

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı

**ALZHEİMER HASTALIĞI GELİŞİMİNDE MANGAN
SUPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD2) Ala9Val ENZİM GEN
POLİMORFİZMLERİNİN VE AKTİVİTESİNİN ETKİSİ.**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Esat KILIÇ

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Ahmet Var

MANİSA, 2009

ÖNSÖZ

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm uzmanlık eğitimim süresince verdikleri destek ve katkılarından dolayı başta Anabilim Dalı Başkanım Prof. Dr. Zeki ARI'ya, tez danışmanım ve bu çalışmamdaki en büyük destekçim Doç. Dr. Ahmet VAR'a değerli hocalarımdan Doç. Dr. Cevval ULMAN'a Doç. Dr. Ece ONUR'a, , Doç. Dr. Fatma TANELİ'ye,

Yardımlarından dolayı Nöroloji Anabilim Dalı öğr. üyesi Prof.Dr. Hatice Mavioğlu'na ve Dr. Melek Karaçam'a,

Dört yıl boyunca çalışmalarımızı uyumlu bir şekilde yürüttüğümüz, iyi ve kötü zamanlarda birbirimize destek olduğumuz; Yard.Doç.Dr. Yeşim Gönenç'e, Dr. Mustafa ALTAŞ'a, Dr. Özlem GÜNAY'a, Dr. Nesrin ÖZLEN'e, Dr. Derya GÜLEÇ'e, Dr. Gürol Şahin ULUTAŞ'a, Dr. Ferda DOĞAN BOZYİĞİT'e, Dr. Nurser ARİFOĞLU'na, Dr. Mehmet ÇALKAN'a, Dr. Ferhunde PULULAR'a, Dr. Soner ERDİN'e, Dr.Aysun BİLGİ'ye, Dr. Turgut AKTAŞ'a , Dr. Sezen IRMAK'a,

Beraber Çalıştığım tüm teknisyen arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen sevgili anneme, babama ve kardeşlerime,

Her zaman anlayış ve sevgi ile beni destekleyen sevgili eşim Hatice'ye ve canım kızlarım Zeynep ve Betül'e,

TEŞEKKÜR EDİYORUM.

Dr. Esat Kılıç, Manisa 2009

KISALTMALAR

AB	: β amiloid peptid
AH	: Alzheimer hastalığı
AIDS	: Acquired immune deficiency syndrome and Prevention of Dementia Group
ApoE	: Apolipoprotein E
APP	: Amiloid prekürsör proteini
BD	: Bipolar hastalık Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı)
cGST	: Sitoplazmik Glutasyon-S Transferaz
CI	: Confidence Interval (Güven Aralığı)
Cu-ZnSOD	: Bakır-çinko SOD
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
DSM-IV	: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Mental
EC-SOD	: Ekstrasellüler SOD
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EURODEM	: European Community Concerted Action on the Epidemiology
Fe-SOD	: Demir SOD
GSH	: Glutasyon (redükte)
GST	: Glutasyon-S Transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HKB	: Hafif Kognitif Bozukluk istatistik Paketi)
MDD	: Major depresif bozukluk
MMDM	: Mini mental durum muayenesi
MnSOD	: Mangan süperoksit dismutaz
NBT	: Nitrobluetetrazolium
OR	: Odds Ratio (Olasılık Oranı)
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PHF	: Paired helical filamentleri

PS-1	: Presenilin 1
PS-2	: Presenilin 2
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SPSS	: Statistical package for social science (Sosyal bilimler için)
TD	: Tardif diskinezi
Tm	: Melting Temperature
TNF- α	: Tümör nekroz faktörü α

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ	I
KISALTMALAR	II
İÇİNDEKİLER	IV
I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
II.1. ALZHEİMER HASTALIĞI	3
II.1.1. Alzheimer Hastalığı Tanımı	3
II.1.2. Tarihçe	3
II.1.3. Epidemiyoloji	4
II.1.4. Etiyoloji	5
II.1.5. Genetik	6
II.1.6. Nöropatoloji	9
II.1.7. Klinik	10
II.2. SERBEST RADİKALLER	21
II.2.1. Serbest Radikaller	21
II.2.2. Beyinde Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşum Mekanizmaları	24
II.2.3. Beyinde Antioksidan Savunma Sistemleri	24
II.2.4. MnSOD	26
III. GEREÇ VE YÖNTEM	33
III.1. Araç ve Gereçler	33
III.2. Yöntem	33
III.2.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	33
III.2.2. Eritrositler İçin Deney Öncesi Yapılan İşlemler	34
III.2.3. SOD Aktivite Tayini	35
III.2.4. DNA İzolasyonu	37
III.2.6. PCR	38

III.3. İstatistiksel Analiz	42
IV. BULGULAR	43
V. TARTIŞMA	46
VI. SONUÇ VE ÖNERİLER	52
VII. ÖZET	53
VIII. İNGİLİZCE ÖZET	54
IX. KAYNAKLAR	55

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer, beyin hücrelerinin üzerinde patolojik bir protein birikiminin görüldüğü, hafıza kaybı, kişilik ve davranış değişiklikleri, düşünme ve yorumlamada bozulma, konuşurken doğru kelimeleri bulmada güçlük çekme, bazı işleri doğru sırayla yapmada zorlanma gibi semptomlarla ilerleyen ve kesin nedeni henüz ortaya konulamamış nörolojik bir hastalıktır (1). Alzheimer hastalığı (AH) en yaygın olarak görülen demans nedenidir. Yaşla birlikte ilerleyen ve basit gündelik işlerin bile yerine getirilmesinde sorunlar yaratan unutkanlık AH'nın habercisi olabilir. Önceleri sinsi başlayan basit unutkanlıklar, yıllar içinde günlük işleri yapmayı engelleyecek düzeye ulaşır; ileri evrelerde ise zihinsel ve bedensel işlevler iyice bozularak, hastayı tamamen bakıma ve yatağa bağımlı hale düşürür. Beyindeki bazı sinir hücrelerinin yavaş yavaş işlevini kaybetmesi sonucu çeşitli zihinsel bozukluklarla ortaya çıktığı artık iyi bilinen Alzheimer hastalığı ender bir hastalık değildir ve yaşlılarda en sık karşılaşılan 4. hastalık olarak bilinir. Bununla birlikte yaşla birlikte artar ve ilerleyici ve geri dönüşsüz özelliğe sahiptir. Alzheimer hastalığı kadınlarda erkeklerdekine göre daha yaygındır. Avrupa'daki rakamlar 65 yaş veya üstü kişilerin yaklaşık %5'inde Alzheimer hastalığı bulunduğunu düşündürmektedir. Bu rakam 85 yaş ve üstü grupta %20'ye çıkar. Bütün dünyada 18 milyon kişide demans bulunduğu tahmin edilmektedir ve 2020 yılında bu rakamın 34 milyona çıkmış olacağı öngörülmektedir. Alzheimer hastalığı medikal, sosyal ve ekonomik bir problemdir ve halen ABD'de ölüm nedenleri arasında dördüncü sıradadır. Yılda 100.000.000.000 \$ tedavi gideri ve 33.000.000 \$ işgücü kaybı ile oldukça pahalı bir hastalıktır. Hastalığın erken dönemde farkedilmesi ve ciddiye alınarak gerekli tıbbi desteğin sağlanması, bu durumla mücadelede önemli bir adım olarak belirtilmektedir.

Süperoksit dismutaz enzimi (SOD), Süperoksit radikallerini direkt olarak hidrojen peroksite ve moleküler oksijene çevirmektedir. Bunlardan

mitokondrial izoenzim olan MnSOD (SOD2), indüklenebilir olma özelliğinden dolayı ayrı bir öneme sahiptir.

Çalışmamızın amacı AH'nın gelişiminde mitokondrial antioksidan enzim olan MnSOD enziminin gen polimorfizminin ve aktivitesinin etkisini araştırmak ve hastalığın patofizyolojisine moleküler düzeyde katkı yapmaktır. Şu ana kadar yapılan çalışmalarda oksidan/antioksidan denge suçlanmış fakat antioksidan enzimlere ait farklı kodlamalar çalışılmamıştır. Bu farklı polimorfik yapılar enzim aktiviteleri ile ilişkili olabilir. Alzheimer hastalığına moleküler yaklaşım daha çok Apo E üzerinden yapılmış ve bazı çalışmalarda ApoE4 alleli suçlanmıştır. Bizim çalışmamız moleküler bakış açısını antioksidan enzimler üzerine yoğunlaştırarak patofizyolojisini farklı bir pencereden açıklamaya katkıda bulunacaktır.

Günümüzde gen polimorfizmleri üzerine çok sayıda çalışma olmakla beraber Alzheimer hastalığı ile antioksidan enzim olan SOD aktivitesi ve bu enzime ait gen polimorfizmleri üzerine yapılan çalışmalara ait kaynaklar, yapılan taramalarda nadirdir. Günümüzde hastalığın moleküler düzeyde etiyolojisinin tam olarak bilinmemesi nedeniyle hastalık önceden öngörülememekte, ancak belirtiler ortaya çıktıktan sonra tespit edilebilmekte ve tedavi edilmeye çalışılmaktadır. Bu çalışmamızda amaç enzim polimorfizmi ve enzim aktivitesi ile AH arasında ilişki bulmak ve bu bilgiler ışığında insanlarda AH gelişme riskini hastalık gelişmeden önce tespit edilebilmeyi sağlamaktır. Hastalık belirtileri henüz başlamadan önce yapılacak girişimler ve alınacak önlemler ülke ekonomisine ve en önemlisi alınacak önlemlerle kişinin daha kaliteli yaşamasına katkıda bulunacaktır.

II.GENEL BİLGİLER

II.1. ALZHEİMER HASTALIĞI (AH):

II.1.1. Alzheimer Hastalığı Tanımı:

Alzheimer hastalığı bilişsel işlevlerde bozulma, günlük yaşam aktivitelerinde azalma, davranışsal ve psikolojik bozukluklarla sonuçlanan ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Geri dönüşü olmayan ve ilerleyici bilişsel yıkımın yol açtığı klinikle, hastanın ve hasta yakınlarının uyumu ve idame edilmesi oldukça güçtür (1).

65 yaş üstü hastalarda demansın en önemli üç nedeni; AH (yaklaşık %60), vasküler demans (%15) ve vasküler demans-AH bir arada bulunması (%10). Lewy cisimcikli demans, Pick hastalığı, fronto-temporal demanslar, normal basınçlı hidrosefali, alkolik demans, enfeksiyon hastalıkları (HIV, sifiliz) ve Parkinson hastalığına bağlı demans gibi hastalıklar diğer demans sebeplerinin %10'unu oluşturur. Demans kliniği gözlenen hastaların yaklaşık yüzde %5'inde demans tablosu metabolik anomaliler (ör: hipotirodizm), beslenme bozuklukları (ör: vitamin B12 eksikliği, folat eksikliği) veya depresyon gibi geri dönebilen sebeplere bağlıdır (2).

II.1.2. Tarihçe:

Dr. Alois Alzheimer'ın 1907'de ilk olgusu 51 yaşındaki Auguste D.'yi yayınlamasından sonra hastalığa "Alzheimer" adını klinik şefi Dr. Emil Kraepelin vermiştir. Alzheimer'ın bu ilk olgusunda hastanın kocası ile ilgili aşırı kıskançlık hezeyanları bulunmaktaydı. Daha sonra bellek başta olmak üzere yüksek beyin fonksiyonlarında bozukluk saptanmıştı. 4,5 yıl yaşayan bu olgunun otopsisinde beyinde günümüzde tanımlanan değişiklikler görüldü (3).

II.1.3. Epidemiyoloji :

Batı Avrupa ve Birleşik Amerika'da yapılan çalışmalarda demansların %50-70'inin AH olmasına karşılık, Japonya ve Rusya'da multi infarkt demansların daha fazla olduğu bildirilmiştir (4,8). Türkiye'de ise hastalığın sıklığı, bu alanda henüz epidemiyolojik bir çalışma yapılmadığı için bilinmemektedir.

Alzheimer hastalığı ile ilgili değişik ülkelerde birçok yapılmış epidemiyolojik çalışma vardır. Çalışmalarda AH prevalansı %3,6 ile %23 arasında değişmektedir. Hastalığın 65 yaşından sonra prevalansı yaşla beraber belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir. European Community Concerted Action on the Epidemiology and Prevention of Dementia Group (EURODEM) projesi standardize tanı kriterleri ve epidemiyolojik yöntemler kullanarak, çeşitli Avrupa ülkelerinden elde ettikleri değerleri bir havuzda toplayarak tablo 1'de gösterilen genel AH'ndaki prevalans sonuçlarını vermiştir (11).

Tablo 1. EURODERM'e göre Alzheimer hastalığı prevalans oranları

Yaş dağılımı	%
30-59	0.02
60-69	0.3
70-79	3.2
80-89	10.8

II.1.4. Etiyoloji:

Alzheimer Hastalığının gelişiminde ortaya konan kesin risk faktörleri yaş, aile öyküsü ve kişinin Apolipoprotein E (ApoE) s4 aleline sahip olmasıdır (4,5). Bunlardan en önemli risk faktörü yaş olup hastalığın prevalansı 65-85 yaşları arasında her beş senede bir iki katına çıkmaktadır. Aile öyküsünde özellikle birinci derecede akrabaların etkilenmesi durumunda risk dört kat artmaktadır (6). Kolesterol transportunda görevli bir protein olan ApoE'nin E4 aleli; normal beyaz popülasyonda %16, AH'larında ise %35-50 sıklıkta bulunması nedeniyle hastalığın majör faktörlerindendir (7,8).

Alzheimer hastalığı patogenezinde genetik dışında çeşitli risk faktörleri vardır:

- Yaş: En güçlü kanıt ilerlemiş yaş için mevcuttur. Hastalığın görülme sıklığı 60 yaşından önce nadirken, 85 yaş ve üzerindeki yaşlarda yaklaşık %20-50'ye yükselir. Alzheimer hastalığı riski her 5 yılda bir; 65 yaşından sonra 1.5 kat, 75 yaşından sonra 3 kat ve 85 yaşından sonra 5 kat artar (20).
- Cinsiyet: Hastalığın kadınlarda erkeklerden daha fazla olduğu bilinmektedir. ,85 yaş ve üstü grupta kadınlarda AH insidansı erkeklere oranla belirgin yüksek bulunmuştur (22). Genel olarak kabul gören kadın erkek oranı 2/1'dir (20) .
- Ailede demans öyküsü olması: AH olan bireyin çocukları, kardeşleri, hastalıktan etkilenmiş bir yakını olmayan birine göre 3–4 kat daha fazla etkilenir (23).
- Düşük eğitim düzeyi: AH insidansı düşük eğitim seviyesi olanlarda daha yüksek eğitim seviyesinde olanlardan 1,5 kat fazla bulunmuştur (21,24).
- Uzun süreli alkol kullanımı (25,26).
- Kardiyovasküler hastalık ve risk faktörleri (27,28,29).
- Down sendromu: Erişkin yaşlara kadar yaşayabilenlerde, genetik bozukluğa bağlı olarak AH gelişim riski yüksektir. Down sendromu olanların %90'ında

30 yaşında iken amiloid plaklar, nörofibriler yumaklar ve kolinerjik eksiklikler vardır (23).

Tablo 2’de risk faktörleri verilmiştir (12). Ayrıca erken dönemde menapoza girip, östrojen alan kadınların AH’lığı açısından düşük risk taşıdığı bilinmektedir. Non-steroid antiinflatuar bileşiklerin AH’nın gelişme riskini azalttığından söz edilmektedir (10,12). Bazı çalışmalarda ileri anne yaşı ve depresyon öyküsünün de AH risk faktörleri arasında olduğu belirtilse de tartışmalıdır (4,9).

Tablo 2. Alzheimer hastalığında Olası Risk Faktörleri

Yaş	Atrial fibrilasyon
ApoE4 allel	Diabet
Kadın cinsiyeti	Beyinde ak madde lezyonları
Kafa travması	Hipotiroidizm
Düşük eğitim düzeyi	Sık sık uzun süreli genel anestezi
Erken histerektomi	Alkol alışkanlığı
Hipertansiyon	Myokard infarktüsü

II.1.5. Genetik:

Alzheimer hastalığı genetik olarak karmaşık ve heterojen bir gruptur. Alzheimer hastalığında genetik faktörler, büyük oranda hastalığın gelişimi için çevresel faktörlere bir yatkınlık zemini oluşturmaktadır. Monozigot ikizlerde yapılan çalışmalara göre, ikizlerin birinde AH belirtileri görüldüğünde, diğer ikizde hastalığın görülme olasılığı yaklaşık %40’tır. Ancak diğer ikizde AH’nın başlaması daha uzun bir dönemden sonra olur. Bu ve buna benzer

çalışmalar AH'nda hem çevresel hem de genetik faktörlerin rol oynadığını gösterir (13).

Şimdiye kadar otozomal dominant geçişten sorumlu olan 3 ayrı gen bulunmuştur: APP geni (21. kromozom), presenilin 1 (PS-1) geni (14. kromozom) ve presenilin 2 (PS-2) geni (1. kromozom). Bu genlerin kodladığı 3 protein de normal işlevleri çok iyi bilinmeyen, nöronal plastisitede rol oynadıkları ileri sürülen transmembran proteinlerdir (14,16).

Alzheimer hastalığı %5 oranında da daha genç bireylerde (40-60 yaş arası) görülebilir. Bu kişilerin çoğunda belirgin bir aile öyküsü vardır ve bilinen bir genetik mutasyon bulunabilir(15). Kromozom 14'teki PS-1, kromozom 1'deki PS-2 ve kromozom 21'deki amiloid-b protein prekürsörü gibi 3 gen defektinin ailelerde erken başlangıçlı AH'na neden olduğu bilinir (14, 16,17).

Erken başlangıçlı AH (40-50 yaş) ile ilgili en sık mutasyon,%50 oranında kromozom 14'de PS-1 geninde bulunmuştur. Kromozom 1'deki PS-2 genindeki homolog proteindeki mutasyon birkaç ailede bulunmuştur (46).

Amiloid prekürsör protein (APP) ile ilgili gen 21 no'lu kromozomun uzun kolundadır. Değişim süreci boyunca 4 değişik APP'i vardır. Senil plakların temel yapısını oluşturan R/A4 proteini APP'in parçalanması sonucu ortaya çıkan bir 42-aminoasit peptiddir. Down sendromunda (trizomi 21) APP geninin üç kopyası vardır ve hastalıkta bu proteinin kodon-717'de mutasyona uğraması sonucu B/A4 proteininin aşırı birikmesi oluşur. Anormal APP'inin gelişmesinin AH'nın birincil nitelikteki nedeni olup olmadığı bilinmemektedir (18).

Geç başlangıçlı AH ile ilişkili olduğu kesin olarak kanıtlanmış tek gen 19 kromozomda kodlanan, kolestrol taşıyan bir enzim olan ApoE'nin E4 (Apo-E4) alelidir (15-16). Apo E'nin AH'ndaki önemi, AH'nı karakterize eden senil plaklar ve nörofibriler yumaklarda da bulunmasıdır. Apo E beyinde lipaz aktivitesini bozarsa maruz kalan beyin bölgelerinde kolesterol ve lipit transportunu değiştirebilir. Defektif reinnervasyon ve yetersiz sinaptik plastisite oluşur. Alzheimer hastalığında neokorteks incelendiğinde

presinaptik terminal dansitede %45 azalma ve frontal, temporal bölgelerde kortekste önemli ölçüde sinaptik kayıp ortaya konmuştur. Siyah ırk için Apo-E4 allel sıklığı %30 olarak bildirilmiştir. Apo-E4 allelinin normal yaşlı erkeklerde bilişsel fonksiyonlarda azalma ile birlikte olduğu ileri sürülmüştür. Apo E-4 allel sıklığı normal popülasyon için %20 iken, AH için %40'tır (19).

Hastaların %95'inden fazlasında hastalık otozomal dominant geçiş göstermez. Ancak bu hastaların bazıları AH sıklığının genel nüfustan daha yüksek olduğu ailelerden gelir. Otozomal geçiş göstermeyen ve genellikle 65 yaşından sonra başlayan bu sporadik şekilde ortaya çıkan hastalığa neden mutasyon bulunmamakla beraber çok sayıda risk faktörleri tanımlanmıştır (14). Alzheimer hastalığındaki genetik faktörler Tablo 3'de özetlenmiştir.

Tablo 3. Alzheimer hastalığındaki genetik faktörler.

Gen	Kromozom	Mekanizma	Etki
APP	21	Mutasyon/Trisomi	Ab üretiminde artış
Presenilin 1	14	Mutasyon	Ab üretiminde artış
Presenilin 2	1	Mutasyon	Ab üretiminde artış
APOE	19	Polimorfizm	Ab klirensinde bozulma, t hiperfosforilasyonu, nöral plastisitede bozulma
a2-MG	12	Polimorfizm	Ab klirensinde bozulma

II.1.6. Nöropatoloji:

Alzheimer Hastalığının patogenezi ile ilgili gelişmelere hastalığın patoloji bulguları yol gösterici olmuştur. Makroskopik patoloji bulguları, özellikle korteks ve hipokampusta diffüz atrofidir. Histolojik olarak ise hücre içinde biriken nörofibriller yumaklar, ekstrasellüler yerleşimli nörotik (amiloid) plaklar, granülovakuolar dejenerasyon, sinaptik kayıp ve Meynert'in bazal

nükleusu, hipokampus, asosiasyon korteksinde kolinerjik hücre kaybı patoloji bulgularını oluşturur (30). Nörofibriller yumaklar, ikili helikal filamentlerden oluşup, bu filamentleri hiperfosforilize tau proteini oluşturmaktadır. Amiloid plakların ana komponenti ise "B sheet" konformasyonu ile biriken 39-43 aminoasitlik fibriller β amiloid peptiddir (AB). Amiloid plakların diğer komponentleri patolojik "şaperonlar" olarak adlandırılmakta ve AB'nin agregasyonunu, çökmesini ve toksisitesini artırdığı ileri sürülmektedir. Bunlar α -1-antikimotripsin, ApoE, bazal membrana bağlı heparan sülfat proteoglikan ve klasik kompleman yolun elemanlarıdır (12,29,31,32).

Hastalığın patogenezi en iyi açıklayan hipotez olan amiloid kaskad hipotezinde anahtar nokta, artmış ve uzun AB'nin oluşmasıdır (33).

Alzheimer hastalığının histopatolojik bulgularını oluşturan senil plaklar, nörofibrillar yumaklar, nöron kaybı, artmış AB oluşumuna ikincil olarak gelişmektedir: AB'nin fibriller oluşturarak lokal mikroglia ve astrositleri aktive ettiği, bu hücrelerden salınan moleküllerin nöronlarda nörotoksik ve nörotropik etkiler oluşturduğu düşünülmektedir. Bu nörotoksik etkilere maruz kalan nöronlarda dejeneratif değişiklikler oluşmaktadır. Böylece nöron soma ve nöritlerinde gelişen yapısal ve fonksiyonel değişiklikler (örneğin sinaptik disfonksiyon), nöron kaybı, birçok nörotransmitter eksikliğine ve biyokimyasal değişikliklere neden olmaktadır (32). Ayrıca AB'nin kalsiyum ve sodyum iyonlarına permeabilitesi artmış iyon kanalları gibi davranarak sitotoksisiteye neden oldukları düşünülmektedir (34). Sonuçta tüm kaskad nöronların programlanmış hücre ölümü (apoptoz) ile sonlanmaktadır.

Alzheimer Hastalığının yaklaşık %5'ini oluşturan ailevi Alzheimer olgularında da bulunan gen mutasyonlarının amiloid plak oluşumunu, amiloid kaskad hipotezine paralel olarak artırdığı düşünülmektedir. PS 1, PS 2 ve APP genlerinde farklı ailelerden birden fazla mutasyon tanımlanmış olup, tüm bu mutasyonlarının ortak özellikleri sonuçta, senil plakların ana komponenti olan ve APP'nin sekretaz enzimleri ile kesimi ile oluşan AB ve uzun AB peptid sentezinin artırılmasıdır (33). Yine bu bireylerin deri hücrelerinin kültürünün, kültür ortamına daha fazla 42 aminoasitlik AB peptidini saldığı

görülmüştür (35). Bunu destekleyen en önemli bulgu ise APP mutasyonuna sahip transgenik farelerde gözlenmiştir. Bu transgenik farelerde 42 aminoasitlik AB'nın 14, 40 aminoasitlik AB'nın ise 5 kat arttığı gösterilmiştir (31,32).

Alzheimer hastalığı için ileri birçok hipotez olmakla birlikte hiçbir hastalığın patolojisini tam olarak açıklayamamaktadır.

II.1.7. Klinik:

Yaşa bağlı kognitif azalmada; 50 yaşın üstündeki bireylerde epizodik bellek performansında bir azalma vardır. Epizodik bellek kişisel olarak yaşanmış zamanı ve yeri belli spesifik olayları içerir. Bireylerde, tanıştırdıktan sonra kişilerin isimlerini hatırlamada güçlük çekme, eşyaların yerini bulamama, satın alınacak çok sayıda eşyayı veya yapılacak çok sayıda işi, telefon numaralarını veya posta kodlarını hatırlamada güçlük çekme ve bilgiyi hemen veya dikkatin dağıtılmasından sonra hatırlamada güçlük çekme gibi günlük sorunlara yol açan bellek kaybına ait yakınmalar vardır. Normal yaşlanmada epizodik bellekten daha az olmak üzere diğer kognitif fonksiyonlarda da defisitler görülür. Bu defisitler sözel akıcılıkta, isimlendirme ve kelime bulmada azalma gibi lisan alanında olduğu gibi, özellikle 80 yaşından sonra görsel-alansal yeteneklerde ve yönetsel işlevlerde bozukluk (tasarlama, organize etme, sıraya koyma, soyutlama gibi) şeklinde görülür. Oysa implisit bellek ve okuma yeteneği korunmuştur. Wechsler Bellek Ölçeği'nin Mantıksal Bellek alt testi gibi bellek testlerinde genç erişkinler için gösterilmiş olan ortalamaların en az 1 standart sapma altında performans gösterme, entelektüel işlevlerde yeterli olma ve SMMT'de en az 24 puan alma ölçütleri ile tanımlanmıştır (23,36).

Alzheimer hastalığının kliniğinden önce yaşa bağlı kognitif azalma ve hafif kognitif bozukluk (HKB) kavramlarına değinmek gerekir.

II.1.7.1. Hafif Kognitif Bozukluk:

Son yıllarda yapılan çalışmalar, yaşa bağlı normal kognitif değişikliklerle AH arasında bir geçiş döneminin olduğunu göstermiştir Hafif kognitif bozukluk, normal yaşlanma ile AH arasındaki klinik durumu tanımlar. Bu kişilerde yaşına göre umulandan daha fazla unutkanlık vardır, fakat AH tanı kriterlerini karşılamaz. Bugün HKB'ü olan kişilerin yüksek oranda AH'na yakalanma riski taşıdığına inanılmaktadır (37). Klinik olarak HKB, tipik olarak bellek gibi bir veya birden fazla kognitif alandaki bozukluğu veya kişinin yaşına veya eğitime göre umulandan daha fazla kognitif yeteneklerde genel olarak hafif yıkımı tanımlar, fakat bu bozukluk demans tanısı koyduracak derecede kişinin günlük yaşam aktivitelerini etkilemez (37).

HKB için klinik kriterler şunlardır (38):

1. Hasta yakını tarafından da doğrulanan bellek bozukluğu yakınması,
2. Yaşa ve eğitime göre objektif bellek bozukluğu,
3. Genel kognitif fonksiyonların geniş oranda korunmuş olması,
4. Günlük yaşam aktivitelerinin büyük miktarda sağlam olması,
5. Demans bulunmaması.

Klinik perspektif açısından en az üç tip tablo vardır. Birinci tip yukarıda sözü edilen "amnestik HKB"dir. Burada belirgin bellek bozukluğu vardır ve AH'na dönüşme riski ve potansiyeli taşır. İkinci tip "multipl alanda HKB"dir. Burada birden çok kognitif alanda (bellek, lisan, dikkat, görsel-mekansal beceriler,yürütücü işlevler gibi), demans oluşturacak kadar şiddette olmayan, hafif bozukluk vardır. Bu tipteki kişiler normal yaşlanmayı temsil edebildikleri gibi, ileride AH'na veya vasküler demansa dönüşebilirler. Üçüncü tip "bellek dışında tek alanda HKB"dir. Burada bellek dışında lisan, yürütücü fonksiyonlar gibi tek bir kognitif alanda bozukluk olup, diğer kognitif fonksiyonlar korunmuştur. Ancak demans oluşturacak derecede günlük yaşam aktiviteleri bozulmamıştır. Bu tipteki kişiler ileride frontotemporal

demans, primer progresif afazi veya Lewy cisimcikli demansa dönüşebilirler (37).

Alzheimer hastalığında dejeneratif sürecin başladığı ve daha sonra yayıldığı bölgeler:

1. Hipokampus, Entorinal korteks

2. Asosiyasyon korteksleri

Önde: Frontol Asosiyasyon Korteksi (Prefrontal korteks)

Arkada: Temporo-Parietal Asosiyasyon korteksi

Alzheimer hastalığında dejeneratif süreç ilk olarak Hipokampus ve Entorinal korteksi tutar. Beynin bu bölgeleri bellek işlevinin altyapısını oluşturdukları için de ilk bozulan işlev bellek olur. Daha sonra, hastalığın ilerlemesi ile dejenerasyon ön ve arka multinodal asosiyasyon kortekslerine doğru yayılır. Arka asosiyasyon korteksi, yani temporo-parietal korteks, karmaşık görsel-mekansal becerilere, ön prefrontal asosiyasyon korteksi de karmaşık dikkate ve yönetici işlevlere aracılık ettiği için, hastalığın ilerlemesi ile birlikte bu becerilerde ve işlevlerde gidecek artan bozulmalarla karşılaşırız (37). Bugünkü kanıtlar AH'na bağlı patolojik değişikliklerin klinik bulgular ortaya çıkmadan 15–20 yıl önce başladığına işaret etmektedir.

Alzheimer hastalığı klinik olarak;

1. Preseptomatik dönem,

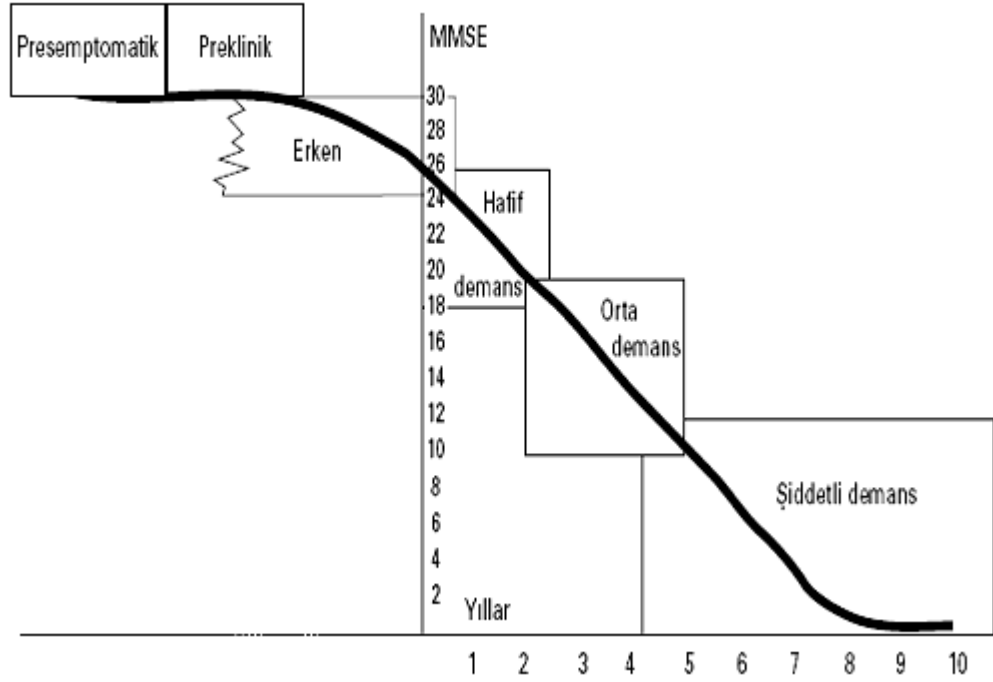
2. Preklinik dönem,

3. Erken “şüpheli” AH,

4. Hafif AH,

5. Orta dönem AH,

6. Ağır (şiddetli) dönem AH, olarak altı gruba ayrılabilir (Şekil 1) (37,40).



Şekil 1. Alzheimer hastalığının klinik evreleri

Preseptomatik evrede, beyinde yavaş ilerleyen bir patolojik süreç vardır. Ancak mental veya davranışsal semptomlar, günlük aktivitelerde bozulma, performanstaki azalma yönünden duyarlı testler kullanıldığında bile, nörofizyolojik testlerde bir bozukluk yoktur (45). Böyle bir evrenin varlığı antemortem değerlendirilmede gözlenebilen ya da ölçülebilen herhangi bir klinik kayıp yokken karakteristik Alzheimer lezyonlarının gösterildiği bir dizi patoloji serisi ile desteklenmektedir (41, 42, 43). Preklinik evrede, özellikle hafızada kolaylıkla fark edilmeyen kayıplar kognitif performanstaki testler ile saptanabilir. Ancak bu kayıplar günlük aktivitelerde herhangi bir aksama ile ilişkili değildir (44,39). Alzheimer hastalığının klinik belirtilerinin başında amnezi, afazi, apraksi ve agnozi gelmektedir (13).

Amnezi:

Alzheimer hastalığında ilk semptom çoğu kez yeni bilgileri öğrenme yeteneğinin kaybıdır (amnezi). Epizodik belleğin kaybı AH'ndaki ana belirtidir.

Epizodik bellek özellikle hipokampusla ilgilidir. Başlangıçta hasta unutkan olur, aynı şeyleri tekrarlar, eşyalarını kaybeder. Randevularını unuttur. Sonunda epizodik belleğin depo edilmesi ve hatırlanması ileri derecede yıkılır. Bellekteki bozulma seçici bir şekilde yakın zamandaki olaylarla ilgilidir (13).

Afazi:

Alzheimer hastalarında sık rastlanan bir bozukluktur. Spontan konuşmada kelime bulmada zorluk ve objeleri isimlendirme yeteneğinde bozukluk ilk görülen dil bozukluklarıdır. Patolojik bozukluklar Wernicke alanının ön yüzüne yayılır ve Wernicke afazisi görülür. Hastalık ilerledikçe hastaların sözcük bulma ve konuşma becerilerindeki kayıplar mutizm boyutuna ulaşır (13).

Apraksi:

Apraksi; sonradan öğrenilen, pratik olarak yapılan ve motor beceri gerektiren hareketleri uygulama becerisinin bozulmasıdır (5). Apraksi genellikle hastada bir şekli kopya etmesi sırasında (örneğin kesişen altıgen veya üç boyutlu cisimler çizme) veya birbiri ardı sıra yapılması gereken bir iş istendiğinde ortaya çıkar. Hastalığın erken döneminde anamnezden hastanın teknik yada yeni öğrenilmiş bilgi gerektiren karmaşık becerileri yapamadığı öğrenilir (yeni adresleri bulamazlar, araba kullanmada riskler artar). Hastalık ilerledikçe elbiselerini belli bir sırada giyemediği; bıçak ve çatal kullanarak doğru şekilde yemek yiyemediği öğrenilir. Sol parietal fonksiyon bozukluğu apraksi nedenidir (13).

Agnozi:

Agnozide hastanın bedeninin çeşitli bölümlerini tanıyamadığı görülür. Yüzleri tanıyamama (prosopagnazi) hastada yakınlarının gerçek olmadığı, yakınlarının kopyaları ile yer değiştirdiği inancına yol açar (13).

Diğer belirtiler arasında soyut kavramları kullanma becerisinde bozulma vardır. Hasta günlük mali ve mesleki sorunları çözmede yetersiz kalır. Karar verme yetisinde ve yargılamada bozukluk görülür (13).

Pratik açıdan hastalığı hafif, orta ve ileri evre olmak üzere 3 döneme ayırabiliriz (13).

II.1.7.2. Hafif (erken) dönem Alzheimer Hastalığı (2–4 yıl):

- Kısa süreli bellekte bozukluk. Uzak bellek genellikle etkilenmemiştir.
- Objeleri yanlış yere koyma
- Daha önce bildiklerinin isimlerini unutma
- Bildik objelerin isimlerini unutma (çatal, kalem)
- Daha önce bildik yerleri bulamama
- Çevreye ilgi kaybı, mesleksi, sosyal aktivitelerden uzaklaşma
- Havaya uygun şekilde giyinememe
- Lisan yeteneklerinin bozulması
- Soyut düşüncede bozukluk
- Zaman ve yerle ilgili orientasyon bozukluğu, ancak kişileri tanıma
- Mini Mental Skor genellikle 20-25 arasında değişir.
- BBT veya MRI genellikle normal

II.1.7.3. Orta Dönem Alzheimer Hastalığı (2–5 yıl):

- Belleğin bozulması belirgin
- Lisan kusurları (afazi), muhakeme, alan orientasyon, yürütücü işlevlerde bozukluklar belirginleşir.
- Davranış sorunları (çabuk irrite olma, tartışma)
- Hezeyanlar ve hallüsinasyonlar

- Uyku-uyanıklık döngüsünde bozukluk, akşamüstleri kognitif ve davranışsal belirtilerde kötüleşme
- (gün batımı sendromu)
- Bir aşağı yukarı dolaşma
- Enkontinans
- Hastaya çoğu kez günlük aktivitesi (banyo yapma, elbise giyme, yemek yeme vs.) için yardım etmek gerekir.
- Sağlıklı eşe (veya bakıcıya) gittikçe bağımlı olma
- Mini Mental Skor 12-20 arasında değişir.
- BBT veya MRI normal veya hafif atrofi gösterir.

II.1.7.4. Ağır (geç) dönem Alzheimer hastalığı (Süre: 2–4):

- Aile bireylerini emosyonel olarak tanıyabilir, ama kişiliğin kesin olarak belirlenmesi ve isimlerinin söylenmesi mümkün değildir.
- Konfüzyon / ajitasyon artması
- Hezeyanlar, hallüsinasyonlar
- Enkontinans şiddetlenmesi
- Hareket yeteneğinin azalması
- İletişim kurulamama, konuşma kısa cümleler veya kelimelerin tekrarı şeklinde kısıtlanır.
- Myoklanı, rijidite, dişli çark, bradimimi ve dengesizlik gibi ekstrapiramidal belirtiler.
- Günlük yaşam aktiviteleri için tamamen yardımın gereksimesi

- Hastanın sürekli bakım için bir kuruma yerleştirilmesi gerekir.
- Mini Mental Skore 12'den aşağıdır.
- BBT veya MRI'de atrofi .

Alzheimer hastalığının geç evresi hastanın neredeyse en temel işlevlerde bile tamamen bakıcısına bağımlı hale gelmesi ile karakterizedir. Sadece bellek parçacıkları kalır. Eş ve çocuklarını emosyonel olarak tanımlayabilir ama kimliğin kesin olarak belirlenmesi (yani akrabalık derecesi ve isimler) mümkün değildir. Konuşma kısa cümleler veya kelimelerin tekrar şeklinde kısıtlanır ve hastanın anlaması sadece basit sözcüklerle sınırlı kalır. Bu evrede sorun yaratan davranışlar (örn: çılgılık atma) halen görülebilse de hastanın kişiliğinin tüm diğer özellikleri gibi er geç kaybolur. Ekstrapiramidal fonksiyon bozuklukları (25), düşmeler gibi motor komplikasyonlar ortaya çıkabilir. Üriner ve fekal inkontinans mevcuttur. Terminal evrede hasta tamamen yatağa bağımlı ve hiç bir şeyi anlamaz durumdadır. Disfaji ve kilo kaybı sıktır. Ölüm sıklıkla pulmoner emboli, pnomoni, ürosepsis, aspirasyon veya beslenememe gibi uzun süre yatağa bağımlılıktan dolayı ortaya çıkan komplikasyonlar nedeniyle olur (23,46).

II.1.7.5. Tanı Kriterleri:

Alzheimer hastalığının klinik tanısı için yayınlanmış olan ve bugün yaygın biçimde Ulusal ve Nörolojik ve İletişim Hastalıkları Enstitüsü ve İnme-Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Hastalıklar Derneği (NINCDS-ADRDA) (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) (47) ve Amerikan Psikiyatri Birliği, Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı (DSM-IV) tanı kriterleri kullanılmaktadır (48). Kesin AH tanısı Biyopsi ya da otopsiyle elde edilen histopatolojik kanıtlar ile konur(47).

DSM-IV Alzheimer Tipi Demans İçin Tanı Kriterleri:

A. Aşağıdakilerden her ikisinin bulunması ile belirli çoğul kognitif defisit gelişmesi

1) Bellek bozukluğu (yeni bilgiler öğrenme ya da daha önceden öğrenilmiş bilgileri anımsama yetisinde bozulma)

2) Aşağıdaki kognitif bozukluklardan birinin (ya da daha fazlasının) bulunması:

a) Afazi (dil bozukluğu)

b) Apraksi (motor işlevlerde bozukluk olmamasına karşın motor etkinlikleri yerine getirme yetisinde bozulma)

c) Agnozi (duyu işlevlerinde bozukluk olmamasına karşın nesnelere tanıyamama ya da tanımlayamama)

d) Yönetiş işlevlerinde bozukluk (yani, tasarlama, organize etme, sıraya koyma, soyutlama)

B. A.1 ve A.2 Tanı Ölçütlerinde sözü edilen kognitif bozuklukların her biri toplumsal ya da mesleki işlevsellikte belirgin bir bozukluğu neden olur ve önceki işlevsellik düzeyinde belirgin bir düşme olur.

C. Aşama aşama başlar ve sürekli kognitif bir düşme görülür.

D. A.1 ve A.2 Tanı Ölçütlerinde sözü edilen kognitif bozukluklar aşağıdakilerden herhangi birine bağlı değildir:

1) Bellekte ve bilişte ilerleyici bozukluklara neden olan merkezi sinir sistemini ilgilendiren diğer durumlar (örn. serebrovasküler hastalık, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, subdural hematoma, normal basınçlı hidrosefali, beyin tümörü)

2) Demansa neden olduğu bilinen sistemik durumlar (örn. hipotiroidizm, vitamin B12 ya da folik asit eksikliği, niasin eksikliği, hiperkalsemi, nörosifiliz, HIV infeksiyonu)

3) Madde kullanımının yol açtığı durumlar

E. Bu bozukluklar sadece deliriumun gidiş sırasında ortaya çıkmamaktadır.

F. Bu bozukluk başka bir Eksen I bozukluğuyla daha iyi açıklanamaz (örn. Majör Depresif Bozukluk, Şizofreni)

Hastalığın seyri oldukça fazla değişkenlik gösterir. Hastalığın başlangıcından itibaren ölüme kadar geçen süre 8-10 senedir. AH'nın seyri bilişsel bozuklukların, fonksiyonel kayıpların veya temel özelliklerinin izlenmesi ile ölçülebilir. İlerlemeye etki eden diğer faktörler arasında ekstrapiramidal faktörler, psikoz ve lisan bozuklukları yer alır. Ölüm sıklıkla pnömoni, pulmoner emboli, ürosepsis ve dekübitus ülserleri ve beslenememe sonucu olur.

II.1.7.6. Demans Hastalarında Muayene ve Yapılması Gereken Laboratuvar Araştırmaları (12):

- Ayrıntılı anamnez hem hastadan, hem de aileden; fizik, nörolojik muayene ve mental durum muayenesi

- Kullanılan ilaçların araştırılması ve mümkünse kandaki düzeylerinin saptanması

- Kan düzeyi deđerlendirmeleri:

Rutin olarak;

- Sedimantasyon dahil rutin kan tablosu
- Kanda üre, şeker kreatinin, elektrolitler, bilirubin, albümin/globülin
- Karaciğer fonksiyon testleri
- B12 vitamini ve folat düzeyi

- Tiroid fonksiyonlarının araştırılması
- Sifiliz ve AIDS testleri

-Elektrokardiografi ve akciğer grafisi

-BT (endikasyon yoksa kontrast madde vermeden) veya MR

-EEG ve endikasyon varsa lomber ponksiyon

-Psikometrik değerlendirme (demansı ortaya koyan çeşitli ölçekler ve yüksek entellektüel fonksiyon bozukluklarını ortaya koyan özel testler) (Mini-Mental durum muayenesi (MMDM) testi gibi)

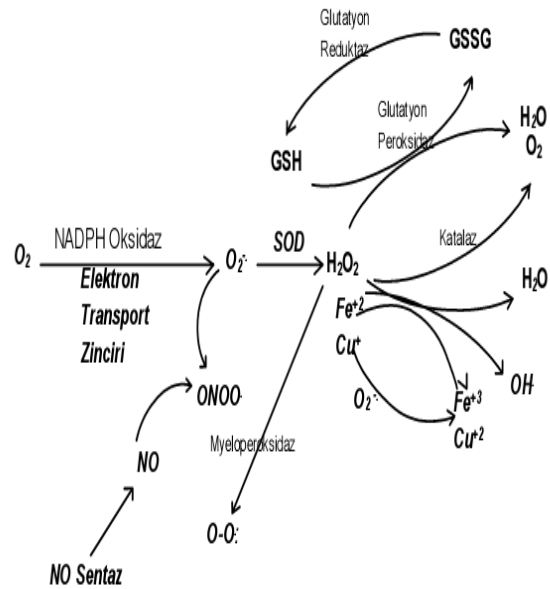
Demansın tanısı kognitif fonksiyonlar, davranış, kişilik veya günlük yaşam aktivitelerinde, tercihen bağımsız bir gözlemci tarafından doğrulanan, kalıcı ve ilerleyici bozulma hikayesi nöropsikolojik testler veya MMDM, Blessed Demans Ölçeği veya Klinik Demans Değerlendirme Ölçeği veya Klinik Demans Değerlendirme Ölçeği gibi tarama ölçeklerinden bir veya daha fazlasından yaşa ve eğitime göre ayarlanmış aralıkların 2 SD altına düşen skorlar alınması ilk skorlar normal sınırlar içinde olsa bile, 6-12 ay aralıklarla yapılan iki testte herhangi bir alana ait alınan skorlar arasındaki farkın SD'yi aşması ile desteklenir (13).

II.2. SERBEST RADİKALLER VE ANTIOKSİDAN SİSTEMLER

II.2.1. Serbest Radikaller

Ortaklanmamış elektron taşıyan ve diğer biyolojik materyallerle reaksiyona girme eğilimi taşıyan atom veya moleküllere serbest radikal adı verilmektedir (49). Elektronlar orbital denem bölgelerde dönerler. Her orbital normal şartlarda birbirine zıt yönde dönen 2 elektron ihtiva eder. Serbest radikaller ortaklanmamış elektron içerir. Bu da en sık olarak elektron transfer zincirinde oluşan elektronların transferi ile veya oksidazlar ile tek elektron transferi ile oluşur. Serbest radikallerin bir başka oluşma şekli de moleküldeki bağların homolitik olarak parçalanması sonucu elektronlardan her birinin farklı atomlar üzerinde kalmasıyla olur (50,51). Ayrıca iyonize radyasyon da serbest radikal oluşumuna sebep olabilir. Oksijen, iki elektronu eşleşmemiş şekilde bir elektron dağılımına sahiptir. Bu yüzden bazen oksijen biradikal olarak değerlendirilir.

- *O-O* Moleküler Oksijen
- O-O: Single Oksijen
- *O-O: Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$)
- *O-O:H Perhidroksil radikal
- H:O-O:H Hidrojen Peroksit (H_2O_2)
- H:O* Hidroksil Radikal (OH^{\cdot})
- H:O: Hidroksil iyon
- H:O:H Su

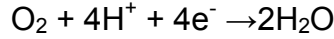


Şekil 2. Oksijenin yüklü formasyonları ve oksijen radikallerinin detoksifikasyonu.

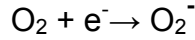
Oksijen molekülünün reaktif bir özelliği olmamasına rağmen diğer radikallerle reaksiyona girme özelliğine sahiptir (50,52). İnsan vücudunda bütün hücrelere hiçbir zorlukla karşılaşmadan giren ve en çok kullanılan özelliğine sahip olan moleküler oksijen (O₂), yapısı itibarıyla radikal olmaya çok uygundur. Bundan dolayı serbest radikal denilince aslında serbest oksijen radikalleri, daha genel bir tabirle reaktif oksijen türleri (ROS) aklı gelmektedir. Şekil 2' de oksijenin yüklü formları ve oksijen radikallerinin detoksifikasyonu görülmektedir (52). İnsan vücudunda serbest radikallerin fizyolojik koşullarda oluşturulduğu birçok mekanizma ve metabolik yol vardır (53,54).

Bunlardan bazıları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1) Mitokondrial elektron transport zinciri: Normal elektron akışı esnasında en son oluşan ürün şudur:



Halbuki elektronların elektron transport zincirinden kaçıp moleküler oksijenle direkt olarak reaksiyona girmesi süperoksit radikalini oluşturur.



Mitokondriyal solunum zincirinde akan elektronların yaklaşık olarak %1-2'si bu şekilde toksik bir ürünü oluşturmak üzere sızıntıya uğrar. Süperoksit radikallerinin üretimi ve salınımı iç mitokondri membranından sitozolik tarafa doğru olur. Bununla beraber, mangan süperoksit dismutaz (MnSOD) aktivitesinin oldukça yüksek olmasına bağlı olarak mitokondrideki süperoksit düzeyi denge halinde tutulur ve yalnızca hidrojen peroksit, mitokondri membranını geçerek sitoplazmaya ulaşabilir (55,56,57).

2) Mikrozoal elektron transport zinciri: Endoplazmik retikulumda özellikle ksenobiyotiklerin metabolizmaları esnasında ve diğer endojen maddelerin metabolizması esnasında yan ürün olarak serbest radikaller üretilir. Burada elektronların kaçak yaptığı en önemli yapı NADPH sitokrom P450 redüktaz enzimidir (56).

3) Karışık fonksiyonlu oksidazlar: Amino asit oksidaz, sitokrom oksidaz, monoamin oksidazlar, ksantin oksidaz en önemlileridir. Bunlardan özellikle

ksantin oksidaz pürin katabolizmasının en son iki reaksiyonunu katalizleyen enzim olarak bazı özel durumlarda fazla miktarda $O_2^{\cdot-}$ üretir (54; 58,59).

4) Solunum patlaması: Nötrofiller fagositoz esnasında, membran ve sitoplazmalarında bulundurdukları NADPH oksidaz ve miyeloperoksidaz enzimleri ile hem serbest oksijen radikalleri hem de aşırı okside edici HOCl gibi ajanları üreterek karşılaştıkları virus, bakteri, mantar gibi ajan patojenleri yok ederler. Bu işlemler esnasında hem ana hem de ara ürün olarak çok fazla miktarda ROS oluşur (54, 56; 59).

5) Prostaglandinlerin sentezi: Prostaglandinlerin sentez edildiği lipooksijenaz ve siklooksijenaz ana metabolik yollarında farklı basamaklarda ROS üretilir. Bunların dışında ayrıca bazı küçük moleküllerin oto-oksidasyonu (tiyoller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, antibiyotikler gibi) ROS oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Son olarak kişilerin maruz kaldığı bazı eksojen ajanlar da vücutta ROS oluşumuna sebep olmaktadır. Bunlar (stres, radyasyon, antineoplastik ajanlar, ksenobiyotikler, bağışıklık yapan bazı maddeler, hiperoksi, pestisitler, aromatik hidrokarbonlar, anestezi maddeler, sigara dumanı vb.) serbest radikallerin eksojen kaynakları olarak da adlandırılmaktadır (60).

İnsan vücudunda fizyolojik olarak veya maruz kalınan anormal koşullara bağlı olarak patolojik bir şekilde üretilen bu serbest radikalleri her seviyede engelleyebilecek antioksidan sistemler bulunmaktadır. Bu antioksidanlar etki etme tiplerine göre; baskılayıcı antioksidanlar (vitaminler, flavonoidler, mannitol, trimetazidin), yok edici antioksidanlar (mitokondri, sitoplazma ve hücre dışı alanda görev yapan antioksidan enzimlerin hepsi), zincir kırıcı antioksidanlar (fenoller ve aromatik aminler) ve tamir etkisine sahip antioksidanlar olmak üzere sınıflandırılabilir. Genel olarak bakıldığında endojen ve eksojen kaynaklı enzim olmayan antioksidanlardan bazıları şunlardır: glutatyon (β -alanil sisteinil glisin), A, C ve E vitaminleri, bilirubin, ürik asit, çift bağ ve redoks potansiyeline sahip grup taşıyan amino asitler, seruloplazmin, laktoferrin, transferrin, albumin, hemoglobin, taurin, pirüvat, glukoz, melatonin, oksipurinol, ve son olarak demir şelatörleri olan karnozin ve homokarnozin (61,54).

II.2.2. Beyinde Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşum Mekanizmaları

Beyinde başlıca ROS oluşum mekanizmaları kısaca şunlardır:

- Katekolaminler ve özellikle dopaminin monoamin oksidaz tarafından katalizlenen oksidasyonları.

Katekolaminlerin toksik kinon metabolitleri beyinde ROS üretiminde ve dolayısı ile birçok patolojik sürecin başlamasında önemli bir role sahiptirler. Şizofrenide ve Parkinson hastalığında nigrostriatal ve mezolimbik sistemlerdeki dopaminerjik nöronların dejenerasyonu söz konusudur. Bu dejenerasyonun sebebi olarak anormal miktarda üretilen serbest radikaller gösterilmektedir. Ayrıca adrenalinin oksidasyon ürünü olan adrenokrom da nörotoksik ve psikomimetik özelliklere sahiptir. Dopaminerjik sistemde dopamin o-kinona, o da aminokroma dönüşerek redoks bir siklus oluşturur.

- Prostaglandin metabolizması

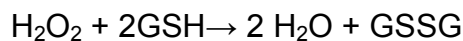
- Fenton reaksiyonu ile demir tarafından serbest radikallerin oluşturulması.

- Makrofaj fonksiyonu gören mikroglial hücrelerin aktivasyonu

- Beyin endoteli ve nöronlarda nitrik oksit üretimi (53).

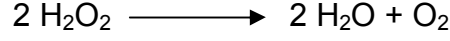
II.2.3. Beyinde Antioksidan Savunma Sistemleri

1) Glutasyon Peroksidaz: Vücudun bütün doku ve hücrelerinde bulunmakla birlikte organlara göre farklılıklar mevcuttur. Beyindeki aktivitesi diğer bazı dokulara göre daha azdır. Hücre içinde sitoplazmada ve mitokondride daha yoğun olarak bulunur. Vücutta hidrojen peroksitin (H_2O_2) detoksifikasyonunda ve ayrıca lipid hidroperoksitlerin detoksifikasyonunda görev alır. Koenzim olarak glutasyonu (GSH) kullanır (54,58,59).



2) Katalaz: Dört adet alt üniteden oluşmuş glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Beyindeki aktivitesi diğer birçok dokuya göre azdır (spesifik

aktivite olarak). Hücrenin özellikle peroksizom partikülleri ve mitokondri-lerinde, daha az yoğunlukta ise sitoplazma ve endoplazmik retikulumunda bulunur. Özellikle H₂O₂ miktarının aşırı arttığı durumlarda devreye girerek bu molekülü suya çevirir (54,58,59).



3) Glutasyon Redüktaz: Glutasyon peroksidazın reaksiyonu esnasında oluşan okside glutasyonu (GSSG) redükte glutatyona (GSH) dönüştürerek, direkt değil de dolaylı olarak antioksidan etki gösteren bir enzimdir. Bu katalizi gerçekleştirirken koenzim olarak NADPH kullanır (54,58,61).

4) Süperoksit Dismutaz (SOD):

Süperoksit dismutaz, oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunan ve süperoksidin hidrojen perokside dismütasyonunu katalizyen bir metalloenzim olup 21. kromozomda lokalize olmuştur (81,82,83). Mc Cord ve Fridovich tarafından 1968'de keşfedilmiştir. 3 tür SOD vardır. Bunlar taşıdıkları prostetik grup olan metallere ve lokalizasyonlarına göre; bakır-çinko SOD (Cu-Zn SOD), mangan SOD (MnSOD, SOD 2) ve ekstrasellüler SOD (EC-SOD) şeklinde sınıflara ayrılırlar. Bunların dışında ökaryotlarda bulunmayıp prokaryotlarda bulunan demir SOD (Fe-SOD) mevcuttur (50,51,62,65). MnSOD kalp, karaciğer ve böbrekte en yüksek konsantrasyonlardadır. Cu-Zn SOD ise karaciğer, beyin ve testiste en yüksek; eritrosit, akciğer ve pankreasta ise en düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Cu-Zn SOD sıçan karaciğerinde lizozomlarda da bulunur. Cu-Zn SOD siyanür ile inhibe olurken MnSOD siyanür ile inhibe edilemez (81,82).

Süperoksit anyonlarının en büyük kaynağı mitokondrideki NADH dan: Elektron transport zinciri esnasında Ubiquinon oksidoredüktaz (Kopleks I) ve ubiquinol [sitokrom c oksidoredüktaz (kompleks III)] den oluşur (67).

Süperoksit anyonları nötr pH'da sulu ortamda oldukça stabildir ve nispeten daha az toksiktir. Ancak, bu radikal O₂^{-•} bir sonucu olan formlarda, çok reaktif ve "tehlikeli" reaktif olur.

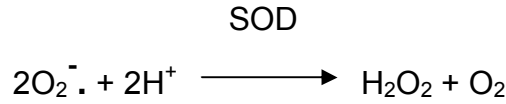
Bu anyonlar:

1. HO₂[•]

2. $\bullet\text{OH}$ (H_2O_2 'den dönüştürülmüş)
3. $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ($\bullet\text{OH}$ ile bikarbonatın tepkimesi ile)

Yukarıdaki ROS'lar yeterli konsantrasyonlarda hücre hasarına neden olabilirler (68).

Metalloprotein olan SOD, bir süperoksid molekülünü O_2 molekülüne yükseltgeyip, diğer süperoksid molekülünü H_2O_2 'e indirger.



MnSOD bir homotetramerik enzimdir. MnSOD süperoksit anyon radikallerinin ($\text{O}_2^{\bullet-}$) katalizinde ve dismutasyonunda çok verimlidir.

Bu dismutasyon reaksiyonu süperoksit radikalinin anyon ve kation formlarının eşit oranda bulunduğu pH 4,8 de kendiliğinden de cereyan eder. Ancak fizyolojik şartlarda yani pH 7,35- 7,45 arasında iken bu reaksiyon çok daha yavaş oluşacaktır. SOD enzimi varlığında pH en az 7,4 olduğu koşullarda bu reaksiyon 4 kat daha hızlı olacaktır (50).

SOD enziminin insanda üç adet izoenziminden biri olan MnSOD (mitokondrial izoenzim), indüklenebilir olma özelliğinden dolayı ayrı bir öneme sahiptir. Süperoksit üretiminin artması ile enzimin transkripsiyon yoluyla üretimi de artmaktadır.

II.2.4. MnSOD :

II.2.4.1. MnSOD nasıl oluşur?

Önce sitoplazmada sinyal sekansı içeren prekürsör bir molekül olarak sentezlenmekte, daha sonra mitokondri içine girerek bu sinyal sekansını kaybetmektedir;

- Mn SOD ökaryot hücrelerde nükleer kromatin tarafından kodlanır.
- MnSOD mRNA sitozole geçer.

- Ribozomda MnSOD proteinin prekürsör formu (~223 a.a) oluşur.
- Translasyon sonrası MnSOD proteinin prekürsör formu mitokondriyal matrikse taşınır.
- Bu mitokondriyal hedef dizisi enerji bağımlı bir proteaz tarafından kısaltılır. İnsan için olgun protein şeklinde tetramer içine monte edilir.
- Ökaryotik MnSOD mitokondriyal matrikste bulunur (70).

II.2.4.2. MnSOD Proteinini Hakkında Bilgiler:

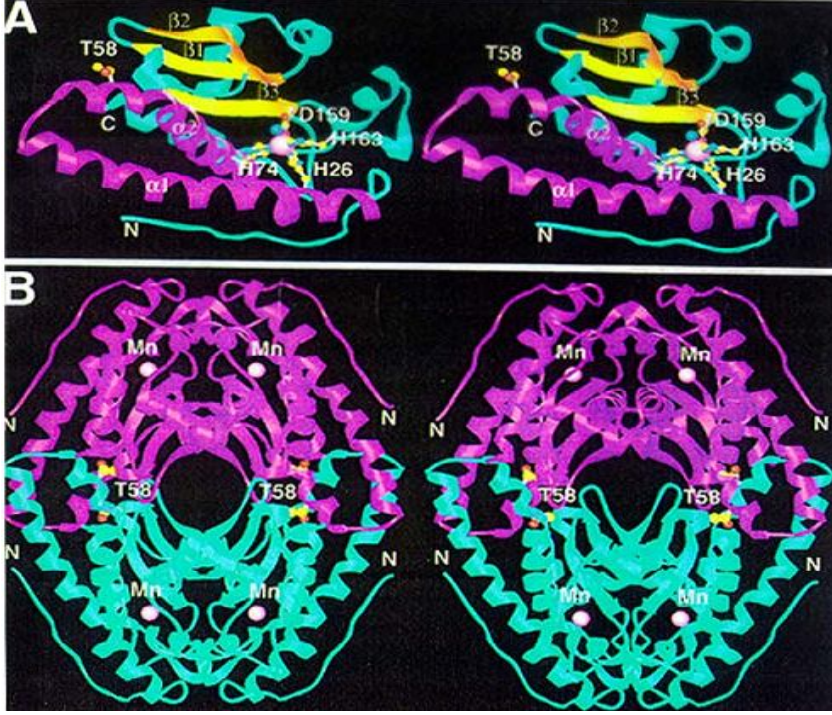
- Ökaryot MnSOD'larının çoğu homotetramerik ve toplam molekül ağırlığı ~ 88 kDa olan dört subünitlidir.
- Çoğu MnSOD asidiktir.
- MnSOD dondurularak inaktive olabilir. CuZnSOD bu işleme daha dayanıklıdır.
- İlk defa 1984'de insan karaciğer MnSOD dizisi her bir subünit 196 aa olarak keşfedildi.
- MnSOD çok iyi korunmuş bir proteindir. Maya, E.coli ve B. Stearothermophilus, İnsan sekansına >%40 benzerlik gösterir. Ancak MnSOD ve CuZnSOD arasında benzerlik yoktur.
- İnsan karaciğer MnSOD'unun her bir subünitinde iki sistein rezidüsü bulundu, subunitlerin içinde ve arasında disulfite bağ yoktur.
- Sistein ökaryotik MnSOD için spesifik olarak görünüyor (75).

II.2.4.3. MnSOD'un Yapısı :

Her yeni sentezlenmiş insan MnSOD subuniti 223 amino asitten oluşur. Mitokondriye transport sonrası, her olgun MnSOD subuniti 198 amino asitten oluşur.

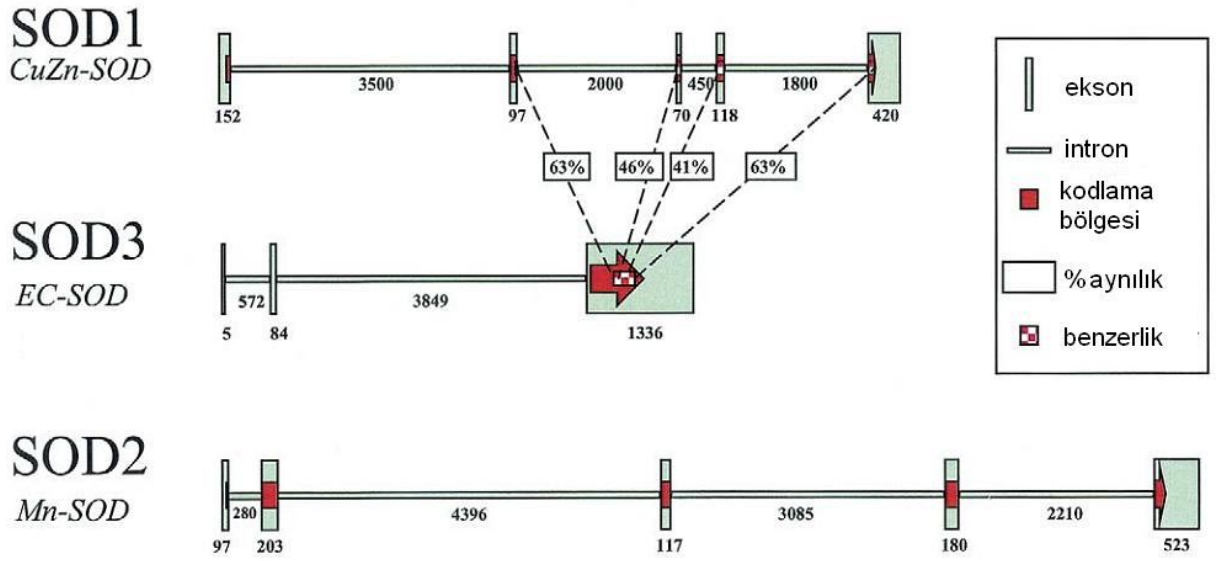
Bir subunit 40 X 47 X 49 Å boyutlara sahiptir. İki ayrı etki alanları vardır: N-terminal helikal alan ve C-terminal a/b alanı. Sıkışmış üç antiparallel levha ve beş heliks içerir. MnSOD'un iki subuniti dimer içinde ve aktif alanın dimer arabiriminin yanında mangan atomları vardır. Residüeller D159, H163, H26,

H74 ve her subunitin bir su molekülü metal bağlayıcı siteye katılmaktadır (Şekil 1) (66). İnsan MnSOD için, iki dimer daha da yaklaşık 60x79x79 Å boyutları ile homotetramer halinde birleşmektedir (74).



Şekil 1: İnsan mangan superoksit dismutaz yapısı A,B.

Yapısında 5 ekson ve 4 intron vardır (Şekil 2).



Şekil 2: İnsan SOD enzim ailesinin üç bilinen üyesinin genomik yapısı. SOD1 ve SOD3 arasında aminoasit dizisinde benzerlik alanlarını göstermek için SOD3 ortaya yerleştirilmiştir. SOD2’de, SOD1 ve SOD3 arasında bulunan amino asit dizisi benzerliği yoktur. Her baz çiftlerinde ekson ve intronlarda gösterilmektedir (115).

II.2.4.4. MnSOD’un mutasyon/polimorfizmi:

MnSOD enzimi kromozom 6q25 gen bölgesine lokalizedir (69). İlgili genin allellerinin tercihli formlarından herhangi birinin farklı çıkması mitokondri gibi ROS oluşumunun çok yoğun olduğu bir organelde ve dolayısıyla hücrenin tümünde bazı anormalliklerle sonuçlanmaktadır (63). MnSOD polimorfizminin varyant veya mutasyon şeklinde üç formu gösterilmiştir:

1. MnSOD’un bir genetik polimorfizm türevi olarak, sinyal peptidindeki -9 konumunda valin, alanine değişir. Bu değişiklik, MnSOD’un hücresel konum ve ve mitokondrial transportunu etkileyebilir (71).
2. MnSOD’un bir varyant/mutasyonu, 58. pozisyonda izolösinin treonine değişimi. İn vivo ve in vitro ısı stabilitesinde düşüklük ve enzimatik aktivitede azalma görülür (72).

3. MnSOD'un bir diğeri mutasyonu da; 60. Pozisyonda lösin, fenilalanine dönüşümü, MnSOD proteinini intraselüler tiollerin vasıtası ile oluşan redoks regülasyona duyarlı hale getirir (73).

II.2.4.5. Hücresel MnSOD seviyelerinin düzenlenmesi (Manipülasyon):

MnSOD gen ekspresyonu; kimyasal maddeler, ısı, radyasyon veya TNF- α ve interlökin-1 β gibi sitokinler ve reaktif oksijen türevleri vasıtası ile indüksiyonu veya supresyonu görülebilir (86).

Eksojen MnSOD proteini, lipozomal SOD veya Polietilen glikol SOD (Peg-SOD) gibi konjuge enzimlerin vasıtası ile direk giriş yapar. Eksojen MnSOD cDNA'nın transfeksiyonu/transdüksiyonu, plazmidler veya adenovirus gibi vektörler tarafından olur. Endojen MnSOD ekspresyonu, antisense veya RNAi yöntemleri ile inhibe olur (76).

II.2.4.6. MnSOD hücre içi sinyal yolları ve gen ekspresyon ayarlanması:

MnSOD birkaç redoks-duyarlı transkripsiyon regülatuar faktörlerin aktivasyonu (NF κ B ve AP-1 gibi) ile ayarlanır. MnSOD gen ekspresyonlarındaki değişiklikler, apoptozis ile ilişkilidir (76).

Hücre içi ROS ve redoks dengesini korumak için MnSOD önemlidir;

Artan MnSOD, normal dokuyu oksidatif strese karşı korur (77). Ancak, MnSOD'un fizyolojik koşullarının overekspresyonu ROS birikimine ve oksidatif strese yol açabilir ve bunlarda tümör metaztazına ve anjiyogenezise katkıda bulunabilir (76).

MnSOD'un overekspresyonu vasıtası ile ROS'un birikimi ve H₂O₂'nin inhibisyonunu kaldırmak, tümör tedavisi için yararlı olabilir (78).

II.2.4.7. Bir tümör baskılayıcı olarak MnSOD:

MnSOD canlıların hayatında önemli ve temel biyolojik işlevler oynamaktadır.

Artan MnSOD ekspresyonu in vitro tümör hücresi büyümesini baskılayabilir (78).

MnSOD transgenik farelerin, kimyasallarla indüklenen tümör oluşumuna ve oksidatif strese dirençli olduğu gösterilmiştir (79).

Premenapozal kadınlarda, MnSOD polimorfik varyantı (-9.pozisyondaki alanin) için homozigot varlığı meme kanseri riskinde 4 kat artış sağladığı gözlenmiştir (80).

II.2.4.8. Manganez Süperoksit Dismutaz (MnSOD) Geninin Polimorfizmi:

Bir toplumda sadece tekrarlayan mutasyonlarla sürdürülemez oranlarda varolan, nadir sıklıktaki, devamlılık göstermeyen iki veya daha fazla genetik özelliğin birlikte oluşumu durumuna “polimorfizm” adı verilmektedir. Eğer toplumun %2 veya daha fazlası nadir bir alleli taşıyorsa, bu durum polimorfiktir. Polimorfizmler insan genetik araştırmalarında anahtar bir fonksiyon üstlenmiştir ve genetik bir marker gibi görev yapmaktadır.

Ön kabule göre, hücrelerde SOD enziminin ve asıl olarak bunun önemli bir izoenzimi olan MnSOD enziminin daha az çalışan polimorfik bir tipinin sentezlenmesi membranlar başta olmak üzere hücrenin bütün kesimlerini etkileyebilecek olayların başlamasına sebep olabilir. Bilindiği gibi hücrelerin sentez ettiği enerjinin büyük bir kısmı hücre membranlarının bütünlüğünün korunması ve içeriye ve dışarıya yapılacak madde transferlerinin gerçekleştirilmesi için harcanmaktadır. MnSOD enziminin daha az efektif çalışması sonucunda dolaylı olarak ROS'un artması ile membranlarda lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonları şeklinde başlar ve membran fonksiyonlarını bozacak şekilde ilerleyebilir.

Membranlarda lokalize olan birçok yapısal ve fonksiyonel protein bu olaylar zincirinden etkilenir. Özellikle taşıma ve pompa görevi yapan

proteinler, lipid peroksidasyonuna bağlı değişikliklerden etkilenerek üç boyutlu değişime uğrarlar. Ayrıca üç boyutlu yapısı değişen membran enzimlerinin aktivitesi de bu değişikliklerden etkilenir. Bütün bu değişiklikler, membran fonksiyonlarının büyük ölçüde bozulması anlamını taşır. Bu şekilde olayların meydana geldiği hastalarda beyin bölgelerine göre bilişsel, fonksiyonel, motor ve psikosomatik bulgular ortaya çıkabilir (64).

III. GEREÇ VE YÖNTEM

III.1. ARAÇ VE GEREÇLER:

1. Benmari : Nüve BM 402 (0-99 °C) (Türkiye)
2. Elektronik Terazi : Sartorius / Basic (USA)
3. Otomatik Pipetler : Socorex Acura 825 (Swiss)
4. Santrifüj : Hettich Rotina 35 R/Soğutmalı(Germany)
5. Spektrofotometre : Shimadzu UV 1601 (Japan)
6. Manyetik Karıştırıcı : Ikamag RH/Isıtmalı (Germany)
7. Cam Pipetler : Precicolor HBG (Germany)
8. Vorteks : Yellowline (USA)
9. Cycle Cihazı : LightCycler 1.5 Roche (Switzerland)
10. Mikrosantrifüj : Hettich mikro 200/Soğutmalı (Germany)

III.2. YÖNTEM:

III.2.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin ve Manisa Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Hastanesi nöroloji polikliniğine başvuran ve AH tanısı almış, kendisinden veya vasisinden izin alınmış 53 kişilik hasta grubu ile alzheimer demans olmayan kişilerden izin alınarak 60 kişilik yaşa ve cinsiyete uygun kontrol grubu oluşturulmuştur. Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi yerel etik kurulu onayı alınmasından sonra, klasik kan alma metoduyla 1 Etilendiamin tetraasetikasit (EDTA)'li mor ve 1 jelli kırmızı kapaklı tüp alınmıştır. Alınan kırmızı kapaklı tüpler santrifüj sonrası serumu ependorflara alınarak -80°C'de saklanmıştır.

Mor kapaklı tüplerden ise yıkanmış eritrosit süspansiyonu hazırlanır. Bu işlem eritrosit süspansiyonlarına elle serum fizyolojik (% 0.9 NaCl) eklenerek eritrositlerin yıkanması esasına dayanır. Gruplardan alınan 3-4 ml EDTA'lı tam kan 3000 rpm'de 5 dakika santrifüje edildikten sonra plazma tabakası aspirasyonla uzaklaştırılır. Aspirasyon ile alınan hacim kadar serum fizyolojik (% 0.9 NaCl) eklenir ve tekrar santrifüj edilir. Üst faz yeniden aspire edilir. Bu basamaklar iki kez tekrar edildikten sonra elde edilen eritrosit paketine distile su konarak -80°C'de saklanmıştır. Numuneler acil santrifüj edilip işleme tabi tutulmuştur. Bütün ölçümler aynı zamanda yapılmıştır.

III.2.2. Eritrositler İçin Deney Öncesi Yapılan İşlemler

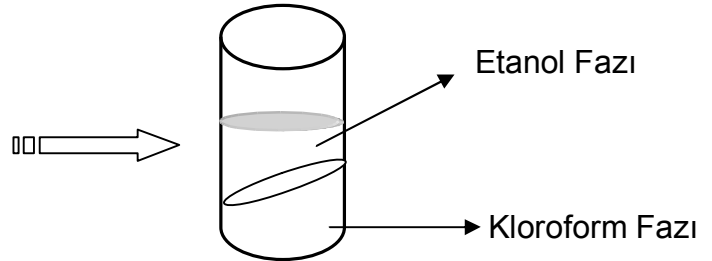
Derin dondurucuda paketlenmiş olarak çıkarılan eritrosit paketleri oda ısısında çözülerek (A);

2 kat distile su ile sulandır.

1 mL al + üzerine
1mL Chloroform/Etanol
(3/5, v/v) karışımı koy,
Vortekste karıştır.

3000 rpm'de 1 saat
(4000 rpm'de 30 dk)
+6 C'de santrifüj et.

Etanol fazını alarak
SOD tayini+Hb tayini yap



III.2.3. SOD Aktivite Tayini

Deneyin prensibi: Ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin, nitrobluetetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanır (84,85). Oluşan süperoksit radikalleri ($O_2\bullet$) ortamdaki NBT' yi indirgeyerek renkli formazon bileşiği oluşturur ve bu kompleks 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda bu indirgeme maksimum olup, mavi-mor renk oluşumu belirgin izlenir. Ortamda SOD bulunması, süperoksit radikalini dismutate edeceğinden NBT' nin indirgenmesi azalır ve renkli formazon oluşumu enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak inhibe olur. Enzim bulunmayan (kör) değer ile enzim bulunan numune absorbans değerleri hesaba katılır.

Hesaplama;

$$\text{Enzimin inhibisyonu} = (\text{Abs}_{\text{kör}} - \text{Abs}_{\text{num}}) / \text{Abs}_{\text{kör}} \times 100$$

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu %50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir. Sonuçlar eritrosit için U/gr Hb olarak ifade edilir.

Reaktifler:

1. 0.3 mmol/L Xanthine
2. 0.3 mmol/L EDTA
3. 150 μmol /L NBT
4. 400 mmol/L Na_2CO_3
5. 1 g/L bovine serum albumin (BSA)
6. 0.8 mmol/L CuCl_2
7. 2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Amonyum sülfat)
8. [167 U/L Xanthine Oxidase(XO)]
9. 150 mM Na CN (Cu-Zn SOD ve MnSOD tayini için)

İlk 5 kimyasal hacimleri koyu renk cam şişeye köpürtülmeden birleştirilir (ASSAY reaktifi). Miadı 2-8 °C'de 2 ay.

Total- SOD Deney Metodu

	Kör (mL)	Numune (mL)	Kör (µL)	Numune (µL)
ASSAY reaktifi	2.85	2.85	1425	1425
Ekstrakt (Etanol fazı)	-	0.10	-	50
Bidistile su	0.10	-	50	-
167 U/L XO	0.05	0.05	25	25

Kör tüpüne enzim ilavesi ile tüp altüst edilir ve inkübasyon süresi başlatılır. 25 °C'de 20 dk inkübasyon sonunda hemen;

0.08 mM/L CuCl ₂	1	1	500	500
-----------------------------	---	---	-----	-----

İlavesi ile reaksiyon durdurulur. Distile suya karşı körden başlanarak numuneler 560 nm'de okunur.

Cu-Zn SOD Deney Metodu

	Kör (mL)	Numune (mL)	Kör (µL)	Numune (µL)
ASSAY reaktifi	2.75	2.75	1375	1375
Ekstrakt (Etanol fazı)	-	0.10	-	50
Bidistile su	0.10	-	50	-
150 mM/L NaCN	0.1	0.1	50	25

25 °C'de 20 dk inkübe edilir. Sonra;

167 U/L XO	0.05	0.05	25	25
------------	------	------	----	----

Kör tüpüne enzim ilavesi ile tüp altüst edilir ve inkübasyon süresi başlatılır. 25 °C'de 20 dk inkübasyon sonunda hemen;

0.08 mM/L CuCl ₂	1	1	500	500
-----------------------------	---	---	-----	-----

İlavesi ile reaksiyon durdurulur. Distile suya karşı körden başlanarak numuneler 560 nm'de okunur.

III.2.4. DNA İzolasyonu

High Pure PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Template Preparation kiti (Roche Diagnostics, Germany) ile çalışılır.

-Liyofilize haldeki Proteinase K 4,5 ml distile su eklenerek alikotlanır (-20 °C' de 12 ay saklanabilir).

-Inhibitör Removal Buffer 20 ml etanol eklenerek hazırlanır.

-Wash Buffer 80ml etanol eklenerek hazırlanır.

Prosedür:

1. 1,5 ml lik ependorf tüplere 200 µl kan örneği alınır.
2. Üzerlerine 200 µl Binding Buffer ve 40 µl Proteinase K eklenerek iyice mix edilir.
3. 10 dk 72 °C'de inkübasyona bırakılır.
4. Daha sonra her tüpe 100 µl isopropanol eklenir ve pipetle mix edilir (DNA'ların çökmesini sağlar).
5. Hasta sayısı kadar toplam tüp çıkartılır ve her birine filter tüp yerleştirilir.
6. Hazırlanan bu karışım toplama tüplere aktarılır.8000x g de 1 dk santrifüj edilir.
7. Toplama tüpler atılır ve filtreli tüpler yeni toplamalara alınır.
8. Her tüpe 500 µl inhibitör removal buffer eklenir. 8000x g de 1 dk santrifüj edilir.
9. Toplama tüpler atılır ve filtreli tüpler yeni toplamalara alınır.
10. Her tüpe 500 µl wash buffer eklenir.8000x g de 1 dk santrifüj edilir.
11. Toplama tüpler atılır ve filtreli tüpler yeni toplamalara alınır.
12. Her tüpe 500 µl wash buffer eklenir. 8000x g de 1 dk santrifüj edilir.
13. Toplamalardaki sıvı dökülür ve tekrar 13000x g de 10 saniye spin yapılır.
14. Toplama tüpler atılır ve filtreli tüpler 1,5ml lik ependorflara alınır.
15. Her tüpe önceden ependorflara bölünerek hazırlanmış ve 72 °C'de bekleyen elution bufferdan 200 µl eklenir.
16. 8000x g de 1 dk santrifüj yapılır.
17. Filtreli tüpler atılır atılır ve DNA 'lar ependorfdadır.

Real Time Ön Hazırlık

1. Soğutma kabı çıkarılır ve örnek sayısı kadar kapiller tüpler yerleştirilir.
2. 1,5ml lik ependorf tüpüne master mix hazırlanır.

Mix (Tek reaksiyon için:15µl) :

- Su
- Mg
- Hybprobe
- SOD primer F
- SOD primer R
- SOD prob fluorescein
- SOD prob LC

3. DNA örnekleri 5µl tüplere dağıtılır.
4. Pozitif kontrol olarak mutasyona sahip olduğu bilinen DNA örneğimiz yine aynı şekilde master miks eklenerek kapillere dağıtılır.
5. Kapillerlerin kapakları kapatılarak 3000 rpm de 5sn spin yapılır ve cihaza yerleştirilir.
6. Run başlatılır ve sonuçlar Tm analizine göre verilir.

III.2.6. PCR

Positif kontrolümüz (Alanin ve Valin sekanslarına sahip heterozigot DNA) DNA Coriell DNA bankasından temin edildi (NA06985). Bu örneklerimiz ve kontrollerimiz ile pozitif kontrolümüzün verdiği melting piklerini karşılaştırma fırsatını sağladı.

Realtime PCR primerleri;

Çalışmada kullandığımız tüm primerler TIB MOLBIOL GmbH Eresburgstraße 22-23 D-12103,Berlin firmasına sentezletildi:

SOD2NPCR F: CAGCCTGCGTAGACGGTCCC

SOD2NPCR R: CGTGGTGCTTGCTGTGGTGC

Florasán Labeled probe: CTCCGGCTTTGGGGTATCTG

Anchor Probe: GCTCCAGGCAGAAGCACAGCCTCC

PCR master miksi, primerlerin her biri kapiler başına 0,5 pmol/ul olacak şekilde, probe konsantrasyonları 0,15 pmol/ul olacak şekilde, Mg⁺² konsantrasyonu 3mM olacak şekilde, LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics, Kat no: 03003248001, Germany) enzim miksi son reaksiyon hacmimiz 20 ul olacak şekilde ayarlandı.

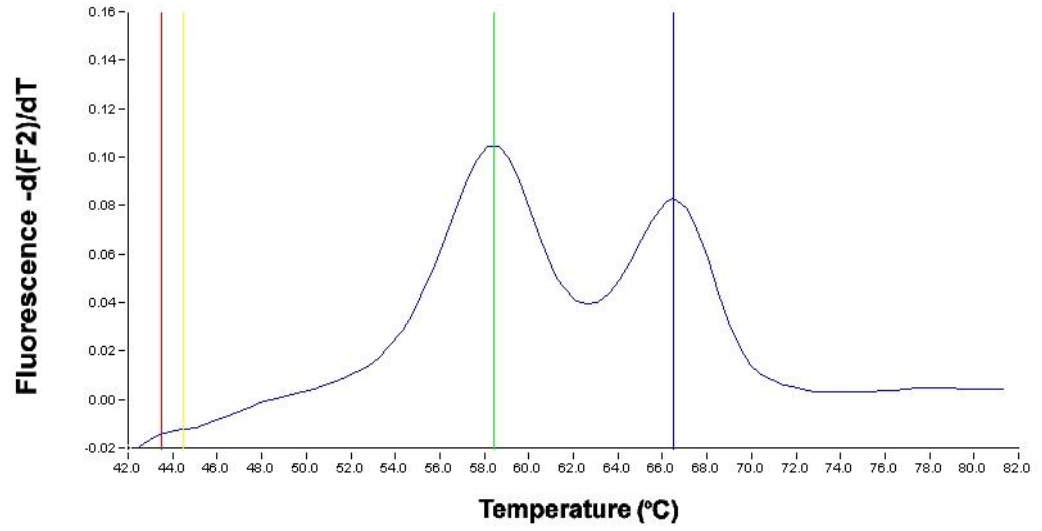
Analiz Protokolü:

95⁰C de 10 dakikalık bir pre-inkubasyon ardından 45 siklus olacak şekilde 95⁰C 10 saniye 60⁰C 20 saniye 72⁰C 20 saniye amplifikasyon programı uygulandı. 60⁰C de florimetrik bir Tek (single) okuma yaptırıldı. Ardından 1 siklus 95⁰C de 0 saniye 40⁰C de 30 saniye ve 95⁰C de 0 saniye 0,1⁰C/saniye sıcaklık artışıyla sürekli floresan okuma (continuous) yaptırıldı. Son olarak cihazı koruma amaçlı soğutma 40⁰C de 30 saniye bekletildi.

Analiz, melting değerleri karşılaştırılarak yapıldı. Kontrol DNA ile örneklerin melting sonuçları karşılaştırılarak wildtype (C nukleotidi ya da Alanin Aminoasiti) ve mutant (T nukleotidi ya da Valin Aminoasiti) olduğuna karar verildi. Probumuz wildtype spesifik olduğu için yüksek derecede pik verenler bizim C nukleotidine sahip bireylerimiz, düşük pike sahip örnekler ise T nukleotidine sahip bireyler olarak isimlendirilmiştir.

MnSOD enzim polimorfizmine ait erime eğrileri (melting curve, Tm) grafik 1, grafik 2 ve grafik 3'de gösterilmiştir. Grafik 1 heterozigot alleleri, grafik 2 valin homozigot ve grafik 3 alanin homozigot allelerine ait eğrileri tanımlamaktadır.

1 hetero kontrol
2 3
3 4
4 5
5 6
6 7
7 8
8 9
9 10
10 11
11 12
12 13
13 14
14 15
15 16
16 17
17 18
18 19
19 20
20 21
21 22
22 23
23 24
24 25
25 26
26 27
27 28
28 29
29 30
30 31
31 32
32 ntc



Digital Filter: Enabled

Calculation Method: Polynomial

Degrees to Average: 5.4

Red cursor Tm = 43.5115

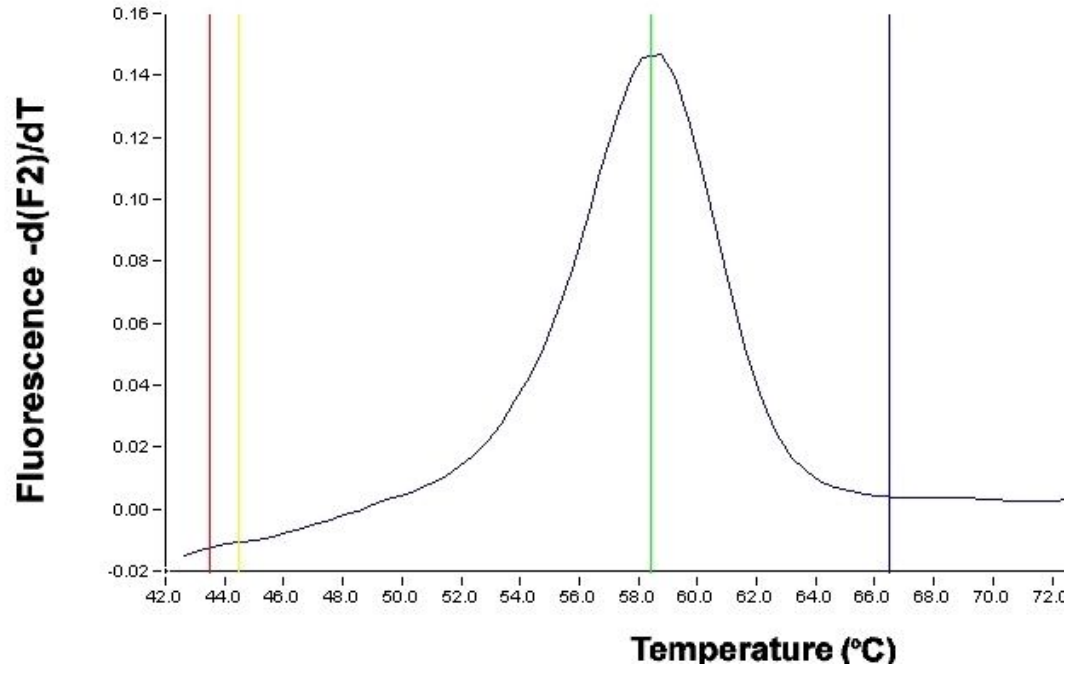
Yellow cursor Tm = 44.4920

Green cursor Tm = 58.4312

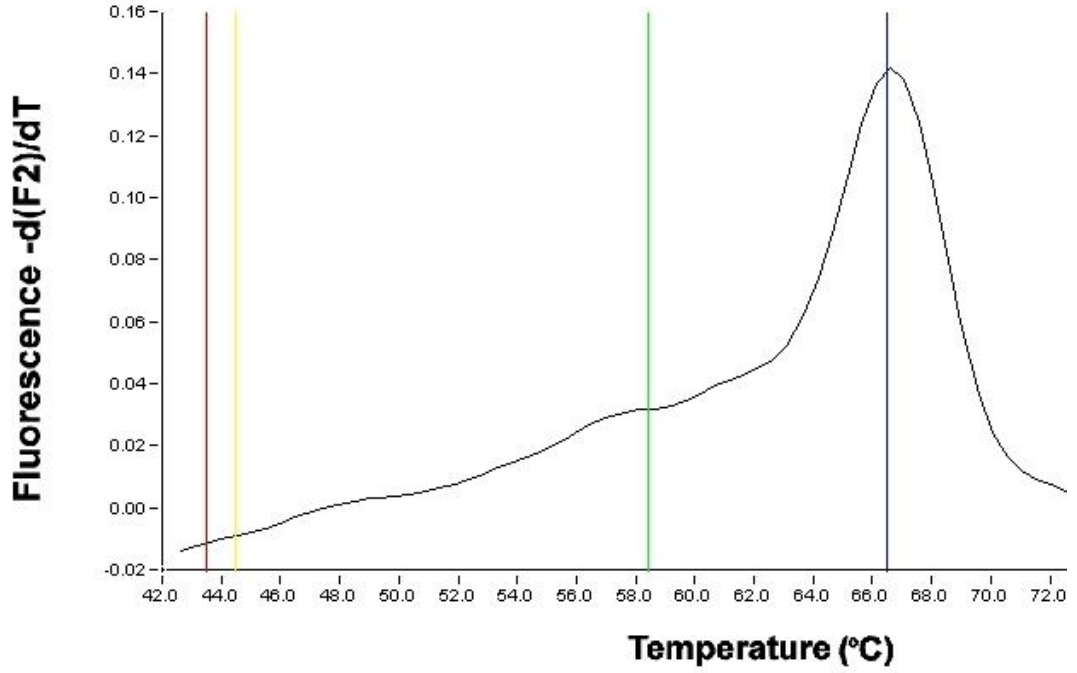
Color Compensation: Off

Blue cursor Tm = 66.4092

Grafik 1 : MnSOD enzim polimorfizmlerine ait her iki Tm de piki olanlar heterozigot allelerini (Ala-Val) göstermektedir. (Tm=Melting Temperature)



Grafik 2 : Tm 54 °C de artış gösteren pikler C (sitozin) gelmesi gerekirken T (timin) bazının yerleştiği mutant olan alleli (Val) göstermektedir.



Grafik 3 : Tm 61 °C civarında artış gösteren pikler ise normal olarak görülmesi gereken T wild tip alleleri (Ala) göstermektedir.

III.3. İstatiksel Analiz

Hasta ve control gruplarına ait demografik verilerin değerlendirilmesinde ki kare, gruplararası Total SOD ve SOD2 enzim düzeylerinin karşılaştırılmasında student's t testleri uygulandı. Alzheimerla SOD2 Ala9Val polimorfizmi arasındaki ilişkiyi göstermek için logistic regresyon analizi uygulanarak %95 güven aralığında Odds Ratio (OR) değerleri hesaplandı. Polimorfik yapı ile enzim düzeyleri arasındaki ilişkiyi göstermede Kruskal Wallis varyans analizi uygulandı. Tüm istatistiksel hesaplamalarda SPSS paket programı (versiyon10.0, SPSS, Chicago, IL) kullanıldı.

IV. BULGULAR

Hastaların demografik verileri Tablo 1 de özetlenmiştir. Yaş ve cinsiyet açısından her iki grupta anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p= 0.07$, $p=0.7$ sırası ile).

Tablo 1: Sağlıklı kontrol (Grup 1) ve Alzheimer hastalarında (Grup 2) yaş ve cinsiyet dağılımı.

	Grup 1 (n: 60)	Grup 2 (n: 53)
Yaş* (%)	< 65	41.2
	65-74	36.7
	≥ 75	59.6
	Total	46.9
Cinsiyet** (%)	Erkek	45
	Kadın	47.9
	Total	46.9

* p : 0.07 ki kare
** p : 0.7 ki kare

Total SOD ve MnSOD enzim aktivitelerine ait veriler ise tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Alzheimer hastaları ve sağlıklı kontrol bireylerinde Total SOD ve MnSOD düzeyleri:

	Grup 1 X ± SD (Median)	Grup 2 X ± SD (Median)	P
Total SOD (U/gHb)	198 ± 93 (203) (n: 60)	224 ± 74 (239) (n: 53)	0.108
Total SOD (U/gHb)	76 ± 51 (75) (n: 50)	144 ± 67 (141) (n: 48)	0.001

SOD polimorfizm yapılarına göre Total SOD ve MnSOD düzeyleri arasında kruskal wallis varyans analizi yöntemi ile yapılan hesaplamada anlamlı bir ilişki gösterilemedi (p:0.8, p:0.5 sırası ile).

Grup 1 ve Grup 2'ye ait SOD2 polimorfizmi allel dağılımı ve odds ratio (OR) oranları tablo 3'de gösterilmektedir. Yapılan regresyon analizi sonuçlarına göre Ala homozigot, Ala/Val heterozigot ve Val homozigot alelleri açısından Alzheimer hastaları ile kontrol grupları arasında herhangi bir fark saptanamadı.

Tablo 3: Alzheimer hastaları ve sağlıklı kontrol bireylerde SOD2 Ala9Val allel dağılımı ve OR oranları:

	Grup 1 (%) (n:58)	Grup 2 (%) (n=48)	OR	CI (%)
Ala/Ala	10.3	12.5	1	
Ala/Val	50	50	0.82	0.236 - 2.901
Val/Val	39.7	37.5	0.78	0.216 - 2.840

Alzheimer hastaları, Ala/Val mutasyonundan Ala/Ala mutasyonuna göre 0.82 kat daha fazla etkilenmektedir (OR: 0.82, %CI: 0.236-2.901).

Alzheimer hastaları, Val/Val mutasyonundan Ala/Ala mutasyonuna göre 0.78 kat daha fazla etkilenmektedir (OR: 0.78, %CI: 0.216-2.840).

Mutasyonlar arasında cinsiyetlere göre farklılık saptanmadı. Erkeklerde Val/Val polimorfizmi daha iyi izlenmekle beraber istatistiksel anlam saptanamadı (OR: 0.167, %CI: 0.14-1.963).

V. TARTIŞMA

Alzheimer hastalığı yaşa bağımlı, özellikle kognitif fonksiyonlarda progresif kayıpla karakterize nörodejeneratif bir bozukluktur. Alzheimer hastalığı gelişiminde rol oynadığı ileri sürülen farklı mekanizmalar vardır. Bunlar arasında en çok suçlananlar 1. Amiloid beta birikimi (86), 2. DNA hasarı (87) ve 3. mitokondrial disfonksiyondur (88). Mitokondri TCA siklusu ve ETZ sistemlerinin yerleştiği ve yüksek enerjili elektronların oksijene aktarılarak ATP'nin sentezlendiği ve bu nedenle çok yüksek oksidatif yüke maruz kalan hücresel organeldir. Buna karşılık MnSOD, süperoksit radikalleri ve diğer bozulmuş oksijen türleri nedeniyle oluşan oksidatif hasara karşı mitokondriyi korumada önemli bir rol oynamaktadır. MnSOD, nükleer-kodlanmış mitokondrial ana antioksidan bir enzimdir ve oksidatif stres tarafından indüklenen beyin hasarı çeşitlerine karşı koruyucudur. İntronik nükleer faktör alanı olan MnSOD'un tümör nekroz faktörü α (TNF- α) tarafından indüksiyonu için şart olan MnSOD geninde bulunan κ B (NF- κ B) bölgesi vardır. Ancak, NF κ B etkinleştirilmesinin oksidatif stresin indüklediği nöronal hasara karşı koruyucu olup olmadığı belirsizdir. β -amiloid ve FeSO₄ karşı maruziyet sonrası, primer nöronal hücrelerin direnç geliştirmeye yönelik TNF- α ile MnSOD indüksiyonu oluşur. Oksidatif stres tarafından indüklenen nöronal hasara karşı koruyucu fonksiyonunu olan MnSOD indüksiyonu için NF- κ B koruma sağlamada kullanılabileceği öneriliyor (89). Sitoplazmadaki önemli bir enzim olan bakır-çinko süperoksit dismutaz ve mitokondrideki MnSOD enzimleri antioksidan etkilerini, süperoksit radikallerini, hızlı ve spesifik bir şekilde hidrojen perokside indirgeyerek ortamdaki uzaklaştırarak gösterirler. Yeni çalışmalar, MS hastalarının lenfositlerinde MnSOD mRNA düzeylerinin önemli şekilde, arttığını göstermektedir (90). Bu da nörodejenerasyonun temelini oluşturan patogenetik mekanizmada oksidatif değişiklerin rolünü desteklemektedir. Alzheimer, serbest radikaller ve mitokondrial disfonksiyon arasındaki bu yakın ilişki antioksidan enzimleri özellikle MnSOD enzimini ve bu enzimi kodlayan genleri Alzheimer patogenezinde potansiyel aday yapmaktadır.

Çalışmamızda AH olan kişilerde Total SOD düzeylerini sağlıklı gruba oranla yüksek bulmakla beraber değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (224 ± 74 U/gHb, 198 ± 93 U/gHb sırası ile, $p=0.108$). Buna karşılık AH'nda MnSOD düzeyleri, sağlıklı kontrol bireylerine göre anlamlı olarak yüksek saptandı (144 ± 67 U/gHb, 76 ± 51 U/gHb sırası ile $p=0.001$). MnSOD'daki bu farklılığın Ala9Val polimorfik yapısı ile olan ilişkisi araştırıldığında SOD2 Ala9Val polimorfizminde AH ile kontrol grupları arasında herhangi bir fark saptanamadı. Alzheimer hastaları ile kontrol gruplarında Ala homozigositesi sırası ile %12.5, %10.3, Ala/Val heterozigositesi sırası ile %50, %50 ve Val homozigotluğu sırası ile %37.5, %39.7 olarak saptandı. Çalışma bulgularımıza göre, AH'ı olan hastalar, Ala/Ala mutasyonuna göre Ala/Val mutasyonundan 0.82 kat daha fazla (OR: 0.82, %CI: 0.236-2.901) ve Val/Val mutasyonundan da 0.78 kat daha fazla etkilenmektedir (OR: 0.78, %CI: 0.216-2.840). Polimorfik yapılarda cinsiyetlere göre farklılık saptanmadı. Erkeklerde Val/Val polimorfizmi olması alzheimer gelişme riskini azaltmakla beraber (OR: 0.167, %CI: 0.14-1.963) istatistiksel olarak anlamlı değildi. Aynı zamanda polimorfik yapılar ile Total SOD ve MnSOD enzim aktiviteleri arasında kruskal wallis varyans analizi yöntemi ile anlamlı bir ilişki saptanamadı ($p=0.8$, $p=0.5$ sırası ile).

Ventriglia M. ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, MnSOD geni Ala9Val polimorfizmi ile İtalya toplumunda Alzheimer hastaları arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve 227 Alzheimer'lı hasta ve 198 sağlıklı kontrolde Ala9Val genotip ve allel sıklığında bizim bulgularımıza benzer şekilde önemli bir fark saptayamamışlardır (90).

Reaktif oksijen türleri, şizofreninin fizyopatolojisi açısından çok önemli bir rol oynamaktadır. Antioksidan enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfizm, şizofreniye yatkınlığa neden olabilmektedir. Bu konu ile ilgili Akyol ve ark.'nın şizofreni ve MnSOD geninin Ala9Val polimorfizmi arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmasında, şizofrenik hastalar ($n=153$) ile MnSOD genindeki fonksiyonel Ala-9Val polimorfizmi arasındaki genetik ilişkiyi ileri sürmüşlerdir. Aynı çalışmada şizofrenikler ve kontroller arasındaki genotipik dağılımda önemli farklılıklar ortaya konulmuştur. Şizofreniklerde genetik dağılım

kontrollerden farklı olarak Ala/Ala %9.2, Ala/Val %69.3 ve Val/Val %21.6 şeklindeyken, kontrollerde ise genetik dağılım sırasıyla %23.5, %42.3 ve %34.2 şeklindedir ($p < 0.0001$). Şizofreni ve -9Ala MnSOD alleli arasındaki ilişkiye bağlı olarak, -9Ala varyantı, şizofreninin fizyopatogenezisinde etkili olabileceğini belirtmişlerdir (91).

Xhosa populasyonunda MnSOD Ala-9Val polimorfizmi ile şizofreninin gelişimi ve istemsiz hareketler arasındaki ilişkiyi araştırılan başka bir çalışmada Ala-9Val polimorfizminde şizofrenik hasta grupları ($n=286$) ve sağlıklı kontrol gruplarının ($n=243$) genotiplenmesi yapılmıştır. Şizofreni ve kontrol grupları arasında, genotip veya allel frekanslarında önemli olmayan farklılıklar gözlenmiştir ($P=0.294$ ve $P=0.528$ sırası ile). Ayrıca, polimorfizm ve semptom şiddeti arasında önemli bir ilişki bulunamamıştır (92).

İnsan mangan MnSOD genindeki fonksiyonel polimorfizmi (Ala9Val) ve şizofreni ve/veya Tardif diskinezi (TD) arasındaki genetik ilişkiyi incelemek için yapılan çalışmada, şizofrenler ($n=192$) ve kontrol ($n=141$) grupları arasındaki allelik veya genotipik dağılımda önemli farklılıklar gözlenmemiştir. Bununla birlikte TD'li grupta şizofrenikler ile şizofrenik olmayanlar arasında genotipik dağılımda önemli bir farklılık tespit edilmiştir ($p=0.03$). Ayrıca TD'li olan hastalarda, Ala9Val (mutant) alleli düşük bulunmuştur ($p = 0.02$; OR = 0.29; %95 CI=0.10-0.83). Ala9Val (yüksek aktiviteli) MnSOD alleli, şizofreniklerdeki TD'ye olan duyarlılığa karşı koruyucu bir rol oynayabileceği belirtilmiştir (93).

Tardif diskinezisi olan ve olmayan Çinli şizofreni hastalarında yaptıkları MnSOD polimorfizm çalışmasında, genetik analizlerle birlikte, enzimin aktivitesi de ölçülmüştür. Polimorfizm ile enzim aktivitesi arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır. MnSOD enzim aktivitesi TD'si olan hastalarda TD'si olmayan hastalar ($P < 0.05$) ve kontrollere ($P < 0.05$) göre önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Ala allelinin sıklığında TD'li grupta (0.14), TD'si olmayan hastalar (0.18) ve kontrollere (0.17) göre önemli ölçüde fark saptanmadı. Enzim aktivitesi ile genotipler karşılaştırıldığında Val/Val genotipine sahip hastaların MnSOD aktivitesi Ala/Val genotipine sahip hastalara göre daha

yüksek bulunmuş ancak fark istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir. Yapılan bu çalışmada; TD'de serbest radikallerin oksidatif regülasyon mekanizmasında bozukluğunun varlığı, genetik polimorfizmin kontrolünde olmadığı sonucuna varılmıştır (94).

Östetik gruplar üzerinde yapılan bir başka çalışmada da, oksidatif strese karşı büyük bir koruma sağlayan MnSOD enzimini kodlayan gen bölgesindeki bir mutasyonun (Ala9Val) etken olduğu anlaşılmıştır (59).

MnSOD gen polimorfizmi (Ala9Val) ile major depresif bozukluk (MDD) ve bipolar hastalık (BD) gibi duygudurum bozuklukları arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Bu çalışmada 80 BD'li, 61 MDD'li hasta ve kontrol olarak 106 sağlıklı insan belirlenmiştir. Sonuç olarak, Ala-9Val polimorfizminde MDD ve BD'li hastaların ve kontrol gruplarının genotip ve allellerinin dağılımı benzer bulunmuştur. Ala-9Val polimorfizminin, duygudurum bozuklukları veya bunların klinik parametreleriyle ilişki olmadığını belirtmişlerdir (95).

Reaktif oksijen metabolitleri ve antioksidantların insan kanserlerinde önemli bir rolü oynadığı artık bilinmektedir. MnSOD mitokondride major antioksidandır. Mitokondride O_2^- ve H_2O_2 'nin düzeylerindeki değişiklik, apoptozisin moleküler mekanizmasındaki değişiklik, hücresel adhezyon ve hücre proliferasyonu kanser gelişmesinde anahtar rolü oynar (95). Önceki çalışmalar MnSOD Val9Ala polimorfizmi ile kanser riski arasında bağı araştırırken, tutarsız sonuçları ortaya koymaktadır.

Yayınlanan 34 yayından 15,320 kanser ve 19,534 kontrol üzerinde yapılan bir meta-analizde MnSOD Val9Ala polimorfizminin kanser üzerine önemli bir majör etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Yine de bir çalışmada prostat kanseri riski artışı ile MnSOD 9Ala ilişkili bulunmuştur. (Val/Ala'a kıyasla Val/Val: OR=1.1; 95% CI= 1.0-1.3; Ala/Ala'ya kıyasla Val/Val: OR=1.3; 95% CI= 1.0-1.6; Val/Ala+Ala/Ala versus Val/Val: OR=1.2; 95% CI= 1.0-1.3). Ayrıca, MnSOD Ala9Ala genotipinin, antioksidanın az tüketen premenopozal kadınlarında artan bir göğüs kanser riskine katkıda bulunduğunu bulunmuştur (96).

İncelenen 13 çalışma ile yapılan başka meta-analiz neticesinde 7366 kanser vakası ve 9102 kontrol dahil olduğu çalışmalarda gösterilmiş ki; Ala9Val polimorfizminin göğüs kanseri riski veya kanser riski ile genel bir ilişki saptanmamıştır (Ala homozigot için OR= 0.98; %95 CI= 0.90-1.07 ve OR= 1.02; 95% CI=0.91-1.14 sırasıyla). Ayrıca MnSOD Ala9Val için her iki dominant veya resesif genin hiçbir büyük etkisi saptanmamıştır (97).

Bu sonuçlara göre, MnSOD Val9Ala polimorfizminin, kötü bir antioksidan dengesi varlığının kanser gelişmesine katkıda bulunabilir. Yine de bu polimorfizm ile kanser arasında ilişki daha büyük çalışmalarla gösterilmeli ve karsinogenezin O_2^- ve H_2O_2 'nin kritik düzeyleri ile korelasyonu hücre biyolojik deneyleri ile belirlenmelidir.

Çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda serbest radikaller bulgularını içeren önemli hipotezler vardır. De Leo ME ve ark. AH oksidatif stresin varlığını değerlendirmek için eritrositte CuZnSOD enzim aktivitesi ve lenfositlerde MnSOD mRNA düzeylerini incelemişler ve total radikal antioksidatif kapasiteyi aynı yaş demans olmayan kontrollerle kıyaslamışlardır (108). De Leo ME ve ark.'ları bizim çalışmamızdaki bulguları destekler şekilde AH'nda toplam antioksidan düzeylerini azalmış ($p < 0.001$ kontrollere karşı) CuZnSOD aktivitesi ve ayrıca MnSOD mRNA düzeylerini ise artmış bulmuşlardır ($p < 0.01$ kontrollere karşı). Bu bulgular, AH nörodejenerasyonun temelini oluşturan patogenetik mekanizmasında oksidatif değişimlerin rolünü desteklemektedir. Benzer şekilde 47 Alzheimer'lı hasta ve 43 sağlıklı kontrol ile yapılan bir diğer çalışmada da Alzheimer grubunun total antioksidan kapasite düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ($p < 0.05$) bulunmuştur (98).

Alzheimer hastalığında, oksidatif stres erken dönemde mevcuttur ve hastalığın patogeneze katkıda bulunmaktadır. Daha önceki çalışmalarda Tg19959 transgenik AH farelerde amiloid patolojilerde mitokondrial antioksidan enzim olan MnSOD kısmi eksikliği bildirilmiştir. Dumont M ve ark.'nın yaptığı çalışmada MnSOD'ın aşırı salınımı AH patogenezinde karşı yararlı olabileceği öne sürülmüştür. Ayrıca alzheimerli transgenik fare

modelinde oksidatif stresin azalması, amiloid birikim ve hafıza yetersizliği MnSOD'un aşırı salınımı ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (99).

mRNA'nın transkripsiyonunda oksidatif stresin etkisini araştırmak için, Rat astroglial hücre kültürlerine H₂O₂ ve paraquat ile oksidatif stres oluşturulmuş ve her iki madde, katalaz ve MnSOD mRNA artışına yol açmıştır. Ayrıca, rat astrositlerinde, oksidatif stres sonrasında MnSOD'in transkripsiyonal düzenlemesi ve katalazın posttranskripsiyonal düzenlemesi için gen ekspresyonu varlığını gösterilmiştir (100).

Alzheimer hastalığı, beta amiloid birikimi, oksidatif stres ve mitokondrial disfonksiyon ilişkisini araştıran bir çalışmada araştırmacılar MnSOD düzeylerinin gelişmekte olan nöronlarda beta amiloid toksitesinin neden olduğu oksidatif hasara karşı arttığı ve nöronları koruyucu rol oynadığını ileri sürmüşlerdir (101).

Sonuç olarak, alzheimer hastalarında total SOD ve özellikle MnSOD'un artmıştır. Buna bağlı olarak alzheimerin patogeneğinde serbest radikal mekanizmasında bir bozukluk olduğunu desteklemektedir. Bu artmış MnSOD düzeylerinin artmış radikal yüküne karşı mitokondri gibi santral sinir sistemi için çok kritik bir organeli koruma amaçlı olduğu açıktır. Burada önemli olan nokta alzheimer patofizyolojisinin mi radikal yükünü arttırdığı (örneğin biriken amiloid beta protein) veya artmış radikal üretiminin mitokondrial disfonksiyon oluşturarak alzheimer gelişimine katkıda mı bulunduğudur? Her iki durumda da serbest radikallerin ve MnSOD'un alzheimer ile iç içe olduğu düşünülebilir. Yine bulgularımız MnSOD'un bu değişiminde polimorfik yapısının etkili olmadığını ortaya koymaktadır. Sonuçta, MnSOD ve mitokondrial disfonksiyon alzheimer patofizyolojisinde önemli iken MnSOD'un polimorfik yapısının patofizyolojiye katkıda bulunmadığını düşünmekteyiz.

VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Alzheimer hastalığı bilişsel yıkımla giden, hastanın işlevselliğini etkileyerek başkalarına olan bağımlılığını artıran bir hastalıktır. Dünyada ve ülkemizde yaşlı insan popülasyonu giderek artmaktadır ve bunun bir sonucu olarak Alzheimer hastalığının prevalansı artmaktadır.

Alzheimer hastalığı olduğu bilinen hasta grupları üzerinde yaptığımız çalışmalarda elde ettiğimiz sonuçlara göre, oksidatif strese karşı koruma sağlayan MnSOD ve Total SOD enzim düzeyleri artmıştır. Bu artmış MnSOD düzeylerinin artmış radikal yüküne karşı mitokondri gibi santral sinir sistemi için çok kritik bir organeli koruma amaçlıdır. Sonuçta, MnSOD ve mitokondrial disfonksiyon alzheimer patofizyolojisinde önemlidir. Ayrıca MnSOD enzimini kodlayan gen bölgesindeki Ala9Val mutasyonunun alzheimer hastalığının patofizyolojisinde bir etken olmadığı anlaşılmıştır.

Elde edilen bu sonuçlar alzheimer hastalığı açısından ülkemizde yeni bir bulgu olup, hastalığın tedavisi ve bu hastalığa karşı alınacak önlemlerde yol gösterici olacağı düşünülmektedir. Bu konudaki ilerlemeler sayesinde hem tedavi, hem de korunma konusunda gelişmeler olacaktır.

VII. ÖZET

Amaç ve kapsam: Alzheimer hastalığı gelişiminde mangan superoksit dismutaz (SOD2) Ala9Val enzim gen polimorfizmlerinin ve aktivitesinin etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Materyal-metod: Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin ve Manisa Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Hastanesi nöroloji polikliniğine başvuran ve AH tanısı almış, kendisinden veya vasisinden izin alınmış 53 kişilik hasta grubu ile alzheimer demans olmayan kişilerden izin alınarak 60 kişilik yaşa ve cinsiyete uygun kontrol grubu oluşturuldu. SOD aktivite tayini, NBT indirgemesi esasına dayanılarak yapıldı. Real time PCR ile DNA örnekleri çalışıldı.

Bulgular: SOD2 Ala9Val polimorfizminde AH ile kontrol grupları arasında Ala homozigot (%12.5, %10.3 sırası ile), Ala/Val heterozigot (%50, %50 sırası ile) ve Val homozigot (%37.5, %39.7 sırası ile) arasında herhangi bir fark saptanamadı. Bununla birlikte, AH'lı kişiler, Ala/Ala mutasyonuna göre Ala/Val mutasyonundan 0.82 kat daha fazla (OR: 0.82, %CI: 0.236-2.901) ve Val/Val mutasyonundan da 0.78 kat daha fazla etkilenmektedir (OR: 0.78, %CI: 0.216-2.840).

Çalışmamızda AH olan kişilerde Total SOD düzeylerini sağlıklı gruba oranla yüksek bulmakla beraber değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (224 ± 74 U/gHb, 198 ± 93 U/gHb sırası ile, $p=0.108$). Buna karşılık AH'nda MnSOD düzeyleri, sağlıklı kontrol bireylerine göre anlamlı olarak yüksek saptandı (144 ± 67 U/gHb, 76 ± 51 U/gHb sırası ile $p=0.001$).

Sonuç: Alzheimer hastalarında total SOD ve özellikle MnSOD'un atıvitesi artmıştır. MnSOD ve mitokondrial disfonksiyon alzheimer patofizyolojisinde önemli iken MnSOD'un polimorfik yapısının patofizyolojiye katkıda bulunmadığını düşünmekteyiz. Daha geniş popülasyonlarda yapılacak çalışmalarda istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar bulunabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer Hastalığı, MnSOD, Ala9Val, Total SOD

VIII. İNGİLİZCE ÖZET / ABSTRACH

Objective: In this study, we aimed to measure MnSOD levels and SOD-2 Ala9Val polymorphisms on Alzheimer patients.

Materials and Method: The study was designed in Celal Bayar University, School of Medicine, Department of Clinical Biochemistry, Department of Neurology and Manisa Mental Hospital Neurology Clinic and was approved by the local ethical committee of the university hospital. We selected 53 Alzheimer's patients (group 1), and 60 control samples (group 2) from age and sex matched healthy volunteers.

The principle of the total SOD (EC 1.15.1.1) activity method is based, briefly, on the inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction by O_2^- generated by xanthine/xanthine oxidase system. Mn-SOD genotypes were determined by means of real time PCR on a LightCycler analyzer (Roche Diagnostics).

Results: There was no difference in Ala homozygosity (12.5%, 10.3% respectively), Ala/Val heterozygosity (50%, 50% respectively) and Val homozygosity (37.5%, 39.7% respectively) between group 1 and group 2. However, Ala/Val (OR: 0.82, %CI: 0.236-2.901) and Val/Val (OR: 0.78, %CI: 0.216-2.840) mutations were less prevalent in Alzheimer patients. MnSOD levels were significantly higher in group 1 (144 ± 67 U/gHb, 76 ± 51 U/gHb respectively, $p=0.001$), but higher total SOD levels did not reach a significant difference (224 ± 74 U/gHb, 198 ± 93 U/gHb respectively, $p=0.108$).

Conclusion: We consider that higher total SOD and MnSOD may be secondary to mitochondrial dysfunction which may play a role in the pathophysiology of Alzheimer disease.

Key Words: Alzheimer Disease, MnSOD, Ala9Val, Total SOD

IX. KAYNAKLAR

1. İçelli İ, Demans ve Komorbid Durumları, Psikiyatri Dünyası. 2001;5:49-54.
2. Kaplan & Sadock Klinik Psikiyatri, El Kitabı. Çeviri Editörü: Prof. Dr. Ercan Abay. 2.Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1999: 31-34.
3. Selekler K.Alzheimer ve diğer demanslar. Ankara:Güneş Kitabevi, 2003: 67-81
4. Kawas CH. Epidemiology of Alzheimer's Disease. in: Dementia Update. American Academy of Neurology 49th Annual Meeting, April 12-19, 1997 Boston, MA:1997, American Academy of Neurology Press, USA, 1997; 23-38.
5. Amaducci L, Falcini M, Lippi A. Descriptive epidemiology and risk factors for Alzheimer's disease. Acta Neurol Scand Suppl. 1992;139:21-5.
6. Hofman A, Schulte W, Tanja TA, et al. History of dementia and Parkinson's disease in 1 st-degree relatives of patients with Alzheimer's disease. Neurology 1989; 39:1589-1592.
7. Relkin NR; The clinical utility of Apolipoprotein E genotyping in neurological practice. In; Dementia Update. American Academy of Neurology 49th Annual Meeting,1997 Boston, MA: 1997, American Academy of Neurology Press, USA, 1997:63-75.
8. Topçuoğlu ES, Selekler K. Alzheimer Hastalığı.Turkish Journal of Geriatrics, Geriatri 1. 1998: 63-67.
9. Rocca WA, van Duijn CM, Clayton D, et al. Maternal age and Alzheimer's disease; A collaborative re-analysis of case-control studies. International Journal of Epidemiology 1991; 20:S21-S27.
10. McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: A review of 17 epidemiologic studies. Neurology 1997; 47:425-432.
11. Rocco A. Hofman A, Brayne C, et al. Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. The EURODEM-Prevalence Research Group. Annals of Neurology 1991; 30: 81-90.

12. Eker E, Türkiye’de sık karşılaşılan psikiyatrik hastalıklar; Sempozyum Dizisi No:62. 2008; S:85-110.
13. Eker E. Alzheimer Hastalığı Ve Diğer Demanslar Türkiye Klinikleri Dahili Tıp Bilimleri Dergisi Psikiyatri 2005;1:3-16.
14. Schellenberg GD. Genetic dissection of Alzheimer disease, a heterogeneous disorder. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92(19):8552-9.
15. O’Brien JT, Ballard CG. Drugs for Alzheimer’s Disease. BMJ. 2001; 323:123–4
16. Cruts M, Van Duijn C.M, Backhovens H, et al. Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and -2 mutations in a population based study of presenile Alzheimer disease. Human Molecular Genetics. 1998; 7: 43- 51.
17. Öztürk Ş. Apolipoprotein E ve Alzheimer Hastalığı, Demans Dizisi. 1999;1:62-67.
18. Sherrington R, Froelich S, Sorbi S. Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. Hum Mol Genet. 1996; 5:985-8.
19. Blacker D, Bertram L, Saunders A, et al. Results of a high-resolution genome screen of 437 Alzheimer’s Disease families. Hum Mol Genet. 2003;12: 23–32
20. Gao S, Hendrie HC, Hall KS, et al. The Relationships Between Age, Sex, and the Incidence of Dementia and Alzheimer Disease Arch Gen Psychiatry. 1998;55:809-15.
21. Kawas C, Gray S, Fozard J. Age-specific incidence rates of Alzheimer’s disease: The Baltimore Longitudinal Study’ Neurology, 2000; 54: 2072-2077.
22. Miech RA, Breitner JC, Zandi PP, et al. Incidence of AD may decline in the early 90s for men, later for women: The Cache County study. Neurology. 2002; 58:209-18.
23. Altın M. Alzheimer Tipi Demans Hastalarına Bakım Verenlerde Tükenmişlik Ve Anksiyete[Tez], Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Psikiyatri Kliniği, 2006.1-11s.

24. Ganguli M, Dodge HH, Chen P, et al. Ten-year incidence of dementia in a rural elderly US community population. *Neurology*. 2000; 54:1109–16.
25. Tyas SL. Alcohol use and the risk of developing Alzheimer's disease. *Alcohol Res Health*. 2001;25: 299–306
26. Teri L, Hughes JP, Larson EB. Cognitive deterioration in Alzheimer's disease: Behavioral and health factors. *J Gerontol*. 1990; 45:P58–P63.
27. Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, et al. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ*. 2001; 322:1447-51.
28. Doll R, Peto R, Boreham J, et al. Smoking and dementia in male British doctors: prospective study. *BMJ*. 2000; 320:1097–1102
29. Mesulam M. Davranışsal ve Kognitif Nörolojinin ilkeleri Çeviri Editörü I.Hakan Gürvit Oxford University Pres. Inc.2000. Yelkovan Yayıncılık. 2004
30. Braak H, Braak E, Bohl J, et al. Alzheimer's disease: amyloid plaques in the cerebellum. *J Neurol Sci*. 1989; 93:277-87.
31. Adams C; Alzheimer's Disease Research; A game of connect the dots. *Gerontology* 1997; 43:8-19
32. Selkoe DJ. Deciphering the genesis and fate of amyloid β -protein yields novel therapies for Alzheimer disease. *J Clin Invest*. 2002; 110:1375-81.
33. Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trend Neurosci*. 1997; 20: 154-9
34. Fraser SP, Suh YH, Djamgoz MBA. Ionic effects of the Alzheimer's disease B-amyloid precursor protein and its metabolic fragments. *Trends in Neurosciences*. 1997; 20:67-72
35. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, et al. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin I variants elevate Abeta 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*. 1996; 17:1005-13.
36. Gımsalı A, Yazgan Ç. Hafif Bilişsel Bozulma; *Türk Psikiyatri Dergisi*. 2004;15:309–316
37. Selekler K. Alzheimer hastalığının öncesi hafif kognitif bozukluk; *Hacettepe Tıp Dergisi*. 2004; 35: 199–206

38. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, et al. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol*, 1999;56: 303–308
39. Morris JC, McKeel DW Jr, Storandt M, et al. Very mild Alzheimer's disease: informant-based clinical, psychometric, and pathologic distinction from normal aging. *Neurology*. 1991;41(4):469-78.
40. Daffner KR, Scinto LFM. Alzheimer hastalığının erken tanısı. In: Scinto LFM, Daffner KR (eds). Çeviri editörü: Ertaş M. Alzheimer hastalığının erken tanısı. Totowa, New Jersey: Humana Yayıncılık. 2000; 1–27.
41. Ellis RJ, Olichney JM, Thal LJ, et al. Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease: the CERAD experience, Part XV. *Neurology*. 1996;46:1592–6.
42. Hubbard BM, Fenton GW, Anderson JM. A quantitative histological study of early clinical and preclinical Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1990;16:111–21
43. Katzman R, Terry R, DeTeresa R et al. Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann Neurol*. 1988; 23:138–44.
44. Hughes CP, Berg L, Danziger WL et al. A new clinical scale for the staging of dementia. *Br J Psychiatry*. 1982; 140:566–72
45. White L, Petrovitch H, Ross GW. Prevalence of dementia in older Japanese-American men in Hawaii: the Honolulu-Asia Aging Study. *JAMA*. 1996; 276:955–60
46. Terry RD, Katzman R, Bick KL, et al. Alzheimer Disease. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, (2nd edition). Çev. edi: Doç. Dr İ. Hakan Gürvit Yelkovan yayıncılık 1999; 11–25
47. McKhann G, Drachman D, Folstein M, et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984;34:939–44
48. Amerikan Psikiyatri Birliği: Psikiyatride Hastalıkların Tanımlanması ve Sınıflandırılması El Kitabı, Yeniden Gözden Geçirilmiş Dördüncü Baskı (DSM-IV-TR), Amerikan Psikiyatri Birliği, Washington DC, 2000'den çeviren Köroğlu E, Hekimler Yayın Birliği, Ankara, 2001.

49. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, Antioxidants, and The Degenerative Diseases of Aging, PNAS. 1993; 90:7915-7922.
50. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, et al. Potential markers of oxidative stress in stroke. Free Radical Biology & Medicine. 2005.39: 841 – 852.
51. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol. 2001;54:176-186.
52. Vincent AM, Russell JW, Low P, et al. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. Endocrine Reviews. 2004; 25: 612–628.
53. Cheeseman KH, Slater TF. An Introduction to Free Radical Biochemistry. Br Med Bull.1993; 49:481-493.
54. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya. 1995.
55. Basaga HS. Biochemical Aspects of Free Radicals. Biochem Cell Biol.1990; 68:989-998.
56. Freeman BA, Crapo JD. Hyperoxia Increases Oxygen Radical Production in Rat Lungs and Lung Mitochondria. J. Biol. Chem, 1981; 256:10986-10992.
57. Grisham MB, Granger DN. Metabolic Sources Of Reactive Oxygen Metabolites During Oxidant Stress and Ischemia with Reperfusion. Clin Chest Med.1989; 10:71-81.
58. Dikici İ. Akut Viral Hepatitlerle İnterferon Tedavisi Görmüş Kronik Viral Hepatitlerde Oksidatif Stresin Araştırılması [Tez]. Selçuk Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, 1999. 73s.
59. Erbil N. Süperoksit dismutaz enzimini kodlayan gen (SOD2) ile otizm hastalığının ilişkisi [Tez]. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 2008. 1-15s.
60. Özyurt H. Deneysel Olarak Bleomisin ile Sıçan Akciğerinde Oluşturulan Fibroziste Serbest Radikallerin Rolü ve Fibrozis Oluşturan Mekanizmalar Üzerine Kafeik Asit Fenetil Esterin (CAPE) Etkisi [Tez]. Malatya İnönü Üniversitesi, 2002.
61. Rice-evans CA, Diplock AT, Symons MCR. Techniques in Free Radicals Research. 1991. vol 22.

62. Taysi S, Gul M, Sari RA, Akcay F, ve ark. Oxidant/antioxidant status in serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Chem Lab Med.* 2002;40: 684–688
63. Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, et al. Structural Dimorphism in The Mitochondrial Targeting Sequence in The Human Manganese Superoxide Dismutase Gene. A Predictive Evidence for Conformational Change to Influence Mitochondrial Transport and A Study of Allelic Association in Parkinson's Disease. *Biochem. Biophys Res Commun,* 1996; 226:561–565.
64. Horrobin DF, Glen AIM, Vaddadi K. The Membrane Hypothesis Of Schizophrenia. *Schizophr Res* 1994.13:195-207.
65. Marklund SL. Properties of Extracellular Superoxide Dismutase from Human Lung. *Biochem J.* 1984. 220:269-272.
66. Greenleaf WB. Role of hydrogen bonding in the active site of human manganese superoxide dismutase. *Biochemistry,* 2004. 43:7038-45.
67. Brand MD. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37:755-767.
68. Jezek P. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37:2478-2503)
69. Church SL, Grant JW, Meese EU, et al. Sublocalization of The Gene Encoding Manganese Superoxide Dismutase (Mnsod/SOD2) to 6q25 by Fluorescence in Situ Hybridization and Somatic Cell Hybrid Mapping. *Genomics.*1992; 14:823–825.
70. Wispe JR, Clarck JC, Burhans MS. Synthesis and Processing of The Precursor for Human Manganosuperoxide Dismutase. *Biochim Biophys Acta.* 1989; 994:30-36.
71. Rosenblum JS, Gilula NB, Lerner RA. On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93:4471-3.

72. Zhang HJ, Yan T, Oberley TD, et al. Comparison of effects of two polymorphic variants of manganese superoxide dismutase on human breast MCF-7 cancer cell phenotype. *Cancer Res.* 1999; 59:6276-83.
73. Hernandez-Saavedra and McCord. Paradoxical effects of thiol reagents on Jurkat cells and a new thiol-sensitive mutant form of human mitochondrial superoxide dismutase. *Cancer Res.* 2003;63:159
74. Borgstahl GE, Parge HE, Hickey MJ, et al. The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles *Cell.* 1992; 71:107-18
75. Barra D, Schinina ME, Simmaco M, et al. The primary structure of human liver manganese superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1984; 259:12595-601
76. Zhang HJ, Drake VJ, Xu L, et al. Redox regulation of adenovirus-induced AP-1 activation by overexpression of manganese-containing superoxide dismutase. *J Virol.* 2002; 76:355-63.
77. Epperly MW, Defilippi S, Sikora C, et al. Radioprotection of lung and esophagus by overexpression of the human manganese superoxide dismutase transgene. *Mil Med.* 2002.167(2 Suppl):71-3.
78. Oberley LW. Anticancer therapy by overexpression of superoxide dismutase. *Antioxid Redox Signal.* 2001; 3:461-72.
79. Zhao Y, Xue Y, Oberley TD, et al. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor formation by modulation of activator protein-1 signaling in a multistage skin carcinogenesis model. *Cancer Res.* 2001.61(16):6082-8.
80. Ambrosone CB, Freudenheim JL, Thompson PA, et al. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. *Cancer Res.* 1999; 59:602-6.
81. Güvenç Y. Portal hipertansiyon oluşturulmuş ratlarda. İnce Barsak, kolon ve pankreas dokularında oksidatif stresin araştırılması [Tez]. Celal Bayar Üniversitesi. 2003.
82. Onur E. Defibrotidin aterojenik diyet uygulanan tavşanlarda beyin ve böbrek serbest radikal ve antioksidanlara etkisi [Tez]. Ege Tıp Fakültesi. 1999.

83. Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 1996; 27: 1121-1128.
84. Sun Y, Oberly LW, Ying L. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 1988; 34: 497-500.
85. Durak I, Yurtaslan Z, Canbolat O, Akyol O. A methodological approach to superoxide dismutase activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium reduction. *Clin Chem Acta*. 1993; 214: 103-104.
86. Sun L, König IR, Homann N. Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) Polymorphism, Alcohol, Cigarette Smoking and Risk of Oesophageal Cancer. *Alcohol Alcohol*. 2009. [Epub ahead of print].
87. Mitrunen K, Sillanpaa P, Kataja V, et al. Association Between Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) Gene polymorphism and Breast Cancer Risk. *Carcinogenesis*. 2001; 22:827-829.
88. Cengiz M, Ozaydin A, Ozkılıc AC, et al. The Investigation of GSTT1, GSTM1 and SOD Polymorphism in Bladder Cancer Patients. *International Urology and Nephrology*. 2007; 39:1043-1048.
89. Sompol P, Xu Y, Ittarat W et al. NF-kappaB-associated MnSOD induction protects against beta-amyloid-induced neuronal apoptosis. *J Mol Neurosci* 2006; 29:279-88.
90. Ventriglia M, Chiavetto LB, Scassellati C, et al. Lack of association between MnSOD gene polymorphism and sporadic Alzheimer's disease. *Aging Clin Exp Res*. 2005;17:445-8.
91. Akyol O, Yanik M, Elyas H, ve ark. Association between Ala-9Val polymorphism of MnSOD gene and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005;29:123-31.
92. Hitzeroth A, Niehaus DJ, Koen L, et al. Association between the MnSOD Ala-9Val polymorphism and development of schizophrenia and abnormal involuntary movements in the Xhosa population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007.13;31:664-72.
93. Hori H, Ohmori O, Shinkai T, et al. Manganese superoxide dismutase gene polymorphism and schizophrenia: relation to tardive dyskinesia. *Neuropsychopharmacology*. 2000; 23:170-7.

94. Zhang Z, Zhang X, Hou G, et al. The increased activity of plasma manganese superoxide dismutase in tardive dyskinesia is unrelated to the Ala-9Val polymorphism. *J Psychiatr Res.* 2002; 36:317-24.
95. Pae CU, Yoon SJ, Patkar A, et al. Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD: Ala-9Val) Gene Polymorphism and Mood Disorders: A Preliminary Study. *Progress in Neuro-Psycho-pharmacology & Biological Psychiatry.* 2006; 30:1326-1329.
96. Wang S, Wang F, Shi X, et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) Val-9Ala polymorphism and cancer risk - A meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2009. [Epub ahead of print].
97. Bag A, Bag N. Target sequence polymorphism of human manganese superoxide dismutase gene and its association with cancer risk: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17:3298-305.
98. Vural H, Vural DC, Yılmaz N, ve ark. Alzheimer hastalığında total antioksidan kapasitenin araştırılması. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2007; 5: 63 - 66.
99. Dumont M, Wille E, Stack C, et al. Reduction of oxidative stress, amyloid deposition, and memory deficit by manganese superoxide dismutase overexpression in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2009 [Epub ahead of print].
100. Röhrdanz E, Schmuck G, Ohler S, et al. The influence of oxidative stress on catalase and MnSOD gene transcription in astrocytes. *Brain Res.* 2001; 900:128-36.
101. Sompol P, Ittarat W, Tangpong J, et al. A neuronal model of Alzheimer's disease: an insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury. *Neuroscience.* 2008;153:120-30.