



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PARKİNSON HASTALIĞI VE İNSAN PERİFERİK
KAN LENFOSİTLERİNDEKİ KROMOZOM
HASARLARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

İLKNUR ÇETİN

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
GENEL BİYOLOJİ PROGRAMI**

Danışman

Prof. Dr. TUNCAY ORTA

Haziran 2013

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PARKİNSON HASTALIĞI VE İNSAN PERİFERİK
KAN LENFOSİTLERİNDEKİ KROMOZOM
HASARLARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

İLKNUR ÇETİN

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
GENEL BİYOLOJİ PROGRAMI**

Danışman

Prof. Dr. TUNCAY ORTA

Haziran 2013

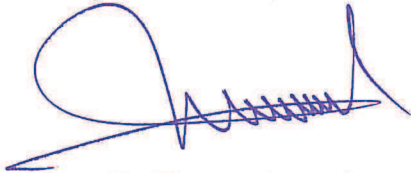
İSTANBUL

Bu çalışma 18/06/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Genel Biyoloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

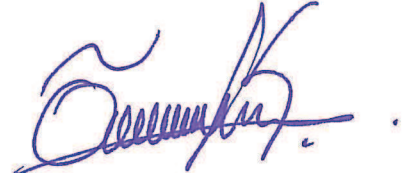
Tez Jürisi

Prof. Dr. Tuncay ORTA (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Nihal Ömür BULAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Bayram DEMİR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Önder KILIÇ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Murat BELİVERMİŞ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 10891 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması boyunca bilgi ve deneyimleriyle her zaman yanımda olan, beni destekleyen ve yönlendiren tez danışmanım değerli hocam Sn. Prof. Dr. Tuncay ORTA'ya, deneysel çalışmalarımı gerçekleştirmemde yardımlarını esirgemeyen ve bilgilerini benimle paylaşan Sn. Uzman Biyolog Süreyya GÜNEBAKAN'a, teşekkür ederim. Ayrıca, araştırma süresince hastaların tanısının konmasını ve hastalardan kan alınımını sağlayan ve desteğini esirgemeyen Bakırköy Ruh ve Sinir Hastalıkları Hastanesi Nöroloji bölümü doktorlarından Sayın Uzm. Dr. Nazan KARAGÖZ SAKALLI ve Dr. Barış TOPÇULAR'a, hastaların kan örneklerini alan Nöroloji bölümü hemşirelerine ve özellikle de kan örneklerini veren kişilere teşekkür ederim.

Her türlü destekleri ile tezimin her aşamasında bana yardımcı olan çalışma arkadaşım Narin ABDULLAH'a teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında yanımda olan,her zaman beni destekleyen eşim Metin ÇETİN'e ve ÇETİN ailesine çok teşekkür ederim.

Her zaman maddi ve manevi desteğini esirgemeyerek hep yanımda olan annem Kadriye ÇAĞIN, babam İlyas ÇAĞIN ve kardeşim Mine ÇAĞIN'a sonsuz teşekkürlerimi sunar, yüksek lisans tez çalışmamı dedem Mustafa TEZCAN'a ithaf ederim.

Haziran 2013

İlknur ÇETİN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iii
TABLO LİSTESİ.....	iv
SEMBOL LİSTESİ.....	v
ÖZET	vi
SUMMARY.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. YAŞLANMA VE OKSİDATİF STRES.....	3
2.2.NÖRODEJENERATİF HASTALIKLAR.....	5
2.3. PARKİNSON HASTALIĞI.....	5
2.2.1. Parkinson Hastalığının Epidemiyolojisi.....	6
2.2.2. Parkinson Hastalığının Etiyolojisi.....	7
2.2.3. Parkinson Hastalığının Histopatolojisi.....	8
2.2.4. Parkinson Hastalığının Genetiği.....	9
2.2.5. Parkinson Hastalığı Ve Apoptoz.....	9
2.4. LENFOSİTLER.....	11
2.5. DNA YAPISI.....	12
2.6. KROMOZOM YAPISI.....	12
2.7. KROMOZOM HASARLARI	13
2.7.1. Kromozom Tipi Aberasyonlar.....	14
2.7.2. Kromatid Tipi Hasarlar.....	14
2.8. MİKRONÜKLEUS OLUŞUMU.....	15
2.9. MN TEST YÖNTEMİ VE UYGULAMA AMACI.....	17
2.10. MN TESTİ AVANTAJLARI.....	18
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	19
3.1. DENEY GRUBU.....	19

3.2. KAN ÖRNEKLERİNİN ELDE EDİLMESİ VE KÜLTÜRE ALINMASI	19
3.3. PREPARATLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	20
3.4. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER	21
4. BULGULAR	22
4.1.HASTA GRUBUNA AİT PERİFERİK KAN LENFOSİTLERİ KÜLTÜR SONUÇLARI	22
4.2. KONTROL GRUBUNDAN ELDE EDİLEN BULGULAR	26
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	31
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	42

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Lewy cisimciği.....	8
Şekil 2.2	: PH'ta görülen protein yolaklar	11
Şekil 2.3	: Mikronükleus ve binükleatın mikroskopik görüntüsü.....	15
Şekil 5.1	: Hasta ve kontrol gruplarındaki spontan MN frekanslarının karşılaştırılması	33
Şekil 5.2	: Hasta ve kontrol gruplarındaki spontan MN frekanslarının karşılaştırılması	34

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1	: Parkinson hastalarının lenfositlerindeki spontan olarak skorlanan deney sonuçları.....	22
Tablo 4.2	: Parkinson hastalarının lenfositlerindeki in vitro hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) uygulaması sonucu skorlanan deney sonuçları.....	24
Tablo 4.3	: Sağlıklı gruba ait lenfositlerde skorlanan deney sonuçları.....	26
Tablo 4.4	: Sağlıklı gruba ait lenfositlerdeki in vitro hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) uygulaması sonucu skorlanan deney sonuçları.....	28
Tablo 4.5	: Mikronükleus frekanslarının grup içi ve gruplar arası karşılaştırılması.....	29
Tablo 4.6	: Grup içi ve gruplar arası proliferatif indekslerin karşılaştırılması.....	30

SEMBOL LİSTESİ

BN	:Binükleat Hücre
DNA	:Deoksiribonükleik asit
LB	:Lewy cisimciği
MN	:Mikronükleus
MPTP	:1-metil-4-fenil 1,2,3,6 tetrahidropiridin
PD	:Parkinson disease
PH	:Parkinson hastalığı
PHA	:Fitohemaglutinin
Pİ	:Proliferatif indeksler
SOD	:Süperoksit dismutaz
SN	:Substantia nigra
UPDRS	:Unified Parkinson's Disease Rating Scale
ROS	:Reaktif oksijen türleri

ÖZET

PARKINSON HASTALIĞI VE İNSAN PERİFERİK KAN LENFOSİTLERİNDEKİ KROMOZOM HASARLARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Parkinson hastalığı (PH), bazal ganglionlardan, başta substansia nigra olmak üzere, diğer beyin sapı pigmentli nöronlarını da etkileyen ve yaşlanma ile birlikte gelişen dejeneratif bir süreçtir. Yaşlanma sırasında telomerlerin kısalmasının yanında kalıtsal ve çevresel faktörlerin meydana getirdiği kromozom hasarları da belli bir paya sahiptir. Kromozom hasarlarını ölçen yöntemlerden biri de mikronükleus tekniğidir. Mikronükleuslar (MN), hasar gören kromozomların hücre bölünmesi esnasında yeni oluşan çekirdeklere dahil olmayıp tüm kromozom veya kromozom parçaları şeklinde sitoplazmada yoğunlaşarak meydana gelen küçük nükleus yapılarıdır.

Bu çalışmada, insan periferik kan lenfositlerindeki kromozom hasarları mikronükleus oluşumları ile ölçülerek Parkinson hastalığı ile olan ilişkisi incelenmiştir. Doğal (spontan) MN oluşumlarının ölçülmesine ek olarak, hidrojen peroksit stresinin in vitro uygulanması sonucunda meydana gelen MN frekansları ve proliferatif indeksler (PI) de belirlenmiştir. Bu da, çevresel faktör ve diyet alışkanlıklarından bağımsız olarak, hidrojen peroksit stresi ile meydana getirilen oksidatif hasarın genom üzerindeki sitogenik etkisinin daha anlamlı çalışılmasını sağlamıştır.

Bu tez projesinde, periferik kan lenfositleri Parkinson teşhisi konmuş 30 hasta ve bu hastalara uygun yaş aralığındaki sağlıklı bireylerden steril, vakumlu ve çeperi heparinli tüplere alınmıştır. Alınmış olan kanlar iki gruba ayrılıp bir grupta spontan ve diğer grupta ise hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulamasıyla oluşan MN frekansı incelenmiştir. Gruplardan elde edilen sonuçlar t-testi kullanılarak yorumlanmıştır.

SUMMARY

AN INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN PARKINSON'S DISEASE AND CHROMOSOME DAMAGE IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

Parkinson disease (PD) is a degenerative process which mainly effects basal ganglions as substansia nigra and other peduncle pigmented neuron. During the aging processes, telomers might may got shorter and also chromosomal damages caused by hereditary and environmental factors may have proportional role on aging. Micronucleus technique is one of the chromosome damage assessment methods. Micronucleus (MN) is a small nucleus structure consisted from a whole or sectional chromosomes which are damaged and doesn't join to the new nuclei during the cell division.

In this thesis project, the relationship of chromosome aberations in human peripheral blood lymphocytes with Parkinson disease was investigated by MN formation. In addition to measuring spontaneous MN formation, MN frequencies and proliferation indexes (PI) after implementation of hydrogen peroxide stress in vitro were also determined. This enabled to study directly cytogenetic affects of oxidative damage by application of hydrogen peroxide stress independently from environmental factors and dietary habits

This project was performed with thirty women and man patients with Parkinson disease and same age matched healthy individuals (control group).Peripheral blood samples from individuals were drawn into two separate sterilized lithium-heparin tubes and one tube was left as a control for spontaneous MN frequencies and the other was applied hydrogen peroxide. Paired t-test was applied for the comparison of spontaneous and hydrogen peroxide induced micronucleus frequencies for each individual in both patients and control groups.

GİRİŞ

Beynin belirli bölgelerinde ortak özelliklere sahip nöron popülasyonlarının ölümü sonucunda nörodejeneratif hastalıklar ortaya çıkmaktadır[1]. Nörodejeneratif hastalıklar, farklı klinik fenotiplere ve genetik etiyolojiye sahiptir[2,3]. Parkinson hastalığı, dopaminerjik nöronlarda büyük dejenerasyon meydana geldikten sonra yani substantia nigrada %50 nöronal kayıp ve striatal dopaminde %80 tükenme ile ortaya çıkar. Görülme sıklığı 65-90 yaşları arasında artmaktadır. Tüm popülasyonun % 0.3 ünü etkilemekle beraber, bu oran 65 yaşın üzerinde %3' e yükselmektedir[4].

Nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde mitokondriyal enerji metabolizması ve intrasellüler kalsiyum dengesindeki bozuklukların etken olabileceğine ilişkin bilgiler mevcuttur. Son yıllarda araştırmacılar tarafından yapılan çeşitli çalışmalarda değişik tipteki nörodejeneratif hastalığın meydana gelmesinde serbest radikal oluşumunun önemli rolü olduğuna ilişkin ipuçları elde edilmiştir[5,6,7]. Bu nörodejeneratif hastalıklar arasında; Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, Alzheimer hastalığı, Multipl skleroz gibi beyin ve sinir sistemi hastalıkları yer almaktadır[6,7].

Yaş artışı ile doğru orantılı olarak her insanda dopaminerjik nöron kaybı olmaktadır. Ayrıca substantia nigradaki nöron kaybını artıran; bir genetik yatkınlık ya da enfeksiyon, travma, toksin veya serbest radikal üretimi gibi süreci hızlandıran risk faktörleri olabilir. Özellikle mitokondri, endoplazmik retikulum ve çekirdek membranında yer alan serbest radikaller aracılığı ile oluşan oksidatif stres, Parkinson hastalığında nörodejenerasyon oluşmasında ve hastalığın ilerleme sürecinde önemli rol oynamaktadır[1,8].

Bu çalışmada, insan periferik kan lenfositlerindeki kromozom hasarları mikronükleus (MN) oluşumları ile ölçülerek Parkinson hastalığı ile olan ilişkisi incelenmiştir. Doğal (spontan) MN oluşumlarının ölçülmesine ek olarak, hidrojen peroksit stresinin in vitro uygulanması sonucunda meydana gelen MN frekansları ve proliferatif indeksleri (PI) belirlenmiştir. Bu çalışma neticesinde çevresel faktör ve diyet alışkanlıklarından

bağımsız olarak, hidrojen peroksit stresi ile meydana getirilen oksidatif hasarın genom üzerindeki sitogenik etkisinin daha anlamlı çalışılması sağlanmıştır.

GENEL KISIMLAR

2.1. YAŞLANMA VE OKSİDATİF STRES

Yaşlanma, genetik bir programla düzenlenip çevresel faktörlerin etkisiyle meydana gelen, yapısal ve işlevsel değişmelerle ölüme götüren bir süreçtir. Diğer bir deyişle yaşlanma, organizmanın mental gelişimi ve metabolik işlemlerinin sonucunda hem ilerleyen yaşa eşlik eden bir seri değişimden, hem de hastalanma ve ölüm olasılığının giderek artan bir şekilde ilerlemesinden sorumlu olan değişikliklerin toplamı olarak tanımlanabilmektedir. Bu değişikliklerin oluşumunda genetik ve çevresel faktörler etkilidir[9].

Yaşlanma sürecinin tüm canlılarda görülmesi, yaşlanma ve ölümün evrensel ve doğal bir olgu olduğunu gösterir. Harman (10), yaşlanmayla ilgili teorisinde, oksijen kaynaklı serbest radikallerin, aerobik organizmaların hücrelerinde veya hücreler arası ortamda meydana gelerek kimyasal modifikasyonlara ve biyolojik denejenerasyona neden olduğunu ileri sürmüştür. Yaşlanmanın sebebi olarak DNA mutasyonundan çok DNA hasarının önemli olduğu ileri sürülmüştür. DNA hasarına, hidroliz, alkalizasyon, radyasyon ve toksik kimyasallar sebep olabilmektedir. DNA'da görülen hasarın seviyesi ile yaşam süresi arasında ters ilişki bulunmuştur. En fazla oksidatif DNA hasarının görüldüğü yer nöronlardır[11].

Yaşlanma ile mitokondriyal solunum ve oksidatif fosforilasyon yavaş yavaş ayrılır ve solunumsal enzim aktiviteleri azalır. Bunun sonucu elektron transport zincirinde artmış elektron akışına bağlı olarak, mitokondrideki reaktif oksijen türleri artar. Mitokondriyal DNA (mt-DNA) artan reaktif oksijen türlerinin meydana getirdiği oksidatif hasara karşı duyarlıdır. Mutant mt-DNA tarafından kodlanan defektif protein subunitleri bozulmuş solunumsal fonksiyon gösterir, elektron kaçağı ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi artar ve sonucunda oksidatif stres ve mt-DNA hasarı artar. Bu kısır döngü farklı

hücrelerde farklı oranlarda meydana gelir ve yaşlanma ile mt-DNA'da mutasyon ve oksidatif hasar ile sonuçlanır[11].

Serbest radikaller, besinlerin oksijen kullanılarak enerjiye dönüştürülmesi sırasında meydana gelen kararsız ve reaktif moleküllerdir. Serbest radikal oluşumu sonucunda meydana gelen hasar, antioksidanlar veya radikal oluşumunu engelleyecek mekanizmalar ile dengelenemez ise, oksidan-antioksidan dengesi oksidanlar lehine bozulur ve "Oksidatif Stres" ortaya çıkar. Oksidatif stres sonucunda oksitleyici maddeler olan serbest radikaller meydana gelerek çevredeki makromoleküllere hasar verir. Bu makromoleküllerden başlıcaları lipitler, proteinler ve nükleik asitlerdir.

Lipid peroksidasyonu ilerleyen yaş ile çeşitli dokularda oluşur. Lipid peroksidasyonu hücre hasarının iyi tanımlanmış bir mekanizmasıdır. Membran lipidlerinin yok edilmesi ve lipid peroksidatlarının ve onun yan ürünleri olan malonaldehit oluşmasına neden olurlar. Lipit peroksidasyonu lipit hidroperoksidleri ve aldehitlerin, protein oksidasyonu protein karbonillerinin, DNA oksidasyonu da modifiye nükleotidlerin oluşumuna yol açar. UV ışınları, ilaçlar, yağ oksidasyonu, immunolojik reaksiyonlar, radyasyon, stres, sigara, alkol ve biyokimyasal redoks reaksiyonları gibi pek çok yolla serbest radikal oluşumu gerçekleşebilir[11,12].

Beyin dokusu enerjisini yalnızca oksidatif metabolizmadan elde eder ve vücuttaki oksijenin büyük bir bölümünü kullanır. Nöronal oksidatif fosforilasyon esnasında mitokondrial elektron transport zincirinden yüksek enerjili elektronların kaçışı serbest radikallerin oluşumunu sağlar. Beyin dokusu oksidan strese özellikle duyarlıdır. Çünkü, beyin toplam vücut ağırlığının % 2 sini oluşturmasına rağmen, toplam vücut oksijeninin % 20 sini kullanır. Beyin hücre zarları büyük oranda doymamış yağ asitlerinden oluşur, bunlar lipid peroksidasyon reaksiyonlarında serbest radikallerin başlıca substratlarıdır, katalaz içermez, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimleri ile glutatyon ve E vitamini düzeyleri sınırlıdır. Rejenerasyon kapasitesi sınırlı olan beyinde, serbest radikallerin oluşmasını sağlayan metaller spesifik bölgelerde birikebilir. Bunun dışında organizmada oluşan serbest radikaller, aralarında ateroskleroz, kalp hastalıkları, kanser, serebrovasküler hastalıklar, nörodejeneratif

hastalıklar, diyabet, akut renal yetmezlik, akciğer hastalıkları, anfizem gibi yaşlanmaya bağlı dejeneratif bozuklukların da yer aldığı patolojik durumların oluşumuna katkıda bulunurlar[13,14].

2.2. NÖRODEJENERATİF HASTALIKLAR

Nöronlar, kalp kası gibi sinaptik bağlantılar uygun şekilde kurulduktan sonra bir daha bölünemeyen yani çoğalamayan hücrelerdir. Dolayısıyla yenilenemediklerinden ömür boyunca yaşarlar. Oysa alzheimer, parkinson, hutchinson gibi hastalıklarda nedeni henüz bilinmeyen bir şekilde apoptozun indüklenerek nöronların öldüğü düşünülmektedir. PH hastalarında substantia nigradaki dopaminerjik nöronlar üç gruba ayrılabilir:

1. Normal nöronlar
2. Hastalıklı nöronlar
3. Ölen nöronlar

Çok sayıda nöronun ölmesi ancak sinapsların tam olarak oluşmadığı dönemden önce olur. Bu dönemde, doğumda aşırı sayıda olan nöronların sayısı uygun sinaptik ağına sağlanabilmesi için azalır. Optimum sayıda nöronun optimum sayıda sinaptik bağlantı içinde olabilmesi için bu nöron kayıpları gereklidir. Bahsedilen bu hücre ölümleri apoptoz ile gerçekleşir. Zamanı gelince ölen bu hücreler daha önceden programlanmış bir şekilde ölürler (programlanmış hücre ölümü). Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılır[15].

2.3. PARKİNSON HASTALIĞI

Parkinson hastalığı bazal ganglionlardaki dopaminerjik nöronların dejenerasyonu sebebiyle ortaya çıkan istirahat tremoru, rijitide ve postural instabilite gibi çeşitli ekstrapiramidal semptomlardan oluşan bir hastalıktır[16,17]. Tipik olarak orta ve ileri yaş hastalığı olup, ortalama 50-60 yaşlarında başlar ve 10-20 yıllık bir süreçte yavaş olarak ilerler[18]. Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilse de, genel olarak Parkinsonizm insidansının 4.5-21/100000 arasında değiştiği

bilinmektedir[19]. Bu belirsizliğin nedeni hastada belli bir etmen saptanmamasından kaynaklanır. Bunlar “İdiopatik (sporadik) Parkinson Hastalığı” diye adlandırılmaktadır. Bu hastalık Hoehn ve Yahr tarafından tanımlanan evrelerin ağırlık derecesine göre sınıflandırılır ve hastalığın derecesi Parkinson Hastalığı Şiddet Skalası (Unified Parkinson’s Disease Rating Scale – UPDRS) yöntemi ile belirlenir[20].

2.3.1. Parkinson Hastalığının Epidemiyolojisi

Beynin koordine merkezini yavaş bir şekilde tahrip eden Parkinson hastalığı ilk defa 1817’de James Parkinson tarafından istirahat halindeki kişilerin el ve ayaklarındaki ritmik hareketlerden yola çıkarak “titremeli felç” olarak tanımlanmıştır[5600]. Yaklaşık 70 yıl sonra Gowers PH’nin sebeplerinden genetik çeşitliliğinin %15 olduğundan bahsetmiştir. 1949 yılında Mjones hastalığın ilk sistematik çalışmasını yapmıştır[21].

Hastalığın semptomları çok belirgin olmadığından birçok kişi PH olduğunun farkında olmamaktadır ve bu prevalans çalışmalarını engellemektedir[22]. PH oluşumu çok genli kalıtım, çevresel, genetik-çevresel etkileşim gibi bir çok faktörü vardır[23]. Hastalığın %85’i sporadik, %10-15’i ailesel, %5’i tek genli kalıtımla ortaya çıkmaktadır[24,25,26].

Hastalık ilk kez endüstriyel devrim zamanında tanımlanmış olsa da, antik Hint literatüründe (M.Ö 4500-1000) tanımlayan açıklamalara rastlanmıştır. Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalar farklı sonuçlar bildirirse de genel olarak Parkinson hastalığının yıllık insidansının 4.5-21/100.000 arasında değiştiği bilinmektedir[27,28,29].

Avrupa’daki PH oranı 100.000 kişide 12.000 olarak belirlenmiştir. Finlandiya’daki ve Amerika’daki insidans 10.8 ve 17.2:100.000 olduğu tespit edilmiştir[30]. Eskişehir’de yapılan bir çalışmada Türkiye için prevalans değeri 111/100.000 olarak bildirilmiştir[29,30]. Hastalık erkeklerde bayanlara göre (1,5-2,1) daha sık gözlenmektedir[31,32]. İkiz kardeşler arasında yapılan çalışmalar yıllar gerektirdiği için klinik gözlemler yapılamamış ve sonuçlanamamıştır[24].

Sigara içenlerde sıklığın daha az olduğu ileri sürülmektedir[33]. Sigara içiminin substansiya nigra nöronlarında dopamin sentezi esnasında oksidatif serbest radikallerini azaltarak koruyucu etki yapabildiği düşünülmektedir[34]. Dorn’ un yaptığı çalışmada Amerikan gazilerinde sigara içen ve içmeyen gruplar arasındaki ölüm oranını 0,36

bulmuştur ve bu çalışmalarda PH riski ve sigara arasında ters ilişki olduğunu belirtmiştir. Doll ve Peto'nun yaptığı çalışmalarda tütünün hastalıktan koruyucu etkisi olduğu bulunmuştur. Nefzger'in de 198 kişi üzerinde yaptığı çalışmalar aynı sonucu vermiştir[35].

Kırsal bölgede yaşamak ve mesleki olarak haşare ilaçlarına maruz kalmak gibi çevresel faktörler ile PH arasında epidemiyolojik bir ilişki bulunabilir, genetik duyarlılık faktörleri çevresel toksinlerle etkileşime girebilir[33]. Birçok haşare ilacının yanı sıra MPTP (1-metil-4-fenil 1,2,3,6 tetrahidropiridin), rotenon ve annonasin mitokondrial solunum zincirindeki kompleks I'nın inhibitörleridir[15]. 1982 yılında Kaliforniya'da genç narkotik bağımlılarında, MPTP içeren sentetik eroinin intravenöz enjeksiyonu ile ortaya çıkan toksik parkinsonizm olguları, bazı durumlarda ekzojen ajanlara maruz kalmanın, PH'ya yol açabileceğini düşündürmüştür. Çeşitli kimyasal maddelerin parkinsonizm yaptığı bilinmektedir fakat MPTP'ye bağlı parkinsonizmin çarpıcı özelliği, daha yaygın santral sinir sistemi harabiyeti yapması beklenirken, tamamen PH'ın anatomik ve klinik özelliklerini göstermesidir[36]. Diğer ekzojen nörotoksinler, toksik metaller, siyanid, vernik incelticileri, organik solventler, karbonmonoksit, karbondisülfid, hidrojen sülfid ve nitrik oksittir[37]. Hastalığa yol açabilecek çevresel faktörler, kuyu suyu içme ve tarım böceklerinin ilaçlanması olarak sıralanmaktadır. Betakarbolinler ve tetrahidroizokuinolinler gibi endojen toksinler dopamin hücre ölümüne yol açarak hastalığa neden olabilirler[36,37].

Sporadik PH'da kompleks I eksikliği uzun zamandan beri bilinmektedir. Mitokondrial genomun mutasyonları kendiliğinden ortaya çıkabilir, bu da genetik ve çevresel nedenleri arasındaki sınırın karışmasına neden olur. Mitokondrial fonksiyon bozukluğu oksidatif strese, proteozomal aşırı yüke, protein agregasyonuna ve nöronal ateşleme özelliklerinde değişikliklere yol açabilir[15].

2.3.2. Parkinson Hastalığının Etiyolojisi

Parkinson hastalığının etiyolojisi sporadik ve ailesel PH olarak iki gruba ayrılabilir, ancak ailesel PH tanımlanmasının her zaman genetik etiyojolojiye karşılık gelmediği ve aile üyelerinin uzun süre aynı çevresel etmenlere maruz kaldıkları için hastalığı geliştirmiş olabilecekleri belirtilmektedir. Bu yüzden idiyopatik PH olarak

tanımlanmaktadır. Sporadik PH grubunda ise viral enfeksiyonlar, tekrarlayan kafa travmaları veya bazı toksinler gibi etkenler olabilir[38].

Diğer nörolojik ve psikiyatrik bulgularla ilişkili olarak şiddetli kafa travmasının Parkinson sendromuna neden olabileceği belirtilmektedir[39]. Bazı epidemiyolojik çalışmalar kafa travması ile PH gelişimi arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermekle beraber diğer araştırmacılar belirgin bir artış olmadığını belirtmişlerdir[40,41].

Prospektif yolla toplanan bilgiler böyle bir ilişki göstermedikçe, travmanın PH'da risk artışına yol açtığı kabul edilmemelidir.

2.3.3. Parkinson Hastalığının Histopatolojisi

Parkinson tanısı konulmasında nigral ve kortikal kökenli lewy cisimciklerinin varlığı büyük önem taşımaktadır. Nöronların stoplazmasındaki protein bütünlüğünün varlığı ve substantia nigradaki dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ile lewy cisimciği oluşur[43].



Şekil 2.1. Lewy cisimciği

PH'nın ikinci patolojik belirteci olan Lewy cisimciğinin varlığı ilk kez 1912 yılında F.H. Lewy tarafından Parkinson hastalarının beyin sapında, substantia nigra'nın NM içeren nöronlarının sitoplazmasında tanımlanmıştır[44]. Lewy cisimciğinin yapısında α -sinüklein, sinfilin-1, ubikutin, nörofilamentler, oksitlenmiş/nitratlanmış proteinler, parkin, proteozomal öğeler ve ısı şok proteinleri bulunmaktadır[45]. LB'ler (Lewy cisimciği) 15 μ m'den daha büyük çapa, yoğun hyalin çekirdeğe ve bunun etrafında net bir ışık halkasına sahiptir.

Parkinson Hastalığı için karakteristik histolojik bulgu olan LB parkinsonizm bulgusu olmayan, yaşlanmakta olan kişilerde de görülmüş ve bu bulgu, yeterince yaşarlarsa bu kişilerin de hastalığa yakalanabileceklerinin habercisi olarak kabul edilmiştir. Ayrıca yaşla birlikte nigral hücre sayısında azalma tespit edilmiştir. Ek olarak PH'nda substantia nigradaki pigmentli nöronların toplam sayısının, yaşa göre eşleştirilmiş kontrollerdekinin %31'ine düştüğü bulunmuştur[45-48].

1.3.4. Parkinson Hastalığının Genetiği

1990'lı yılların sonuna kadar PH'ın sporadik bir hastalık olduğu düşünülüyordu. Bununla birlikte anlamlı sayıdaki olguda (%10-15), bu hastalığın Mendel kalıtım örüntüsü olmadan aileler içinde de olduğu gözlemlendi[24]. Bu gözlem PH'ın genetik olmayan faktörlerin yanı sıra bazı genetik faktörlerce de belirlenen karmaşık özellikte olduğu düşündürmektedir. Çünkü PH fenotipi ya otozomal ya da çekinik kalıtımla bir Mendeliyen özellik olarak aktarılabilir. Alfa-sinüklein geni otozomal başat olarak kalıtımla alınan PH formlarında mutasyon geçirmiştir ve aynı zamanda da kodlanmış protein sporadik PH'daki Lewy cisimciklerinin ana yapıtaşıdır[49,50].

Bir mitokondrial protein kinaz olan PTEN tarafından indüklenen putatif kinaz 1 (PINK1), mitokondrial bozukluğun önemine işaret etmektedir; oksidatif stres algılayıcısı olarak DJ1, reaktif oksijen türlerinin nigral hücrelerin sağ kalımı için zararlı etkilerine dikkat çekmektedir[15].

2.3.5. Parkinson Hastalığı ve Apoptoz

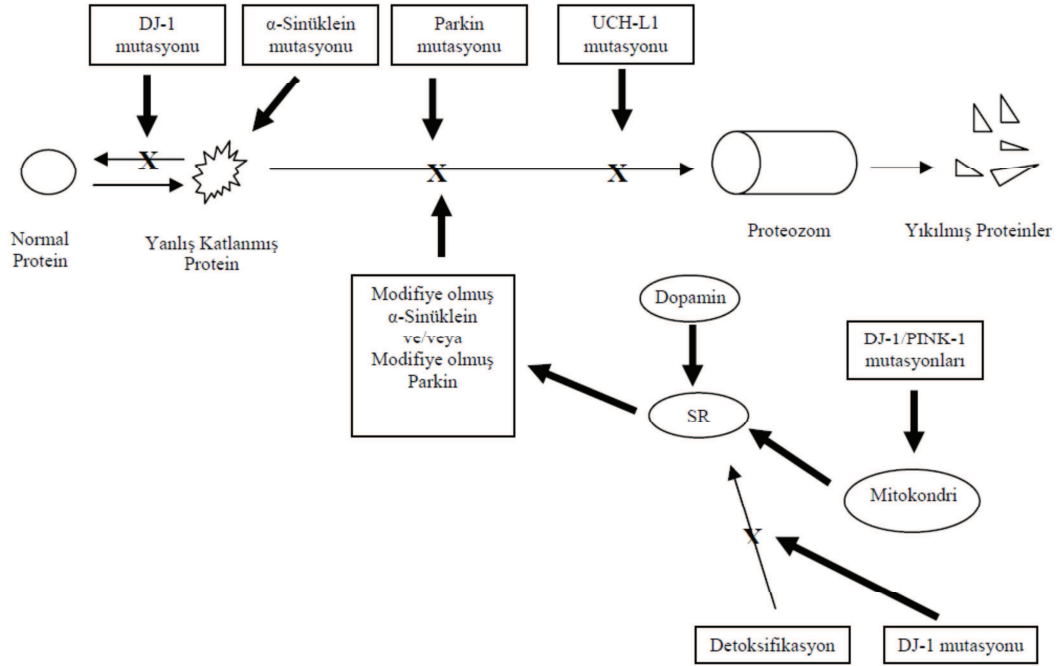
Son yıllardaki en önemli araştırma konularından biri PH'da dopaminerjik nöronların apoptozla mı yada nekrozla mı öldükleridir. Programlanmış hücre ölümü PH için iki yönden önemlidir. Birincisi hücre içi yapıtaşlarının bozunmasını ve en sonunda hücrenin fagositozunu indüklemek için spesifik moleküler yolaklar kullanılmaktadır. Bu moleküler yolaklar farmakolojik olarak hedef alınabilir. İkincisi, hücre ölümüne götüren çoklu patojenik süreçler için programlanmış hücre ölümü ortak sonlanım noktasıdır. Programlanmış hücre ölümünü gerçekleştirirmeden önce, dopaminerjik nöron birden bire dejenere olmaz, ancak belkide yıllar boyunca süren bazı aşamalardan geçer[15].

“Programlanmış hücre ölümü” demek olan apoptoz, PH’da substansiya nigra pars kompakta’daki dopaminerjik nöronların ölüm şeklidir. PH’lı hastaların beyin dokuları üzerinde yapılan çalışmalar kaspaz-1, kaspaz-3 ve TNF-R1 (tümör nekroz faktör-reseptör1) düzeylerinin Substantia Nigra’da, kontrol örneklerine göre arttığını göstermiştir. Her üç protein için PH beyinlerinin diğer bölgelerinde kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir[43].

PH’da görülen hücresel patoloji GGPH ile sporadik PH arasında patolojik açıdan büyük farklar olmadığını göstermiştir. Parkin’e bağlı ORPH istisna olarak kabul edilirse, geri kalan bütün olgulardaki ortak payda Lewy cisimciklerinin varlığıdır. Lewy cisimcikleri ubikütine edilmiş proteinler barındırmaktadır ki, bunların içinde α -sinüklein, sinfilin-1, nörofilament proteinleri mevcuttur. Bu da ilgili genlerde mutasyonlar olmadığı halde hemen hemen aynı proteinlerin agregat oluşturduğunu işaret etmektedir[44,51,52].

Bu aşamada GGPH’da görülen sorumlu genlerin kodladıkları proteinlerin işlevleri gözönüne alındığında proteozom sistemi ve mitokondrinin PH’da görülen moleküler patolojideki kilit rolleri netleşmektedir (Şekil 2.2). Özellikle parkin, UCH-L1 ve DJ-1 proteinlerinin ubikütün/proteozom sisteminde oynadıkları roller, bu proteinlerin işlevlerini yerine getirememesi, ya da yanlış yerine getirme durumunda hücrede protein yıkımının sekteye uğradığını, bunun sonucu olarak ortaya çıkan hücresel stresin de hücreyi apoptoza götürebildiğini göstermektedir[53,54].

Ayrıca, bir şekilde DNA’sı hasarlanmış (virüs etkisi veya çevresel nedenlerle) hücreler organizmanın zarar görmemesi için kendilerini öldürürler (“cell suicide”) ve bunu organizmanın yararı için yaparlar. Genotoksik ajanların etkisiyle yaratılan ağır DNA hasarına yanıt olarak p53’ün indüksiyonuyla da başlatılabilir. İndüklenen p53, bir pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyesi olan bax’ın indüksiyonuna yol açarak apoptozisi başlatır. p53 bax’ın indüksiyonu haricinde ayrıca Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin indüksiyonuna neden olarak da apoptozisi başlatabilir. Apoptozis ayrıca reaktif oksijen radikallerinin (oksidatif stres) hem mitokondri hem plazma membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilir[15].



Şekil 2.2. Parkinson Hastalığında görülen protein yolları

2.4. LENFOSİTLER

Tüm kan hücreleri gibi lenfositlerde gelişmekte olan fetusun kemik iliği yada karaciğerindeki pluripotent kök hücrelerden oluşur. Genç lenfositler birbirinin aynısıdır, fakat daha sonra gelişmelerini yaptıkları yere bağlı olarak T ya da B hücrelerine dönüşürler[55,56].

2.5. DNA YAPISI

DNA bir canlıya ait bütün bilgilerin şifrelendiği moleküldür. Genomumuzu oluşturan DNA molekülünün yapısı, 1953 yılında James Watson ve Francis Crick tarafından açıklanmıştır. DNA molekülü, beş karbonlu bir şeker (deoksiriboz), fosfat grubu ve azotça zengin purin (A: adenin, G:guanin) ve primidin (T: Timin, C:Sitozin) bazlarından oluşan polimerik bir nükleik asit makromolekülüdür.

Hücre bölünmesi sırasında DNA molekülü kendini eşleyerek kalıtsal bilgiyi çoğaltır ve bunları yeni oluşan hücrelere aktarır. DNA molekülü birbiri ile sarmal yapan iki zincirden oluşmuştur.

Karşılıklı gelen adenin ve timin arasında iki hidrojen bağı, sitozin ve guanin arasında üç zayıf hidrojen bağı bulunur. DNA molekülleri 5' ucundan 3' ucuna doğru şeker fosfat omurgasından oluşan iki zincirin birbiri eksenine etrafında birbirlerine antiparalel olarak sarılması ile meydana gelen çift sarmal yapıdadır, bu yapıya "double helix" yapısı denir. Bir DNA zincirindeki adenin (A) nukleotidi (bazı) diğer zincirdeki timin (T) bazı ile, guanin (G) bazı ise, diğer zincirdeki sitozin (C) bazı ile baz çifti oluşturur. Her bir zinciri oluşturan nukleotitler deoksiriboz ve fosfat grupları arasında kurulan fosfodiester bağları ile birbirine bağlanır. DNA zinciri normal fizyolojik şartlardaki hücrelerde çoğunlukla sağa doğru dönümlü B-DNA formunda, nadir olarak sola doğru dönümlü Z-DNA formunda bulunur[57].

2.6. KROMOZOM YAPISI

Genetik materyalin varlığı ilk kez 1869 yılında Friedrich Miescher tarafından iltihaptaki akyuvarlarda saptanmıştır. 1944 yılında Avery ve diğ. [50] tarafından DNA'nın kalıttan sorumlu materyal olduğu belirlenmiş, 1953 yılında ise Watson ve Crick adlı araştırmacılar çift sarmallı DNA yapısını ortaya koymuşlardır [51].

Kromatin organizasyonunda ilk aşama nukleozom oluşumudur. Nukleozom ikişer adet H2A, H2B, H3 ve H4 histon ve bir adet H1 histon proteininden oluşan 200 baz çifti uzunluğunda DNA'nın paketlenmiş bir yapısıdır. DNA'nın 145 baz çiftlik kısmı sekiz proteinden oluşan iç bölge etrafında yaklaşık 1,75 bir dönüm yapar. Hücre bölünmesi başladığında kromozomların oluşumu sırasında bu iplik yapısının daha da yoğunlaşması gerekir. Kromatin iplikçikler histon olmayan proteinlerin ve RNA moleküllerinin yardımıyla ilmekler yaparak bir protein iskelete tutunmuş olarak yoğunlaşmaya devam ederler[50,51].

Kromozomlar sentez fazı (S fazı) sırasında replike olurlar. Replikasyon sırasında tüm DNA molekülleri açılmaktadır. Bu DNA molekülleri metafaz kromozomları ile karşılaştırıldığında veya interfaz kromatinin fibrilli yapısı ile karşılaştırıldığında çok büyüktürler. Bu yüzden DNA molekülleri, hem interfaz hem de S evrelerinde çok büyük boyutları nedeni ile mutasyonlara neden olan fiziksel ve kimyasal ajanların açık hedefleridir. Oluşacak olan DNA hasarı sonucunda mikroskopta görülebilen yapısal kromozom aberasyonları oluşur[51].

2.7. KROMOZOM HASARLARI

Kromozomların sayısı ve yapısındaki değişimlere kromozom aberasyonları (KA) denir. Kromatid kırık, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, halka kromozom, kardeş kromatid birleşmesi, translokasyon, inversiyon, izokromozomlar yapısal kromozom aberasyonlarıdır. Bazı araştırmacılar tarafından KA olarak kabuledilemeyen ancak yine de bir anormallik sonucu oluşan yapısal bozukluklar ise gap, spiral çözülmesi, kromozom kontraksiyonudur.

İlk defa 1918 yılında de Vries *Oenothera*'da translokasyon tipi anormalliklerin varlığını saptayarak, kromozom yapısında değişikliklerin meydana gelebildiğini göstermiştir. Morgan 1922'de ve Bridges 1923'te *Drosophila*'da translokasyon ve inversiyon tipi anormalliklerin olduğunu gözlemişlerdir. Delesyon, duplikasyon, inversiyon, translokasyon gibi kararlı aberasyonların *Drosophila* tükrük bezi kromozomlarında ve mısır pakiten kromozomlarında kendiliğinden oluştuğu gösterilmiştir. Disentrik ve halka oluşumu gibi kararsız aberasyonların McClintock'un 1942'de mısırdaki yaptığı çalışmalar sonucunda, genetik materyalin kırılması, birleşmesi, köprü oluşumu sonucu meydana geldiği saptanmıştır. KA'ları organizmaların evriminde rol oynamaktadır[52].

Yapısal kromozom aberasyonları, aberasyonun kromozomun bir kromatidinde veya her iki kromatidinde görülmesine bağlı olarak iki gruba ayrılır. Eğer aberasyon tek bir kromatidde görülüyorsa buna "kromatid tipi aberasyon", her iki kromatidinde de görülüyorsa "kromozom tip aberasyon" denir. Bu aberasyon tipleri mutajen uygulamasının yapıldığı hücre siklusu safhasına ve kullanılan mutajenik ajanın tipine bağlıdır[53,54].

2.7.1. Kromozom Tipi Aberasyonlar

G0 ve G1 fazındaki iyonizan radyasyonlara maruz kalmış hücrelerin kültüre edilmesi sonucu metafaz evresinde görülen disentrik, halka şeklinde ve asentrik kromozomlar gibi hasarlar, kromozom tipi hasarlar olarak adlandırılırlar.

İnsanda dolaşan kan lenfositleri genellikle G0 veya G1 fazında olan hücrelerden oluştuğu için iyonizan radyasyonların bu hücrelerde meydana getirdiği hasarlar kromozom tipi olmaktadır. Daha açık bir ifade ile, kromozomun bir yerinde oluşan

hasar kromozomun her iki kolunda birden meydana gelen hasar sonucunda oluşmaktadır.

2.7.2. Kromatid Tipi Hasarlar

İyonizan radyasyonlar, kimyasallar ve U.V. ışınlarından farklı olarak hücre hangi fazda olursa olsun hasar meydana getirirler. Oluşan hasar hücrenin içinde bulunduğu faza göre değişir. Hücre G₀ /G₁ fazında ise kromozom tipi hasarlar G₂/S fazında ise kromatid tip hasarlar meydana gelir. Kimyasallar ve UV radyasyonu ise faza bağlı olmaksızın kromatid tip hasar meydana getirirler. G₀ /G₁ fazında iyonizan radyasyona maruz kalmış hücrelerde kromatid tip aberasyon görülüyorsa bunun sebebi bu hasarın radyasyon sebebi ile oluşmadığı veya hücrenin kültür ortamında birden fazla bölünme geçirmiş olmasıdır[52,53,54].

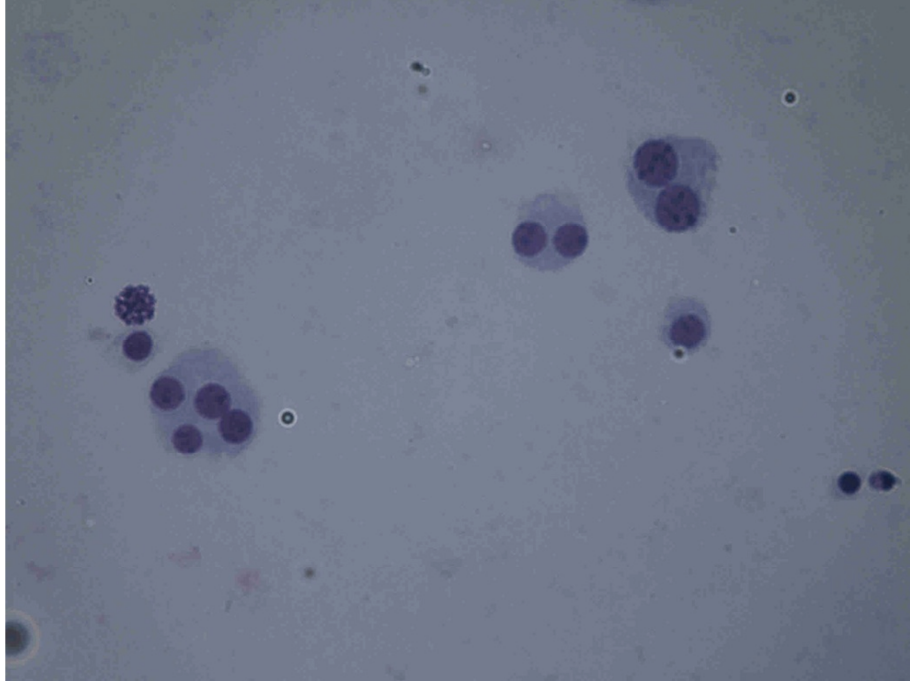
Kromatid Tipi Hasarları;

1. Terminal (uç) ve intersisyel (ara) delesyonlar
2. Akromatid lezyonlar (gap)
3. İzokromatid lezyonlar
4. İki kromozomun kromatidleri arasındaki asimetric değişimler (interchange)
5. İki kromozomun kromatidleri arasındaki simetric değişimler (interchange)
6. Simetric ve asimetric iç değişimler (intrachange)
7. Triradialler (Üç kollu konfigürasyonlar) şeklinde gözlenmektedir [51].

2.8. MİKRONÜKLEUS OLUŞUMU

MN'lar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentric kromozom fragmentlerinden köken alan oluşumlardır. Bu durumda bu parça mikronukleus adını alır ve interfazda kolayca görülebilir. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. MN'lar ya klastojenlerin neden olduğu kromozom kırığı sonucu asentric kromozom

fragmentlerinden, ya da aneujenlerin neden olduğu sentromer bölünme hataları ve iğ ipliği fonksiyon bozukluğu sonucu anafaz sırasında geri kalan tam bir kromozomdan oluşurlar [55,56,57]. Mikronükleuslar sitoplazma içinde, ana nükleusun dışında olmakla birlikte, nükleusun şekil, yapı ve boyanma özelliklerini aynen taşıyan, küçük küresel yapılar olarak tanımlanmaktadır[58,59]. Şekil 2.3'te MN analiz tekniği kullanılarak hazırlanmış bir preparat üzerinde, ışık mikroskobunda ve 250 büyütmede, görülmesi muhtemel hücre şekilleri şematik olarak verilmiştir.



Şekil 2.3. Mikronükleus ve binükleatın mikroskobik görünümü

MN'lar ilk kez 1 yy kadar önce Howell tarafından eritrosit sitoplazmasında görülmüş ve bu yapılara “nükleer materyal fragmenti” denmiştir. Bunlar 1900'lü yılların başlarında Jolly terminolojisinde “intraglobuler korpüsküller” olarak tanımlanmıştır[59]. Bu yapılar “Howell-Jolly cisimcikleri” olarak bilinir. Benzer yapılar 1937'de Brenneke tarafından fare, sıçan embriyolarında ve 1951'de Thoday tarafından Vicia faba'da da görülmüştür[60]. Bunlara “fragment nükleuslar” veya “mikronükleuslar” denmiştir. Evans vd. 1959'da Vicia faba kök uçlarında MN'ları radyasyona maruz kalan hücrelerde gördüklerini, asentrik fragmentlerden orjinlendiklerini ve mitozun son safhasında iki yavru nükleustan ayrılarak oluştuklarını bildirmişlerdir. Vicia faba kök

uçlarında nötron ve gama ışınlarının etkisini karşılaştırdıkları çalışmada, sitogenetik hasarın belirteci olarak MN'ların kullanılabilirliğini tespit etmişlerdir[60].

İlk kez MN test yöntemini öneren Boller ve Schmid 1970'te ve Heddle 1973'te ajanların genotoksik potansiyellerini ölçmek için kemik iliği eritrositlerinde MN'u test yöntemi olarak kullanmışlardır[60,61]. Daha sonra 1980'de MacGregor vd. tarafından bu metod periferik kanda dolaşan polikromatik eritrositlerde denenmiş ve en az kemik iliği metodundaki kadar hassas olduğu gözlenmiştir. Bu metod hayvanları öldürmeden fazla sayıda örnek alınmasına olanak verdiği için daha avantajlı sayılmıştır[61].

Countryman ve Heddle 1976 yılında yaptıkları çalışmada, lenfositlerde MN oluşumunu belirleyerek, kromozom hasarının meydana çıkarılmasında diğer bir uygulanabilir hücresel sistem ileri sürmüşlerdir[62]. Von Ledebur ve Schmid 1973'te, Högstädt ve Karlsson 1985'te geliştirdikleri modifiye metodlarla, aneuploidiye yol açan ajanlar ile klastojenleri birbirinden ayırmada, MN büyüklük farkından yararlanmışlar; klastojenlerce uyarılan MN'ların asentrik kromozom fragmentleri içeren küçük, aneujenlerce uyarılan MN'ların tam kromozomlar içerdiğini ve daha büyük ebatlı olduğunu göstermişlerdir[61,62].

1985 ve 1986 yıllarında Fenech ve Morley tarafından Sitokinezi-Blok (Cytokinesis-Block) metodu geliştirilmiştir[63]. MN araştırmalarında in situ hibridizasyon (ISH) tekniği, ilk defa kromozomların sentromerini tanımlamak için Norppa vd. tarafından 1993'te uygulanmıştır. Daha sonra Richard vd. 1994'te floresan insitu hibridizasyon (FISH) tekniği ile MN oluşturan kromozomların her birinin kimliğini belirleyebilecek teknolojik gelişmeler sağlamışlardır. Sentromerik problu floresan in situ hibridizasyon metodu, aneuploidiyi indükleyen bileşiklerin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır[64].

2.9. MİKRONÜKLEUS TESTİ YÖNTEMİ VE UYGULAMA AMACI

MN yönteminin geliştirilmesinde en önemli adım, MN oluşumuna izin veren, bir çekirdek bölünmesini tamamlamış hücrelerin sayılmasının esas alınmasıdır [63]. Sitokinezi-blok mikronukleus metodunu geliştiren Fenech ve Morley (1985, 1986)

hücre kültürüne mitoz sırasında sitoplazma bölünmesini durduran aktin inhibitörü cytochalasin-B (Cyt-B) ilave ederek çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler elde etmişlerdir[60,63]. İncelenen alanda kültür süresi içinde ikinci bölünmesini tamamlamış 4 çekirdekli hücelere de rastlanmaktadır; ancak MN sayımında Heddle ve Countryman'ın (1976) kriterleri kullanıldığından bu hücrelerde görülen MN'lar değerlendirme dışı bırakılmaktadır.

Heddle ve Countryman'ın (1976) kriterlerine göre:

- 1- MN esas nükleus ile aynı yapıda olmalıdır.
- 2- MN esas nükleustan küçük olmalıdır.
- 3- MN esas nükleustan ayrı, yuvarlak veya yaklaşık yuvarlak şekilli olmalıdır.
- 4- Nükleer olmayan partiküllerden farklı olarak ışığı yansıtmemelidir.
- 5- MN feulgen pozitif veya diğer DNA'ya özel reaksiyonlarda pozitif reaksiyon göstermelidir.
- 6- MN'lar sitoplazması iyi gözlenen hücrelerde sayılmalıdır.
- 7- MN oluşumu doza bağlı olmalıdır.

Sitokinezi-blok Mikronükleus (CBMN) tekniği in vitro genotoksisite testleri, insan popülasyon taramasında kolayca uygulanabilecek bir tekniktir[63].

MN tekniği, en çok çeşitli kimyasallara ve fiziksel ajanlara maruz kalmış bireylerin taraması amacı ile, bireyler arasında genetik hasarın temel seviyesini anlamak ve çeşitli ajanların klastojenik ve aneujenik potansiyellerini değerlendirmek amacı ile insan lenfositlerini de içeren farklı tip hücrelerde geniş çapta kullanılmaktadır[63].

2.10. MİKRONÜKLEUS TESTİNİN AVANTAJLARI

MN test yöntemini sitogenetik anormallikleri belirlemede etkili bir metod yapan, farklı hücre tiplerinde in vitro şartlarda yaygın uygulanabilirliği ve sayım kolaylığıdır. Ayrıca

elde edilen verilerin çok sayıda olması istatistiksel dayanağının güçlü olmasını sağlar. Fenech 1997’de, Kirsch-Volders 1997’de, Eastmond ve Tucker 1989’de MN test yönteminde kinetikor veya sentromeri belirleyen metodlar kullanarak; kromozom kırığı nedenli MN ile kromozom geri kalması nedenli MN’ ları birbirinden ayırmanın kolay olduğunu belirtmişlerdir[63]. İmmünokimyasal işaretleme metodları ile CBMN test yöntemi, MN oluşumundan sorumlu esas mekanizmanın anlaşılmasını sağlar. Çift iplik DNA kırıkları, asentrik fragmentli MN oluşumuna ve mitotik iplikteki hata, tam kromozomlu MN oluşumuna neden olmaktadır [60]. Kirsch-Volders vd. (1997) ile Fenech vd. (1997) yaptıkları çalışmaların sonuçlarına göre, bu yöntem klastojenik ve aneujenik etkileri birbirinden ayırabilmekte ve Elhajouji vd.’nin (1997) yılı çalışma sonuçlarına göre de ayrıca, doz-cevap eğrisi, tam kromozom ve kromozom ayrılmaması sonuçlarına uygulanabilmektedir [60]. Bundan dolayı in vitro MN test yöntemi bilimsel olarak yeterli ve güçlü kabul edilmektedir [60,62].

MALZEME VE YÖNTEM

3.1. DENEY GRUBU

Bu çalışmaya 40-80 yaş aralığında olan 60 kişi katılmıştır. Hasta grubu için parkinson hastalığı teşhisi konmuş 30 hastadan, kontrol grubu için 30 sağlıklı bireyden kan alınmıştır. Bireylerden alınan kan 5 ml'lik lityum-heparinli ve vakumlu 2 adet steril tübe konulmuştur.

Çalışma İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 05.01.2011 tarih 62 sayılı kararı ile yapılmıştır.

3.2. KAN ÖRNEKLERİNİN ELDE EDİLMESİ VE KÜLTÜRE ALINMASI

Hasta ve sağlıklı bireylerden alınan kanların 0,5ml'si, phytohemagglutinin (PHA, 20 µg/ml), 4 ml besiyeri (RPMI-1640 medyum) ve 0,5 ml Newborne Calf Serum ile kültür şişeleri içine ekilerek 37°C' de inkübasyona bırakılmıştır. Hidrojen peroksit uygulanan gruplar için hücreler kültüre konulmadan önce 0,20 ml hidrojen peroksit ekleyerek muamele edilmiş ve daha sonra kültüre konulmuştur. Phytohemagglutinin, *Phaseolusvulgaris* (fasülye) bitkisinden elde edilen bir proteindir ve G0 fazında bulunan T lenfositlerini sitimüle ederek hücre siklusunda ilerlemelerini aktive etmektedir.

İnkübasyonun 44. saatinde kültür ortamına 0.20 ml cytochalsin-B (Sigma;USA) eklenecek hücreler 28 saat daha inkübasyonda tutulduktan sonra toplam 72 saatlik kültür süresini tamamlayan hücreler 200g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Cytochalsin-B hücrelerin sitokineзде durdurulması için kullanılmaktadır. Dibe çöken kısma 0.075 M KCI çözeltisi ilave edilerek, hücreler tekrar 200g'de 10 dk. santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve çöken kısma 7:1 oranında metanol:asetik asit karışımı ilave edilerek tekrar santrifüj edilmiştir. Bu işlem toplamda üç defa tekrarlandıktan sonra hücreler -20°C de bekletilen lamalar üzerine pasteur pipeti ile damlatılarak binükleat

hücreler elde edilmiştir. Kurutulan lamalar %5 lik Giemsa boyası ile 10 dk. boyanıp lamel ile kapatılmış ve ışık mikroskobunda incelenmek üzere hazır hale getirilmiştir.

3.3. PREPARATLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Giemsa ile boyanan preparatlar X400 büyütme ile mikroskopta incelenmiştir. Preparatlarda mikronükleus içeren ve içermeyen hücreler sayılarak mikronükleus frekansları, 1'li, 2'li, 3'lü ve 4'lü çekirdekten oluşan hücrelerin tespit edilmesi ile de proliferatif indeksler her bir birey için tespit edilmiştir. Mikronükleusların doğruluğu X1000 büyütme ile kesinleştirilmiştir.

Binükleat hücrelerin değerlendirilmesinde de şu kriterler kullanılmıştır [67,68,69];

1. Binükleat hücredeki iki nükleus intakt nükleer membrana sahip olmalıdır ve aynı sitoplazmik sınırlar içinde bulunmalıdır.
2. Binükleat hücredeki iki nükleus yaklaşık olarak eşit büyüklükte, eşit boyama yoğunluğu ve eşit boyama oranında olmalıdır.
3. Binükleat hücredeki iki nükleus, büyük nükleusun çapının 4'te birinden geniş olmamak şartı ile çok ince bir nükleoplazmik köprü ile bağlanabilir.
4. Binükleat hücredeki iki ana nükleus birbirine dokunabilir ama üstü üste binemezler. Üst üste gelen iki nükleuslu bir hücre, her bir nükleusun nükleer sınırları ayırt edilebilir olduğu sürece skorlanabilir.
5. Binükleat hücrenin sitoplazmik sınırı veya membranı intakt olmalı ve açık şekilde bitişik hücrelerin sitoplazmik sınırlarından ayırt edilebilir olmalıdır.

MN skorlamasında ise aşağıdaki kriterlere uyulmuştur:

1. İnsan lenfositlerinde MN' nin çapı ana nükleusun çapının 1/16 ile 1/3'ü aralığında olmalıdır. Bu da sırasıyla, BN hücredeki ana nükleusundan birinin alanının 1/256 ve 1/9'u ile uyumludur.
2. MN' ler yuvarlak ve oval şekilde olmalıdır.

3. MN' ler ışığı kırmazlar ve bu nedenle boya partükülleri gibi artefaktlardan kolayca ayırt edilebilirler.
4. MN' ler ana nükleusa bağlı olmamalıdır.
5. MN, ana nükleusa dokunabilir ama üst üste gelmemeli ve mikronükleer sınırlar nükleer sınırlardan ayırt edilebilir olmalıdır.
6. MN genellikle ana nükleus ile aynı boya yoğunluğuna sahip olmalıdır, fakat bazen daha şiddetli de olabilir [69].

3.4. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

Hasta ve kontrol gruplarındaki her bir bireyin lenfositlerindeki spontan ve hidrojen peroksit (H₂O₂) stresi sonrası meydana gelen MN frekansları eşleştirilmiş (paired) t-test ile karşılaştırılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalar için ise eşleştirilmemiş (unpaired) t-test kullanılmıştır. Spontan ve mutlak MN frekansları ile proliferatif indekslerin Parkinson hastalığı üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir.

BULGULAR

4.1. HASTA GRUBUNA AİT PERİFERİK KAN LENFOSİTLERİ KÜLTÜR SONUÇLARI

Bu tez çalışmasında 43-80 yaş aralığında, yaş ortalaması 66 olan 10 kadın ve 20 erkek ile olmak üzere 30 kişilik hasta grubu ile çalışılmıştır. Hasta grubunu yeni veya en fazla 2 yıl öncesinde Parkinson teşhisi konmuş bireyler oluşturmaktadır. Bu gruptaki bireyler hastalık seviyelerine göre farklı ilaçlar kullanmaktadır.

Hasta grubunun spontan MN dağılımları, MN frekansları ve proliferatif indeksler Tablo.4.1'de gösterilmektedir. Tabloda verilen toplam hücre (N), binükleatlarla beraber sayılan bir (M1), iki (M2), üç (M3), ve dört (M4) nükleatlı hücrelerin toplam sayısını göstermektedir. Hasta grubuna ait MN oluşum frekansları 0.019 ± 0.007 (standart sapma) ortalama ile 0.007 ve 0.035 aralığında dağılmaktadır.

Tablo.4.1 Parkinson hastaların lenfositlerindeki spontan olarak skorlanan deney sonuçları.

Hasta	Cinsiyet	Yaş	BN	MN	MN dağılımı					M1	M2	M3	M4	MN/BN	Pİ
					1MN	2MN	3MN	4MN	5MN						
1	Erkek	43	1009	19	19	0	0	0	0	1478	0	57	46	0,019	1,160
2	Erkek	45	1013	13	9	2	0	0	0	1148	0	39	32	0,013	1,143
3	Erkek	49	1020	20	20	0	0	0	0	1298	0	50	48	0,02	1,175
4	Erkek	53	1011	18	10	4	0	0	0	1349	0	114	123	0,018	1,376
5	Erkek	58	1024	13	9	2	0	0	0	798	56	187	166	0,013	1,769
6	Kadın	59	1012	35	29	3	0	0	0	1469	0	104	97	0,035	1,299
7	Erkek	60	1013	17	13	2	0	0	0	1445	0	176	178	0,017	1,492
8	Kadın	61	1045	18	15	1	1	0	0	1132	0	29	17	0,017	1,093

9	Kadın	63	1006	16	16	0	0	0	0	1547	0	152	148	0,016	1,405
10	Erkek	65	1012	35	29	3	0	0	0	1648	6	33	30	0,035	1,094
11	Erkek	65	1009	23	19	2	0	0	0	2562	0	105	86	0,023	1,17
12	Kadın	65	1000	16	13	0	1	0	0	1986	0	96	45	0,016	1,154
13	Kadın	65	1004	17	15	1	0	0	0	1141	12	96	93	0,017	1,36
14	Kadın	66	1000	28	25	0	1	0	0	1834	0	28	19	0,028	1,06
15	Erkek	67	1001	16	13	0	1	0	0	1359	0	82	56	0,016	1,222
16	Erkek	67	1015	17	15	1	0	0	0	2015	0	102	43	0,017	1,154
17	Erkek	68	1011	18	18	0	0	0	0	2056	5	76	76	0,018	1,174
18	Erkek	68	1009	19	19	0	0	0	0	1331	0	120	133	0,019	1,403
19	Erkek	68	1011	9	9	0	0	0	0	1760	0	55	55	0,009	1,147
20	Kadın	69	1009	20	11	3	1	0	0	1814	0	75	83	0,02	1,202
21	Erkek	70	1011	29	20	3	1	0	0	454	0	150	137	0,029	1,96
22	Erkek	71	1007	30	26	2	0	0	0	1478	0	49	38	0,03	1,135
23	Erkek	71	1006	25	22	0	1	0	0	1853	0	103	69	0,025	1,204
24	Erkek	72	1002	10	10	0	0	0	0	1112	0	23	15	0,01	1,079
25	Erkek	72	1003	15	10	1	1	0	0	1102	10	78	70	0,015	1,298
26	Erkek	75	1013	17	13	2	0	0	0	1578	0	76	52	0,017	1,181
27	Kadın	77	1015	18	13	1	1	0	0	1202	0	83	62	0,018	1,261
28	Kadın	78	1010	7	5	1	0	0	0	2149	0	204	211	0,007	1,406
29	Erkek	79	1006	16	10	3	0	0	0	1207	0	120	64	0,016	1,311
30	Kadın	80	1017	14	12	2	0	0	0	1923	0	102	74	0,014	1,203

BN; binükleat hücre, MN; mikronükleus, M1; 1 nükleuslu hücre, M2; 2 nükleuslu hücre, M3; 3 nükleuslu hücre, M4; 4 nükleuslu hücre, Pİ; proliferatif indeks.

Ayrıca birli (M1), ikili (M2), üçlü (M3) ve dördlü (M4) nükleuslara sahip olan hücreler dikkate alınarak proliferatif indeks her bir birey için hesaplanmıştır. Proliferatif indeks;

$P\bar{I}=M1+2M2+3M3+4M4/(M1+M2+M3+M4)$ şeklinde formüle edilmektedir. Hasta grubuna ait spontan proliferatif indeksler 1.270 ± 0.199 ortalama ile 1.060 ve 1.960 aralığındadır.

Tablo 4.2’de hasta grubuna ait in vitro hidrojen peroksit (H_2O_2) uygulaması sonucu elde edilen deney sonuçları verilmektedir. H_2O_2 uygulaması sonucu oluşan MN oluşum frekansları 0.014 ± 0.005 (ortalama \pm standart sapma) ortalama ile 0.005 ve 0.024 aralığında dağılım göstermektedir.

Tablo.4.2 Parkinson hastalarına ait lenfositlerdeki in vitro H_2O_2 uygulaması sonucu skorlanan deney sonuçları

Hasta	Cinsiyet	Yaş	BN	MN	MN dağılımı					M1	M2	M3	M4	MN/BN	Pİ
					1MN	2MN	3MN	4MN	5MN						
1	Erkek	43	1000	8	8	0	0	0	0	1411	0	46	47	0,008	1,155
2	Erkek	43	1010	6	6	0	0	0	0	1423	2	56	43	0,006	1,16
3	Erkek	49	1007	15	11	2	0	0	0	1364	0	63	78	0,015	1,24
4	Erkek	53	1013	7	7	0	0	0	0	1189	0	82	56	0,007	1,25
5	Erkek	58	1023	13	10	0	1	0	0	999	3	96	83	0,013	1,376
6	Kadın	59	1008	12	8	0	0	1	0	1078	0	80	98	0,012	1,361
7	Erkek	60	1002	18	11	2	1	0	0	758	0	100	73	0,018	1,45
8	Kadın	61	1004	11	7	2	0	0	0	851	3	17	7	0,011	1,066
9	Kadın	63	1018	17	11	3	0	0	0	1352	5	284	225	0,017	1,669
10	Kadın	65	1009	23	15	4	0	0	0	1129	7	106	92	0,023	1,371
11	Erkek	65	1007	10	10	0	0	0	0	1531	2	35	28	0,01	1,098
12	Erkek	65	1005	20	15	1	1	0	0	1890	0	124	100	0,02	1,26
13	Kadın	65	1007	8	6	1	0	0	0	1080	7	67	69	0,008	1,285
14	Kadın	66	1017	5	5	0	0	0	0	2047	0	8	8	0,005	1,019
15	Erkek	67	1004	13	10	0	1	0	0	1325	2	59	40	0,013	1,168

16	Erkek	67	1023	15	13	2	0	0	0	1472	6	75	45	0,015	1,182
17	Erkek	68	1002	10	5	1	1	0	0	1730	0	19	18	0,01	1,052
18	Erkek	68	1026	10	8	1	0	0	0	1735	0	56	48	0,01	1,139
19	Erkek	68	1008	16	11	1	1	0	0	1865	3	86	53	0,016	1,166
20	Kadın	69	1002	16	9	2	0	0	0	1730	0	23	32	0,016	1,08
21	Erkek	70	1001	20	12	4	0	0	0	1384	0	21	17	0,02	1,065
22	Erkek	71	1005	14	12	1	0	0	0	1635	0	25	45	0,014	1,108
23	Erkek	71	1025	13	10	0	1	0	0	1745	0	103	95	0,013	1,253
24	Erkek	72	1000	23	17	0	2	0	0	1370	16	36	31	0,023	1,125
25	Erkek	72	1023	17	15	1	0	0	0	1167	4	58	69	0,017	1,252
26	Erkek	75	1006	15	12	0	1	0	0	1490	0	89	54	0,015	1,208
27	Kadın	77	1008	10	8	1	0	0	0	1236	0	53	69	0,01	1,23
28	Kadın	78	1006	13	7	3	0	0	0	668	0	173	163	0,013	1,832
29	Erkek	79	1010	15	7	1	2	0	0	707	0	78	116	0,015	1,559
30	Kadın	80	1013	24	17	2	1	0	0	1845	0	105	86	0,024	1,23

BN; binükleat hücre, MN; mikronükleus, M1; 1 nükleuslu hücre, M2; 2 nükleuslu hücre, M3; 3 nükleuslu hücre, M4; 4 nükleuslu hücre, Pİ; proliferatif indeks.

Hasta grubunun spontan mikronükleus sıklıkları ile H₂O₂ tedavisi sonrası elde edilen MN sıklıkları eşleştirilmiş t-testi ile karşılaştırıldığında (Tablo 4.5) aradaki fark anlamlı bulunmuştur (p<0.01).

H₂O₂ uygulanan hasta grubuna ait proliferatif indeksler ise 1.247 ortalama ile 1.019 ve 1.832 aralığında (Tablo 4.2) dağılım göstermektedir. Eşleştirilmiş t- testi ile bu gruba ait değerler karşılaştırıldığında (Tablo 4.4) ise fark bulunmamıştır (p=0.648).

4.2. KONTROL GRUBUNDAN ELDE EDİLEN BULGULAR

Çalışmamızın kontrol grubunu, hasta grubuna uygun cinsiyet ve 42 - 80 yaşları arasındaki sağlıklı 30 birey oluşturmaktadır. Tablo 4.3’de kontrol grubuna ait spontan MN oluşum frekansları ve Pİ değerleri bulunmaktadır.

Tablo 4.3.Sağlıklı gruba ait lenfositlerdeki spontan olarak skorlanan deney sonuçları

Hasta	Cinsiyet	Yaş	BN	MN	MN dağılımı					M1	M2	M3	M4	MN/BN	Pİ
					1MN	2MN	3MN	4MN	5MN						
1	Erkek	42	1000	15	9	3	0	0	0	1378	5	68	75	0,015	1,24
2	Erkek	43	1003	18	7	4	1	0	0	1523	0	85	55	0,018	1,201
3	Erkek	49	1003	21	14	2	1	0	0	1396	0	99	86	0,021	1,288
4	Erkek	53	1005	13	9	2	0	0	0	2036	0	82	68	0,013	1,168
5	Kadın	54	1011	17	7	5	0	0	0	1486	0	96	86	0,017	1,27
6	Erkek	58	1015	20	15	1	1	0	0	1069	3	86	47	0,02	1,262
7	Bayan	59	1002	13	9	2	0	0	0	1058	3	58	35	0,013	1,194
8	Erkek	60	1023	36	22	7	0	0	0	995	0	59	38	0,035	1,212
9	Kadın	60	1014	19	10	2	1	0	0	1258	0	47	58	0,019	1,197
10	Kadın	63	1018	15	8	2	1	0	0	1358	3	158	195	0,015	1,527
11	Kadın	65	1023	23	19	2	0	0	0	1625	7	106	55	0,022	1,214
12	Erkek	65	1004	26	14	6	0	0	0	1358	2	35	36	0,026	1,126
13	Erkek	66	1013	24	14	5	0	0	0	13368	0	115	108	0,024	1,041
14	Erkek	67	1001	15	9	3	0	0	0	1396	0	58	36	0,015	1,15
15	Erkek	68	1002	25	10	2	1	0	0	2583	0	125	112	0,025	1,208
16	Erkek	68	1014	14	8	3	0	0	0	14568	0	19	10	0,014	1,005
17	Erkek	68	1025	12	6	3	0	0	0	1236	0	56	48	0,012	1,191
18	Kadın	69	1011	15	7	4	0	0	0	18532	0	23	45	0,015	1,01

19	Kadın	69	1006	25	10	6	0	1	0	2058	0	88	48	0,025	1,146
20	Erkek	70	1012	25	12	5	1	0	0	1235	0	21	11	0,025	1,059
21	Erkek	71	1012	24	14	5	0	0	0	1985	0	25	45	0,024	1,09
22	Erkek	71	1017	15	9	3	0	0	0	1789	0	96	85	0,015	1,227
23	Erkek	72	1002	36	23	5	1	0	0	1658	16	36	48	0,036	1,132
24	Erkek	72	1000	36	15	5	1	2	0	1039	0	96	56	0,036	1,302
25	Erkek	73	1007	16	10	3	0	0	0	1742	0	96	65	0,016	1,203
26	Erkek	75	1000	14	7	2	1	0	0	1490	0	89	53	0,014	1,206
27	Kadın	76	1000	20	8	6	0	0	0	1378	0	78	69	0,02	1,238
28	Kadın	78	1009	27	18	3	1	0	0	2058	0	85	63	0,027	1,163
29	Kadın	78	1000	18	12	3	0	0	0	1475	0	153	105	0,018	1,358
30	Erkek	78	1008	35	24	3	1	0	0	997	0	78	356	0,035	1,855

BN; binükleat hücre, MN; mikronükleus, M1; 1 nükleuslu hücre, M2; 2 nükleuslu hücre, M3; 3 nükleuslu hücre, M4; 4 nükleuslu hücre, Pİ; proliferatif indeks.

Tablo 4.3 de verilen sağlıklı gruba ait spontan MN oluşum frekansları 0.021 ± 0.007 ortalama ile 0.012 ve 0.036 aralığında dağılım göstermektedir. Proliferatif indeksler ise 1.216 ± 0.159 ortalama ile 1.010 ve 1.855 aralığında değişmektedir.

Tablo 4.4'te kontrol grubuna ait *in vitro* H₂O₂ uygulaması sonucu skorlanan MN frekansları ve proliferatif indeks sonuçları verilmektedir. MN oluşum frekansları 0.021 ± 0.006 ortalama ile 0.01 ve 0.033 aralığında bulunmaktadır. Proliferatif indeksler 1.194 ± 0.063 ortalama ile 1.061 ve 1.315 aralığında bulunmaktadır.

Tablo 4.4: Sağlıklı gruba ait lenfositlerdeki *in vitro* H₂O₂ uygulaması sonucu skorlanan deney sonuçları

Hasta	Cinsiyet	Yaş	BN	MN	MN dağılımı					M1	M2	M3	M4	MN/BN	Pİ
					1MN	2MN	3MN	4MN	5MN						
1	Bay	42	1024	12	6	3	0	0	0	1236	0	53	52	0,012	1,195
2	Bay	43	1005	20	7	5	1	0	0	1369	0	45	40	0,02	1,144
3	Bay	49	1025	11	5	3	0	0	0	1852	0	75	63	0,011	1,17
4	Bay	53	1004	22	14	4	0	0	0	2302	0	76	68	0,022	1,146
5	Bayan	54	1000	12	8	2	0	0	0	1472	0	48	40	0,012	1,138
6	Bay	58	1023	28	13	6	1	0	0	1254	3	96	86	0,027	1,315
7	Bayan	59	1025	30	16	7	0	0	0	1368	5	68	65	0,029	1,223
8	Bay	60	1003	19	15	2	0	0	0	1000	0	35	32	0,019	1,156
9	Bayan	60	1008	28	12	8	0	1	0	1472	0	89	85	0,028	1,263
10	Bayan	63	1003	27	14	5	1	0	0	1789	3	75	124	0,027	1,264
11	Bayan	65	1002	16	10	3	0	0	0	2147	5	76	98	0,016	1,194
12	Bay	65	1000	19	13	3	0	0	0	1235	2	71	85	0,019	1,287
13	Bay	66	1002	25	15	5	0	0	0	1368	0	100	47	0,025	1,225
14	Bay	67	1000	22	12	2	0	1	0	1869	0	25	76	0,022	1,141
15	Bay	68	1004	33	14	8	1	0	0	1475	0	48	62	0,033	1,178
16	Bay	68	1006	27	17	5	0	0	0	1685	0	68	76	0,027	1,2
17	Bay	68	1007	25	13	6	0	0	0	1654	0	96	38	0,025	1,171
18	Bayan	69	1006	31	17	7	0	0	0	1472	0	125	28	0,031	1,206
19	Bayan	69	1000	25	10	8	0	0	0	1247	0	142	48	0,025	1,298
20	Bay	70	1002	16	6	5	0	0	0	1235	0	100	68	0,016	1,288
21	Bay	71	1000	18	8	5	0	0	0	1685	0	98	45	0,018	1,181
22	Bay	71	1017	23	7	8	0	1	0	1348	0	86	67	0,023	1,249

23	Bay	72	1003	23	8	6	1	0	0	1398	14	97	48	0,023	1,226
24	Bay	72	1007	17	7	5	0	1	0	1568	0	48	45	0,017	1,139
25	Bay	73	1007	22	8	7	0	0	0	1654	8	64	35	0,022	1,137
26	Bay	75	1000	14	6	4	0	0	0	5678	0	47	86	0,014	1,061
27	Bayan	76	1008	23	17	3	0	0	0	1378	0	75	47	0,023	1,194
28	Bayan	78	1006	19	8	4	1	0	0	2058	12	54	46	0,019	1,119
29	Bayan	78	1007	18	8	5	0	0	0	1247	0	47	68	0,018	1,219
30	Bay	78	1003	10	6	0	0	1	0	2875	0	52	50	0,01	1,085

BN; binükleat hücre, MN; mikronükleus, M1; 1 nükleuslu hücre, M2; 2 nükleuslu hücre, M3; 3 nükleuslu hücre, M4; 4 nükleuslu hücre, Pİ; proliferatif indeks.

Eşleştirilmiş t-testi ile kontrol grubuna ait doğal MN frekansları ile in vitro H₂O₂ uygulaması sonucu oluşan MN frekansları karşılaştırıldığında (Tablo 4.3) aradaki fark anlamsız bulunmuştur (p=0.959). H₂O₂ uygulanmış ve uygulanmamış proliferatif indeksler arasında da anlamlı bir fark (p=0.477) bulunmamıştır (Tablo 4.4).

Tablo 4.5: MN frekanslarının gruplar içi ve gruplar arası karşılaştırılması

	Hasta grubu	Kontrol grubu	Eşleştirilmemiş t-testi
SpontanMN frekansı ± SD	0.019± 0.007	0.021± 0.007	p=0.254
H ₂ O ₂ MN frekansı ± SD	0.014 ± 0.005	0.021 ± 0.006	p<0.0001
Eşleştirilmiş t-testi sonucu	p<0.01	p=0.959	

Tablo 4.5'te hasta grubunun spontan MN frekansları ile kontrol grubunun spontan MN frekansları eşleştirilmemiş t-testi (unpaired t-test) ile karşılaştırılmıştır. Aradaki fark anlamsız bulunmuştur (p= 0.254). H₂O₂ uygulanan kontrol ve hasta grubu arasında aynı uygulama yapıldığında, arada anlamlı bir fark gözlenmiştir (p<0.0001).

Tablo 4.6 Grup içi ve gruplar arasında proliferatif indekslerin karşılaştırılması

	Hasta grubu	Kontrol grubu	Eşleştirilmemiş t-testi
Spontan PI değerleri \pm SD	1.270 \pm 0.199	1.216 \pm 0.159	p=0.253
H ₂ O ₂ PI değerleri \pm SD	1.247 \pm 0.185	1.194 \pm 0.063	P=0.141
Eşleştirilmiş t-testi sonucu	p=0.648	p=0.477	

Tablo 4.6’da kontrol ve hasta grubuna ait olan spontan PI değerleri gruplararası eşleştirilmemiş t-testi ile karşılaştırıldığında iki grup arasında fark anlamsız bulunmuştur (p= 0.253). H₂O₂ uygulanan kontrol ve hasta grubu için PI değerleri karşılaştırıldığında da gruplar arası farkın olmadığı (p=0.141) olduğu bulunmuştur.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Parkinson hastalığı genetik etkinliğin yanında birçok çevresel risk faktörlerinin sonucunda oluşan nörodejeneratif bir hastalıktır. Yaş, genetik ve çevresel faktörler gibi birçok sebebe sahip olan bu hastalığın henüz kesin olarak ispatlanmış bir nedeni bulunamamıştır.

Daha çok ileri yaşlarda görülen bu hastalığın Avrupa'daki oranı 100.000 kişide 12.000 olarak belirlenmiştir. Küspeci ve ark. [68] tarafından ülkemizde Afyonkarahisar bölgesinde yapılan bir epidemiyolojik çalışmada tüm nüfusun %0.3'ünü etkilediği gösterilen PH prevalansı, 60 yaş üstü nüfusta %1 olarak bildirilmiştir.

Parkinson hastalığında substansia nigral (SN) hücrelerin progresif ölümü söz konusudur. Dopaminin oksidatif metabolizmasının sitotoksik serbest radikal oluşturma potansiyeli olması nedeniyle SN nöronları oksidan strese daha duyarlıdır H_2O_2 , ferröziyonların varlığında hidroksil radikaller oluşturarak nöronu direkt veya indirekt yolla hasara uğrattığı gösterilmiştir[69].

Serbest radikaller, hücrelerin lipit, protein, DNA ve karbonhidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Bu etki sonucunda meydana gelen hasarların artışı DNA onarımındaki azalmayı etkiler,kanser ve yaşlanma ile etkili olan hastalıkların oluşumunda temel rol oynar. Miquel ve diğ. tarafından 1980'de mitokondriyal DNA'da (mtDNA) oksidatif stresin neden olduğu hasara bağlı mutasyonların yaşlanma sürecinde önemli olduğu ve mitokondrilerin yaşlanmada anahtar rol oynadıkları açıklanmıştır [70].

Ayrıca mitokondri , endoplazmik retikulum ve çekirdek membranında yer alan serbest radikaller aracılığı ile oluşan oksidatif stres, Parkinson hastalığının nörodejenerasyon oluşumunda ve ilerleme sürecinde önemli rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu mekanizmaların birlikte etkin olabileceğine ilişkin

hipotezler mevcuttur. Dauer W(2003) ve diğ. tarafından 2003'te yapılan çalışmada, nörodejenerasyonun çevresel faktörler sonucu meydana gelen mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, ekzotoksinler, nörotrofik destek yetersizliliği ve immün mekanizmaları tarafından oluştuğu düşünülmektedir[70,73].

Çevresel faktörlerden oluşan hastalıkların önceden tespit edilmesinde periferik kan lenfositlerinde (PKL) oluşan kromozom hasarını belirlemek için mikronükleusların kullanılması son yirmi yıldan beri ilgi çekmektedir[74,75]. MN analiz yöntemi, hasara uğrayan kromozomlarda meydana gelen asentrik kromozom parçaları veya mitotik iğdeki hatalar sebebiyle kromozomun tamamının mitoz bölünme sırasında kutuplara çekilememesi ve bunların sitoplazmada yoğunlaşmaları sonucu oluşan MN'ların değerlendirilmesine dayanmaktadır[46,76].

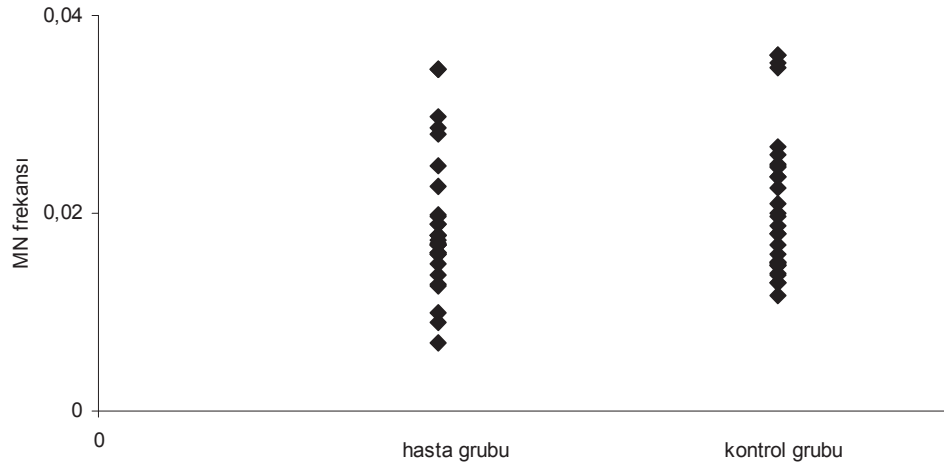
Nigliore ve ark. 2001'de insan periferik kan kültürüyle yaptıkları bir çalışmada, oksidatif stres sonucu okside pürin ve pirimidinlerde artışın olduğunu, sağlıklı ve hasta gruplar karşılaştırıldığında da bu artışların özellikle hasta gruplarında ki DNA zincir kırılmalarında artışa yol açtıklarını göstermişlerdir.

Bu tez çalışmasının amacı Parkinson hastalığında meydana gelen ve mikronükleus yöntemi ile ölçülen kromozom hasarlarının duyarlı bir biyoişaretleyici olarak kullanılabilirliğinin test edilmesidir. Hasta grubu için Parkinson hastalığı teşhisi yeni konmuş veya ilk 2 yıllık evrede olan ve yaşları 43-80 arasında 30 hasta birey kullanılmıştır. Diğer kontrol grubunda ise hastaların yaş aralığına uygun 30 sağlıklı birey kullanılmıştır. Hastalardan ve sağlıklı bireylerden alınan periferik kan örneklerinde spontan ve H₂O₂ uygulanması ile meydana gelen mikronükleus oluşumları incelenmiştir. Hasta ve kontrol gruplarına uygulanan H₂O₂'nin sitotoksik ve genotoksik seviyede etkisi bulunmamaktadır. Elde edilen mikronükleus oluşumları ve proliferatif indeksleri hesaplanarak karşılaştırmalar t-testi ile yapılmıştır.

Hasta grubuna ait spontan ve H₂O₂ uygulanması sonucu skorlanan MN frekansları karşılaştırıldığında; H₂O₂ uygulanması sonucu meydana gelen MN frekansı spontan MN frekansına göre anlamlı seviyede azalma (p<0.01) göstermiştir. Fakat H₂O₂ uygulaması sonucu sağlıklı kontrol bireylerde meydana gelen MN sıklıkları spontan değerlere göre bir farklılık (p=0.959) göstermemiştir. Bunun yanında,

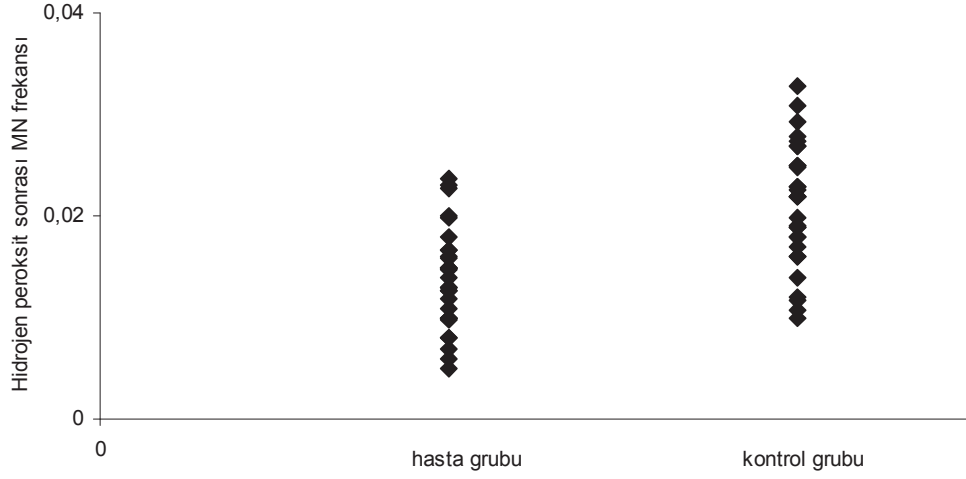
H₂O₂ uygulaması ile hücrelerin proliferatif kapasiteleri hasta grubunda (p=0.648) ve kontrol grubunda (p=0.477) farklılık yaratmamıştır. Farkın olmaması toksik etki göstermediğini belirtir.

Şekil 5.1’de spontan MN frekansı sıklıkları yönünden hasta grubu ve kontrol grubu karşılaştırıldığında, iki grup arasında farkın olmadığı (p= 0.254) gözlenmiştir. Bu çalışmada yer alan Parkinson hastalarının periferik kan lenfositlerinde MN oluşumları ile ölçülen kromozom hasarlarının Şekil 5.1’de gösterildiği gibi sağlıklı bireylere oranla istatistiksel olarak herhangi bir fark olmadığından Parkinson hastalığı spontan ve kromozom hasarları arasında bir ilişki olmadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 5.1. Hasta ve kontrol gruplarındaki spontan MN frekanslarının karşılaştırılması

Şekil 5.2’de Hasta grubundaki lenfositlerin H₂O₂ duyarlılığı 0.014 ortalama ile kontrol grubunun 0.021 olan H₂O₂ duyarlılığından istatistiksel olarak anlamlı seviyede farklılık (p<0.0001) göstermektedir. Bu farklılık özellikle H₂O₂ uygulamasının hasta grubundaki MN’ları önemli ölçüde düşürmesinden kaynaklanmaktadır. Çünkü H₂O₂ uygulaması ile kontrol bireylerdeki MN sıklıkları değişmemiştir.



Şekil 5.2. Hasta ve kontrol gruplarındaki spontan MN frekanslarının karşılaştırılması.

Hasta ve sağlıklı bireylerden alınan periferik kanlardaki spontan ve in vitro H_2O_2 uygulaması sonucu karşılaştırılan proliferatif indeksler arasında farklılık bulunmamıştır. Fakat şekil 5.2'deki H_2O_2 uygulaması ile elde edilen hasta ve kontrol bireyler arasındaki farklılık, H_2O_2 uygulamasının Parkinson hastalığına MN testi ile belirlenebilme özelliğini kazandırmaktadır.

KAYNAKLAR

1. JOHN GILROY, *Basic Neurology*, Sf: 182
2. HALLIWELL B., *Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: Fact or fiction; Ann. Neurol*, 32: S10-S15, 1992
3. JENNER P., *Oxidative damage in neurodegenerative disease. Lancet* 344, 796-798, 1994
4. HEIWELL P.O., LARSSON P.A, DAHLSTROM A., *Further evidence for involvement of microtubules in the proximo-distal intra-axonal transport of acetylcholine and related enzymes in rat sciatic nerve, Acta Physiol. Scand.* 104, 156-166, 1978.
5. DAVIES K. J. A, *Oxidative stress: The paradox of aerobic life. Biochem. Soc. Symp.* 61, 1-31, 1995
6. HALLIWELL B., *Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: Fact or fiction ;Ann. Neurol.* 32, S10-S15, 1992
7. JENNER P., *Oxidative damage in neurodegenerative disease. Lancet* 344, 796-798, 1994
8. BEAL M.F., *Aging, energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Ann. Neurol.* 38, 357-366, 1995.
9. DR. REYHAN GÜRER (Uzmanlıktezi) , *İdiopatik Parkinson Hastalığı Etiyopatogenezinde Seruloplazminin Yeri Ve Proton Mr Spektroskopisi İle Verifikasyonu*, İstanbul-2005
10. WEBER G. F, *The pathophysiology of reactive oxygen intermediates in central nervous system. Med. Hypothes.* 43, 223-230, 1994

11. DR. MUSTAFA CANKURTARAN, *Yaşlılık, yaşlanma mekanizmaları, antiaging ve yaşam tarzı Değişiklikleri* , Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Geriatri Ünitesi, Ankara
12. SOHAL RS, MOCKETT RJ, ORR WC., *Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis*. Free Radic Biol Med. 2002 Sep 1,33(5):575-86.
13. HALLIWELL B., GUTTERIDGE J. M., *Oxygen radicals and the nervous system. Trends Neurol. Sci.* 1, 22-26, 1985.
14. EVANS P.H., *Free radicals in brain metabolism and pathology*, British Med. Bull. 49, 577-587, 1993
15. ANTHONY H.V. SCHAPIRA, ANDREAS HARTMANN,, *Wiley-Blackwell, Klinik pratikte Parkinsonizm Bozuklukları*, Yves Agid16.
17. ADAMS RD, VICTOR M, ROPPER AH., *Principles of Neurology. 6 th ed. New York, NY, McGraw-Hill, 1997:1067-1078*
18. GLENDINNING DS, ENOKA RM., *Motor unit behavior in parkinson's disease. Physical Therapy.* 1994, 74(1), 61-70
19. FAHN S, PRZEDBORSKI S., *Parkinsonizm. I, Rowland LP, ed. Merritt's Textbook of neurology.* 10 th ed. Philadelphia, Md, Lippincott Williams&Wilkins, 2000;679-693
20. STERN MB., *The clinical characteristics of Parkinson's disease and Parkinsonian syndromes: a diagnosis and assessment. In, Stern MB, Hurting HI, eds. The coprehensive management of Parkinson's disease.* New York, PMA, 1988:3-50.
21. MJONES H, *Paralysis agitans, a clinical and genetic study.* Acta Psychiatr Scand Suppl 1949, 54:1-95
22. ANNABELLA N. SELLBACH, RICHARD S. BOYLE , PETER A. SILBURN, GEORGE D. MELLICK., *parkinson's disease and family history, parkinsonism and related disorders* 12(2006) 399-409

23. LYNN M. BEKRIS, IGNACIO F. MATA, CYRUS P. ZABETIAN., *the genetic of Parkinson disease* , journal of geriatricpsyc,atryandneurology 23(4) 228-242
24. DENNIS J. CORDATO, DANIEL K.Y. CHAN., *genetics and Parkinson disease*, journal of clinicalneuroscience(2004) 11(2), 119-123
25. CAROLINE PIRKEVI, SUZANNELESAGE, SIBEL ERTAN, ALEXISBRICE, A. NAZLI BAŞAK., *Türk Parkinson hastalarında LRRK2 G2019S mutasyon tanımlanması ve haplotip analizi*, P-382
26. RAJPUT AH ANDBIRDI S.,*Epidemiology of Parkinson's Disease. Parkinsonism &Related Disorders*, 1997, 3: 175-186.
27. RAJPUT AH, RAJPUT A, RAJPUT M., *Epidemiology of Parkinsonism.In: Pahwa R, Lyons KE, Koller WC (eds) Handbook of Parkinson'sDisease*, 3rd edition, MarcelDekker Inc., New York, 2003, 17-42.
29. TANNER CM, HUBBLE JP, CHAN P., *Epidemiology and genetics of Parkinson's disease*. In, Watts RL, Koller WC (eds) *Movement Disorders, Neurologic Principles and Practice*, McGraw-Hill, NewYork, 1997, 137-152.
30. TORUN Ş, UYSAL M, GÜCÜYENER D, ÖZDEMİR G.,*Parkinson's diseasein Eskişehir, Turkey*. Eur J, 1995, 2 (suppl. 1), 44-45.
31. DR. REJKOKRÜGER , *Parkinson disease, genetic types*, Orphanet encyclopedia, august 2004
32. PROF. DR. HÜLYA APAYDIN, PROF. DR. SIBEL ÖZEKMEKÇİ,*Parkinson Hastalığı Hasta Ve Yakınları İçin El Kitabı*
33. WEN-HUA PIAO, DENISE CAMPAGNOLO, CARLOS DAYAO, RONALD LUKAR, JIE WU, FU-DONGSHI., *nicotineand inflammatory neurological disorders* , Acta Pharmacol Sin 2009 Jun 30 (6), 715-722
34. RILEY DE., Lang AE (1991) *Movement disorders. Neurology In Clinical Praticce. The Neurological Disorders*, Cilt 2, WG Bradley (Ed), Butterworth-Heinemann, s.1568-1569.

35. ROBERTO ZANETTI, DORA LORIA, STEFANO ROSSO.:*Melanoma, Parkinsons Disease And Levodopa: Causal Of Spurious Link A Review Of The Literature*
36. WATSON, J. , CRICK, F., 1953, *Molecular Structure of Nucleic Acids, A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*, Nature, 171, 737-738.
37. BONASSIA S., ZNAORB A., NORPPAC H., HAGMAR L., ,2004, *Chromosomal Aberrations and Risk of Cancer in Humans, An Epidemiologic Perspective*, American Journal Experts, 104, 376-38.
38. CALNE DB, *Parkinson's disease is not one disease*, Park Rel Disord, 2001, 7:3-7
39. NORPPA H., GHİTA C., FALCK, M., 2003, *What do human micronuclei contain*, UK Environmental Mutagen Society, 18 (3), 221–233.
40. DEMİREL S., ZAMANİ, A., 2002, *Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları* Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Genel Tıp Dergisi, 12(3),123-127).
41. HALLIWELL B., *Oxygen radicals as key mediators in neurological disease*, Fact or fiction, Ann. Neurol. 32, S10-S15, 1992
42. DR. REJKOKRÜGER, *Parkinson disease, genetic types*, Orphanet encyclopedia, august 2004. Perl DP, Olanow CW, Calne D. Alzheimer's disease and Parkinson's disease, distinct
43. LANSBURYJR PT, BRICE A., *Genetics of Parkinson's disease and biochemical studies of Implicated gene products*, Current Op Gen Develop, 2002;12:299-306.
44. DAUER W AND PRZEDBORSKI S., *Parkinson's disease, mechanisms and models*. Neuron. 39, 889–909, 2003
45. *Entities or extremes of spectrum of neurodegeneration*, Ann Neurol. 1998 Sep, 44(3 Suppl 1), 19-31

46. PERL DP, OLANOW CW, CALNE D, *Alzheimer's disease and Parkinson's disease: distinct entities or extremes of a spectrum of neurodegeneration* Ann Neurol. 1998, 44(Suppl1), 19-31
47. ADAMS RD, VICTOR M, ROPPER AH., *Principles of Neurology*. 6 th ed. New York, NY: McGraw-Hill, 1997, 1067-1078
48. WATERS CH., *Parkinson Hastalığının Tanısı ve Tedavisi*. Çev, Büyükkal B, Turgut yayıncılık ve Tic. A.Ş. İstanbul, 2000
49. TANNER CM., Ottoman R. *Parkinson's disease in twins, an etiologic study*, JAMA. 1999, 281, 341-346.
50. MOURADIAN MM., *Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson's disease*, Neurology. 2002, 58, 179-185.
51. HORNYKIEWICZ O ANDKISH SJ., *Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease*. In, Yahr M and Bergmann KJ, editors. *Parkinson's Disease*. New York, Raven Pres, 1987. p.19–34
52. BOSSY-WETZEL E., Schwarzenbacher R, Lipton SA, *Molecular pathways to neurodegeneration*, Nature Med, 2004, 10(Suppl), S2-S9.
53. DAUER W AND PRZEDBORSKI S., *Parkinson's disease: mechanisms and models*. Neuron. 39, 889–909, 2003
54. MOGI M, TOGARI A, KONDO T, MIZUNO Y, KOMURE O, KUNO S, ICHINOSE H, NAGATSU., T. *Caspase activities and tumor necrosis factor receptor r1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain*. J Neural Transm, 2000, 107, 335-341.
55. WATSON, J. , CRICK, F. , 1953, *Molecular Structure of Nucleic Acids; A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*, Nature, 171, 737-738.
56. BOLOGNESI, C. , ABBONDANDOLO, A. , 1997, *Age Related Increase of Baseline Frequencies of Sister Chromatid Exchanges, Chromosome Aberrations, And Micronuclei in Human Lymphocytes*, aacrjournals, 6(4), 249-256.

57. LARMARCOVAI, G. , CEPPI, M. , BOTTA, A. , 2008, *Micronüclei Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes of Cancer Patients: A Meta Analysis*, Mutation Research, 659, 274-283.
58. CICCHETTI, R., BARI, M., ARGENTIN, G., 1999, *Induction of micronuclei in bone marrow by two pesticides and their differentiation with CREST staining, an in vivo study in mice*. Mutation Research, 439, 239-248.
59. RAO DV, HOWELL RW., Time dose fractionation in radioimmunotherapy: implications for selecting radionuclides. J Nucl Med. 1993, 34, 1801–1810.
60. KIRSH-VOLDERS, M., SOFUNI, T., AARDEMA, M., ALBERTINI, S., EASTMOND, D., FENECH, M., ISHIDATE, J.M., KIRCHNER, S., LORGE, E., MORITA, T., NORPPA, H., SURRALES, J., VANHAUWAERT, A.: Wakata, A., 2003, *Report from the in vitro micronucleus assay working group*. Mutation Research, 540, 153-163.
61. ALMASSY, Z., KREPINSKI, A.B., BIANCO, A., KÖTELES, G.J.: 1987, *The present state and perspectives of Micronucleus Assay in radiation Protection*. A review. Appl.Radiat. Isot., 38, 241-249.
62. COUNTRYMAN P. I., AND HEDDLE J. A., *A True Microculture Technique for Culturing Human Lymphocytes*. Humangenetik, in press, 1976.
63. DEMİREL, S., ZAMANİ: A.G., 2002, *Mikronukleus tekniği ve kullanım alanları*, Genel TıpDerg, 12(3), 123-127.
64. PAPAPAULOU, P., VLASTOS, D., STEPHANOU, G., DEMOPOULOS, N.A.: 2001, *Linuron cytogenetic activity on human lymphocytes treated in vitro. Evaluation of clastogenic and aneugenic potential using cytokinesis block micronucleus assay in combination with fluorescence in situ hybridization (FISH)*, Fresenius Environmental Bulletin, 10(5), 431-437.
67. NIAS, A.H.W.: 1998, *An Introduction to Radiobiology*, England, Wiley, Chichester.

68. FENECH, M., *Mutation Research, 2000, The in vitro micronucleus technique*, 455, 81-95.
69. FENECH, M., CHANG, W.P., VOLDERS-KRISCH, M., HOLLAND, N., BONASSI, S., ZEIGER, E., *Mutation Research, 2003, Human Project, detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures*, 534, 65-75.
70. BURKE RE., *Programmed cell death and Parkinson's disease*. *Mov Disord* 1998;13:Suppl
71. KÖSEL S, EGENSEPGER R, VON EITZEN U, MEHRAEIN P, GRAEBER MB., *On the question of apoptosis in the parkinsonian substantia nigra*. *Acta Neuropathol (Berl)* 1997;93:105-108.
73. DAUER W, PRZEDBORSKI J., *Parkinson's disease: Mechanisms and models*. *Neuron* 2003;39(11):889-909.
74. MARDER K, LEVY G, LOUIS ED, MEJIA- SANTANA H, COTE L, ANDREWS H, HARRIS J, WATERS C, FORD B, FRUNCHT S, ET AL., *Familial aggregation of early-and late onset Parkinson's Disease*. *Ann Neurol* 2003;54:507-513.
75. LE ROUX J., SLABBERT J., SMIT B., BLEKKENHORST G., *Assesment of the micronucleus assay as a biological dosimeter using cytokinesis-blocked lymphocytes from cancer patients receiving fractioned partial bodyradiotherapy*. *Strahlenther. Onkol.* 1998, 174:75-81.
76. LEE T.K.; WILEY JR.A.L., MEANS J.A., ESINHART J.D., BLACKBURN L.D.: *Frequencies of micronuclei in human lymphocytes: comparison between healthy donors and cancer patients and their in vitro response to ionizing radiation*. *Radiat Oncol Invest* 1993;1:148-152.
77. FENECH M., *The advantages and disadvantages of the cytokinesis – block micronucleus method*. *Mutat Res.* 1997, 392 :11-18.

ÖZGEÇMİŞ

1987' de İstanbul'da doğdum. 2003 yılında Tuna Lisesi'nden mezun olup 2005 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimime başladım. 2009 yılında lisans eğitimimi tamamlayıp İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Programı'nda yüksek lisansa başladım ve 2009 yılından beri yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.

İlknur ÇETİN