic ALS cases. Also, observed intronic variants were not very informative for ALS. Therefore, further research with larger patient population and more gene groups are needed to understand the molecular mechanism of ALS

Key Words: Amyotrophic lateral sclerosis, Superoxide dismutase, Mutation

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Beyin ve spinal kordda motor nöronların dejenerasyonu ile karakterize edilen amyotrofik lateral skleroz, yüksek fenotipik ve genotipik değişkenlik gösteren progresif ve paralizan nöromusküler bir hastalıktır. ALS gelişiminde yirmiden fazla genin etkili olabileceği daha önce yapılan genetik çalışmalarda gösterilmiştir. Süperoksit dismutaz 1 geni ALS oluşumuna neden olan genler arasında en fazla mutasyona uğrayan genlerden biridir. SOD1 geni mutasyonları sporadik ALS olgularının yaklaşık olarak %7'sinden, ailesel ALS olgularının ise %12-13'ünden sorumlu tutulmaktadır. Türk populasyonunda ALS ile ilgili genetik faktörlerin araştırılması ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Amyotrofik Lateral Skleroz Online Genetik Veritabanı (ALSod) verilerine göre ALS ile ilişkili major genlerin mutasyon sıklığı C9orf72 için %28,30, SOD1 için %4,8, FUS için %4,60 TARDBP için %4,63 ve UBQLN2 için %4,4 olarak bildirilmiştir. Bu nedenle yapılan çalışmaya Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Nöroloji Polikliniğine başvuran ve sporadik ALS tanısı konan yaş ortalaması 61±9 olan 18 kadın ile yaş ortalaması 60±6 olan 18 erkek hasta olmak üzere toplamda 36 ALS hastası dahil edilmiştir. Çalışmamızda SOD1 geninin 1.ekzon bölgesinde rs17881180 C.72+133C>T mutasyonu SANGER DNA dizi analizi ile araştırılmış ve mutasyon saptanmamıştır. Buna ek olarak SOD1 geninin 1.intron bölgesinde iki kadın hastada homozigot varyant, iki kadın ve iki erkek hastada ise heterozigot varyantlar bulunmuştur.

Sonuçlarımızda ALS hastalarının SOD1 geninin 1. ekzon bölgesinde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Saptanamamasının nedeni sporadik ALS olgularında SOD1 geninin 1. ekzon bölgesinde mutasyon görülme sıklığının düşük olması ya da yaptığımız çalışmadaki olgu sayısının az olması olabilir. Diğer taraftan çalışmamızda altı hastada belirlenen intronik varyantların ise ALS hastalığının moleküler mekanizmasının anlaşılmasında tek başına bilgilendirici olmadığı düşünülmektedir. Bu nedenle daha sonraki çalışmalarda daha fazla olgu ve hastalıkla

ilişkili daha fazla gen mutasyonunun birlikte araştırılması hastalığın moleküler mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.



TEŞEKKÜR

Tez çalışmanın gerçekleőtirilmesinde değerli bilgilerini benimle paylaőan, ne zaman bir konuda kendilerine danıősam bana kıymetli zamanlarını ayırıp buyk bir sabırla faydalı olabilmek için elinden geleni sunan her sorun yaőadıęımda çekinmeden yanlarına gidebildiğim, güler yüzlerini benden esirgemeyen, yüksek lisans eğitimim ve tez çalışması sürecim boyunca tecrübesini benden esirgemeyen baőtta Prof.Dr Kıymet AKSOY olmak üzere değerli danıőmanlarım Prof. Dr. Gülizar ATLI ve Doç. Dr. Őule MENZİLETOğLU YILDIZ'a Őükranlarımı sunarım. Yine çalıőmamda konu, kaynak ve yöntem açısından bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren Dr. Derya KOCAMAZ'a teşekkür ederim. Bütün eğitim hayatım boyunca olduğu gibi Yüksek Lisans eğitimimde de desteklerini benden asla esirgemeyen ve her zaman yanımda olan anneme ve babama da sonsuz teőekkürler.

Esin SÖNMEZ

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XIV
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Reaktif Oksijen Türü Oksidatif Stres Kaynakları	3
2.1.1. Endojen Kaynaklar.....	3
2.1.2. Eksojen Kaynaklar	4
2.2. Reaktif Oksijen Türü Oluşturan Başlıca Mekanizmalar	4
2.2.1. Otoksidasyon.....	4
2.2.2. Geçiş Metal İyonlarının Etkisi	6
2.3. Reaktif Oksijen Türünün Etkileri.....	7
2.3.1. Lipitlere Etkileri	7
2.3.2. Proteinlere Etkileri	8
2.3.3. Nükleik Asitlere ve Karbonhidratlara Etkileri	8
2.4. Antioksidanlar.....	9
2.4.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	10
2.4.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)	10
2.4.1.2. Glutasyon peroksidaz (GPx)	10
2.4.1.3. Glutasyon redüktaz (GR)	11
2.4.1.4. Glutasyon S-transferaz (GST).....	11
2.4.1.5. Katalaz (CAT)	11

2.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	12
2.4.2.1. Vitamin C (Askorbik asit)	12
2.4.2.2. Vitamin E (Tokoferoller)	12
2.4.2.3. Karotenoidler	12
2.4.2.4. Melatonin	13
2.4.2.5. Transferrin	13
2.4.2.6. Seruloplazmin	13
2.4.2.7. Bilirubin	14
2.4.2.8. Albümin	14
2.4.2.9. Glutasyon (GSH)	14
2.4.2.10. Ürat	14
2.4.2.11. Ferritin	15
2.4.2.12. Selenyum	15
2.4.2.13. Sitokinler	16
2.5. Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS)	16
2.5.1. Hastalığın Teşhisi	16
2.5.2. Amyotrofik Lateral Skleroz'da Yaşam Süresi	17
2.5.3. Hastalığın Tanı ve Tedavisi	17
2.6. ALS Hastalığının Oluşumunda Genetik Nedenler	18
2.6.1. Familial ALS (fALS)	18
2.6.2. Sporadik ALS (sALS)	20
2.6.3. Hastalığın Histopatolojisi	21
2.6.4. Hastalığın Patofizyolojisi	22
2.7. ALS Hastalığına Neden Olan Faktörler	22
2.7.1. Hastalığın Epidemiyolojik Özellikleri	22
2.7.2. Ağır Metallere Maruz Kalma	23
2.7.3. Viral Enfeksiyonlar	24
3. MATERYAL VE METOD	25
3.1. Toplanan Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu	25

3.1.1. Materyal.....	25
3.1.2. Kimyasalların Hazırlanması	25
3.1.3. DNA İzolasyon Prosedürü.....	26
3.2. SOD1 Sekans Analizi	26
3.2.1. PCR Analizi.....	26
3.2.2. PCR Protokolü.....	27
3.2.3. PCR Clean-Up Prosedürü.....	28
3.2.4. Sekans Analizi.....	29
4. SONUÇLAR.....	31
5. TARTIŞMA	35
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	44



TABLolar DİZİNİ**SAYFA**

Tablo 2.1. Ailesel Amyotrofik Lateral Skleroz tanısı için kriterler	19
Tablo. 3.1. PCR analizinde kullanılan bileşikler	27
Tablo. 3.2. PCR Amplifikasyon Basamakları	28
Tablo. 3.3. PCR Clean-Up Reaksiyonu için kullanılan bileşikler.....	28
Tablo. 3.4. PCR Clean Up Basamakları.....	28
Tablo. 3.5. Sekans Analizinde Kullanılan Bileşikler	29
Tablo. 3.6. Sekanslama Basamakları	29
Tablo 4.1. ALS tanısı konan kadın ve erkek hastaların SOD1 geninin 1. intron bölgesinde rs17881180 C.72+133C>T varyantı	31



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 2.1. Lipid Peroksidasyonu	7
Şekil 4.1. ALS tanısı konan kadın hastaların SOD1 geninin 1. intron bölgesinde rs17881180 C.72+133C>T homozigot varyantı.....	31
Şekil 4.2. ALS tanısı konan kadın hastaların SOD1 geninin 1. intron bölgesinde rs17881180 C.72+133C>T heterozigot varyantı.....	32
Şekil 4.3. ALS tanısı konan kadın hastaların SOD1 geninin 1. intron bölgesinde rs 17881180 C.72+133C>T homozigot varyantının elektrogram görünümü.	32
Şekil 4.4. ALS tanısı konan kadın hastaların SOD1 geninin 1. intron bölgesinde .	33



SİMGELER VE KISALTMALAR

ALS	: Amyotrofik Lateral Skleroz
ALSoD	: Amyotrofik Lateral Skleroz Online Genetik Veritabanı
CAT	: Katalaz
EMG	: Elektromiyogram
fALS	: Familial ALS, Ailesel ALS
FTD	: Frontotemporal demans
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon S-transferaz
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROT	: Reaktif oksijen türleri
sALS	: Sporadik ALS, Rastlantısal ALS
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOD1	: Cu/Zn Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiyobarbitürik asit
ÜMN	: Üst Motor Nöron



1.GİRİŞ

Amyotrofik lateral skleroz (ALS), üst ve alt motor nöron dejenerasyonu sonucu ortaya çıkan ve sebebi tam olarak bilinmeyen nörodejeneratif bir hastalıktır. Güçsüzlük, atrofi ve fasikülasyon gibi alt motor nöron (AMN) klinik bulguları ile karakterizedir. Klinik bulgulara karakterize olan spastisite ve hiperrefleksi gibi üst motor nöron (ÜMN) bulguları da eşlik eder. Kısa zamanda ağır solunum yetmezliği nedeniyle ölümlere yol açar. ALS’de yaşam süresi 1-20 yıl arasındadır. (Karlíkaya ve Hays, 2005)

ALS, ilk kez 1869 yılında Fransız nörolog Jean-Martin Charcot tarafından tanımlanmıştır. ALS günümüzde sıklıkla görülen nörolojik bir hastalık olup hastalık 50-60 yaşlarında ortaya çıkar. Erkeklerde kadınlara oranla daha sık görüldüğü düşünülse de son 40 yılda yapılan çalışmalarda bu durumda bir azalmanın olduğu gözlenmiştir. Türkiye’de yaklaşık 6000-8000 kadar ALS hastası bulunduğu düşünülmektedir. Ailesel formun (familiar ALS, fALS) yanı sıra rastlantısal ALS (Sporadik ALS, sALS) tanımlandığından bu yana sadece genetik değil çevresel faktörlerin de hastalık üzerindeki etkisi olduğu düşünülmektedir.

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda tanımlanmış çevresel risk faktörleri; yaş, erkek cinsiyet ve sigara içimidir. Aynı zamanda tarım işçiliği, kurşun, civa ve tekstil ya da plastik sanayide çalışma da çevresel faktörler arasında yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda sALS olgularında genetik geçiş açık değildir. ALS olguları genellikle sALS olmakla birlikte %5-10 kadarı fALS’dır. (Sies ve ark., 1992)

Antioksidan sistemler fizyolojik şartlarda oluşan oksidatif hasara karşı vücudu korumaktadır. Vücudun en önemli savunma sistemi olan antioksidanlar ve serbest radikaller arasındaki dengesizlik nedeniyle oluşan oksidatif stres nöronal metabolizma bozulmalara yol açmaktadır. Antioksidan savunma sistemleri biyokimyasal özelliklerine göre iki sınıfa ayrılır; enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar. Enzimatik antioksidanlara örnek olarak; Superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz verilebilir. Enzimatik olmayan

antioksidanlara ise A, C, E vitaminleri, melatonin ve ferritin örnek verilebilir. Antioksidanların başlıca iki etkisi vardır; serbest radikal oluşumunun önlenmesi ve oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesidir. Örnek olarak çok güçlü bir indirgeyici ajan olan vitamin C; lipid peroksidasyonunu başlatan radikalleri temizleyerek, hücre membranını oksidatif hasara karşı korur.

fALS olgularının yaklaşık %10-20 kadarında hastalığın etiyojisinin Cu/Zn süperoksit dismutaz (SOD1) enziminde meydana gelen mutasyon varlığı olduğu rapor edilmiştir. ALS'de anahtar hipotez; oksidatif stres sonucu motor nöron hasarının oluşmasıdır. ALS'nin orta yaşlarda ortaya çıkması, oksidatif stresin ileri yaşlarda artması ile bağlantılıdır. (Özmen ve Özarda, 2014)

Bu tez çalışmasında Çukurova Bölgesi'ndeki ALS olgularındaki SOD1 enziminin mutasyon varlığı belirlenerek hastalığın erken dönemlerinde SOD1 enziminin marker olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1.Reaktif Oksijen Türü Oksidatif Stres Kaynakları

Reaktif oksijen türleri (ROT); patolojik ve fizyolojik reaksiyonlar sırasında oluşan, eşleşmemiş elektronu bulunan moleküllerdir. Barındırdıkları eşleşmemiş elektronlar, bu molekülleri; lipid, protein ve nükleik asit gibi önemli yapılara zarar verecek şekilde reaktif hale getirecek reaksiyonların başlamasına neden olmaktadır. (Delibaş ve Özçankaya, 1995)

Reaktif oksijen oluşumunda sorumlu olan antioksidan ve enzim sistemlerin hücrede yerleşiminin farklılık göstermesine karşın, ROT oluşumunun en önemli kaynağı mitokondridir. ROT'ların rol aldığı fizyolojik olaylar arasında hücre sinyal mekanizması, hücre farklılaşması ve çoğalması gibi çeşitli durumlar yer alır. Organizmanın yaşamını sağlıklı bir şekilde devam ettirebilmesi için, oksidan-antioksidan dengesinin korunması gereklidir. Serbest radikaller normal metabolik süreçte endojen olarak üretilirler. Güneş ışınları, sigara, çevre kirliliği ve radyasyon gibi ekzojen etkenler nedeniyle de serbest radikaller oluşabilmektedir. Serbest radikallerin yapısı reaktif olduğu için başta nükleik asit, protein ve lipit olmak üzere hücre bileşenleri ile etkileşebilme ve zarar verme potansiyeli vardır. Neden oldukları zararlara örnek olarak; hücre zarının yapısını bozma, enzim etkinliklerinde değişiklikler, proteinler ile kovalent bağ oluşumu, sinir iletisini azaltma, DNA zedelenmesi, lipit peroksidasyonu verilebilir. Oksidatif stresin diyabet ve kanser gibi birçok hastalığın oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. (Büyüksulu ve Yiğitbaşı, 2015)

2.1.1.Endojen Kaynaklar

- Aerobik solunum esnasında, mitokondride; elektron transport sistemi tarafından katalizlenen oksijenler, reaktif oksijen türlerini yan ürün olarak üretirler.

- Arşidonik asit metabolizması ve düz kas hücreleri reaktif oksijen üretir.
- Vücut yorgunluğu kaynaklı stres ya da zihinsel stres toksik yan ürün olarak reaktif oksijen üretimine neden olur. Strese neden olan kortizol ve kateşolamin gibi hormonların kendileri de reaktif oksijene dönüşür.
- Lipit peroksidasyonu, ksantin oksidaz gibi kaynaklardan reaktif oksijen türleri oluşur.
- Yangı esnasında sitokinlerin serbest bırakılmasından kaynaklı olarak makrofajlar ve nötrofiller reaktif oksijen üretmeye başlar. (Karabulut ve Gülay, 2016)

2.1.2. Eksojen Kaynaklar

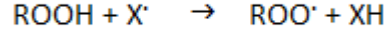
Mikrodalga ışınları; X-rays, UV ışınlar; volkanik faaliyetler ve orman yangınları; asbest, benzen, karbonmonoksit ve formaldehit gibi havayı kirleten etkenler; tutkal, boya, temizlik ürünleri ve böcek ilacı gibi kimyasallar; su kirlenmesine neden olan kloroform; alkol ve sigara tüketimi; egzoz ve sigara dumanı eksojen olarak reaktif oksijen üretimine neden olabilir. (Karabulut ve Gülay, 2016)

2.2.Reaktif Oksijen Türü Oluşturan Başlıca Mekanizmalar

2.2.1.Otooksidasyon

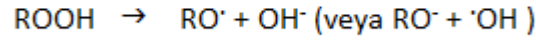
Otooksidasyon; atmosferik oksijen tarafından katalizlenen bir serbest radikal zincir reaksiyonudur. Çoklu doymamış yağ asitleri ve fosfolipidler otooksidasyona yatkındır. Otooksidasyon sonucu oluşan ilk ana ürün hidroperoksit (ROO[•]) radikalidir. Hidroperoksitlerin, zincir reaksiyonu başlatabilmesi için üç farklı mekanizma vardır;

- Hidroperoksit, reaksiyona katılabilecek bir peroksi (ROO[•]) oluşturmak için gelen başlatıcı bir radikal (X[•]) ile reaksiyona girebilir.

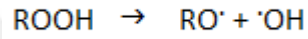


- Hidroperoksit, bir metal iyonu ya da başka bir indirgen ile alkoksi (RO[·]) veya hidroksi ([·]OH) radikalini oluşturmak için indirgenebilir.

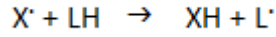
[H]



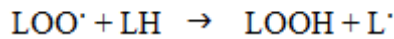
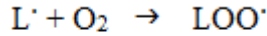
- Hidroperoksitteki O-O bağı parçalanarak alkoksi ve hidroksi radikallerine dönüşebilmektedir.



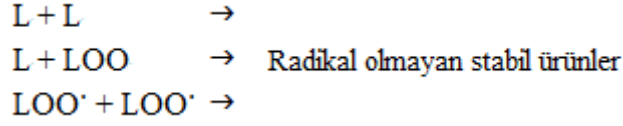
Lipid oksidasyonu, başlangıç, ilerleme ve sonuç şeklinde gerçekleşmektedir. Başlangıç aşamasında, başlatıcı bir radikal (X[·]) ve yağ asidi (LH) substratının reaksiyona girmesi sonucu H atomu transferi ile bir lipid radikali (L[·]) oluşur.



İlerleme aşamasında, oluşmuş olan L[·]radikaline oksijen eklenerek peroksi (LOO[·]) radikali oluşur ve bu peroksi radikali diğer yağ asidi molekülünden ayrılan bir H atomuyla birleşerek yeni lipid radikallerine dönüşür.

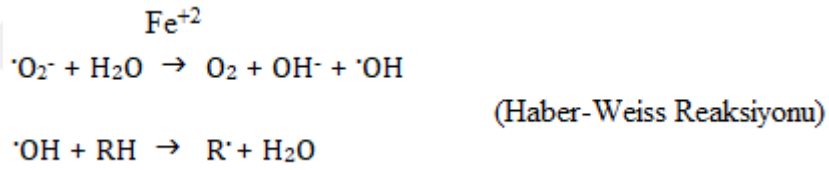


Sonuç aşamasında; oluşan radikaller birbirleri ile reaksiyona girerek radikal olmayan eter, keton, ester ve alkol gibi ürünlere dönüşür. (Koca ve Karadeniz, 2003)

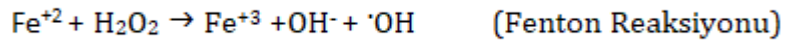


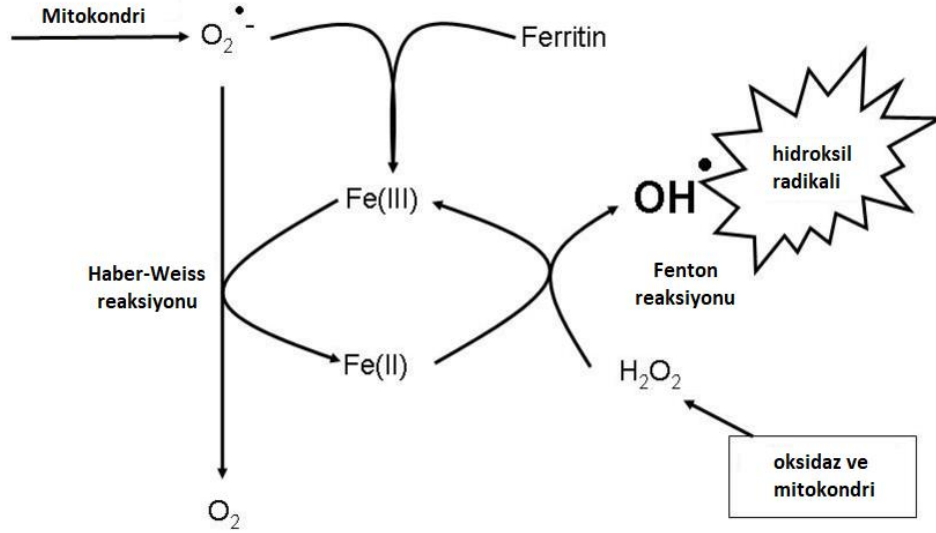
2.2.2. Geçiş Metal İyonlarının Etkisi

Canlı sistemde serbest radikal oluşturan, demir ve bakır gibi geçiş metal iyonları vardır. Bakır katalizli reaksiyonlar henüz tam olarak açıklanamamıştır ama demir oksidatif reaksiyonları teşvik etmektedir. Demirin biyolojik sistemlerde ATP üretimi, DNA sentezi ve oksijen taşıma gibi görevleri vardır. Fakat serbest formları toksik etki yapabilmektedir. Bu toksisite lipid oksidasyonunu teşvik edebilir ya da DNA molekülüne hasar verebilir. Süperoksit anyonu (O_2^-), Fe^{+2} katalizörlüğünde H_2O ile reaksiyona girerse zararlı hidroksi (OH) radikallerini oluşturan Haber-Weiss reaksiyonu oluşur. (Koca ve Karadeniz, 2003)



Demir iyonları; Fenton-tip reaksiyonları da katalizler. Bu reaksiyonda hidroperoksitler zararlı hidroksi radikale dönüşür. Hidroksi radikali oldukça reaktif bir türdür ve hızlı şekilde lipid radikali oluşturarak lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonlarını başlatır.(Şekil 2.1). (Koca ve Karadeniz, 2003).





Şekil 2.1. Lipid Peroksidasyonu

2.3. Reaktif Oksijen Türünün Etkileri

2.3.1. Lipitlere Etkileri

Lipitler reaktif oksijen türlerine karşı oldukça hassastır. Reaktif oksijenler, lipitler ile reaksiyona girdiğinde gerçekleşen lipit peroksidasyonu çok yüksek derecede zararlı etkilere neden olmaktadır.

Lipit peroksidasyonu hücre membranının geçirgenliğini ve akışkanlığını bozarak zarar verir. Lipit peroksidasyonu bir metil grubundan ($-CH_3$) bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile birlikte karbon atomu ($\dot{C}H$) üzerinde eşlenmemiş bir elektron oluşmasıyla sonuçlanır. Bu şekilde oluşan karbon radikali, moleküllerin yeniden düzenlenmesiyle konjuge dien'e sabitlenir ve sabitlenen karbon radikali daha sonra oksijen molekülü ile reaksiyona girerek lipit peroksil radikalini (LOO^{\bullet}) oluşturur. Bu radikaller daha fazla hidrojen atomlarının ayrılmasıyla diğer lipit molekülleri ile reaksiyona girebilir. Böylece lipit hidroperoksitler ($LOOH$) şekillenir ve aynı zamanda daha fazla lipit peroksitleri üretilir. (Büyüksulu ve Yiğitbaşı, 2015)

Lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak, malondialdehit düzeylerinin tayini için Ohkawa ve ark. (1979) tarafından bildirilen spektrofotometrik yöntem esas alınır. Yöntemin temeli, biyolojik materyalde, perokside lipidlerin yıkım ürünü olan malondialdehitin, tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyonu sonucunda oluşan pemberenkli ürünün miktar tayinidir.

2.3.2. Proteinlere Etkileri

Serbest radikaller proteinleri doğrudan etkilerken proteinlerin etkilenme derecesini aminoasit içerikleri belirler. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküller serbest radikaller ile daha yüksek reaktiviteye sahip olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi aminoasitler içeren proteinler serbest radikallerle daha kolay reaksiyona girer.

Serbest radikaller, yapısal proteinlerin fonksiyonunu ve enzim aktivitesini engelleyerek birçok proteinin hasarına neden olabilir. Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu protein oksidasyonu sonucunda, protein hidroperoksitler gibi kararlı ve yüksek derecede reaktif ürünler meydana gelir. Bu ürünler ile geçiş metal iyonlarının etkileşimi sonucunda da radikaller oluşabilir. Bununla beraber oksitlenmiş proteinlerin birçoğu, fonksiyonel olarak doğada inaktiftir ve hızlı bir şekilde uzaklaştırılır. Buna karşın zamanla azalmalı olarak birikerek hastalıklara neden olmaktadır. (Büyüksulu ve Yiğitbaşı, 2015).

2.3.3. Nükleik Asitlere ve Karbonhidratlara Etkileri

Reaktif oksijen türleri, DNA ile etkileşime geçerek oksidatif hasara yol açar. DNA, OH gibi serbest radikaller tarafından kolaylıkla hasara uğratılabilir. Bu serbest radikaller DNA ile reaksiyona girerek şeker moleküllü hidrojen atomlarının kaybına veya ilavesine sebep olabilir. Özellikle, pirimidinin C4-C5 çift bağı hidroksil radikalının saldırılarına karşı çok hassastır. Bu saldırılar sonucunda timin glikol, urasil glikol, üre kalıntısı, 5-hidroksideoksiüridin,

5-

hidroksideoksisitidin ve hidantoin gibi oksidatif pirimidin hasar ürünleri meydana gelir. Benzer şekilde pürinler, hidroksil radikal saldırılarına karşı hassastır. Bu saldırılar 8-hidroksi deoksiguanozin ve 8-hidroksi deoksiadenozin formamidopirimidin ürünlerinin oluşumuna yol açar.

Hidroksil gibi serbest radikaller, karbonhidratlar ile reaksiyona girer ve karbon atomlarının birinden bir hidrojen atomu çıkararak karbon merkezli radikal üretirler. Bunlar hyaluronik asit gibi önemli moleküllerde zincir kırılmalarına yol açar. (Büyüksü ve Yiğitbaşı, 2015).

2.4. Antioksidanlar

Antioksidanlar, serbest oksijen radikallerinin hedef dokularda oluşturabilecekleri hasarı önleyen, geciktiren veya meydana gelen hasarın tamirinde görev alan maddelerdir. Antioksidanlar, enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki başlık altında toplanır. Enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz, sitokrom oksidaz, enzimatik olmayan antioksidanlardan bazıları ise vitamin E, vitamin C, karotenoidler, melatonin, glutatyon, ürat, bilirubin, albümin, transferin ve demir şelatörleridir. Antioksidanlar çoğunlukla *in vivo* bazen de *in vitro* olabilirler. (Berköz ve ark., 2008).

Yapılan çalışmalarda bazı bitki türlerinin doğal antioksidan kaynağı olduğu belirlenmiştir. Yüksek miktarda C vitamini konsantrasyonuna sahip olan portakal ve limon bu özelliklerinden dolayı yüksek antioksidan kaynağıdır. Patates, domates, ıspanak, ayçiçeği ve karabuğdayda antioksidan bulunmaktadır. (Moure ve ark., 2001). Özellikle Avrupa'da ve Amerika'da sık tüketilen brokolide; hem bağışıklık sistemini güçlendiren hem de antioksidan özellik taşıyan A, E ve C vitaminleri bulunmaktadır. Brokoli aynı zamanda da lifli yapısından dolayı ağır metallerin bağırsaklardan dışarı atılmasını sağlar. Likopen içeren domates; yapısındaki likopenden dolayı doğal antioksidan kaynağıdır. Likopen, karoten ailesine ait bir pigmenttir. Prostat kanseri ve karotenler arasındaki ilişkiyi anlamak amacıyla

yapılan bir çalışmada likopenin kanser riskini azalttığı gözlenmiştir. Yeşil çay da güçlü bir antioksidan kaynağıdır. (Aydemir ve Sarı, 2009).

2.4.1. Enzimatik Antioksidanlar

2.4.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz ilk kez oksijenli solunum yapan canlılarda 1968 yılında belirlenmiştir. Yüksek oksijen kullanımı olan dokularda SOD aktivitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek seviyelerde süperoksit üretimi olur ama bu enzim sayesinde hücre içinde süperoksit düzeyleri düşük seviyede tutulur. SOD enzimi yüksek katalitik aktivitesi sayesinde hücrelerde süperoksit birikimine izin vermez. Fakat bazı patolojik durumlar söz konusu olduğunda süperoksit yapımının artması durumunda, süperoksite özgü tepkimeler görülmeye başlar. (Fridovich, 1983).

SOD, mitokondride oksijen ve hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşturmak için süperoksit radikallerinin dönüşümünü katalizler. SOD aktivitesinin düşük olması kanserli doku oluşumunu tetikleyebilir. Glutasyon peroksidaz (GPx) ve Katalaz ise oluşan hidrojen peroksiti suya indirger. Sitozolda Cu-Zn içeren SOD (Cu-Zn SOD) ve mitokondride Mn içeren SOD (Mn SOD) olmak üzere, insanda iki tip SOD enzimi vardır. (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).



2.4.1.2. Glutasyon peroksidaz (GPx)

Bu enzimin varlığına ilk defa memeli eritrositlerinde rastlanmıştır. Özellikle akciğerde etki gösterir. Glutasyon peroksidaz büyük moleküllü lipit hidroperoksitlerinin ve hidrojen proksitin indirgenmesinden sorumludur. (Cheeseman ve Slater, 1993). GPx, hidrojen peroksitin dönüşümünü katalizler ve lipit peroksidasyonunda önemli bir yere sahiptir. GPx-1 ve GPx-4 olmak üzere iki

adet intraselüler Glutasyon peroksidaz bulunmaktadır. (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

2.4.1.3. Glutasyon redüktaz (GR)

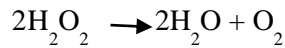
Glutasyon redüktaz (GR), okside glutasyonun redükte glutasyona dönüşümünü katalizleyerek yardımcı olur. Hücre içinde oksidatif hasarın önlenmesi açısından dolayı da olsa önemli bir rol oynar. Glutasyon peroksidaz enzimi zararlı hidrojen peroksinin hücredeki düzeyini düşürmekten sorumludur. Yeşil çay güçlü bir antioksidandır ve Glutasyon redüktaz gibi antioksidan enzimlerin sentezini tetikleyerek antioksidan aktivite gösterir. Bu etkisinden dolayı yeşil çay, DNA yapısında oluşabilecek hasarları ve lipid peroksidasyonunu önleyici etki gösterir. (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

2.4.1.4. Glutasyon S-transferaz (GST)

Glutasyon S-transferaz, bir Faz II biyotransformasyon enzimidir hidrofobik ve elektrofilik bileşiklerin glutasyon ile konjugasyonunu sağlayarak daha kolay atılabilen, daha az toksik metabolitlere dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimlerden biridir. (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

2.4.1.5. Katalaz (CAT)

Katalaz, SOD tarafından inhibe edildiği sırada oluşan hidrojen peroksiti, su ve moleküler oksijene parçalamakla görevlidir. Böylece zararlı süperoksit radikali moleküller oksijen ve suya dönüştürülmüş olur. (Siems ve ark., 1994).



Hemoprotein olan katalazın yapısında 4 hem grubu bulunur. Her alt birim enzimin kararlılığında rol oynayan bir molekül olan NADPH içerir. Katalaz

sitozolde ve endoplazmik retikulumda yoğun olarak bulunur. Böbreklerde ve karaciğerde aktivitesi yüksektir. (Akkuş, 1995). Katalazın indirgeyici aktivitesi büyük moleküllere etki etmez, hidrojen peroksit gibi küçük moleküllere karşı etkilidir. (Jenkins ve Tengi, 1981).

2.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

2.4.2.1. Vitamin C (Askorbik asit)

C vitamini özellikle sebzelerde ve meyvelerde bulunur. İnsan için mümkün olmasa da birçok memeli karaciğerindeki glikozdan askorbik asit sentezleme yeteneğine sahiptir. İnsanda sentezlenememesinin nedeni ise askorbik asit sentezi için gereken esansiyel gulonolakton oksidaz enziminin olmamasıdır. C vitamini birçok hastalığa neden olan oksijen radikallerini okside edebilmektedir. Kalp damar hastalıklarını, kanserleri, nörolojik hastalıkları azaltma etkisi vardır. Katarakt gelişimine neden olan oksidanları yok etmekte ve DNA hasarlarını önlemede önemli rol oynar. (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

2.4.2.2. Vitamin E (Tokoferoller)

E vitamini özellikle buğday, mısır, pamuk ve soya yağında bulunur. Dokularda bulunan en önemli eksojen kaynaklı lipofilik antioksidandır. Serbest radikal ve tekli oksijen tutucu olarak görev yapar. Ultraviyole ve radyasyon gibi serbest radikal oluşturan faktörlere karşı cildi korur. Lipit peroksidasyonunu önleme etkisine sahiptir. (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

2.4.2.3. Karotenoidler

Sarı, kırmızı ve turuncu renkli, meyvelerde ve sebzelerde bulunan pigmentlerdir. Bitkisel yağlarda erirler ama suda erimezler. Karotenoidler ilk kez havuçtan (*Dautus carrota*) izole edilmiştir ve adını da buradan alır. Günümüzde yaklaşık olarak 600 kadar karotenoid madde vardır. Kalp hastalığının azaltılması

açısından önemli fizyolojik antioksidanlardır. Antioksidan kapasitesi açısından en önemli karotenoid likopendir. (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

2.4.2.4. Melatonin

Melatonin çok güçlü ve etkili bir endojen radikal toplayıcısıdır. Toksik hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek bütün hücre kompartımanlarındaki biyomolekülleri, oksidatif hasara karşı bölgesel olarak yerinde korur. (Delibaş ve Özçankaya, 1995). Uyku ve üreme gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan melatonin; kemik iliği hücreleriyle safra ve gastrointestinal sistemden sentezlenir ve salgılanır. Oksidatif strese yol açan serbest radikalleri detoksifiye eder. (Yazıcı ve Köse, 2004).

2.4.2.5. Transferrin

Transferrin esas olarak serumda bulunur ama diğer vücut sıvılarında da düşük konsantrasyonuna rastlanır. Asıl işlevi çoğalan hücrelere demir taşımaktır. Antioksidan etki göstermesinin nedeni, serbest demir iyon konsantrasyonunu azaltmasıdır. Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksitin, hidroksil radikallerine dönüşümünü katalizler. (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

2.4.2.6. Seruloplazmin

Seruloplazmin ilk kez 1994 yılında izole edilmiştir. Sentezi karaciğerde gerçekleşir. Ferro haldeki demiri ferri demire oksitler ve transferrin ile birleşmesine yardım ederek hemoglobinin sentezinde görev almak üzere ilgili dokulara taşınmasını sağlar. (Aydın ve ark., 1992). Seruloplazmin, kandaki bakırın %95'ini taşır. Eritrositlerde bulunan yağ asitlerini aktif oksijen radikallerine karşı korur. (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

2.4.2.7. Bilirubin

Bilirubin, 120 günlük yaşam süresini dolduran eritrositlerin parçalanmasıyla oluşur. Dolaşım sırasında karaciğer tarafından alınarak safra ve idrarla atılır. Peroksil radikallerini toplamasından dolayı antioksidan özellik gösterir. (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

2.4.2.8. Albümin

Albümin, serbest oksijen radikallerini tutucu özelliğinden dolayı antioksidandır. Plazmada en çok sirküle olan proteindir. Kanda bulunan proteinlerin %60'ını oluşturur. (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

2.4.2.9. Glutasyon (GSH)

Glutasyon, neredeyse tüm ökaryotik hücrelerde sentezlenir ve bu nedenle de yüksek yoğunluklarda bulunur. Yaklaşık %85-90 kadarı sitoplazmada bazen de mitokondri, endoplazmik retikulum ve çekirdekte bulunur. C ve E vitaminleri GSH tarafından düzenlenir. Plazma membranından aminoasit transportunu da sağlar. (Karabulut ve Gülay, 2016).

Buna ek olarak glutasyon, suda çözünen bir tripeptiddir. Kataliz, taşıma ve ara metabolizma dahil bir çok biyolojik süreçte görev alır. GPx, GST gibi antioksidan enzimler için substrat rolü oynamaktadır. Endojen bir antioksidandır, serbest oksijen radikallerini nötralize eder. Karaciğer, böbrek ve bağırsakta yüksek konsantrasyonlarda bulunur. (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

2.4.2.10. Ürat

Ürik asit, plazmada bulunan serbest radikallerin üçte ikisini oluşturmaktadır. Pürin metabolizmasının bir ürünü olan ürat, suda çözünebilir endojen bir antioksidandır. Son yıllarda yüksek ürik asit seviyelerinin oksidatif stresle ilişkili olduğu ve risk oluşturduğu düşünülmektedir. Bu durum ürik asitin önemli bir antioksidan olduğu durumuna karşıt olarak ortaya çıkmıştır. Yapılan bazı

çalışmalarda koroner kalp hastalığı ve inme gibi olaylarla ürik asit düzeyleri arasında ilişki olduğu bildirilmektedir. Ürik asitin arteryal kan basıncını artırdığı ve hipertansiyon gelişmesine yol açtığı bilinmektedir. Diyabet hastalarında da ürik asit düzeylerinin yüksek olması yeni vasküler olayların gelişmesi için risk faktörü oluşturmaktadır. (Domaç ve ark., 2010).

2.4.2.11. Ferritin

Ferritin yüksek moleküler ağırlığa sahip, demirin depolanmasında görev alan bir proteindir. Depo demirini gösterir, bu nedenle demir eksikliği ve aşırı demir yüklenmesini değerlendirmek amacıyla serum ferritin seviyesine bakılır. Karaciğer, dalak ve kemik iliğinde bulunan ferritinin seviyesinin düşük olması demir depolarının boşaldığını gösterir. (Özgürtaş ve ark., 2008).

2.4.2.12. Selenyum

İnsanlar ve hayvanlar için esansiyel bir element olan selenyum, doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Selenyum insanlar tarafında günlük diyetlerinde inorganik ve organik formda alınır. İnsan vücudunun önemli metabolik yollarının vazgeçilmez eser elementidir. Aktif bölgesine selenyum katılmış proteinler selenoprotein olarak tanımlanır ve bu proteinler görevlerini yerine getirmek için selenyuma ihtiyaçları duyarlar, 30 tanesi tanımlanmış olmak üzere, insan vücudunda 100 civarı selenoprotein olduğu düşünülmektedir. Bu selenoproteinlerin en önemlileri, tioredoksin redüktaz ve glutatyon peroksidazdır. Selenoproteinler; tiroid fonksiyonlarını düzenlerler, kanserde antioksidan enzimlerdir, spermde yapısal proteinlerdir ve bazı viral enfeksiyonlarda azaltıcı etki gösterirler. Tiroid bezi hücreleri hormon sentezi sırasında H₂O₂'in oksidatif hasar yapma etkisine karşı selenoprotein olan glutatyon peroksidazin antioksidan etkisi ile korunurlar. (Bal ve ark., 2015).

2.4.2.13. Sitokinler

Sitokinler bağışıklık sistemin düzenleyen proteinlerdir. Depolanamazlar ama oldukça kısa sürede salgılanırlar. Sitokinler; antiviral etki gösterirler, bazı hipofiz hormonlarının salınım ve sentezine neden olurlar, yüksek konsantrasyonlarında şok ve ölüme yol açarlar, düşük konsantrasyonlarında ateşe neden olurlar, yaraların iyileşmesini sağlarlar. Kanser patogenezi ve tedavisinde etkilidirler. Katalaz olmak üzere bazı antioksidan etkili enzimleri aktive ederler. (Akdoğan ve Yöntem, 2018).

2.5. Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS)

ALS geç dönemde ortaya çıkan, istemli kaslarımızın hareketinden sorumlu olan motor nöronların ölümü sonucu oluşan nörodejeneratif bir hastalıktır. Nöronlar; hasar gördüklerinde veya öldüklerinde vücut tarafında yerine konamazlar. ALS ilk kez 1869 yılında alanında öncü bir nörolog olan Fransız Jean-Martin Charcot tarafından tanımlanmıştır. Bu nedenle, hastalık ilk zamanlar Charcot Hastalığı olarak adlandırılmıştır.

Hastalığın ilk belirtileri her hastada aynı olmamakla birlikte genellikle bir kolda ya da bacakta güçsüzlük ya da incelme, hastanın fark ettiği ilk belirti olmaktadır. Örneğin, kalem tutmak, düğme iliklemek, çanta taşımak zorlaşır; ya da hasta yürürken tökezler. Bazı hastalarda ise hastalık, konuşma veya yutma güçlüğü şeklinde başlar. Hastanın kendisi ya da yakınları peltek, genizden konuşma fark eder. Kaslarda seyirme, ağrı ve kramplar bu belirtilere eşlik edebilir. (Rowland and Shneider, 2001).

2.5.1. Hastalığın Teşhisi

Teşhis asıl olarak klinik belirti ve bulgulara dayanarak konur. Yine de hastalık pek çok kas ve sinir hastalığı ile karışabildiği için bazı analizlerin yapılması gerekirken tanıya yardım eden yöntem elektromiyogramdır (EMG). Başka

hastalıklarla karışabileceğinden, manyetik rezonans görüntüleme (MR), bazı kan ve idrar analizleri gerekebilir. (Özcan ve ark., 2016).

2.5.2. Amyotrofik Lateral Skleroz'da Yaşam Süresi

ALS'nin seyri her hastada farklı şekilde olur. Hastalıkta hayatta kalma süresi genellikle 4-6 yıl olarak verilse de 10 yıl ve üstünde yaşayan pek çok hasta vardır. İyi bir tıbbi ve sosyal destek ile 20 yıldan fazla yaşayan ALS hastaları vardır.

Teşhisten 50 yıl sonra bile yaşamını oldukça verimli biçimde sürdürebilmiş olan dünyaca ünlü bilim adamı Stephen Hawking, sergilediği bu dirençli ve uzun yaşam süresiyle ALS olmadığı yolunda bir görüşe yol açıyorsa da ALS hastasıydı.

Üç hemşire ve asistanının desteğiyle de olsa her yıl dört-beş kez yolculuğa bile çıkan ve bundan büyük keyif alan Hawking, çevresiyle iletişimini yanak kasları ile kontrol ettiği elektronik bir cihaz aracılığıyla sağlıyordu. Bilgisayarda yazı yazabiliyor ve yazdıklarını, bir metin okuyucu program sayesinde seslendirebiliyordu. 8 Ocak 1942 doğumlu olan Hawking, 14 Mart 2018 günü hayatını kaybetmiştir. (Özcan ve ark., 2016).

2.5.3. Hastalığın Tanı ve Tedavisi

Biyolojik belirteçler, vücutta zamanla izlenebilen ölçülebilir maddelerdir. ALS tanısını iyileştirmek, hastalık ilerlemesini izlemek ve tahmin etmek, bir kişinin terapiye yanıtını izlemek ve bir ilacın hedeflenen hedefe ulaşp ulaşmadığını anlamak için biyobelirteçler kullanılır. (Petrucci ve ark. 2016).

ALS için radikal bir tedavi henüz tespit edilmemiştir. Mevcut tedaviler ALS'yi tedavi etmez ancak hastalığın ilerlemesini yavaşlattığı gösterilmiştir. Yakın zamana kadar ALS'yi tedavi etmek için sadece bir ilaç (riluzol) onaylanmıştır. (Mehta ve ark. 2018).

2.6. ALS Hastalığının Oluşumunda Genetik Nedenler

ALS olgularının %90-95'i sporadiktir (Sporadik ALS, sALS). Hastalığın geri kalan %5-10'luk bölümü ise genetik geçişli ya da aileseldir (Familiyal ALS, fALS). Bu ailesel geçiş otozomal dominant ya da otozomal resesiftir. sALS ile fALS'ın klinikteki görüntüsü birbirine çok benzemektedir. Bununla beraber ikisi arasında bir takım farklılıklar vardır. Örneğin; fALS'da hastalık başlangıç yaşı sALS'a göre yaklaşık 10 yıl daha erkendir. fALS'da kadın: erkek oranı 1:1, sALS'da ise 1:1,7'dir. Ama sALS'daki bu oran yaşla beraber değişir ve 70 yaşından sonra 1:1 olur. (Hand and Rooleau, 2002).

1993 yılında Rosen ve ark. familiyal vakaların %20'sinde Cu/Zn Superoksit Dismutaz (SOD1) enzimini kodlayan gende pek çok mutasyon belirlemişlerdir. Kalan %80'lik familiyal kısma da diğer genlerdeki mutasyonların neden olduğu düşünülmektedir. Yapılan araştırmalar sonucu sALS hastaların %5'nin SOD1 geninde mutasyonlara sahip olduğu bulunmuştur. Günümüzde ALS hastalığıyla ilişkilendirilmiş yaklaşık 124 farklı SOD1 mutasyonu tespit edilmiştir. Bulunan tüm bu SOD1 mutasyonları dominanttır. ALS hastalarında farklı SOD1 mutasyonları farklı sendromlara neden olmaktadır. (Rosen ve ark., 1993)

2.6.1. Familiyal ALS (fALS)

Ailesel (familiyal) ALS'nin birçok formunun kalıtsallığı otozomal dominanttır, ancak otozomal resesif geçişli ve X bağlantılı dominant ailesel ALS de ortaya çıkmaktadır. Uygulamada birinci veya ikinci derece akrabalarından birinin ALS'ye sahip olduğu bildirildiğinde ALS'nin ailesel olduğu kabul edilmektedir. Bununla birlikte, bazı ailelerde birinci derece akrabalarında ALS ve Frontotemporal demans sunumu ve bazı ALS hastalarında Frontotemporal demans (FTD) ile birlikte ALS görülmesi ailede ALS tanısı için yakın zamanda önerilen bir algorithmada değerlendirilmektedir. Bu çerçevede, birinci dereceden bir akrabasında aile öyküsü olan, görünüşte dağınık bir ALS hastasının, olası ailesel ALS' ye sahip olduğu düşünülmektedir.

Bu kavramın geçerliliği, bir fonksiyon geni olan kromozom 9'da çerçeve kayması 72'de (C9ORF72) bir heksanükleotit tekrarının (GGGGCC) anormal bir genişlemesinin ALS ile bağlantılı en yaygın gen varyantı olduğu keşfi ile desteklenmektedir ve ALS-FTD ve saf FTD ile sıklıkla ilişkilidir. Literatürde ailesel ALS tanımı üzerinde resmi olarak kabul edilmiş herhangi bir tanım bulunmamakla birlikte, önerilen çalışma tanımı birinci dereceden veya ikinci dereceden bir ALS öyküsüne dayanıyor veya potansiyel olarak bir birinci derece görel bir FTD öyküsü söz konusuysa yeterince desteklendiği görülmektedir (Tablo2.1). (Boylan, 2016).

Tablo 2.1. Ailesel Amyotrofik Lateral Skleroz tanısı için kriterler

Belirginlik sınıfı / düzeyi	Aile Öyküsü
Kesin	≥ 2 ALS'li birinci veya ikinci dereceden akrabalar
	≥ 1 ALS ve gen pozitif toplama ile ilişkili
Muhtemel	1 ALS'li birinci veya ikinci derece akraba
Olası	ALS'li uzak akraba (üçüncü derece veya ötesi)
	Aile öyküsü olmayan ancak bir FALS geni için pozitif olan, sporadik ALS hastası
	≥ 1 Onaylanmış frontotemporal demans hastası birinci veya ikinci derece akraba

*Tanımlar: Birinci derece akrabalar: ebeveynler, çocuklar ve kardeşler; ikinci derece akrabalar: büyükbaba, teyzeler / amca.

2011'de, C9orf72 geninde DNA'nın kısa, tekrar eden bir bölümünün kayması, ALS ve FTD'nin en yaygın genetik nedeni olarak keşfedilmiştir. Normal olarak, bir kişinin yaklaşık 30 tekrarlama varken, bir C9orf72 genişleme taşıyıcısı birkaç yüz ile binlerce tekrar arasına sahiptir.

Araştırmacılar keşfinden bu yana, hastalığın etiolojisini araştırmaktadırlar. Potansiyel hastalık yolları, genin işlevinin kaybedilmesini ve genişleyen tekrarlardan kaynaklanan toksik fonksiyon kazanımını içermektedir. Buna ek olarak, hücre

çekirdeğinin içindeki ve dışındaki moleküllerin taşınmasını bozarak hücrelere hasara neden olan tekrar RNA üretilmektedir.

Eylül 2011'de C9orf72'de heksonükleotid tekrar genişlemesinin tanımlanmasından önce ALS ile ilgili çok az sayıda epigenetik çalışma yayınlanmıştır. Epigenetik süreçlerin değişimi bir takım tekrar genişleme bozukluklarında gözleendiği için, C9orf72'de bir heksonükleotid tekrar genişlemesinin bulgusu, epigenetik modifikasyonların ve kromatin yeniden modellenen ALS ve FTD'de de rol oynayabileceği olasılığını ortaya koymuştur. Heksonükleotid tekrar genişlemesinin keşfinden bu yana, bazı çalışmalar rapor edilmiş olup bunların yarısı C9orf72 lokus ile ilişkilendirilmiştir. ALS ve FTD için epigenetik değişikliklerin değerlendirilmesi halen erken bir aşamadır ve değerlendirilmesi gereken çok etken vardır. Örneğin, ALS'ye ve FTD'ye katkıda bulunan eşsiz epigenetik değişikliklerin, tüm hücrelerde veya belirli alt genetik hücrelerin alt gruplarında belirli epigenetik değişikliklere karşı daha duyarlı veya savunmasız olup olmadığı bilinmemektedir. Bununla birlikte, epigenomda kanıt değişiklikleri ile birleşince, ALS ve FTD patogenezi katkıda bulunur, epigenetik enzimlerinin dinamik doğasıdır. Nörodejenerasyona yol açan patojenik epigenetik değişiklikleri tersine çevirmek için epigenetik dinamikleri düzenleyen enzimleri hedef alan terapötik stratejilerin geliştirilmesi, bu hastalıklarla mücadele için cazip bir yaklaşım sunmaktadır. (Petrucci ve ark. 2016).

2.6.2. Sporadik ALS (sALS)

Sporadik ALS'nin etiyolojisi büyük ölçüde bilinmemektedir. Familial ve sporadik ALS klinik olarak birbirinden ayırt edilemez. Ancak iki grup arasında küçük ve ilginç bazı farklılıklar vardır. Örneğin; familial olgularda hastalık başlangıç yaşı ortalaması sporadik vakalara oranla 10 yaş daha erken olup yaklaşık 46 yaşken sporadik vakalarda hastalık başlangıç yaşı ortalaması yaklaşık 56'dır.

fALS'da kadın:erkek oranı 1:1 iken sALS'da bu oran 1:1,5'dir. Bu oran 70 yaşından sonraki hastalar arasında 1:1'e yaklaşır.

SOD1 mutasyonu fALS vakalarının %10-15 ile ilişkilendirilmiştir. sALS hastalarında SOD1 mutasyonu taramaları sonucu bu vakaların %1-7'sinde SOD1 mutasyonlarına rastlanmıştır. Bugüne kadar tanımlanan bütün SOD1 ilişkili sALS vakaları ile SOD1 mutasyonu taşımayan sALS hastalarını birbirinden ayıracak fenotipik karakteristik bir farklılık bulunmamaktadır.

2.6.3. Hastalığın Histopatolojisi

Ailesel ALS, yaşa bağlı penetrant ile otozomal dominant bir özellik olarak kalıtılır ve klinik olarak sporadik formdan ayırt edilemez. Alevlenen ALS, sporadik vakalarla karşılaştırıldığında, bacaklardan ilk tutulumla birlikte başlangıç yaşı daha erken olma eğilimi gösterir ve süresi kısa olabilir. ALS öncelikle motor nöronların hastalığı olmasına rağmen, ailesel vakaların %73'ü omurilikte duyuşal sinir yollarının tutulumunu göstermektedir. Patoloji posterior sütunların orta bir bölgesinde, Clarke sütununda ve spinoserebellar yollarda oluşur.

ALS vakalarının yaklaşık onda biri aileseldir ve bunlardan yaklaşık dörtte biri SOD1 kodlayan gende mutasyona sahiptir. SOD, süperoksit radikalini hidrojen peroksite dönüştürür. Ailesel ALS'deki mutasyonların çoğunluğu enzimin yapısal omurgasını etkiler. Ailesel ALS hastalarında SOD aktivitesinin düzeyleri araştırılmıştır. Deng ve ark., eritrositlerde SOD düzeyini ölçmüş, SOD mutasyonuna sahip heterozigot hastaların normal seviyedeki SOD aktivitesinin yaklaşık %50 düşük SOD aktivitesine sahip olduklarını 1993 yılında rapor etmişlerdir. Bowling ve ark., beyinde sitozolik SOD aktivitesi %40 düşük olarak bildirmiştir. Kültürü yapılan hücrelerin DNA transfeksiyonundan sonra mutant SOD üzerinde yapılan çalışmalar, hastalardaki bulgularla uyumlu olarak tespit edilmiştir. (Bowling ve ark., 1993)

2.6.4. Hastalığın Patofizyolojisi

Amyotrofik lateral skleroz beyin sapı ve serebral korteksteki motor nöronları etkileyen nörodejeneratif bir hastalıktır. Daha önceleri erkeklerde kadınlara oranla 1,7 kat daha fazla görüldüğü söylene de, son 40 yıl içinde bu oranda azalma olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır. Çoğu ALS tanısı konmuş hasta 2-3 yıl içinde kaybedilmektedir. 5 yıl sağ kalma oranı %10-20 olarak bildirilmiştir. ALS, klinik olarak kolay tanımlansa bile, altta yatan patofizyolojik süreçler çok çeşitlidir. Uluç ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada familial ALS için öne sürülen patofizyolojik mekanizmaların, sporadik ALS için de öngörülüp görülemeyeceğini incelemiştir. Öne sürülen mekanizmaların başında, SOD1 mutasyonu gelmektedir. SOD1 enzimi familial ALS ile ilişkili olmaktadır. ALS tanısı konmuş hastalarda SOD1 mutasyonu varlığına ilişkin ilk yayın 1993 yılında çıkmıştır. O yıllarda 13 olarak belirlenen mutasyon günümüzde 100'den fazladır. Belirlenen bu mutasyonların çoğu nokta mutasyonudur. Az sayıda ise delesyon ve insersiyon belirlenmiştir.

Az sayıda bulunan motor nöronlar, somatik çapları geniş, aksonları uzun ve oksidatif strese yatkın hücrelerdir. Güçlü bir oksidan olan oksijen molekülü, başka moleküllerden elektron alarak diğer güçlü oksidan molekülü olan süperoksit anyonuna dönüşmektedir. SOD enzimi bu sırada devreye girerek antioksidan etkisiyle süperoksiti, hidrojen peroksite dönüştürmektedir.

2.7. ALS Hastalığına Neden Olan Faktörler

2.7.1. Hastalığın Epidemiyolojik Özellikleri

ALS erişkinlerde en sık görülen motor nöron hastalığıdır. Beyin ve omurilikte motor nöronların nörodejenerasyonu ile karakterizedir. ALS insidansı yılda 100.000 kişide yaklaşık 1-2,6 vaka, prevalans ise 100.000'de yaklaşık 6 vaka olarak gösterilebilir. ALS başlangıç yaşı şu an 58-60 yaşdır ve ölümle sonuçlanan yaşam süresi ortalama 3-4 yıldır.

Ekim 2010 ve Aralık 2011 tarihleri arasında sadece ABD'de kesin ALS tanısı konmuş 12187 vakanın tahmin edildiği görülmektedir. Olguların büyük

çoğunluğunu sALS (%90-95), geri kalan %5-10 kalıtsal ve fALS olarak adlandırılmıştır. Sporadik ALS'nin çevresel risk faktörlerine genetik yatkınlık içerdiği düşünülmektedir. (Talbot ve ark. 2016).

Türkiye’de Çukurova Üniversitesi’nde Koç ve arkadaşları (2016) tarafından 41 hasta üzerinde yapılan (24 erkek, %58,53; 17 kadın, % 42,47) ALS çalışmasında vakaların yaklaşık %5-10’unun genetik kökenli, %90-95’inin ise düzensiz olduğu tespit edilmiştir. Genetik form çoğunlukla otozomal dominant modelde görülür, otozomal resesif formu ise akraba evliliğinin yaygın olduğu Kuzey Afrika toplumlarında yaygın olarak görülür. Otozomal dominant kalıtım formu olan hastaların % 10-20’sinde kromozom 21 üzerinde lokalize Cu/Zn SOD mutasyonu vardır. Sporadik ALS insidansı 1,5–2/100000, prevalansı ise 6/100.000’dir. Hastalık erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülmektedir. ALS hastalığı tanısı konulan hastaların %50’si tanıdan sonraki 3 yıl içinde ölmektedir. Koç ve arkadaşları, yaptıkları bu çalışmada El Escorial kriterlerine göre tanısı konmuş hastaları ele almıştır.

Avrupa’da 1 Ocak 1998 – 30 Aralık 1999 yılları arasındaki 2 yıllık süreçte teşhis edilen 1.028 vakaya göre yıllık ortalama insidans oranı 100.000 kişide 2,16’dır. Avrupa nüfusunun 18 yaş ve üstü için yıllık insidans oranı ise 100.000 kişide 2,7’dir. Bu 1.028 vakanın 554’ü erkek, 447’si kadın. Erkek hastalarda sayıca fazlalık söz konusu olmuştur. Yapılan bu çalışma ile Avrupa’da ALS’nin insidansı belirlenmiştir. Bu çalışmada toplanan 1.028 ALS hastası ölümcül nörodejeneratif hastalığın Avrupa’daki epidemiyolojisinin ölçülmesine olanak sağlamıştır. (Logrosino ve ark. 2010).

2.7.2. Ağır Metallerle Maruz Kalma

Kurşun, selenyum, civa, kadmiyum ve demir gibi ağır metallerle maruz kalmanın ALS için bir risk faktörü olarak rolü uzun zamandır araştırılmasına rağmen ve sonuçlar çelişkilidir. Motor nöron dejenerasyonuna yol açan moleküler

mekanizmalara katkıda bulunan çeşitli ağır metallerin potansiyel rolü oldukça araştırılmış ancak kısmen karakterize edilmiştir. (Trojsi ve ark. 2013).

Yeni bir sistematik derleme, metaller ve ALS arasındaki ilişkiyi ele alan 50 çalışmayı analiz etmiş ve bir ilişki öneren sadece üç çalışma bulmuştur. Bir çalışma, selenyuma maruz kalan bireylerde ALS riskinin anlamlı olarak yüksek olduğunu kısmen bildirmiştir. Kurşun, civa, alüminyum, kadmiyum, krom ve manganezin etkisine ilişkin bir başka çalışmada anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. (Sutedja ve ark., 2009).

2.7.3. Viral Enfeksiyonlar

Sürekli viral enfeksiyonlara maruz kalmak sALS'nin nedenleri arasında olabilir diye düşünülerek ALS hastalarının omurilikleri incelenmiş ve hastaların omuriliklerinde enterovirüs RNA'sına rastlanmıştır. (Rowland and Shneider, 2001).

3. MATERYAL VE METOD

Proje kodu TYL-2016-7470 olan bu yüksek lisans tez çalışması Çukurova Üniversitesi Etik Kurulu tarafından (11/10/2016-E.129951) onaylandı ve Çukurova Üniversitesi Kan Merkezi laboratuvarında gerçekleştirildi. Periferik kan örnekleri Balcalı Hastanesi Nöroloji Anabilim Dalı'na başvuran daha önceden ALS tanısı konmuş 18 erkek 18 kadın olmak üzere 36 hastadan alındı. Kan örneklerinin toplanma süreci 12 ay sürdü.

Alınan kan örneklerini toplamak için Disodyum EDTA'lı tüpler kullanıldı. Toplanan örnek tüpleri DNA izolasyonu ve diğer DNA analizleri için Balcalı Hastanesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Kan Merkezinde muhafaza edildi.

3.1. Toplanan Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Kan örneklerinden DNA izole etmek için Roche, Yüksek Saf Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) hazırlama kiti (**Roche, Cat. No. 11 796 828 001**) kullanıldı.

3.1.1. Materyal

Kimyasallar: İzopropanol, Absolut Etanol, Bağlama Tamponu, Proteinaz K, İnhibitör Removal Tampon, Yıkama Tamponu, Elusyon Tamponu ve Saf Su.

3.1.2. Kimyasalların Hazırlanması

1. Proteinaz K 4,5 mL distile su içerisinde dilue edildi.
2. İnhibitor Removal Tampon: Solüsyonu içerisine 20 mL absolute etanol eklendi.
3. Yıkama Tamponu: Solüsyonu içerisine 80 mL absolute etanol eklendi.

3.1.3. DNA İzolasyon Prosedürü

1. Bir ependorf tüp içerisine alınan 200 µL tam kan örneği üzerine 200 µL Bağlanma Tamponu ve 40 µL Proteinaz K eklendi ve örnekler 70°C'de 10 dakika inkübe edildi. Bu işlem sırasında daha sonra kullanmak için Elution Tampon (örnek başına 200 µL) 70°C'de inkübasyona bırakıldı.
2. İnkübasyon sonrası kan örnekleri üzerine 100 µL izopropanol eklenerek karıştırıldı ve örnekler filtrelili tüplere aktarılarak 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
3. Bu santrifüj sonrası filtrelili tüpün alt kısmı yeni bir tüp ile değiştirilerek üzerine 500 µL İnbitör Removal Tampon eklendi ve 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası filtrelili tüpün alt kısmı yeni bir tüp ile değiştirilerek yıkama işlemi için örneklerin üzerine 500 µL Yıkama Tamponu eklendi ve 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Dördüncü aşamada belirtilen yıkama işlemi bir kez daha tekrar edildi. İkinci yıkama işleminden sonra örnekler kalan Yıkama Tamponu uzaklaştırmak için filtrelili tüp değiştirilmeden 13000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Filtrelili tüpün filtrelili kısmı yeni ependorf tüplere yerleştirilerek üzerine 200 µL önceden ısıtılmış Elusyon Tamponu eklenerek 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi ve DNA izolasyon işlemi sonlandırıldı.
7. İzole edilen DNA örnekleri ALS mutasyon analizi yapılmıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.2. SOD1 Sekans Analizi

3.2.1. PCR Analizi

Çalışma öncesi genomik DNA konsantrasyonu ve verimi nanodrop ile ölçülmüş ve yüksek kaliteli genomik DNA'lar (verim:1,7-2,2) belirlenmiştir,

çalışma öncesi tüm örneklerin DNA konsantrasyonları eşit olacak şekilde dilüe edilmiştir. PCR analizinde forward primer olarak 5'-TGCGAGGCGATTGGTTTGGGG-3', revers primer olarak 5'-TCAGCACTTGGGCACCGCAC-3' seçilmiş ve analizde kullanılacak bileşikler ve miktarları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo. 3.1. PCR analizinde kullanılan bileşikler

Bileşikler	Hacim (µL)
2X GML PCR Mix With Gold Tampon	7,5
HotStart Taq DNA Polimeraz (5U/µL)	0,2
G/C Enhancer	2,0
SOD1-EX1-F (5pmol)	1,0
SOD1-EX1-R (5pmol)	1,0
Distile Su	2,0
Toplam	13,5

3.2.2. PCR Protokolü

1. Hotstart Taq DNA polimeraz hariç diğer bileşikler oda sıcaklığında çözülmüştür.
2. Primer Mix ve PCR solüsyonları vortekslenerek, kısa bir santrifüj işlemi ile kapakta kalan kısımların uzaklaştırılması sağlanmıştır.
3. Buz aküsü üzerinde Tablo 3.1 de belirtilen bileşikler kullanılarak örnek miktarına göre Master Mix hazırlanır ve nazikçe vortekslenmiştir.
4. Her bir örnek için PCR tüplerine 13,5 µL Master Mix ve 1,5 µL genomik DNA eklenerek, tüpler vorteklenir ve kısa bir santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir.
5. Tüpler Thermal Cycler cihazına yerleştirilerek amplifikasyon için Tablo 3.2'de belirtilen adımlar gerçekleştirilmiştir.

Tablo. 3.2. PCR Amplifikasyon Basamakları

Basamaklar	Durum	Sıcaklık	Zaman
1	Aktivasyon	95 °C	10 dakika
2	Amplifikasyon 40 döngü	96 °C	30 saniye
		63 °C	1 dakika
		72 °C	40 saniye
3	Uzatma	72 °C	7 dakika
4	Durdurma	4 °C	Durdurma

6. PCR ürünleri 2-6 °C'de PCR Clean-up reaksiyonu için saklanmadan önce %2'lik agaroz jel'de PCR ürünleri yürütülmüştür.

3.2.3. PCR Clean-Up Prosedürü

1. PCR Clean-Up Reaksiyonu için Tablo 3.3'de belirtilen bileşikler kullanılmıştır.

Tablo. 3.3. PCR Clean-Up Reaksiyonu için kullanılan bileşikler

Bileşikler	Hacim (µL)
GML ExoSAP IT Kit	2,0
PCR Ürünü	10,0
Toplam	12,0

2. PCR tüpleri içerisine Tablo 3.3'de belirtilen bileşiklerden pipetlenir, tüpler Thermal Cycler cihazına yerleştirilir ve Tablo 3.4'de belirtilen adımlar gerçekleştirilmiştir.

Tablo. 3.4. PCR Clean Up Basamakları

Basamaklar	Durum	Sıcaklık	Zaman
------------	-------	----------	-------

1	Aktivasyon	37 °C	30 dakika
2	İnaktivasyon	80 °C	15 dakika
3	Durdurma	4 °C	Durdurma

3. Sekans analizi yapılmaya kadar PCR ürünleri -20 °C’de saklanmıştır.

3.2.4. Sekans Analizi

1. Sekans analizinde Tablo 3.5’de belirtilen bileşikler kullanılır.

Tablo. 3.5. Sekans Analizinde Kullanılan Bileşikler

Bileşikler	Hacim (µL)
BigDye Terminator v.3.1	1,5
5X Sequencing Tampon	2,0
Distile Su	3,5
SOD1-EX1-Forward Primer (5pmol)	1,0
Toplam	8,0

2. Tablo 3.5’de belirtilen miktarlarda bileşikler kullanılarak Master Mix hazırlanır.
3. PCR tüpleri içerisine 8 µL Master Mix ve 2 µL Clean-Up PCR ürünü pipetlenerek, tüp vortekslenir ve kısa bir santrifüj işlemi gerçekleştirilir.
4. Tüpler Thermal Cycler cihazına yerleştirilerek Tablo 3.6’da belirtilen basamaklar takip edilerek sekanslama yapılır.

Tablo. 3.6. Sekanslama Basamakları

Basamaklar	Durum	Sıcaklık	Zaman
------------	-------	----------	-------

1	Aktivasyon	96 °C	1 dakika
2	Uzatma 25 döngü	96 °C	10 saniye
		60 °C	4 dakika
3	Durdurma	4 °C	Durdurma

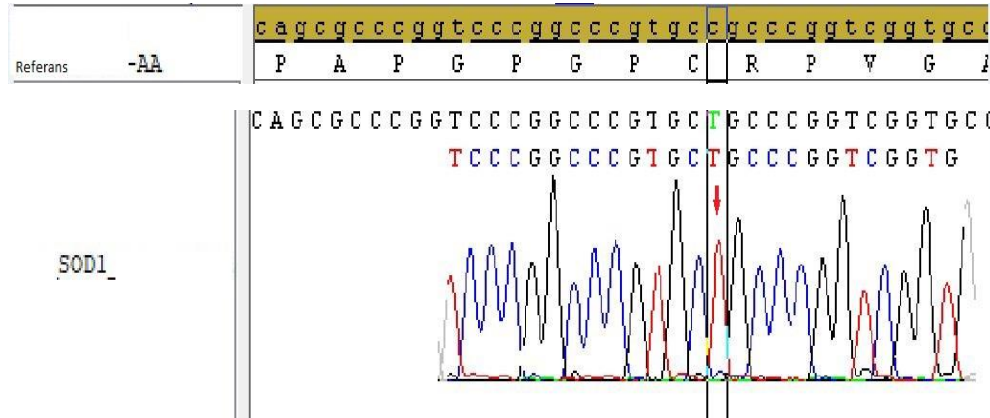
5. Sekans ürünleri Sephadex Column Pürifikasyon metodu ile pürifiye edilir ve Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazında yürütülerek sonuçlar elde edilir.

4. SONUÇLAR

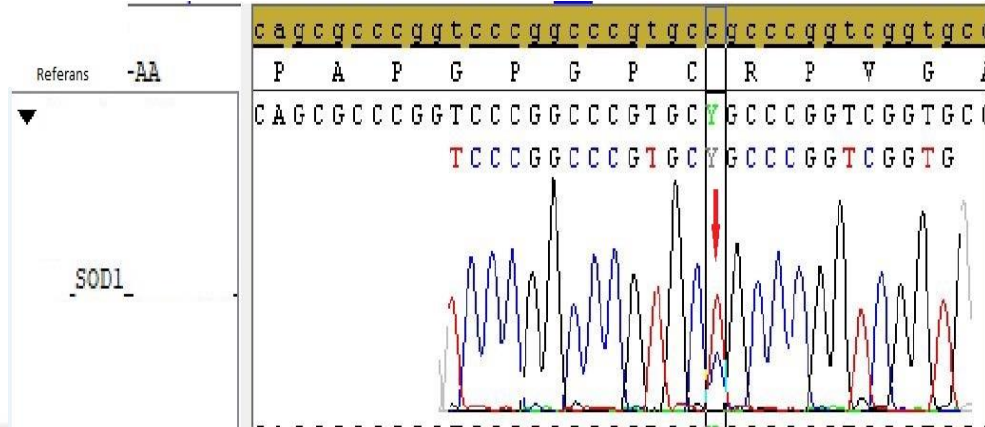
Çalışmamıza Nöroloji Polikliniğine başvuran ve sporadik ALS tanısı konan yaş ortalaması 61±9 olan 18 kadın ile yaş ortalaması 60±6 olan 18 erkek hasta olmak üzere toplamda 36 ALS hastası dahil edilmiştir. Çalışmamızda SOD1 geninin 1. ekzon bölgesinde rs17881180 C.72+133C>T mutasyonu araştırılmış ve mutasyon saptanmamıştır. Buna ek olarak SOD1 geninin 1. intron bölgesinde iki kadın hastada homozigot varyant, iki kadın ve iki erkek hastada ise heterozigot varyantlar bulunmuştur (Tablo 4.1, Şekil 1-4).

Tablo 4.1. ALS tanısı konan kadın ve erkek hastaların SOD1 geninin 1. intron bölgesinde rs17881180 C.72+133C>T varyantı

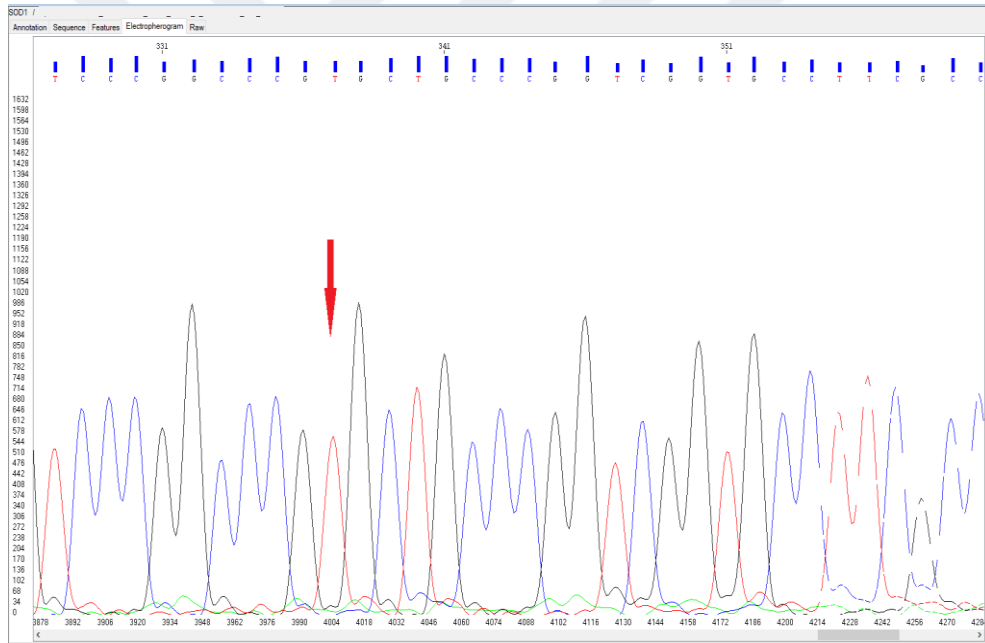
Cinsiyet	rs17881180 C.72+133C>T varyantı		
	Homozigot N/%	Heterozigot N/ %	Mutasyon yok N/%
Erkek (N=18)	-	2/ %11,1	16/ %88,8
Kadın (N=18)	2/ %11,1	2/ %11,1	14/ %77,7
Toplam (N=36)	2/ %5,5	4/ %11,1	30/ %83,3



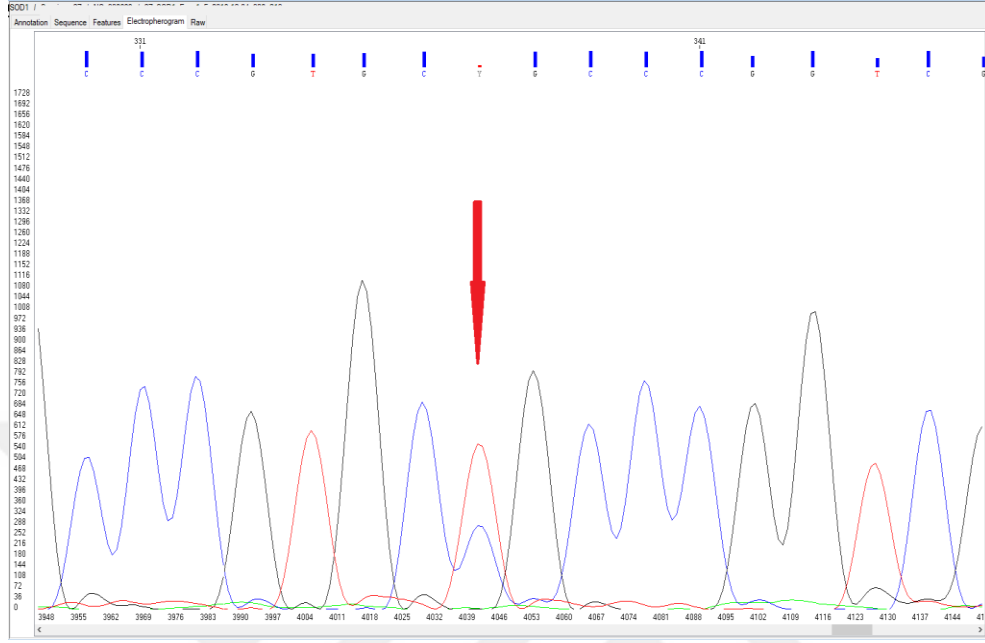
Şekil 4.1. ALS tanısı konan kadın hastaların SOD1 geninin 1. intron bölgesinde rs17881180 C.72+133C>T homozigot varyantı



Şekil 4.2. ALS tanısı konan kadın hastaların SOD1 geninin 1. intron bölgesinde rs17881180 C.72+133C>T heterozigot varyantı.



Şekil 4.3. ALS tanısı konan kadın hastaların SOD1 geninin 1. intron bölgesinde rs17881180 C.72+133C>T homozigot varyantının elektogram görünümü.



Şekil 4.4. ALS tanısı konan kadın hastaların SOD1 geninin 1. intron bölgesinde rs17881180 C.72+133C>T heterozigot varyantının elektrogram görünümü.



5. TARTIŞMA

Amyotrofik lateral skleroz beyin ve spinal kordda motor nöronların dejenerasyonu ile karakterize edilen, yüksek genotipik ve fenotipik değişkenlik gösteren progresif ve parolitik nöromusküler bir hastalıktır. (Brown ve ark., 2017). Hastalığın klinik semptomları güçsüzlük, atrofi ve fasikülasyon gibi alt motor nöron bulgularında spastisite, hiperrefleksi ve patolojik refleksler gibi üst motor nöron bulguları ile karakterizedir. (Wijesekera ve Leigh, 2009). ALS prevalansı tüm dünyada 3-8/100.000 olarak belirlenmiştir. (Kaya ve Özcan, 2017). Günümüzde ALS etiyojisi henüz tam olarak anlaşılmamış olmasına rağmen yapılan çalışmalarda tarım ilaçları, ağır metaller, çözücüler gibi çevresel kirleticilerin yanı sıra diyet türü, sigara kullanımının da hastalığın gelişiminde etkili olabileceği gösterilmiştir (Morozova ve ark., 2008; Yu ve ark., 2014). Son yıllarda ALS’de motor nöron dejenerasyonlarının moleküler mekanizmasının araştırılması hastalığın anlaşılması ve farklı tedavi stratejileri geliştirilmesi nedeniyle önem kazanmıştır. Daha önceki genetik çalışmalarda ALS gelişiminde 20’den fazla genin etkili olabileceği gösterilmiştir. Amyotrofik lateral skleroza neden olan genler arasında SOD1 en fazla mutasyona uğrayan genlerden biridir. SOD1 geni mutasyonları sporadik ALS vakalarının yaklaşık olarak %7’sinden, ailesel ALS vakalarının ise %12-13’ünden sorumlu tutulmaktadır. (Andersen, 2006). Bu gen süperoksidin moleküler oksijen ve hidrojen peroksida inaktivasyonunu katalizleyen antioksidan savunmada rol oynayan Cu/Zn süperoksit dismutaz enzimini kodlamaktadır. (Tripolszki ve ark., 2017). SOD1 geni kromozomun 21. uzun kolunda yer almakta ve 11 kb kromozomal DNA’yı kapsayan her haploid genomu tek kopya halinde bulundurmaktadır. Bu bölgede 153 aminoasidi kodlayan 5 ekzon ve kodlama bölgesini kesen 4 intron bulunmaktadır. Cu/Zn SOD homozigot ve heterozigot mutasyonların süperoksit dismutazın enzimatik aktivitesini %50 oranında azalttığı bilinmektedir. (Radunović ve Leigh, 1996). SOD1 genindeki mutasyon ile oluşan Cu/Zn SOD enzimi anormal formdadır ve çinko bakımından eksiktir. Bu nedenle

enzim süperoksit temizleme görevini bırakarak hücrel antioksidanlardan elektron alarak daha fazla süperoksit oluşumunu indüklemektedir. Artan süperoksit ve süperoksit ile hızlı bir şekilde reaksiyona giren peroksinitrit ise hücrelerde oksidatif stres ve apoptoz gelişimini uyarmaktadır. (Uluç ve ark., 2008). Ayrıca genellikle toksisitenin fonksiyon kazanımı yoluyla ortaya çıktığı ve mutasyona uğrayan SOD1 geninin nöral hücre ölümünü başlatan glial hücre ve motor nöronları etkileyen patofizyolojik süreçlerle bağlantılı kaskad oluşumunu arttırdığı ile ilgili kanıtlarda daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. (Allen ve ark., 2014).

Süperoksit dismutaz 1 gen mutasyon sıklığı coğrafik bölgelere göre değişkenlik göstermekte ve bu oran İskandinav ülkelerinde %23.5, Amerika'da %23.4, Fransa'da %14.3 ve ülkemizde ise %12.2 olarak bildirilmektedir. (Bülbül ve ark., 2018). Çalışmamızda SOD1 geninin 1. ekzon bölgesinde rs17881180 C.72+133C>T mutasyonu 36 ALS hastasında saptanmamıştır. Fakat SOD1 geninin 1. intron bölgesinde C.72+133C>T 70 ve 72 yaşlarında iki kadın hastada homozigot varyant, 65 ve 40 yaşlarında iki kadın ile 59 yaşında iki erkek hastada ise heterozigot varyant bulunmuştur. Önceki çalışmalarda ALS hastalığına yakalanma yaşının genellikle 50-65 yaş aralığında olduğu, fakat vakaların sadece %5'inin 30'lu yaşlarda da başlayabileceği bildirilmiştir. (Logroschino ve ark., 2010). Çalışmamızda da SOD1 varyantı saptanan ve ALS tanısı alan hastaların %13,8'i >50 yaşından büyük iken %2,7'si <50 yaşından küçük olarak belirlenmiştir.

Türk populasyonunda ALS ile ilgili genetik faktörlerin araştırılması ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Amyotrofik Lateral Skleroz Online Genetik Veritabanı (ALSoD) verilerine göre Türk populasyonunda ALS ile ilişkili major genlerin mutasyon sıklığı C9orf72 için %28,30, SOD1 için %4,8, FUS için %4,60 TARDBP için %4,63 ve UBQLN2 için %4,4 olarak bildirilmiştir. (Wroe ve ark., 2008). Ozoguz ve ark., (2015) tarafından Türk populasyonunda yapılan bir çalışmada 116 ailesel ALS vakasında C9orf72, SOD1, FUS, TARDBP ve UBQLN2 gen mutasyon sıklığı sırasıyla %18,8, %12,2, %5, %3,7 ve %2,4 olarak, 361 sporadik ALS vakasında ise C9orf72 ve UBQLN2 genlerinin mutasyon sıklığı %3,1

ve %0,6 olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmanın sporadik ALS vakalarında SOD1 gen mutasyonuna rastlanmamıştır. Bizim çalışmamıza benzer olarak Vildan ve ark. (2019) tarafından Türk popülasyonunda yapılan diğer bir çalışmada ise altı ailesel ALS ve iki sporadik ALS vakasında SOD1 geninin 1. intron bölgesinde C.72+133C>T varyantı %26,6 oranında saptanmıştır. Aynı çalışmada ailesel ALS vakalarında saptanan SOD1 C.72+133C>T iki hastada heterozigot, sporadik ALS vakalarında ise bir tanesi heterozigot, altı tanesi homozigot varyant belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda SOD1 C.72+133C>T varyantı tüm vakalarda %16,6 oranında bulunmuştur. Çalışmamız Vildan ve ark., (2019) tarafından bildirilen SOD1 C.72+133C>T varyant sıklığı oranıyla uyumluluk göstermekte ve Avrupa'daki SOD1 C.72+133C>T varyant sıklığı (%6) göz önüne alındığında Türk popülasyonunda bu oranın daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır.(Vildan ve ark., 2019). Türkiye zengin tarihi geçmişi ve Avrupa'nın güneydoğu sınırındaki coğrafyası ile Asya ve Avrupa arasında köprü oluşturmaktadır. Akdeniz'i çevreleyen geniş kıyı bölgeleri ile Karadeniz ve Yakın Doğu ülkelerini çevreyelen kırsallarının kazandırdığı mevcut jeopolitik konum Türkiye'ye de yüksek etnik heterojenlik ve zengin bir genetik havuzun oluşmasına katkı sağlamıştır. Avrupa popülasyonlarında görülen genetik heterojenite farklı coğrafik bölgelerdeki genetik yapının değişkenliğinin bir sonucu olabilir. (Novembre ve ark., 2008). Fakat Türkiye'deki ALS epidemiyolojisi her ne kadar diğer Kafkas ülkeleri ile örtüşse de hastalığın moleküler ve klinik terimleri göz önüne alındığında ülkemizde ALS'nin daha karmaşık ve kompleks olduğu anlaşılabilir. Geleneksel yöntemlerle tedavi edilemeyen ailesel ALS vakalarının >60'dan fazlasında allel ve lokus heterojenliğinin görülmesi, geniş ailelerde aile içi ve aileler arası fenotipik heterojenitenin ortaya çıkması, mutasyonların değişken penetrasyon hızı, yeni mutasyonların varlığı ve ALS hastalığının çoğunlukla ülkemizde erken yaşlarda başlaması Türkiye'de ALS hastalığının araştırılması ve teşhisini zorlaştırmaktadır. Fakat bunun yanı sıra bu durum bir avantaj olarak kişiye özel genetik tedavilerin geliştirilmesi için fırsat da sunmaktadır.

Sonuç olarak, çalışmamızda SOD1 geninin 1. ekzon bölgesinde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Bunun nedeni çalışmamızdaki vaka sayısının az olması ya da sporadik ALS vakalarında SOD1 geninin 1. ekzon bölgesinde mutasyon görülme sıklığının düşük olması olabilir. Diğer taraftan çalışmamızda altı hastada belirlenen intronik varyantların ise ALS hastalığının moleküler mekanizmasının anlaşılmasında tek başına bilgilendirici olmadığı düşünülmektedir. Bu nedenle daha sonraki çalışmalarda daha fazla vaka ve hastalıkla ilişkili daha fazla gen mutasyonunun birlikte araştırılması hastalığın genetik resminin tam olarak çizilmesi ve Türk popülasyonundaki ALS hastalığının moleküler mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesine katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR

- Akdoğan M., Yöntem M., 2018. Sitokinler. Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi. Cilt 3, Sayı 1, 36-45.
- Akkuş İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya, 1. Baskı, 17.
- Andersen P.M., 2006. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 6, 37-46.
- Aydemir B., Karadağ Sarı E., 2009. Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile İlişkisi. *Kocatepe Veteriner Dergisi*. 2 (2): 56-60.
- Aydın F., Ulusoy Ş., Mocan Z., Mocan H., Uzun Y., 1992. Eser Element Olarak Bakır ve İlgili Klinik Durumlar. *SSK Tepecik Hast. Derg.* 2 (3) : 260-4.
- Bal C., Büyükşekerci M., Ercan M., Hocaoğlu A., Çelik H.T., Abuşoğlu S., Tutkun E., Yılmaz Ö.H., 2015. Farklı selenyum seviyelerinin tiroid hormon sentezi üzerine etkisi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 72(4): 311-316
- Berköz M., Yalın S., Güler G. V., Yalçın A., 2008. Akut Lösemilerde Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzim Aktivitesi. *Erciyes Tıp Dergisi (ErciyesMedical Journal)*, 30(3):157-162.
- Bowling A.C., Schulz J.B., Brown R.H. Jr., Beal M.F., 1993. Superoxide dismutase activity: oxidative damage and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. 61: 2322-2325.
- Boylan K., 2016. Familial ALS. *Neurol Clin*. 33(4): 807–830.
- Brown R.H., Phil D., Al-Chalabi A., 2017. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Eng J Med*, 377, 162-172.
- Bülbül N.G., Seçil Y., Başak N., Beckmann Y., Türe H.S., Tunca C., Özoğuz A., 2018. SOD1 (L144F) ve C9ORF72 gen mutasyonları saptanan iki aile ve amyotrofik lateral skleroza genel bakış. *Turk J Neurol*, 24, 159-164.

- Büyükuslu N., Yiğitbaşı T., 2015. Reaktif Oksijen Türleri ve Obezitede Oksidatif Stres. Journal of Marmara University Institute of Health Sciences Volume: 5, Number: 3.
- Cheeseman K.H., Slater T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull., 49 (3): 481-93.
- Çiftçi V., Darbaş Ş., Bilgen T., Uysal H., Karüzüm Berker S., 2019. Genetic alterations of C9orf72, SOD1, TARDBP, FUS, and UBQLN2 genes in patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. Cogent Medicine. 6: 1582400.
- Delibaş N., Özcankaya R., 1995. Serbest Radikaller. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 2 (3): 11-17.
- Deng H.X., Hentati A., Tainer J.A., Iqbal Z., Cayabyab A., Hung W-Y., Getzoff E.D., Hu P., Herfeldt B., Roos R.P., Warner C., Deng G., Soriano E., Smyth C., Parge H.E., Ahmed A., Roses A.D., Hallewell R.A., Pericak-Vance M.A., Siddique T., 1993. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in CuZn superoxide dismutase. Science. 261:1047-1051.
- Domaç F.M., Mısırlı H., Koçer A., 2010. Serum Ürik Asit Düzeylerinin Hemorajik İnmedeki Rolü. Türk Serebrovasküler Hastalıklar Dergisi. 16:1; 17-22.
- Fridovich I., 1983. Superoxide Radical: An Endogenous Toxicant. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 23: 239-257.
- Hand, C.K., Rooleau, G.A. 2002. Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. John Wiley & Sons, Inc. Muscle Nerve 25: 135-159.
- Jenkins R.R., Tengı J., 1981. Catalase Activity in Sceletal Muscle of Varying Fiber Types. Experimentia, 37: 67-68.
- Karabulut H., Gülay M.Ş., 2016. Antioksidanlar. MAE Vet. Fak. Dergisi, 1(1): 65-76.
- Karabulut H., Gülay M.Ş., 2016. Free Radicals. MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg., 4(1): 50-59.
- Karlıkaya G., Hays P.A., 2005. Amyotrofik Lateral Skleroz Nöropatolojik Bir Çalışma. Türk Nöroloji Dergisi. Cilt 11, Sayı 1, 54-62.

- Kasnak C., Palamutoğlu R., 2015. Doğal Antioksidanların Sınıflandırılması ve İnsan Sağlığına Etkileri. *Türk Tarım –Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 3(5): 226-234.
- Kaya A., Özcan F., 2017. Communication with the patients of amyotrophic lateral sclerosis and current technology. *TJTTP*, 8,2.
- Koca N., Karadeniz F., 2003. Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliđi Dergisi*. Sayı: 16, 32-37.
- Koç F., Balal M., Demir T., Alparslan Z.N., Sarıca Y., 2016. Adaptation to Turkish and Reliability Study of the Revised Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale (ALSFRS-R). *Arch Neuropsychiatry*. 53: 229-233.
- Logroscino G., Traynor B.J., Hardiman O., Chio A., Mitchell D., Swingler R.J., Millul A., Benn E., Beghi E., 2010. Incidence of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 81(4): 385–390.
- Logroscino G., Traynor B.J., Hardiman O., Chió A., Mitchell D., Swingler R.J., Millul A., Benn E., Beghi E., 2010. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 81, 385-390.
- Mehta P., Kaye W., Raymond J., Wu R., Larson T., Punjani R., Heller1 D., Cohen J., Peters T., Muravov O., Horton K., 2018. Prevalence of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, Vol.67, No.7.
- Morozova N., Weisskopf M.G., McCullough M.L., Munger K.L., Calle E.E., Thun M.J., Ascherio A., 2008. Diet and amyotrophic lateral sclerosis. *Epidemiology*, 19, 324-337.
- Moure A., Cruz J.M., Franco D., 2001. Antioxidants From Residual Sources. *Food Chem*, 72 :145-171.
- Novembre, J., Johnson, T., Bryc, K., Kutalik Z., Boyko A.R., Auton A., Indap A., King K.S., Bergmann S., Nelson M.R., Stephens M., Bustamante C.D., 2008. Genes mirror geography within Europe. *Nature* 456, 98e101.

- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K., 1979. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry*. 95(2):351-8.
- Ozoguz A., Uyan O., Birdal G., Iskender C., Kartal E., Lahut S., Başak, A.N., 2015. The distinct genetic pattern of ALS in Turkey and novel mutations. *Neurobiology of Aging*, 36, 1764 e1769– 1764 e1718.
- Özgürtaş T., Aydın İ., Atay A.A., Yavuz İ., Nevruz O., Erbil M.K., 2008. Yüksek Serum Ferritin Düzeylerinin Etiyolojik Spektrumu. *Türk Biyokimya Dergisi*. 33 (4) ; 223–225.
- Petrucci L., Belzil V.V., Katzman R.B., 2016. *Acta Neuropathol*. 132(4): 487–502.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X., 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*.362 :59–62.
- Rowland, L.P., Shneider, N.A., 2001. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med*, Vol.344, No.22.
- Siems W.G., Van Kuijk E.J., Maas R., 1994. Uric acid and glutathion levels during short term whole body cold exposure. *Free Rad. Biol. Med.*, 16(3): 299-305.
- Sies H., Stahl W., Sundquist A.R., 1992. Antioxidant functions of vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann. NY. Acad. Sci.* 30: 7-20.
- Sutedja N.A., Veldink J.H., Fischer K., 2009. Exposure to chemicals and metals and risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*. 10:302-309.
- Talbott E.O., Malek A.M., Lacomis D., 2016. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Handbook of Clinical Neurology*. Vol.138, No.225.
- Tripolszki K., Csányi B., Nagy D., Ratti A., Tiloca C., Silani V., Kereszty E., Török N., Vécsei L., Engelhardt J.I., Klivényi P., Nagy N., Széll M., 2017. Genetic analysis of the SOD1 and C9ORF72 genes in Hungarian patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*, Volume 53 Pages 195.e1-195.e5.

- Trojci F., Monsurrò M.R., Tedeschi G., 2013. Exposure to environmental toxicants and pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. State of the art and research perspectives. *Int J Mol Sci.* 14:15286-15311.
- Uluç K., İşak B., Tanrıdağ T., Us Ö., 2008. ALS patofizyolojisi: neyi, ne kadar biliyoruz?. *Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 21, 102-111.
- Ünalı Özmen S., Özarda Y., 2014. Amyotrofik Lateral Skleroz Hastalığında Biyobelirteçler. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi.* 12(3): 137-146.
- Wijesekera L.C., Leigh P.N., 2009. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis*, 4, 3.
- Yazıcı C., Köse K., 2004. Melatonin: Karanlığın Antioksidan Gücü. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi.* 13: 56-65.
- Wroe R., Wai-Ling Butler A., Andersen P. M., Powell J. F., Al-Chalabi A., 2008. ALSOD: The amyotrophic lateral sclerosis online database. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 9, 249–250.
- Yu Y., Hayashi S., Cai X., Fang C., Shi W., Tsutsi H., Sheng J., 2014. Pu-erh tea extract induces the degradation of FET family proteins involved in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biomed Res Int*, Volume 2014, Article ID 254680, 12 pages.
- Özcan F., Kaya A., Yayla M.E., 2016. Amyotrofik Lateral Skleroz Hastalığı ve Aile Hekiminin Rolü. *CBU-SBED.* 3(2):431-435.

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Adana'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Adana'da okudum. Lise öğrenimimi Tarsus Ayhan Bozpınar Anadolu Lisesi'nde 2010 yılında tamamladım. 2010-2014 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Fen – Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimi aldım. 2015 yılında ise Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım.

