



**Paraoksonaz 1 (PON1) Genetik Polimorfizmlerinin
Psödoeksfoliasyon Sendromu ve
Psödoeksfoliasyon Glokomu'ndaki Rolünün
Araştırılması**

Program Kodu: 1002

Proje No: 315S190

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Birsen Can Demirdöğen

Araştırmacılar:
Doç. Dr. Tarkan Mumcuoğlu
Yard. Doç. Dr. Gökhan Özge

Bursiyerler:
Ezgi Göksoy
Gizem Yakar

AĞUSTOS 2017
ANKARA



ÖNSÖZ

Psödoeksfoliasyon sendromu (PES) göz dokularında anormal fibriler materyallerin üretilip birikmesiyle karakterize bir hücre dışı matriks hastalığıdır. Psödoeksfoliasyon materyali, aköz sıvısının drenajını sağlayan kanalları tıkayarak göz içi basıncının artmasına sebep olarak glokoma (PEG) ve görme kaybına yol açabilir. Glokom görme kaybına neden olan ikinci büyük faktördür ve PES'li hastaların PEG geliştirme ihtimali %34.3'tür. PES patofizyolojisinin büyüme faktörlerinin fazla salgılanması, oksidatif stresin artması ve hücresel stres yanıtının bozulması gibi birçok faktörle ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Paraoksonaz 1 (PON1) iyi bilinen antioksidan enzimlerden biridir ve gözde aköz humorde de ifade edildiği bilinmektedir. Toplumda serum paraoksonaz aktivitesi yönünden kişiler, yüksek, orta ve düşük aktivite gösterenler olmak üzere üç fenotipik grupta toplanmaktadır. Bu aktivite polimorfizminin temelinde PON1 geninin kodlayan bölgesinde yer alan 192Q/R ve 55L/M tek nükleotit polimorfizmleri (SNP) bulunmaktadır. Ayrıca, PON1 geninin promotor bölgesindeki polimorfizmlerden -107T/C, PON1 ifade seviyesindeki farklılıkların %22,4'ünden sorumludur. Tek kör randomize olarak planlanan bu çalışmada PON1 genetik polimorfizmlerinin (192Q/R, 55L/M ve -107T/C) PES ve PEG ile ilişkisinin incelenmesi ve bu polimorfizmlerin PES ve/veya PEG tanısında ve PEG yatkınlığı olan PES hastalarının erken teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır.

150 PEG hastası, 150 PES hastası ve 150 kontrol ile yapılan çalışma sonucunda, PON1 192Q/R ve 55L/M polimorfizmlerinin kontroller için PES veya PEG riski bakımından fark yaratmadığı gözlenmiştir. 192Q/R polimorfizmi PES hastalarının PEG oluşturma riski açısından da ilişkisiz bulunmuş, ancak PES hastaları için, 55MM genotipine sahip olmanın, 55LM veya LL genotipine göre, PEG için 0.49 kat (OR=0.490, P=0.048) riskli, diğer bir ifade ile yaklaşık 2 kat koruyucu olduğu ortaya çıkmıştır. PON1 -107C aleli taşıyan genotipe sahip olmanın, taşımayan genotipe göre PES için 0.573 kat riskli (yani 1.74 kat daha koruyucu) (P=0.022) olduğu; öte yandan PES hastaları arasında C aleli taşıyan genotipe sahip olmanın, TT genotipine göre, PEG riskini 1.690 kat arttırdığı (P=0.030) hesaplanmıştır. Sonuç olarak, bu polimorfizmler PES ve PEG kapsamında ilk kez incelenmiş olup, bazı alellerin varlığı PES/PEG ile ilişkili bulunmuştur.

Bu proje 315S190 proje koduyla TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----|
| ÖNSÖZ..... | i |
| İÇİNDEKİLER..... | ii |
| TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ..... | iv |
| ÖZET..... | vi |
| ABSTRACT..... | vii |
| 1.GİRİŞ..... | 01 |
| 2.LİTERATÜR ÖZETİ..... | 02 |
| 2.1 Psödoeksfoliyasyon Sendromu Ve Psödoeksfoliyasyon Glokomu..... | 02 |
| 2.2 Epidemiyoloji..... | 03 |
| 2.3 Önemi..... | 04 |
| 2.4 Psödoeksfoliyasyon Sendromunun Patogenezi..... | 05 |
| 2.5 Paraoksonaz 1 (PON1)..... | 07 |
| 2.6 PON1 192Q/R Polimorfizmi (rs662)..... | 08 |
| 2.7 PON1 55L/M Polimorfizmi (rs854560)..... | 09 |
| 2.8 PON1 -107T/C Polimorfizmi (rs705379)..... | 09 |
| 2.9 PON1 ve Psödoeksfoliyasyon Sendromu..... | 10 |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM..... | 12 |
| 3.1 Gönüllülerden Kan Örneklerinin Toplanması..... | 12 |
| 3.2 Cihaz, Sarf Malzemesi ve Kimyasalların Satın Alınması..... | 13 |
| 3.3 DNA İzolasyonu ve DNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Analizleri..... | 13 |
| 3.4 PES, PEG ve Kontrollerin PON1 Genotiplerinin Belirlenmesi..... | 15 |
| 3.4.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)..... | 15 |
| 3.4.1.1 PON1 192 Q/R Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu..... | 16 |
| 3.4.1.2 PON1 55 L/M Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu..... | 18 |
| 3.4.1.3 PON1 -107 T/C Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu..... | 20 |
| 3.4.2 PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleriyle Kırılması..... | 22 |
| 3.4.2.1 PON1 192 Q/R Bölgesine Ait PCR Ürününün Restriksiyon Endonükleaz Enzimiyle Kırılması..... | 22 |
| 3.4.2.2 PON1 55 L/M Bölgesine Ait PCR Ürününün Restriksiyon Endonükleaz Enzimiyle Kırılması..... | 24 |
| 3.4.2.3 PON1 -107 T/C Bölgesine Ait PCR Ürününün Restriksiyon Endonükleaz Enzimiyle Kırılması..... | 26 |
| 3.5 İstatistik analizler..... | 28 |



| | |
|--|----|
| 4. BULGULAR..... | 29 |
| 4.1 Genotip Sonuçları..... | 29 |
| 4.1.1 PON1 192 Q/R Tek Nükleotit Polimorfizmi Genotip Sonuçları..... | 29 |
| 4.1.2 PON1 55 L/M Tek Nükleotit Polimorfizmi Genotip Sonuçları..... | 30 |
| 4.1.3 PON1 -107 T/C Tek Nükleotit Polimorfizmi Genotip Sonuçları..... | 31 |
| 4.1.4 Üçlü Haplotip Dağılımı..... | 33 |
| 4.2 Önceden fenotip verisi olan hastaların genotip bilgilerinin analizi..... | 35 |
| 4.2.1 PON1 Genotipleri ile fenotipleri arasındaki korelasyon..... | 35 |
| 4.2.2 PON1 Genotipleri ile PON1, stPON1 ve ARE enzim aktiviteleri arasındaki korelasyon..... | 35 |
| 4.3 Lojistik regresyon analizi..... | 36 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ..... | 37 |
| 6. REFERANSLAR..... | 40 |
| PROJE ÖZET BİLGİ FORMU..... | 46 |

TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

| Tablo Adı | Sayfa No |
|--|-----------------|
| Tablo 1. PON1 192Q/R alellerinin substrat seçiciliği | 09 |
| Tablo 2. PES hastası, PEG hastası ve kontrol bireylerin demografik bilgileri | 13 |
| Tablo 3. PON1 genetik polimorfizmlerinin belirlenmesi; primerlerin sekansı, PCR sırasında primerlerin kalıp DNA'ya yapışması için uygulanan sıcaklık (T _m), PCR ürününü kırmak için kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimi ve kırılma ürünlerinin beklenen uzunluğu | 15 |
| Tablo 4. 192 Q/R tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan reaksiyon içeriği | 17 |
| Tablo 5. 192 Q/R tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı | 17 |
| Tablo 6. 55 L/M tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan reaksiyon içeriği | 19 |
| Tablo 7. 55 L/M tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı | 19 |
| Tablo 8. -107 T/C tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan reaksiyon içeriği | 21 |
| Tablo 9. -107 T/C tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı | 21 |
| Tablo 10. PES hastaları, PEG hastaları ve kontrol bireylerin 192 Q/R genotip ve alel frekansları | 29 |
| Tablo 11. PEG ve PES hastalarının 192 Q/R genotip ve alel frekansları | 30 |
| Tablo 12. PES hastaları, PEG hastaları ve kontrol bireylerin 55 L/M genotip ve alel frekansları | 30 |
| Tablo 13. PES ve PEG hastalarının 55 L/M genotip ve alel frekansları | 31 |
| Tablo 14. PES hastaları, PEG hastaları ve kontrol bireylerin -107 T/C genotip ve alel frekansları | 32 |
| Tablo 15. PES ve PEG hastalarının -107 T/C genotip ve alel frekansları | 32 |
| Tablo 16. PON1 192Q/R, 55L/M, -107T/C üçlü kombine haplotiplerin dağılımı. OR ve P için a) PEG vs. control b) PES vs. control, c) PEG vs. PES | 33-34 |
| Tablo 17. PON1 Genotipleri ile Fenotipleri arasındaki korelasyon | 35 |
| Tablo 18. PON1 Genotipleri ile PON1, stPON1 ve ARE aktiviteleri arasındaki korelasyon | 36 |

| Şekil Adı | Sayfa No |
|--|-----------------|
| Şekil 1. Beyaz ince lifsi psödoeksfoliasyon materyalinin ön kamaraya ilaveten pupil sınırındaki görüntüsü | 02 |
| Şekil 2. İzole edilmiş genomik DNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntüsü | 14 |
| Şekil 3. PON1 geninin 192 Q/R tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgesinin sekansı | 16 |
| Şekil 4. 192 Q/R tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgenin optimize edilmiş koşullarda elde edilen PCR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü | 18 |
| Şekil 5. PON1 geninin 55 L/M tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgesinin sekansı | 18 |
| Şekil 6. 55 L/M tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgenin optimize edilmiş koşullarda elde edilen PCR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü | 20 |
| Şekil 7. PON1 geninin -107 T/C tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgesinin sekansı | 20 |
| Şekil 8. -107 T/C tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgenin optimize edilmiş koşullarda elde edilen PCR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü | 22 |
| Şekil 9. 192 Q/R tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü | 23 |
| Şekil 10. 192 Q/R tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kesim sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü | 24 |
| Şekil 11. 55 L/M tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü | 25 |
| Şekil 12. 55 L/M tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kesim sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü | 26 |
| Şekil 13. -107 T/C tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü | 27 |
| Şekil 14. -107 T/C tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kesim sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü | 28 |



ÖZET

Psödoeksfoliyasyon sendromu (PES) hücre dışı matrikste lifsi materyallerin hem oküler dokularda hem de çeşitli iç organlarda birikmesi ile karakterize, yaşa bağlı gelişen sistemik bir bozukluktur. Psödoeksfoliyasyon materyalinin, aköz hümör sıvısının drenajını sağlayan kanalları tıkaması sonucunda göz içi basıncının artması ile birlikte glokom ortaya çıkar; bu tip glokoma psödoeksfolyatif glokom (PEG) adı verilir. Glokom dünyada görme kaybına yol açan en önemli sebeplerden biridir. PES'in patofizyolojisinde oksidatif stresin yer aldığı düşünülmektedir. PON1 oldukça bilinen bir antioksidan enzimdir ve PES'in patofizyolojisinde rolü olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle PON1 aktivitesini ve ifade edilme seviyesini etkileyen bazı tek nükleotit polimorfizmleri (SNP) ile PES ve PEG hastalıkları arasındaki ilişkinin incelenmesine karar verilmiştir. Bu SNP'ler 192Q/R, 55L/M, ve -107T/C polimorfizmleridir.

Çalışma grubu 150 PES hastası, 150 PEG hastası ve 150 kontrolden oluşmaktadır. Kan örnekleri Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göz Hastalıkları Servisince toplanmıştır. Genotipler PCR ve sonrasında RFLP tekniği kullanılarak belirlenmiştir. PCR'da kullanılan genomik DNA'lar ekibimiz tarafından tam kandan izole edilmiştir.

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, PON1 192Q/R ve 55L/M polimorfizmlerinin kontroller için PES veya PEG riski bakımından fark yaratmadığı gözlenmiştir. 192Q/R polimorfizmi PES hastalarının PEG oluşturma riski açısından da ilişkisiz bulunmuş, ancak PES hastaları için, 55MM genotipine sahip olmanın, 55LM veya LL genotipine göre, PEG için 0.49 kat (OR=0.490, P=0.048) riskli, diğer bir ifade ile yaklaşık 2 kat koruyucu olduğu ortaya çıkmıştır. PON1 -107C aleli taşıyan genotipe sahip olmanın, taşımayan genotipe göre PES için 0.573 kat riskli (yani 1.74 kat daha koruyucu) (P=0.022) olduğu; öte yandan PES hastaları arasında C aleli taşıyan genotipe sahip olmanın, TT genotipine göre, PEG riskini 1.690 kat arttırdığı (P=0.030) hesaplanmıştır.

Sonuç olarak, bu polimorfizmler PES ve PEG kapsamında ilk kez incelenmiş olup, bazı alellerin varlığı PES/PEG ile ilişkili bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: glokom, polimorfizm, PON1, psödoeksfoliyasyon, SNP



ABSTRACT

Pseudoexfoliation syndrome (PES) is an age-related systemic disorder, characterized by progressive accumulation of abnormal fibrillary material in ocular tissues. When pseudoexfoliation material blocks the canals responsible for the drainage of aqueous humor, intraocular pressure increases and causes pseudoexfoliative glaucoma (PEG). Glaucoma is one of the most important cause of blindness in the world. It is thought that oxidative stress is involved in the pathophysiology of PES. PON1 is a well-known antioxidant enzyme and is thought to play a role in the pathophysiology of PES. Therefore, it has been decided to examine the relationship between some single nucleotide polymorphisms (SNPs) affecting PON1 activity and expression level (192Q/R, 55L/M, -107T/C) and PES and PEG.

The study population consisted of 150 PES patients, 150 PEG patients and 150 controls. Blood samples were collected by University Health Sciences, Ankara Gülhane Education and Research Hospital, Department of Ophthalmology. Genotypes were determined by PCR/RFLP analysis.

As a result of the statistical analyzes, it was observed that the PON1 192Q/R and 55L/M polymorphisms did not make any difference in the PES or PEG risk for the controls. 192Q/R polymorphism was not related to the risk of PEG in patients with PES, but possessing 55MM genotype in PES patients had 0.49 times (OR=0.490, P=0.048) increased risk for PEG compared to 55LM/LL genotype; ie., it is almost 2 times protective. Having a -107C allele carrying genotype was 0.573 times risky (ie. 1.74 times more protective) (P=0.022) for PES than the non-carrying genotype; On the other hand, having a genotype bearing the C allele among PES patients increased the PEG risk by 1.690 fold (P=0.030) relative to the TT genotype.

As a result, these polymorphisms have been investigated for the first time in PES and PEG, and some of the alleles have been associated with PES / PEG.

Keywords: Glaucoma, polymorphism, PON1, pseudoexfoliation, SNP

1. GİRİŞ

Psödoeksfoliyasyon sendromu (PES) hücre dışı matrikste lifsi materyallerin hem oküler dokularda hem de çeşitli iç organlarda birikmesi ile karakterize, yaşa bağlı gelişen sistemik bir bozukluktur. Psödoeksfoliyasyon materyalinin, aköz humor sıvısının drenajını sağlayan kanalları tıkanması sonucunda göz içi basıncının artması ile birlikte glokom ortaya çıkar. Psödoeksfoliyasyon tüm dünyada glokomun en sık görülen nedenlerinden biridir ve bu tip glokoma psödoeksfolyatif glokom (PEG) adı verilir. PES patofizyolojisinin büyüme faktörlerinin fazla salgılanması, oksidatif stresin artması ve hücrel stres yanıtının bozulması gibi birçok faktörle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu projede bu faktörlerden biri olan oksidatif stresin artması ele alınmaya karar verilmiştir. Bu durumun antioksidan koruma mekanizmalarındaki bazı bozukluklarla ilgisi olduğu düşünülmektedir bu da akla çok iyi bilinen bir antioksidan enzim olan Paraoksonaz 1 (PON1) enzimini getirmektedir. PON1 enzimiyle ilgili yapılan ilk çalışmalarda sağlıklı popülasyonlarda insanlar arasında paraoksonaz aktivitesinde (paraoksonu hidrolize etme aktivitesi) fark bulunduğu görülmüştür. İlerleyen yıllarda PON1 geninin kodlayan bölgesinde iki tane polimorfizm tespit edilmiştir. Bunlar tek nükleotit polimorfizmleridir (single nucleotide polymorphism; SNP). Bu aktivite polimorfizmi ile ilişkili bulunan tek nükleotit polimorfizmleri 192Q/R ve 55L/M SNP'leridir. Promotor bölge polimorfizmlerinden -107T/C, PON1 ifade seviyesindeki farklılıkların %22,4'ünden sorumlu olması nedeniyle, en önemlisidir. Bu nedenle kontrollü, tek kör randomize olarak planlanan bu çalışmada PON1 genetik polimorfizmlerinin PES ve PEG ile ilişkisinin incelenmesine karar verilmiştir. PON1 genindeki 3 polimorfizmin (192Q/R, 55L/M ve -107T/C) PES ve/veya PEG tanısında ve PEG yatkınlığı olan PES hastalarının erken teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyellerini araştırmak amaçlanmıştır.

Bu çalışma kapsamında 1 yıllık süre içerisinde,

- En az 100 PEG hastası, 100 PES hastası ve 100 kontrol bireyin PON1 genindeki 3 SNP (192 Q/R, 55 L/M, -107 T/C) yönünden genotiplerinin belirlenmesi,
- Sonuçların istatistiksel analizinin yapılması amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda projenin 1 yıllık sürecinde;

- Sarf malzeme ve cihaz temini yapılmıştır.
- Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göz Hastalıkları Servisince 150 PES hastası, 150 PEG hastası ve 150 kontrol bireyden (toplam 450 kişiden) tam kan örnekleri alınmıştır. Toplam 450 PES hastası, PEG hastası ve kontrol bireye ait tam kan

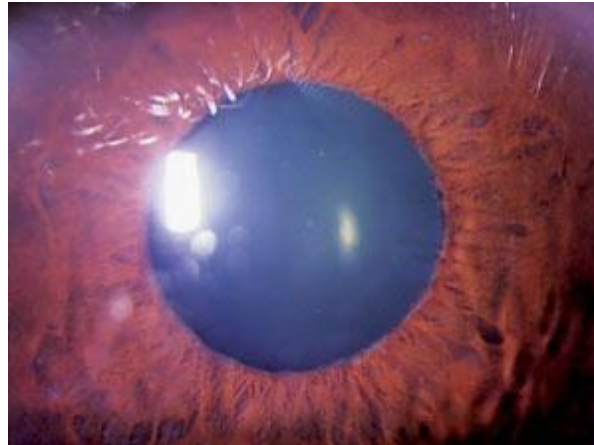
örneklerinden DNA izolasyonu, DNA'ların kalitesinin ve konsantrasyonlarının belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

- PON1 geninde bulunan 192 Q/R, 55 L/M, -107 T/C tek nükleotit polimorfizmlerinin PCR ve restriksiyon endonükleaz enzim kesimi optimizasyonları yapılarak toplam 450 örneğin 3 SNP için genotipleme çalışmaları tamamlanmış ve sonuçların istatistiksel analizi yapılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Psödoeksfoliasyon Sendromu ve Psödoeksfoliasyon Glokomu

Psödoeksfoliasyon (eksfoliasyon) sendromu (PES) hücre dışı matrikste lifsi materyallerin hem oküler dokularda hem de çeşitli iç organlarda birikmesi ile karakterize, yaşa bağlı gelişen sistemik bir bozukluktur. Psödoeksfoliasyon gözün ön segmentindeki tüm dokuları tutar. En önemli tanı kriteri, herhangi bir sübjektif bulgu olmadan lens üzerinde ve pupil kenarında depolanmış beyaz-gri renkli psödoeksfoliasyon materyalinin görülmesidir (Şekil 1). Ayrıca, lens epiteli, trabeküler ağ, iris, silier proses, konjonktiva ve perioküler dokuların da bu lifsi materyali içerdiği gösterilmiştir (Richardson vd., 1981; Schlotzer vd., 1991). Tipik eksfoliyasyon birikimlerine deri, aort, beyin, kalp, böbrek gibi birçok dokuda da rastlandığı için PES sistemik bir hastalık olarak nitelendirilmektedir (Schlötzer-Schrehardt vd., 1992; Streeten vd., 1992).



Şekil 1. Beyaz ince lifsi psödoeksfoliasyon materyalinin ön kamaraya ilaveten pupil sınırındaki görüntüsü

Psödoeksfoliasyon materyalinin, aköz humor sıvısının drenajını sağlayan kanalları tıkanması sonucunda göz içi basıncının artması ile birlikte glokom ortaya çıkar. Psödoeksfoliasyon tüm dünyada glokomun en sık görülen nedenlerinden biridir ve bu tip glokoma psödoeksfolyatif glokom (PEG) adı verilir. PES en çok açık açılı glokoma yol açsa da, açılı kapanması glokomuna da yol açabilmektedir (Ritch ve Schlötzer-Schrehardt, 2001). Halk arasında *göz tansiyonu* adıyla bilinen glokom, milyonlarca insanı etkileyen yaygın bir göz hastalığıdır. Tedavi

edilmezse görme kaybına neden olabilmektedir. Göz içinde basınç yükseldiğinde görmeyi sağlayan göz siniri hücrelerinin beslenmesi bozulur ve bu hücreler hasar görerek yavaş yavaş öldükçe çevreden merkeze doğru görme kaybı ortaya çıkar. Hücrelerin tümü öldüğü zaman kalıcı total görme kaybı oluşur.

PES glokoma ek olarak sekonder katarakta da yol açmaktadır (Kuchle vd., 1997). PES’de görülen karakteristik patolojik birikimler fakodonezis, melanin dispersiyonu, yetersiz midriyazis, kan aköz bariyeri disfonksiyonu gibi birçok göziçi komplikasyona zemin hazırlamaktadır. Bu birikimler PES hastalarının göz içi operasyonu ile ilişkili olarak ortaya çıkan lens zonüllerinde kopma, arka kapsül rüptürü ile vitreus kaybı, iris kaynaklı göz içi kanaması, kornea endotel yetmezliği, postoperatif enflamasyon ve göz içi basınç yükselmeleri ve intraoküler lensin lüksasyonu gibi birçok komplikasyonun da nedenidir (Naumann vd.,1998; Schlötzer-Schrehardt ve Naumann, 2006).

2.2 Epidemiyoloji

İlk kez 1917 yılında Lindberg tarafından tanımlanmış olan PES günümüzde bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilebilir. Epidemiyolojik çalışmalar incelendiğinde tüm dünyada yaygın olduğu, ancak toplumlar arasında değişik sıklıklarda görüldüğü dikkat çekmektedir (Ringvold vd., 1999). PES prevalansı coğrafik, etnik ve irksal varyasyon göstermektedir. Eskimolar ve Hintliler arasında, Almanya, İngiltere, Avusturya, Japonya, Danimarka ve İsviçre’de PES görülme sıklığı oldukça düşüktür; 70 yaş üstü kişilerde %6’nın altındadır. Öte yandan, İzlanda, Finlandiya, Rusya, Tunus, Suudi Arabistan, İsveç, Norveç, Yunanistan ve Türkiye’de PES görülme sıklığı daha yüksektir; genellikle %15’in üstündedir (Forsius, 1988; Ringvold, 1999). PES ülkemizde önemli oküler sorunlar arasında yer almaktadır. PES görülme sıklığı 40 yaş üzerinde %11.3 (İskeleli, 1978), 50 yaş üzerinde %18.2 (Örgen, 1949), Ankara’da 40 yaş üzerinde %12.8 (İrkeç, 1979), Doğu Akdeniz bölgesinde 60 yaş ve üzeridekilerde %11.2 (Yalaz vd., 1992), Karadeniz bölgesinde %16.5 (Aritürk vd., 2005), Orta Karadeniz’de %12.2 (Cumurcu vd., 2010), İstanbul’da %11 (Alpay vd., 1989) olarak bildirilmiştir. Psödoeksfoliatif materyal birikimi ve toplumda PES görülme sıklığı yaşa bağlı olarak artmaktadır (Mitchell vd., 1999).

Psödoeksfoliasyon bulunan gözlerde glokom gelişme riski çok yüksektir (Mitchell vd., 1999). Eğer gözlerden birinde glokom, diğerinde ise sadece PES var ise, bu gözde beş yıl içinde glokom gelişme riski %50 dir (Yalvaç vd., 2001). Dünya Sağlık Örgütü’nün verilerine göre glokom, dünyada körlük nedenleri arasında kataraktan sonra ikinci sırada gelmektedir (Resnikoff vd., 2004). Glokom geri döndürülemez körlüğün ise ana nedeni durumundadır ve 2010 yılında tüm dünya çapındaki körlük nedenlerinin %8’ini teşkil etmektedir (King vd., 2013). Dünya çapındaki kör insanların 6.6 milyonu glokom nedeniyle görme yetisini kaybetmiştir.

Yapılan hesaplara göre glokom 2020 yılında tüm dünyada 80 milyon insanı etkileyecektir. PEG, tüm glokomların yaklaşık %25'ini oluşturur (Schlötzer-Schrehardt vd., 2002). Ülkemizde PES olan hastalarda glokom sıklığı % 34.3, glokom hastalarında PES sıklığı ise %46.9 olarak saptanmıştır (Yalaz vd., 1992). Çalışmalar tutarlı bir şekilde göstermiştir ki, ilerleyen yaş glokom için büyük bir risk faktörüdür (Giangiacomo ve Coleman, 2009). Toplumların yaş ortalamasının gittikçe arttığı göz önüne alındığında, PES ve PEG'in gelecekte daha sık görüleceği düşünülmektedir.

2.3 Önemi

PES'li bir hasta, ileri derecede glokom gelişip görme kaybı ortaya çıkana kadar hastalığını fark etmeyebilir. PES klinik olarak tespit edilebilir aşamaya geldiğinde epey ilerlemiş psödoeksfoliasyon birikimi bulunmaktadır. Hasta başlarda görme duyusunda bir kayıp hissetmediği için hastalığı fark etmez; hastalık ilerledikçe önce çevredeki görme alanı daralır ve görme keskinliği zamanla azalır. Hastalık ilerlediği zaman fark edilir; ancak o zaman da geç kalınmış olur. Glokomlu hastalarda görme kaybı meydana geldikten sonra geriye dönük tedavisi mümkün değildir; ancak tanı konulduktan sonra ilerleyişi durdurulabilir. Glokom bu nedenle sinsi bir hastalık olarak nitelendirilmektedir. ABD'de yapılan bir araştırmaya göre ABD'de 2.2 milyon glokom hastası vardır; ancak bunların yalnızca yarısı glokom olduğunu bilmektedir (The Eye Diseases Prevalence Research Group, 2004).

Psödoeksfoliasyonlu hastaların göz içi basıncının kontrol altında tutulması ve görme kaybının önüne geçilebilmesi açısından rutin kontrollerin sık ve düzenli bir şekilde yapılması çok önemlidir. Bu hastalarda gün içindeki göz içi basıncı da düzensizdir. Kontroller arası sürede, psödoeksfoliasyonlu hastaların göz içi basıncı birkaç kez 20 mmHg'nın üstüne çıkmış bile olabilir. Ancak tüm PES hastalarında glokom gelişmemektedir.

Halihazırda glokom yatkınlığı olan PES hastalarının erken teşhisinde kullanılan bir parametre mevcut değildir. Bu nedenle, kısa vadede, multidisipliner çalışmalar sonucunda, PES hastalarından PEG oluşturmaya yatkın olanların tespit edilmesini sağlayacak objektif parametrelerin bulunmasına ve bu sayede bu kişilerde göz içi basıncı göz sinirine zarar vermeden önce tedbir alınmasına ihtiyaç vardır. Bu bireyler için rutin kontroller sıklaştırılabilir ve glokom tedavisine daha erken başlanabilir. Şu anda piyasada bulunan göz tansiyonunu ölçen lensler bu tip hastalarda öncelikli olarak uygulamaya geçirilebilir.

Psödoeksfoliasyon materyalini aspire ederek temizlemeyi hedefleyen operasyonlar sonrasında aynı patolojik birikimlerin yeniden oluşması nedeniyle bu sendromun kesin tedavisi henüz yoktur (Jacobi vd., 1999). Glokom tedavisinde ise görme kaybını önlemeyi veya geri döndürmeyi sağlayacak bir tedavi yapılamamakta, yalnızca gözdeki basıncın düşürülmesi hedeflenmektedir. Ayrıca, psödoeksfoliasyon materyali yalnızca oküler dokularda değil, kalp,

akciğer, karaciğer, safra kesesi, atardamarlar gibi hemen hemen tüm organ ve dokularda birikim yaparak zarar verir (Schlötzer-Schrehardt vd., 1992; Streeten vd., 1992). Örneğin aort damarında birikim yaparak anevrizmaya, kulakta ise işitme kaybına neden olabilmektedir (Samarai vd., 2012). Bu nedenle, uzun vadede, psödoeksfoliyasyon materyalinin oluşumunda rol alan faktörlerin tespit edilmesi ve bu sayede PES'in ortaya çıkmasının önlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada incelenecek polimorfizmler PES ile ilgili bulunursa, bunlar mekanistik olarak ilişkilerinin teyit edilmesinin ardından, ileriki yıllarda tedavi için yeni terapötik imkânlar yaratabilecektir.

2.4 Psödoeksfoliyasyon Sendromunun Patogenezi

Bu sendromdaki hücre dışı matriksteki elastik lifsi materyallerin kronik olarak birikmesi durumu ya çok fazla üretimden, ya yetersiz yıkılmadan, ya da her ikisinin birden gerçekleşmesi ile ortaya çıkar (Streeten vd. 1986). Psödoeksfoliyasyon sendromunun altında yatan patofizyoloji hem genetik hem de çevresel faktörler içermektedir. Genetik mekanizmalar, hücre dışı matriksin yapımı ve yıkımından sorumlu lizil oksidaz-benzeri (lysyl oxidase-like; LOXL) ve Clusterin gibi düzenleyici proteinlerin genlerindeki bozukluklara dayanıyor olabilir (Sein vd., 2013).

LOXL enzimleri kolajen ile elastini çapraz bağlayarak elastik liflerin oluşumu, stabilizasyonu, yeniden modellenmesi ve dokuların esnekliklerinin yaşa bağlı olarak azalmasının önlenmesi gibi önemli fonksiyonlardan sorumlu bir ailedir. Bu ailenin bir üyesi olan LOXL1 enzimini kodlayan gendeki polimorfizmler İzlandalılar, İsveçliler (Thorleifsson vd., 2007), Amerikalı beyazlar (Challa vd., 2008), Amerika ve Avrupalılar (Aragon-Martin vd., 2008; Yang vd., 2008), Hintliler (Ramprasad vd., 2008), Avustralyalılar (Hewitt vd., 2008), Almanlar, İtalyanlar (Pasutto vd., 2008), Japonlar (Hayashi vd., 2008; Ozaki vd., 2008), Çinliler (Chen vd., 2009), Güney Afrikalılar (Williams vd., 2010) ve Türkler (Kasım vd., 2013) gibi birçok farklı popülasyonda PES ve/veya PEG ile ilişkili bulunmuştur. Ancak, yukarıda da değinildiği gibi glokom geliştirme riski olan PES hastalarının belirlenmesi son derece kritik bir öneme sahiptir. Yakın zamanda yayımlanan bir çalışmaya göre LOXL1 genetik polimorfizmleri bu ayrımı yapmakta başarısızdır (Anastasopoulos vd., 2014).

PES'in ortaya çıkmasına yol açan diğer faktörler arasında ultraviyole ışığa maruziyet, beslenme, bulaşıcı ajanlar, travma ve inflamasyon bulunmaktadır (Schlötzer-Schrehardt, 2012). İnterlökin-6 gibi pro-fibrotik sitokinler, büyüme faktörleri, yükselmiş hücresel ve oksidatif stres, matriks metalloproteinazlar ile metalloproteinazların doku inhibitörü arasındaki dengedeki lokal değişiklik de bu patojenezde rol oynuyor gibi görünmektedir (Gartaganis vd., 2002; Schlötzer-Schrehardt ve Naumann, 2006; Gartaganis vd., 2007).

Serbest radikal oluşturan oksidanlar ile antioksidan koruma sistemi arasındaki fizyolojik denge bozulduğunda ortaya çıkan oksidatif stresin, kardiyovasküler hastalık (Hoeschen 1997), diyabet (Kaneto vd., 2007), inme (Seneş vd., 2007), hipertansiyon (de Champlain vd., 2004), yaşa bağlı makula dejenerasyonu, katarakt (Beatty vd., 2000; Spector 1995; Augusteyn ve Duncan 1981) gibi birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığını gösteren bulgular vardır. Oksidatif stres psödoeksfoliasyon sendromunun patofizyolojisinde de önemli yer tutuyor gibi durmaktadır. Öncelikle PES'in, ortak noktaları oksidatif stres olan anjina pektoris, hipertansiyon (Mitchell vd., 1997), koroner arter hastalığı (Citirik vd., 2007) ve inme gibi hastalıklarla ilişkili bulunması, bu hastalığın patogenezinde oksidatif stresin rol alıyor olabileceğini düşündürmüştür (Ritch ve Schlötzer-Schrehardt 2001).

Psödoeksfoliasyon sendromunun patogenezinde oksidatif stresin rolü bir kaç çalışmada incelenmiştir (Koliakos vd., 2002; Yılmaz vd., 2005; Gartaganis vd., 2007; Koliakos vd., 2008; Can Demirdöğen vd., 2014; Dursun vd., 2015). PES hastalarında gözün aköz hümor sıvısındaki (Koliakos vd., 2002) ve serumdaki (Yılmaz vd., 2005) askorbik asit seviyesinin kontrollerinkine göre önemli derecede düşük olduğu görüldü. Ayrıca PES hastalarının serum örneklerinde oksidatif hasarın bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) konsantrasyonu kontrollerinkinden yüksekti ($P=0.002$) (Yılmaz vd., 2005). Daha sonra, Koliakos vd. (2008) kontrollerle karşılaştırıldığında PEG hastalarının aköz hümor ve serum örneklerindeki prooksidan-antioksidan dengesinin oksidanlar yönüne doğru anlamlı derecede kaymış olduğunu belirledi. PES hastaları ile kontroller arasında benzer bir farklılık, aköz örneklerinde bulunamasa da, serumda tespit edildi (Koliakos vd., 2008). PES hastalarının lens epitel dokusundaki glutatyon ve glutatyon disülfid seviyeleri kontrollerdeki ile karşılaştırıldığında sırasıyla 2.2 kat ve 2.0 kat düşük bulundu. Ayrıca PES hastalarının lens dokusundaki MDA seviyelerinin de kontrollerinkinden 2.5 kat yüksek olduğu belirlendi (Gartaganis vd., 2007).

Ekibimiz tarafından PES üzerinde yapılan önceki çalışmamızda (Can Demirdöğen vd., 2014) serumda ölçülen total antioksidan statüsü (TAS) PES ve PEG hastalarında kontrollere göre anlamlı derecede düşük bulunmuştu. Total oksidan statüsü (TOS), oksidatif stres indeksi (OSI) ve total tiol seviyeleri yönünden ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştı. Yeni yayımlanan bir çalışmada PES ve PEG hastalarının aköz hümor ve serum total antioksidan kapasiteleri (TAC) kontrollere göre anlamlı derecede düşük, total oksidatif stres (TOS) parametresi ise yüksek bulunmuştur (Dursun vd., 2015). Tüm bu bulgular psödoeksfoliasyon sendromunun patogenezinde antioksidan koruma sistemindeki bir bozukluğun yol açtığı düşük antioksidan seviyesinin ve/veya yüksek oksidan seviyesinin rolü olabileceğine işaret etmektedir. Paraoksonaz 1 günümüzde en önemli antioksidan enzimlerden biri olarak görülmektedir ve sonraki bölümde bu enzim ayrıntılı bir şekilde anlatılmaktadır.

2.5 Paraoksonaz 1 (PON1)

İnsan Paraoksonaz 1 enzimi (PON 1; EC 3.1.8.1) serumda yüksek dansiteli lipoproteine (HDL) bağlı olarak bulunan 43-45 kDa moleküler ağırlığa sahip, kalsiyuma bağımlı bir estera/laktonazdır. PON1, çoğunlukla karaciğerde 355 amino asitten oluşan bir protein olarak sentezlenir (Gan vd., 1991; Hasset vd., 1991). Karaciğerden kana salgılanması sırasında amino ucundan sadece metiyonin amino asiti uzaklaştırılır; amino ucunun geri kalanı PON1'in HDL'ye bağlanması için gereklidir (Sorenson vd., 1999). Kanda tamamen HDL'ye bağlı olarak bulunan PON1, insan kanında litrede 50 mg kadar bulunur (Sorenson vd., 1999; Blatter vd., 1993). En yüksek aktivitenin belirlendiği kan dışında karaciğer, böbrek, bağırsak, beyin gibi dokularda da PON1'e rastlanmıştır. Bunlara ilaveten, gözde aköz hümor sıvısında ve gözyaşında da bulunmaktadır. Aköz sıvısının proteomiks analizinden elde edilen sonuçlara göre bu sıvıda 676 tane protein bulunmaktadır. Bu proteinler arasında PON1 de yer almaktadır (Chowdhury vd., 2010). 2012 yılında yapılan bir çalışmada gözyaşı proteomu incelenmiş ve sağlıklı bir insanın gözyaşında 1543 farklı proteinin bulunduğu tespit edilmiştir. Bu proteinlerden biri de PON1'dir (Zhou vd., 2012).

PON1 ilk olarak parathion ve diazinon gibi organofosfatlı pestisitlerin toksik okson metabolitlerini metabolize etmesi ile tanınmış; sonraki yıllarda ise oksidatif strese bağlı olarak oluşan lipid peroksidlerinin hidroliz reaksiyonunu katalizleyerek LDL ve HDL'yi oksidatif değişimlere karşı korumasıyla ilgi çekmiştir (Mackness vd., 1993). PON1'in hidrolize ettiği substratlar arasında sarin, soman gibi sinir gazları, aromatik esterler (örneğin, fenil asetat) ve halkasal karbonat yapısındaki ilaçlar (örneğin, prulifloksasin) da bulunmaktadır (Draganov ve La Du, 2004; Tougou vd., 1998).

PON1 enzimiyle ilgili yapılan ilk çalışmalarda sağlıklı popülasyonlarda insanlar arasında serum PON1'in paraoksonaz aktivitesinde (paraoksonu hidrolize etme aktivitesi) 10 ila 40 kat arası fark bulunduğu görülmüştür (Zech ve Zurcher 1974; Playfer ve ark. 1976; Furlong ve ark. 1988). Toplumda serum paraoksonaz aktivitesi yönünden kişilerin, yüksek, orta ve düşük aktivite gösterenler olmak üzere üç grupta toplandığı ortaya çıkmıştır (Eckerson vd., 1983a). İlerleyen yıllarda PON1 geninin kodlayan bölgesinde iki tane polimorfizm tespit edilmiştir. Bunlar tek nükleotit polimorfizmleridir (single nucleotide polymorphism; SNP) ve bir popülasyonda DNA'daki tek bir bazın % 1' den yüksek frekansla kalıcı olarak bir başkasıyla yer değiştirmesi olarak tanımlanmaktadır. Bu aktivite polimorfizmi ile ilişkili bulunan tek nükleotit polimorfizmleri 192Q/R ve 55L/M SNP'leridir ve aşağıda detaylı bir şekilde anlatılmaktadır. PON1 enzimini kodlayan gen 9 ekson içermektedir ve 28 kb uzunluğundadır (Clendenning vd., 1996). Bugün PON1 geninde 200 civarı SNP olduğu bilinmektedir. Bunlardan 7 tanesi transle edilmeyen 5' bölgede, 5 tanesi eksonlarda, 171 tanesi intronların içinde ve 15 tanesi de transle edilmeyen 3' bölgede tespit edilmiştir (La Du, 2003).

2.6 PON1 192Q/R Polimorfizmi (rs662)

Enzimin sentezlenmesi sırasında 192. amino asit olarak glutamin (Q) yerine arjinin (R) eklenmesine neden olur (Humbert vd., 1993). Bu durum PON1 genini kodlayan DNA'nın spesifik bir noktasında Adenin bazının yerine Guanin bazının kalıcı olarak yerleşmesi ile ortaya çıkmaktadır. DNA'sında bu pozisyonda Adenin taşıyanlarda (yabanıl tiplerde) mRNA'da oluşan kodon CAA'dır ve glutamin amino asitini kodlamaktadır (192Q aleli). Bu aleli homozigot olarak taşıyan bireylerde sentezlenen PON1 proteini 192. amino asit olarak glutamin taşımaktadır. DNA'sında Adenin yerine Guanin geldiğinde oluşan kodon CGA'dır ve arjinin kodlamaktadır (192R aleli). Bu aleli homozigot olarak taşıyan bireylerde sentezlenen PON1 proteini 192. amino asit olarak arjinin taşımaktadır.

PON1 192Q için allel frekansı dünyada Kuzey Avrupa kökenli beyazlar için 0.75'ten bazı Asya toplumlarında 0.30'a kadar değişmektedir (Brophy vd., 2002). Türkiye'de yapılan çalışmalarda 192Q alleli için frekans 0.69 (Aynacioglu vd., 1999) ve 0.676 (Can Demirdöğen vd., 2009) olarak tespit edilmiştir.

Bu polimorfizm enzimin katalitik aktivitesini bazı substratlara karşı ciddi şekilde etkilemektedir (Tablo 1; Deakin and James, 2004). Yapılan ilk çalışmalarda 192R izoformunun paraoksonu 192Q izoformundan 6 kat daha hızlı hidrolizlediği belirlenmiştir. Diazokson, sarin, soman ve fosfolipid hidroperoksitlerin hidrolizi yönünden ise tam tersi bir durum gözlenmiştir: 192Q izoformu diazokson, sarin soman ve fosfolipid hidroperoksitleri 192R izoformundan daha iyi hidrolizlemektedir (Davies vd, 1996; Mackness vd., 1997a; Mackness vd., 1997b). Klorprifos okson ve fenil asetat gibi bir grup substrat için ise PON1 192Q ve 192R izoformlarının hidroliz hızının aynı olduğu görülmüştür (Davies vd., 1996). Başka bir deyişle, her ne kadar 192Q izoziminin paraoksonaz aktivitesi 192R'den düşük olsa da LDL'yi oksidasyona karşı koruma kapasitesi 192R'den yüksektir (Mackness vd., 1998a). Ancak, enzim aktivitesi ölçümleri fizyolojik koşullarda, ortamda daha az NaCl kullanılarak yapıldığında, 192R ve 192Q izoformlarının diazoksonu aynı hızda hidrolize ettiği ve 192R izoformunun klorprifos okson hidroliz hızının 192Q izoformundan daha yüksek olduğu görülmüştür (Li vd., 2000). PON1'in paraoksonaz aktivitesi tuzlu ortamda ölçüldüğünde 192Q ile 192R allozimleri ayırt edilebilir hale gelmektedir.

Tablo 1. PON1 192Q/R alellerinin substrat seçiciliği

| | |
|---|---|
| 192R alloziminin aktivitesi şu substratlara karşı daha yüksektir: | Paraokson Metilparaokson Fenitroksan Klorion okson EPN okson Armin |
| Her iki allozim şu substratlara karşı benzer aktivite gösterir: | Fenil asetat Klorprifos okson 2-Naftil asetat |
| 192Q alloziminin aktivitesi şu substratlara karşı daha yüksektir: | Diazokson Sarin Soman Fosfolipid hidroperoksitleri |

Mackness vd., 1998b'den alınmıştır.

2.7 PON1 55L/M Polimorfizmi (rs854560)

PON1 geninin kodlayan bölgesinde tespit edilmiş olan diğer polimorfizm (55L/M) ise enzimin 55. amino asitinde lösinden (L) metiyonine (M) değişime yol açar (Humbert vd., 1993). Enzimin 55. pozisyonunda metiyonin taşıyan bireylerin (55M), 55L izoformunu taşıyanlardan daha düşük PON1 aktivitesine sahip oldukları gözlenmiştir. Ancak bu polimorfizmin enzimin katalitik aktivitesini direk etkilemediği, plazmada bulunan enzim seviyesi ve proteinin stabilitesi ile ilişkili olduğu için aktiviteyi dolaylı olarak etkilediği ortaya çıkmıştır (Blatter Garin vd., 1997). Bu durum kısmen, 55L/M bölgesi ile promotor bölgesinde -107. pozisyondaki polimorfizm arasında linkage disequilibrium bulunmasından kaynaklanmaktadır (Brophy vd., 2002). 55L alloziminin stabilitesinin daha yüksek olmasına katkı yapan diğer unsurun ise 55. pozisyondaki lösün amino asitinin proteinin doğru katlanmasına katkı yapmasından kaynaklandığı öne sürülmüştür (Harel vd., 2004). PON1 55L için allel frekansları 0.57'den (beyazlar), 0.99'a (Oji-Cree popülasyonu) kadar değişmektedir (Brophy vd., 2002). Türk popülasyonunda bu frekans 0.72 (Aynacioglu vd., 1999) ve 0.619 olarak tespit edilmiştir (Can Demirdöğen vd., 2009).

2.8 PON1 -107T/C Polimorfizmi (rs705379)

PON1 geninin promotor bölgesinde de çok sayıda genetik farklılıklar belirlenmiştir (Brophy vd., 2001a). Promotor bölge polimorfizmlerinden -107T/C, PON1 ifade seviyesindeki farklılıkların %22,4'ünden sorumlu olması nedeniyle, en önemlisidir. -107T alelini taşıyan bireylerin serum PON1 seviyeleri düşüktür (Brophy vd., 2001b). PON1 -107T için allel frekansları İsviçrelielerde 0.56 (James vd., 2000a), Japonlarda 0.52 (Suehiro vd., 2000), İtalyanlarda 0.59 (Campo vd., 2004) ve Türklerde 0.595 (Can Demirdöğen vd., 2009) olarak bulunmuştur.

Özetle, eksonlarda yer alan anlamlı SNP'ler PON1 enziminin aktivitesini etkileyerek kalitesini değiştirirken, promotör bölgede yer alanlar ise proteinin transkripsiyon seviyesini etkileyerek kantitesini değiştirmektedir. Dolayısı ile insanlar arasında PON1 aktivitelerinde görülen büyük

farklılıkların iki temel kaynağı vardır: (1) enzim aktivitesini etkileyen kodlayan bölge polimorfizmleri (192Q/R ve 55 L/M) (2) enzimin ifade edilme seviyesini belirleyen promotör bölge polimorfizmleri (-107T/C).

Ancak bunların yanı sıra fizyolojik durumlar, diyet, yaşam tarzı ile ilgili bazı faktörler de PON1 aktivitesini etkilemektedir. Örneğin sigara (James vd., 2000b), alkol (Debord vd., 1998), yağlı yiyecekler (Shih vd., 1996) aktiviteyi düşürürken, nar suyu (Aviram vd., 2004), diyetle alınan polifenoller (Aviram ve Rosenblat, 2005) ve zeytinyağı (Tomás vd., 2001) aktiviteyi arttırmaktadır. PON1 aktivitesini ölçmeye dayalı çalışmalarda bu faktörlerin hepsinin birden kontrol edilmesi mümkün değildir. Bundan dolayı bir çalışmada PON1 aktivitesi düşük ölçüldüğünde bunun nedeni kişiden kişiye değişebilir; hatta aynı kişide iki gün ara ile ölçüldüğünde bile farklılık gösterebilir ve doğrudan patogenez ile ilişkilendirilmesi doğru olmaz. Öte yandan PON1 genetik polimorfizmleri diyet, yaşam koşulları gibi faktörler tarafından etkilenmeyen parametrelerdir.

Bu nedenle kontrollü, tek kör randomize olarak planlanan bu çalışmada PON1 genetik polimorfizmlerinin PES ve PEG ile ilişkisinin incelenmesine karar verilmiştir. PON1 genindeki 3 polimorfizmin (192Q/R, 55L/M ve -107T/C) PES ve/veya PEG tanısında ve PEG yatkınlığı olan PES hastalarının erken teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyellerini araştırmak amaçlanmıştır.

Yukarıda bahsedilen, ekibimiz tarafından PES, PEG ve oksidatif stres parametreleri ile ilgili yaptığımız çalışmada PON1 aktivitesi de, fenotipleri ortaya çıkaracak şekilde, belirlenmişti (Can Demirdöğen vd. 2014). O çalışmada kullandığımız hasta ve kontrollere ait tam kan örnekleri -80°C'de halen saklanmaktadır. Önerilen bu projede, Can Demirdöğen vd. 2014 çalışmasındaki örneklem biraz genişletilerek PON1 genetik polimorfizmleri ile PES ve PEG ilişkisi incelenecektir. Elde edilecek genotip dağılımlarının, Can Demirdöğen vd. 2014 çalışmamızda yayımlanan fenotip sonuçları ile ilişkisi de değerlendirilecektir.

2.9 PON1 ve Psödoeksfoliasyon Sendromu

Patogenezinde oksidatif stresin rolü olduğu düşünülen diyabet, koroner arter hastalığı, serebrovasküler hastalık, iskemik inme gibi birçok hastalıkta PON1'in rolü olduğunu gösteren bulgular vardır (Mackness vd., 1998c; McElveen vd., 1986; Jarvik vd., 2000, Can Demirdöğen vd., 2008). Literatürde psödoeksfoliasyon sendromunda paraoksonaz enziminin rolünü araştıran kısıtlı sayıda çalışmalar da yer almaktadır. Serumda yapılmış olan bir çalışmada psödoeksfoliasyon hastalarında (n=43) paraoksonaz, ksantin oksidaz ve adenosin deaminaz aktiviteleri ölçülmüş, hastaların paraoksonaz aktivitesi düşük, adenosin deaminaz ve ksantin oksidaz aktivitesi yüksek bulunmuştur. Bu durum yazarlar tarafından oksidatif stresin

yükseldiği, pürin metabolizmasının ise değişikliğe uğradığı şeklinde yorumlanmıştır (Yağcı vd., 2009).

Ekibimiz tarafından yapılan çalışmada (Can Demirdöğen vd., 2014) serumda ölçülen bazal PON1 aktivitesi yönünden PEG hastaları ile kontroller arasında fark yoktu; PES hastalarında kontrollere göre anlamlı derecede yüksekti ($p= 0.046$). Tuzla uyarılmış PON1 aktivitesi ve arilesteraz aktivitesi yönünden ise hasta ve kontroller arasında ciddi bir fark tespit edilmedi. Daha sonra uyarılmış PON1 aktivitesi ile arilesteraz aktivitesinin oranından faydalanılarak fenotipler belirlendi. PON1 fenotiplerinin belirlenmesinin temeli paraoksonaz enzimi ile yapılan ilk çalışmalarda atılmıştı. PON1 ile yapılan ilk çalışmalar toplumda plazma paraoksonaz aktivitesinin polimorfik dağıldığını ve insanların iki veya üç farklı fenotip grubuna ayrıldıklarını göstermişti (Zech ve Zurcher 1974; Playfer ve ark. 1976; Furlong ve ark. 1988; Eckerson vd., 1983a). Tek substratla yapılan çalışmaların, bu üç fenotipi ve çeşitli hastalıklar ile bu enzim arasındaki ilişkiyi ortaya koymakta yetersiz olacağı vurgulanmıştı (Brophy vd., 2002). Bu nedenle Eckerson vd. (1983b) tarafından PON1'in aktivite fenotiplerini ortaya çıkarmak üzere 2 substratlı bir yöntem önerildi. Bu yöntemle 3 fenotip AA (düşük aktivite), AB (orta aktivite) ve BB (yüksek aktivite) ortaya çıkarılabilmektedir. Yukarıda da değinildiği gibi PON1'in bu 3 fenotipinin temelinde yatan en önemli polimorfizm 192Q/R polimorfizmidir. 192Q ve 192R allozimlerinin substratlara karşı ilgi seviyesi farklılık göstermektedir. Örneğin 192R alloziminin paraokson substratını hidroliz hızı yüksek, diazokson ve fosfolipit hidroperoksitleri hidroliz hızı ise düşüktür. Öte yandan 192Q alloziminde ise bu durum tersine dönmüştür; 192Q alloziminin paraoksonaz aktivitesi düşük ancak fosfolipit hidroperoksitleri hidroliz hızı yüksektir (Davies vd., 1996; Mackness vd., 1997a; Mackness vd., 1997b). Dolayısı ile 192RR genotipine karşılık gelen BB fenotipinin fosfolipit hidroperoksitleri hidroliz hızı ve buna bağlı olarak da LDL ve HDL'yi oksidatif değişimlere karşı koruma kapasitesi düşüktür (Mackness vd., 1998b).

Ekibimiz tarafından yapılan çalışmada (Can Demirdöğen vd., 2014) fenotipler belirlendiğinde, PES hastalarında (25%) BB fenotipine kontrollerde olduğundan (3.1%) daha fazla rastlanmıştır. BB fenotipi düşük antioksidan koruma kapasitesine, ancak yüksek (tuzla uyarılmış) paraokson hidroliz hızına sahip fenotiptir (Aviram vd., 1998). Bizim burada elde ettiğimiz fenotip sonuçları büyük oranda 192Q/R genotiplerinin bir yansıması olarak kabul edilebilir. Ancak yukarıda da bahsedildiği gibi PON1 enzim aktivitesini etkileyen diğer SNP'ler de bulunmaktadır. Bu nedenle önerilen bu projede PON1 aktivitesini etkileyebilen PON1 genetik polimorfizmleri ile PES ve PEG arasındaki ilişkinin incelenmesine karar verilmiştir.

Yukarıda da değinildiği gibi yalnızca enzim aktivitesine bakarak bunu patoloji ile ilişkilendirmek doğru bir yaklaşım olmayacaktır. Hasta ve kontrollerdeki PON1 fenotip dağılımlarının (Can Demirdöğen vd., 2014) PON1 genindeki polimorfizmler ile ilişkisi incelenerek hangisinin hastalıkla daha güçlü bir ilişkisi olduğunun da değerlendirilmesi önemlidir. Daha önce PON1

genetik polimorfizmleri ile glokomlu ve/veya glokomsuz psödoeksfoliyasyon arasındaki ilişki hiç çalışılmamıştır.

Şu ana dek psödoeksfoliyasyon sendromunun oluşumunda genetik faktörlerin rolünü araştıran birçok çalışma yapılmış, LOXL1 üzerinde yoğunlaşmış olan çalışmalarda Türkler de dahil olmak üzere (Kasım vd., 2013) birçok farklı popülasyonda PES ve LOXL1 genetik polimorfizmleri arasında birliktelik gösterilmiştir (Thorleifsson vd., 2007; Challa vd., 2008; Aragon-Martin vd., 2008; Yang vd., 2008; Ramprasad vd., 2008; Hewitt vd., 2008; Pasutto vd., 2008; Hayashi vd., 2008; Ozaki vd., 2008; Chen vd., 2009; Williams vd., 2010). Ancak, yukarıda da değinildiği gibi glokom geliştirme riski olan PES hastalarının belirlenmesi son derece kritik bir öneme sahiptir ve yakın zamanda yayımlanan bir çalışmaya göre LOXL1 genetik polimorfizmleri bu ayrımı yapmakta başarısızdır (Anastasopoulos vd., 2014).

Önerilen bu çalışma sayesinde bakılan PON1 polimorfizmlerinin dağılımı yönünden PES ve PEG hastaları arasında fark bulunması bize PEG geliştirme riski olan PES hastalarını tanımlama yönünden yol gösterici olabilir; ileride yapılacak prospektif çalışmalar sayesinde bu bulgu teyit edilebilir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gönüllülerden Kan Örneklerinin Toplanması

PES ve PEG tanısının koyulması, Hasta ve kontrollerin çalışma hakkında bilgilendirilmesi, Hasta ve kontrollerden kan, gözyaşı ve aköz örneklerinin alınması, Hasta ve kontrollerin demografik bilgilerinin kaydedilmesi

Bu çalışma kapsamında bugüne kadar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi (eski adıyla Gülhane Askeri Tıp Akademisi) Göz Hastalıkları Servisi'nce 150 PES hastası, 150 PEG hastası ve 150 kontrol bireyin tam kan örnekleri toplanmış ve TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Teknoloji Merkezi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'ndeki 202 no'lu laboratuvarımıza getirilmiştir. Bu grubun demografik bilgileri aşağıdaki Tablo 2'de verilmektedir. Bilindiği gibi PES ve PEG yaşa bağlı olarak artış gösteren hastalıklardır. Bu durum bizim çalışma popülasyonumuzda da kendini göstermektedir. Yaş ortalaması PES hastalarında 71.47 ± 8.18 , PEG hastalarında 75.95 ± 8.80 ve kontrollerde 71.86 ± 9.31 olarak belirlenmiştir ($P=0.000$). Cinsiyet dağılımına bakıldığında PEG hastalarında erkeklerin kadınlara oranı biraz daha yüksek görünmektedir, ancak PES ve kontrol grubundaki dağılım ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($P=0.409$).

Tablo 2. PES hastası, PEG hastası ve kontrol bireylerin demografik bilgileri

| | PES hastası (n=150) | PEG hastası (n=150) | Kontrol (n=150) | P |
|------------------------------------|------------------------|------------------------|--------------------|-------|
| Yaş | 71.47±8.18 | 75.78 ±8.80 | 71.88±9.28 | 0.000 |
| Cinsiyet erkek/kadın erkek % | 77/73 51.3 | 87/63 58.0 | 77/73 51.3 | 0.409 |

Kan örnekleri antikoagulan (EDTA) içeren tüplere toplanmıştır ve -20°C buzdolabında bekletilmiştir. Laboratuvarımıza getirildikten sonra ise işlem yapılana kadar -86°C buzdolabında depolanmıştır. Toplanan tam kan örneklerinin tümünde DNA izolasyonu ile PON1 geninde çalışılması öngörülmuş tüm SNP'lerin çalışmaları tamamlanmıştır (İş paketi 3 ve 4).

3.2 Cihaz, Sarf Malzemesi ve Kimyasalların Satın Alınması

Alınması planlanmış olan cihazlardan mini jel elektroforez cihazı ve kuru blok ısıtıcı temin edilmiştir. Sarf malzemelerin temini ise proje boyunca devam etmiş olup gerekli kimyasallar alınarak deneylerde kullanılmıştır.

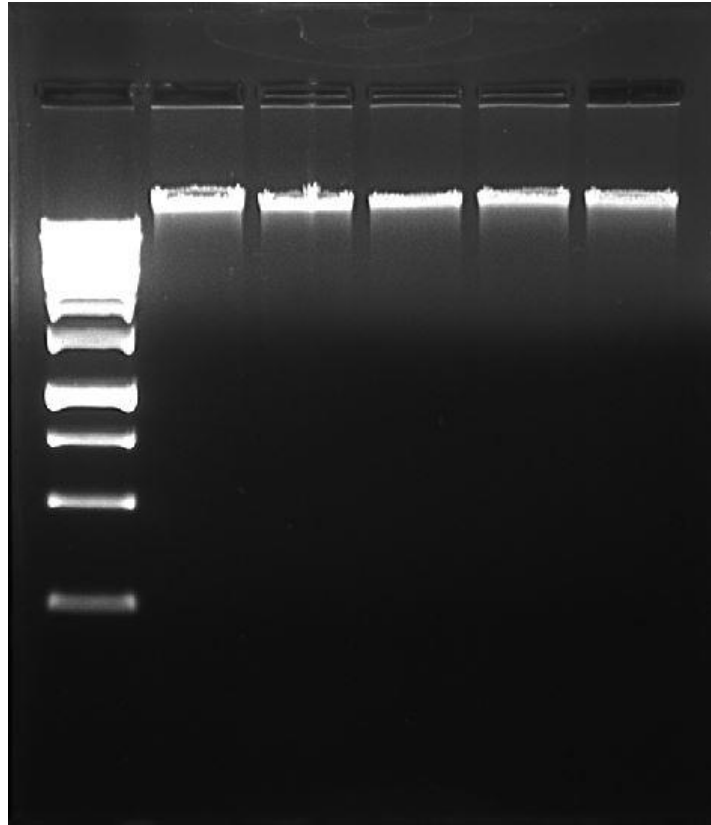
3.3 DNA İzolasyonu ve DNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Analizleri

Antikoagulan (EDTA) içeren tüplere alınan tam kan örnekleri TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Teknoloji Merkezi Biyomedikal Bölümü'ndeki 202 no'lu laboratuvarımıza getirilerek DNA izolasyonları, Lahiri ve Schnabel (1993) tarafından tarif edilen DNA izolasyonu metodunun laboratuvarımızda daha önce modifiye edilmiş hali kullanılarak yapılmıştır. Bu yöntem ile DNA izolasyonu için 750 µL tam kan ile KCl, EDTA ve MgCl₂ içeren pH 7.6 da tamponlanmış Tris-HCl solüsyonu (TKM) karıştırılıp ve Triton X-100 eklendikten sonra tüpler hafif hareketlerle çalkalanarak hücrelerin parçalanması sağlandı. Tüpler oda sıcaklığında santrifüjlendikten sonra supernatant atıldı, pellet iki kez daha TKM solüsyonu ile yıkanıp, TKM içinde çözüldü. Sodium dodecyl sulfat (SDS) eklendikten sonra 58°C'de 10 dakika inkübe edilip, soğuk ve doymuş NaCl çözeltisi ile ekstraksiyonu yapıldı; böylece proteinler organik fazda ayrılırken genomik DNA da sıvı fazda toplandı. Tüpler santrifüjlenerek proteinlerin pellete çökmesi sağlanıp, pellet atıldı. Sıvı fazdaki DNA %100'lük saf soğuk alkol ile çöktürüldü ve pH 8.0'de tamponlanmış Tris-EDTA solüsyonunda çözülüp, saklandı.

DNA izole edildikten sonra, kalitatif ve kantitatif analizleri yapıldı. Kantitatif analiz için izole edilmiş olan DNA'nın 260 nm'deki abzorbansı Hitachi U-5100 spektrofotometre ile (Hitachi High-Technologies Corporation, Japan) ölçüldü. DNA konsantrasyonu şu formül kullanılarak hesaplandı:

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) = Abzorbans 260nm x 50 ($\mu\text{g/mL}$) x Seyreltme Faktörü

İzole edilen genomik DNA'nın saflık ve bütünlük açısından kalitatif analizi için iki yöntem kullanıldı. Saf olup olmadığını anlamak için öncelikle izole edilmiş DNA örneğinin 280 nm'deki abzorbansı ölçüldü. Daha önce kantitatif analiz için 260 nm'de ölçülen abzorbansı, 280 nm'deki abzorbansına bölündüğünde (A_{260}/A_{280}) elde edilen değer 1,8 ise DNA'nın saf olduğu düşünüldü. A_{260}/A_{280} oranı 1,8'den yüksekse RNA kontaminasyonu, düşükse protein kontaminasyonu olduğu düşünüldü. DNA'nın bütünlüğü ise agaroz jel elektroforezi ile bir kereye mahsus olmak üzere incelendi. Etidyum bromür içeren %0,5 agaroz jeli, yatay agaroz jel elektroforez ünitesinde hazırlandı, 5 μL DNA örneği bromofenol mavisini içeren yükleme tamponu ile karıştırılıp, jelin deliklerine yüklendi. Tankın kapağı kapatılıp jel 90 Voltta 50 dk. yürütüldü. Jel UV ışığı altında Vilber Lourmat Gel Imaging System kullanılarak görüntülendi ve Vision-Capture (Version 16.09) bilgisayar yazılımı yardımı ile fotoğrafı çekildi (Şekil 2). Agaroz jelde saf DNA örneklerinin tek bir bant olarak görüldüğü, RNA ile kontamine olmuş örneklerin ise iki bant verdiği bilinmektedir. Yayılmış, bulanık görünen bir bant ise DNA'nın kırıldığını gösterir.



Şekil 2. İzole edilmiş genomik DNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntüsü

3.4 PES, PEG ve Kontrollerin PON1 Genotiplerinin Belirlenmesi

3.4.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PON1 genindeki 192Q/R, 55L/M, -107T/C polimorfizmlerinin genotiplenmesi klasik PCR-RFLP yöntemi ile belirlenmiştir. Her bir PES hastası, PEG hastası ve kontrolden elde edilen genomik DNA kullanılarak ayrı bir PCR karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon ortamı kalıp DNA, dNTPler, MgCl₂, Taq DNA polimeraz, uygun tampon çözeltisi, steril ultra saf su ve çoğaltılacak bölge için özel primerleri içermektedir. Bu çalışma kapsamında, bugüne kadar optimizasyon çalışmaları başarı ile tamamlanan 192Q/R, 55L/M, -107T/C tek nükleotit polimorfizmlerinin belirlenmesi için kullanılan primerlerin sekansı, PCR sırasında primerlerin kalıp DNA'ya yapışması için uygulanan sıcaklık (T_m), PCR ürününü kırmak için kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimi ve kırılma ürünlerinin uzunluğu Tablo 3'te verilmektedir.

PCR reaksiyonu için laboratuvarımızda bulunan Eppendorf Mastercycler (Hamburg, Germany) kullanılmıştır. İlk etapta, primer dizilerinin verildiği kaynak makalelerde verilen amplifikasyon koşullarından başlanarak, bu programdaki basamakların süreleri ve uygulanacak sıcaklık gibi parametrelerde değişiklik yapılarak en düzgün PCR bantını veren en uygun amplifikasyon programları belirlenmiştir.

Tablo 3. PON1 genetik polimorfizmlerinin belirlenmesi; primerlerin sekansı, PCR sırasında primerlerin kalıp DNA'ya yapışması için uygulanan sıcaklık (T_m), PCR ürününü kırmak için kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimi ve kırılma ürünlerinin beklenen uzunluğu

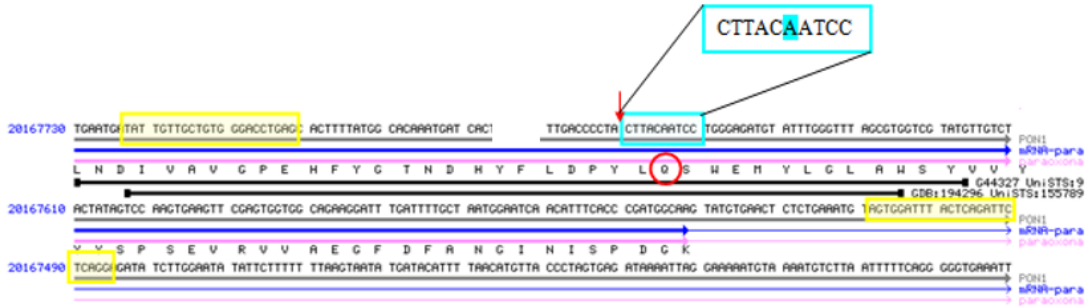
| SNP | Primer sekansı | T _m (°C) | PCR ürün uzunluğu (baz çifti; bç) | RE | Kırılma ürünlerinin uzunluğu (bç) |
|----------|--|---------------------|-----------------------------------|---------|-----------------------------------|
| 192 Q/R | 5' TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G 3' 5' CCT GAG AAT CTG AGT AAA TCC ACT 3' | | 238 bç | Alw I | 172 + 66 |
| 55 L/M | 5' CCT GCA ATA ATA TGA AAC AAC CTG 3' 5' TGA AAG ACT TAA ACT GCC AGT C 3' | | 172 bç | Nla III | 106 + 66 |
| -107 T/C | 5' AGC TAG CTG CGG ACC CGG CGG GGA GGA G 3' 5' GGC TGC AGC CCT CAC CAC AAC CC 3' | 67 | 240 bç | BsrB I | 212 + 28 |

PCR sonucunda elde edilen DNA'lar agaroz jel elektroforez yöntemi ile incelenmiştir. Bu amaçla, elde edilmesi planlanan PCR bantının büyüklüğünün görülmesini sağlayacak yoğunlukta bir agaroz jel (% 2) hazırlanmıştır. PCR ürünlerinin öngörülen büyüklüğü Tablo 3'te verilmektedir. PCR ürününün 12 µL'si bromofenol mavisi içeren bir yükleme tamponu ile

karıştırılarak jele yüklenmiştir. Aynı zamanda 50-1000 bç arasında bantlar veren bir DNA belirteci (50 bçlik DNA ladder) de jele yüklenmiş, böylece elde edilen bantın büyüklüğü tahmin edilebilmiştir. Tablo 3'te verilen uzunlukta tek bir bant elde edildiğinde PCR başarılı olmuş sayılıp, bir sonraki aşamaya, PCR ürününün restriksiyon enzimiyle kırılması aşamasına geçilmiştir.

3.4.1.1 PON1 192 Q/R Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu

192 Q/R tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin bağlandığı nükleotitler ve restriksiyon enziminin tanıdığı nükleotitler Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. PON1 geninin 192 Q/R tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgesinin sekansı. İleri ve geri primerlerin tanıdığı bölgeler sarı renkli kutucuğun içinde, A/w/ restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği bölge mavi renkli kutucuğun içinde ve polimorfik aminoasit de kırmızı halka ile belirtilmiştir (Sekans <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> kaynağından alınmıştır).

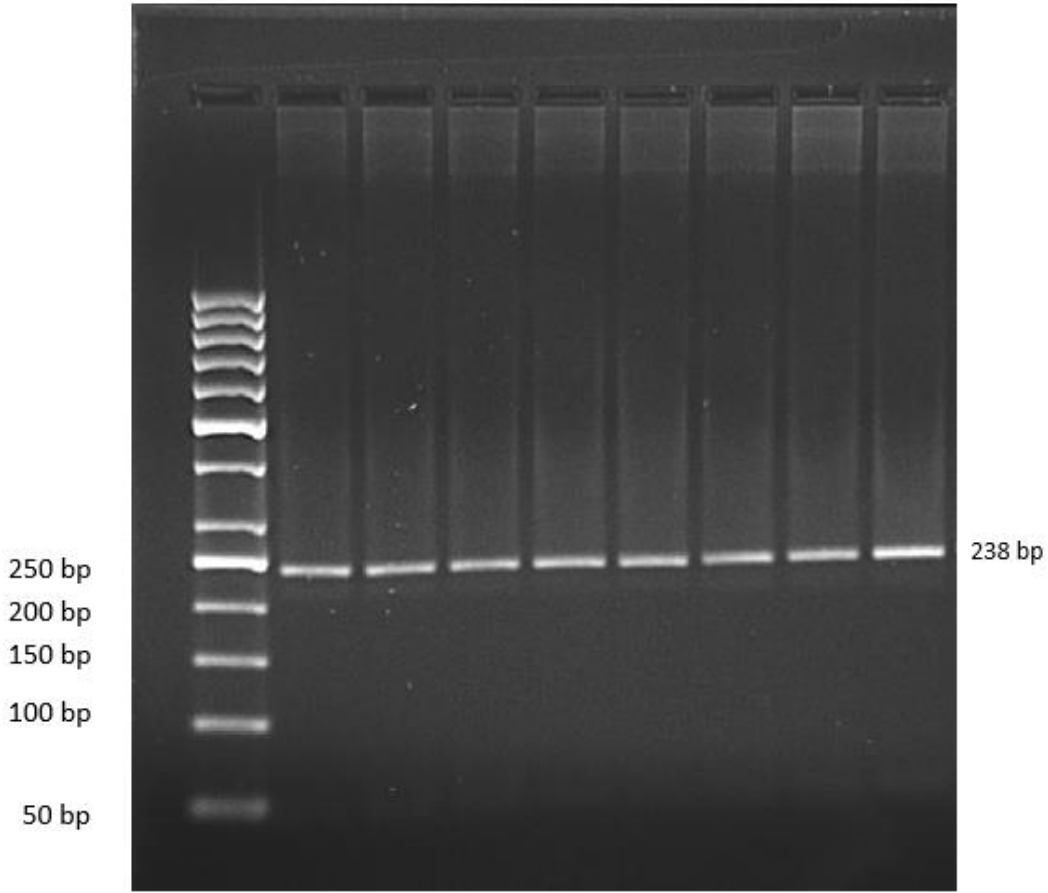
Optimizasyon amacıyla farklı MgCl₂ ve primer konsantrasyonları ile denemeler yapılmıştır. Ayrıca primer bağlanma sıcaklığı için de 58-62°C arasındaki sıcaklıklar denenmiş ve 60.5 °C'de en iyi sonuçlar elde edilmiştir. Optimizasyon sonucunda, reaksiyon ortamında Tablo 4'teki gibi bir içeriğin kullanılmasının ve Tablo 5'teki gibi bir döngü programı kullanılmasının en düzgün sonuçların elde edilmesini sağladığı belirlenmiştir. Ayrıca Tablo 5'teki döngü programıyla ilgili de pek çok deneme yapılmıştır. Optimize koşullarda elde edilen PCR ürünü Şekil 4'teki %2'lik agaroz jel elektroforez fotoğrafında 238 bç'lik bir bant şeklinde görülmektedir.

Tablo 4. 192 Q/R tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan reaksiyon içeriği

| İçerik | 1 tüp için eklenen hacim | Stok konsantrasyonu | 50 µL reaksiyon karışımındaki son konsantrasyon |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------|---|
| Steril Apirojen H ₂ O | değişken | | |
| Amplifikasyon Tamponu | 5 µL | 10X | 1X |
| MgCl ₂ | 3 µL | 25 mM | 1.75 mM |
| dNTP Karışımı | 1 µL | 10 mM | 200 µM |
| İleri Primer | 2 µL | 10 pmol/µL | 20 pmol (400 nM) |
| Geri Primer | 2 µL | 10 pmol/µL | 20 pmol (400 nM) |
| Kalıp DNA | değişken | değişken | 200 ng |
| Taq DNA Polimeraz | 0.25 µL | 5 U/µL | 1.25 U |

Tablo 5. 192 Q/R tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı

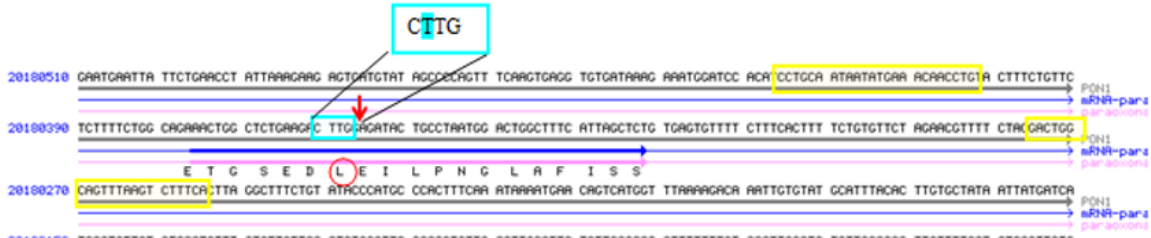
| | | | |
|-------------------|--------|--------|------------|
| İlk denatürasyon | 94°C | 3 dk. | } 40 döngü |
| Denatüsyon | 95°C | 30 sn. | |
| Primer bağlanması | 60.5°C | 20 sn. | |
| Sentez | 72°C | 50 sn. | |
| Son uzama | 72°C | 10 dk | |



Şekil 4. 192 Q/R tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgenin optimize edilmiş koşullarda elde edilen PCR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü

3.4.1.2 PON1 55 L/M Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu

55 L/M tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin bağlandığı nükleotitler ve restriksiyon enziminin tanıdığı nükleotitler Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. PON1 geninin 55 L/M tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgesinin sekansı. İleri ve geri primerlerin tanıdığı bölgeler sarı renkli kutucuğun içinde, *Nla*III restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği bölge mavi renkli kutucuğun içinde ve polimorfik aminoasit de kırmızı halka ile belirtilmiştir (Sekans <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> kaynağından alınmıştır).

Optimizasyon amacıyla farklı MgCl₂ ve primer konsantrasyonları ile denemeler yapılmıştır. Ayrıca primer bağlanma sıcaklığı için de 57-60°C arasındaki sıcaklıklar denenmiş ve 59°C'de en iyi sonuçlar elde edilmiştir. Optimizasyon sonucunda, reaksiyon ortamında Tablo 6'daki gibi

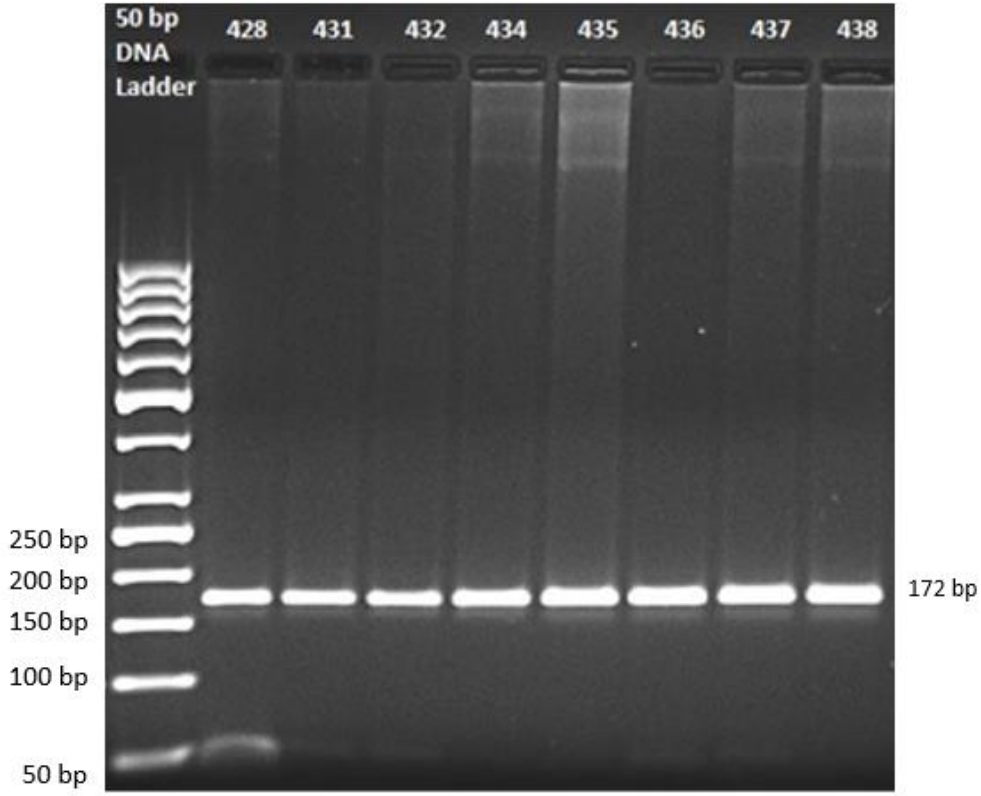
bir içeriğin kullanılmasının ve Tablo 7'deki gibi bir döngü programı kullanılmasının en düzgün sonuçların elde edilmesini sağladığı belirlenmiştir. Ayrıca Tablo 7'deki döngü programıyla ilgili de pek çok deneme yapılmıştır. Optimize koşullarda elde edilen PCR ürünü Şekil 6'daki %2'lik agaroz jel elektroforez fotoğrafında 172 bp'lik bir bant şeklinde görülmektedir.

Tablo 6. 55 L/M tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan reaksiyon içeriği

| İçerik | 1 tüp için eklenen hacim | Stok konsantrasyonu | 50 µL reaksiyon karışımındaki son konsantrasyon |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------|---|
| Steril Apirojen H ₂ O | değişken | | |
| Amplifikasyon Tamponu | 5 µL | 10X | 1X |
| MgCl ₂ | 4 µL | 25 mM | 2.0 mM |
| dNTP Karışımı | 1 µL | 10 mM | 200 µM |
| İleri Primer | 1 µL | 10 pmol/µL | 10 pmol (200 nM) |
| Geri Primer | 1 µL | 10 pmol/µL | 10 pmol (200 nM) |
| Kalıp DNA | değişken | değişken | 200 ng |
| Taq DNA Polimeraz | 0.25 µL | 5 U/µL | 1.25 U |

Tablo 7. 55 L/M tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı

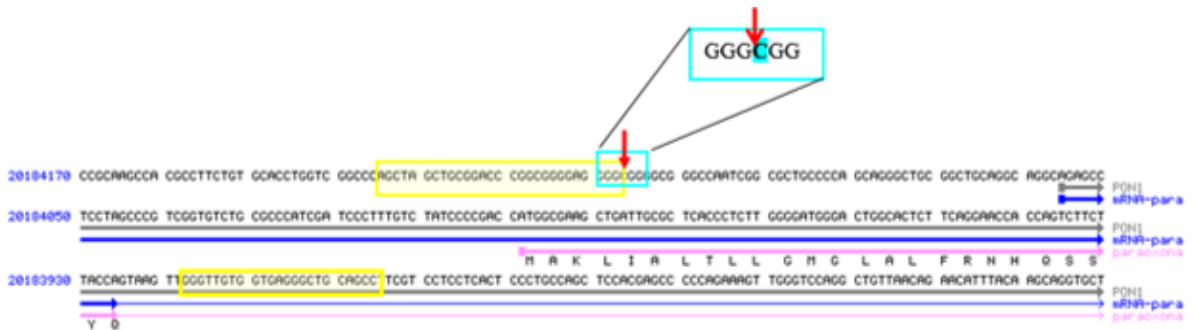
| | | | |
|-------------------|------|--------|------------|
| İlk denatürasyon | 94°C | 3 dk. | } 45 döngü |
| Denatüsyon | 95°C | 30 sn. | |
| Primer bağlanması | 59°C | 20 sn. | |
| Sentez | 72°C | 50 sn. | |
| Son uzama | 72°C | 10 dk | |



Şekil 6. 55 L/M tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgenin optimize edilmiş koşullarda elde edilen PCR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü

3.4.1.3 PON1 -107 T/C Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu

-107 T/C tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin bağlandığı nükleotitler ve restriksiyon enziminin tanıdığı nükleotitler Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7. PON1 geninin -107 T/C tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgesinin sekansı. İleri ve geri primerlerin tanıdığı bölgeler sarı renkli kutucuğun içinde, *BsrBI* restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği bölge mavi renkli kutucuğun içinde ve polimorfik nükleotit de kırmızı ok ile belirtilmiştir (Sekans <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> kaynağından alınmıştır).

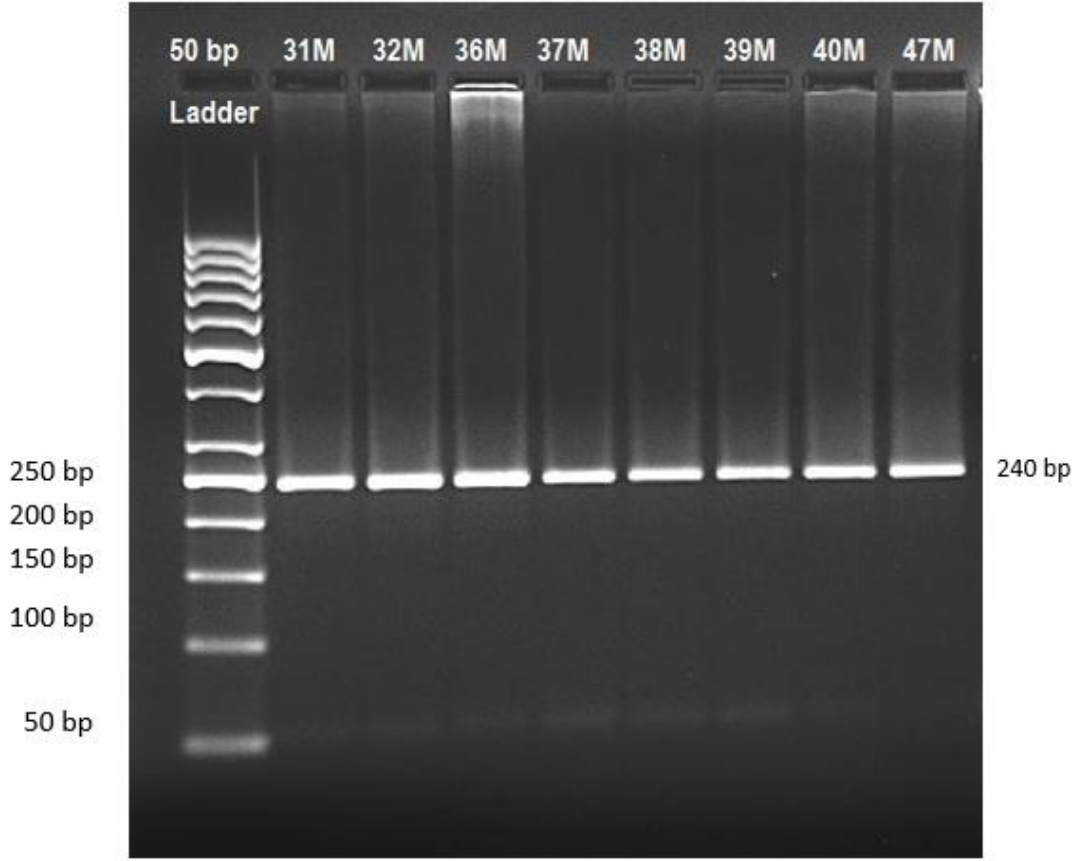
Optimizasyon amacıyla farklı $MgCl_2$ ve primer konsantrasyonları ile denemeler yapılmıştır. Ayrıca reaksiyon ortamı DMSO'lu ve DMSO'suz olarak hazırlanarak hangisinde en iyi sonucu verdiği bakılmış ve DMSO kullanımına karar verilmiştir. Bunlar dışında primer bağlanma sıcaklığı için de 60-69°C arasındaki sıcaklıklar denenmiş ve 67°C'de en iyi sonuçlar elde edilmiştir. Optimizasyonlar sonucunda reaksiyon ortamında Tablo 8'deki gibi bir içeriğin kullanılmasının ve Tablo 9'daki gibi bir döngü programı kullanılmasının en düzgün sonuçların elde edilmesini sağladığı belirlenmiştir. Optimize koşullarda elde edilen PCR ürünü Şekil 8'deki %2'lik agaroz jel elektroforez fotoğrafında 240 bp'lik bir bant şeklinde görülmektedir.

Tablo 8. -107 T/C tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan reaksiyon içeriği

| İçerik | 1 tüp için eklenen hacim | Stok konsantrasyonu | 50 µL reaksiyon karışımındaki son konsantrasyon |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------|---|
| Steril Apirojen H ₂ O | değişken | | |
| Amplifikasyon Tamponu | 5 µL | 10X | 1X |
| MgCl ₂ | 5 µL | 25 mM | 2.0 mM |
| dNTP Karışımı | 1 µL | 10 mM | 200 µM |
| DMSO | 2.5 µL | %100 | %5 |
| İleri Primer | 1.25 µL | 10 pmol/µL | 12.5 pmol (350 nM) |
| Geri Primer | 1.25 µL | 10 pmol/µL | 12.5 pmol (350 nM) |
| Kalıp DNA | değişken | değişken | 200 ng |
| Taq DNA Polimeraz | 0.25 µL | 5 U/µL | 1.25 U |

Tablo 9. -107 T/C tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı

| | | | |
|-------------------|------|--------|------------|
| İlk denatürasyon | 94°C | 3 dk. | } 35 döngü |
| Denatüsyon | 95°C | 30 sn. | |
| Primer bağlanması | 67°C | 20 sn. | |
| Sentez | 72°C | 50 sn. | |
| Son uzama | 72°C | 10 dk | |



Şekil 8. -107 T/C tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgenin optimize edilmiş koşullarda elde edilen PCR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü

3.4.2 PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleriyle Kırılması

Bireylerin genotiplerini belirlemek amacıyla, PCR sonucunda elde edilen DNA'lar Tablo 3'te verilen spesifik restriksiyon endonükleaz enzimi ile birlikte inkübe edilmiştir. Kullanılan restriksiyon enziminin miktarı, inkübasyonun süresi ve sıcaklığı gibi kriterler optimize edilmiştir. Restriksiyon süresi sonunda örnekler %2.5'lik agaroz jelinde analiz edilmiştir.

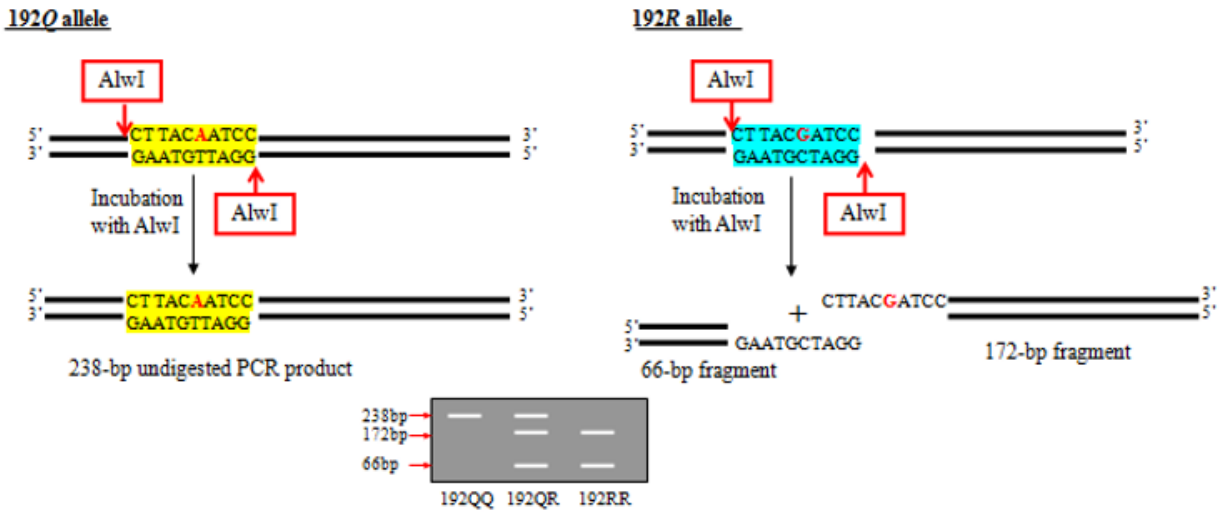
Aşağıda PON1 genindeki tek nükleotit polimorfizmlerinin belirlenmesi için yapılan restriksiyon endonükleaz enzim kesim işlemleri daha detaylı anlatılmaktadır.

3.4.2.1 PON1 192 Q/R Bölgesine Ait PCR Ürününün Restriksiyon Endonükleaz Enzimiyle Kırılması

192 Q/R genotipleri, *A/w* restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilip, kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucunda gözlenen bantların büyüklüğüne göre belirlenmiştir. *A/w* enziminin tanıma bölgesi aşağıdaki gibidir:



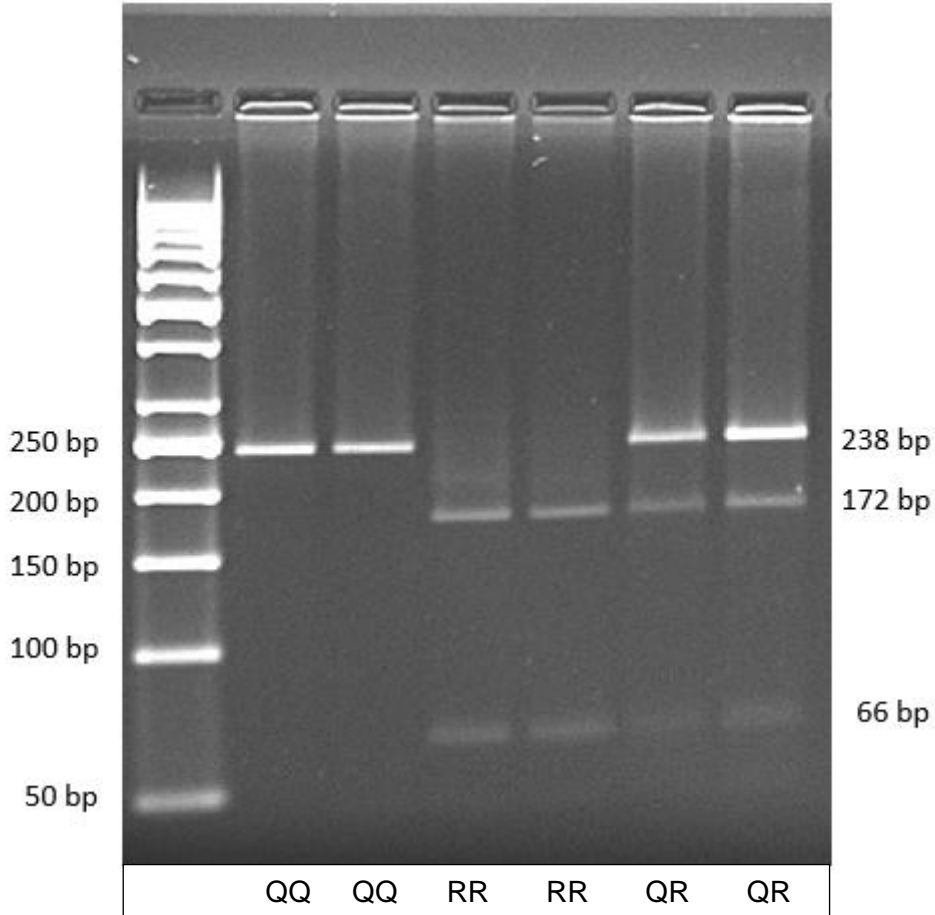
192 Q/R genetik polimorfizminin genotiplerinin belirlenmesi şematik olarak Şekil 9'da açıklanmıştır. 192 Q/R genetik polimorfizmini belirlemek için üretilen PCR ürünü bu bölge varsa, PCR ürünü *A/w* ile bekletildiğinde 238 bç'lik PCR ürününün 172 bç ve 66 bç'lik iki parçaya ayrılması beklenir. Agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş olan restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilmiş PCR ürünü, 172 bç ve 66 bç boyutlarında iki ayrı bant şeklinde görünmekte ise bu durumda bu PCR ürününün elde edildiği DNA örneğinin alındığı bireyin 192 Q/R genotipinin RR (polimorfik homozigot genotip) olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 9. 192 Q/R tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü

PCR ürünü *A/w* enziminin tanıdığı nükleotit dizisi bulunmadığı takdirde, 238 bç'lik PCR ürünü kesilmeyip, agaroz jel elektroforezinde, kontrol amacıyla jele yüklenmiş (*A/w* restriksiyon enzimiyle muamele edilmemiş) 238 bç boyutundaki PCR örneğiyle aynı büyüklükte bir bant olarak görünmektedir. Bu durumda bu bireyin genotipinin QQ (yabanıl homozigot genotip) olduğuna karar verilmiştir. Heterozigot (QR) olan bireylerden elde edilmiş olan genomik DNA'dan elde edilen PCR örneklerinden bazılarında *A/w* enziminin kesim bölgesi varken, bazılarında ise kesim yeri bulunmamaktadır. Bu yüzden *A/w* enzimiyle muamele edilmiş PCR ürünü jele yüklendiğinde 238 bç, 172 bç ve 66 bç boyutlarında üç bant elde edilmiştir. Bu enzimin inkübasyon süresi 1-16 saat arası olarak önerilmektedir. Yaptığımız optimizasyon çalışmaları sonunda PCR ürünlerinin *A/w* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesinde en iyi sonuçların PCR ürününün *A/w* enzimiyle 17 saat boyunca 55°C'de inkübe edilmesi ile elde edildiği belirlenmiştir. Ayrıca 10 µl PCR ürününün tam olarak kesilmesi için gereken *A/w* enzim miktarı da optimize edilmiş ve 2 ünite enzimin en iyi sonucu verdiği görülmüştür. Şekil 10'da laboratuvarımızda optimize edilen koşullarda PCR ürünlerinin *A/w*

restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesi sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü örneği ve karar verilen genotipler verilmektedir



Şekil 10. 192 Q/R tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kesim sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü

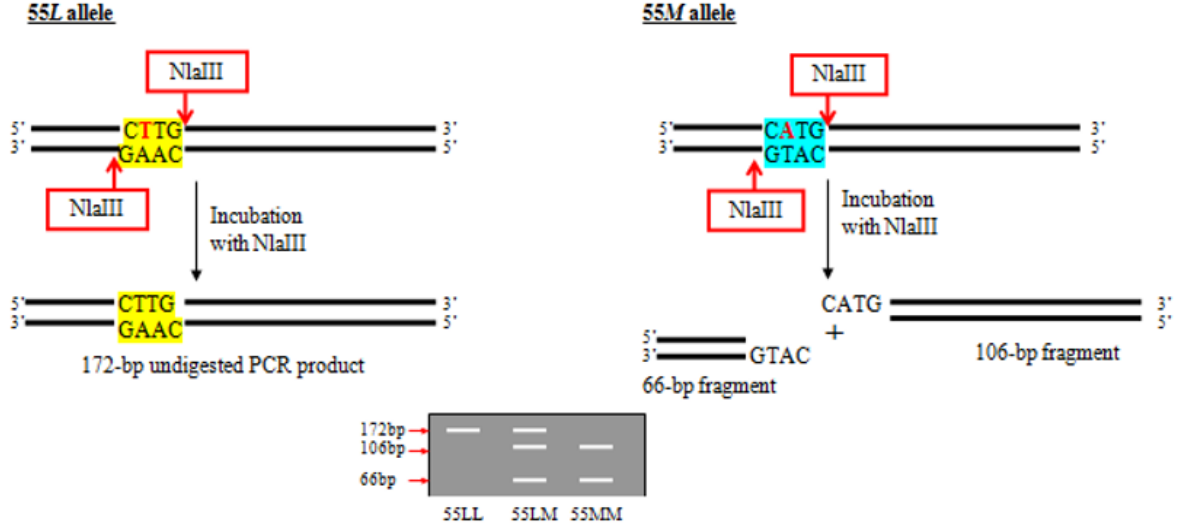
3.4.2.2 PON1 55 L/M Bölgesine Ait PCR Ürününün Restriksiyon Endonükleaz Enzimiyle Kırılması

55 L/M genotipleri, *NlaIII* restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilip, kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucunda gözlenen bantların büyüklüğüne göre belirlenmiştir. *NlaIII* enziminin tanıma bölgesi aşağıdaki gibidir:



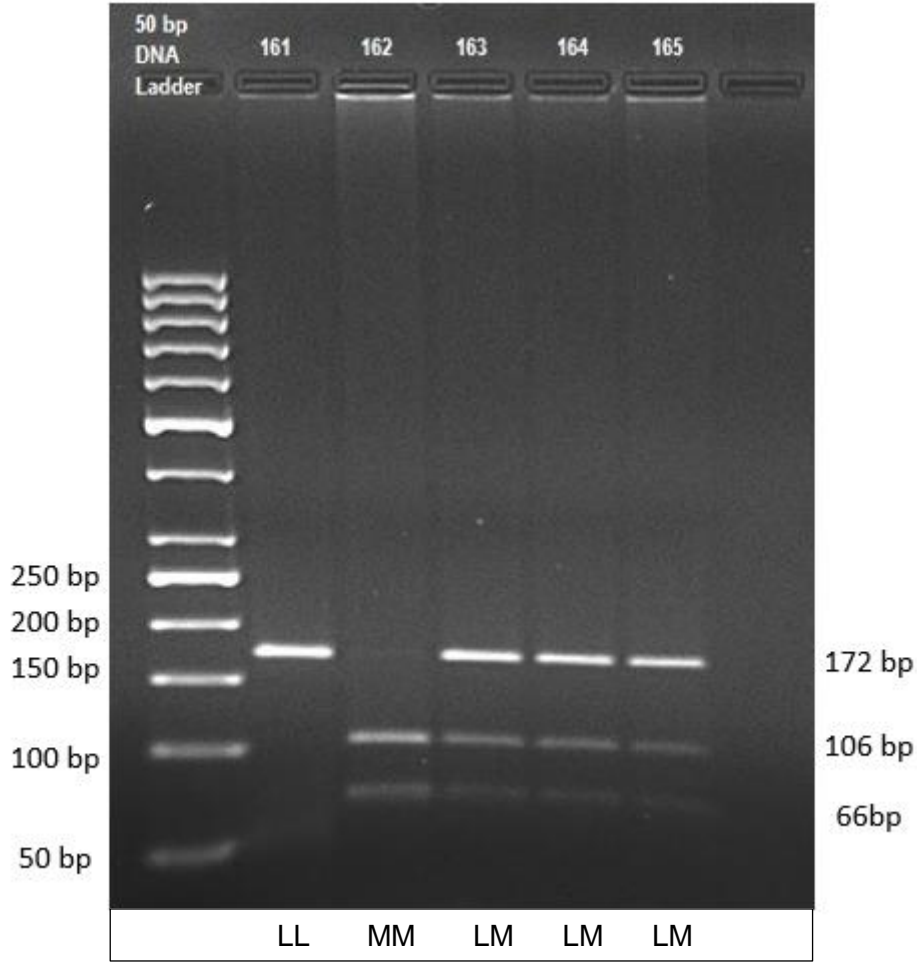
55 L/M genetik polimorfizminin genotiplerinin belirlenmesi şematik olarak Şekil 11'de açıklanmıştır. 55 L/M genetik polimorfizmini belirlemek için üretilen PCR ürünüde bu bölge varsa, PCR ürünü *NlaIII* ile bekletildiğinde 172 bç'lik PCR ürününün 106 bç ve 66 bç'lik iki parçaya ayrılması beklenir. Agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş olan restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilmiş PCR ürünü, 106 bç ve 66 bç boyutlarında iki ayrı bant

şeklinde görünmekte ise bu durumda bu PCR ürününün elde edildiği DNA örneğinin alındığı bireyin 55 L/M genotipinin MM (polimorfik homozigot genotip) olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 11. 55 L/M tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü

PCR ürününde *NlaIII* enziminin tanıdığı nükleotit dizisi bulunmadığı takdirde, 172 bç'lik PCR ürünü kesilmeyip, agaroz jel elektroforezinde, kontrol amacıyla jele yüklenmiş (*NlaIII* restriksiyon enzimiyle muamele edilmemiş) 172 bç boyutundaki PCR örneğiyle aynı büyüklükte bir bant olarak görünmektedir. Bu durumda bu bireyin genotipinin LL (yabanıl homozigot genotip) olduğuna karar verilmiştir. Heterozigot (LM) olan bireylerden elde edilmiş olan genomik DNA'dan elde edilen PCR örneklerinden bazılarında *NlaIII* enziminin kesim bölgesi varken, bazılarında ise kesim yeri bulunmamaktadır. Bu yüzden *NlaIII* enzimiyle muamele edilmiş PCR ürünü jele yüklendiğinde 172 bç, 106 bç ve 66 bç boyutlarında üç bant elde edilmiştir. Bu enzimin inkübasyon süresi 1-16 saat arası olarak önerilmektedir. Yaptığımız optimizasyon çalışmaları sonunda PCR ürünlerinin *NlaIII* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesinde en iyi sonuçların PCR ürünününün *NlaIII* enzimiyle 17 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmesi ile elde edildiği belirlenmiştir. Ayrıca 10 µl PCR ürününün tam olarak kesilmesi için gereken *NlaIII* enzim miktarı da optimize edilmiş ve 5 ünite enzimin en iyi sonucu verdiği görülmüştür. Şekil 12'de laboratuvarımızda optimize edilen koşullarda PCR ürünlerinin *NlaIII* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesi sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü örneği ve karar verilen genotipler verilmektedir



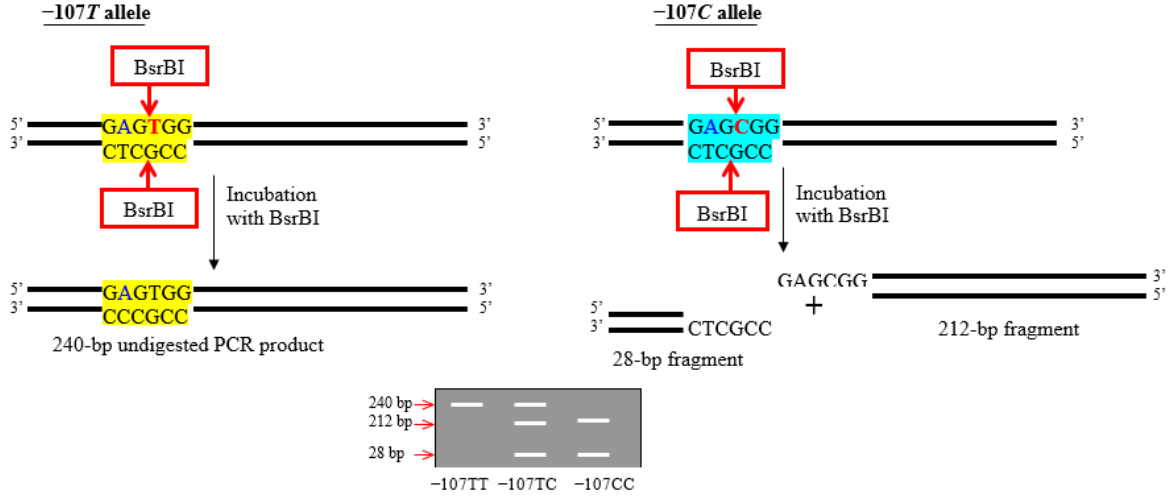
Şekil 12. 55 L/M tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kesim sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü

3.4.2.3 PON1 -107 T/C Bölgesine Ait PCR Ürününün Restriksiyon Endonükleaz Enzimiyle Kırılması

-107 T/C genotipleri, *BsrBI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilip, kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucunda gözlenen bantların büyüklüğüne göre belirlenmiştir. *BsrBI* enziminin tanıma bölgesi aşağıdaki gibidir:

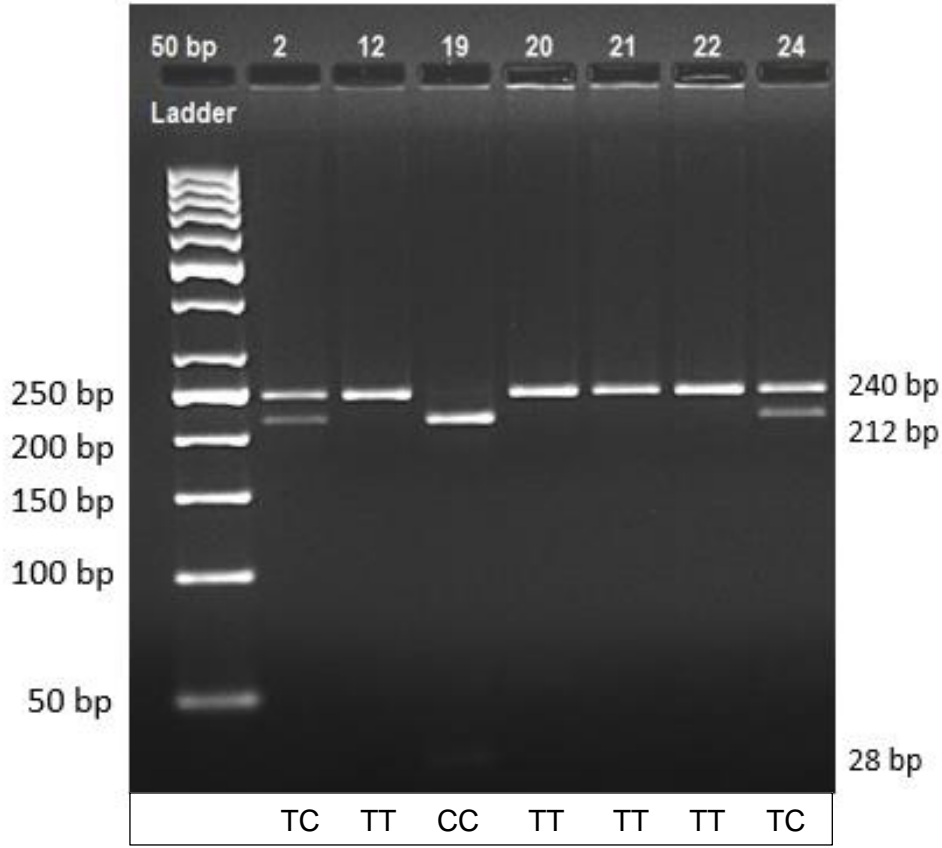


-107 T/C genetik polimorfizminin genotiplerinin belirlenmesi şematik olarak Şekil 13'te açıklanmıştır. -107 T/C genetik polimorfizmini belirlemek için üretilen PCR ürünüde bu bölge varsa, PCR ürünü *BsrBI* ile bekletildiğinde 240 bç'lik PCR ürününün 212 bç ve 28 bç'lik iki parçaya ayrılması beklenir. Agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş olan restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilmiş PCR ürünü, 212 bç ve 28 bç boyutlarında iki ayrı bant şeklinde görünmekte ise bu durumda bu PCR ürününün elde edildiği DNA örneğinin alındığı bireyin -107 T/C genotipinin CC (polimorfik homozigot genotip) olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 13. -107 T/C tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü

PCR ürününde *BsrBI* enziminin tanıdığı nükleotit dizisi bulunmadığı takdirde, 240 bç'lik PCR ürünü kesilmeyip, agaroz jel elektroforezinde, kontrol amacıyla jele yüklenmiş (*BsrBI* restriksiyon enzimiyle muamele edilmemiş) 240 bç boyutundaki PCR örneğiyle aynı büyüklükte bir bant olarak görünmektedir. Bu durumda bu bireyin genotipinin TT (yabanıl homozigot genotip) olduğuna karar verilmiştir. Heterozigot (TC) olan bireylerden elde edilmiş olan genomik DNA'dan elde edilen PCR örneklerinden bazılarında *BsrBI* enziminin kesim bölgesi varken, bazılarında ise kesim yeri bulunmamaktadır. Bu yüzden *BsrBI* enzimiyle muamele edilmiş PCR ürünü jele yüklendiğinde 240 bç, 212 bç ve 28 bç boyutlarında üç bant elde edilmiştir. Bu enzim fast-digest bir enzimdir ve inkübasyon süresi 15 dk. olarak önerilmektedir. Yaptığımız optimizasyon çalışmaları sonunda PCR ürünlerinin *BsrBI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesinde en iyi sonuçların PCR ürünününün *BsrBI* enzimiyle 45 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmesi ile elde edildiği belirlenmiştir. Ayrıca 10 µl PCR ürününün tam olarak kesilmesi için gereken *BsrBI* enzim miktarı da optimize edilmiş ve 10 ünite enzimin en iyi sonucu verdiği görülmüştür. Şekil 14'te laboratuvarımızda optimize edilen koşullarda PCR ürünlerinin *BsrBI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesi sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü örneği ve karar verilen genotipler verilmektedir.



Şekil 14. -107 T/C tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kesim sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü

3.5 İstatistik analizler

Sürekli değişken olarak yaş parametresinin dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile incelenmiş, normal dağılmadığı için bu parametrenin hasta ve kontroller arasında karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Kategorik değişkenler (cinsiyet, genotip ve alel frekansları) yüzde veya oran şeklinde ifade edilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarında genetik polimorfizmlere ait alellerin genotip dağılımlarının Hardy-Weinberg dengesine uyup uymadığı χ^2 testi ile incelenmiştir. Hasta ve kontrollerin genotip ve alel frekanslarındaki farklılıklar da χ^2 testi ile belirlenmiştir. Fenotipler ile genotipler arasındaki ilişki Pearson korelasyonu ile analiz edilmiştir. Yaş, cinsiyet, genotip parametrelerinin ve bunlarla birlikte, PON1, stPON1, ARE ve fenotip parametrelerinin psödoeksfolyasyon sendromu ve psödoeksfolyasyon glokomu ile ilişkili olup olmadığını belirlemek için lojistik regresyon analizi, Backward LR yöntemi ile, Hosmer-Lemeshow kalibrasyonu ile birlikte, yapılmıştır. P değeri 0.05'ten küçük olduğunda bulgular istatistiksel olarak anlamlı sayılmıştır. Bahsedilen bu istatistiksel analizler için SPSS paket programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Şimdiye kadar Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nca toplanıp TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Teknoloji Merkezi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'ndeki 202 no'lu laboratuvarımızda DNA izolasyonu tamamlanan toplam 450 kan örneğinde, yukarıda optimizasyon çalışmalarının tamamlandığı bildirilen 3 polimorfizmin genotipleme çalışması tamamlanmıştır.

4.1 Genotip Sonuçları

4.1.1 PON1 192 Q/R Tek Nükleotit Polimorfizmi Genotip Sonuçları

192 Q/R polimorfizmi için 150 PES hastası, 150 PEG hastası ve 150 kontrol bireyin genotip ve alel frekansları Tablo 10'da verilmektedir. Polimorfik R alelinin frekansı PES hastalarında 0.290, PEG hastalarında 0.303, ve kontrollerde 0.250 olarak hesaplanmıştır ve aralarında istatistiksel anlamlı bir fark yoktur (PES-kontrol $P=0.270$, PEG-kontrol $P=0.144$). PES için R alelinin OR (Odds Ratio) değeri 1.225 (95% CI=0.854-1.758) iken PEG için R alelinin OR değeri 1.306 (95% CI=0.912-1.870) olarak hesaplanmıştır. Gözlenen genotip frekanslarının Hardy-Weinberg dengesine uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Tablo 10. PES hastaları, PEG hastaları ve kontrol bireylerin 192 Q/R genotip ve alel frekansları

| | PES (n=150) | Kontrol (n=150) | OR (95% CI) | P | PEG (n=150) | Kontrol (n=150) | OR (95% CI) | P |
|--------------------------|----------------|--------------------|-------------------------------------|-------|----------------|--------------------|-------------------------------------|-------|
| Genotip, n(%) | | | | | | | | |
| QQ | 77(51.3) | 84(56.0) | 1.613 ^a (0.676-3.849) | 0.278 | 69(46.0) | 84(56.0) | 1.119 ^a (0.441-2.837) | 0.813 |
| QR | 59(39.3) | 57(38.0) | 1.207 ^b (0.766-1.901) | 0.418 | 71(47.3) | 57(38.0) | 1.494 ^b (0.948-2.355) | 0.083 |
| RR | 14(9.4) | 9(6.0) | | | 10(6.7) | 9(6.0) | | |
| Alel frekansı | | | | | | | | |
| Q | 0.710 | 0.750 | 1.225 ^c (0.854-1.758) | 0.270 | 0.697 | 0.750 | 1.306 ^c (0.912-1.870) | 0.144 |
| R | 0.290 | 0.250 | | | 0.303 | 0.250 | | |

a.RR vs QR+QQ

b.RR+QR vs QQ

c.R vs Q

Polimorfik genotip RR frekansı PES hastalarında %9.4, PEG hastalarında %6.7 ve kontrollerde %6.0 olarak gözlenmiştir. Risk analizi için RR genotipine sahip kişi sayısı, QR+QQ genotipi taşıyanlar ile karşılaştırıldığında OR değeri PES için 1.613 (95% CI=0.676-3.849, $P=0.278$), PEG için 1.119 (95% CI=0.441-2.837, $P=0.813$) olarak hesaplanmıştır. RR+QR genotiplerine karşı QQ genotipleri düşünüldüğünde ise PES için OR= 1.207 (95% CI=0.766-1.901, $P=0.418$), PEG için OR=1.494 (95% CI=0.948-2.355, $P=0.083$) olarak bulunmuştur. Bu

sonuçlara göre, R aleli taşıyan genotipe sahip olmak ile, taşımayan genotipe sahip olmak arasında PES veya PEG riski bakımından anlamlı bir fark yoktur.

Tablo 11'de PON1 192Q/R genotip ve alel frekansları PES ve PEG hastaları arasında karşılaştırılmış ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Tablo 11. PEG ve PES hastalarının 192 Q/R genotip ve alel frekansları

| | PEG (n=150) | PES (n=150) | OR (95% CI) | P |
|----------------------|----------------|----------------|----------------------------------|-------|
| Genotip, n(%) | | | | |
| QQ | 69(46.0) | 77(51.3) | 0.694 ^a (0.298-1.616) | 0.395 |
| QR | 71(47.3) | 59(39.3) | 1.238 ^b (0.787-1.949) | 0.355 |
| RR | 10 (6.7) | 14 (9.4) | | |
| Alel frekansı | | | | |
| Q | 0.697 | 0.710 | 1.066 ^c (0.751-1.513) | 0.721 |
| R | 0.303 | 0.290 | | |

a. RR vs. QR+QQ
b. RR+QR vs. QQ
c. R vs. Q

4.1.2 PON1 55 L/M Tek Nükleotit Polimorfizmi Genotip Sonuçları

55 L/M polimorfizmi için 148 PES hastası, 150 PEG hastası ve 150 kontrol bireyin genotip ve alel frekansları Tablo 12'de verilmektedir. Polimorfik M alelinin frekansı PES hastalarında 0.338, PEG hastalarında 0.353, kontrollerde 0.323 olarak hesaplanmıştır ve aralarında istatistiksel anlamlı bir fark yoktur (PES-kontrol P=0.707, PEG-kontrol P=0.437). PES için M alelinin OR (Odds Ratio) değeri 1.068 (95% CI=0.759-1.502) iken PEG için M alelinin OR değeri 1.143 (95% CI=0.815-1.604) olarak hesaplanmıştır. Gözlenen genotip frekanslarının Hardy-Weinberg dengesine uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Tablo 12. PES hastaları, PEG hastaları ve kontrol bireylerin 55 L/M genotip ve alel frekansları

| | PES (n=148) | Kontrol (n=150) | OR (95% CI) | P | PEG (n=150) | Kontrol (n=150) | OR (95% CI) | P |
|----------------------|----------------|--------------------|-------------------------------------|-------|----------------|--------------------|-------------------------------------|-------|
| Genotip, n(%) | | | | | | | | |
| LL | 72(48.7) | 70(46.7) | 1.514 ^a (0.777-2.953) | 0.221 | 57(38.0) | 70(46.7) | 0.742 ^a (0.347-1.588) | 0.441 |
| LM | 52(35.1) | 63(42.0) | 0.924 ^b (0.586-1.455) | 0.732 | 80(53.3) | 63(42.0) | 1.428 ^b (0.901-2.261) | 0.129 |
| MM | 24(16.2) | 17(11.3) | | | 13 (8.7) | 17(11.3) | | |
| Alel frekansı | | | | | | | | |
| L | 0.662 | 0.677 | 1.068 ^c (0.759-1.502) | 0.707 | 0.647 | 0.677 | 1.143 ^c (0.815-1.604) | 0.437 |
| M | 0.338 | 0.323 | | | 0.353 | 0.323 | | |

a. MM vs LM+LL
b. MM+LM vs LL
c. M vs L

Polimorfik genotip MM frekansı PES hastalarında %16.2, PEG hastalarında %8.7 ve kontrollerde %11.3 olarak gözlenmiştir. Risk analizi için MM genotipine sahip kişi sayısı, LM+LL genotipi taşıyanlar ile karşılaştırıldığında OR değeri PES için 1.514 (95% CI=0.777-2.953, P=0.221), PEG için 0.742 (95% CI=0.347-1.588, P=0.441) olarak hesaplanmıştır. MM+LM genotiplerine karşı LL genotipleri düşünüldüğünde ise PES için OR= 0.924 (95% CI=0.586-1.455, P=0.732), PEG için OR= 1.428 (95% CI=0.901-2.261, P=0.129) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, M aleli taşıyan genotipe sahip olmak ile taşımayan genotipe sahip olmak arasında PES veya PEG riski bakımından anlamlı bir fark yoktur.

Tablo 13'de PON1 55L/M genotip ve alel frekansları PES ve PEG hastaları arasında karşılaştırılmıştır. PES hastaları için, MM genotipine sahip olmak LM veya LL genotipine göre PEG için 0.49 kat (OR=0.490, P=0.048) risklidir; diğer bir ifade ile yaklaşık 2 kat koruyucudur.

Tablo 13. PES ve PEG hastalarının 55 L/M genotip ve alel frekansları

| | PEG (n=150) | PES (n=148) | OR (95% CI) | P |
|----------------------|----------------|----------------|----------------------------------|-------|
| Genotip, n(%) | | | | |
| LL | 57(38.0) | 72(48.7) | 0.490 ^a (0.239-1.005) | 0.048 |
| LM | 80(53.3) | 52(35.1) | 1.546 ^b (0.975-2.451) | 0.064 |
| MM | 13 (8.7) | 24(16.2) | | |
| Alel frekansı | | | | |
| L | 0.647 | 0.662 | 1.071 ^c (0.764-1.501) | 0.691 |
| M | 0.353 | 0.338 | | |

a. MM vs. LM+LL
b. MM+LM vs. LL
c. M vs. L

4.1.3 PON1 -107 T/C Tek Nükleotit Polimorfizmi Genotip Sonuçları

-107 T/C polimorfizmi için 150 PES hastası, 150 PEG hastası ve 150 kontrol bireyin genotip ve alel frekansları Tablo 14'te verilmektedir. Polimorfik C alelinin frekansı PES hastalarında 0.397, PEG hastalarında 0.473, kontrollerde 0.443 olarak hesaplanmıştır ve aralarında istatistiksel anlamlı bir fark yoktur (PES-kontrol P=0.247, PEG-kontrol P=0.461). PES için C alelinin OR (Odds Ratio) değeri 0.826 (95% CI=0.597-1.142) iken PEG için C alelinin OR değeri 1.128 (95% CI=0.818-1.556) olarak hesaplanmıştır. Gözlenen genotip frekanslarının Hardy-Weinberg dengesine uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Polimorfik genotip CC frekansı PES hastalarında %21.3, PEG hastalarında %24.7 ve kontrollerde %18.0 olarak gözlenmiştir. Risk analizi için CC genotipine sahip kişi sayısı, TC+TT genotipi taşıyanlar ile karşılaştırıldığında OR değeri PES için 1.235 (95% CI=0.698-2.187, P=0.468), PEG için 1.492 (95% CI=0.509-2.102, P=0.159) olarak hesaplanmıştır. CC+TC genotiplerine karşı TT genotipleri düşünüldüğünde ise PES için OR= 0.573 (95% CI=0.355-

0.925, $P=0.022$), PEG için $OR=0.996$ (95% $CI=0.590-1.590$, $P=1.000$) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, C aleli taşıyan genotipe sahip olmanın, taşımayan genotipe göre PES için 0.573 kat riskli (yani 1.74 kat daha koruyucu) ($P=0.022$) olduğu söylenebilir.

Tablo 14. PES hastaları, PEG hastaları ve kontrol bireylerin -107 T/C genotip ve alel frekansları

| | PES (n=150) | Kontrol (n=150) | OR (95% CI) | P | PEG (n=150) | Kontrol (n=150) | OR (95% CI) | P |
|----------------------|----------------|--------------------|-------------------------------------|-------|----------------|--------------------|-------------------------------------|-------|
| Genotip, n(%) | | | | | | | | |
| TT | 63(42.0) | 44(29.3) | 1.235 ^a (0.698-2.187) | 0.468 | 45(30.0) | 44(29.3) | 1.492 ^a (0.854-2.606) | 0.159 |
| TC | 55(36.7) | 79(52.7) | 0.573 ^b (0.355-0.925) | 0.022 | 68(45.3) | 79(52.7) | 0.969 ^b (0.590-1.590) | 1.000 |
| CC | 32(21.3) | 27(18.0) | | | 37(24.7) | 27(18.0) | | |
| Alel frekansı | | | | | | | | |
| T | 0.603 | 0.557 | 0.826 ^c (0.597-1.142) | 0.247 | 0.527 | 0.557 | 1.128 ^c (0.818-1.556) | 0.461 |
| C | 0.397 | 0.443 | | | 0.473 | 0.443 | | |

a. CC vs. CT+TT
b. CC+CT vs. TT
c. C vs. T

Tablo 15'te PON1 -107T/C genotip ve alel frekansları PES ve PEG hastaları arasında karşılaştırılmıştır. TC veya CC genotipine sahip olmanın, TT genotipine göre, PEG riskini 1.690 kat arttırdığı ($P=0.030$) hesaplanmıştır. C alelinin frekansının PES hastalarında PEG hastalarında olduğundan daha düşük olduğu görülmüştür, ancak aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($P=0.058$).

Tablo 15. PES ve PEG hastalarının -107 T/C genotip ve alel frekansları

| | PEG (n=150) | PES (n=150) | OR (95% CI) | P |
|----------------------|----------------|----------------|----------------------------------|-------|
| Genotip, n(%) | | | | |
| TT | 45(30.0) | 63(42.0) | 1.325 ^a (0.770-2.278) | 0.309 |
| TC | 68(45.3) | 55(36.7) | 1.690 ^b (1.049-2.721) | 0.030 |
| CC | 37(24.7) | 32(21.3) | | |
| Alel frekansı | | | | |
| T | 0.527 | 0.603 | 1.367 ^c (0.989-1.890) | 0.058 |
| C | 0.473 | 0.397 | | |

a. CC vs. TC+TT
b. CC+TC vs. TT
c. C vs. T

4.1.4 Üçlü Haplotip Dağılımı

Bu çalışma kapsamında elde edilen PON1 192Q/R, 55L/M, -107T/C genotiplerinin üçünün birden tek kişide oluşturduğu farklı haplotiplerin PES, PEG ve kontrol gruplarındaki dağılımları Tablo 16'da verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı P değerleri koyu renkle verilmiştir.

QQMMTT haplotipi PES hastaları arasında %4.16, kontrollerde ise %1.47 görülmüştür (OR =2.57, P=0.048). **QQLMTC** haplotipi PES hastalarında %2.2, kontrollerde %4.16 (OR=0.41, P=0.034) görülmüştür. Aynı haplotip için PEG-PES karşılaştırmasında da yine istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (OR=3.309, P=0.002). **QQLLCC** dağılımı da PES (%3.42) ve kontroller (%0.98) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka sahiptir (OR=3.155, P=0.038). **QRL LTC** haplotipi PEG hastalarında %2.69, kontrollerde %5.38 görülmüştür (OR=0.391, P=0.014). Aynı haplotip PES hastalarında %3.42, kontrollerde %5.38 görülmüştür (OR=0.487, P=0.046).

Tablo 16. PON1 192Q/R, 55L/M, -107T/C üçlü kombine haplotiplerin dağılımı. OR ve P için a) PEG vs. control b) PES vs. control, c) PEG vs. PES

| Üçlü kombine haplotipler n (%) | PEG n (%) | PES n (%) | Kontrol n (%) | OR | P |
|--------------------------------|-----------|-----------|---------------|----------------------------------|--|
| QQMMCC | 1(0.24) | 2(0.49) | 2(0.49) | a) 0.439 b) 0.840 c) 0.518 | a) 0.492 b) 0.863 c) 0.586 |
| QQMMTC | 4(0.98) | 5(1.22) | 1(0.24) | a) 3.588 b) 4.326 c) 0.829 | a) 0.226 b) 0.148 c) 0.783 |
| QQMMTT | 9(2.20) | 17(4.16) | 6(1.47) | a) 1.340 b) 2.570 c) 0.521 | a) 0.589 b) 0.048 c) 0.125 |
| QQLMCC | 8(1.96) | 5(1.22) | 4(0.98) | a) 1.803 b) 1.070 c) 1.698 | a) 0.340 b) 1.000 c) 0.359 |
| QQLMTC | 25(6.11) | 9(2.20) | 17(4.16) | a) 1.355 b) 0.410 c) 3.309 | a) 0.373 b) 0.034 c) 0.002 |
| QQLMTT | 10(2.44) | 7(1.71) | 6(1.47) | a) 1.500 b) 0.982 c) 1.527 | a) 0.443 b) 1.000 c) 0.401 |
| QQLLCC | 9(2.20) | 14(3.42) | 4(0.98) | a) 2.044 b) 3.155 c) 0.648 | a) 0.236 b) 0.038 c) 0.326 |
| QQL LTC | 8(1.96) | 10(2.44) | 9(2.20) | a) 0.768 b) 0.931 c) 0.824 | a) 0.598 b) 0.881 c) 0.693 |
| QQLLTT | 2(0.49) | 4(0.98) | 5(1.22) | a) 0.342 b) 0.665 c) 0.514 | a) 0.185 b) 0.547 c) 0.439 |
| QRMMCC | 0 | 0 | 0 | a) 0 b) 0 c) 0 | a) 1.000 b) 1.000 c) 1.000 |

| | | | | | |
|--------|----------|----------|----------|----------------------------------|--|
| QRMMTC | 1(0.24) | 0 | 0 | a) 0 b) 0 c) 2.050 | a) 0.245 b) 1.000 c) 0.212 |
| QRMMTT | 0 | 1(0.24) | 3(0.73) | a) 0 b) 0.276 c) 0 | a) 0.094 b) 0.236 c) 0.228 |
| QRLMCC | 3(0.73) | 1(0.24) | 5(1.22) | a) 0.517 b) 0.163 c) 3.175 | a) 0.365 b) 0.061 c) 0.294 |
| QRLMTC | 14(3.42) | 7(1.71) | 9(2.20) | a) 1.407 b) 0.638 c) 2.206 | a) 0.442 b) 0.384 c) 0.092 |
| QRLMTT | 13(3.18) | 14(3.42) | 7(1.71) | a) 1.696 b) 1.758 c) 0.965 | a) 0.273 b) 0.235 c) 1.000 |
| QRLCC | 9(2.20) | 10(2.44) | 7(1.71) | a) 1.138 b) 1.218 c) 0.934 | a) 0.803 b) 0.697 c) 0.886 |
| QRLTCC | 11(2.69) | 14(3.42) | 22(5.38) | a) 0.391 b) 0.487 c) 0.804 | a) 0.014 b) 0.046 c) 0.604 |
| QRLTT | 5(1.22) | 12(2.93) | 7(1.71) | a) 0.667 b) 1.612 c) 0.414 | a) 0.496 b) 0.328 c) 0.097 |
| | | | | | |
| RRMMCC | 0 | 0 | 0 | a) 0 b) 0 c) 0 | a) 1.000 b) 1.000 c) 1.000 |
| RRMMTC | 0 | 0 | 0 | a) 0 b) 0 c) 0 | a) 1.000 b) 1.000 c) 1.000 |
| RRMMTT | 0 | 1(0.24) | 0 | a) 0 b) 0 c) 0 | a) 1.000 b) 0.254 c) 0.245 |
| RRLMCC | 0 | 0 | 0 | a) 0 b) 0 c) 0 | a) 1.000 b) 1.000 c) 1.000 |
| RRLMTC | 1(0.24) | 0 | 0 | a) 0 b) 0 c) 2.050 | a) 0.245 b) 1.000 c) 0.212 |
| RRLMTT | 0 | 2(0.49) | 1(0.24) | a) 0 b) 1.694 c) 0 | a) 0.196 b) 0.665 c) 0.088 |
| RRLCC | 1(0.24) | 0 | 3(0.73) | a) 0.288 b) 0 c) 2.050 | a) 0.254 b) 0.094 c) 0.212 |
| RRLTCC | 4(0.98) | 6(1.47) | 3(0.73) | a) 1.176 b) 1.714 c) 0.686 | a) 0.834 b) 0.448 c) 0.564 |
| RRLTT | 2(0.49) | 5(1.22) | 2(0.49) | a) 0.877 b) 2.145 c) 0.409 | a) 1.000 b) 0.356 c) 0.275 |

4.2 Önceden fenotip verisi olan hastaların genotip bilgilerinin analizi

Proje önerisinde de belirtilmiş olduğu gibi daha önce PON1 (PON1 enziminin paraokson substratına karşı aktivitesi), ARE (PON1 enziminin arilesteraz substratına karşı aktivitesi), stPON1 (tuz ile uyarılmış PON1 aktivitesi) ve fenotip (stPON1/ARE verisine göre belirlenmiş) bilgileri yayınlanmış olan (Can Demirdogen vd., 2014) 94 kişilik grup için PON1 genotip bilgileri belirlenmeye çalışılmış, ancak bu gruptaki bazı kişilerin kan veya DNA örneğinin kalmamış veya eskimiş olması gibi nedenlerden dolayı 192Q/R ve 55L/M bölgeleri için bu gruptan 91 kişinin, -107T/C bölgesi için ise 89 kişinin genotip bilgisi elde edilebilmiştir.

4.2.1 PON1 Genotipleri ile fenotipleri arasındaki korelasyon

Elde edilmiş olan veriler kullanılarak, genotip-fenotip korelasyonu PEG, PES ve kontrol gruplarında ayrı ayrı incelenmiştir (Tablo 17). Buna göre, PEG, PES ve kontrol gruplarında, 192Q/R polimorfizmi ile daha önceki çalışmamızda PON1 ve ARE aktivite verilerini kullanarak belirlediğimiz Fenotip değerleri arasında güçlü ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon vardır. Ayrıca PES ve kontrol gruplarında 55L/M polimorfizmi ile fenotip arasında anlamlı bir korelasyon olduğu görülmektedir.

Tablo 17. PON1 Genotipleri ile Fenotipleri arasındaki korelasyon

| | PEG | | PES | | Kontrol | |
|---------------------|---------------------|--------------|---------------------|--------------|---------------------|--------------|
| | Pearson correlation | P | Pearson correlation | P | Pearson correlation | P |
| 192Q/R ile Fenotip | 0.745 | 0.000 | 0.717 | 0.000 | 0.589 | 0.000 |
| 55L/M ile Fenotip | -0.197 | 0.297 | -0.425 | 0.019 | -0.490 | 0.005 |
| -107T/C ile Fenotip | 0.069 | 0.717 | 0.212 | 0.270 | -0.032 | 0.867 |

4.2.2 PON1 Genotipleri ile PON1, stPON1 ve ARE enzim aktiviteleri arasındaki korelasyon

Proje önerisinde bahsedilen analize ilave olarak, PON1 192Q/R, 55L/M ve -107T/C genotiplerinin önceki çalışmamızda ölçülmüş olan PON1, stPON1 ve ARE enzim aktiviteleri ile olan korelasyonu da incelenmiştir (Tablo 18).

192Q/R genotipi tüm gruplarda (PEG, PES ve kontrol) PON1 ve stPON1 ile güçlü korelasyona sahiptir (tümü için P=0.000). Ancak ARE ile 192Q/R arasında korelasyon bulunmamıştır.

Benzer şekilde 55L/M polimorfizmi ile PON1 ve stPON1 arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur. Ancak ARE ile 55L/M arasında korelasyon bulunmamıştır. PON1 - 107T/C genotipi ile PON1, stPON1 ve ARE enzim aktiviteleri arasında hiçbir grupta istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyona rastlanmamıştır.

Tablo 18. PON1 Genotipleri ile PON1, stPON1 ve ARE aktiviteleri arasındaki korelasyon

| | | PEG | | PES | | Kontrol | |
|-------------|-------------------|---------------------|--------------|---------------------|--------------|---------------------|--------------|
| | | Pearson correlation | P | Pearson correlation | P | Pearson correlation | P |
| 192Q/R ile | PON1 aktivitesi | 0.836 | 0.000 | 0.938 | 0.000 | 0.767 | 0.000 |
| | stPON1 aktivitesi | 0.828 | 0.000 | 0.931 | 0.000 | 0.755 | 0.000 |
| | ARE aktivitesi | -0.059 | 0.759 | 0.301 | 0.105 | -0.009 | 0.963 |
| 55L/M ile | PON1 aktivitesi | -0.378 | 0.039 | -0.592 | 0.001 | -0.722 | 0.000 |
| | stPON1 aktivitesi | -0.375 | 0.041 | -0.587 | 0.001 | -0.727 | 0.000 |
| | ARE aktivitesi | -0.129 | 0.496 | -0.236 | 0.210 | -0.300 | 0.101 |
| -107T/C ile | PON1 aktivitesi | 0.201 | 0.287 | 0.278 | 0.144 | 0.290 | 0.121 |
| | stPON1 aktivitesi | 0.217 | 0.249 | 0.286 | 0.133 | 0.308 | 0.098 |
| | ARE aktivitesi | -0.004 | 0.984 | 0.147 | 0.448 | 0.317 | 0.088 |

4.3 Lojistik regresyon analizi

Öncelikle bu çalışmada elde edilmiş olan PON1 192Q/R, 55L/M ve -107T/C genotip, yaş ve cinsiyet parametreleri ile lojistik regresyon analizi yapılmıştır. Backward LR modeli ile yapılan bivariate regresyon analizinde her seferinde yalnızca PEG-kontrol, PES-kontrol veya PEG-PES açısından risk analizi yapılmış, sonuçta yalnızca cinsiyet (OR=1.780, P=0.003) PEG ile ilişkili bulunmuştur. Diğer parametreler istatistiksel olarak anlamlı derecede ilişkili bulunmamıştır.

Bu analize ilaveten, önceki çalışmamızda elde edilmiş olan PON1, stPON1, ARE ve fenotip parametrelerinin de PES ve PEG hastalıkları ile ilişkisini incelemek için bu parametreleri ekleyerek lojistik regresyon analizi yapılmıştır. PES-kontrol analizinde 192Q/R genotipi (OR=2.388, P=0.036), PEG-kontrol analizinde yaş (OR=1.134, P=0.002), PEG-PES analizinde 192Q/R (OR=0.544, P=0.047) ilişkili bulunmuştur. Oluşturulan tüm modellerde Hosmer-Lemeshow testi modelin kalibrasyonunun yeterli olduğunu göstermiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu projede, önemli bir antioksidan enzim olan PON1'i kodlayan gendeki tek nükleotit polimorfizmlerinden 3 tanesi (192Q/R, 55L/M ve -107T/C) ile psödoeksfolyasyon sendromu (PES) ve psödoeksfolyatif glokom (PEG) arasındaki ilişki incelenmiştir. Çalışma grubu 150 PES hastası, 150 PEG hastası ve 150 kontrolden oluşmaktadır. Bilindiği gibi PES ve PEG yaşa bağlı olarak artış gösteren hastalıklardır. Özellikle PEG daha ileri yaşlarda ortaya çıkmaktadır. Bu durum bizim çalışma popülasyonumuzda da kendini göstermektedir. Yaş ortalaması PES hastalarında 71.47 ± 8.18 ve kontrollerde 71.86 ± 9.31 birbirine yakınken, PEG hastalarında 75.95 ± 8.80 olarak belirlenmiştir ($P=0.000$). Kısıtlı zaman ve her gruptan 100'ün üstünde bireyin çalışmaya dahil edilmesi gerekliliğinden dolayı, yaşı büyük olan PEG hastaları çalışmadan çıkarılmamıştır. Cinsiyet dağılımı yönünden ise hasta ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Kan örnekleri Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göz Hastalıkları Servisince toplanarak araştırma ekibimize gönderilmiştir. Genotipler, PCR ve sonrasında RFLP tekniği kullanılarak belirlenmiştir. PCR'da kullanılan genomik DNAlar ekibimiz tarafından tam kandan izole edilmiştir.

PON1 192Q/R polimorfizmi yönünden yapılan incelemede, R aleli taşıyan genotipe sahip olmak ile taşımayan genotipe sahip olmak arasında PES veya PEG riski bakımından anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Benzer şekilde PES hastaları ile PEG hastaları arasında da R aleli taşımanın getirdiği istatistiksel olarak anlamlı bir risk yoktur. Bu polimorfizm daha önce PES veya PEG kapsamında incelenmemiştir. Inagaki vd. (2006) tarafından Japonlarda, açık açılı glokom (OAG) hastaları üzerinde yapılan çalışmada PON1 192QQ, QR, RR genotip frekansları sırasıyla hastalarda %14, %40.1, %45.9, kontrollerde ise %12.8, %46.3, %40.9 olarak bulunmuştur ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Öte yandan Zhou vd. (2010) tarafından Çinli primer açık açılı glokom (POAG) hastalarında yapılan çalışmada PON1 192Q/R polimorfizminin POAG ile istatistiksel olarak anlamlı ($P=0.000$) ilişki içinde olduğu bildirilmiştir.

PON1 55 L/M polimorfizmi yönünden yapılan incelemede, M aleli taşıyan genotipe sahip olmak ile, LL genotipine sahip olmak arasında, kontroller için PES veya PEG riski bakımından anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. PES hastaları ile PEG hastaları arasında yapılan karşılaştırmada ise, PES hastaları için, MM genotipine sahip olmanın, LM veya LL genotipine göre, PEG için 0.49 kat ($OR=0.490$, $P=0.048$) riskli, diğer bir ifade ile yaklaşık 2 kat koruyucu olduğunu düşündürülen bir sonuç ortaya çıkmıştır. Her ne kadar PON1 enziminin 55.

pozisyonunda metiyonin taşıyan bireylerin (55M), 55L izoformunu taşıyanlardan daha düşük PON1 seviyesine sahip oldukları bulunsa da (Blatter Garin vd., 1997), Aviram vd. (1998) tarafından yapılan çalışmada 55MM genotipine sahip bireylerin LDL'yi oksidatif değişikliklere karşı koruma kapasitesinin en yüksek seviyede olduğunu, 55LL'nin ise en düşük kapasiteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bununla bağlantılı olarak, minor alel olan M değil, L aleli bazı hastalıklarla ilişkili bulunmuştur. Örneğin, bu projenin yürütücüsünün yer aldığı önceki bir çalışmada (Can Demirdogen vd., 2008) ve yine Türk popülasyonunda yapılan benzer bir başka çalışmada PON1 55L alelinin frekansı inme hastalarında kontrollere göre daha yüksek bulunmuştur (Aydın vd., 2006). Ayrıca, 55LL genotipinin Avusturya inme önleme çalışmasında beyaz cevher lezyonlarının yaygınlığı ve progresyonu ile karotis hastalığının varlığı ve şiddeti ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Schmidt vd., 1998; Schmidt vd., 2000). Ayrıca, PON1 55LL-ML'nin hem bifürkasyonda hem de genel karotis arterdeki plaklarla ve herhangi bir bölgedeki toplam plak sayısı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Fortunato vd., 2003). Bu polimorfizm daha önce PES veya PEG kapsamında incelenmemiştir. Inagaki vd. (2006) tarafından açık açılı glokom (OAG) hastalarında yapılan çalışmada PON1 55L/M polimorfizmi ile OAG arasında bağlantı bulunamamıştır.

Promotor bölge polimorfizmlerinden -107T/C, PON1 ifade seviyesindeki farklılıkların %22,4'ünden sorumludur ve -107T alelini taşıyan bireylerin serum PON1 seviyeleri düşüktür (Brophy vd., 2001b). Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre, C aleli taşıyan genotipe sahip olmanın, taşımayan genotipe göre PES için 0.573 kat riskli (yani 1.74 kat daha koruyucu) ($P=0.022$) olduğu söylenebilir. Öte yandan PES-PEG karşılaştırmasında, PES hastaları arasında C aleli taşıyan genotipe sahip olmanın, TT genotipine göre, PEG riskini 1.690 kat arttırdığı ($P=0.030$) hesaplanmıştır. Bu farklı sonuçlar, aynı bireylerdeki farklı genetik alt yapıların farklı bileşkelerinden (örneğin -107T/C bölgesi ile 55L/M bölgesi arasındaki bağlantıdan (linkage)) ve/veya çevresel (beslenme, sigara gibi) faktörlerin gen ifadesi üzerindeki farklı etkilerinden kaynaklanabilir. Bu polimorfizm daha önce PES, PEG veya diğer glokom tipleri kapsamında incelenmemiştir.

Üçlü kombine genotiplerin hasta ve kontrollerdeki dağılımı incelendiğinde bazı istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşılmıştır. QQMMTT ve QQLLCC haplotipi PES hastalarında kontrollerde olduğundan daha sık görülmüştür. QRLLTC haplotipi PES ve PEG hastalarında, kontrollerden daha az görülmüştür. QQLMTC haplotipi PES hastalarında, kontrollerden daha az görülmüştür. QQLMTC haplotipi aynı zamanda PEG hastalarında, PES hastalarında olduğundan daha sık görülmüştür.



Bu projede elde edilmiş olan PON1 genotipi sonuçları ile daha önce bu çalışma grubunun küçük bir alt grubunda elde edilmiş olan fenotip verileri (Can Demirdogen vd., 2014) arasındaki korelasyon incelenmiş, fenotiplerin tüm gruplarda 192Q/R polimorfizmi ile güçlü bir şekilde korele olduğu, 55L/M polimorfizmi ile ise yalnızca PES ve kontrol gruplarında korelasyon gösterdiği hesaplanmıştır. -107T/C polimorfizmi ile fenotip parametresi arasında korelasyon bulunmamıştır. Bu projede elde edilmiş olan PON1 genotipleri ile daha önce bu çalışma grubunun küçük bir alt grubunda elde edilmiş olan PON1, stPON1 ve ARE enzim aktiviteleri (Can Demirdogen vd., 2014) arasındaki korelasyon incelendiğinde yine 192Q/R ve 55L/M polimorfizmlerinin PON1 ve stPON1 ile korele olduğu görülmüştür. Bu polimorfizmler ARE ile korelasyon içinde değildir. -107T/C polimorfizmi ile PON1, stPON1 ve ARE enzim aktivitesi parametreleri arasında korelasyon bulunmamıştır.

Bu çalışmada elde edilmiş olan PON1 192Q/R, 55L/M ve -107T/C genotip, yaş ve cinsiyet parametreleri ile lojistik regresyon analizi yapıldığında cinsiyet (OR=1.780, P=0.003) PEG ile ilişkili bulunmuştur. Lojistik regresyon analizine, önceki çalışmamızda elde edilmiş olan PON1, stPON1, ARE ve fenotip parametreleri de eklendiğinde PES-kontrol analizinde 192Q/R genotipi (OR=2.388, P=0.036), PEG-kontrol analizinde yaş (OR=1.134, P=0.002), PEG-PES analizinde 192Q/R (OR=0.544, P=0.047) ilişkili bulunmuştur. Ancak tüm popülasyona ait aktivite verilerinin bulunmadığına dikkat etmek gerekir.

Sonuç olarak, bu çalışmada incelenmiş olan parametrelerin PES/PEG tanısında kullanılabilme potansiyellerinin başka toplumlarda da incelenerek doğrulanması gerekmektedir. Bu genetik polimorfizmler daha önce PES ve/veya PEG'de çalışılmamış olup, elde edilen bu sonuçlar özgündür ve uluslararası bir dergide makale olarak yayınlanması planlanmaktadır.

6. REFERANSLAR

- Alpay, H., Ersoy, G. 1989. "Psödoeksfoliasyon sendromu (İstatistiksel bir çalışma)", Türk Oftalmoloji Gazetesi, 19, 63-66.
- Anastasopoulos, E., Coleman, A. L., Wilson, M. R., Sinsheimer, J. S., Yu, F., Katafigiotis, S., Founti, P., Salonikiou, A., Pappas, T., Koskosas, A., Katopodi, T., Lambropoulos, A., Topouzis, F. 2014. "Association of LOXL1 polymorphisms with pseudoexfoliation, glaucoma, intraocular pressure, and systemic diseases in a Greek population", *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 55(7), 4238-43.
- Aragon-Martin, J. A., Ritch, R., Liebmann, J., O'Brien, C., Blaaw, K., Mercieca, F., Spiteri, A., Cobb, C. J., Damji, K. F., Tarkkanen, A., Rezaie, T., Child, A. H., Sarfarazi, M. 2008. "Evaluation of LOXL1 gene polymorphisms in exfoliation syndrome and exfoliation glaucoma", *Molecular Vision*, 14, 533-541.
- Aritürk, N., Oge, I., Yücel, O. E. 2005. "Exfoliation syndrome in middle east and black sea area of Turkey", In: 5th International Glaucoma Symposium- IGS Final Program and Book of Abstracts, A 72.
- Augusteyn, R. C., Duncan, G. 1981. "Mechanisms of Cataract Formation in the Human Lens", London: Academic Press, 71-116.
- Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R. et al. 1998. "Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase alloenzymes Q and R.", *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 10:1617-24.
- Aviram, M., Rosenbalt, M. 2005. "Paraoxonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences.", *Curr Opin Lipidol*, 16(4): 393-9.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Gaitini, D., Nitecki, S., Hoffman, A., Dornfeld, L., Volkova, N., Presser, D., Attias, J., Liker, H., Hayek, T. 2004. "Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis (CAS) reduces common carotid intima-media thickness (IMT), blood pressure and LDL oxidation.", *Clin Nutr*, 23: 423-433.
- Aydin, M., Gencer, M., Cetinkaya, Y. 2006. "PON1 55/192 polymorphism, oxidative stress, type, prognosis and severity of stroke", *IUBMB Life*: 58(3):165-72.
- Aynacioglu, A. S., Cascorbi, I., Mrozikiewicz, P. M., Nacak, M., Tapanyigit, E. E., Roots, I. 1999. "Paraoxonase 1 mutations in a Turkish population.", *Toxicol Appl Pharmacol*, 157(3): 174-7.
- Beatty, S., Koh, H., Henson, D., Boulton, M. 2000. "The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration.", *Surv Ophthalmol*, 45:115-34.
- Blatter Garin, M. C., James, R. W., Dussoix, P. et al. 1997. "Paraoxonase polymorphism Met-Leu 54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes.", *J Clin Invest*, 99: 62-6.
- Blatter, M. C., James, R. W., Messmer, S., Barja, F., Pometta, D. 1993. "Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-85: identity of K-85 with paraoxonase.", *Eur J Biochem*, 211: 871-9.
- Brophy, V. M., Hastings, M. D., Clendenning, J. B., Richter, R. J., Jarvik, G. P., Furlong, C. E. 2001a. "Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter.", *Pharmacogenetics*, 11: 77-84.
- Brophy, V. H., Jampsa, R. L., Clendenning, J. B., McKinstry, L. A., Jarvik, G. P., Furlong, C. E. 2001b. "Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase gene (PON1) expression.", *Am J Hum Genet*, 68: 1428-36.
- Brophy, V. H., Jarvik, G. P., Furlong, C. E. 2002. "PON1 polymorphisms.", In: Costa LG, Furlong CE Eds. *Paraoxonase (PON1) in Health and Disease: Basic and Clinical Aspects*, Norwell, MA: Kluwer Acad., p.53-77.
- Burdon, K. P., Sharma, S., Hewitt, A. W., McMellon, A. E., Wang, J. J., Mackey, D. A., Mitchell, P., Craig, J. E. 2008. "Genetic analysis of the clusterin gene in pseudoexfoliation syndrome", *Molecular Vision*, 14, 1727-36.
- Campo, S., Sardo, M. A., Trimarchi, G., Bonaiuto, M., Fontana, L., Castaldo, M., Bonaiuto, A., Saitta, C., Bitto, A., Manduca, B., Riggio, S., Saitta, A. 2004. "Association between serum paraoxonase (PON1) gene promoter T(-

107)C polymorphism, PON1 activity and HDL levels in healthy Sicilian octogenarians.", *Experimental Gerontology*, 39: 1089–1094.

Can Demirdöğen, B., Ceylan, O.M., Işıkoğlu, S., Mumcuoğlu, T., Erel, Ö. 2014. "Evaluation of oxidative stress and paraoxonase phenotypes in pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma". *Clin. Lab.* 60(1), 79-86.

Can Demirdöğen, B., Demirkaya, Ş., Türkanoglu, A., Bek, S., Arınç, E., Adalı, O. 2009. "Analysis of paraoxonase 1 (PON1) genetic polymorphisms and activities as risk factors for ischemic stroke in Turkish population.", *Cell Biochemistry and Function*, 27(8): 558-567.

Can Demirdöğen, B., Türkanoglu, A., Bek, S., Sanisoğlu, Y., Demirkaya, Ş., Vural, O., Arınç, E., Adalı, O. 2008. "Paraoxonase/arylesterase ratio, PON1 192Q/R polymorphism and PON1 status are associated with increased risk of ischemic stroke.", *Clinical Biochemistry*, 41 (1-2): 1-9.

Challa, P., Schmidt, S., Liu, Y., Qin, X., Vann, R. R., Gonzalez, P., Allingham, R. R., Hauser, M. A. 2008. "Analysis of LOXL1 polymorphisms in a United States population with pseudoexfoliation glaucoma", *Molecular Vision*, 14, 146-149.

Chen, L., Jia, L., Wang, N., Tang, G., Zhang, C., Fan, S., Liu, W., Meng, H., Zeng, W., Liu, N., Wang, H., Jia, H., 2009. "Evaluation of LOXL1 polymorphisms in exfoliation syndrome in a Chinese population", *Molecular Vision*, 15, 2349-57.

Chowdhury, U. R., Madden, B. J., Charlesworth, M. C., Fautsch, M. P. 2010. "Proteome Analysis of Human Aqueous Humor", *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(10), 4921-31.

Citirik, M., Acaroglu, G., Batman, C., Yildiran, L., Zilelioglu, O. 2007. "A possible link between the pseudoexfoliation syndrome and coronary artery disease.", *Eye*, 21:11-5.

Clendenning, J. B., Humbert, R., Green, E. D., Wood, C., Traver, D., Furlong, C. E. 1996. "Structural organization of the human PON1 gene.", *Genomics*, 35: 586-589.

Çumurcu, T., Kılıç, R., Yoloğlu, S. 2010. "The frequency of pseudoexfoliation syndrome in the middle Black Sea region of Turkey", *European Journal of Ophthalmology*, 20, 1007-1011.

Davies, H. G., Richter, R. J., Keifer, M., Broomfield, C. A., Sowalla, J., Furlong, C. E. 1996. "The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin.", *Nature Genet*, 14: 334–336.

de Champlain, J., Wu, R., Girouard, H. et al. 2004. "Oxidative stress in hypertension.", *Clin Exp Hypertens*, 26(7-8):593-601.

Deakin, S. P., James, R. W. 2004. "Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1.", *Clin Sci*, 107: 435-447.

Debord, J., Dantoine, T., Bollinger, J. C., Abraham, M. H., Verneuil, B., Merle, L. 1998. "Inhibition of arylesterase by aliphatic alcohols.", *Chem Biol Interact*, 113: 105–15.

Draganov, D. I., La Du, B. N. 2004. "Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review.", *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 369(1): 78-88.

Dursun, F., Ozec, A. V., Aydin, H., Topalkara, A., Dursun, A., Toker, M. I., Erdogan, H., Arici, M. K. 2015. "Total oxidative stress, paraoxonase and arylesterase levels at patients with pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliative glaucoma.", *Int J Ophthalmol*, 8(5):985-990.

Eckerson, H. W., Romson, J., Wyte, C., La Du, B. N. 1983b. "The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts.", *Am J Hum Genet*, 35:214-27.

Eckerson, H. W., White, C. M., La Du, B. N. 1983a. "The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism.", *Am J Hum Genet*, 35: 1126-38.

Forsius, H. 1988. "Exfoliation syndrome in various ethnic populations", *Acta Ophthalmologica*, 184, 71–85.

Fortunato, G., Rubba, P., Panico, S. 2003. "A paraoxonase gene polymorphism, PON 1 (55) as an independent risk factor for increased carotid intima-media thickness in middle-aged women", *Atherosclerosis*, 167(1): 141–148.

- Furlong, C. E., Richter, R. J., Seidel, S. L., Motulsky, A. G. 1988. "Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/arylesterase in hydrolysis of the insecticide metabolites chlorpyrifos oxon and paraoxon.", *Am J Hum Genet*, 43: 230–238.
- Gan, K. N., Smolen, A., Eckerson, H., La Du, B.N. 1991. "Purification of human serum paraoxonase/arylesterase: evidence for one esterase catalyzing both activities", *Drug Metab Dispos*, 19: 100-6.
- Gartaganis, S. P., Georgakopoulos, C. D., Mela, E. K., Exarchou, A., Ziouti, N., Assouti, M., Vynios, D. H. 2002. "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in exfoliation syndrome", *Ophthalmic Research*, 34, 165-171.
- Gartaganis, S. P., Patsoukis, N. E., Nikolopoulos, D. K., Georgiou, C. D. 2007. "Evidence for oxidative stress in lens epithelial cells in pseudoexfoliation syndrome", *Eye (London, England)*, 21, 1406-1411.
- Giangiaco, A., Coleman, A. L. 2009. "The epidemiology of glaucoma", *Essentials in Ophthalmology*, p13-21.
- Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R. B., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J. L., Tawfik, D. S. 2004. "Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes.", *Nat Struct Mol Biol*, 11(5): 412-9.
- Hassett, C., Richter, R. J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J. W., Omiecinski, C. J., Furlong, C. E. 1991. "Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence." *Biochemistry*, 30: 10141-9.
- Hayashi, H., Gotoh, N., Ueda, Y., Nakanishi, H., Yoshimura, N. 2008. "Lysyl oxidase-like 1 polymorphisms and exfoliation syndrome in the Japanese population", *American Journal of Ophthalmology*, 145, 582-585.
- Hoeschen, R. J. 1997. "Oxidative stress and cardiovascular disease.", *Can J Cardiol*, 13(11):1021-5.
- Humbert, R., Adler, D. A., Distech, C. M., Hassett, C., Omiecinski, C. J., Furlong, C. E. 1993. "The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism." *Nat Genet*, 3: 73-6.
- Inagaki Y, Mashima Y, Funayama T, Ohtake Y, Fuse N, Yasuda N, Fukuchi T, Murakami A, Hotta Y. 2006. "Paraoxonase 1 gene polymorphisms influence clinical features of open-angle glaucoma". *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 244(8):984-90.
- İrkeç, M. 1979. "Senil psödoeksfoliasyonunun epidemiyolojik özellikleri üzerine bir inceleme". *T Oft Gaz*, 263.
- İskeleli, G. 1978. "Psödoeksfoliasyon sıklığı", XII. Ulusal Oftalmoloji Kongresi, Antalya, 171.
- Jacobi, P. C., Dietlein, T. S., Kriegelstein, G. K. 1999. "Comparative study of trabecular aspiration vs trabeculectomy in glaucoma triple procedure to treat pseudoexfoliation glaucoma", *Archives of Ophthalmology*, 117:10, 1311-8.
- James, R. W., Leviev, I., Righetti, A. 2000b. "Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease.", *Circulation*, 101: 2252–57.
- James, R. W., Leviev, I., Ruiz, J., Passa, P., Froguel, P., Garin, M. C. 2000a. "Promoter polymorphism T(-107)C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients.", *Diabetes*, 49(8): 1390-3.
- Jarvik, G. P., Rozek, L. S., Brophy, V. H., Hatsukami, T. S., Richter, R. J., Schellenberg, G. D., Furlong, C. E. 2000. "Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1(192) or PON1(55) genotype.", *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 2441–2447.
- Kaneto, H., Katakami, N., Kawamori, D. et al. 2007. "Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes.", *Antioxid Redox Signal*, 9(3):355-66.
- Kasım, B., İrkeç, M., Alikashiöğlü, M., Orhan, M., Mocan, M. C., Aktaş, D. 2013. "Association of LOXL1 gene polymorphisms with exfoliation syndrome/glaucoma and primary open angle glaucoma in a Turkish population", *Molecular Vision*, 19, 114-20.
- King, A., Azuara-Blanco, A., Tuulonen, A. 2013. "Glaucoma", *British Medical Journal*, 346, f3518.
- Koliakos, G. G., Befani, C. D., Mikropoulos, D., Ziakas, N. G., Konstas, A. G. 2008. "Prooxidant-antioxidant balance, peroxide and catalase activity in the aqueous humour and serum of patients with exfoliation syndrome or exfoliative glaucoma.", *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 246(10):1477-83.

- Koliakos, G. G., Konstas, A. G. P., Schlotzer-Schrehardt, U., Bufidis, T., Georgiadis, N., Ringvold, A. 2002. "Ascorbic acid concentration is reduced in the aqueous humor of patients with exfoliation syndrome" *American Journal of Ophthalmology*, 134, 879–883.
- Kuchle, M., Amberg, A., Martus, P., Nguyen, N., Naumann, G. 1997. "Pseudoexfoliation syndrome and secondary cataract", *British Journal of Ophthalmology*, Oct; 81(10), 862–866.
- La Du, B. N. 2003. "Future studies of low-activity PON1 phenotype subjects may reveal how PON1 protects against cardiovascular disease.", *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 1317.
- Lahiri, D. K., Schnabel, B. 1993. "DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality.", *Biochem Genet*, 31(7-8): 321-8.
- Li, W. F., Costa, L. G., Richter, R. J. et al. 2000. "Catalytic efficiency determines the in vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphates.", *Pharmacogenetics*, 10: 767-79.
- Mackness, B., Durrington, P. N., Mackness, M. I. 1998a. "Human serum paraoxonase.", *Gen Pharmacol*, 31: 329–336.
- Mackness, B., Mackness, M. I., Arrol, S., Turkie, W., Durrington, P. N. 1998b, "Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification.", *FEBS Lett*, 423: 57–60.
- Mackness, B., Mackness, M. I., Arrol, S., Turkie, W., Julier, K., Abuasha, B., Miller, J. E., Boulton, A. J., Durrington, P. N. 1998c. "Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus.", *Atherosclerosis*, 139: 341–49.
- Mackness, B., Mackness, M. I., Arrol, S., Turkie, W., Durrington, P. N. 1997a. "Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon.", *Br J Pharmacol*, 112: 265–268.
- Mackness, M. I., Arrol, S., Mackness, B., Durrington, P. N. 1997b. "The alloenzymes of paraoxonase determine the effectiveness of high-density lipoprotein in protecting low density lipoprotein against lipid-peroxidation.", *Lancet*, 349:851-2.
- Mackness, M. I., Arrol, S., Abbott, C. A., Durrington, P. N. 1993. "Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase.", *Atherosclerosis*, 104: 129-35.
- McElveen, J., Mackness, M. I., Colley, C. M., Peard, T., Warner, S., Walker, C. H. 1986. "Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction.", *Clin Chem*, 32:671-3.
- Mitchell, P., Wang, J. J., Hourihan, F. 1999. "The relationship between glaucoma and pseudoexfoliation: the Blue Mountains Eye Study", *Archives of Ophthalmology*, 117, 1319-24.
- Mitchell, P., Wang, J. J., Smith, W. 1997. "Association of pseudoexfoliative syndrome with increased vascular risk.", *Am J Ophthalmol*, 124:684-7.
- Naumann, G. O., Schlötzer-Schrehardt, U., Kuchle, M. 1998. "Pseudoexfoliation syndrome for the comprehensive ophthalmologist. Intraocular and systemic manifestations", *Ophthalmology*, 105(6), 951-68.
- Ozaki, M., Lee, K. Y., Vithana, E. N., Yong, V. H., Thalamuthu, A., Mizoguchi, T., Venkatraman, A., Aung, T. 2008. "Association of LOXL1 gene polymorphisms with pseudoexfoliation in the Japanese", *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(9), 3976-80.
- Örgen, L. 1949. "Kapsüler eksfoliasyon", *Oto Nöro Oftalmoloji*, 4,1.
- Pasutto, F., Krumbiegel, M., Mardin, C. Y., Paoli, D., Lämmer, R., Weber, B. H., Kruse, F. E., Schlötzer-Schrehardt, U., Reis, A. 2008. "Association of LOXL1 Common Sequence Variants in German and Italian Patients with Pseudoexfoliation Syndrome and Pseudoexfoliation Glaucoma", *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49,1459-63.
- Playfer, J. R., Eze, L. C., Bullen, M. F., Evans, D. A. 1976. "Genetic polymorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity.", *J Med Genet*, 13: 337–342.

- Ramprasad, V. L., George, R., Soumitra, N., Sharmila, F., Vijaya, L., Kumaramanickavel, G. 2008. "Association of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in the LOXL1 gene with pseudoexfoliation syndrome in India", *Molecular Vision*, 14, 318-322.
- Resnikoff, S., Pascolini, D., Etya'ale, D., Kocur, I., Pararajasegaram, R., Pokharel, G. P., Mariotti, S. P. 2004. "Global data on visual impairment in the year 2002", *Bulletin of the World Health Organization*, 82 (11), p. 844–851.
- Richardson, T. M., Epstein, D. L. 1981. "Exfoliation glaucoma: a quantitative perfusion and ultrastructural study", *Ophthalmology*, 88(9), 968–980.
- Ringvold, A. 1999. "Epidemiology of the pseudo-exfoliation syndrome", *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 77, 371–375.
- Ritch, R., Schlotzer-Schrehardt, U. 2001. "Exfoliation syndrome", *Survey of Ophthalmology*, 45(4), 265-315.
- Samarai, V., Samarei, R., Haghighi, N., Jalili, E. 2012. "Sensory-neural hearing loss in pseudoexfoliation syndrome", *International Journal of Ophthalmology*, 5(3), 393-396.
- Schmidt, H., Schmidt, R., Niederkorn, K. 1998. "Paraoxonase PON1 polymorphism Leu–Met54 is associated with carotid atherosclerosis: results of the Austrian Stroke Prevention Study", *Stroke*, 29:2043–8.
- Schmidt, R., Schmidt, H., Fazekas, F. 2000. "MRI cerebral white matter lesions and paraoxonase PON1 polymorphisms: three-year follow-up of the Austrian Stroke Prevention Study", *Arterioscler Thromb Vascular Biology*, 20:1811–6.
- Schlotzer-Schrehardt, U., Kuchle, M., Naumann, G.O. 1991. "Electron-microscopic identification of pseudoexfoliation material in extrabulbar tissue", *Archives of Ophthalmology*, 109(4), 565–570.
- Schlötzer-Schrehardt, U. 2012. "Pseudoexfoliation syndrome: the puzzle continues", *Journal of Ophthalmic and Vision Research*, 7, 187-189.
- Schlötzer-Schrehardt, U., Koca, M., Naumann, G. O. H., Volkholz, H. 1992. "Pseudoexfoliation syndrome: ocular manifestation of a systemic disorder?", *Archives of Ophthalmology*, 110, 1752–6.
- Schlötzer-Schrehardt, U., Kuchle, M., Jünemann, A., Naumann, G. O. 2002. "Relevance of the pseudoexfoliation syndrome for the glaucomas", *Ophthalmologie*, 99, 683-90.
- Schlötzer-Schrehardt, U., Naumann, G. O. 2006. "Ocular and systemic pseudoexfoliation syndrome", *American Journal of Ophthalmology*, 141, 921-937.
- Sein, J., Galor, A., Sheth, A., Kruh, J., Pasquale, L. R., Karp, C. L. 2013. "Exfoliation syndrome: new genetic and pathophysiologic insights", *Current Opinion in Ophthalmology*, 24(2), 167-74.
- Seneş, M., Kazan, N., Coşkun, O., Zengi, O., Inan, L., Yücel, D. 2007. "Oxidative and nitrosative stress in acute ischaemic stroke.", *Ann Clin Biochem*, 44(Pt 1):43-7.
- Shih, D. M., Gu, L., Hama, S., Xia, Y-R., Navab, M., Fogelman, A. M., Lusis, A. J. 1996. "Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model.", *J Clin Invest*, 97: 1630–1639.
- Sorenson, R. C., Bisgaier, C. L., Aviram, M., Hsu, C, Billecke, S., La Du, B. N. 1999. "Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity.", *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19: 2214-25.
- Spector, A. 1995. "Oxidative stress-induced cataract: mechanisms of action.", *FASEB J*, 9:1173-82.
- Streeten, B. W., Gibson, S. A., Dark, A. J. 1986. "Pseudoexfoliative material contains an elastic microfibrillar-associated glycoprotein", *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 84, 304–320.
- Streeten, B. W., Li, Z. Y., Wallace, R. N., Eagle, R. C., Keshgegian, A. A. 1992. "Pseudoexfoliative fibrilopathy in visceral organs of a patient with pseudoexfoliation syndrome", *Arch Ophthalmology*, 110, 1757–1762.
- Suehiro, T., Nakamura, T., Inoue, M., Shiinoki, T., Ikeda, Y., Kumon, Y., Shindo, M., Tanaka, H., Hashimoto, K. 2000. "A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression.", *Atherosclerosis*, 150: 295-298.

The Eye Diseases Prevalence Research Group, 2004. "Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States". *Archives of Ophthalmology*, 122, 477-485.

Thorleifsson, G., Magnusson, K. P., Sulem, P., Walters, G. B., Gudbjartsson, D. F., Stefansson, H., Jonsson, T., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., Stefansdottir, G., Masson, G., Hardarson, G. A., Petursson, H., Arnarsson, A., Motallebipour, M., Wallerman, O., Wadelius, C., Gulcher, J. R., Thorsteinsdottir, U., Kong, A., Jonasson, F., Stefansson, K. 2007. "Common sequence variants in the LOXL1 gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma", *Science*, 317, 1397-1400.

Tomás, M., Sentí, M., Elosua, R., et al. 2001. "Interaction between the Gln-Arg 192 variants of the paraoxonase gene and oleic acid intake as a determinant of high-density lipoprotein cholesterol and paraoxonase activity," *European Journal of Pharmacology*, vol. 432, no. 2-3, pp. 121–128.

Tougou, K., Nakamura, A., Watanabe, S., Okuyama, Y., Morino, A. 1998. "Paraoxonase has a major role in the hydrolysis of prulifloxacin (NM441), a prodrug of a new antibacterial agent.", *Drug Metab Dispos*, 26(4): 355-9.

Williams, S. E., Whigham, B. T., Liu, Y., Carmichael, T. R., Qin, X., Schmidt, S., Ramsay, M., Hauser, M. A., Allingham, R.R., 2010. "Major LOXL1 risk allele is reversed in exfoliation glaucoma in a black South African population", *Molecular Vision*, 16, 705-12.

Yalaz, M., Othman, I., Nas, K., Eroglu, A., Homurlu, D., Çıkıntaş, Z., Ashouri, A. 1992. "The frequency of pseudoexfoliation syndrome in the eastern Mediterranean area of Turkey", *Acta Ophthalmology (Copenhagen)*, 70, 209-213.

Yalvaç, I., Önal, M. 2001. *Temel Göz Hastalıkları*, 259-285. *Glokom* (1. Baskı). Editörler: Aydın, P., Akova, Y. A. Ankara: Güneş Kitabevi.

Yang, X., Zabriskie, N. A., Hau, V. S., Chen, H., Tong, Z., Gibbs, D., Farhi, P., Katz, B. J., Luo, L., Pearson, E., Goldsmith, J., Ma, X., Kaminoh, Y., Chen, Y., Yu, B., Zeng, J., Zhang, K., Yang, Z. 2008. "Genetic association of LOXL1 gene variants and exfoliation glaucoma in a Utah cohort", *Cell Cycle*, 7(4), 521-4.

Yılmaz, A., Adiguzel, U., Tamer, L., Yildirim, O., Oz, O., Vatanserver, H., Ercan, B., Değirmenci, U. S., Atik, U. 2005. "Serum oxidant/antioxidant balance in exfoliation syndrome", *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 33, 63–66.

Zech, R., Zurcher, K. 1974 "Organophosphate splitting serum enzymes in different mammals.", *Comp Biochem Physiol*, 48: 427–433.

Zhou, L., Zhao, S. Z., Koh, S. K., Chen, L., Vaz, C., Tanavde, V., Li, X. R., Beuerman, R. W. 2012. "In-depth analysis of the human tear proteome", *Journal of Proteomics*, 75(13), 3877-85.

Zhou G, Liu B. 2010. "Single nucleotide polymorphisms of metabolic syndrome-related genes in primary open angle glaucoma". *Int J Ophthalmol* 3(1):36-42.



TÜBİTAK PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

| |
|---|
| Proje No: 315S190 |
| Proje Başlığı: Paraoksonaz 1 (PON1) Genetik Polimorfizmlerinin Psödoeksfoliasyon Sendromu ve Psödoeksfoliasyon Glokomu'ndaki Rolünün Araştırılması |
| Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Doç. Dr. Birsen Can Demirdöğen, Doç. Dr. Tarkan Mumcuoğlu, Yard. Doç. Dr. Gökhan Özge |
| Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Söğütözü Caddesi No:43, Söğütözü, Ankara, 06560 Türkiye |
| Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK, Tunus Caddesi No:80 06100 Kavaklıdere Ankara |
| Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 15.07.2016 – 15.07.2017 |
| Öz (en çok 70 kelime) Bu projede PON1 genindeki 3 SNP'nin psödoeksfoliasyon sendromu (PES) ve psödoeksfoliatif glokom (PEG) ile ilişkisi incelenmiştir. Sonuçta, PES hastaları için, 55MM genotipinin, 55LM/LL genotipine göre, PEG için 0.49 kat riskli (2-kat koruyucu) olduğu; -107TC/CC genotipinin, -107TT genotipine göre PES için 0.573 kat riskli (1.74-kat koruyucu) olduğu; PES hastaları arasında TC/CC genotipine sahip olmanın, TT genotipine göre, PEG riskini 1.69 kat arttırdığı hesaplanmıştır. Bu polimorfizmler PES/PEG kapsamında ilk kez incelenmiştir. |
| Anahtar Kelimeler: glokom, polimorfizm, PON1, psödoeksfoliasyon, SNP |
| Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır. |
| Projeden Yapılan Yayınlar: Göksoy E, Demirkaya S, Oflaz S, Özge G, Mumcuoğlu T, Can Demirdöğen B. Analysis of the relationship between PON1 (paraoxonase1) 192Q/R (rs662) polymorphism with pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliative glaucoma. Erciyes Tıp Genetik Günleri. 11-13 Mayıs 2017. Kayseri. Erciyes Medical Journal, Erciyes Medical Genetics Days 2017 Special Issue, S.69 Yakar G, Koçan C, Öztepe T, Özge G, Mumcuoğlu T, Can Demirdöğen B. A study on the association between PON1 (paraoxonase 1) 55L/M (rs854560) polymorphism and pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliative glaucoma. Erciyes Tıp Genetik Günleri. 11-13 Mayıs 2017. Kayseri. Erciyes Medical Journal, Erciyes Medical Genetics Days 2017 Special Issue, S.69 Can Demirdöğen B, Yakar G, Göksoy E, Demirkaya S, Koçan C, Özge G, Mumcuoğlu T. Relationship Between Paraoxonase 1 (PON1) Promoter (-107T/C) and Coding Region Polymorphisms (192Q/R and 55L/M) and Pseudoexfoliation Syndrome. 10-14 Eylül 2017 tarihlerinde İsrail'de düzenlenecek 42. FEBS Kongresi'nde poster sunumu için kabul edildi. Kongre bittikten sonra FEBS Journal'da özet yayınlanacaktır. |