



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KORONER ATEROSKLEROZ VE İNSAN PERİFERİK  
KAN LENFOSİTLERİNDEKİ KROMOZOM HASARLARI  
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Tuğçe ERKOL  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Genel Biyoloji Programı**

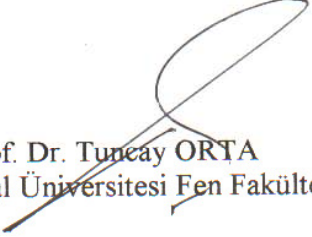
**Danışman  
Prof.Dr. Tuncay ORTA**


**Mayıs, 2009**


**İSTANBUL**

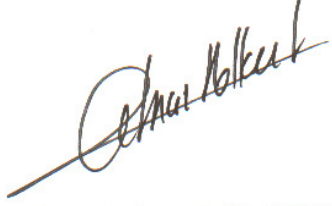
Bu çalışma 03/06/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Genel Biyoloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

  
Prof. Dr. Tunçay ORTA  
İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi

  
Prof. Dr. Yavuz ÇOTUK  
İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi

  
Prof. Dr. Tulay ENGİZEK  
İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi

  
Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT  
İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi

  
Prof. Dr. Hatice BİLGE  
İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin T-1566 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## **ÖNSÖZ**

“Koroner ateroskleroz ve insan periferik kan lenfositlerindeki kromozom hasarları arasındaki ilişkinin araştırılması” adlı tez projemde danışmanlığımı yapan, bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren beni aydınlatan ve bilimsel açıdan beni yetiştiren, Sayın Hocam Prof. Dr. Tuncay ORTA’ya göstermiş olduğu emekleri için sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kardiyoloji Ana Bilim Dalı’nda kontrol grubu ve hasta grubu kanlarımın alınmasında bana destek olan ve her türlü problemin çözümünde yanımda olan Sn. Prof. Dr. Barış İLERİGELEN’e anlayışı ve desteğinden ötürü en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmam boyunca görüş ve deneyimlerinden yararlandığım değerli Sn. Uzman Biyolog Süreyya GÜNEBAKAN’a ve hasta grubuna ait kanların alınmasında bana yardımcı olan Sevgili arkadaşım İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İntern Öğrencisi İbrahim HARBALIOĞLU’na teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu günlere gelmemi sağlayan maddi ve manevi desteklerini asla benden esirgemeyen öğrenim hayatım boyunca sabır ve itina ile hep yanımda olan ve benim için son derece önemli olan değerli ANNEM (E.Çiğdem ERKOL) ve sevgili BABAM (İzzet ERKOL)’a sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışması İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği tarafından desteklenmiştir. (Tez proje no: T-1566)

**Mayıs, 2009**

**Tuğçe ERKOL**

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>ÖNSÖZ.....</b>	<b>i</b>
<b>İÇİNDEKİLER.....</b>	<b>ii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ.....</b>	<b>iv</b>
<b>TABLO LİSTESİ.....</b>	<b>v</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>vi</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>vii</b>
<b>1.GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2.GENEL KISIMLAR.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.LENFOSİTLER.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. YAŞLANMA VE OKSİDATİF STRES.....</b>	<b>4</b>
<b>2.3. KROMOZOM YAPISI.....</b>	<b>6</b>
<b>2.4. KROMOZOM HASARLARI.....</b>	<b>8</b>
<b>2.4.1. Kromozom Tipi Aberasyonlar.....</b>	<b>9</b>
<b>2.4.2. Kromatid Tipi Aberasyonlar.....</b>	<b>11</b>
<b>2.4.3. Mikronükleus Oluşumu.....</b>	<b>14</b>

<b>3.MALZEME VE YÖNTEM.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. DENEY GRUBU.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2. KANLARIN KÜLTÜRE ALINMASI.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3. PREPERATLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....</b>	<b>18</b>
<b>3.4. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER.....</b>	<b>18</b>
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>19</b>
<b>4.1 HASTA GRUBUNA AİT PERİFERİK KAN LENFOSİTLERİ     KÜLTÜR SONUÇLARI.....</b>	<b>19</b>
<b>4.2 KONTROL GRUBUNA AİT PERİFERİK KAN LENFOSİTLERİ     KÜLTÜR SONUÇLARI.....</b>	<b>22</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>28</b>
<b>SONUÇ.....</b>	<b>31</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>32</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>36</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 Akyuvarlar.....	3
Şekil 2.2 DNA molekülü.....	7
Şekil 2.3 DNA molekülü.....	7
Şekil 2.4 Kromozom yapısı.....	8
Şekil 2.5 MN şeması.....	14
Şekil 2.6 Hücre bölünme evresinde metafaz ve telofazdaki kromatin fragmentleri (mikronükleus) ve köprü (bridge) oluşumları.....	15
Şekil 2.7 Hücre siklusu.....	16
Şekil 3.1 Birinci şekilde binükleat hücre, ikinci şekilde ise mikronükleus içeren binükleat hücre gösterilmektedir (X400).....	18
Şekil 4.1 Hasta ve kontrol gruplarına ait doğal MN frekanslarının karşılaştırılması.....	26
Şekil 4.2 Hasta ve kontrol gruplarına ait H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulamalı MN frekanslarının karşılaştırılması.....	26
Şekil 5.1 Hasta ve sağlıklı gruba ait mutlak MN dağılım grafiği.....	30

## TABLO LİSTESİ

## Sayfa

<b>Tablo 4.1</b> Koroner Aterosklerozlu hastaların lenfositlerindeki spontan olarak skorlanan deney sonuçları.....	20
<b>Tablo 4.2</b> Koroner Aterosklerozlu hastaların lenfositlerindeki <i>in vitro</i> hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) uygulaması sonucu skorlanan sonuçlar.....	21
<b>Tablo 4.3</b> Sağlıklı gruba ait lenfositlerdeki spontan MN frekansları ve Pİ değerleri...23	
<b>Tablo 4.4</b> Sağlıklı gruba ait lenfositlerdeki <i>in vitro</i> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulaması sonucu skorlanan MN frekansları ve Pİ değerleri.....	24
<b>Tablo 4.5</b> Grup içi eşleştirilmiş t-testi sonuçlarının karşılaştırılması.....	25
<b>Tablo 4.6</b> Gruplar arası eşleştirilmemiş t-testi sonuçlarının karşılaştırılması.....	25
<b>Tablo 4.8</b> Grup içi eşleştirilmiş t-testi sonuçları.....	27
<b>Tablo 4.9</b> Gruplar arası eşleştirilmemiş t-testi sonuçları.....	27
<b>Tablo 5.1</b> Eşleştirilmiş t-testine göre mutlak MN frekans dağılımı sonuçları.....	29



## ÖZET

### **KORONER ATEROSKLEROZ VE İNSAN PERİFERİK KAN LENFOSİTLERİNDEKİ KROMOZOM HASARLARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

Koroner Ateroskleroz, koroner arterlerde yüksek kan kolestrol düzeyine bağlı olarak damarın iç duvarında aterom (plak) oluşumu sonucu kan akımının engellenmesi ile ortaya çıkan bir koroner arter hastalığıdır. Metabolik değişiklikler, genetik faktörler ve beslenme alışkanlıkları koroner ateroskleroz üzerine etkilidir. Yaşlanmaya bağlı olarak makromoleküllerde ve özellikle genetik materyalde oksidatif stresin artması da koroner ateroskleroza yol açan etmenlerden biri olarak sayılmaktadır. Oksidatif hasarın genomda meydana getirdiği mutasyonlar sonucu oluşan kromozom hasar ve kayıplarını ölçen yöntemlerden biri de mikronükleus (MN) tekniğidir.

Bu tez çalışmasında, koroner ateroskleroz teşhisi konmuş 30 kişilik hasta grubu ile aynı yaş grubunda olan 30 sağlıklı bireyden alınan periferik kan lenfositlerinde mikronükleus oluşumu ile ölçülen kromozom hasarları ve lenfositlerin proliferatif indeksleri (PI) MN tekniği ile incelenerek, koroner ateroskleroz ile olan ilişkisi araştırılmıştır. Ayrıca lenfositlere hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) verilerek stres yüklenmiş ve bunun sonucu meydana gelen MN frekanslarının doğal MN frekanslarından çıkarılması ile mutlak MN frekansları belirlenmiştir. Böylece çevresel faktör ve diyet alışkanlıklarından bağımsız olarak oksidatif hasarın sitolojik düzeydeki etkisinin daha anlamlı çalışılması sağlanmıştır. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar t-testi ile yapılmıştır.

Hasta grubu ile sağlıklı gruplara ait spontan (doğal) ve mutlak MN frekansları karşılaştırıldığında anlamlı bir farkın olmadığı gözlenmiştir. Her iki grupta  $H_2O_2$  uygulaması sonucu ortaya çıkan PI'lerin  $H_2O_2$  uygulanmamış hücrelere oranla arttığı izlenmiş fakat gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalarda ise anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. DNA'da meydana gelen hasarlar sonucunda oluşan kromozom aberasyonlarının MN tekniğiyle skorlanması, MN frekans ve proliferatif indekslerin koroner ateroskleroz tanısı konmuş bireyleri sağlıklı bireylerden ayırt etmede rolünün olmadığını göstermiştir.

## **SUMMARY**

### **AN INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN CORONARY ATHEROSCLEROSIS AND CHROMOSOME DAMAGES IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES**

Coronary Atherosclerosis is a disease of the coronary arteries, occurs with high cholesterol blood level that is builded up in the walls of coronary arteries and forms hard substances called plaque which is resulting in obstruction of blood flow. Metabolic changes, genetic factors, and diet habits are effective on coronary atherosclerosis. Increasing of oxidative stress at macromolecules especially at genetic material according to aging is also counted as one of the factors that causes coronary atherosclerosis. One of the method which measures chromosome aberrations and deletions forming as a result of mutations by the oxidative damage made up at genome is MN technique.

In this thesis work, the relationship between the chromosome aberrations that were scored by the formation of micronucleus and proliferative index (PI) of lymphocytes and coronary atherosclerosis were investigated by the MN technique in peripheral blood lymphocytes obtained from thirty patients group diagnosed as coronary atherosclerosis and thirty healthy individuals at the same age group. Besides, oxidative stress was applied to lymphocytes by giving hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and then spontanous MN frequencies were subtracted from these results to obtain absolute MN frequencies. Thus the cytological effect levels of oxidative damage were better provided as being independent from the enviroment factors and diet habits. The comparisons between the groups were made by t-test.

When the spontaneous and absolute MN frequencies related to patient and healthy groups were compared, no significant differences were detected. In both two groups, increasing of PI's were observed as a result of  $H_2O_2$  application but the comparisons between the groups showed no significant difference. When the chromosome aberrations that were formed as a result of DNA damage were scored with the MN technique, it has been shown that MN frequencies and proliferation indexes have no role in discriminating individuals which diagnosed as coronary atherosclerosis from healthy individuals.

## 1.GİRİŞ

Kalp, vücudun tümüne kanı pompalayan güçlü ve yorulmaksızın yaşayan bir organizma gibidir. Kalbin etrafını çevreleyen ve miyokard adı verilen kalp kasının beslenmesini (oksijenlenmesini) sağlayan damarlar koroner arter olarak isimlendirilir. Ana atar damar olan AORT'dan sağ ve sol (ikiye ayrılır) olmak üzere iki koroner arter çıkar ve bunlar kalbe temiz kan taşırlar. Koroner Arter Hastalığı (KAH), koroner arterlerin tıkanması ve daralması sonucunda ortaya çıkar. Ülkemizde her yıl yaklaşık 65.000 kişide KAH nedeniyle ani ölüm meydana gelmektedir. Koroner Kalp Hastalığı (KKH) olarak da bilinen KAH'ın en sık rastlanan nedeni koroner aterosklerozdur (damar sertliği). Koroner arterlerdeki yüksek kan kolesterol düzeyine bağlı olarak damarın iç duvarında aterom (plak) oluşumu sonucu kan akımını engelleyici darlığın oluşmasıdır. Bu patoloji neticesinde kalp kasına yeterli oksijen gitmez ise iskemik kalp hastalığı (kalp dokusunun kanlanamaması) ortaya çıkar. KKH'da en çok korkulan durum ateroskleroz kaynaklı doku ölümü olan miyokard infarktüsüdür (kalp krizi). Koroner damarlardaki tıkanma sonucu kalp, yeterince beslenemediğinden kasılamaz ve vücuda kan gönderemez. Dünyadaki ölümlerin başlıca nedeni kalp hastalıklarıdır [1,2].

Günümüzün de önemli sağlık sorunu olarak görülen ateroskleroz gelişiminde bireysel ve çevresel faktörlerin rolleri bulunmaktadır. Birinci derece akrabalarda KAH olması, hipertansiyon, kolesterol yüksekliği, şeker hastalığı, yaş, cinsiyet ve açıklığa kavuşturulamamış genetik faktörler bireysel faktörleri oluşturur. Çevresel ve sonradan kazanılan risk faktörleri içinde ise sigara kullanımı, yüksek kolesterol içerikli beslenme, obezite, stresli ve sedanter (hareketsiz) yaşam şekli sayılabilir [2].

Ateroskleroz ve ona bağlı olarak gelişen mekanizmalar yaşlı populasyonlarda sık karşılaşılan bir durumdur. Bireylerde yaş ilerledikçe ateroskleroz görülme sıklığı artar. Erkeklerde 40-45, kadınlarda 50-55 yaştan sonra aterosklerotik olaylar gözlemlenir. Yaşlanma ile birlikte canlıların vücutlarında zamana bağlı olarak fizyolojik ve yapısal değişiklikler meydana gelir. Yaşlılarda fiziksel hareketlerin azalması ile fazla enerji yağ dokusu şeklinde depolanır ve vücuttaki yağsız doku kitlesinin azalıp yağ kitlesinin artmasına sebep olmakta ve ilerleyen yaşlarda ateroskleroza bağlı damar duvarı

kalınlaşması ortaya çıkmakta ve devamında aterosklerotik plak oluşmaktadır. Meydana gelen aterosklerotik hastalıkların azaltılmasında sağlıklı yaşlanmanın sağlanması, risk faktörlerinin minimum düzeye indirilmesi ve tedavinin önemi büyüktür [1,2].

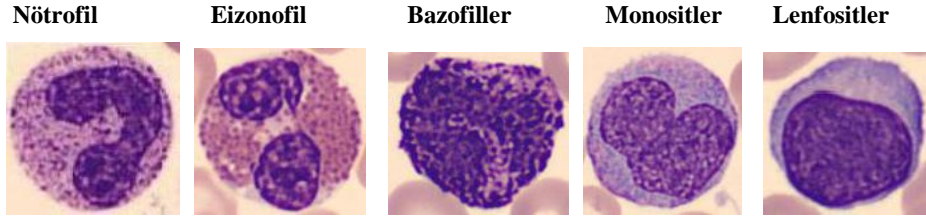
Yaşlanmanın moleküler mekanizmasında ise makromoleküllerde özellikle genetik materyalde oksidatif stresin artması söz konusudur. Oksidatif DNA hasarı yaşlanmanın başlıca nedenlerinden biridir. Zamanla içinde hasar birikimleri ve hücre onarım mekanizmalarındaki etkinliğin azalması kromozomlarda kararsızlığa neden olmaktadır. Yaşlanmaya bağlı artan oksidatif hasarın genomda meydana getirdiği mutasyonlar sonucu oluşan kromozom hasar ve kayıplarını ölçen yöntemlerden biri de mikronükleus (MN) tekniğidir. Mikronükleuslar, hasar gören kromozomların bölünen hücrelerdeki yeni oluşan nükleuslara katılmayarak tüm kromozom veya kromozom parçaları halinde yoğunlaşarak sitoplazmada kaldığı nükleusa ait küçük yapılardır. Hücre bölünmesinin engellenmesi ile elde edilen binükleat (BN) hücrelerdeki MN'lar hücrenin sitoplazması içerisinde ana nükleusların dışında, kardeş çekirdeklerin yanında yer alırlar [3].

Bu tez çalışmasında, yaşlılığa bağlı gelişen hastalıklardan koroner ateroskleroz ile kromozom hasarları arasındaki ilişki araştırılmıştır. Koroner ateroskleroz teşhisi konulmuş hastalar ile sağlıklı bireylerden alınan periferik kan lenfositlerindeki kromozom hasarları sitogenetik bir yöntem olan mikronükleus tekniği ile ölçülmüş ve lenfositlerdeki proliferatif etkinliğin koroner ateroskleroz ile olan ilişkisinin incelenmiştir. *In vitro* koşullarda lenfositlere hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) verilerek oksidatif stres yüklenmiş ve uygulama sonucu ölçülen MN frekansları ile spontan (doğal) MN frekansları hasta ve sağlıklı gruplar arasındaki t-testi ile karşılaştırılmıştır.  $H_2O_2$  stresi indüklenmesi sonucunda meydana gelen MN frekanslarının doğal MN frekanslarından çıkarılması ile mutlak MN frekansları belirlenmiştir. Mutlak MN frekansları, çevresel faktör ve diyet alışkanlıklarından bağımsız olarak oksidatif hasarın sitolojik düzeydeki etkisinin daha anlamlı çalışılmasına olanak sağlamıştır. MN frekanslarının (kromozom kararsızlığı ve hasarların) *in vitro* ölçülmesine ek olarak, BN hücrelerin yanında çok çekirdekli hücrelerin de sayılarak toplam hücrelere oranı ile elde edilen proliferatif indeksler (PI) de skorlanmıştır. MN tekniği ile elde edilen MN frekansları ve PI'lerin koroner ateroskleroz tanısında sitolojik işaretleyici olarak uygulanabilirliği test edilmiştir.

## 2.GENEL KISIMLAR

### 2.1. LENFOSİTLER

Erişkin insanlarda milimetreküp kanda 7.000 kadar akyuvar bulunur. Akyuvarların kanda bulunma nedeni kemik iliğinden veya lenfoid dokudan gereksinim duyulan bölgelere taşınmalarıdır. Kanda normalde beş çeşit akyuvar vardır. Polimorfonükleer nötrofiller, polimorfonükleer eozinofiller, polimorfonükleer bazofiller, monositler ve lenfositler (Şekil 2.1). İlk üç tip hücre polimorfonükleer hücrelerdir, granüler görünüme sahip olduklarından ‘granülositler’ olarak isimlendirilirler. Granülosit ve monositler fagositoz ile vücudu korurlar [4].



Şekil 2.1 Akyuvarlar [5]

Lenfositlerin fonksiyonu ise immün sistemle ilişkili olmalarıdır. Bunlar, lenfoid dokularda, lenf bezleri, dalak, timus, tonsiller, vücudun çeşitli yerlerindeki lenfoid dokularda, özellikle kemik iliğinde ve barsak duvarı epiteli altında uzanan Peyer plaklarında üretilirler. Lenfositler, lenf düğümleri ve diğer lenfoid dokudan lenfatik drenaj ile sürekli olarak dolaşıma katılırlar. Böylece tüm vücutta lenfositlerin sürekli dolaşımı vardır. Lenfositlerin yaşam süresi, haftalarca, aylarca hatta yıllarca olabilir. Lenfoid dokunun lenfositleri iki ana gruba ayrılır. T lenfositleri ‘‘hücresele bağışıklığı’’ sağlayacak olan aktif lenfositlerin oluşumundan sorumludur. B lenfositleri ‘‘hümöral bağışıklığı’’ sağlayan antikorların yapımından sorumludur. Her iki tip lenfosit embriyoda pluripotent (çok yönlü) hematopoyetik kök hücreden kaynaklanarak farklılaşır ve olgun lenfositleri oluştururlar. T lenfositleri kemik iliğinde geliştikten sonra, timus bezine göçerler. Burada çok hızlı bölünerek çoğalır ve çok sayıda antijene yanıt geliştirebilecek şekilde çeşitlendirilirler. İşlenmiş T lenfositleri timusu terk eder ve vücut lenfoid dokularına yerleşirler. B lenfositleri ise fetal yaşamın orta döneminde karaciğerde, geç fetal dönem ve doğum sonrasında da kemik iliğinde işlenirler [4].

B lenfositlerin ömürleri kısadır. T lenfositlerinin ortalama ömürleri 2-4 yıl olup; bazılarının ise 10 yıldan fazladır. İnsan vücudunda yaklaşık  $5.2 \times 10^{12}$  lenfosit dolaşır. Lenfositlerin % 70'i T- lenfositlerdir ve bunların yaklaşık % 98'i ufak, hücre siklusunun bölünmeyen bir fazında ( $G_0$ ) bulunur [6].

## 2.2. YAŞLANMA VE OKSİDATİF STRES

Canlılarda görülen oldukça karmaşık, multi faktörlü ve evrensel bir süreç olan yaşlanma, organizmanın molekül, hücre, doku, organ ve sistemler düzeyinde, zamanın ilerlemesi ile ortaya çıkan, geriye dönüşü olmayan yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin bütünü olarak tanımlanabilir [7]. Aristoteles “Rhethorik” adlı eserinde; “hastalık erken gelen bir yaşlılık, yaşlılık ise doğal bir hastalıktır” ifadesine yer vermektedir. Galen’e göre yaşlanma doğal ve olağan bir süreçtir. Tarihin ünlü düşünürlerinden Çiçero, “İnsan yaşlılığında da başarılar imza atabilir” demektedir ve insan yaşamının bu dönemindeki üretkenliğin önemini vurgulamaktadır [8]. Yaşlılık, doğal ve fizyolojik bir olay olması nedeniyle bireylerde artan yaşa bağlı olarak vücut faaliyetlerinde azalma, hastalıklara karşı artan hassasiyet ve dış etkenlere karşı oluşan cevapta azalma gözlemlenir.

Yaşlılık teorileri dış etkenler ve iç etkenler (kalıtsal) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır [7]. Bilim adamları 1954'lerden beri serbest radikallerin yaşlanma ve dejeneratif hastalıklara neden olduğunu bilmektedirler. Denham Harman tarafından ortaya atılan ‘serbest radikal teorisi’ne göre yaşlanma, oksijenli solunum sırasında oluşan serbest radikallerin dokularda birikmesi sonucu oluşan hasarlar nedeniyle olmaktadır. Denham Harman’ın 1956 yılında öne sürdüğü bu teori kapsamında serbest radikalleri Pandora’nın “Felaketler kutusuna” benzeterek, biyolojik oksidasyonlar sonucu oluşan serbest radikallerin ömür boyunca tesadüfi ve birikimsel hücre hasarı oluşturarak, doku ve organ yaşlanmasına yol açtığını bildirmiş, radikallerin büyük çaplı hücre hasarı, mutagenез, kanser ve yaşlanmanın dejeneratif sürecinden sorumlu olabileceği görüşünü öne sürmüştür [7,9].

Serbest radikal, dış orbitallerinde eşleşmemiş bir elektrona sahip ve elektriksel açıdan yüksüz atom ya da moleküllerdir. Serbest radikallerin bilinen en temel etkileri, lipid

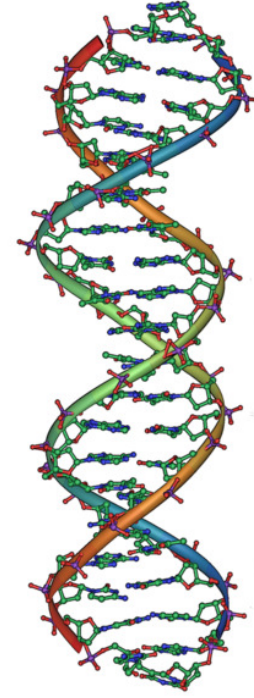
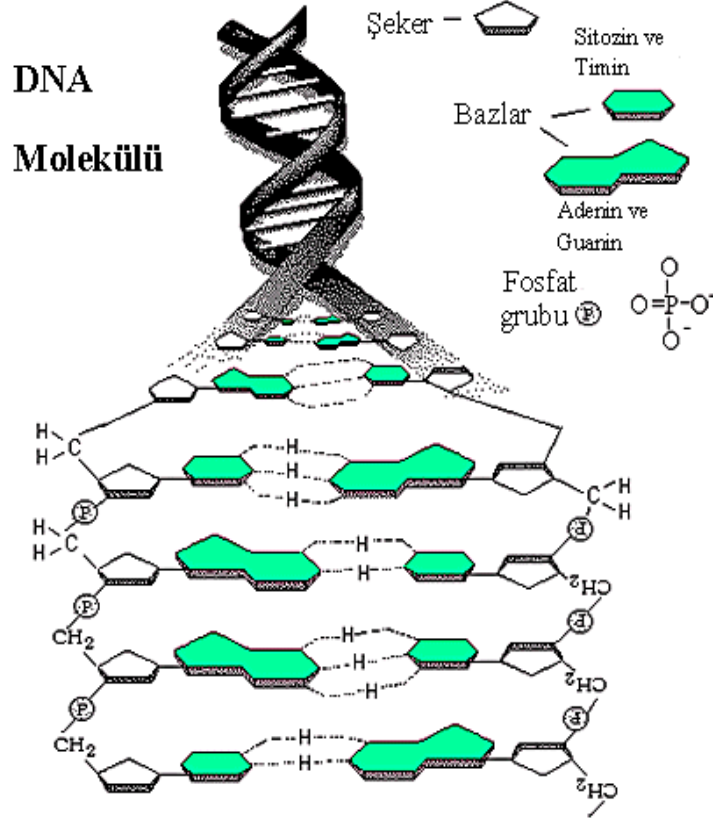
peroksidasyonu, proteinler arasında disülfit bağı oluşumu (protein oksidasyonu) ve DNA hasarıdır [9,10]. Yükselen oksidatif stres artan DNA hasarı ile ilişkilidir [10,11]. Post mitotik hücreler kümülatif DNA hasarına karşı hassas olabilirler. Memelilerde bu mekanizmaya en yakın organlar beyin, kalp ve iskelet kaslarıdır [12]. Beyin ve kalp diğer dokulara göre kıyaslandığında yüksek metabolik aktiviteleri nedeniyle oldukça yüksek oksidatif strese maruz kalırlar. Aynı zamanda yaşlanma ile beraber hücrelerin DNA hasar tamir kapasitlerinde azalmanın olacağı düşünülmektedir [14]. Çok sayıda çalışmaya göre, DNA hasarının yaşa bağlı olarak arttığı bilinmektedir [11,13-16]. Koroner aterosklerozun yaşlanmaya bağlı oksidatif DNA hasar birikimindeki artışla ilgisi olduğu önceden yapılan çalışmalarla desteklenmektedir [13-15,17]. “Oksidatif stres” teorisine göre ağır basan bir görüş olan ‘oksidatif hasar yaşam süresini ve kalitesini belirler’ ifadesi reaktif oksijen metabolitlerinin de (superoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri) serbest radikaller kadar biyolojik moleküllerde hasara neden olduğunun ortaya çıkması esasına dayanır [13,14,17-20].

Yaşlanmayla beraber bireylerde meydana gelen biyolojik fonksiyonlarda gerileme ve hastalıklara karşı direncin azalması söz konusudur. Oluşan hasarların ilerleyen yaş ile beraber birikimi sonucunda oluşan dejeneratif hastalıklar arasında alzheimer, ateroskleroz, parkinson ve diyabet başta gelmektedir [11,14]. Yaşlılarda ölüm oranları en çok kalp hastalıkları, serebrovasküler hastalıklar ve malign hastalıklarda görülmektedir [19]. 65 yaş ve üzerindekilerde kalbe bağlı ölümlerin %85'inin nedeni KKH'dır [21]. Yapılan araştırmalarda Türkiye'de ölümlerin yüzde 43'ü, koroner kalp hastalıklarından kaynaklandığı bilinmektedir. 2 milyon kalp damar hastası olan ülkemizde her yıl 130 bin kişinin dünyada ise yaklaşık 17 milyon kişinin hayatını kaybettiği KKH'den ölümün önemli bir kısmı 41 ile 58 yaş grubunda gerçekleşmiştir [22]. Yaş, ırk, cinsiyet, alkol, sigara, beslenme alışkanlıkları, fiziksel aktivite ve stres gibi pek çok faktörün belirleyici olduğu koroner ateroskleroz hastaları için diyabet, hipertansiyon, hiperlipidemi ve obezite de önemli risk faktörleridir [23].

### 2.3. KROMOZOM YAPISI

Hücrelerde DNA, kromozom olarak adlandırılan yapıların içinde organize olmuştur. Kromozomlarda bulunan histonlar gibi kromatin proteinleri DNA'yı sıkıştırıp organize ederler. Ökaryotik organizmalarda (yani hayvan, bitki, mantar ve protistalar) DNA, hücre çekirdeği içerisinde depolanır. DNA, tekrarlanan nükleotid birimlerden oluşan uzun bir polimerdir (Şekil 2.2 ve Şekil 2.3). DNA zinciri 22 ila 26 Ångström arası (2,2-2,6 nanometre) genişlikte ve bir nükleotid birimi 3,3 Å (0.33 nm) uzunluğundadır. Herbir tekrarlanan birim çok küçük olmasına rağmen, DNA polimerleri milyonlarca nükleotidten oluşan devasa moleküllerdir. Canlı organizmlarda DNA genelde birbirine sıkıca sarılı bir çift zincirden meydana gelir. Bu iki uzun iplikçik sarmaşık gibi birbirine sarılarak bir çift sarmal (double helix) yapısı oluşturur. Nükleotid birimleri 5C (karbonlu)'lu bir şeker, azotlu organik bir baz ve bir fosfat grubundan oluşur. Şeker ve fosfat grupları DNA molekülünün omurgasını oluşturur, baz ise çifte sarmaldaki diğer DNA ipliği ile etkileşir. DNA'da bulunan şeker 2-deoksiribozdur, bu pentoz şekeridir (beş karbonlu şekerdir). Bitişik iki şeker halkasından birinin 3 numaralı karbonu ile öbürünün 5 numaralı karbon atomu fosfat gruplarına, fosfodiester bağı ile tutunmuştur. Bu fosfodiester bağı asimetrik olması nedeniyle DNA iplikçığının bir yönü vardır. Çifte sarmalda bir iplikteki nükleotidlerin birbirine bağlanma yönü, diğer ipliktekilerin yönüne terstir. DNA ipliklerinin bu düzeni antiparalel olarak adlandırılır. DNA ipliklerinin asimetrik olan uçları 5' ve 3' uçlarını kapsar, 5' ucu bir fosfat grubu, 3' ucu ise bir hidroksil grubu taşır [24].

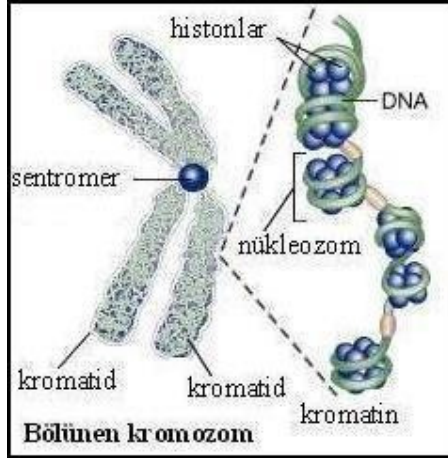




Şekil 2.2 DNA molekülü [25]

Şekil 2.3 DNA molekülü [26]

DNA çifte sarmalının iki ipliği birbirine bazlar arasındaki hidrojen bağları ile tutturulmuştur. DNA'da bulunan dört baz, adenin (A), sitozin (C), guanin (G) ve timin (T) olarak isimlendirilir. Bu dört baz bir nükleotid oluşturmak üzere şeker-fosfata bağlanırlar. Bazlar iki tipe ayrılırlar: adenin ve guanin, pürin türevleri; sitozin ve timin ise pirimidin türevleridir. Şekil 2.4, kromatin (DNA ve proteinlerden meydana gelmiş dağınık ve ağısı yapı) materyelinin paketlenmesi ile kromozomların meydana gelişini göstermektedir.



Şekil 2.4 Kromozom yapısı [27]

## 2.4. KROMOZOM HASARLARI

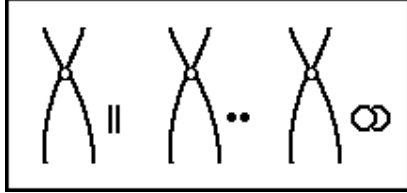
DNA pek çok farklı mutajen tarafından hasara uğrayabilir ve bunun sonucunda DNA dizisi değişebilir. Mutajenler arasında, okside edici ajanlar, alkilleyici ajanlar ve yüksek-enerjili elektromanyetik ışınlar (U.V. ve X ışınları gibi) sayılabilir. DNA'da oluşan hasarın tipi mutajenin tipine bağlıdır. Örneğin U.V. ışığı, pirimidin bazları arasında cross-link olan “timin ikilileri” (timin dimerleri) üreterek DNA'ya hasar verir. Diğer yandan, serbest radikaller veya hidrojen peroksit gibi oksidantlar baz modifikasyonları ve iplik kırıkları gibi farklı türden hasarlar da oluşturabilirler. Her bir insan hücresinde günde 500 baz oksidatif hasardan etkilenir. DNA da meydana gelen lezyonlar içinde en tehlikeli olanları çift iplik kırılmalarıdır. Çünkü onarımı zordur, bunlar DNA dizilerinde noktasal mutasyonlara ve delesyon, translokasyon gibi kromozom aberasyonlarına yol açabilirler [28].

Aberasyonlar kromozom ve kromatid tipi aberasyonlar olmak üzere ikiye ayrılırlar ve bunlar hücre bölünmesinin metafaz evresinde gözlenebilmektedirler [29-31].

### **2.4.1. Kromozom Tipi Aberasyonlar**

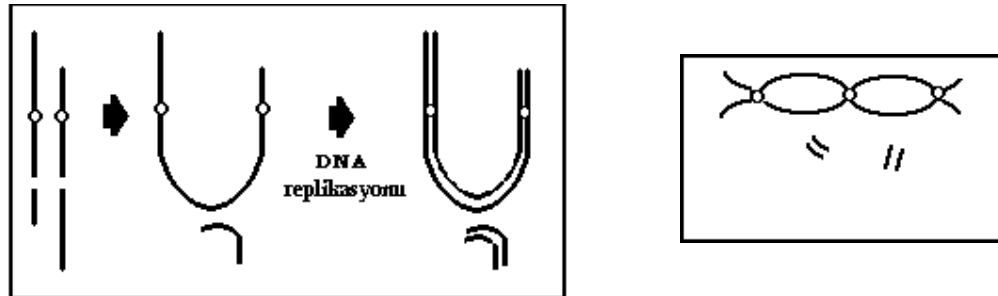
Kromozom aberasyonları hücre siklusunun  $G_0$  ya da erken  $G_1$  evreleri boyunca üretilirler [29-31]. Buna bağlı olarak hasarlar S evresinde duplike olurlar ve her iki kromatidi içeren simetrik ve simetrik olmayan hasarlar olmak üzere metafaz evresinde gözlemlenirler [29,31].

#### *A) Terminal ve İntersisyal Delesyonlar (Uç ve ara delesyonlar)*



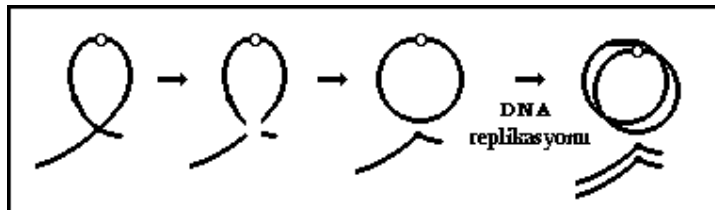
Bu tip aberasyonlarda kromozom ucunda veya ara kısımda kopmalar meydana gelebilir. Küçük intersisyal delesyonların çift noktalı görülenleri 'minutes' olarak sınıflandırılır. Orta kısımlarında belirgin bir boşluk olan büyük intersisyal delesyonlar ise asentrik halkalar olarak sınıflandırılırlar. Fark, çok belirgin olmamakla birlikte değişik büyüklükteki intersisyal delesyonların oluşumu sonucunda gerçekleşirler [30].

#### *B) Kromozomlar Arası Asimetrik Değişimler (Interchange)*



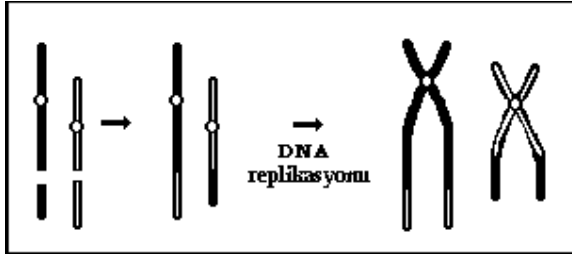
Bu aberasyon terminal (uç) delesyona uğramış iki kromozomun kırık uçlarının birleşmesi ile oluşur. Genelde disentrik ve trisentrik kromozomlardır. Metafazda analiz edildiğinde bir çift asentrik fragmentle eşlik edilen bir disentrik ve iki çift asentrik fragmentle eşlik edilen bir trisentrik gözlemlenir. Bir trisentriğin iki disentriğe eş olduğu kabul edilir [30].

#### *C) Simetrik olmayan (Asimetrik) İç Değişimler (Intrachange)*



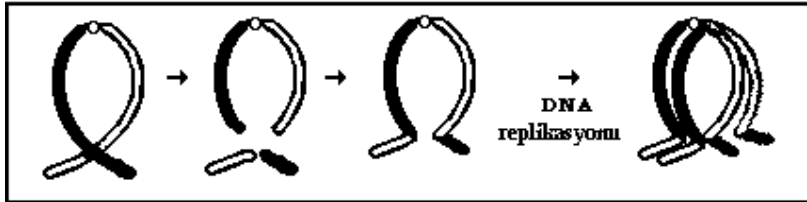
Asimetrik iç değişimlerde (interchange) de olduğu gibi, bir sentrik halkaya bir çift asentrik fragment eşlik etmiştir, kromozom iki kolunda meydana gelen kırıklar ile delesyona uğramış tekrar bu iki kol birbiriyle birleşmiştir. Bir sentrik halka bir disentiriğe eşdeğerdir [30].

*D) İki Kromozom Arasında Simetrik Değişimler (Interchange)*

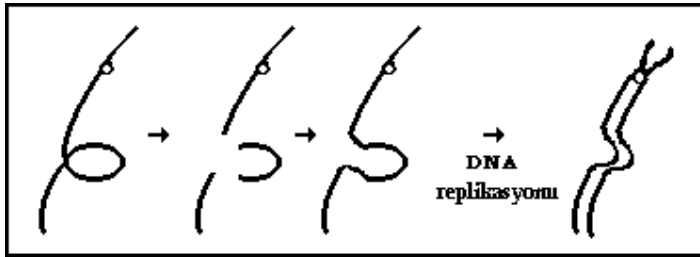


İki kromozom arasında karşılıklı parça alış-verişi (translokasyon) meydana gelir. Simetrik değişimlerin normal boyanan preparatlarda gözlemlenmeleri oldukça zordur. Exchange (translokasyon) yapan parçaların normal karyotipten farklı iki kromozom üretmeleri gerekir. Bu yüzden bantlama yöntemi ile belirlenirler [30].

*E) Simetrik İç Değişimler( Peri- ve Parasentrik İnversonlar)*



Perisentrik ters dönüşüm (İnverson): Bir kromozomun iki kolunun uç kısımlarının kopması ve kopan parçaların karşılıklı olarak yer değiştirmesiyle oluşur.

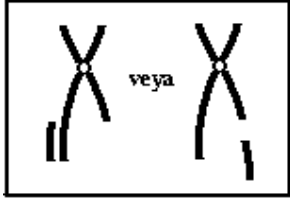


Parasentrik ters dönüşüm (İnverson): Bir kromozomun iki kolunun uç kısımlarının kopması ve kopan parçaların da kromozomun aynı kolu üzerinde ters dönerek aynı yere bağlanması sonucu oluşur [30].

### 2.4.2. Kromotid Tipi Aberasyonlar

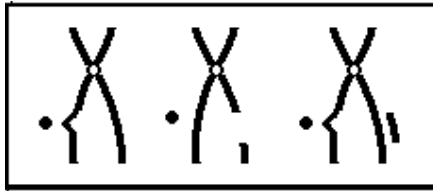
Kromatid tipi aberasyonlar DNA sentezi esnasında ve sentezini tamamlamış hücrelerde hücre siklusunun S veya G<sub>2</sub> evrelerinde oluşan kromozomal değişiklikler sonucu meydana gelmektedir. Kromatid tipi değişiklikler genelde kimyasallar tarafından oluşturulurlar [29].

#### A) Terminal Delesyonlar



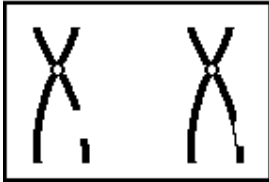
Terminal bir delesyonda, kromatid fragmentinin uç bölgesinden bir parçanın kopması ve bu parçanın kromozomun yakınında ya da distaline doğru farklı bir yer değişimidir veya eğer yer değiştirme yok ise, sentrik ve asentrik bölgeler arasındaki boyanmamış bölge vardır ve bu bölgenin genişliği kromotidin eninden büyüktür. İntersisyal delesyonlar ise terminal delesyonlar ile akromatid lezyonlar veya “gaps”leri ayırt etmek için kullanılır [30].

#### B) İntersisyal Delesyonlar



Kromatid tip intersisyal delesyonlar kromozom tipi benzerleri gibi açıkça gözlemlenemezler. Çünkü çıkan küçük fragment koptuğu kromozomdan genellikle ayrılır [30].

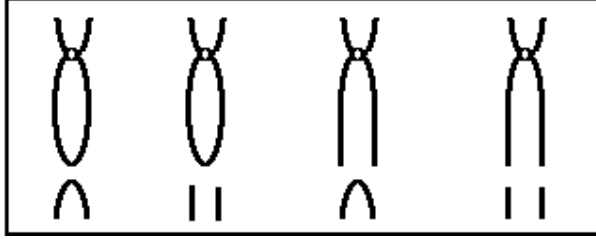
#### C) Akromatik Lezyonlar (“gaps”)



Akromatid lezyonlar veya gap ler kromozomların boyanmamış ya da çok az boyanmış bölgeleridir. Tek kromatidte (single) veya her iki kardeş kromatidte de görünüşe göre

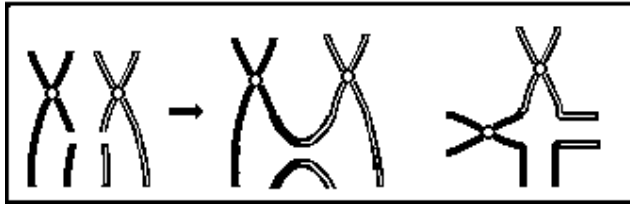
hemen hemen aynıdır. Bir kromatidin eni boyanmamış bölgeden geniş ise bu bir akromatid lezyon olarak kabul edilir [30].

*D) İzokromatid Delesyonlar*



İzokromatid delesyonlar görünüşe göre aynı pozisyonda iki taraflı kırıklar ile her iki kromatidi kapsadıklarından kromatid tip aberasyonlardır. Kardeş birleşenlerin doğasına bağlı çok farklı tipleri vardır. Eğer kardeşlerin bileşimi oluşursa izokromatid aberasyonardır, bunları kromozom tip terminal delesyonlardan ayırt etmek mümkün olur. Asentrik fragment genelde kromozomun kopan sentrik parçası ile ilişkide değildir. [30].

*E) İki Kromatid Arasında Simetrik olmayan İç Değişimler ( Interchange)*



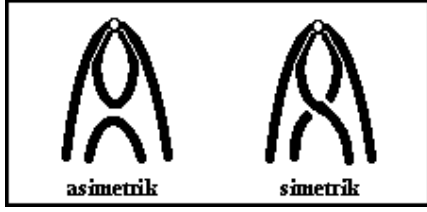
Asimetrik iç değişimler, kromozom tip disentriklere eşit kromatid tiplerdir. İki farklı kromozomun her bir kromatidinde kırılma oluşur ve kopan parçalar birbirleri ile, delesyona uğrayan kromatidler de birbirleriyle birleşir [30].

*F) İki Kromatid arasında Simetrik Değişimler ( Interchange)*



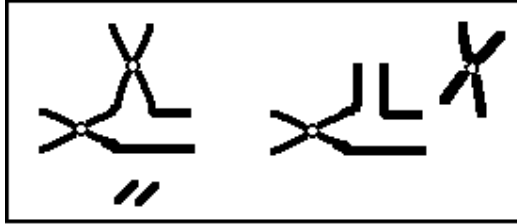
Simetrik içdeğişimler kromozom tip resiprokal translokasyonlara eşit kromatid tiplerdir. İki ayrı kromozomun her bir kromatidinde bir kırılma olur ve kopan asentrik parçalar karşılıklı olarak yer değiştirir. Böylece kromozom bantlama yöntemi olmadan da gözlemlenemezler [30].

G) Asimetrik Ve Simetrik İç Değişimler (Intrachange)



Simetrik ve asimetrik iç değişimlerin iki formu vardır ama metafaz hücreleri analiz edildiğinde bunlardan sadece biri ayırt edilebilir. Kromozomun bir kromatidinin farklı uçlardaki kolları üst üste gelir ve üst üste gelen kısımlardan kromatidler kopar. Eğer kopan parçalar yer değiştirerek tekrar birleşirse, simetrik parçalar yer değiştirmez ve birbirleri ile birleşir. Buna karşın kromatid uçları kendi aralarında birleşirse, asimetrik iç değişim oluşur. Bu tip aberasyonlardan metafazda sadece asimetrik iç değişimler gözlemlenebilir. Simetrik iç değişimler ise bantlama teknikleri ile boyanmamış kromozom parçalarında görülebilir [30].

H) Tridialler ( Üç Kollu Konfigürasyonlar)

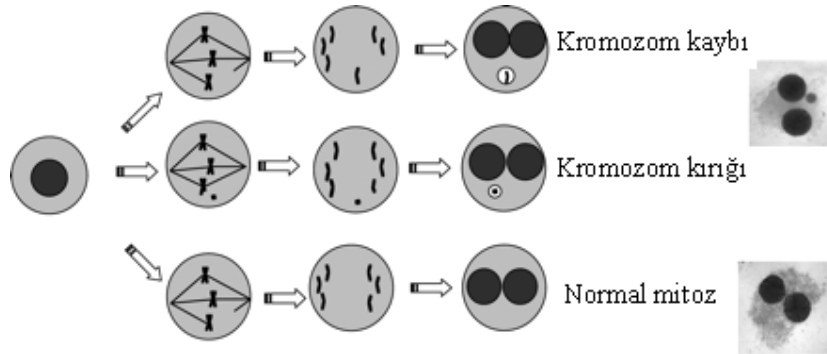


Bir tridial, izokromatid delesyona sahip bir kromozom ile kromatid delesyona sahip ikincinin arasındaki etkileşim ile oluşabilir. Üç kollu aberasyon çeşidi olan tridiallerin pek çok tipi oluşur ama memeli hücrelerinde şekilde gösterilen iki tane en çok gözlemlenendir [30].

Farklı tipteki kromozom aberasyonlarının ayrı ayrı not edilmesi önemlidir. Herhangi bir örnek için sonuçlar, her bir aberasyon tipi için hücre başına aberasyon frekansı veya her bir aberasyon tipi için aberasyonlu hücrelerin frekansı şeklinde sunulmalıdır. Datanın istatistiksel analizi için, aberasyon sınıflarını kromatid tip aberasyonlar- kromozom tip aberasyonlar - kromatid iç değişimleri ve kromozom iç değişimleri gibi genel kategorilere göre kombine etmek uygundur [30].

### 2.4.3. Mikronükleus Oluşumu

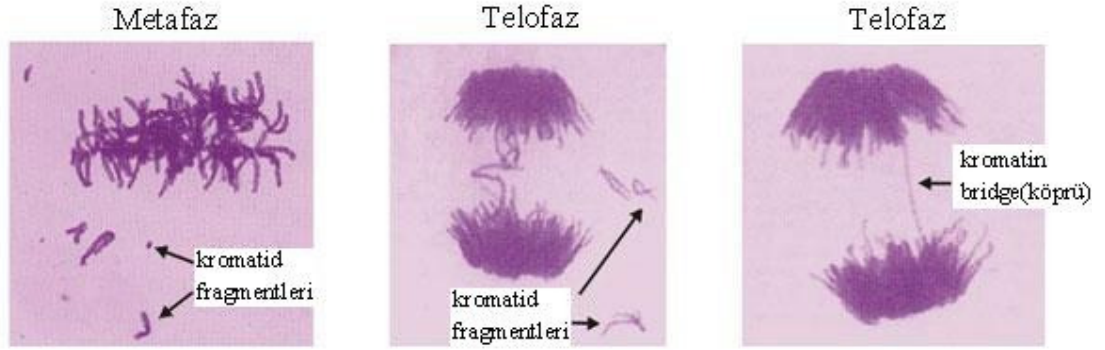
Mikronükleuslar, bölünen hücrelerde kardeş nükleuslara katılamayan asentrik kromozom fragmentleri veya tüm kromozomlardan ortaya çıkan küçük ve extranükleer oluşumlardır (Şekil 2.5) [31,32].



Şekil 2.5 MN şeması [32]

Mikronükleus içeriğindeki kromozomal fragmentler, direkt DNA çift iplik kırıklarından, hücre replikasyonu sonrası SSB (tek iplik kırığı)'lerin DSB (çift iplik kırığı)'lere dönüşümünden veya DNA sentez hatalarından sonuçlanır (Şekil 2.6) [31]. İki kromozom kırığının onarılamayışı bir disentrik kromozom ve bir asentrik fragment üreten bir asimetrik kromozomun yeniden düzenlenmesine öncüllük edebilir. Sıklıkla disentrik kromozomların sentromerleri anafazda, kardeş nükleuslar arasında nükleoplazmik köprü (NPB) oluşturacak şekilde hücrenin zıt kutuplarına doğru çekilir ve bir asentrik fragment de MN oluşturur [31,33,34]. Mikronükleus içeriğindeki tüm kromozomlar öncelikle kromozom ayırma makinesindeki kusurlardan dolayı oluşur. Mesela bunlar, hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki eksiklerden, mitotik iğdeki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından veya kromozomal altyapılardaki hasarlardan, mekaniksel bozulmadan ve sentromerik DNA'nın hipometilasyonundan kaynaklanır [33].

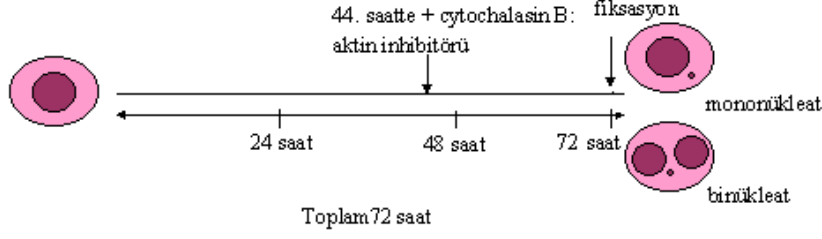




**Şekil 2.6** Hücre bölünme evresinde metafaz ve telofozdaki kromatin fragmentleri (mikronükleus) ve köprü (bridge) oluşumları [35]

Mikronükleus skorlanması oldukça kolay, ekstra kültür işlemi basamağı olmadan uygulanabilir ve insan biyomonitöringine alakalı farklı hücre tiplerinde (lenfositler, fibroblastlar ve epitel hücrelerinde) kullanılabilir. Fenech ve Morley şimdilerde geniş olarak kullanılan bir method olan Sitokinez- bloklı MN (CBMN) deneyi'ni geliştirerek MN'lerin binükleat hücrelerde daha kolaylık ve güvenilirlikle skorlanmasını sağladılar [31,36].

CBMN'nin en önemli avantajı, sırasıyla yapısal ve sayısal CA'lara öncülük eden klastojenik ve anojenik olayların ikisini birden ortaya çıkarmakta yatar [31]. Standart in-vitro mikronükleus deneyi insan lenfositlerinde uygulanır ve klasik teste göre insan lenfositleri mitozu stimüle eden phytohaemagglutinin (PHA) öncülüğünde kültüre edilirler (Şekil 2.7). 44.saatten sonra cytochalin-B (Sit-B) kültüre ilave edilir. Bu aktin polimerizasyonu inhibitörünün kullanılışı, binükleat hücrelerin ve mononükleat hücrelerin arasındaki ayırma izin veren sitokinezi bloke etmesidir. 72. saatte hücreler mikroskopik slaytlara ekilirler, sabitlenirler ve boyanırlar [31,34]. Periferik kan lenfositlerindeki kromozom hasarlarının ölçümünde MN tekniğinin kullanılması ilk kez Countryman ve Heddle tarafından sunulmuştur [37]. MN testi mutajenisite (bir mutasyon başlatma yeteneği) testleri için güvenilir bir deneydir. Her bir hücredeki nükleus sayısı, cytochalin-B ilavesi ile nükleer bölünmelerin sayısını göstermektedir. Bu teknikte yalnızca binükleat (iki çekirdek içeren) hücreler sayılmaktadır çünkü bu hücreler sadece bir kez hücre bölünmesi geçirmiş hücre grubudur [38].



**Şekil 2.7** Hücre siklusü [39]

MN frekansı için skorlanan sitokinez-bloklü hücrelerin aşağıdaki karakteristiklere sahip olması gerekir [40-42]:

1. Hücreler binükleat olmalıdır.
2. Binükleat hücredeki iki nükleus intakt nükleer membrana sahip olmalıdır ve aynı sitoplazmik sınırlar içinde bulunmalıdır.
3. Binükleat hücredeki iki nükleus yaklaşık olarak eşit büyüklükte, eşit boyama yoğunluğu ve eşit boyama oranında olmalıdır.
4. Binükleat hücredeki iki nükleus, büyük nükleusun çapının 4'te birinden geniş olmamak şartı ile çok ince bir nükleoplazmik köprü ile bağlanabilir.
5. Binükleat hücredeki iki ana nükleus birbirine dokunabilir ama üstü üste binemezler. Üst üste iki gelen nükleuslu bir hücre, herbir nükleusun nükleer sınırları ayırt edilebilir olduğu sürece skorlanabilir.
6. Binükleat hücrenin sitoplazmik sınırı veya membranı intakt olmalı ve açık şekilde bitişik hücrelerin sitoplazmik sınırlarından ayırt edilebilir olmalıdır [41].

MN skora kriterleri;

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 şekillerdedir.
3. MN'ler ışığı kırmazlar ve bu nedenle boya partükülleri gibi artefaktlardan kolayca ayırt edilebilirler.
4. MN'ler ana nükleusa bağlanmazlar veya birleşmezler.
5. MN, ana nükleusa dokunabilir ama üst üste gelemes 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 [42].

### **3. MALZEME VE YÖNTEM**

#### **3.1. DENEY GRUBU**

Bu çalışma, Koroner Ateroskleroz teşhisi konmuş 30 kişilik hasta grubu ile aynı yaş grubunda olan 30 sağlıklı bireyden alınan periferik kan lenfositleri ile yapılmıştır. Hastalar, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kardiyoloji A.B.D. servisinde daha önceden geçirmiş oldukları koroner arter hastalıkları sonucunda yapılmış olan anjiyografi tetkikinde koroner damarlarının en az iki veya daha fazlasında belli bir derecede darlık saptanmış olan ve çoğunluğu daha önce miyokard infarktüsü geçirmiş olan 40 yaş üstü katılımcılardan oluşmaktadır. Bireylerden çeperi lityum-heparin ile kaplı vakumlu ve steril 4.5 ml'lik 2 tüp içerisinde alınan kanlardan biri doğal MN frekanslarının tespiti için ayrılırken, diğeri hidrojen peroksit ile muamele görmüştür.

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulunun 4 Aralık 2007 tarih ve 34471 sayılı kararı ile bu tez çalışması uygun bulunmuştur.

#### **3.2. KANLARIN KÜLTÜRE ALINMASI**

Hasta ve sağlıklı gruba ait kontrol kanların 0.5 ml'si, içerisinde phytohemagglutinin (PHA, 15µg/ml), 4 ml besiyer (RPMI-1640 medyum) ve 0.5 ml Newborne Calf Serum bulunan kültür şişeleri içine ekilerek 37°C' de inkübasyona bırakılmıştır [41]. Hasta ve sağlıklı gruba ait hidrojen peroksit uygulamalı deneylerde kanlara 0,25 hidrojen peroksit eklenmiştir. İnkübasyonun 44'üncü saatinde kültür ortamına 0,20 ml cytochalsin-B (Cytochalsin B;Sigma;USA) eklenerek hücreler 28 saat daha inkübasyonda tutulduktan sonra toplam 72 saatlik kültür süresini tamamlayan hücreler, santrifüj tüplerine konularak 200g'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Dibe çöken kısma önceden hazırlanmış ve -20 C<sup>0</sup> de dondurucuda bekletilmiş 0,075M KCl çözeltisi ilave edilerek hücreler tekrar 200g'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant atılarak, çöken kısma 7:1 oranında metanol:asetik asit karışımı ilave edilmiş ve tekrar 200 g'de 10dk. santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem iki defa tekrarlandıktan sonra tespit edilen hücreler

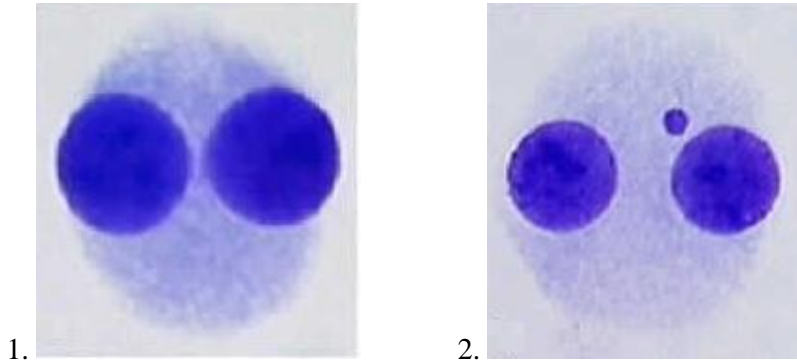
-20 C<sup>0</sup> de bekletilen lamalar üzerine pastör pipeti ile damlatılarak binükleat hücreler elde edilmiştir. Kurutulan lamalar %5'lik Giemsa boyası ile 10 dk. boyanıp lamel ile kapatılarak ışık mikroskobunda incelenmek üzere hazır hale getirilmiştir.

### 3.3. PREPERATLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Preparatlardaki mikronükleus içeren ve içermeyen binükleat hücreler sayılarak mikronükleus frekansları ve ayrıca 1'li, 2'li, 3'lü ve 4'lü çekirdekten oluşan hücrelerin tespit edilmesi ile hesaplanan proliferatif indeksler, her bir birey için tespit edilmiştir. Hücrelerin ışık mikroskobu altında değerlendirilmesi X400 büyültmede yapılmıştır. Kaydedilen mikronükleusların doğrulanması ise X1000 büyültmede immersiyon yağı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Her bir preparatta toplam 1000 adet BN'lı hücre sayımı yapılmıştır.

### 3.4. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

Her bir bireyin lenfositlerindeki spontan ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) stresi sonrası meydana gelen MN frekansları eşleştirilmiş (paired) t-test ile yapılmıştır. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar ise eşleştirilmemiş (unpaired) t-test ile skorlanmıştır. Doğal ve mutlak MN frekansları ile proliferatif indekslerin yaşlanma kaynaklı koroner ateroskleroz üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir.



**Şekil 3.1.** Birinci şekilde binükleat hücre, ikinci şekilde ise mikronükleus içeren binükleat hücre gösterilmektedir (X400) [43].

## **4. BULGULAR**

### **4.1 HASTA GRUBUNA AİT PERİFERİK KAN LENFOSİTLERİ KÜLTÜR SONUÇLARI**

Koroner ateroskleroz teşhisi konulmuş 40 yaş üstü 30 hasta bireye ait MN dağılımları, MN frekansları ve proliferatif indeksler (Pİ) Tablo.4.1 ve Tablo.4.2’de verilmektedir. Tablolarda verilen toplam hücre (N), binükleatlarla beraber sayılan bir (M1), iki (M2), üç (M3), ve dört (M4) nükleatlı hücrelerin toplam sayısını göstermektedir.

Tablo 4.1’de hasta grubuna ait spontan MN frekans sonuçları verilmektedir. MN frekansları  $0.0279 \pm 0.01177$  (ortalama  $\pm$  standart sapma) ortalama ile 0.0070 ve 0.06200 aralığında dağılmaktadır.

**Tablo 4.1** Koroner Aterosklerozlu hastaların lenfositlerindeki spontan olarak skorlanan deney sonuçları

	BN	MN	MN dağılımı					M1	M2	M3	M4	MN/BN	M1+2M2+3M3+4M4	Toplam hücre (N)	Pi
			1MN	2MN	3MN	4MN	5MN								
1.	1000	23	19	0	0	1	0	4471	41	44	31	0,023	6809	5587	1,219
2.	1024	42	24	5	1	0	1	3579	26	44	37	0,041	5959	4710	1,265
3.	1007	14	12	1	0	0	0	2397	20	58	39	0,014	4781	3521	1,358
4.	1016	25	23	1	0	0	0	2583	25	83	69	0,025	5190	3776	1,374
5.	1038	32	30	1	0	0	0	784	12	119	140	0,030	3801	2093	1,816
6.	1007	26	22	2	0	0	0	287	12	267	337	0,026	4474	1910	2,342
7.	1001	22	20	1	0	0	0	1335	15	167	142	0,022	4436	2660	1,668
8.	1003	31	18	5	1	0	0	3807	31	97	25	0,031	6266	4963	1,262
9.	1045	19	15	2	0	0	0	2113	2	76	27	0,018	4543	3263	1,392
10.	1000	18	12	3	0	0	0	4298	27	101	56	0,018	6879	5482	1,255
11.	1000	26	26	0	0	0	0	2816	28	76	43	0,026	5272	3963	1,330
12.	977	16	10	3	0	0	0	2026	4	81	40	0,016	4391	3128	1,404
13.	1000	31	27	2	0	0	0	2536	31	90	65	0,031	5128	3722	1,378
14.	1000	19	12	0	1	1	0	493	12	64	30	0,019	2829	1599	1,767
15.	1000	15	15	0	0	0	0	2734	22	55	36	0,015	5087	3847	1,322
16.	1000	26	22	2	0	0	0	2863	26	73	98	0,026	5526	4060	1,361
17.	1000	16	14	1	0	0	0	2191	29	72	30	0,016	4585	3322	1,380
18.	1000	30	24	3	0	0	0	2353	26	87	76	0,03	4970	3542	1,403
19.	1000	62	50	6	0	0	0	2110	66	96	74	0,062	4826	3346	1,442
20.	1001	40	31	3	1	0	0	2210	33	119	125	0,040	5135	3488	1,472
21.	1000	43	38	1	1	0	0	3360	79	132	69	0,043	6190	4640	1,334
22.	1000	36	26	5	0	0	0	3940	59	125	71	0,036	6717	5195	1,293
23.	1000	25	23	1	0	0	0	798	11	135	52	0,025	3433	1996	1,720
24.	1005	54	43	4	1	0	0	560	7	202	264	0,054	4246	2038	2,083
25.	1006	28	26	1	0	0	0	1122	23	145	112	0,028	4063	2408	1,687
26.	1004	37	37	0	0	0	0	1840	17	134	160	0,037	4924	3155	1,561
27.	1009	30	28	1	0	0	0	1322	16	160	116	0,030	4316	2623	1,645
28.	1000	24	22	1	0	0	0	2116	23	134	88	0,024	4916	3361	1,462
29.	1000	25	21	2	0	0	0	2582	24	100	34	0,025	5066	3740	1,354
30.	1000	7	7	0	0	0	0	132	3	95	40	0,007	2583	1270	2,034

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

Tablo 4.2’de Koroner Aterosklerozlu 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  $0.0274 \pm 0.01250$  (ortalama  $\pm$  standart sapma) ortalama ile 0.01090 ve 0.05000 aralığında dağılım göstermektedir. Hasta grubunun spontan mikronükleus sıklıkları ile  $H_2O_2$  tedavisi sonrası elde edilen MN sıklıkları eşleştirilmiş t-testi ile karşılaştırıldığında arada anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ( $p=0,81$ ; Tablo 4.5).

**Tablo 4.2** Koroner Aterosklerozlu hastaların lenfositlerindeki *in vitro* hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) uygulaması sonucu skorlanan sonuçlar

	BN	MN	MN dağılımı						M1	M2	M3	M4	MN/BN	M1+2M2+3M3+4M4	Toplam hücre (N)	Pİ
			1MN	2MN	3MN	4MN	5MN	6MN								
1.	1002	37	30	2	1				1932	26	80	26	0,037	4332	3066	1,413
2.	1003	37	26	2	1	1			3074	26	54	28	0,037	5406	4185	1,292
3.	1008	15	13	1					1178	13	60	42	0,015	3568	2301	1,551
4.	1007	23	20		1				1833	25	67	71	0,023	4382	3003	1,460
5.	1000	24	20	2					235	7	195	143	0,024	3406	1580	2,156
6.	1025	17	13	2					263	3	184	157	0,016	3499	1632	2,144
7.	1028	35	26	3	1				718	5	156	132	0,034	3780	2039	1,854
8.	1003	17	13	2					2640	16	97	51	0,017	5173	3807	1,359
9.	1000	12	12						1998	8	64	35	0,012	4346	3105	1,400
10.	1000	13	13						4225	30	98	40	0,013	6739	5393	1,249
11.	1000	50	29	9	1				4097	23	137	60	0,05	6794	5317	1,278
12.	826	9	7	1					2903	1	95	43	0,011	5014	3868	1,296
13.	1000	35	15	3	1		1	1	1159	16	41	25	0,035	3414	2241	1,523
14.	1007	12	10	1					663	13	42	28	0,012	2941	1753	1,678
15.	1000	11	5	3					1940	4	77	31	0,011	4303	3052	1,410
16.	1000	14	14						1388	14	85	69	0,014	3947	2556	1,544
17.	1000	15	13	1					1103	17	106	31	0,015	3579	2257	1,586
18.	1000	18	16	1					3051	42	82	34	0,018	5517	4209	1,311
19.	1000	50	46	2					1903	47	113	67	0,05	4604	3130	1,471
20.	1004	30	28	1					1189	23	114	119	0,030	4061	2449	1,659
21.	1000	49	43	3					997	24	168	65	0,049	3809	2254	1,690
22.	1000	43	39	2					893	29	122	44	0,043	3493	2088	1,673
23.	1000	35	27	1	2				380	2	161	84	0,035	3203	1627	1,969
24.	1000	37	35	1					535	8	157	93	0,037	3394	1793	1,893
25.	1000	28	26	1					485	26	135	79	0,028	3258	1725	1,889
26.	1002	36	30	3					674	11	116	132	0,036	3576	1935	1,848
27.	1007	31	25	3					704	17	213	117	0,031	3859	2058	1,875
28.	1000	40	30	5					756	15	92	33	0,04	3194	1896	1,684
29.	1013	31	31						1529	6	60	47	0,031	3935	2655	1,482
30.	1002	21	19	1					862	14	168	110	0,021	3838	2156	1,780

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

MN oluşum frekanslarının yanı sıra her bir grupta yer alan 30 hasta ve 30 sağlıklı bireyin proliferatif indeksleri, Eastmond ve Tucker'ın methoduna göre şu şekilde hesaplanmıştır [41,44];

$$\text{Proliferatif index (PI)} = (M1+2(M2)+3(M3)+4(M4)) / N$$

Hasta grubuna ait spontan proliferatif indeksler 1.513 ortalama ile 1.219 ve 2.342 aralığında (Tablo 4.1), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> proliferatif indeksleri ise 1.614 ortalama ile 1.250 ve 2.156 aralığında (Tablo 4.2) dağılım göstermektedir. Bu gruba ait değerler eşleştirilmiş t- testi ile karşılaştırıldığında aradaki fark çok anlamlı bulunmuştur (p<0.01; Tablo 4.8).

#### **4.2 KONTROL GRUBUNA AİT PERİFERİK KAN LENFOSİTLERİ KÜLTÜR SONUÇLARI**

Hasta grubu ile aynı yaş dağılımına sahip 40 yaş üstü 30 sağlıklı bireye ait deney sonuçları Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'de verilmektedir.



**Tablo 4.3** Sağlıklı gruba ait lenfositlerdeki spontan MN frekansları ve Pİ değerleri

	BN	MN	MN dağılımı					M1	M2	M3	M4	MN/BN	M1+2M2+3M3+4M4	Toplam hücre (N)	Pİ
			1MN	2MN	3MN	4MN	5MN								
1.	1000	14	14	0	0	0	0	2289	11	62	25	0,014	4476	3387	1,321
2.	1000	11	11	0	0	0	0	1426	8	111	26	0,011	3660	2571	1,423
3.	1000	13	11	1	0	0	0	1840	21	97	31	0,013	4106	2989	1,374
4.	1000	25	21	2	0	0	0	4606	30	58	51	0,025	6931	5745	1,206
5.	1001	34	27	1	0	0	1	3593	32	93	116	0,034	6219	4835	1,286
6.	1018	22	19	0	1	0	0	3426	40	94	45	0,022	5819	4623	1,259
7.	1000	15	13	1	0	0	0	4476	31	109	37	0,015	6798	5653	1,202
8.	1000	34	30	2	0	0	0	5921	58	105	71	0,034	8429	7155	1,178
9.	1000	17	15	1	0	0	0	1683	12	114	77	0,017	4132	2886	1,432
10.	1002	28	22	3	0	0	0	1140	29	128	80	0,028	3653	2379	1,535
11.	1000	30	26	2	0	0	0	507	5	123	144	0,03	3219	1779	1,809
12.	1001	39	33	3	0	0	0	919	23	151	130	0,039	3641	2224	1,637
13.	1000	32	24	1	2	0	0	830	13	188	189	0,032	3803	2220	1,713
14.	1017	15	11	2	0	0	0	200	2	212	337	0,015	3801	1768	2,15
15.	1000	31	31	0	0	0	0	438	2	272	221	0,031	3601	1933	1,863
16.	1039	21	15	3	0	0	0	442	3	89	61	0,02	2862	1634	1,751
17.	1004	43	33	2	2	0	0	440	8	132	191	0,043	3363	1775	1,895
18.	1002	46	29	7	1	0	0	670	13	97	82	0,046	3128	1864	1,678
19.	1004	8	8	0	0	0	0	1306	3	110	91	0,008	3797	2514	1,51
20.	1003	17	15	1	0	0	0	820	5	119	90	0,017	3318	2037	1,629
21.	1000	17	15	1	0	0	0	2079	12	159	133	0,017	4797	3383	1,418
22.	1001	27	23	2	0	0	0	3651	23	137	196	0,027	6623	5008	1,322
23.	1004	14	12	1	0	0	0	2431	7	93	124	0,014	5045	3659	1,379
24.	1006	21	17	2	0	0	0	3861	15	151	116	0,021	6521	5149	1,266
25.	1027	40	23	7	1	0	0	4310	10	87	115	0,039	6934	5549	1,249
26.	1004	8	6	1	0	0	0	564	0	166	160	0,008	3381	1894	1,785
27.	1011	11	9	1	0	0	0	795	1	146	141	0,011	3532	2094	1,687
28.	1007	18	12	1	0	1	0	1524	12	179	210	0,018	4584	2932	1,563
29.	1007	21	15	3	0	0	0	1076	7	135	112	0,021	3690	2337	1,579
30.	1014	13	13	0	0	0	0	641	4	131	89	0,013	3167	1879	1,685

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

Tablo 4.3'de sağlıklı gruba ait lenfositlerdeki spontan MN frekansları sonuçları verilmiştir. Spontan MN oluşum frekansları  $0.0227 \pm 0.01067$  (ortalama  $\pm$  standart sapma) ortalama ile  $0.0079$  ve  $0.04591$  aralığında dağılım göstermektedir.

**Tablo 4.4** Sağlıklı gruba ait lenfositlerdeki *in vitro* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması sonucu skorlanan MN frekansları ve Pİ değerleri

	BN	MN	MN dağılımı				M1	M2	M3	M4	MN/BN	M1+2M2+3M3+4M4	Toplam hücre (N)	Pİ
			1MN	2MN	3MN	4MN								
1.	1000	18	11	2	1	0	737	10	123	25	0,018	3226	1895	1,702
2.	1000	10	7	0	1	0	855	10	122	39	0,01	3397	2026	1,677
3.	1010	16	14	1	0	0	959	22	114	50	0,016	3565	2155	1,654
4.	1002	16	14	1	0	0	1247	10	67	35	0,016	3612	2361	1,53
5.	1016	19	14	1	1	0	390	0	121	104	0,019	3201	1631	1,96
6.	1000	18	18	0	0	0	1795	30	85	49	0,018	4306	2959	1,455
7.	1000	9	9	0	0	0	1440	9	78	53	0,009	3904	2580	1,513
8.	1001	13	13	0	0	0	833	11	155	119	0,013	3798	2119	1,7923
9.	1001	36	34	1	0	0	1694	31	147	43	0,036	4371	2916	1,499
10.	1000	33	27	3	0	0	830	15	130	65	0,033	3510	2040	1,72
11.	1003	37	30	2	1	0	1877	39	116	65	0,037	4569	3100	1,474
12.	1000	49	34	6	1	0	399	9	132	70	0,049	3093	1610	1,921
13.	1000	21	19	2	0	0	342	10	193	147	0,021	3529	1692	2,086
14.	1007	14	10	2	0	0	170	0	218	276	0,014	3942	1671	2,359
15.	1019	36	32	0	0	1	446	6	78	51	0,035	2934	1600	1,834
16.	1004	36	29	2	1	0	380	4	60	36	0,036	2720	1484	1,833
17.	1007	30	27	0	1	0	380	6	132	122	0,03	3290	1647	1,997
18.	1004	48	38	5	0	0	450	13	40	29	0,048	2720	1536	1,771
19.	1001	14	14	0	0	0	980	7	50	39	0,014	3302	2077	1,59
20.	1006	35	33	1	0	0	2347	22	62	32	0,035	4717	3469	1,36
21.	1002	14	12	1	0	0	1877	15	131	51	0,014	4508	3076	1,465
22.	1002	26	24	1	0	0	950	9	177	187	0,026	4251	2325	1,828
23.	1017	26	23	0	1	0	1548	13	117	112	0,026	4407	2807	1,57
24.	1028	36	30	3	0	0	2605	20	162	136	0,035	5731	3951	1,45
25.	1007	32	18	4	2	0	754	4	129	139	0,032	3719	2033	1,829
26.	1042	25	20	1	1	0	2252	8	138	132	0,024	5294	3572	1,482
27.	1016	19	19	0	0	0	1695	12	138	98	0,019	4557	2959	1,54
28.	1001	28	19	3	1	0	2095	19	169	132	0,028	5170	3416	1,513
29.	1000	20	16	2	0	0	2469	8	123	68	0,02	5126	3668	1,397
30.	1000	20	16	2	0	0	2201	17	103	86	0,02	4888	3407	1,435

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

Tablo 4.4’de sağlıklı gruba ait lenfositlerdeki *in vitro* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması sonucu skorlanan MN frekansları sonuçları verilmektedir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması sonucu oluşan MN oluşum frekansları  $0.0249 \pm 0.01070$  (ortalama  $\pm$  standart sapma) ortalama ile 0.0090 ve 0.049 aralığında dağılım göstermektedir. Sağlıklı gruba ait doğal mikronükleus sıklıkları ile *in vitro* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması sonucu oluşan MN frekansları

eşleştirilmiş t-testi ile karşılaştırıldığında aradaki fark anlamsız bulunmuştur ( $p=0,23$ ; Tablo 4.5).

**Tablo 4.5** Grup içi eşleştirilmiş t-testi sonuçlarının karşılaştırılması

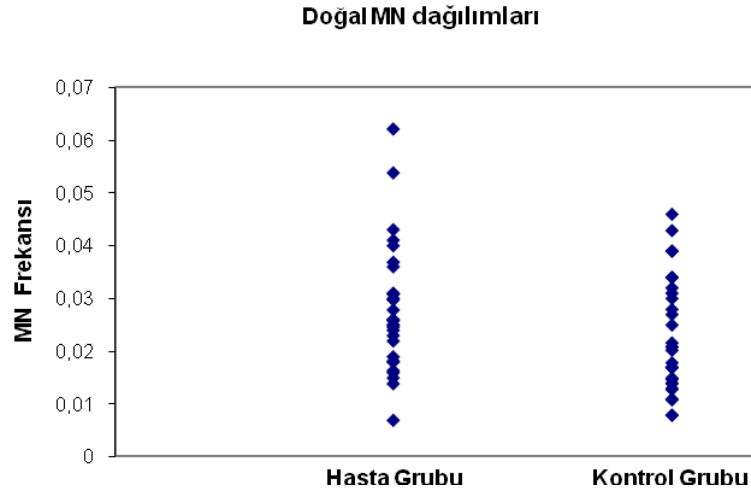
	Hasta grubu	Kontrol grubu
Doğal MN frekansı $\pm$ SD	$0.0279 \pm 0.01177$	$0.0227 \pm 0.01067$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> MN frekansı $\pm$ SD	$0.0274 \pm 0.01250$	$0.0249 \pm 0.0170$
Eşleştirilmiş t-testi sonucu	$p = 0,81$	$p = 0,23$

Tablo 4.6’da belirtilen sonuçlara göre hasta grubun spontan MN frekansları ile sağlıklı grubun spontan MN frekansları eşleştirilmemiş t-testi (unpaired t-test) ile karşılaştırıldığında aradaki fark anlamsız bulunmuştur ( $p =0,08$ ). İki gruba ait veriler Şekil 4.1 de karşılaştırılmıştır.

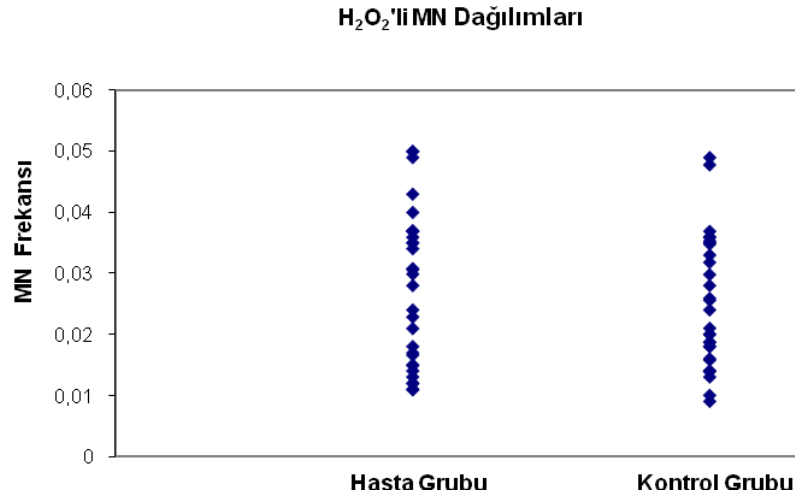
Aynı karşılaştırma hidrojen peroksit uygulanmış sağlıklı ve hasta grubu arasında yapıldığında, yine iki grup arasında farklılığın olmadığı ( $p=0,41$ ) Şekil 4.2’de gözlenmektedir.

**Tablo 4.6** Gruplar arası eşleştirilmemiş t-testi sonuçlarının karşılaştırılması

	Hasta grubu	Kontrol grubu	p değeri
Doğal MN frekansı $\pm$ SD	$0.0279 \pm 0.01177$	$0.0227 \pm 0.01067$	$p = 0.08$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> MN frekansı $\pm$ SD	$0.0274 \pm 0.01250$	$0.0249 \pm 0.00170$	$p = 0.41$



**Şekil 4.1** Hasta ve kontrol gruplarına ait doğal MN frekanslarının karşılaştırılması



**Şekil 4.2** Hasta ve kontrol gruplarına ait H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamalı MN frekanslarının karşılaştırılması

Kontrol grubuna ait doğal proliferatif indeksler ise 1.5262 ortalama ile 1.178 ve 2.150 aralığında (Tablo 4.3), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'li proliferatif indeksler de 1.6747 ortalama ile 1.360 ve

2.359 aralığında (Tablo 4.4) dağılım göstermektedir ve eşleştirilmiş t-testi ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark yine oldukça anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.01$ ; Tablo 4.8).

**Tablo 4.8** Grup içi eşleştirilmiş t-testi sonuçları

	Hasta grubu	Kontrol grubu
Spontan Pİ ortalaması	1.513 ± 0.2730	1.526 ± 0.2445
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Pİ ortalaması	1.614 ± 0.2558	1.675 ± 0.2351
Eşleştirilmiş t-testi	$p < 0.01$	$p < 0.01$

Tablo 4.9 da gösterilen gruplar arası eşleştirilmemiş t-testi sonuçlarına göre kontrol ve hasta grubuna ait olan spontan Pİ değerleri karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ( $p = 0.84$ ). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'li Pİ değerleri karşılaştırıldığında ise iki grup arasında yine anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ( $p = 0.34$ ).

**Tablo 4.9** Gruplar arası eşleştirilmemiş t-testi sonuçları

	Hasta grubu	Kontrol grubu	Eşleştirilmemiş t-testi
Spontan Pİ ortalaması	1.5129 ± 0.2730	1.5262 ± 0.2445	$p = 0.84$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Pİ ortalaması	1.6138 ± 0.2558	1.6747 ± 0.2351	$p = 0.34$

Genel bir değerlendirme ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in hücrelerde oluşturduğu oksidatif stres sonucunda meydana gelen MN oluşum frekanslarında artma veya azalma gözlemlenmemiş ve gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda fark görülmemiştir. Proliferatif indekslerin karşılaştırılmasından elde edilen sonuçlara bakıldığında ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının gerek hasta grubunda gerekse sağlıklı bireylerde hücrelerin bölünme hızını arttırdığı gözlemlenmiştir (Tablo 4.8).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Balon anjioplasti (PTCA), Renal Balon anjioplasti (PTA; peripheral transluminal angioplasty), koroner stent uygulamaları, renal, iliak ve subklavian stent uygulamaları, mitral balon valvoplasti gibi girişimsel (invaziv) kardiovasküler prosedürler, kardiovasküler hastalıkların teşhis ve tedavisinde uygulanmaktadır [32]. Bu prosedürler teşhis amaçlı radyasyon kullanımı gerektirdiğinden, hastaların radyasyona maruziyeti söz konusudur. Bu maruziyet birkaç yüzden (koroner anjiografi için) birkaç bin (çeşitli koroner stent yerleşimi için) aralığında değişen miktarlardaki göğüs röntgen filmlerine eşdeğerdir. Ateroskleroz hastasının invaziv kardiovasküler prosedürler sonrasında radyasyon maruziyetine kalmaları sonucu DNA hasarı geliştiği önceden yapılan çalışmalarla bilinmektedir [32].

Somatik mutasyonların akümüülasyonunun aterosklerotik hastalıkların başlangıcı ve ilerleyişinde önemli bir risk oynadığı önceden yapılan çalışmalarla desteklenmektedir [14,45,47]. Fakat buna dair kromozom aberasyonlarını araştıran çok az sayıda çalışma bulunmakta ve çok sayıda açıklanamamış soru da bulunmaktadır [10,13,45-47].

Yapılan bu tezde koroner ateroskleroz teşhisi anjiografi işlemi yapılarak konulmuş hasta grubu ile çalışılmıştır. Bu hastalığın teşhisinde en güvenilir yöntem olan anjioplasti hastalarda uygulanarak bir veya iki damarı tıkalı olan ve 40 yaş üstü hastalar seçilmiştir. Bu araştırmanın amacı olarak kullanılan MN testi ile radyasyon ışınlamasına ve girişimsel tedaviye gerek kalmadan ateroskleroz hastalığının ön tanı ile tespitinde uygulanabilirliği çalışılmıştır. MN tekniğini kullanmaktaki amaç, MN tekniğinin duyarlı bir kromozom hasar biyomarker'ı olmasının yanı sıra hem kolay, hem daha hızlı, hem daha ucuz ve genotoksik değişikliklerinin tayininde en ideal yöntemlerden biri olmasıdır [32,45]. Hastalardan elde edilen bulguların karşılaştırılacağı kontrol grubu da hasta grubunu oluşturan bireylere uygun yaştaki sağlıklı bireylerden oluşmaktadır. Hasta ve sağlıklı kontrol bireylerin lenfositlerindeki spontan ve hidrojen peroksit uygulaması sonucu meydana gelen MN frekansları arasındaki ilişki kantitatif olarak incelenmiştir. Ayrıca her bireyin proliferatif etkinliğine bakılarak hasta ve sağlıklı gruplar arasındaki hücre bölünmelerinin kıyaslaması yapılmıştır.

Hasta ve sağlıklı gruplara genotoksik ve sitotoksik düzeyde etkisi olmayan hidrojen peroksit uygulaması ile elde edilen MN frekansları ve iki gruba ait spontan MN frekansları gerek grup içi ve gerekse gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Bireylere ait spontan MN frekansları kontrol edemediğimiz faktörler tarafından belirlendiğinden laboratuvar ortamında kontrollü olarak her bireye aynı stres faktörü uygulanarak katılımcıların verebileceği farklı cevapların elde edilebilmesi amacıyla, doğal MN frekanslarının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'li MN frekanslarından çıkarılması ile elde edilen mutlak MN frekansları (bireylerdeki farklılıkları yaratacağından) kullanılmıştır. Elde edilen mutlak MN frekansları bireylerin yaşamları boyunca beslenme alışkanlıkları ve çevresel şartlara bağlı olarak gelişmiş olabilecek kümülatif hasar birikimlerinin önüne geçerek laboratuvarında yüklenen oksidatif hasarın göstergesi olmuştur.

Mutlak MN frekansları hasta grubunda -0.01673 ve 0.02400 aralığında -0.000454 ortalama ile; kontrol grubunda ise -0.02101 ve 0.01896 aralığında 0.002250 ortalama ile değişkenlik göstermiştir. İki gruba ait bu değerler karşılaştırıldığında ise aradaki fark anlamsız bulunmuştur (p=0.3035; Tablo 5.1).

**Tablo 5.1** Eşleştirilmiş t-testine göre mutlak MN frekans dağılımı sonuçları

	Hasta grubu	Kontrol grubu	t-test
Mutlak MN frekansı ortalaması	-0.000454 ± 0.01003	0.002250 ± 0.01016	p = 0.3035

İki gruba ait mutlak MN frekanslarının benzer olduğu Şekil 5.1'de görülmektedir. Hasta grubu ile kontrol grubunun doğal ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'li MN'leri arasında anlamlı fark görülmediği gibi iki grubun mutlak mikronükleusları arasında da farklılık izlenmemiştir.



**Şekil 5.1** Hasta ve sağlıklı gruba ait mutlak MN dağılım grafiği

Yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan koroner ateroskleroz hastalığında, yaşlılıkla beraber artan oksidatif stres sonucu bireylerin hücrelerinde kümülatif kromozom hasarları ile oluşan MN'larda sağlıklı bireylere oranla bir artış saptanamadığından, koroner aterosklerozla kromozom hasarları arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Hasta ve sağlıklı bireylerin yer aldığı gruplar kendi içlerinde spontan ve  $H_2O_2$  uygulanması sonrası elde edilen proliferatif indeksler yönünden karşılaştırıldığında, her iki grupta da  $H_2O_2$  sonrası Pİ'lerin yani hücre bölünmesi etkinliğinin arttığı gözlenmiştir ( $p < 0.01$ ; Tablo 4.8). Bu sonuçla tezde kullanılan hidrojen peroksit miktarının hücre bölünmesi üzerine sitotoksik etki oluşturmadığı ve tam tersine bölünmeyi arttırdığı düşünülmektedir.



## SONUÇ

Koroner ateroskleroz teşhisi konmuş olan 40 yaş üstü hasta grubu ile bu yaş grubuna uygun sağlıklı katılımcıların lenfositlerindeki spontan ve *in vitro* hidrojen peroksit uygulaması sonucu meydana gelen MN frekansları, mutlak MN frekansları ve proliferatif indekslerinin karşılaştırıldığı bu tezde, hasta ve kontrol grubu arasında bir farklılığın gözlenememesi sonucu olarak yaşlılıkla ilişkili ortaya çıkan koroner aterosklerozun lenfosit kromozomlarında meydana gelen hasarlar ile belirlenemeyeceği görüşü öne çıkmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. BUTURAK A., 2006, *Akut Koroner Sendromlarda İnterlökün Gen Polimorfizmi*, Kardiyoloji Uzmanlık Tezi, Prof. Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp ve Araştırma Hastanesi Kardiyoloji Kliniği.
2. DURAN E., 2004, *Hasta Bilgilendirme Kitapçığı*, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, Edirne.
3. BOLOGNESI, C., LANDO, C., FORNI, A., LANDINI, E., SCARPATO, R., MIGLIORE, L., BONASSI, S., 1999, Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes, *Age and Ageing*, 28: 393-397.
4. HALL, G., Kasım 2001, *Textbook of Medical Physiology*, Yüce yayınları nobel tıp kitabevleri ltd.sti.ortak yayını, 975-420-129-3.
5. <http://www.kanbilim.com/index.htm> [Ziyaret Tarihi: 14.11.2008].
6. BENINSON, D., LLOYD, D., C., NATARAJAN, A., T., OBE, G., PRESTON, R., J., 1986, International Atomic Energy Agency, Technical Report. No.260., *Biological Dosimetry: Chromosomal Aberration for dose assessment*, IAEA 1986-10, Vienna, 920125086X.
7. NALBANT, S., 2006, The Biology Of Aging, *Turk J Phys. Med. Rehab.*, 52, A12-A17.
8. KUTSAL, G.Y., 2005, Yaşlanan kadının sağlık sorunları, *Yaşlanan Kadın Sempozyumu*, 7 Mart 2005 Kırmızı Salon Hacettepe Üniversitesi Kültür Merkezi, Ankara: Hüksam-H.Ü.Gebam, 10-11.
9. ÇAKATAY, U., KAYALI, R., 2006, The Evolution of Free Radical Biochemistry in Historical Perspective, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 37, 162 –167.
10. TÜRKOĞLU, Ü.M., AKALIN, Z., İLHAN, E., YILMAZ, E., BİLGE, A., NİŞANCI, Y., UYSAL, M., 2004, Investigation of oxidative DNA damage in parents with coronary heart disease, *The Medical Journal of Kocatepe*, 5, 55-58.
11. BOLOGNESI, C., ABBONDANDOLO, A., BARALE, L., 1997, Age- related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosom aberrations, and MN in human lymphocytes, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 6, 249-256.

12. JHONSON, B., SINCLAR, A., GUARENTE, L., 1999, Molecular Biology of aging, *Cell*, 96, 291-302.
13. DEMİRBAĞ, R., YILMAZ, R., KOCYİĞİT, A., 2005, Relationship between DNA damage, total antioxidant capacity and coronary artery disease, *Mutation Research*, 570, 197-203.
14. ANDREASSI, M.G., 2003, Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of contributive factors for oxidative DNA damage, *Mutation Research*, 543, 76-86.
15. BOTTO, N., MASETTI, S., PETROZZI, L., VASALLE, C., MANFREDI, S., BIAGINI, A., ANDREASSI, M.G., 2002, Elevated Levels of oxidative DNA damage in patients with coronary artery disease, *Coronary Artery Disease*, 13, 269-274.
16. MÜFTÜOĞLU, M., 2003, DNA Repair and premature aging syndromes, *Turkish Journal of Biochemistry*, 28, 20-24.
17. BOTTO, N., RIZZA, A., COLOMBO, M.G., 2001, Evidence for DNA damage in patients with coronary artery disease, *Mutation Research*, 493, 23-30.
18. COOKE, S.M., EVANS, D.M., DIZDAROĞLU, M., LUNEC J., 2003, Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease, *FASEB J.*, 17, 1195-1214.
19. KARASU, Ç., 2008, The role Of Oxidative Stress, *Türkiye Klinikler J Med Sci*, 28 (Suppl): S1-S11.
20. BENNET, M.R., 2001, Reactive Oxygen Species and Death, Oxidative DNA Damage in Atherosclerosis, *American Heart Association*, 88, 648-650.
21. AKGÜN, G., *Yaşlılıkla Birlikte Görülebilirliği Artan Hastalıklar*, [http://www.saglik.tr.net/genel\\_saglik\\_yaslilik\\_hastaliklar.shtml](http://www.saglik.tr.net/genel_saglik_yaslilik_hastaliklar.shtml) - 18k [Ziyaret Tarihi: 15 Kasım 2008].
22. Sosyal Sektörler ve Koordinasyon Genel Müdürlüğü, 2007, *Türkiye'de Yaşlıların Durumu ve Yaşlanma Ulusal Eylem Planı*, 978-975-19-4115-5.
23. DEMİRCAN, G., DIRAMAN, E., DEMİRCAN, S., Aralık 2005, The Role Of Oxidative Stress in Heart Diseases, *Türk Kardiyoloji Derneği*, 33(8), 488-492.
24. WATSON, J., CRICK, F., 1953, Molecular Structure of Nucleic Acids; A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid, *Nature*, 171:737-738.

25. <http://www.cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/triplexes/STRUCTURE.HTML> [Ziyaret Tarihi: 14.11.2008].
26. [http://www.bioscience.ws/encyclopedia/index.php?title=Direct\\_DNA\\_damage](http://www.bioscience.ws/encyclopedia/index.php?title=Direct_DNA_damage) [Ziyaret Tarihi: 14.11.2008].
27. <http://content.answers.com/main/content/img/BritannicaConcise/images/72136.jpg> [Ziyaret Tarihi: 14.11.2008].
28. FENECH, M., 1993, The cytokinesis-block micronucleus techniques: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Research*, 285, 35-44.
29. LLOYD, D.C., DOLPHIN, G.W., 1977, Radiation Induced Chromosome Damage in Human Lymphocytes, *British Journal of Industrial Medicine*, 34, 261-273.
30. ALBERTINI, R.J., ALTLAND, K., CARRANO, A.V., CZEIZEL, A., DOUGLES, G.R., EVANS, H.J., HOOK, E.B., MILLER, J.R., MOHRENWEISER, H., NEWCOMBE, H.B., PRESTON, R.J., SMITH, E.M.B., SMITH, M., WARBURTON, D., 1985, *Environmental health criteria 46, Guidelines for the study of genetic effects in human populations*, World Health Organization Geneva, 92-4-150186-5.
31. MATEUCA, R., LOMBAERT, N., AKA, P.V., DECORDIER, I., KIRSCHVOLDERS, M., 2006, Chromosomal changes: induction, detection methods, and applicability in human biomonitoring, *Biochimie*, 88, 1515-1531.
32. ANDREASSI, G.M., CIOPPA, A., MANFREDI, S., PALMIER, C., BOTTO, N., PICANO, E., 2007, Acute chromosomal DNA damage in human lymphocytes after radiation exposure in invasive cardiovascular procedures, *European Heart Journal*, Italy, 27, 2195-9.
33. FENECH, M., MORLEY, A.A., 1985, Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Research*, 147, 29-26.
34. THOMAS, P., UMEGAKI, K., FENECH, M., 2003, *Mutagenesis*, Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay, 18, 187-194.
35. <http://www.igcar.ernet.in/igc2004/sg/micronuc.htm> [Ziyaret Tarihi: 14.11.2008].
36. FENECH, M., HOLLAND, N., CHANG, W.P., ZEIGER, E., BONASSI, S., 1999, The Human Micronucleus Project: an international collaborative study on

- use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans, *Mutation Research*, 428, 271-283.
37. TIAN, Y., ISHIKAWA, H., PIAO, F.Y., YAMAMOTO, H., YAMAUCHI, T., DUAN, Z.W., ZHANGG, Y. M., MA, M.Y., CUI, J.S., 2003, Micronucleus Assay Of Human Lymphocytes: a comparison of Cytokinesis-block and human capillary blood lymphocytes methods, *J Occup Health*, 45:408-409.
  38. ROSEFOLT, C., FAUTH, E., ZANKI, H., 2004, Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay, *Mutagenesis*, vol.19 no. 4 pp. 277-284.
  39. <http://we.vub.ac.be/~cege/volders/ENG/tests/MN.htm> [Ziyaret Tarihi: 14.11.2008].
  40. NIAS, A.H.W., 1998, *An Introduction to Radiobiology*, England, Wiley, Chichester, 978-0-471-97590-8.
  41. FENECH, M., 2000, The in vitro micronucleus technique, *Mutation Research*, 455, 81-95.
  42. FENECH, M., CHANG, W.P., VOLDERS-KRISCH, M., HOLLAND, N., BONASSI, S., ZEIGER, E., 2003, Human Project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Research*, 534, 65-75.
  43. [http://www.massey.ac.nz/~imbs/images/al\\_micronucleus.jpg=al](http://www.massey.ac.nz/~imbs/images/al_micronucleus.jpg=al) [Ziyaret Tarihi: 18.11.2008].
  44. EASTMOND, D.A., TUCKER, J.D., 1989, Identification of aneuploidyinducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Env. Mol. Mutagen*, 13 (1) 34-43.
  45. ANDREASSI, G.M., BOTTO, N., 2003, DNA damage and Atherosclerosis, *Cell Cycle, Genetic instability*, Italy, 2:3, 224-227.
  46. ORTA, T., GÜNEBAKAN, S., ALTUN, M., DİNÇER, M., KEMİKLER, G., 2003, Lack of a Correlation Between Micronucleus scores in Cytokinesis-Blocked Lymphocytes and Cancer Patient Response to Radiotherapy, *Roentgenologia and Radiologia*, 2, 113-117.
  47. ANDREASSI, G.M., BOTTO, N., 2003, DNA damage as a emerging risk factor in atherosclerosis, *Trends Cardiovasc Med.*, 13, 270-275.

## ÖZGEÇMİŞ

18 Temmuz 1984'de İstanbul'da doğdum. 1995 yılında Şair Nedim İlköğretim okulunu bitirdim. 2002 yılında Vatan Anadolu Lisesi'nden mezun oldum. 2006'da İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimimi tamamladım. 2006 yılından beri İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak Genel Biyoloji programında Tezli Yüksek Lisans eğitimime devam etmekteyim.