

Türk Popülasyonunda Mitokondriyal DNA Delesyonlarında Yaşlanma ve Sigara Kullanımının Etkisi

The Effects of Aging and Smoking on the Deletions of Mitochondrial DNA in Turkish Population

Zeliha KAYAALTI,^a
Dr.Tülin SÖYLEMEZOĞLU^a

^aAdli Tıp Enstitüsü,
Ankara Üniversitesi, Ankara

Geliş Tarihi/Received: 28.05.2009
Kabul Tarihi/Accepted: 30.09.2009

*Bu çalışma, Eurotox Kongresi 2004,
Finlandiya'da poster olarak sunulmuştur.*

Yazışma Adresi/Correspondence:
Zeliha KAYAALTI
Ankara Üniversitesi,
Adli Tıp Enstitüsü, Ankara,
TÜRKİYE/TURKEY
kayaalti@medicine.ankara.edu.tr

ÖZET Amaç: Çalışmada, Türk popülasyonunda, sigara kullanan ve kullanmayan gönüllülerin saç foliküllerindeki 4977 bp ve 7436 bp mtDNA delesyonlarında yaşlanmanın etkisi araştırıldı. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışma için 100 sağlıklı gönüllüden 3-7 adet saç folikül örneği toplandı ve bireyler yaşlarına, sigara kullanım alışkanlıklarına ve sigara tüketim miktarlarına göre gruplara ayrıldı. Toplam DNA izolasyonu, saç foliküllerinden "Qiagen DNA Mini Kit" i kullanılarak yapıldı. 4977 bp ve 7436 bp mtDNA delesyonlarını belirlemek için, bölgeler polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile amplifiye edildi, çoğaltılan ürünler %2'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılarak etidium bromürle boyandı ve ultraviyole ışık altında görünür hale getirilerek fotoğraflandı. **Bulgular:** Sonuçlarımız 4977 bp ve 7436 bp mtDNA delesyon frekanslarının yaşlanma ile arttığını göstermiştir (sırasıyla, p=0.003 ve p=0.005). 4977 bp mtDNA delesyonu rölatif risk değerinin 65 üzeri yaş grubunda, 35 altı yaş grubuna göre 5.11 kat daha fazla olduğu (p= 0.002) belirlenirken, 7436 bp mtDNA delesyonuna 35 yaş altında ve 35-65 yaş grupları arasında hiç rastlanmamıştır. 4977 bp mtDNA delesyonu ile sigara kullanımı ve sigara tüketim miktarı arasında anlamlı ilişki bulunmuş (p<0.01) ancak aynı ilişki 7436 bp mtDNA delesyonunda belirlenmemiştir. Ancak 7436 bp delesyon belirlenen üç birey de ağır sigara içiciler ve 65 yaş üzeri grupta yer almaktadır. **Sonuç:** 4977 bp ve 7436 bp mtDNA delesyon frekansları ile yaşlanma arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon tespit edilmiş, ayrıca 4977 bp mtDNA delesyonunun sigara kullanımı ve sigara tüketim düzeyi ile artış gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: DNA, mitokondriyal; gen delesyonu; sigara içme; yaşlanma; kıl folikülü

ABSTRACT Objective: We studied the effect of aging on 4977 bp and 7436 bp mtDNA deletions in among the hair follicles of smoker and non-smoker volunteers in Turkish population. **Material and Methods:** Three to seven hair follicles were collected from 100 healthy volunteers for the study and subjects were grouped according to age, smoking habits and the amount of cigarettes consumed. "Qiagen DNA Mini Kit" was used for the isolation of total DNA from hair follicles. The 4977 bp and 7436 bp gene regions were amplified with polymerase chain reaction (PCR) for the determination of mtDNA deletions. Amplified products were photographed under ultraviolet light after 2% agarose gel electrophoresis and staining with ethidium bromide. **Results:** The frequencies of 4977 bp and 7436 bp mtDNA deletions increased with aging (p=0.003 and p=0.005, respectively). The relative risk of 4977 bp mtDNA deletion increased 5.11 fold among age group above 65 compared to the group below 35 (p=0.002). The 7436 bp mtDNA deletion was not observed among subjects below 65 years of age. There was a significant relation between the 4977 bp mtDNA deletions and smoking and the amount of cigarettes consumed (p<0.01). The same relation could not be demonstrated for 7436 bp mtDNA deletions, however, three subjects who had 7436 bp deletions were heavy smokers and older than 65 years of age. **Conclusion:** There was a statistically significant positive correlation between the frequencies of 4977 bp ve 7436 bp mtDNA deletions and aging. The 4977 bp mtDNA deletions increased with smoking and the amount of cigarettes consumed.

Key Words: DNA, mitochondrial; gene deletion; smoking; aging; hair follicle

Hayvan hücrelerinde mitokondriler, oksidatif fosforilasyonla ATP üretiminden sorumlu, hücre içerisinde ekstra kromozomal DNA'ya sahip tek organeldir.^{1,2} İnsan mitokondriyal DNA'sı (mtDNA), 16569 bç uzunluğunda, çift zincirli, elektron transport sisteminde görevli 13 protein ile 22tRNA ve 2rRNA kodlayan, dairesel bir yapıdır.³ İnsan vücuduna alınan oksijenin %90'ı mitokondriler tarafından tüketilmektedir ve tüketilen bu oksijenin %1-5'i oksidatif fosforilasyon sırasında süperoksid anyonuna, hidrojen peroksida, hidroksil radikaline ve diğer reaktif oksijen türlerine (ROT) dönüşmektedir.⁴ Oluşan bu radikaller hücre içerisindeki makromoleküllere atak yaparak, DNA kırıklarına, protein yapısındaki bozukluklara ve lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır.⁵ Mitokondriyal DNA'lar histon proteinlerince korunmamakta, ROT'un olduğu iç membrana yakınlığından, ROT'ları tarafından oluşturulan oksidatif hasara daha fazla maruz kalmakta ve mtDNA'larda onarım sistemi nükleer DNA'ya göre yetersiz olmaktadır.⁶ Bu nedenle mtDNA'larda mutasyon oranı nükleer DNA'ya (nDNA) göre 10-17 kat daha fazladır. MtDNA'da yanlış bazı kesip çıkarma tamir mekanizması bulunurken (base excision repair: BER), nükleer DNA'da bulunan nükleotid kesip çıkarma tamir mekanizması (nucleotide excision repair) mtDNA'da bulunmamaktadır.⁷⁻⁹

Yapılan çalışmalarda, mtDNA'da oluşan mutasyon ve delesyonların, yaşlanma ve yaşla birlikte ortaya çıkan dejeneratif hastalıklarla ilişkisi olduğu gösterilmiştir.^{10,11} Özellikle büyük delesyon olarak adlandırılan 4977 bç mtDNA delesyonunun, yüksek oksijen tüketiminin olduğu iskelet kası, beyin ve kalp gibi postmitotik dokularda yaşa bağlı olarak biriktiği,¹² bu delesyonla ATPase 8 ve 6, COXI-II, ND3, ND4, ND4L ve ND5 genleri ile mitokondride protein sentezinde görevli 5 tRNA'nın kodlandığı mitokondriyal DNA bölgelerinin çıkarıldığı ve böylelikle mitokondrideki oksidatif fosforilasyon metabolizmasının zarar gördüğü tespit edilmiştir.¹³ İlerleyen Eksternal Oftalmopleji (CPEO) ve Kearns-Sayre Sendromu (KSS) gibi mitokondriyal miyopatilerde, önemli derecede 4977 bç mtDNA delesyonunun biriktiği saptanmıştır.¹⁴

Yaşlanma ile birlikte artan ROT'un oluşturduğu oksidatif stresin yanı sıra,¹⁵ sigara kullanımının,¹⁶ lipid peroksidasyonunun,¹⁷ radyasyonun¹⁸ ve oksidanların da,¹⁹ mtDNA'daki mutasyon ve delesyonları artırdığı birçok dokuda gösterilmiştir. Saç foliküllerindeki DNA hasarının, uzun süreli maruziyet sonucu sigaradan kaynaklanan genotoksitenin izlenmesi için iyi bir biyogösterge olabileceği ileri sürülmektedir.²⁰

Saç folikülerinde görülen 4977 bç ve 7436 bç mtDNA delesyonlarının, sadece yaşlanma ile değil, aynı zamanda sigara kullanımında da genomik hasarın belirteci olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu delesyonların yüksek oranlarda olması, sigara kullanımına bağlı kanserlerin de göstergesi olarak düşünülmektedir.²¹⁻²³ Sigara dumanı, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve nitrozaminler gibi birçok mutajenlerle ve serbest radikaller de dahil olmak üzere diğer bileşiklerle kolaylıkla reaksiyona girebilen 3800'den fazla bileşik taşıyan kompleks bir karışımdır.²⁴ Sigara dumanındaki katran, kinon-semikinon-hidrokinon (Q/Q/QH2) kompleksi taşımaktadır²⁵ ve bu kompleks, moleküler oksijeni süperoksida, hidrojen peroksidi de hidroksi radikale çevirmektedir.²⁶ Yapılan bu çalışmada, Türk toplumundaki bireylerden alınan saç foliküllerindeki 4977 ve 7436 bç mtDNA delesyonlarının oranı ve bu delesyonların sigara kullanımı, sigara tüketim miktarı ve yaşlanmayla korelasyonu olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

SAÇ FOLİKÜLLERİNİN TOPLANMASI

Çalışmaya, yaşları 18 ile 90 arasında değişen, görünüşte sağlıklı, belirgin bir hastalığı olmayan, 56'sı sigara kullanan, 44'ü hiç sigara kullanmamış toplam 100 gönüllü erkek birey katıldı. Biyolojik materyal olarak, gönüllülerin bitemporal bölgesinden alınan 3-7 adet saç folikül örnekleri kullanıldı. Bireyler, yaşlarına, sigara kullanıp kullanmadıklarına ve sigara tüketim miktarlarına göre gruplandırıldı. Bu çalışma için Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 07.11.2005 tarih ve 80-2093 sayılı kararı ile izin alındı, bireylerden örnekler Helsinki Deklerasyonu Prensipleri'ne uy-

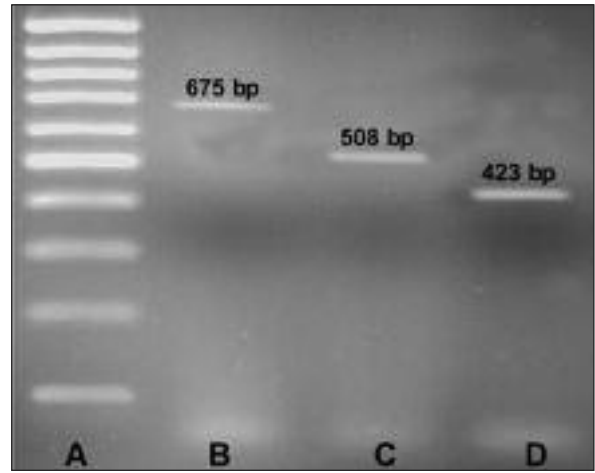
gun olarak ve kişilerden “bilgilendirilmiş olur” formu alınarak toplandı.

SAÇ FOLİKÜLLERİNDEN DNA İZOLASYONU

Saç folikül örneklerinden “Qiagen DNA izolasyon mini kiti” ile tüm DNA izolasyonları yapıldı. Tüplere alınan örneklerin üzerine 300 µl ATL, 20 µl Proteinaz K ve 30 µl 0.39 M DTT eklenerek, 56 °C’de, 1.5 saat lizis işlemi yapıldı. Üzerine 300 µl AL konularak 70 °C’de 10 dakika ikinci defa inkübasyona alındı. Sonrasında 200 µl soğuk saf etanol eklenerek tüm içerik kolon sistemine aktarıldı. Kolon üzerine sırasıyla 500 µl AW1 konulup 8000 rpm de 1 dakika, 500 µl AW2 konulup 14000 rpm de üç dakika santrifüj edildi. Alttaki tüp atılarak kolona yeni tüp takıldı ve kolon üzerine 50 µl distile su konularak 8000 rpm de bir dakika santrifüj edildi ve tüpe toplanan DNA’lar analizlere alınmaya kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

4977 BÇ VE 7436 BÇ MTDNA DELESYONLARININ PZR ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ

Saç folikül örnekleri, izolasyon sonrasında uygun primer çiftleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu’na (PZR) alındı. Amplifikasyonda, PZR’nin kontrolü amacıyla F1-R1 primer çifti, 4977 bç ve 7436 bç mtDNA delesyonlarını belirlemek amacıyla ise sırasıyla F2- R2 ve F3-R3 primer çiftleri (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville) kullanıldı. Amplifikasyon total hacmi 50 µl olacak şekilde, 100 ng DNA, 200 µM dNTP karışımı, 1 U Hot Star Taq DNA Polimeraz (Qiagen), 10 pmol primer çiftleri, 1XPCR Buffer (Qiagen) ve distile su ile hazırlandı. PZR programı; başlangıç denatürasyonu 94 °C’de 5 dakika, sonra 33 döngü halinde 94



ŞEKİL 1: 675 bç’lik, 508 bç’lik ve 423 bç’lik amplifikasyon ürünleri.

(A:100 bç’lik ladder (Marker)

B:675 bç’lik oligonükleotid (Amplifikasyonun kontrolü)

C:508 bç’lik oligonükleotid (7436 bç mtDNA delesyonlu birey)

D:423 bç’lik oligonükleotid (4977 bç mtDNA delesyonlu birey).

°C’de 30 saniye, 55 °C’de 30 saniye ve 72 °C’de 30 saniye, final uzama ise 72 °C’de 10 dakika olarak uygulandı. Sonuçlar %2’lik agaroz jel elektroforezinde, UV ışık altında etidyum bromürle görünür hale getirilerek, Syngene görüntüleme sisteminde incelendi (Şekil 1). Kullanılan primerler ve PZR sonrasında oluşan oligonükleotid uzunlukları Tablo 1’de gösterilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Bütün istatistiksel analizler, SPSS V.16.0.1 programı kullanılarak yapıldı. Gönüllüler yaşlarına göre Grup I: <35, Grup II: 35-65 ve Grup III: >65 olmak üzere üç gruba ayrıldı. Her bir yaş grubunun, delesyonlar ve farklı sigara kullanım katsayılarına sahip bireyler ile karşılaştırılması Ki-kare testi ile yapıldı.

TABLO 1: Amplifikasyonda kullanılan primerler ile PZR sonrasında oluşan oligonükleotidlerin uzunlukları.

Primer çifti	Primerlerin sekansı	PZR pozisyonu 5’→3’	Amplifikasyonun amacı	PZR ürününün uzunluğu (bç)	Delesyon varlığında PZR ürününün uzunluğu (bç)
F1-R1	F1: 5’-GGAGTAATCCAGGTCCGGT-3’ R1: 5’-AATGATGGCTAGGGTGAAGT-3’	3079-3753	Kontrol	675	675
F2-R2	F2: 5’-CCGTATTACCCTATAGC-3’ R2: 5’-GGGGAAGCGAGGTTGACCTG-3’	8251-13650	4977 bç mtDNA delesyonunu belirlemek	5400	423
F3-R3	F3: 5’-CTCTAGAGCCCACTGTAAG-3’ R3: 5’-GTTGAGGGTTGATTGCTGTAC-3’	8285-16228	7436 bç mtDNA delesyonunu belirlemek	7944	508

dı. Beklenen frekansların beşten az olduğu durumlarda Fisher's exact test uygulandı. Sonuçlar $p < 0.05$ değerine göre istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Elde edilen sonuçlar, çapraz tablolar ile sunuldu. Çalışmanın prospektif olması dolayısıyla rölatif risk (RR) değerleri ayrıca hesaplanarak söz konusu çapraz tablolara eklendi. Sigara kullanım katsayısı, (günde kullanılan sigara paketi x sigara kullanım yılı) olarak hesaplandı ve sigara kullanım katsayısı 1-20 olanlar hafif içici, 20 ve üzeri katsayısı olanlar ise ağır içici olarak gruplandırıldı.

BULGULAR

4977 bç ve 7436 bç mtDNA delesyon frekanslarının yaşa bağlı olarak artışının istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (sırasıyla $p = 0.003$ ve $p = 0.005$) (Tablo 2). 4977 bç delesyonlu bireylerin yaş ortalamaları 61.26 ± 17.93 ($n = 23$) iken, bu delesyona sahip olmayan bireylerin yaş ortalamaları 45.09 ± 19.98 ($n = 77$) olarak hesaplandı. 4977 bç mtDNA delesyonu ile yaş grupları arasındaki ilişki rölatif risk (RR) değerlerine göre incelendiğinde, Grup II'deki (>65) 4977 bç mtDNA delesyonunun görülme frekansının, Grup I'dekinden (<35) 5.11 kat fazla olduğu hesaplandı ve bu sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p = 0.002$). Grup III'teki 4977 bç mtDNA delesyonunun görülme frekansının ise Grup II'dekinden ($35-65$) 1.95 kat daha fazla olduğu belirlendi ($p = 0.061$).

Tüm yaş gruplarında sadece üç bireyde 7436 bç mtDNA delesyonuna rastlandı ve bu bireylerin tamamı 65 yaş üzerindeki yaş grubunda bulunmaktaydı. 7436 bç mtDNA delesyonlu bireylerin yaş ortalamaları 72.67 ± 7.23 iken, bu delesyona sahip olmayan bireylerin yaş ortalamaları ise 48.07 ± 20.46 olarak hesaplandı ve yaşlanma ile 7436 bç mtDNA delesyonu arasında istatistiksel olarak anlamlılık tespit edildi ($p = 0.005$).

Sigara kullanımı ile 4977 bç mtDNA delesyonu arasında istatistiksel olarak anlamlılık belirlendi ($p = 0.001$). Bu delesyonun görülme frekansının, sigara kullanımı olan bireylerde, kullanmayanlara göre 5.25 kat daha fazla olduğu tespit edildi. Otuz beş yaş altı ve 35-65 yaşları arasındaki bireylerde 7436 bç mtDNA delesyonuna rastlanmadığından, bu delesyon ile sigara kullanımı arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanamadı, ancak 7436 bç mtDNA delesyonuna sahip bireylerin üçü de sigara kullanan bireylerin olduğu grupta bulunmaktaydı (Tablo 3).

Çalışmada, gönüllüler sigara kullanımlarının yanı sıra, sigara tüketim miktarlarına göre de gruplandırıldı. Ağır sigara içiciler ile hafif sigara içiciler ve ağır sigara içiciler ile sigara kullanımı olmayan bireylerle, 4977 bç mtDNA delesyonu görülme sıklığı arasında istatistiksel anlamlılık tespit edildi (sırasıyla $p < 0.05$ ve $p < 0.01$). Sigara tüketim miktarı

TABLO 2: Yaş gruplarına göre 4977 bç ve 7436 bç mtDNA delesyonlarının oranı.

Yaş Grupları	4977 bç mtDNA delesyon				7436 bç mtDNA delesyon			
	(+)	(-)	RR	p	(+)	(-)	RR	p
Grup I (<35)	3 (8.6%)	32 (91.4%)	5.11	0.002	0 (0%)	35 (100%)	---	0.067
Grup II ($35-65$)	9 (22.5%)	31 (72.5%)	1.95	0.061	0 (0%)	40 (100%)	---	0.053
Grup III (>65)	11 (44.0%)	14 (56.0%)	-	-	3 (12%)	22 (88.0%)	---	-
Toplam	23 (23.0%)	77 (77.0%)	---	0.003	3 (3%)	97 (97%)	---	0.005

(+/-) = delesyonların var olup olmadığını gösterir

% = aynı yaş grubu içerisindeki yüzde oranları belirtir

RR = "Grup III ve Grup I"; "Grup III ve Grup II'deki" delesyon yüzdelilerinin oranları

p = Grup III ile Grup I ve Grup III ile Grup II arasındaki farklılık

TABLO 3: 4977 bç ve 7436 bç mtDNA delesyonlarının sigara kullanımı ve yaş gruplarına göre dağılımı.

Yaş Grupları	Sigara Kullanma Durumu	4977 bç mtDNA delesyon		RR	Fischer's Exact P Test	7436 bç mtDNA delesyon		RR	Fischer's Exact P Test
		(+)	(-)			(+)	(-)		
Grup I (<35)	+	2	13	2.67	0.565	0	15	----	----
	-	1	19			0	20		
Grup II (35-65)	+	9	16	----	0.015	0	25	----	----
	-	0	15			0	15		
Grup III (>65)	+	9	7	2.54	0.208	3	13	----	0.280
	-	2	7			0	9		
Toplam	+	20	36	5.25	0.001	3	53	----	0.253
	-	3	41			0	44		

RR=Gruplardaki sigara kullananlardaki 4977 bç mtDNA delesyonunun, sigara kullanılmayanlardaki 4977 bç mtDNA delesyonuna oranı

artıkça 4977 bç mtDNA delesyonun da arttığı, ağır sigara içicilerde bu delesyonun görülme frekansının, hiç sigara kullanmayanlara göre 6.45 kat daha fazla olduğu belirlendi. 7436 bç mtDNA delesyonlu üç birey de ağır sigara içicilerin olduğu grupta bulunmaktaydı ve bu delesyona hafif içiciler ve sigara kullanımı olmayan bireyler arasında rastlanmadı (Tablo 4).

TARTIŞMA

Günümüzde mitokondriyal DNA'da birçok mutasyon ve büyük delesyonlar belirlenmiş olup, bu delesyonların hastalıklar ve yaşlanma ile ilişkisi çeşitli dokularda araştırılmıştır.^{17,27}

Çalışmamızda saç örnekleri, bireylerden invaziv olmayan yöntemle kolaylıkla toplanabildiğinden ve toksik maddelerle kronik maruziyet sonucunda ortaya çıkacak genotoksik hasarlar için iyi bir gösterge olarak kabul edilebileceğinden dolayı örnek olarak seçilmiştir.²² MtdNA delesyonla-

rının belirlenmesi ve organizmaya verebileceği hasarlar ile ilişkisinin araştırılmasında, delesyon birikiminin az olduğu karaciğer ve kan gibi yenilenme hızı fazla olan hücreler yerine, delesyonların birikim gösterdiği saç, beyin ve iskelet kası gibi çok az yenilenen veya hiç yenilenmeyen dokular kullanılmaktadır. Bireylerin saç folikül örneklerinde mtDNA delesyonları ve yaşlanma arasındaki korelasyon belirlenirken, aynı bireylerden alınan kan örneklerinde bu delesyonlara rastlanmamıştır.^{10,28} Diğer dokulara göre saç örneklerinde mtDNA delesyonlarının daha erken belirlenebiliyor olmasıyla, organların fonksiyonlarını etkileyen bu delesyonların, dokular arasında yayılarak hasar oluşturmalarının ve kanser oluşumunun önlenmesi açısından önemli olabileceği ileri sürülmektedir.²³

Mitokondriyal DNA'lar, nükleer DNA'ya göre oksidatif stres hasarına ve karsinojenlerin etkisine daha fazla maruz kalmaktadır. Karsinojen

TABLO 4: Sigara kullanımı ile sigara tüketim miktarlarına göre 4977 bç ve 7436 bç mtDNA delesyonun oranı.

Sigara Kullanma Durumu		4977 bç mtDNA delesyon				7436 bç mtDNA delesyon			
		(+)	(-)	RR	p	(+)	(-)	RR	P
Sigara Kullananlar	Hafif içiciler (1-20)	2 (13.3%)	13 (86.7%)	3.30	p<0.05	0 (0%)	15 (100%)	---	p>0.05
	Ağır içiciler (>20)	18 (43.9%)	23 (56.1%)	6.45	p<0.01	3 (7.3%)	38 (92.7%)	---	---
Sigara Kullanmayanlar		3 (6.8%)	41 (93.2%)	-	-	0 (0%)	44 (100%)	---	p>0.05
Toplam		23 (23%)	77 (77%)	---	p<0.01	3 (3%)	97 (97%)	---	p>0.05

RR= "Ağır içiciler ve hafif içiciler"; "ağır içiciler ve hiç sigara kullanmayanlar"daki delesyon yüzdelere oranları

p=Ağır içiciler ile hafif içiciler ve ağır içiciler ile hiç sigara kullanmayanlar arasındaki farklılık

polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve nitrozaminler hayvan hücrelerinin özellikle mitokondrisinde birikmektedir. Hücre kültürüyle yapılan çalışmalarda, bu maddelerin mtDNA'ya bağlanmalarının nDNA ya göre 50-500 kat fazla olduğu belirlenmiştir.^{29,30}

MtDNA delesyonları ve yaşlanma arasındaki bağıntıyı araştıran birçok çalışma bulunmakla birlikte,^{12,22} bu delesyonların sigara kullanımı ve sigara tüketim miktarı ile korelasyonu sadece birkaç çalışmada araştırılmıştır. Liu ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda, bireylerin saç foliküllerinde 4977 bç ve 7436 bç'lik mtDNA delesyonlarını araştırmış, 4977 bç mtDNA delesyonu ile yaşlanma, sigara kullanımı ve sigara tüketim miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlılık tespit etmişlerdir.^{20,23} Ancak 7436 bç mtDNA delesyonuna sadece bir bireyde rastladıklarından bu delesyonla ilgili herhangi bir anlamlılık belirlenememiştir.^{20,23}

Yaptığımız çalışmada da literatürdeki çalışmaların bulgularını doğrulayan sonuçlar elde edilmiş, sigara kullanan bireylerin mtDNA'larında 4977 bç'lik delesyonun, kullanmayanlara göre 5; 25 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. MtDNA'daki 7436 bç'lik delesyon ise ağır içici grubundaki bireylerin %7.3'ünde görülürken, sigara kullanmayan ve hafif içici gruplarda bu delesyona rastlanmamıştır.

SONUÇ

Bu çalışma sonucunda ilk defa Türk toplumunda, bireylerin saç foliküllerinde 4977 bç ve 7436 bç mtDNA delesyonları araştırılmış, bu delesyonlarla yaşlanma, sigara kullanımı ve sigara tüketim miktarı arasındaki korelasyon belirlenmiştir. Saç foliküllerinde, yaşlanma ile 4977 bç ve 7436 bç mtDNA delesyonları arasında istatistiksel anlamlılık tespit edilmiştir. Ayrıca bireyler sigara kullanıp kullanmadıklarına ve sigara tüketim miktarlarına göre de sınıflandırılmış ve sigara tüketim miktarı arttıkça 4977 bç mtDNA delesyonunun da artış gösterdiği saptanmıştır. 7436 bç mtDNA delesyonu sadece üç bireyde tespit edilmiş ve bu bireylerin tamamı da 65 yaş üzerinde ve ağır sigara içicilerin olduğu grupta yer almıştır.

Yapılan çalışmada, bireylerin sadece yaş, sigara kullanma durumları ve sigara tüketim miktarları değişken olarak ele alınmıştır. İlerideki çalışmalarda farklı dokular ve hastalıklar ile bireylerin ayrıntılı sağlık profilleri çıkarılarak, mitokondriyal DNA delesyonlarının araştırılması planlanmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonununun 2005 08 04 nolu ve "Sigara içiminde oksidatif ve nitrozatif stres" başlıklı projesi ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290(5806):457-65.
- Clayton DA, Doda JN, Friedberg EC. The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci* 1974;71(7):2777-81.
- Graeber MB, Grasbon-Frodl E, Eitzen UV, Kösel S. Neurodegeneration and aging: role of the second genome. *J Neurosci Res* 1998;52(1):1-6.
- Richter C. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int J Biochem Cell Biol* 1995;27(7):647-53.
- Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; 78(2):547-81.
- Kadenbach B, Barth J, Akgün R, Freund R, Linder D, Possekel S. Regulation of mitochondrial energy generation in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1271(1): 103-9.
- Croteau DL, Stierum RH, Bohr VA. Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutat Res* 1999;434(3):137-48.
- Dianov GL, Souza-Pinto N, Nyaga SG, Thybo T, Stevnsner T, Bohr VA. Base excision repair in nuclear and mitochondrial DNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001;68:285-97.
- Mason PA, Matheson EC, Hall AG, Lightowers RN. Mismatch repair activity in mammalian mitochondria. *Nucleic Acids Res* 2003;31(3):1052-8.
- Lee HC, Pang CY, Hsu HS, Wei YH. Differential accumulations of 4,977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1226(1): 37-43.
- Zhang C, Lee A, Liu VW, Pepe S, Rosenfeldt F, Nagley P. Mitochondrial DNA deletions in human cardiac tissue show a gross mosaic distribution. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254(1):152-7.
- Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW, Arnheim N. A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(16):7370-4.
- Wallace DC, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Voljavec AS, Shoffner JM. Mitochondrial DNA mutations associated with neuromuscular diseases: analysis and diagnosis using the polymerase chain reaction. *Pediatr Res* 1990;28(5):525-8.

14. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988;331(6158):717-9.
15. Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94(2):514-9.
16. Ballinger SW, Boudier TG, Davis GS, Judice SA, Nicklas JA, Albertini RJ. Mitochondrial genome damage associated with cigarette smoking. *Cancer Res* 1996;56(24):5692-7.
17. Fahn HJ, Wang LS, Hsieh RH, Chang SC, Kao SH, Huang MH, et al. Age-related 4,977 bp deletion in human lung mitochondrial DNA. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(4):1141-5.
18. Birket MJ, Birch-Machin MA. Ultraviolet radiation exposure accelerates the accumulation of the aging-dependent T414G mitochondrial DNA mutation in human skin. *Aging Cell* 2007;6(4):557-64.
19. Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, Schweizer M, Suter M, et al. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta* 1995;1271(1):67-74.
20. Liu CS, Chen HW, Lii CK, Tsai CS, Kuo CL, Wei YH. Alterations of plasma antioxidants and mitochondrial DNA mutation in hair follicles of smokers. *Environ Mol Mutagen* 2002;40(3):168-74.
21. Wei YH. Mitochondrial DNA alterations as ageing-associated molecular events. *Mutat Res* 1992;275(3-6):145-55.
22. Kao SH, Liu CS, Wang SY, Wei YH. Ageing-associated large-scale deletions of mitochondrial DNA in human hair follicles. *Biochem Mol Biol Int* 1997;42(2):285-98.
23. Liu CS, Kao SH, Wei YH. Smoking-associated mitochondrial DNA mutations in human hair follicles. *Environ Mol Mutagen* 1997;30(1):47-55.
24. Fahn HJ, Wang LS, Kao SH, Chang SC, Huang MH, Wei YH. Smoking-associated mitochondrial DNA mutations and lipid peroxidation in human lung tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19(6):901-9.
25. Pryor WA, Stone K, Zang LY, Bermúdez E. Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage. *Chem Res Toxicol* 1998;11(5):441-8.
26. Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxynitrate, and peroxynitrite. *Ann N Y Acad Sci* 1993;686(27-8):12-27.
27. Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, et al. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med* 1989;320(20):1293-9.
28. Yen TC, Su JH, King KL, Wei YH. Ageing-associated 5 kb deletion in human liver mitochondrial DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;178(1):124-31.
29. Wunderlich V, Schütt M, Böttger M, Graffi A. Preferential alkylation of mitochondrial deoxyribonucleic acid by N-methyl-N-nitrosourea. *Biochem J* 1970;118(1):99-109.
30. Allen JA, Coombs MM. Covalent binding of polycyclic aromatic compounds to mitochondrial and nuclear DNA. *Nature* 1980;287(5779):244-5.