

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**PARKİNSON HASTALIĞI TANISI ALAN OLGULARDA
METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ
GENİ POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Ramazan EMRE

**Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

ESKİŞEHİR

2011

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

PARKİNSON HASTALIĞI TANISI ALAN OLGULARDA
METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ
GENİ POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Ramazan EMRE

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI
Doç. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU

ESKİŞEHİR
2011

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Ramazan EMRE'ye ait "Parkinson hastalığı tanısı alan olgularda metilentetrahidrofolat redüktaz geni polimorfizmlerinin araştırılması." adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:

Jüri Başkanı

Prof.Dr. Sevilhan ARTAN

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Üye

Doç.Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Üye

Doç.Dr. Serhat ÖZKAN

Nöroloji Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun
ve Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Tarih

Prof.Dr.Necmi ATA

Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren sayın hocalarım Prof.Dr. Sevilhan ARTAN'a, Doç.Dr. M.Hamza MÜSLÜMANOĞLU'na, Yrd. Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR'e, Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR'e, Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK ARAS'a; ayrıca tezimde bana yardımcı olan Nöroloji Anabilim Dalından Doç.Dr. Serhat ÖZKAN'a yardımları ve destekleri için teşekkür ederim.

ÖZET

Emre, R. Parkinson hastalığı tanısı alan olgularda metilentetrahidrofolat redüktaz geni polimorfizmlerinin araştırılması. Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2011.

Metilentetrahidrofolat redüktaz geni polimorfizmleri ve levodopa tedavisi Parkinson hastalarında homosistein seviyesini artırabilir. Çalışmamızda hiperhomosisteinemi ile ilişkili Parkinson hastalığı (PH)'nın patogeneğinde bu faktörlerin etkileşimini araştırdık. Plazma homosistein (Hcy) seviyesi ve MTHFR polimorfizmlerini (C677T, A1298C) sporadik PH tanısı almış levodopa alan, dopamin agonisti alan ve levodopa ve entakaponu birlikte alan 70 hasta ve 100 sağlıklı birey ile karşılaştırdık. MTHFR geni C677T polimorfizminin hasta ve kontrollerdeki dağılımı birbirine yakındı ancak TT genotipinin hastalarda (%11.4) kontrollere (%6) göre fazla oranda bulunduğu tespit edildi. Plazma Hcy seviyesinin TT genotipini taşıyan hasta ve kontrollerde en yüksek seviyelerde olduğu gözlemlendi. A1298C polimorfizmi için farklı genotipler arasında Hcy düzeyi açısından anlamlı fark saptanamadı. Hcy düzeyi, levodopa alan hastalar ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. Aynı zamanda plazma Hcy seviyesi ile hastalığın süresi arasında da korelasyon saptanamadı. Sonuçta; MTHFR geni C677T polimorfizminin TT genotipi, Parkinson hastalığı tanısı alan hastalarda hiperhomosisteinemi için önemli bir faktör olarak değerlendirilebilir.

Anahtar Kelimeler: Parkinson Hastalığı, MTHFR (C677T, A1298C), Hiperhomosisteinemi, Levodopa, Entakapon.

ABSTRACT

Emre, R. Investigation of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in patients with Parkinson's disease. Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Speaciality Thesis in Department of Medical Genetics, Eskişehir,2011. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and Parkinson's disease patients with levodopa therapy may increase homocysteine levels. In our study, we investigated the interaction of these factors in the pathogenesis of Parkinson's disease (PD) that is associated with the hyperhomocysteinemia. Plasma homocysteine (Hcy) levels and MTHFR polymorphisms (C677T, A1298C) were compared in 100 healthy subjects and 70 patients that are diagnosed as sporadic PD and taking levodopa, taking dopamine agonists, and taking entakapon and levodopa together. The distribution of the MTHFR gene C677T polymorphism in patients and controls was close to each other, but patients with the TT genotype (11.4%) were found more frequently when compared to controls (6%). Plasma Hcy level in patients and controls with the TT genotype was observed as the highest levels. Hcy levels between different genotypes for the A1298C polymorphism, there was no significant difference. Difference of hcy levels between patients taking levodopa and other groups was not statistically significant. At the same time there was no correlation between plasma Hcy level and disease duration. In conclusion, the TT genotype of MTHFR gene C677T polymorphism, can be considered as an important factor for hyperhomocysteinemia in patients with Parkinson's disease.

Key Words: Parkinson's disease, MTHFR(C677T, A1298C), Hyperhomocysteinemia

Levodopa, Entacapon

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Parkinson Hastalığının Tarihçesi	3
2.2. Parkinson Hastalığının Epidemiyolojisi	3
2.3. Parkinson Hastalığının Kliniği	4
2.3.1. Tremor	5
2.3.2. Bradikinezi	5
2.3.3. Rijidite	5
2.3.4. Postural İnstabilite	6
2.4. Parkinson Hastalığının Patogenezi	6
2.4.1. Oksidatif Stres	8
2.4.2. Mitokondriyal Disfonksiyon	9

	Sayfa
2.4.3. Protein Agregasyonu	9
2.4.4. Ubikütin proteozom Sistemi	10
2.5. Parkinson Hastalığının Genetiği	11
2.5.1. PARK1 (α -sinüklein, SNCA)	11
2.5.2. PARK2 (Parkin)	12
2.5.3. PARK3	12
2.5.4. PARK5 (UCHL-1)	13
2.5.5. PARK6 (PINK1)	13
2.5.6. PARK7 (DJ-1)	13
2.5.7. PARK8 (Dardarin, LRRK2)	14
2.5.8. PARK9 (ATP13A2)	14
2.6. Homosistein Metabolizması	14
2.6.1. Hiperhomosisteinemi	18
2.6.2. Homosistein ve Nörodejenerasyon	22
2.7. MTHFR Geni	23
2.8. Genetik Polimorfizm	24
2.9. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmleri	25
2.10. Polimorfik Markırların Genotiplendirmesinde PCR Kullanımı	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Hasta Grubu	28
3.2. Kontrol	28

	Sayfa
3.3. Gereçler	28
3.3.1. Kullanılan Aletler	28
3.3.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	29
3.4. Yöntemler	30
3.4.1. E.Z.N.A. Ekstraksiyon Kiti ile Kandan DNA Elde Edilmesi	30
3.4.2. C677T Polimorfizmini İçeren Genomik Bölgenin PCR ile Amplifikasyonu	31
3.4.3. A1298C Polimorfizmini İçeren Genomik Bölgenin PCR ile Amplifikasyonu	32
3.5. Amplifikasyon Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi	34
3.5.1. C677T Polimorfizmini İçeren Genomik Bölgenin Hinf I Restriksiyon Enzimi ile Kesimi	34
3.5.2. A1298C Polimorfizmini İçeren Genomik Bölgenin Mbo II Restriksiyon ile Kesimi	34
3.5.3. Enzim Kesim Ürünlerinin Agaroz jel Elektroforezi ile Ayrılması	35
3.6. Plazma Homosistein, Folat ve B12 Vitamini Ölçülmesi	35
3.7. İstatistiksel Analiz	35
4. BULGULAR	37
4.1. Araştırma Grubu Bireylerinin Demografik Özellikleri	37
4.2. C677T Polimorfizminin RFLP Yöntemi ile İncelenmesi	38
4.3. A1298C Polimorfizminin RFLP Yöntemi ile İncelenmesi	39
5. TARTIŞMA	46
KAYNAKLAR	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP	Adenozin Trifosfat
A	Adenin
BHMT	Betain Homosistein Metil Transferaz
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
BG	Bazal Gangliyon
bp	Baz çifti
C	Sitozin
CBS	Sitatyonin β - Sentaz
COMT	Katekol-O-Metiltransferaz
DA	Dopami
DHF	Dihidrofolat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleik Asit Trifosfat
E	Entakapon
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FAD	Flavin Adenin Dinükleotit
FHMT	S-metiltetrahydrofolat Homosistein Metiltransferaz
Hcy	Homosistein
Hz	Hertz
IBR	In-between region
kb	Kilobaz
L	L-dopa, levodopa
LRRK2	Leucine-Rich Repeat Kinase 2 geni
Mb	Megabaz

μ l	Mikrolitre
mtDNA	Mitokontriyal DNA
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
MTHFR	Metilentetrahidrofolat Redüktaz
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NMDA	N-metil D-aspartik asit
NO	Nitrik Oksit
OD	Otozomal Dominant
ODPH	Otozomal Dominant Parkinson Hastalığı
3-OMD	3-O-Metildopa
OR	Otozomal Resesif
ORPH	Otozomal Resesif Parkinson Hastalığı
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PH	Parkinson Hastalığı
RE	Restriksiyon Enzimi
RFLP	Restruction Fragment Lenght Polymorphism
SAH	S-adenozil Homosistein
SAM	S-adenozil Metiyonin
SN	Substansiya Nigra
SNCA	Sinüklein Alfa Geni
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
SNPc	Substantiya Nigra Pars Kompakta
SOD	Süperoksit Dismutaz Enzimi
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SSS	Santral Sinir Sistemi
T	Timin

THF	Tetrahidrofolat
UBL	Ubikitin legion
UPDRSIII	Unified Parkinson's Disease Rating Scale-III
UPS	Ubikütün Proteozom Sistemi

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Homosistein metiyonin metabolizması	16
2.2. L-dopa ve homosistein metabolizması	20
2.3. Homosistein metabolik yolunun ve COMT inhibisyonunun hipotetik mekanizması	21
2.4. RFLP analizi	26
4.1. C677T polimorfizmini içeren genomik bölgenin PCR sonrası jel elektroforez görüntüsü	38
4.2. C677T polimorfizmini içeren genomik bölgenin kesim sonrası jel elektroforez görüntüsü	39
4.3. A1298C polimorfizmini içeren genomik bölgenin PCR sonrası jel elektroforez görüntüsü	40
4.4. A1298C polimorfizmini içeren genomik bölgenin kesim sonrası jel elektroforez görüntüsü	40

TABLOLAR

	Sayfa
4.1. Hastaların ve kontrollerin cinsiyetlerine göre dağılımı	37
4.2. Olguların hastalık başlangıç yaşına göre dağılımı	38
4.3. Çalışmada değerlendirilen olguların klinik özellikleri	41
4.4. Hasta ve kontrollerin biyokimyasal değerleri, MTHFR genotip, allel frekans dağılımı	42
4.5. Hasta ve kontrol Hcy düzeyi ve MTHFR genotip dağılımı	43
4.6. Hasta ve kontrollerin klinik özellikleri ve biyokimyasal değerleri	44
4.7. Hasta ve kontroller MTHFR genotip dağılımı	45
5.1. Farklı toplumlardaki Hcy düzeyleri	51

1. GİRİŞ

Parkinson hastalığı (PH), ilk olarak 1817 yılında İngiliz hekim James Parkinson tarafından '*shaking palsy* (titrek felç)' adıyla tanımlanmıştır. Fransız Nörolog Jean Martin Charcot, PH'ye gereken önemi göstermiştir. Üzerinde geniş çaplı bir araştırma yaptıktan sonra hastalığa Dr. James Parkinson'un adını vermiştir (1,2). PH'nin etiyopatogenezine yönelik ilerlemeler kaydedildi. PH ile ilgili genetik çalışmalar yapılmıştır. PH'yi epidemiyolojik olarak değerlendirirsek uzun preklinik dönem varlığı, tanısız test olmaması, ileri yaş hastalığı olması ve tanı için postmortem muayene ihtiyacı olması gibi zorlukları vardır (3). PH insidansının en önemli faktörü yaştır. PH insidansının 60 ve 80'li yaşlar arasında artışı söz konusudur (4). PH insidansı çoğu toplumda, erkeklerde kadınlara göre daha yüksektir (5). Eskişehir'de yapılan bir çalışmada ise prevalans değeri 111/100.000 olarak bulunmuştur (7). Hastalık en az siyah ırkta görülmektedir. Ayrıca siyah ırkta PH'nin diğer ırklara göre daha az görülmesi, deri melanin pigmentinin toksik bileşiklerin girişini engelleme ihtimali olabilir (8). Kırsal yaşam, kuyu suyu kullanmak, tarımla uğraşmak PH için risk faktörü olduğu belirtilmiştir (9).

Beslenme alışkanlıklarının hastalık etiyopatogenezinde ki rolünü belirlemek amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Hollanda'da yapılan bir çalışmada Parkinson hastalarında, kontrollerle karşılaştırıldığında E vitamini alımının daha düşük olduğu belirlenmiştir (10). Sigara kullananlarda PH'nin daha az görüldüğü bilinmektedir. Bir çalışmaya göre sigara PH riskini %40 azaltmaktadır. Kahve ve kafein tüketiminin PH'ye karşı koruyucu etki yaptığını dair çalışmalar mevcuttur (11,12). Çevresel etkenler arasında ise pestisitler, karbon monoksit, tarımsal ilaçlara maruziyet, endüstriyel ajanlar, metaller (mangan, civa, demir) PH için risk faktörlerini oluşturur (13). PH'nin patolojisinde substantiya nigra pars kompaktadaki (SNPc) pigmentli nöronların kaybı vardır. Bununla beraber bazen intrasitoplazmik Lewy cisimciği görülmektedir. PH kliniği; progresif seyreden, kronik bir hastalıktır. PH sinsi başlar, istirahat tremoru, rijidite, akinezi/bradikinezi ve postural instabilite gibi major klinik bulgularla ortaya çıkar (14).

Çalışmamızda Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Hareket Bozukluğu Polikliniğine başvuran Londra Beyin Bankası tanı

kriterlerine göre PH tanısı alan 70 olgunun ve 100 sağlıklı bireyin periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Hasta ve kontrollerin homosistein (Hcy), folat ve vitamin B12 düzeylerini ölçmek için periferik kan örneği alınmıştır. Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) geninde C677T ve A1298C polimorfizmlerin bulunduğu genomik bölgeler, spesifik olarak tasarlanan primerler yardımıyla klasik PCR yöntemi ile amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon sonrası örneklerin Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP) analizi yapılmıştır. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

PH'de MTHFR genindeki C677T ve A1298C polimorfizmlerinin L-dopa tedavisi, L-dopa ile birlikte entakapon tedavisi ve sadece dopamin agonisti alan hastalarda bu ilaçların ve MTHFR genindeki polimorfizmlerin Parkinson hastalarında plazma Hcy düzeyi üzerine olan etkisini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Parkinson Hastalığının Tarihçesi

PH, çok eski çağlardan beri toplumlar tarafından bilinen bir hastalıktır. Eski Hint sağlık sisteminde “Kampavata” adı ile bilinen PH, ilk olarak 1817 yılında İngiliz hekim James Parkinson tarafından ‘*shaking palsy* (titrek felç)’ adıyla tanımlanmıştır. Yayınlanan makalenin tam adı, “Titremeli Felç Üzerine Bir Makale”dir. Bu makale ile PH tanımlanmış tıbbi bir durum olarak kabul edilmiştir. Makale, Dr. Parkinson’un karşısına çıkan 6 vakanın incelemesine dayanmakta ve bu hastalık üzerine daha fazla araştırma yapılmasını teşvik etme amacı taşımaktadır. Makalenin yayınlanmasından ancak 60 sene sonra Fransız Nörolog Jean Martin Charcot, PH’ye gereken önemi göstermiştir. Üzerinde geniş çaplı bir araştırma yaptıktan sonra hastalığa Dr. James Parkinson’un adını vermiştir (1,2).

2.2. Parkinson Hastalığının Epidemiyolojisi

PH, ikinci en sık karşılaşılan nörodejeneratif hastalıktır. Son zamanlarda PH ile ilgili yapılan genetik çalışmalar neticesinde, PH’nin etiyopatogenezine yönelik ilerlemeler kaydedildi. PH epidemiyolojisine baktığımızda; uzun prelinik dönem varlığı, ileri yaş hastalığı olması, tanısız test olmaması ve tanı için postmortem muayeneye ihtiyaç gibi zorluklar vardır. Bütün bu zorlukları aşacak gelişmeler olmakta ve hastalığın görülme sıklığı ile ilgili daha kesin veriler bulunmaktadır (3). PH her ırkta, her meslek grubunda görülebilen bir hastalıktır. Hastalık 20 yaşından önce başlarsa “primer juvenil parkinsonizm,” 20-40 yaşları arasında başlarsa genç başlangıçlı parkinsonizm olarak adlandırılır. Çalışmaları incelediğimizde PH kaba insidansı tüm yaş grupları için 100 000’de 4,5 ile 19 arasında değişmektedir. PH insidansının en önemli faktörü yaştır. Yapılan pek çok çalışmada 50 yaşın altında PH çok nadirdir. PH insidansı 60 ve 80’li yaşlarda arasında artış söz konusudur (4). PH insidansı çoğu toplumda, erkeklerde kadınlardan daha yüksektir. Kaliforniya’da yapılan bir çalışmada insidans erkeklerde 19/100 000, kadınlarda ise 9.9/100 000 bulunmuştur. PH insidansının ırklar veya etnik gruplar arasında farklılığını araştıran bazı çalışmalarda beyaz ırkda 13.2/100 000, Asyalılarda 11.3/100 000 ve siyahlarda 10.2/100 000 görülmüştür (5). Hastalık en az siyah ırkta görülmektedir. Hastalığın

prevalans değerleri arasında farklılıklar bulunur. Yapılan çalışmalarda prevalans 80.6/100 000 ile 187/100 000 arasında değişmektedir (6). Eskişehir’de yapılan bir çalışmada ise prevelans değeri 111/100 000 olarak bulunmuştur (7). Hastalık sıklığının coğrafik olarak değişimi aslında bir çevresel veya ırklar arası farklılık tabanındaki genetik değişiklerle ilişkili olabilir.

Hastalığın, çoğu çalışmada grldğu gibi erkeklerde daha sık görülmesi, biyolojik nedene işaret edebileceği gibi erkek ve kadın arası davranış farklılıklarının neden olabileceği risk faktörlerine maruziyet farkı nedeniyle olabilir. Ayrıca siyah ırkta PH’nin diğer ırklara göre daha az görülmesi, deri melanin pigmentinin toksik bileşiklerin girişini engelleme ihtimali olabilir (8). Pek çok çalışmada kırsal yaşam, kuyu suyu kullanmak, tarımla uğraşmak PH için risk faktörü olduğu belirtilmiştir. Kırsal alanda yaşam, kuyu suyu kullanımı ve tarımsal ilaçlara maruziyeti artırması nedeniyle PH riskini artırmaktadır (9). Diyetin hastalık etiyopatogenezindeki rolünü belirlemek amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların çoğunda yetersiz antioksidan alımı üzerinde durulur. Hollanda’da yapılan bir çalışmada Parkinson hastalarında, kontrollerle karşılaştırıldığında E vitamini alımının daha düşük olduğu belirlenmiştir (10). Sigara kullananlarda PH’nin daha az grldğu bilinmektedir. Bir çalışmaya göre sigara PH riskini %40 azaltmaktadır (11). Kahve ve kafein tktiminin PH’ye karşı koruyucu etki yaptığına dair çalışmalar mevcuttur (12). Sonuç olarak erkek cinsiyet, kafa travması, duygusal stres, ileri yaş, beyaz ırk, ailede PH varlığı; çevresel olarak ise pestisitler, karbon monoksit, tarımsal ilaçlara maruziyet, endüstriyel ajanlar, metaller (mangan, civa, demir) PH için risk faktörlerini oluşturur (3,13).

2.3. Parkinson Hastalığının Kliniği

PH genellikle 50-60 yaşlarda başlayan, progresif seyreden, kronik bir hastalıktır. PH’nin patolojisinde substantiya nigra pars kompaktadaki (SNPc) pigmentli nöronların kaybı ve bununla beraber bazen intrasitoplazmik Lewy cisimciği ile karakterizedir. PH sinsi başlar, istirahat tremoru, rijidite, akinezi/bradikinezi ve postural instabilite gibi major belirtilerle ortaya çıkar. İlk motor belirtiden önce çabuk yorulma, kişilik değişiklikleri görülebilir. Hastaların omuz ve kol kaslarında ağrı veya gerginlikler olabilir. Hastalık tipik olarak asimetrik

olarak gelişir ve motor belirtiler genellikle istirahat tremoru ile başlar. Hastalık seyri boyunca belirtiler vücudun diğer yarısına geçer ve her hastada değişen düzeylerde bradikinezi vardır (14,15).

2.3.1. Tremor

İstirahat tremoru, hastalarda ilk ortaya çıkan belirti olup hastaların %75'inde görülür. Tremor hareket sırasında kaybolur fakat ekstremitte belli bir pozisyonu aldığı anda tekrar ortaya çıkar. Çoğunlukla üst ekstremitenin distalinden ünilateral olarak başlar. Bazen sadece tek bir parmakta görülebilir. Tremor genelde baş ve işaret parmağının ritmik stereotipik para sayma hareketidir. Frekansı 3-7 Hz arasındadır. Tremor zamanla ipsilateral alt ekstremiteye ve daha sonra karşı vücut yarısına doğru yayılır ve diğer belirtilere göre daha yavaş ilerler. Tremor günlük periyot içinde şiddeti değişkendir ve uykuda kaybolup emosyonel stres durumlarında şiddeti artabilir (16).

2.3.2. Bradikinezi

Bradikinezi hareketin yavaşlaması olarak tanımlanır. Akinezi ise hareketin olmamasıdır. Hastalarda bir harekete başlamak ve onu devam ettirmek zordur. Bradikinezi tüm Parkinson hastalarında görülür. Hareketlerde yavaşlama anlamına gelen bradikinezi, PH'nin özürülük yaratan en temel belirtisidir. Bradikinezinin sebebi globus pallidustaki inhibitör dopaminerjik uyarıların azalması sonucu talamusun ventrolateral nükleusundaki nöronların inhibisyonunda artış ve motor korteksteki nöronların stimulusundaki kayıp nedeniyle ortaya çıkar (17). Hastaların sadece istemli motor hareketleri değil, mimik hareketleri, kolları sallama ve yutkunma gibi otomatik hareketlerinde de azalma olur. Hastalığın erken dönemlerinde hareket amplitüdünde azalma (hipokinezi) varken daha ileri dönemlerde bradikinezi ve akinezi gelişir (18).

2.3.3. Rijidite

Hastanın ekstremitte, boyun ve gövdesinin pasif hareketi sırasında her yöne ve hareket genliği boyunca hissedilen artmış dirençtir. Tremor ile birlikte PH'nin pozitif belirtilerini oluştururlar. Hareketin şiddeti ve hızından çoğunlukla etkilenmez.

Rijiditeden bütün kas grupları etkilenebilir. Dişli çark belirtisi, rijiditenin hareket esnasında kesintili olarak hissedilmesidir. Rijidite, istemli hareketleri sınırlar ancak hastalar motor hareketlerini rahat yaparlar. Bradikinezi hastanın özürülülüğünde rijiditeden daha belirleyicidir. PH olgularının %89-99'unda görülür. Rijidite değişik derecededir ve çoğunlukla tremor gibi ipsilateral başlar ve daha sonra diğer tarafa yayılabilir (19).

2.3.4. Postural İnstabilite

Postural refleksler ayakta durmamızda ve herhangi bir postürü sürdürürken dengede durmamızı, hareket esnasında yön değiştirirken dengemizi korumamızı sağlar. Postural instabilite, postural reflekslerin kaybı nedeniyle ortaya çıkan denge bozukluğudur. Genelde hastalığın geç evrelerinde ortaya çıkar. PH bulguları içinde özürülülüğe en sık neden olanı ve tedaviye en dirençli olanıdır (20). Hastada başlangıçta kol fleksiyonu ile başlayan, sonra gövde ve boyun fleksiyonunun eklendiği öne doğru eğik bir duruş görülür. Hasta daha sonraki zamanlarda öne ve arkaya doğru düşme meyli gösterir, düşmemek için ağırlık merkezini yakalamaya çalışır şekilde yürür ve durmakta güçlük çeker (19).

Bu dört kardinal bulgunun yanında Parkinson hastalarında; kognitif etkilenme ve davranış bozuklukları (demans, bradifreni, vizyospasyal defisitler, depresyon, anksiyete, uyku bozukluğu, delüzyon, halüsinasyon gibi), otonomik bozukluklar (ortostatik hipotansiyon, konstipasyon, cinsel işlev bozuklukları, anormal termoregülasyon, idrar inkontinansı gibi), duyuşal semptomlar (ağrı, küntlük hissi, yanma, elektriklenme gibi), kraniyofasial bozukluklar (maske yüz, göz kırpmasının azalması, bulanık görme, olfaktör bozukluklar, disfazi, siyalore gibi), iskelet deformiteleri (elde unlar deviasyon, metakarpofalangeal ve distal interfalangeal eklemlerin fleksiyonu, ayak baş parmağın tonik ekstansiyonu) mikrografi ve kilo kaybı gözlenebilir (21).

2.4. Parkinson Hastalığının Patogenezi

PH ikinci en sık nörodejeneratif hastalık olması ve beklenen yaşam süresinin uzamasından dolayı hastalığın görülme sıklığının artması nedeniyle halk sağlığı açısından önemli hale gelmiştir. Hastalığın tüm evrelerinde görülen motor belirtilere

yönelik tedaviler geliştirilmiştir. Ancak tedaviye cevap alınmadığı durumlarda daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ile hastalığın tedavisi mümkün olacaktır. Bu nedenle hastalığın karmaşık moleküler mekanizmasını anlamamız gereklidir. PH'nin etiopatogenezinde genetik faktörler, çevresel faktörler ve patojenik mekanizmalar rol almaktadır. PH'de seçici nöron kaybı esas olarak substansiya nigradaki (SN) dopaminerjik nöronların bazı grubunda başlamaktadır. İlk klinik belirtilerin görülmesi bu nöronların %60'ının kaybedildikten sonra, yaklaşık 5 yıllık bir presemptomatik dönemden sonra olur (22).

PH klasik olarak SN'deki nöron kaybı ve gliozisin yakınındaki nöronlarda intrasitoplazmik eozinofilik inklüzyon cisimlerinin (Lewy cisimciği) bulunması ile tanımlanır. Ancak lewy cisimciklerinin görülmemesi klinik ve patolojik olarak tanısı konulmuş hastaları dışlamamaktadır. Lewy cisimciğinin ana bileşeni α - sinükleindir. PH patolojisinde, nöronlarda protein agregasyonu (α - sinüklein birikmesi), bozulmuş mikro ve makro degradasyon, protein yıkım yollarındaki bozukluklar, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres ve antioksidatif disfonksiyon gibi patojenetik mekanizmalar yer almaktadır. Bu mekanizmalarla beraber daha nadir olarak bozulmuş kinaz aktivitesi ve apoptozis, büyük ihtimalle bazı noktalarda kesişen intraselüler yolakları oluşturarak devreye giren nöroinflamatuvar süreçlerin de etkisi neticesinde apoptozis ve muhtemelen otofaji ile gerçekleştirilen hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda beklentiler, gelecekte daha etkin moleküler temelli tedavi protokollerinin gelişmesidir (23). Santral sinir sistemi (SSS) vücudun en karmaşık sistemidir ve vücut ağırlığına göre oranı % 2'dir. SSS ileri derecede farklılaşmış; bir takım iletileri ve işaretleri çevreden organizmaya ya da vücudun bir kısmından diğer kısmına taşımakla görevli bir sistemdir. SSS'nin en küçük birimleri nöronlardır. Nöronlar arasındaki iletişim bir takım kimyasal haberciler (nörotransmitter) tarafından sağlanmaktadır. Bu iletişimin düzenli bir şekilde devam etmesi için beyinde enerji ihtiyacının karşılanması gereklidir (24). Beyin enerji ihtiyacını karaciğer, kalp, böbrek gibi oksidatif fosforilasyona önemli derecede bağımlı olarak elde eder. Vücuttaki oksijenin % 20'sini kullanır. Metabolik yakıt maddelerinin (glukoz, yağ asitleri, amino asitler gibi elektron vericileri) enzim katalizli oksidasyonu ile elde edilen elektronlar koenzim nükleotitleri olan nikotinamid adenin dinükletid (NAD), flavin adenin dinükletid (FAD) gibi elektron

taşıyıcılarına aktarılır. İndirgenmiş nükleotitler daha sonra elektronları mitokondride bulunan elektron transport zinciri adı verilen bir grup özelleşmiş elektron taşıyıcılarına aktarırlar ve en sonunda moleküler oksijene aktarılır. Oksidatif fosforilasyon olarak tanımlanan bu olayda enerji ortaya çıkar. Reaksiyon esnasında elektron transport zincirinden yüksek enerjili elektronların kaçışı serbest radikallerin oluşumuna neden olur. Beyin, mitokondrial gen mutasyonlarından en çok etkilenen organlardan birisidir.

SSS hücreleri yüksek düzeyde O₂ tüketimi nedeni ile potansiyel bir oksidatif kapasiteye sahiptir. Kolaylıkla okside edilebilir maddeleri (poliansatüre yağ asitleri, katekolamin) bol miktarda içerdiği, rölatif olarak düşük düzeyde antioksidan (glutatyon, Vitamin E, antioksidan enzim) içerdiği, spesifik tepkimeler nedeniyle endojen süperoksit radikal (SOR) üretimi yaptığından dolayı SSS oksidatif strese duyarlıdır. Bunun yanında globus pallidus, SN gibi alanlarda yüksek demir (Fe) içermesine rağmen beyin omurilik sıvısı (BOS)' da düşük düzeyde transferin içerdiği ve Fe transportunu yeterli düzeyde sağlayamadığı, içerdiği nöron hücreleri nonreplik özelliğe sahip olup, hasarlanma ile disfonksiyonel hale gelip apoptozis ile hücre ölümüne uğradığı için, SSS hücrelerinin oksidatif strese duyarlılıkları fazladır (25,26).

2.4.1. Oksidatif Stres

Pek çok nörodejeneratif hastalıkta gözlenen mekanizmalar arasında oksidatif stres dikkati çekmektedir. Dopamin metabolizmasında özellikle dopaminerjik (DA) nöronları etkilediği düşünülen serbest radikal artışıyla ilişkilendirilen oksidatif stres, demir içeriğinin artması, demir bağlayıcı proteinlerdeki değişimler, süperoksit dismutaz (SOD) seviyesindeki artış, diğer taraftan antioksidasyondan görevli redükte glutatyon, lipid peroksidasyonunda artış, artmış protein oksidasyonu ve deoksiribonükleik asit (DNA) tahribatı gibi olaylar nedeniyle PH patolojisiyle ilişkilendirilmiştir. Ancak verilere baktığımızda reaktif oksijen ürünlerinden ziyade reaktif nitrojen ürünlerinin patolojik olaylarda daha etkin olduğu düşünülmektedir. Kesin olmamakla beraber glial kaynaklı nitrik oksit (NO) ve nöronda oluşan süperoksit etkileşimi sonucu ortaya çıkan perokinitritin nitrazatif bozukluğun ana kaynağı olduğu düşünülmektedir (27).

2.4.2. Mitokondriyal Disfonksiyon

Geç başlangıçlı nörodejeneratif hastalıklar olan Parkinson, Alzheimer ve Huntington'da mitokondriyal solunum zincir disfonksiyonu patogenezlerden biri olarak kabul edilir. Hastaların bir kısmında kas, SN, frontal korteks mitokondriyelerinde kompleks 1'in %25- 30 arasında azlığı tespit edilmiştir. Bunun nedeni çevresel ve genetik nedenlerle açıklanmaya çalışılmıştır. Kompleks 1 eksikliğinde mitokondriyal DNA (mtDNA) tarafından kodlanan subünitlerin yapısını etkileyebilecek genetik değişikliklerle ilgili çalışmalar değişik sonuçlar vermesine karşın bazı polimorfizmlerin hastalık riskini artırıcı veya azaltıcı yönde etkili olabileceğini düşündürmüştür. Yaşlanma ile birlikte mtDNA'da delesyon artmaktadır ve bu durum Parkinson hastalarının beyinlerinde daha sık oranda görülür. Mitokondriyal DNA'da delesyon sitokrom oksidaz aktivitesinde azalma ile birliktelik göstermesi, daha fazla artmış serbest radikal harabiyatıyla açıklanmaya çalışılmaktadır. Bu nedenlerden dolayı ileri yaş hastalığı olan PH ile yaşlandıkça artış gösteren mitokondriyal disfonksiyon PH'nin patogenezinde mitokondriyi hedef organ haline getirmiştir (28). Mitokondriyal disfonksiyon PH patogenezinde kompleks 1 disfonksiyonu yoluyla etkilediği gibi monogenik PH formlarındaki mutant proteinlerin direk veya dolaylı olarak etkiledikleri birçok mitokondriyal işlevsel bozukluğundan dolayı da etkilemektedir. Parkinsonizmle giden bazı mitokondriyal sitopati formlarında mtDNA oluşumunu doğrudan etkileyen mutasyonların ortaya çıkarılması da bize yardımcı bilgiler verir (29).

2.4.3. Protein Agregasyonu

Birçok nörodejeneratif hastalık yaygın bir patolojik süreç takip eder. Bu süreçte proteinlerin mutasyonları sonucu yapısal olarak bozuk proteinlerin işlenmesi ve bunların toplanması görülür. İki aşama vardır; Birinci aşamada anormal proteinlerin birikmesi süreci, ikinci aşama da hücrelerin bu olaya verdiği cevaptır. PH'de karakteristik olarak yapısı değişmiş ve polimerize olmuş protein oluşur. İlerleyen süreçte intrasellüler protein birikimi olur. Bu durum nöronal hücrede işlev kaybı ve hücrenin ölümüne neden olur. α -Sinüklein olarak bilinen ilk familial PH geninin keşfedilmesi önemli gelişmeleri beraberinde getirdi. α -sinüklein, lewy cisimciklerinin major bileşenidir. Dopamin sentez edildikten sonra transportu ve

metabolizmasının düzenlenmesinde görev alan proteinlerdeki hatalı işlev görme, normalde parçalanarak kataliz edilmesi gereken bu proteinlerin yolak içinde bazı noktalarda parçalanamaması ve agregatlar olarak birikmesine neden olur.

α -sinüklein proteini 140 amino asit uzunluğunda olan, hem nöron hem glialarda önemli oranda ifade edilen, ağırlıklı olarak presinaptik yerleşimli, sinaptik veziküllerle ilişkili, dolayısıyla nörotransmitter salınımı, geri alınımı ve hücre içi veziküler transportta görevli olduğu düşünülmektedir (30). α -sinüklein proteininin hücre zarına bağlanarak fosfolipaz D aktivitesini modüle ettiği ve bu yolla sinaptik veziküllerin salınımını düzenlediği düşünülmektedir. Söz konusu gende bulunan mutasyonların proteinin veziküllere bağlanma kapasitesini azalttığı gösterilmiştir. α -sinükleinin missens mutasyon kadar artmış gen dozaj etkisi familyal PH'ye neden olur. Bu mutasyonlarla ilgili patoloji SN hücre kaybı ile hastalığın aniden gelişimini yansıtır. α -sinüklein çözülebilir ve katlanmamış bir proteindir. α -sinüklein birikmeye meyillidir. İlk önce halka şeklinde protofibril, en sonunda çözünmez fibril veya polimer yapısı oluşur. Oluşan çözünmez fibriller lewy cisimciklerinin ana bileşenidir. Protofibriller ve çözülebilir bileşenler nöronlar için çok toksiktir. Birçok faktör protein birikimini destekler. Proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonları (glikolizasyon, fosforilasyon), α -sinüklein genindeki mutasyon sonucu oligomer yapısı, ısı ve pH değişikliklerinde, ortamındaki ferrik demir gibi metaller, histon, tau, tübülün gibi moleküllerin varlığında proteinlerin toplanmasına neden olmaktadır (31,32,33).

2.4.4. Ubikülin Proteozom Sistemi

Parkin geninin keşfedilmesinden sonra nörodejenerasyon üzerindeki ubikülin proteozom sisteminin (UPS) direkt rolünün ilk kanıtı ortaya çıktı. Japonya'da erken başlangıçlı otozomal resesif (OR) geçiş gösteren ailesel PH olgularında bağlantı analizi ve pozisyonel klonlama teknikleri kullanılarak keşfedilen parkin geni 500 kilobazlık (kb) uzunluğunda, 12 ekzonlu bir gendir. Parkin geninin analizinde nokta mutasyonları ve değişik ekzonların üzerinde (delesyonlar, duplikasyonlar ve triplikasyonlar) tanımlanmıştır. Bu genin kodladığı parkin proteini 465 amino asitten oluşur. Proteinin N-terminalinde Ubikülin bölge (UBL), C-terminalinde ise really interesting new gene (RING-finger) içeren iki bölge ve bunların arasındaki in-

between region (IBR) bölgesi yer alır. Parkin geni ile ilgili çalışmalarda ubikütin-proteozom yolunda görev alan bir protein olduğu ortaya konmuş ve parkinin bir E3 ligaz olduğu anlaşılmıştır. E3 ligaz enzimlerinin işlevi, ubikütin-aktive-edici-enzim E1 ile aktive edilip ubikütin-konjüge-edici-enzim E2'ye gönderilen ubikütin monomerlerini substrat proteine katmaktır. Böylece ubikütin ile işaretlenmiş proteinler proteozom tarafından yıkılırlar. Böylece E3 ligaz hücredeki protein yıkımında kilit bir rol üstlenmektedir. Ayrıca parkindeki RING-finger bölgeleri ile IBR bölgesi ubikütin-konjüge-edici-enzim E2 ile etkileşim için uygun bir alan meydana getirir. Parkindeki işlev bozukluğu sonucunda nöronlar sitotoksik etkilere karşı korunmasız hale gelir. Parkin'in E3 ligaz aktivitesinin kaybı substrat proteinlerin ubikütin ile işaretlenememesine ve dolayısıyla proteozom tarafından tanınıp yıkılamamasına yol açmaktadır. Yıkılamayan proteinler hücrede birikmekte ve toksisiteye neden olmaktadır. Parkin'in bilinen en önemli iki substratı α -sinüklein ve siklin-E proteinleridir. Siklin-E, nöronların hayatta kalmasında önemlidir. Bu proteinin yıkılamaması hücrede apoptozu tetikler. Parkin'e bağlı PH olgularının orta beyinlerinde siklin-E artmıştır (34,35,36).

2.5. Parkinson Hastalığının Genetiği

Parkinson hastalığı 1817 yılında James Parkinson tarafından tanımlandı. Tanımlanmasından beri günümüze kadar tanısı klinik olarak konmaya devam etmektedir. Yaklaşık 40 yıldır epidemiyolojistler uzmanlık alanlarını ağırlıklı olarak PH' de hastalıkla çevresel faktörler (viral enfeksiyonlar, nörotoksinler) arasındaki ilişkiye yönlendirdiler.

2.5.1. PARK1 (SNCA)

SNCA geni, ailesel parkinsonizm olgularında tanımlanan ilk gendir. İlk olarak Yunan ve İtalyan ailelerde, α -sinüklein geninde 3 nokta mutasyon (A30P, A53T ve E46K) bulunmuştur (34). Bu nokta mutasyonlar dışında α -sinüklein geninin duplikasyon ve triplikasyonu (PARK4) sonucu meydana gelen patolojiler de tanımlanmıştır (37). SNCA geni 4. kromozomun q kolunda yer alan SNCA geni, 140 amino asit içeren ve presinaptik bir protein olan α -sinüklein proteinini kodlar. α -sinüklein proteininin görevi tam olarak bilinmemekle beraber nörotransmitter taşıyan

veziküllerin salgılanmak üzere hücre membranı ile birleşmesinde rol alan SNARE protein yapısının oluşumunda görevli bir proteindir. α -sinüklein proteininin hücre zarına bağlanarak fosfolipaz D aktivitesini modüle ettiği ve bu yolla sinaptik veziküllerin salınımını düzenlediği düşünülmektedir. Bu gende bulunan mutasyonların proteinin veziküllere bağlanma kapasitesini azalttığı gösterilmiştir (34). Genetik olarak otozomal dominant karakterdedir ve sıklığı azdır. Genin duplikasyon ve triplikasyona uğraması ile anormal protein yapısı oluşur. Bu protein SN'de dopaminerjik hücrelerde dopamin artışına, böylece PH'de patolojik mekanizmaları tetikleyerek lewy cisimcikleri oluşumuna neden olduğu sanılmaktadır (38).

2.5.2. PARK2 (Parkin)

Parkin genine bağlı PH, OR geçiş gösterir. Parkin geni 1998 yılında Japonya'da erken başlangıçlı otozomal resesif olarak kalıtılan ailesel PH vakalarında yapılan bağlantı analizi ve pozisyonel klonlama yöntemleri aracılığıyla tanımlanmıştır (39). Parkin geni 12 ekzonludur. Parkin geninde birçok nokta mutasyonu ve delesyon, duplikasyon, insersiyon tespit edilmiştir (40,41). Parkin geni tarafından kodlanan Parkin proteininde 465 amino asit bulunur. Proteinin moleküler yapısına baktığımızda parkin nöronlarda ubikütin proteozomal sistemde ubikütinizasyon esnasında E2 enzimi bağımlı ubikitin ligaz (E3) olarak görev yapar. Ubikütin ile işaretlenmiş proteinlerin yıkımında önemli rol oynamaktadır. Parkinin bilinen en önemli iki substratı α -sinüklein ve siklin-E proteinleridir. Ayrıca Parkin'deki RING-finger bölgeleri ile IBR bölgesi übikütin konjuge edici enzim E2 ile etkileşim için uygun bir ara yüz oluşturmaktadır (42). Erken başlangıçlı parkinsonizmin genetik olarak en sık nedeni olarak bildirilir. Hastalık 30'lu yaşlarda başlar ve yavaş seyir izler. L-dopa'ya hızlı cevap verir. Alt ekstremitte distonileri, diurnal fluktuasyon, uykudan yarar sağlama ve hiperrefleksi bulunmaktadır (39,43).

2.5.3. PARK3

İkinci kromozom üzerine yerleşen lokus (2p13) 1998 yılında OD olarak kalıtılan 6 ailede incelenerek tanımlanmıştır. Kalıtsal PH'de üçüncü sırada tanımlanmış genetik etkendir. Aile bireyleri arasında hastalığın başlangıç yaşı

geniştir. Klinik olarak geç başlangıçlı sporadik olgulara yüksek oranda benzer kliniği vardır. Bu postmortem patolojik incelemesinde SN'de dopaminerjik nöron dejenerasyonu ve lewy cisimcikleri bildirilmiştir. Bu genin penetransı %40'ın altındadır (44).

2.5.4. PARK5 (UCHL-1)

İlk defa otozomal dominant (OD) geçiş gösteren bir Alman ailede tanımlanmıştır. Park5'e baktığımızda ubiquitin C terminal hidrolaz enzimini kodlayan UCHL-1 geninde defekt vardır (45). Genin 4. kromozomun p koluna lokalize (4p14) olduğu tespit edilmiştir. Hastalık 50'li yaşlarda başlar. UCHL-1 çoğunlukla beyinde görevli bir gendir ve ürünü ubiquitin polimerlerini hidroliz yoluyla monomerik forma geri çeviren bir enzimdir. Park5 geninde bir nokta mutasyon (I93M) ve bir de koruyucu polimorfizm (S18Y) tespit edilmiştir.

2.5.5. PARK6 (PINK1)

İlk defa 2004 yılında otozomal resesif geçişli Parkinson bulguları bulunan İtalyan bir ailede tanımlanmış ve Avrupa'da birkaç ailede daha tanımlanmıştır (46). Bu gendeki defekt erken başlangıçlı sporadik vakalara neden olmaktadır. PINK-1 (PTEN tarafından indüklenen kinaz 1) geni yaklaşık 18.06 kilobazlık (kb) bir alanda yer almakta ve 8 kodlayıcı ekzon vardır. Kromozomal lokusu 1p36-37 olarak bulunmuştur. Gen 581 amino asitten oluşan ve yaygın olarak ifade edilen bir protein kodlamaktadır. PINK1 mitokondride bulunan ve oksidatif strese çok miktarda oluşan bir mitokondrial kinaz olan mitokondrial serin/treonin kinaz kodlamaktadır. Bu enzim hücreyi mitokondrial disfonksiyon ve oksidatif stresten korumaktadır. PINK1 geninde 46 nokta mutasyon, delesyon ve insersiyon bildirilmiştir (40,41). Mutasyonlar sonucunda oksidatif stres, enerji metabolizması, mitokondri disfonksiyonuna ve apoptozise neden olmaktadır (47). Kliniğinde klasik PH bulgularının yanında distoni ve demans gibi bulgularda vardır (46).

2.5.6. PARK7 (DJ-1)

DJ-1 gen mutasyonları 2001 yılında Hollandalı 4 hastada tanımlanmıştır (48). Kromozomal lokalizasyonu 1p36 olan DJ-1 geninin uzunluğu 23.63 kb'dir ve 7

ekzon içermektedir. Şimdiye kadar bu gen üzerinde çok sayıda nokta mutasyon ve gen içi değişiklik bildirilmiştir (40,41). DJ-1 geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu erken başlangıçlı ORPH gelişmektedir. Mutasyonlar genin her yanına dağılım göstermekte fakat aynı fenotipe neden olmaktadır (49). Genin fonksiyon kaybı sonucunda oksidatif stres, enerji metabolizması bozukluğu ve mitokondriyal disfonksiyona neden olmaktadır.

2.5.7. PARK8 (LRRK2, Dardarin)

LRRK2 geni, yaklaşık olarak 150 kb uzunluğunda olan 51 tane kodlayıcı ekzonu vardır. PARK8 lokusu 2002 yılında, Japon bir ailede yapılan bağlantı analizleri ile 12q11.2-q13.1 bölgesinde tespit edilmiştir. Daha sonraki yıllarda bu lokusta yerleşen genin LRRK2 geni olduğu, mutasyonlarının da OD kalıtım kalıbına uyduğu gösterilmiştir (50,51). LRRK2 geni, 2527 amino asit büyüklüğünde, oldukça korunmuş bir yapıya sahip pek çok farklı işlevsel bölgesi olan GTP-binding serin/treonin kinaz isimli proteini kodlar. Proteinin işlevi tam olarak bilinmemektedir ancak artmış kinaz aktivitesinin patogeneze sorumlu olduğunu düşündürmektedir (52).

2.5.8. PARK9 (ATP13A2)

ATP13A2 geni OR ailevi PH'ye neden olan 1180 amino asit uzunluğundaki lizozomal tip 5 ATPaz proteinini kodlamaktadır. Gende meydana gelen mutasyon lizozomal disfonksiyona neden olmaktadır. Normal olarak protein lizozomlar tarafından tutulurken, mutant protein endoplazmik retikulum tarafından tutulur ve proteozomlarca degrade edilir. Klinik olarak PH bulguları yanında spaside, supranükleer gözü yukarı dikme parezisi ve demans semptomları vardır. Hastalık hızlı ilerler, levadopaya cevap vardır fakat uzun süre kullanımda artan spaside, tepe doz diskinezisi ve kognitif kayıp oluşur (53).

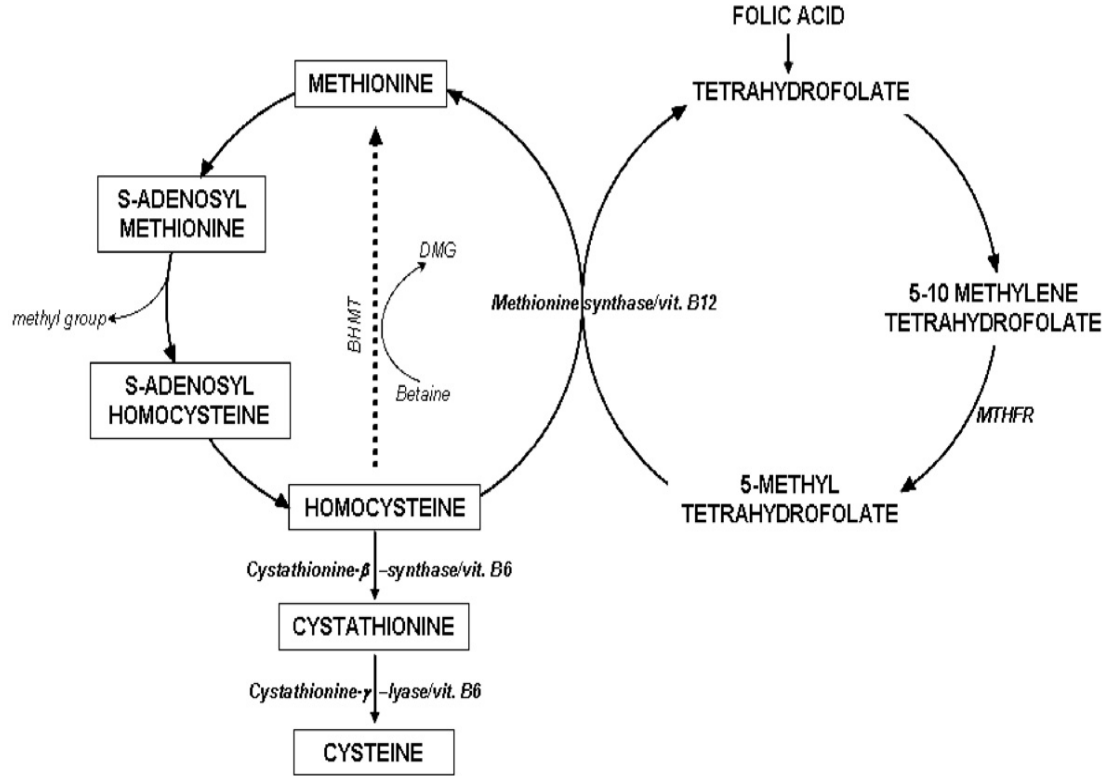
2.6. Homosistein Metabolizması

Homosistein(Hcy); diyet proteinin içinde bulunan metiyonin amino asitinin derivasyonu ile oluşan sülfür içeren bir amino asittir. İlk defa de Vigneaud tarafından

tanımlanmıştır (54). Hcy, protein oluşumuna katılmaz ve esansiyel bir amino asit olan metiyoninin demetilasyonu ile oluşur. Dolaşımdaki Hcy dört formda bulunabilir; redükte halde, proteine bağlı olarak (%80-90), birbiri ile bağ yapıp disülfid homosistein olarak (Hcy üriner formu) ve sistein gibi sülfidril grubu içeren maddelerle birleşerek sistein-homosistein veya homosistein-tiyolakton halinde bulunabilir (55). Proteine bağlı olmayan ve böbrek tarafından filtre edilen homosistein tekrar emilerek oksidatif olarak yıkılır. Bu şekilde hemen hemen bütün homosistein ya metiyonine remetile edilir ya da karbondioksit ve sülfata yıkılır. Yiyeceklerle alınan metiyonin devamlı olarak S-Adenozil metiyonin(SAM) üzerinden homosisteine dönüştürülür. SAM'ın metil grubu uzaklaştırılarak S-Adenozil homosisteine (SAH) dönüştürülür. S- Adenozil homosistein (SAH) SAH -hidrolaz enzimi ile adenozin ve homosisteine hidroliz olur (56).

Metiyonin esansiyel bir amino asit olmasına rağmen vücutta homosisteinin remetilasyonu ile elde edilebilir. Düzenli diyet alımı durumlarında Hcy'nin bir kısmı 5- metiltetrahydrofolat 'dan bir metil grubu alır metionine dönüşür. Hcy'nin diğer kısmı transsülfür yolu ile sisteine dönüşür. Hcy'nin büyük kısmı remetile edilmez ve sitasyonin β sentaz (CBS) aracılığı ile serin vasıtasıyla sitasyonine katabolize edilir (57). CBS piridoksal fosfat (B₆ vitamini)'a bağımlı, Hcy metabolizmasında hız kısıtlayıcı noktada bulunan ve yaşla azalan bir enzimdir (54). Sitasyonin de gamma-sitasyonaz ile sistein ve α -ketobütirata metabolize edilir. B₆ vitamini gamma-sitasyonazın da kofaktörüdür. Hcy'i sisteine dönüştüren bu yol transsülfürasyon yolu olarak bilinir. Fazla metiyonin varlığında CBS'nin aktive edilmesi ve remetilasyonun inhibe edilmesi ile transsülfürasyon yolu aktive olur. Böylece metiyoninden karbonun ve sülfürün kesin akışı sisteine doğru olur. Sonunda karbondioksit ve sülfata yıkılmış olur. Metiyonin eksik olduğu durumlarda, remetilasyonun iki yolundan biriyle, homosistein metiyonine metabolize olur (Şekil 2.1). Karaciğerde ve nadiren böbrekte homosisteinin çoğu metil kaynağı olarak betaini kullanıp BHMT (betain homosistein metil transferaz) enziminin katalizlediği reaksiyonla metiyonine metabolize edilir. Diğer dokuların büyük kısmı N5 metiltetrahydrofolatı metil kaynağı olarak kullanıp, FHMT(5- metiltetrahydrofolat homosistein metil transferaz) enzimi aracılığıyla homosisteini metiyonine metabolize eder. Bu metil kaynağının

oluşumu da besinlerle alınan N5-N10 metilentetrahidrofolata bağlıdır. Ayrıca vitamin B₁₂, FHMT enziminin temel kofaktörüdür (54).



Şekil 2.1. Homosistein metiyonin metabolizması; MTHFR: Metilentetrahidrofolat redüktaz; DMG: Dimetil glisin; BHMT: Betain homosistein metil transferaz.

Martignoni ve ark.'dan.

Metilentetrahidrofolat, folatın dolaşımda olan primer şeklidir. Folik asit (folat) pteridin, p-aminobenzoik asit ve glutamik asitten oluşan pteroilglutamik asit yapısında, suda çözünen bir vitamindir. Gerçekte bir ön vitamin olan folik asit, ince bağırsağın proksimal kısmından daha çabuk olmak üzere bütün ince bağırsak boyunca emilmektedir. Emilimi aktif transportla olur ve tamamı emilmektedir. Emildikten sonra glikoproteinlere bağlanarak karaciğer ve diğer dokulara

dağılmaktadır. Vitamin B12 gibi enterohepatik siklusa giren folik asit idrarla atılmaktadır (58,59). Folik asit vücutta dihidrofolat redüktaz enzimi ile önce dihidrofolata (DHF) ve daha sonra tetrahidrofolata (THF) dönüşür. Tetrahidrofolattan oluşan folat türevleri çeşitli enzimlerin koenzim grubunu oluştururlar. Bunların en önemlileri N5- N10-metilen THF, N5-metil THF ve N5-formil THF'dir. 5-metil THF, THF'nin plazma da bulunan şeklidir ve biyolojik olarak aktif türevidir (60,61).

5-metil THF, metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi tarafından 5,10- metilentetrahidrofolat'dan oluşur. Bu koenzimler üzerlerindeki tek karbonlu radikalleri başka maddelere kolayca transfer edebilmeleri nedeniyle DNA, belli amino asit ve lipit sentezlerinde önemli rol oynayan esansiyel bir maddedir (62). Absorbsiyonunu takiben folatların spesifik karaciğer enzimleri ile formil, metil ve forminin gibi tek karbon gruplarını kabul etme eğiliminde olan THF'ye indirgenmelerinden sonra THF'nin bir kısmı 10-formil THF'nin 10-formil THF dehidrojenaz enzimi ile formil gruplarının yükseltgenmesiyle CO₂, H₂O ve THF dönüşümünde rol oynar. Diğer bir kısmı ise folat türevlerinin oluşumunda ve tek karbon aktarımında görev alır. Kanda bulunan ve plazma proteinlerine bağlı olarak taşınan 5-metil THF hücre içinde glutamik asitle konjuge olarak THF şeklinde depolanmaktadır. 5-metil- THF beyin omurilik sıvısında, beyinde ve plazmada yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır (63). Vitamin B12 (kobalamin), FHMT enziminin temel kofaktörüdür. Et, süt, yumurta gibi besinlerde bulunan B12 vitamini (kobalamin) bağırsakta intrinsek faktör varlığında emilir ve karaciğerde depolanır. B12 vitamini hücre sitozolünde hidroksikobalamin şeklinde serbest kalır ve sitozolde metilkobalamine çevrilir. Homosisteinin metiyonine ve aynı anda N5-metiltetrahidrofolatın tetrahidrofolata dönüştüğü reaksiyonda rol alır. THF; pürin, pirimidin ve nükleik asit sentezi için gereklidir. Ayrıca mitokondriye girer ve 5'-deoksiadenozil kobalamine dönüşür. Metil malonil KoA'nın süksinil KoA'ya dönüşümünü sağlar. Sistein de ileri aşamada sülfata metabolize edilerek idrarla atılır. Plazma homosistein düzeyindeki yükselmeler Hcy metabolizmasında yer alan enzimlerin genetik defektine, sistemik hastalıklara (diabetes mellitus, hipotiroidizm, böbrek yetmezliği), beslenme bozukluğuna (folat, B12, B₆) ve ilaç alımı gibi nedenlerle olmaktadır.

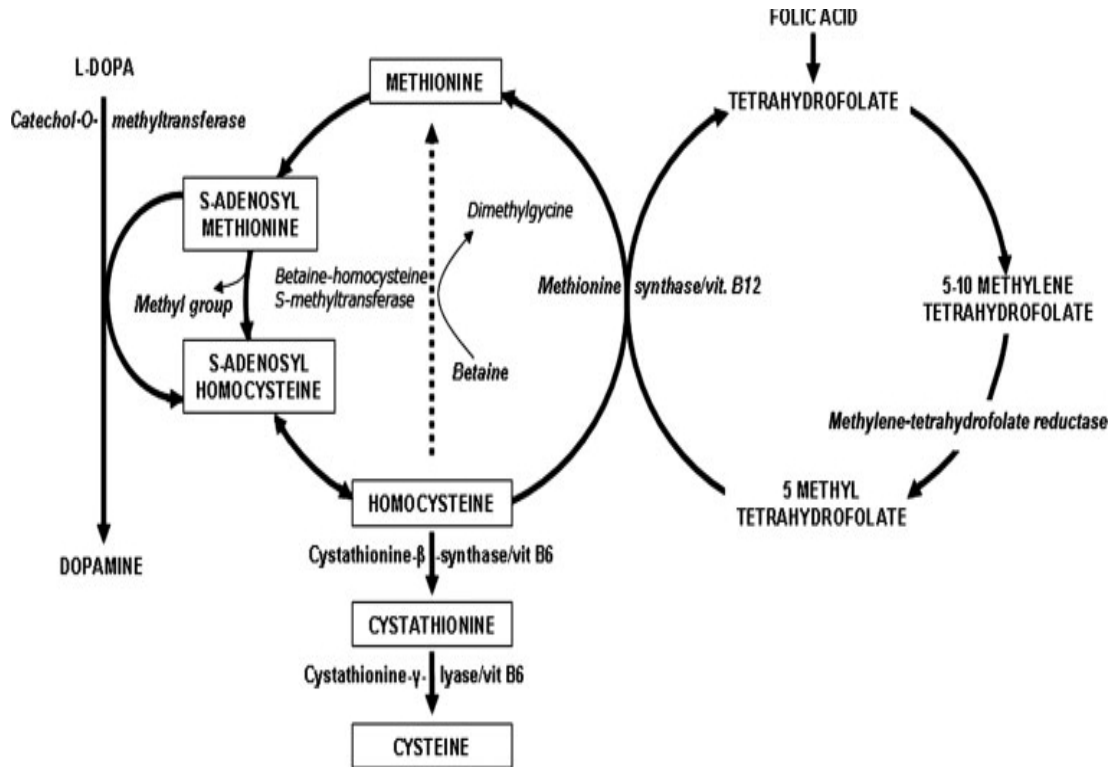
2.6.1. Hiperhomosisteinemi

Homosistein metabolizması, sitotoksik olan bu amino asitin seviyesini düşük tutmak için remetilasyon ve transsülfürasyon yolları arasında sürdürülen denge ile sağlanmaktadır (64). Homosistein seviyesinin yükselmesi genetik faktörler ve sonradan kazanılan faktörler arasındaki kompleks ilişki sonucunda olmaktadır. Homosistein metabolizmasındaki rol alan genlerdeki mutasyonlar nedeniyle homosistein düzeyi yükselebilir. Genetik nedenler arasında en sık neden olanı; Sistasyonin β -sentaz (CBS) eksikliğidir. Bu enzim eksikliğinin homozigot formu konjenital homosistinüri olarak adlandırılan ağır hiperhomosisteineminin en sık karşılaşılan genetik nedenidir. Konjenital homosistinüriye neden olmaktadır. Konjenital homosistinüri; otozomal resesif geçişli bir hastalık olup 200.000 doğumda 1 görülen bir hastalıktır. Bu hastalığın homozigot formunda Hcy düzeyi 400 $\mu\text{mol/L}$ 'ye kadar çıkabilir. Hastalığın klinik bulguları ektoptik lens, iskelet bozukluğu, tromboembolizm, mental retardasyon ve ağır prematüre aterosklerozdur. Aterotrombotik komplikasyonlar sıklıkla genç yaşta ortaya çıkar ve ölümcüldür. Heterozigotlar da ise klinik bulgular daha az belirgindir (65).

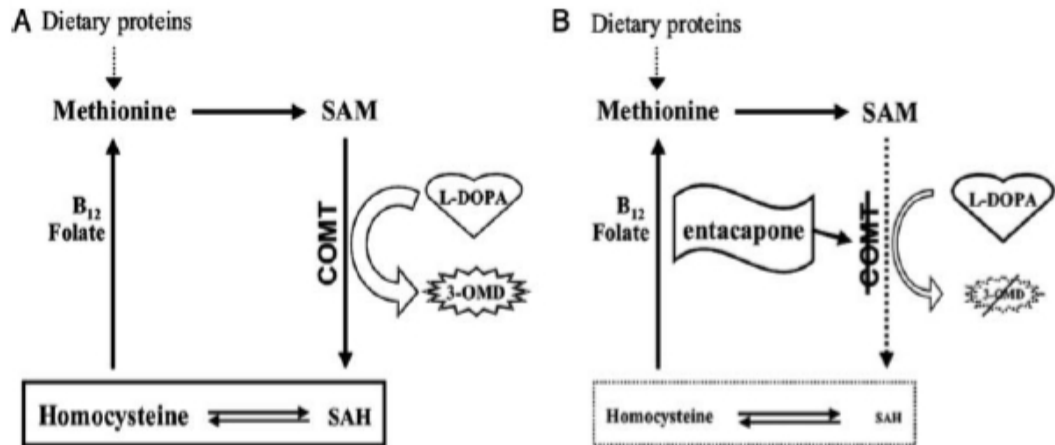
Diğer genetik nedenler arasında MTHFR genindeki görülen polimorfizmler (C66T, A1298C) sonucu MTHFR enziminin aktivitesinde azalma sonucunda ağır bir homosisteinemiye neden olur. FHMT (5- metiltetrahidrofolat homosistein metil transferaz) enzimini kodlayan gendeki mutasyonlar sonucu da hiperhomosisteinemi olmaktadır (66). Hiperhomosisteinemi'ye aynı zamanda beslenme bozukluklarında neden olmaktadır. Bunlar arasında folik asit, vitamin B6 ve vitamin B12 alımlarının azlığı bunların bir veya birkaçının alımındaki azlık hiperhomosisteinemi'ye neden olmaktadır (67,68). Hiperhomosisteinemi'ye neden olan diğer etkenler arasında bulunan kronik böbrek yetmezliğinin, kreatinin artışının plazma homosistein düzeyini dört kat artırabildiği belirtilmektedir (69,70). Hipotiroidi yapılan çalışmalarda, hipotiroidisi olan hastalarda Hcy konsantrasyonunun arttığı ve bu durumun vasküler hastalık sıklığı ile ilişkili olduğu savunulmuştur (71). Kronik gastrit, helicobakter pilori infeksiyonunda folat azlığına bağlı olarak Hcy düzeyinde artış belirtilmiştir (72). Pernisiyöz anemi; 404 hastada yapılan bir çalışmada kobalamin eksikliğine bakılmıştır. Hastaların %96'sında plazma Hcy düzeyleri ortalamanın üç standart sapmanın üzerinde bulunmuştur (71). Diabetes mellitus,

sistemik lupus eritromatozus, ağır psöriazis, pernisiyöz anemi gibi kronik hastalıklar yer alırken ayrıca meme, over, pankreas kanserleri ve akut lenfoblastik lösemi gibi kanserlerde hiperhomosisteinemiye neden olur (73,74).

Hiperhomosisteinemiye ilaçlarda neden olmaktadır. Bu ilaçlar arasında Metotreksat; fenitoin, kolestipol ve niasin folat metabolizmasını etkileyerek Hcy seviyelerini artıran ilaçlardır. Blankenhorn ve arkadaşları niasin ve kolestipol alan koroner hastalarına göre Hcy seviyelerini daha yüksek bulmuşlardır. Bunun yanında Teofilin ve sigara; Piridoksal metabolizmasını antagonize ederek, nitroz oksit vitamin B12 metabolizmasını bozarak Hcy seviyelerini artırmaktadır (75,76,77). Tamoksifen ve penisilamin gibi ilaçlar Hcy seviyelerini ileri düzeyde azalttığı gösterilmiştir (78). PH tedavisinde sıklıkla kullanılan L-dopanin da plazma Hcy düzeylerini artırdığı gösterilmiştir (79). L-Dopanin katekol-O-metil transferaz (COMT) enzimi ile yıkılımı tetrahidrofolat aracılı metil transferi sonucu olmaktadır. Bu yolla aşırı L-Dopa yıkılımı da metil miktarında azalmaya ve dolayısıyla homosisteinin yıkılımının yavaşlamasına neden olabilmektedir. Ayrıca L-dopa transmetilasyon reaksiyonlarında metil grup alıcısı olarak Hcy mekanizmasını etkilemektedir (Şekil 2.2). COMT enzimi anahtar bir rol oynar, SAM'de metil donörü olarak rol alır. Dekarboksilaz inhibitörleriyle birlikte verildiği zaman L-dopanin çoğu COMT enzimi tarafından 3-O-metildopa (3-OMD) ye metile olur. Böylece daha sonra Hcy'ye hidrolize olacak olan SAH'nin miktarı artar (80,81,82). Hiperhomosisteineminin PH'nin başlangıcında mı yoksa tedavi sonrasında mı olduğu hala net değildir. Daha önce yapılan hayvan deneylerinde entakapon tolkapon gibi COMT inhibitörleri L-dopanin 3- OMD'ye dönüşümünü sağlayan COMT enzimini inhibe ederek L-dopanin hcy düzeyini yükseltmesini önlerler (83,84). (Şekil 2.3)



Şekil 2.2. L-dopa ve homosistein metabolizması. Rodriguez ve ark.'dan.



Şekil 2.3. Homosistein metabolik yolunun ve COMT inhibisyonunun hipotetik mekanizması. (A) Normal COMT aktivitesi L_dopa 3-OMD'ye degrade olur ve plazma Hcy artar. (B) Eğer entakapon gibi COMT inhibitörleri alınır Hcy seviyesi normal düzeyde kalır. SAM: S-adenozil metiyonin; COMT: Katekol-O-metil transferaz; 3-OMD: 3-O-metildopa; L-dopa: Levodopa; SAH: S-adenozilhomosistein. Valkovic ve ark.'dan.

Hiperhomosisteinemi çok geniş bir klinik durumla ilişkilidir ve etkisi santral sinir sisteminde (mental retardasyon, serebral atrofi ve epileptik nöbetler) görülür (85,86). Hiperhomosisteinemi aynı zamanda trombotik ve aterosklerotik vasküler hastalıklar açısından artmış bir risk oluşturmaktadır (87,88). Hiperhomosisteineminin toksik etkisi özellikle artmış oksidatif strese bağlı endotelial hasar gibi farklı birçok mekanizma ile açıklanmaya çalışılmışsa da asıl hücresel ve moleküler etkisinin temeli halen net olarak bilinmemektedir (89,90). Bazı in vitro çalışmalar yüksek konsantrasyonlardaki Hcy'nin çeşitli hücre serilerinde apoptozisi indüklediğini bildirmektedir. Ancak bu durum da bu amino asitin prooksidant özelliğinden dolayı oksidatif stresi artırdığı ve artmış oksidatif stresinde apoptozisi uyardığı şeklinde yorumlanmaktadır. Sonuç olarak yüksek seviyedeki Hcy düzeyleri endotelial hasarı, ortaya çıkarmış olduğu oksidatif stres ile oluşturmaktadır (91).

2.6.2. Homosistein ve Nörodejenerasyon

Hiperhomosisteinemi vasküler hastalıklar için bir risk faktörü olarak düşünülebilir. Endotelyal hasar yapar ve sonunda atherosklerozis olur. Hcy'nin vasküler damar hasarını tetikleyen mekanizmasının altında yatan durum tam olarak anlaşılamamıştır. Transmetilasyon reaksiyonlarındaki değişimler potansiyel olarak hiperhomosisteinemiye yol açarlar. Bu transmetilasyon değişimleri Alzheimer ve PH gibi nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde rol oynar (92,93,94,95). SSS ekstrasellüler Hcy'nin ve onun türevlerine (homosisteik asit ve homosisteik sülfirik asit gibi) eksitotoksik özelliklerinden dolayı aşırı derecede duyarlıdır (96). Hcy ve onun türevlerinin eksitotoksitesi NMDA reseptörlerinin sitümüle etme ve nöronal DNA hasarı yaratma kapasitesi ile ilişkilidir. Böylece apoptotik hücre ölümüne duyarlılık artışı örneğin hipokampal nöron kültürlerinde gösterilmiştir (97,98,99). Yine de Hcy konsantrasyonu beyinde direk nörotoksik etki yapacak kadar yüksek düzeye ulaşması muhtemel değildir (97,98,100).

Hayvan modellerindeki nörodejenerasyonda Hcy'nin potansiyel toksisitesini keşfetmek için deneysel çalışmalar yapılmıştır. Bir çalışmada örneğin; dorsal hipokampusa 0.43ng/mikroL serbest Hcy'nin direk infüzyonu ki bu miktar normal plazma düzeyinin 3 katıdır ve fare için nörotoksikite yaratmamıştır. Eğer hipokampus için yüksek oranda toksik olan bir glutamat agonisti kainat ile kombine verilirse kainatın başlattığı nörotoksikiteyi Hcy artırır (97). Artmış Hcy düzeyi Alzheimer benzeri patoloji veya beta amiloid peptid ekspresyonu açısından hipokampal düzeyde major etkilere yol açmamıştır. Hiperhomosisteinemi ve deneysel PH arasındaki potansiyel ilişki bakımından 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP)'in nigrostriyal sistemdeki seçiciliğinden dolayı Hcy ile potansiyel sinerjik etkisini Duan ve ark. keşfetmişlerdir. Duan ve ark. yaptıkları hayvan deneyi çalışmalarında beyin içerisine yapılan Hcy injeksiyonunun MPTP (MPTP patolojik ve nörokimyasal PH benzeri değişiklikleri hayvanlarda başlatmak için yaygın kullanılan bir nörotoksindir.)'nin başlattığı motor disfonksiyon ve dopaminerjik nöron kaybını şiddetlendirdiğini göstermişlerdir (101). Onlar göstermişlerdir ki folat içermeyen diyet ya da Hcy'nin intraserebral infüzyonunun başlattığı hiperhomosisteinemi nörotoksik değildir fakat iki durumda da PH'nin seçici olarak hasar görmüş striatum ve SN bölgelerinde MPTP'nin nörotoksik etkinliği artmıştır. Bu yüzden Hcy intrinsik

nörodejenerasyon mekanizmasında araya girmektedir fakat direk toksin olarak değildir. Deneysel kanıtlarla da desteklendiği gibi kan ve beyinde artmış Hcy düzeyi ile karakterize olmuş durumlarda kendiliğinden nöronal hasara neden olacak seviyede olmayabilir. Fakat nöronların çeşitli nörotoksik hasarlara nöronal hassaslığını ileri düzeyde artırabilir. Aynı zamanda kültüre edilmiş insan dopaminerjik hücreler üzerinde yapılan çalışmalar Hcy'nin DNA kırıklarına yol açtığını, retonon ve demir ile indüklenen oksidatif stres, mitokondrial disfonksiyon ve apoptozisi güçlendirdiğini göstermiştir. Dolayısıyla artmış Hcy düzeyleri nörodejenerasyondaki etkisini özellikle oksidatif stres, mitokondrial disfonksiyon ve apoptozisi indükleyerek göstermektedir. Bu gözlemler hiperhomosisteineminin kardiyovaskülerden SSS'ye kadar geniş bir risk faktörü olarak rolünü güçlendirmektedir (97). Bu değerlendirmelerde nöronal hemostazisin sürdürülmesi için dengeli bir Hcy metabolizmasının önemine vurgu yapılmaktadır.

2.7. MTHFR Geni

Metilentetrahidrofolat Redüktaz geni; MTHFR geni 1. kromozomun 1p36.23-p34.3 bölgesinde yer alan 2.2 kb uzunluğunda ve 11 ekzondan (Ekzonlar 102-432 baz uzunluğunda iken intronlar 250-1500 baz) oluşur. Metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimini kodlamaktadır. Enzim 656 amino asitten oluşur. Bu enzimin 70 ve 77 kDa'lık iki alt birimi olup, sitoplazmik bir proteindir (102). MTHFR enzimi; homosistein ve folat metabolizmasında anahtar bir enzimdir. 5,10- metilentetrahidrofolat'ın 5- metil tetrahidrofolat'a indirgenmesini katalizler. 5-metil tetrahidrofolat, folat'ın sirkülasyondaki formudur ve homosisteinin metiyonine remetilasyon reaksiyonundaki karbon vericisidir. Vitamin B12 ve B₆, MTHFR'nin kofaktörleridir. Geçmiş 10 yılda MTHFR eksikliğinin anlaşılmasında büyük ilerlemeler oluşmuştur. Bu eksiklik homosistüniri, hiperhomosisteinemi' ye neden oluyor. Kalıtsal trombofililerden (pıhtılaşma bozukluklarından) birisi olan MTHFR gen mutasyonunda metilentetrahidrofolat enzim geninde mutasyon sonucu homosistein düzeyi artar (hiperhomosisteinemi) ve pıhtılaşmaya eğilim oluşur (103). Homosistein metabolizmasında rol oynayan MTHFR geninin heterozigot veya homozigot polimorfizmleri hiperhomosisteinemiye yol açar. MTHFR geninde en sık iki tanımlanan polimorfizm C677T ve A1298C'dir. C677T toplumlarda %2-15

oranında görülür. Dördüncü ekzon bölgesinde yer alan 677. baz olan sitozinin (C) yerine timinin (T) geçmesiyle oluşan polimorfizm translasyon ürününde 226. sırada yer alan alanin amino asiti yerine valin amino asitinin geçmesiyle neticelenir. MTHFR geninde meydana gelen C677T polimorfizmi enzim aktivitesini azaltmaktadır. Bu da 5-metiltetrahidrofolat seviyesinde azalmaya ve homosisteinin metiyonine dönüşmemesine ve bunun sonucunda plazma homosistein seviyesinin yükselmesine neden olmaktadır (104).

MTHFR polimorfizmi tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilişkisi çalışmalarda net olarak gösterilememiştir. Çalışmaların bazıları MTHFR polimorfizmi ile tekrarlayan düşükler arasında ilişki olduğunu gösterirken çoğu çalışmada bir ilişki gösterilememiştir (105). İkinci sık görülen polimorfizm, A1298C polimorfizmidir. MTHFR'nin regülatör bölgesindeki adenin (A) yerine sitozinin (C) geçmesiyle glutamatın alanine dönüşümü izlenir. Bu polimorfizm enzim aktivitesini azaltır ama 677T allel değişimi kadar belirgin değildir. In vitro koşullarda 1298C alleli homozigot olan bireylerde enzim aktivitesi % 40 kadar azalmıştır ancak plazma homosistein düzeyleri kontrollere göre yüksek değildir. Bununla beraber, kombine MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerin birlikte bulunması MTHFR aktivitesinin %40-50 oranında azalmasına buna bağlı olarak da hiperhomosisteinemi gelişimine ve plazma folat düzeylerinin azalmasına neden olduğu rapor edilmiştir. Genel populasyonun %15-20 kadarı MTHFR varyantlarının biri açısından heterozigottur (106).

2.8. Genetik Polimorfizm

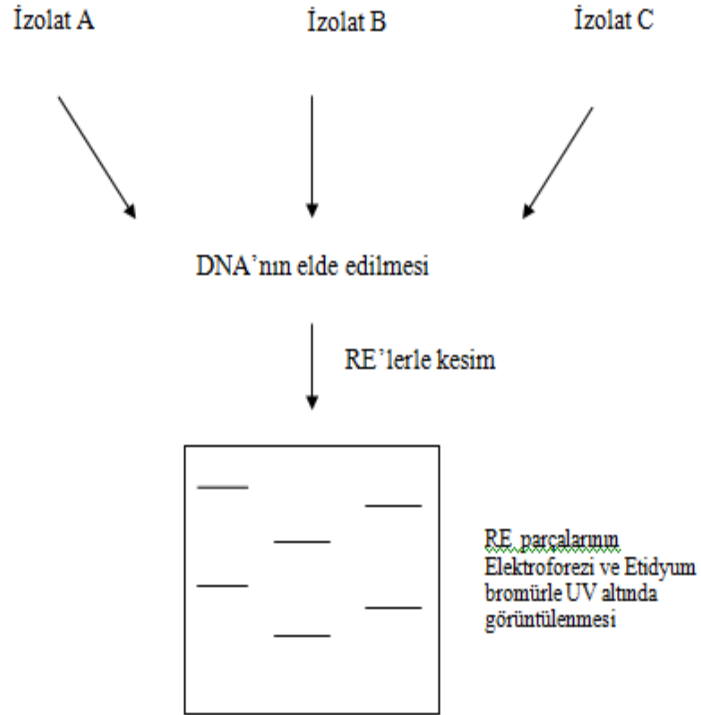
Dünyadaki birçok bireyin kromozomlarında aynı yerde bulunan DNA dizileri birbirine benzerlik gösterir. Populasyonda iki farklı birey arasında DNA'nın yaklaşık 1000 bç uzunluğundaki herhangi bir kısmı ortalama sadece bir baz çifti değişimi içerir. Bir genin belli bir lokusta yer alan alternatif kopyalarından her birine allel denir. Allellerin genel populasyonda kromozomlarda %1'den fazla bulunması genetik polimorfizm olarak tanımlanmaktadır. İntronlarda ve genler arasında sınırlandırılmış olan DNA dizilerinde değişim gösteren bazı alleller vardır. Kodlanan dizi farklılıkları protein çeşitliliğine ve farklı fenotiplerin ortaya çıkmasına sebep olurlar. Genetik hastalığa sebep olan zararlı mutasyonların birçoğu nadir

değişimlerdir. Ağır hastalığa neden olan mutant alleller genetik çeşitliliğin bir sonucudur. Birçok proteinin, farklı populasyonlarda nispeten yaygın ve ayrılabilen şekillerde olduğu tesbit edilmiştir (107).

2.9. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmleri

Restriksiyon enzimler (RE), çok özgül olarak DNA'yı belirli bölgelerden keserek çoğunlukla 1000-20 000 baz çiftlik parçalar oluşturan enzimlerdir. Genelde RE arasında EcoRI, ClaI, Hind 3 ve Hinf 1 yer alır (108). Restriksiyon enzimleri kesim sonrasında genomik DNA'da dizi değişiklikleri, belirli kesim bölgeleri yaratır veya onları yok eder. İlk RE haritası Simian virüs 40'in DNA'sının Hind 3 RE ile kesilmesiyle yapılmış SV40'a ait 11 değişik parça elde edilmiştir. Bu yöntemle viral DNA'da önemli bölgelerin yerleri tespit edilebilmiştir. Bu çalışmadan sonra Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP) yöntemi ökaryotik hücre DNA'sının analizinde ve birçok hastalığın teşhisinde kullanıma girmiştir. 1970'lerin sonunda genom analizi için Southern blot tekniğinin uygulanmasından sonra, restriksiyon enzim bölgelerinin dağılımının bütün insanlarda tam olarak aynı olmadığı keşfedilmiştir. Her ne kadar bazı nükleotid değişikliklerinin varlığı, mutasyon ve protein polimorfizmleri hakkındaki bilgiler vasıtası ile saptanabiliyorsa da, Southern blot tekniğiyle belirlenen değişim derecesi bir sürpriz olarak ortaya çıkmıştır.

Southern blot ile belirlenen enzim kesim yerlerindeki DNA değişimleri, Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) olarak adlandırılır (Şekil 2.4.)(109). Belirli restriksiyon endonükleaz kesilme bölgelerindeki değişimlerden oluşan RFLP'ler, tek nükleotid polimorfizmleri Single Nucleotide Polymorphism (SNP) olarak bilinirler. SNP'leri genetik haritalar için belirleyici olarak kullanılabilir. Kompleks hastalıklardan sorumlu belirli genlerin kalıtımını incelemek için tek nükleotid polimorfizmlerine gerek vardır. DNA sarmalı özgül restriksiyon enzimleri ile kesildiği zaman farklı uzunluklarda fragmentler oluşur ve bu fragmentler, elektroforetik davranışlarındaki farklılıklar ile jel elektroforezinde gözlemlenebilirler (109).



Şekil 2.4. RFLP analizi

2.10. Polimorfik Markırların Genotiplendirmesinde PCR Kullanımı

Tek nükleotid polimorfizmleri Southern blot ile ortaya konabildiği gibi, polimeraz zincir reaksiyonunun ardından restriksiyon enzim kesimi yöntemi kullanılarak da belirlenebilir. Bunun için polimorfik bölgeyi içine alan primerler kullanılarak PCR aracılığıyla bölge çoğaltılır. Uygun restriksiyon enzimi ile PCR ürününün kesiminin ardından elde edilen fragmentler agaroz jel elektroforezinde yürütülür ve analiz edilir (107). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), herhangi bir DNA örneğinde istenen bölgenin çoğaltılmasını sağlayan hızlı bir in vitro yöntemdir. PCR, elde bulunan DNA örneklerinde seçici olarak istenen bölgenin çoğaltılmasını sağladığı için, çoğaltılacak bölge hakkında önceden bilgi sahibi olunmasını gerektirmektedir. Bu bilgi, istenen bölgeyi çoğaltmak için gereken, 15-25 nükleotid arasında değişen uzunluklarda bir çift primerin belirlenebilmesi için şarttır. Denatüre edilen kalıp DNA içerisine primerler eklendikten sonra, bu primerler tamamlayıcı dizilerine bağlanırlar. Uygun bir polimeraz enzimini ve dört çeşit deoksिनükleozid

trifosfattan (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) yeterli miktarda bulunması halinde, primerler hedef DNA'nın komplementerinin sentezlenmesini sağlarlar (107). PCR, bir zincir reaksiyonudur. Çünkü, yeni sentezlenen DNA dalları, ardışık döngülerde sentezlenecek diğer DNA'lar için kalıp görevi yapmaktadırlar. Isı ile bozulmayan polimeraz enzimlerinin kullanımı gerekmektedir çünkü PCR ısı değişimlerine dayanan üç temel basamaktan oluşmaktadır:

- i. Denatürasyon: Yaklaşık 93-95⁰C'de gerçekleşir. DNA tek dal haline gelmektedir.
- ii. Bağlanma: 50-70⁰C arasında gerçekleşen ve primerlerin hedef DNA'ya bağlanmasının gerçekleştiği basamaktır.
- iii. Uzama: 70-75⁰C arasında gerçekleşir ve yeni DNA dallarının elde edildiği aşamadır (107).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Grubu

Çalışmamıza Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Hareket Bozukluğu Polikliniğine Londra Beyin Bankası tanı kriterlerine göre sporadik PH tanısı almış 70 hastaya ait periferik kan örnekleri dahil edilmiştir. Ailevi PH öyküsü olan olgular çalışmaya dahil edilmemiştir. Hastalardan alınan periferik kan örnekleri EDTA'lı tüp içerisine alınarak laboratuvarımıza ulaştırılmıştır.

Çalışmamız Aralık 2010 – Şubat 2011 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. PH tanısı alan olguların periferik kan hücrelerinden elde edilen DNA örneklerinde, MTHFR geninde bulunan C677T ve A1298C polimorfizmlerinin bulunduğu gen bölgeleri RFLP yöntemi ile incelenmiştir.

Çalışmamız için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 6 Temmuz 2010 tarihinde 119 sayılı onay alınmıştır.

3.2. Kontrol

Çalışma grubumuza yaş ortalaması $66\pm 5,85$ arasında olan herhangi bir sistemik hastalığı olmayan (diabetes Mellitus, kronik böbrek yetmezliği gibi) herhangi bir ilaç kullanmayan, 56 kadın ve 44 erkek birey alınmıştır.

3.3. Gereçler

3.3.1. Kullanılan Aletler

PCR aleti (thermal cycler) (PE GenAmp PCR System 9700)

Jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi (Gene Genius)

Elektroforez aleti (Consort E844)

Elektroforez için güç kaynağı (EKR)

Hassas terazi (Setra)

Pipet takımı (Gilson)

Manyetik karıştırıcı (ısıtıcılı) (Heidolph)

Mikrosantrifüj (Eppendorf)

Pastör pipeti
Su banyosu (Nüve)
Vorteks (Heidolph)
Mezür (100'lük 1000'lik)
Beher (250'lik, 500'lük)
Deep-freeze (Arçelik)
Mikrodalga fırın (Arçelik)
Buzdolabı (Arçelik)
Falkon tüpü (50'lik)
Ependorf Tüpü (1,5 ml'lik)
PCR tüpleri (strip) (Perkin Elmer)
Toplama tüpü (E.Z.N.A.)
HiBind DNA spin kolonu (E.Z.N.A.)
Mini soğutucu
Enjektörlük bidistile su
EDTA'lı tüp

3.3.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Rutin Agaroz (İnvitrogen)
Borik asit (Sigma)
EDTA (Sigma)
Tris (Sigma)
dNTP seti (Biotools)
Etanol (95%) (Tekel)
Etidyum Bromid (Sigma)
OB Proteaz (E.Z.N.A.)
MgCl₂ (PCR için) (Biotools)
10XPCR buffer (Biotools)
Wash buffer Solüsyonu (E.Z.N.A.)
Elution buffer Solüsyonu (E.Z.N.A.)
BL Solüsyonu (E.Z.N.A.)
Moleküler Weight Marker (Promega, GibcoBRL)

Taq DNA polimeraz (Biotools)
6X Jel yükleme tamponu (Sigma)
Hinf I restriksiyon enzimi (Fermentas)
Mbo II restriksiyon enzimi (Fermentas)

3.4. Yöntemler

3.4.1 E.Z.N.A. Ekstraksiyon Kiti ile Kandan DNA Elde Edilmesi

Periferik kan örneklerinden DNA elde edilmesinde E.Z.N.A. Ekstraksiyon Kiti kullanılmıştır. DNA izolasyonu için üretici firmanın önerdiği protokol aynen uygulanmıştır.

- Su banyosunun ısısı 55°C ye getirilmiştir.
 - Kan örnekleri ve diğer malzemeler oda sıcaklığına getirilmiştir.
 - 1,5 ml ependorf tüp strafora konulup üzerine protokol numarası yazılmıştır.
 - 25 µl E.Z.N.A. OB proteaz ependorf tüpünün dibine konmuştur.
 - 250 µl hasta kan örneği ependorf tüpüne eklenmiştir.
 - BL solüsyonu çalkalanıp karıştırıldıktan sonra ependorf tüpüne 250 µl eklenmiştir.
 - Bu karışım 15 sn. vortekslenmiştir.
 - 55°C de 20 dk. inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon bittiğinde sıcak su banyosu 70°C'ye ayarlanır ve içine elution buffer konur.
- Çok kısa süreli santrifüj edilmiştir.
 - %96-100'lük etanolden 260 µl örneğe eklenip 15 sn. vortekslenmiştir.
 - Filtreli tüpün kapağına protokol numarası yazılmıştır.
 - Ependorf tüpündeki karışım dikkatlice filtreli tüpe aktarılmıştır.
 - 10 000 devir/dk'da 1 dk santrifüjlenmiştir.

- Filtreli tüp yeni toplama tüpüne konulup, filtratlı tüp atılmıştır. (Filtreli tüp tamamen boşalmadığı zaman tam devirde tekrar santrifüjlenmiştir)

- 500 µl HB buffer dikkatlice filtreli tüpe konulmuştur. 10 000 devir/dk'da 1 dk süreyle santrifüjlenmiştir.

- Filtreli tüp ikinci yeni toplama tüpüne konulup filtratlı tüp atılmıştır.

- Filtreli tüpe 650 µl wash buffer konulmuştur.

- 10 000 devir/dk'da 1 dk santrifüj edilip filtratlı tüp atılmıştır.

650 µl wash buffer ilave edilmiş tekrar 10 000 devir/dk'da santrifüj edilmiştir.

- Filtreli tüp yeni ependorf tüplerine aktarılıp 10 000 devir/1dk santrifüjlenmiş, ependorf tüpü atılmıştır.

- Filtreli tüp yeni ependorf tüpüne aktarılıp üzerine 100 µl elution buffer eklenmiştir.

- Oda sıcaklığında 20 dk bekletilip 10 000 devir/dk'da 1 dk santrifüjlenmiştir.

- Filtreli tüp atılıp DNA içeren sıvı ependorf tüpü içinde -20°C'ye kaldırılmıştır.

3.4.2. C677T Polimorfizmini İçeren Genomik Bölgenin PCR ile Amplifikasyonu

C677T polimorfizmini içeren genomik bölgenin amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri:

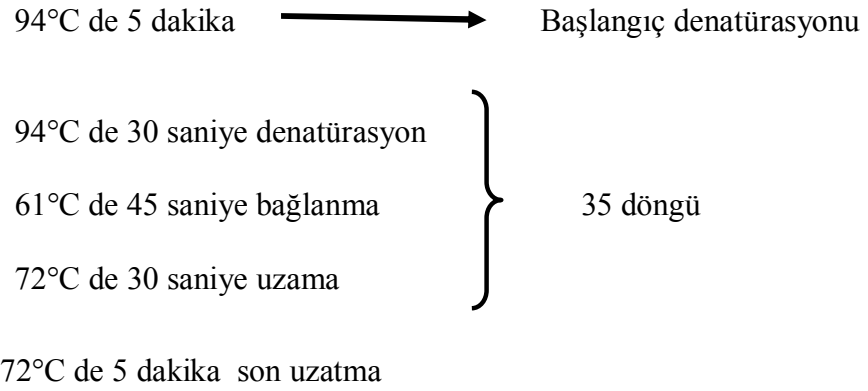
Primer F: 5' TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA 3'

Primer R: 5' AGGACGGTGCGGTGAGAGTG 3'

PCR miksi:

ddH ₂ O	25,4 µl
10xPCR buffer	5 µl
dNTP miks (10mM)	0,4 µl
primer F (1 µM)	4 µl
primer R (1 µM)	4 µl
Taq pol (5 u/ µl)	0,2 µl
MgCl (50mM)	4 µl
DNA	7 µl
	+ -----
	50 µl

PCR şartları:



3.4.3. A1298C Polimorfizmini İçeren Genomik Bölgenin PCR ile Amplifikasyonu

A1298C polimorfizmini içeren genomik bölgenin amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri:

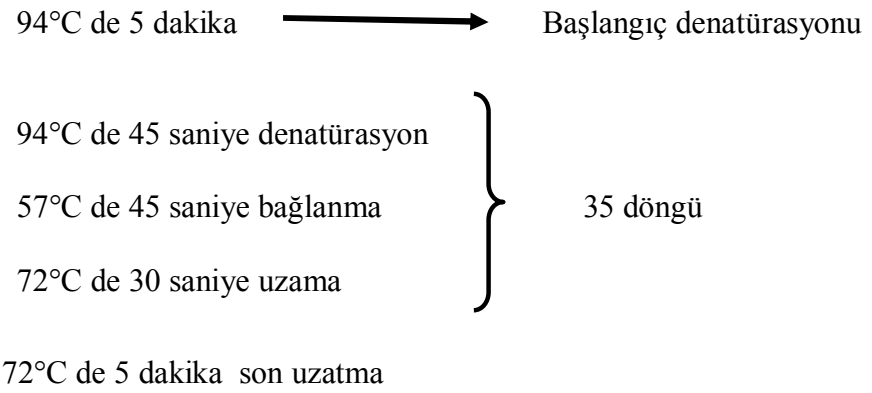
Primer F: 5'CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC 3'

Primer R: 5' CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG 3'

PCR miksi:

ddH ₂ O	25.4 µl
10xPCR buffer	5 µl
dNTP miks (10mM)	0.4 µl
primer F (1 µM)	4 µl
primer R (1 µM)	4 µl
Taq pol (5 u/ µl)	0,2 µl
MgCl (50mM)	4 µl
DNA	7 µl
	+ -----
	50 µl

PCR şartları:



3.5. Amplifikasyon Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi

3.5.1. C677T Polimorfizmini İçeren Genomik Bölgenin Hinf 1 Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

15 µl'lik PCR ürününe 0.5 µl enzim, 2.5 µl R⁺ buffer ve 7 µl ddH₂O eklenerek 37 °C de 16 saat inkübe edilerek kesim yapılmıştır.

R ⁺ Buffer	→ 2.5 µl	} 37 °C de 16 saat inkübasyon
Hinf 1 enzim	→ 0.5 µl	
ddH ₂ O	→ 7 µl	
PCR ürünü	→ 15 µl	

3.5.2. A1298C Polimorfizmini İçeren Genomik Bölgenin Mbo II Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

20 µl'lik PCR ürününe 0.2 µl enzim, 0.5 µl R⁺ buffer ve 4.3 µl ddH₂O eklenerek, 37 °C de 16 saat inkübe edilerek kesim yapılmıştır.

R ⁺ Buffer	→ 0.5 µl	} 37°C de 16 saat inkübasyon
Mbo II enzim	→ 0.2 µl	
ddH ₂ O	→ 4.3 µl	
PCR ürünü	→ 20 µl	

3.5.3. Enzim Kesim Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Ayrılması

PCR örneklerinin Hinf 1 ve Mbo II restriksiyon enzimleri ile kesimlerinden sonra oluşan ürünlerin incelenmesi için %2 lik ve %3 lük agaroz jeli hazırlanarak örnekler agaroz jel elektroforezi yöntemine tabi tutulmuştur. %2 lik ve %3 lük agaroz jel için hazırlanan agaroz mikrodalga fırın kullanılarak yüksek ısıda 1XTBE solüsyonu içinde çözündürülmüştür. Çözeltinin soğuması beklenecek içerisinde konsantrasyonu 0.5 µl/ml olacak şekilde etidyum bromür eklenmiştir.

Elektroforeze başlamadan önce tank, taraklar ve jel yatağı temizlenip, tankın benç üzerindeki dengesi ayarlanmış, tarak ve jel küveti tanka yerleştirilip, hazırlanan jel küvete dökülmüştür. Jel donduktan sonra tank 1×TBE çözeltisi ile doldurulmuştur. 25 µl PCR ürünü alınıp, üzerine 2.5 µl 6X lik yükleme tamponundan konularak karıştırılmış ve jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir (Her jelin ilk ve son kuyusuna marker yüklenmiştir).

Yükleme işlemi bittikten sonra elektrotlar yerleştirilerek 120 voltta yürütülmüştür. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi ile incelenerek görüntüsü alınmıştır.

3.6. Plazma Homosistein, Folat ve B12 Vitamini ölçülmesi

Bir gece açlıktan sonra ve bir gece L-dopa ve entakapon tedavisi almayan bireylerden kan örnekleri toplandı. Plazma Hcy, folat ve vitamin B12 değerleri ölçüldü. Homosisteinin, folat ve B12 referans aralığı sırasıyla 5-15 µmol/L, 4.6-18.7 ng/ml ve 191-663 pg/ml olarak değerlendirildi.

3.7. İstatistiksel Analiz

Sürekli veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Kategorik veriler ise % olarak verilmiştir. Normal dağılım gösteren veriler için grup sayısı iki olan durumlarda student t testi kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen veriler için 2'li grupların karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi, çoklu grupların testinde ise Kruskal – Wallis testi kullanılmıştır. Çalışma sonucu elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Windows ortamında SPSS (Statistical Package for Social Science) 15.0 istatistiksel paket programı ve Sigma stat 3.5, programlarından yararlanılmıştır. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ve gruplar arasında

farklılıkların saptanmasında Ki - Kare (Chi-Square) analizi kullanılmıştır. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, önemlilik düzeyi için $p<0.05$ değeri kriter kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Hareket Bozukluğu Polikliniği'nde klinik olarak Londra Beyin Bankası tanı kriterlerine göre sporadik PH tanısı almış 70 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Moleküler analizler (periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu, PCR, RFLP) Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Hastaların yaşları, cinsiyetleri, hastalık başlangıç zamanları hasta dosyalarından temin edilmiştir. Çalışmamıza ayrıca diabetes mellitus, kronik böbrek yetmezliği, nörodejeneratif hastalığı gibi sistemik hastalığı olmayan ve Hcy plazma seviyesini yükseltecek herhangi bir ilaç kullanmayan 100 sağlıklı birey dahil edilmiştir.

4.1. Araştırma Grubu Bireylerinin Demografik Özellikleri

Çalışma grubumuza dahil edilen hastaların 35'i erkek, 35'i kadındır (Tablo 4.1). Kontrollerin 56'sı kadın 44'ü erkektir. Hastaların yaş ortalaması $65,89 \pm 9,25$ ve kontrollerin yaş ortalaması $66 \pm 5,85$ yıl olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.1. Hastaların ve kontrollerin cinsiyetlerine göre dağılımı

Cinsiyet	Hasta		Kontrol	
	N	%	N	%
Kadın	35	50	56	56
Erkek	35	50	44	44
Toplam	70	100	100	100

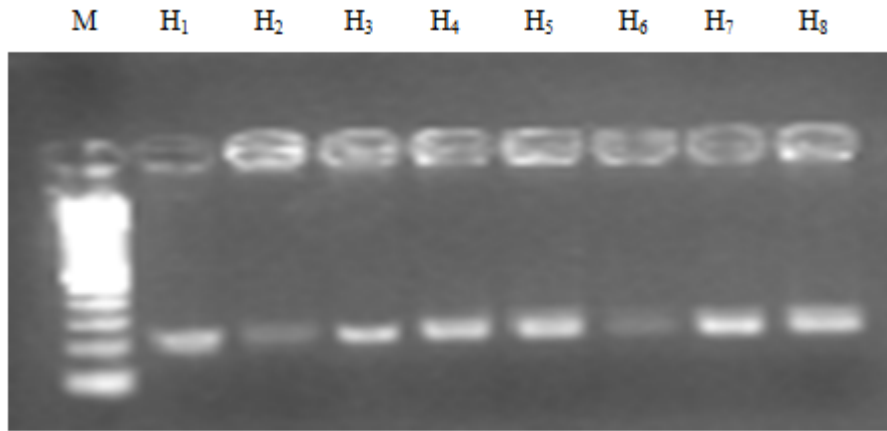
Tablo 4.2'de görüldüğü üzere hastaların %11.86'sı (n=9) erken başlangıçlı 50 yaş altı grubu, %88.14'ü (n=61) geç başlangıçlı 50 yaş üstü grubu oluşturmaktadır.

Tablo 4.2. Olguların hastalık başlangıç yaşına göre dağılımı

Klinik Tanı Yaşı	N	%
Erken Başlangıçlı <50	9	11.86
Geç Başlangıçlı \geq 50	61	88.14
Toplam	70	100.0

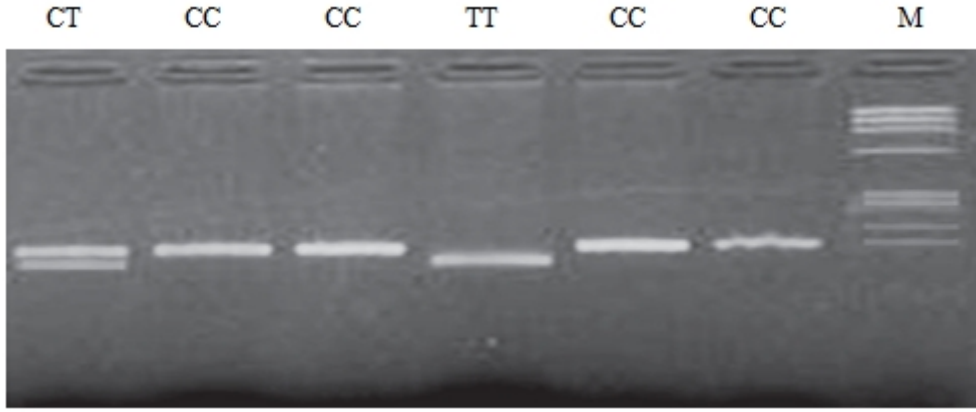
4.2. C677T Polimorfizminin RFLP Yöntemi ile İncelenmesi

PH tanısı alan ve 100 kontrol 70 olgunun DNA izolasyonu periferik kan örneklerinden gerçekleştirilmiştir. FastPCR programı kullanılarak dizayn edilen primerler ile toplamda 193 bp'lik genomik bölgenin amplifikasyonu gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrası jel elektroforezde bant kalitesi iyi olan örnekler RFLP analizine alındı, bant kalitesi düşük olan örnekler için ise PCR işlemi tekrarlandı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. C677T polimorfizmini içeren genomik bölgenin PCR sonrası jel elektroforez görüntüsü. M: Marker (100 bp); H: Hasta.

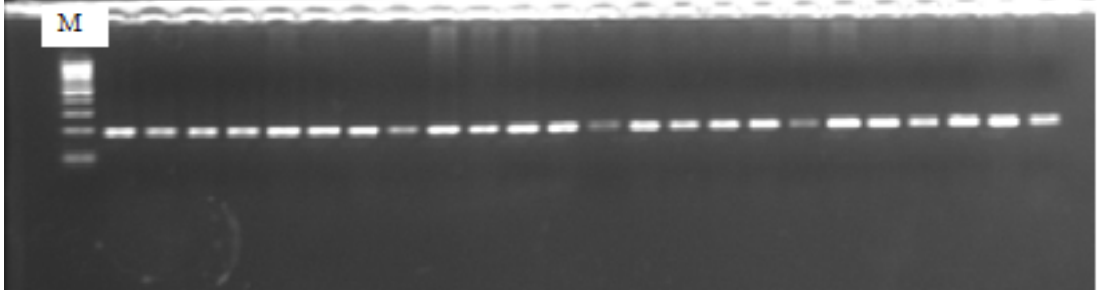
RFLP analizi sonrasında hastalardan 44 ve kontrollerde 50 bireyde CC genotipi, hastalardan 18 ve kontrollerden 44 bireyde CT genotipi tespit edilmiştir. Ayrıca hastalardan 8 ve kontrollerden 6 bireyde TT genotipi tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. C677T polimorfizmini içeren genomik bölgenin kesim sonrası jel elektroforez görüntüsü M: Marker (50 bp); CC: Homozigot wild; CT: Heterozigot; TT: Homozigot mutant.

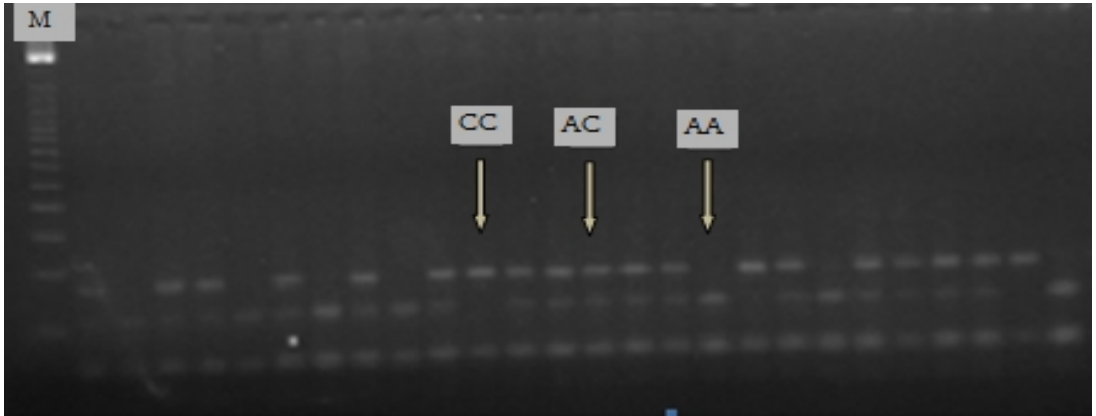
4.3. A1298C Polimorfizminin RFLP Yöntemi ile İncelenmesi

PH tanısı alan 70 olgu ve 100 kontrol DNA izolasyonu periferik kan örneklerinden gerçekleştirilmiştir. FastPCR programı kullanılarak dizayn edilen primerler ile toplamda 163 ve bp'lik genomik bölgenin amplifikasyonu gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrası jel elektroforezde bant kalitesi iyi olan örnekler RFLP analizine alındı, bant kalitesi düşük olan örnekler için ise PCR işlemi tekrarlandı (Şekil 4.3.)



Şekil 4.3. A1298C polimorfizmini içeren genomik bölgenin PCR sonrası jel elektroforez görüntüsü. M: Marker (100 bp).

PCR sonrası elde edilen PCR ürünleri RFLP analizi yapılmıştır. Hastalardan 24 kontrollerden 41 bireyde AA homozigot wild, hastalardan 31 ve kontrollerden 50 bireyde AC heterozigot, hastalardan 15 ve kontrollerden 9 bireyde CC homozigot mutant genotip tespit edilmiştir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. A1298C polimorfizmini içeren genomik bölgenin kesim sonrası jel elektroforez görüntüsü M: Marker (50 bp); AA: homozigot wild; AC: heterozigot; CC: homozigot mutant.

70 hastanın 26'sı L-dopa (L) tedavisi almaktadır. 33 hasta L-dopa tedavisi ile birlikte entakapon (E) tedavisi almaktadır. 11 hastada Dopamin agonisti (DA) (ropinirol ve pramipeksol) almaktadır (Tablo 4.3). Olguların Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRSIII) skorları 37.61 ± 15.57 ve Hoehn Yahr değerleri 2.21 ± 0.68 olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4.3. Çalışmada değerlendirilen olguların klinik özellikleri. (L: levodopa; L ve E: levodopa ve entakapon; UPDRS: Unified Parkinson's Disease Rating Scale; ortalama \pm Standart sapma; n: Hasta sayısı; DA: Dopamin agonisti)

Ortalama Yaş	65,89 \pm 9,25
Cinsiyet (%erkek/kadın)	50.0/50.0
Hoehn Yahr değerleri	2.21 \pm 0.68
UPDRSIII	37.61 \pm 15.57
Ortalama L-DOPA Dozu (mg/gün)	543.27 \pm 310.13
L yıl	2.14 \pm 4.1
L(n)	26
L ve E(n)	33
DA(n)	11

Hasta ve kontrol grubumuz arasında Hcy düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (sırasıyla 18.29 \pm 9.22 ve 15.77 \pm 7.58, $P > 0.05$) (Tablo 4.4). İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da hastaların Hcy ortalaması kontrollerden yüksektir. Hastaların ve kontroller arasında folat ve vitamin B12 düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. (sırasıyla 88.84 \pm 3.31 7.59 \pm 3.35, $P > 0.05$), vitamin B12 (sırasıyla 296.32 \pm 214.09 379.41 \pm 191.06, $P > 0.05$)

Hastalar ve kontroller arasındaki C677 ve A1298 allel frekansları açısından da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. MTHFR genotip dağılımına baktığımızda hastalarda ve kontrollerde en çok compound (bileşik) CC/AC genotipi gözlenmiştir.

Tablo 4.4. Hasta ve kontrollerin biyokimyasal değerleri, MTHFR genotip, allel frekans dağılımı

	HASTA N=70	KONTROL N=100	P
Biyokimyasal data			
Hcy ($\mu\text{mol/l}$)	18.29 \pm 9.22	15.77 \pm 7.58	P > 0.05
Folat (ng/ml)	8.84 \pm 3.31	7.59 \pm 3.35	P > 0.05
Vitamin B12 (pg/ml)	296.32 \pm 214.09	379.41 \pm 191.06	P > 0.05
Genetik data			
Allel sıklığı			
C677	0.75	0.72	P > 0.05
T677	0.25	0.28	P > 0.05
A1298	0.56	0.66	P > 0.05
C1298	0.44	0.34	P > 0.05
Genotip Dağılımı			
CC677/AA1298	n=14 (%20)	n=15 (%15)	P > 0.05
CT677/AA1298	n=4 (%5.7)	n=22 (%22)	P > 0.05
TT677/AA1298	n=6 (%8.5)	n=4 (%4)	P > 0.05
CC677/AC1298	n=20 (%28.5)	n=28 (%28)	P > 0.05
CC677/CC1298	n=10 (%14.2)	n=7 (%7)	P > 0.05
CT677/AC1298	n=11 (%15.7)	n=20 (%20)	P > 0.05
CT677/CC1298	n=3 (%4.2)	n=2 (%2)	P > 0.05
TT677/AC1298	n=2 (%4.2)	n=0	
TT677/CC1298	n=0	n=2 (%2)	

Çalışmamızda hasta ve kontroller arasında MTHFR compound (bileşik) genotip dağılımı ve Hcy düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur. TT/AA genotipini taşıyan hastalarda Hcy düzeyi en yüksekti (27.33 \pm 18.68) kontrollerde ise (23.65 \pm 7.04) olarak bulundu. Kontrollerde en yüksek Hcy düzeyi CT677/CC1298 genotipini taşıyanlarda bulundu (Tablo 4.5). TT/AA genotipini

taşıyan hastalarda Hcy düzeyi diğer genotipi taşıyan hasta ve kontrollerden daha yüksekti. Ancak Hcy düzeyi en düşük CT genotipinde görüldü (15.23 ± 6.19). CC677/AA1298 genotipine sahip kontrollerde Hcy düzeyi ortalaması en düşük çıkmıştır (11.95 ± 6.55).

Tablo 4.5. Hasta ve kontrol Hcy düzeyi ve MTHFR genotip dağılımı

MTHFR genotip	Hcy Seviyesi ($\mu\text{mol/l}$)	
	Hasta	Kontrol
CC677/AA1298	18.12 ± 9.56	11.95 ± 6.55
CT677/AA1298	15.23 ± 6.19	15.51 ± 7.57
TT677/AA1298	27.33 ± 18.68	23.65 ± 7.04
CC677/AC1298	16.83 ± 5.92	16.41 ± 6.37
CC677/CC1298	18.6 ± 6.42	16.74 ± 4.23
CT677/AC1298	16.83 ± 9.71	13.16 ± 7.13
CT677/CC1298	14.57 ± 3.5	25.9 ± 0.42

L-dopa tedavisi alan hastalarda Hcy düzeyi (19.56 ± 10.77) diğer gruplara göre yüksek düzeydedir ancak L-dopa ve entakaponu birlikte alanlara, DA agonisti alanlara ve kontrole göre (sırasıyla 17.13 ± 7.69 , 18.76 ± 9.94 ve 15.7 ± 7.58 $p > 0.05$) istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır (Tablo 4.6). Hcy düzeyi en düşük çıkan grup kontrol grubudur (15.7 ± 7.58). L-dopa tedavisi alan hastaların hastalık süreleri DA kullananlara göre anlamlı derecede yüksektir (sırasıyla 8.96 ± 5.29 ve 3.27 ± 1.27 $P < 0.001$). L-dopa tedavisi alanlar ile DA alanlar arasında Hcy düzeyi arasında

anlamli fark bulunmadı. Hcy düzeyi üzerine hastalığın süresinin etkisi olmamıştır. Grupların folat ve vitamin B12 düzeyleri normaldir.

Tablo 4.6. Hasta ve kontrollerin klinik özellikleri ve biyokimyasal değerleri (L: levodopa; E: Entakapon)

	L	L – E -	L+ E+	Kontrol	p
Yaş	70 ± 6,87	57 ± 10,16	65,03 ± 8,26	66±5.85	
Kadın / Erkek	17 / 9	4 / 7	14 / 19	56 / 44	
Hoehn Yahr	2.52 ± 0.84	1.55 ± 0.15	2.2 ± 0.45		
Hasta yıl	8.96 ± 5.29	3.27 ± 1.27	8.06 ± 4.01		
L-DOPA doz(mg/gün)	543.27 ± 310.13		428.79±167.25		
L-DOPA Yıl	2.14±4.1		2.14±4.1		
Entakapon			478.79 ±199.6		
Hcy	19.56 ± 10.77	18.76 ± 9.94	17.13 ± 7.69	15.7±7.58	p>0.05
Folat	8.93 ± 3.81	8.31 ± 2.45	8.93 ± 3.21	7.6±3.35	p>0.05
B12	295.14±148.13	255.92±153.63	289.34±200.39	379.41±191.06	p>0.05

Hastalarda TT genotipini frekansı hastalarda kontrollerden daha yüksektir (%11.4, %6 P<0.05). Aynı genotipi taşıyan gruplar arasında birey sıklığı ve Hcy düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır (Tablo 4.7). TT genotipini taşıyan L-dopa tedavisi alan hastalarda diğer genotipleri taşıyan L-dopa tedavisi alan hastalara göre Hcy düzeyi istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır (sırasıyla 36.28±16.17, 13.5±1.71, 17.2±6.59 P<0.01). Farklı genotipdeki aynı hasta grupları arasında Hcy düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 4.7.Hasta ve kontroller MTHFR genotip dağılımı (L: Levodopa; E: entakapon)

	L-dopa	L-E-	L+E+	Kontrol	P
C677T(n)					
C/C	17.2±6.59(18)	16.09±6.58(6)	18.5±8.15(20)	15.12±6.42(50)	P>0.05
C/T	13.5±1.71(4)	21.96±13.02(5)	13.9±4.63(9)	14.91±7.59(44)	P>0.05
T/T	36.28±16.17(4)		17.29±10.5(4)	27.45±8.03(6)	P>0.05
A1298C(n)					
A/A	25.97±16.59(8)	18.1±7.83(3)	16.65±9.22(13)	15±7.74(41)	P>0.05
A/C	16.83±7.32(13)	22.08±11.26(6)	15.93±7.2(12)	15.85±7.76(50)	P>0.05
C/C	20.6±7.05(5)	9.79±1.7(2)	19.68±5.74(8)	18.78±5.45(9)	P>0.05

5.TARTIŞMA

PH, ikinci en sık karşılaşılan nörodejeneratif hastalıktır (3). PH her ırkta, her meslek grubunda görülebilen bir hastalıktır. Çalışmaları incelediğimizde PH'nin insidansı kabaca tüm yaş grupları için 100 000'de 4,5 ile 19 arasında değişmektedir. PH insidansının ırklar veya etnik gruplar arasında farklılığını araştıran bazı çalışmalarda beyaz ırkda 13.2/100 000, Asyalılarda 11.3/100 000 ve siyahlarda 10.2/100 000 görülmüştür (5). PH insidansında en önemli faktör yaştır. Yapılan pek çok çalışmada 50 yaşın altında PH çok nadirdir, 60 ve 80'li yaşlarda arasında ise bir artış söz konusudur (4). Böyle sıklıkta gözlenen PH'nin tedavisi için yapılan harcamalar, ülkelerin sağlık giderlerine de büyük maliyetler yüklemektedir.

Son zamanlarda PH ile ilgili yapılan genetik çalışmalar neticesinde, PH'nin etiyopatogenezine yönelik ilerlemeler kaydedildi. PH'nin tanısını koymak için bazı tanı kriterlerinin kullanılmasına rağmen tanı koymayı netleştirmek için kesin moleküler tanı yöntemi yoktur. PH tanısı konan hastaların değişik klinik göstermesi, tedaviye yanıtlarının farklı olması, patolojik bulguların hastadan hastaya farklılık göstermesi değişik moleküler yolların patogeneizde etkili olduğunu düşündürmektedir. Şu an için genel olarak kabul gören patogenetik mekanizmalar; oksidatif stres, anormal protein akümüasyonu, mitokondriyal disfonksiyon ve ÜPS olarak özetlenebilir. PH'nin nedeni olarak gösterilen genlerde yapılan çalışmalar nörodejenerasyon ile ilişkili bu patogenetik mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını sağlamakta ve aynı zamanda hastalığın etkin bir şekilde tedavi edilebilmesi için yeni terapötik hedefler sunmaktadır.

Şimdiye kadar PH'nin genetik ile ilişkisini araştırmaya dönük çok sayıda çalışma yapılmıştır ve genetik anormalliklerin hastalığın etiyopatogenezinde majör rol oynadığına dair bulgular gün geçtikçe artmaktadır. PH'de ailesel agregasyon görülmesi, kesin olarak mendeliyen kalıtım paterninin gözlemlendiği ailelerin tespit edilmesi ve genetik assosiasyon çalışmaları hastalığın etiolojisinde genetik faktörlerin önemli rol oynadığını düşündürmüştür. PH'nin genetik etiolojisinin araştırılmasına yönelik farklı yöntemlerin ve farklı hasta gruplarının kullanıldığı birçok çalışmanın bulguları doğrultusunda günümüzde PH ile ilişkili en azından 13 lokus ve 9 gen tanımlanmıştır. Bildirilen bu gen ve lokuslar dışında daha birçok

genin PH ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Bu genlerin başında gelen MTHFR geni direk PH'ye neden olmasa da Parkinson hastalarında hiperhomosisteinemi gelişimi açısından risk faktörü olarak tanımlanmaktadır. MTHFR geni üzerinde tanımlanmış olan polimorfizmler (C677T, A1298C) enzimin aktivitesini azaltarak plazma homosistein düzeyini artırmaktadır (104). Plazma Hcy düzeyindeki artış PH'ye giden nörodejenerasyona yol açmakta ve dolayısıyla bu polimorfizmlerin günümüzde PH'de hiperhomosisteinemi gelişimi için risk faktörü olabileceği belirtilmektedir. Buradan anlaşılacağı üzere plazma Hcy seviyesini artıran her türlü etmen (genetik, çevresel, iatrojenik) aslında PH'de hiperhomosisteinemi için bir risk oluşturmaktadır. Hiperhomosisteinemiye neden olan çevresel etmenler içinde en iyi bilinenleri folat ve B12 eksiklikleri, sigara, kafein, alkol kullanımınıdır. PH'nin tedavisinde temel olarak kullanılan L-dopa'nın da hiperhomosisteinemiye yol açtığını bildiren yayınlar bulunmaktadır. L-dopa, COMT enzimi tarafından O- metilasyon ile metabolize olmaktadır. Bu reaksiyonlarında metil grup vericisi olarak SAM kullanılmaktadır. Dolayısıyla L-dopa tedavisi Hcy'nin metyonine dönüşümü için gerekli olan metil gruplarını azaltarak en sonunda hiperhomosisteinemi ile sonuçlanmaktadır. Tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde hiperhomosisteinemi PH'den ziyade L-dopa tedavisi nedeniyle oluşmaktadır (80,81,82). Biz çalışmamızda PH tanısı alan olgulardaki Hcy düzeylerini MTHFR gen polimorfizmleri ve L-dopa tedavisi arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık.

Çalışmamıza Londra Beyin Bankası tanı kriterlerine göre PH tanısı alan 70 olgu ve 100 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Olguların klinik takip ve tedavileri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Hareket Bozukluğu Polikliniği tarafından yapılmaktadır. Hastaların ve kontrol bireylerinin Hcy, folat, B12 düzeyleri ölçüldü. MTHFR genindeki C677T ve A1298C polimorfizmlerinin varlığı RFLP yöntemiyle araştırıldı. Hastalar L-dopa tedavisi alan, L-dopa ve entakapon birlikte alan ve DA alanlar şeklinde gruplandırılarak kontrollerle MTHFR polimorfizmi, Hcy, folat ve B12 plazma değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Çalışmamızda MTHFR geninde hiperhomosisteinemiye neden olan C677T ve A1298C polimorfizmlerini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamıza dahil edilen 70 olgu ve 100 kontrolün DNA örneklerinde gerçekleştirilen analizler sonucunda hastalar ve kontroller arasındaki C677 ve A1298

allel frekansları (sırasıyla %75 ve %72) açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Çalışmamızda hasta ve kontroller arasında MTHFR compound (bileşik) genotip dağılımı ve Hcy düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı değildi. Hcy seviyesinin en yüksek olduğu grup TT/AA genotipini taşıyan hastalardı (27.33 ± 18.68) ve aynı zamanda Hcy seviyeleri aynı genotipi taşıyan kontrollerde de yine yüksek olarak saptandı (23.65 ± 7.04). Hasta ve kontrol grubumuz arasında Hcy düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla 18.29 ± 9.22 ve 15.77 ± 7.58 $P > 0.05$). İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da hastaların Hcy ortalaması kontrollerden yüksektir.

Kontrollerde en yüksek Hcy düzeyi CT677/CC1298 genotipini taşıyanlarda bulundu. Hcy düzeyi en düşük CT genotipinde görüldü (15.23 ± 6.19). Hcy düzeyi ortalaması en düşük çıkan grup CC677/AA1298 genotipine sahip olan hastalardı (11.95 ± 6.55).

Valkovic ve arkadaşları PH tanısı alan 57 olguda vit B12, serum folat, plazma Hcy seviyesi üzerinde bir COMT inhibitörü olan entakaponun etkisini değerlendirmişlerdir. Hastaların 19'u sadece L-dopa tedavisi almış, 21 hasta da L-dopa ve entakaponu birlikte almıştır. Dopamin agonisti alan 17 hastayı kontrol grubu olarak değerlendirmişlerdir. Ortalama Hcy düzeyinin sadece L- dopa kullananlarda iki ilacı birlikte kullananlardan ve kontrol grubundan yüksek olduğunu belirtmişlerdir ($P=0.001$, $P=0.0001$). Bizim çalışmamızdaki ortalama Hcy düzeyi ise sadece L-dopa kullananlarda iki ilacı birlikte kullananlardan, DA agonisti kullananlardan ve kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P > 0.05$). İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunmasa da sadece L-dopa tedavisi alan hastaların Hcy düzeylerinin diğer gruplardan yüksek olduğu gözlemlendi. Bu bulgular neticesinde PH'de L-dopa tedavisinin Hcy düzeyini anlamlı derecede arttırmadığı gözlenmiştir. L-dopa ve entakaponu birlikte kullanan hastalarda Hcy düzeyinin sadece L-dopayı kullananlara göre belirgin derecede düşük çıkmadığı saptandı. Dolayısıyla Valkovic ve ark.nın belirttiği gibi entakaponun Hcy düzeyini kontrolünde önemli olduğu sonucuna ulaşamadı (110).

Lin ve ark. 94 sporadik PH ve 146 kontrol grubunu değerlendirdikleri çalışmalarında, MTHFR C677T polimorfizminin hasta ve kontroller arasında allelik ve genotipik frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadıklarını

belirtmişlerdir. Ancak TT genotipini ve T allelinin frekansını hastalarda kontrollere göre istatistiksel olarak yüksek bulmamışlarsa da T allel frekans sıklığının daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. 70 hasta ve 100 kontrol bireyinin değerlendirildiği çalışmamızda ise TT genotip frekansı hastalarda kontrollere göre istatistiksel olarak yüksek olduğu gözlenmiştir ($P<0.05$) (111).

Caccamo ve ark. 49 L-dopa tedavisi alan PH'li ve 86 sağlıklı bireyi dahil ettikleri çalışmalarında folat/vitB12, günlük L-dopa dozu ve MTHFR polimorfizminin PH'de hiperhomosisteinemi gelişimi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. MTHFR genotip analizini DG-DGGE yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında Hcy düzeyini hastalarda kontrollerden önemli oranda yüksek bulmuşlardır (16.3 ± 5.7 ve $11.7\pm 2.7\mu\text{mol/L}$, $P<0.01$). Hasta ve kontroller arasında folat, vitB12 seviyesi açısından önemli fark bulamamışlardır. Ancak TT/AA genotip sıklığının hastalarda kontrollere göre yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir (%32.5 ve %17.4, $P<0.05$). Aynı zamanda TT/AA genotipini taşıyanlar hastalarda Hcy düzeyini de yüksek bulmuşlardır (22.1 ± 4.9). Bizim çalışmamızda da TT/AA genotipini taşıyan hasta ve kontrollerde Hcy seviyesinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla TT/AA genotipinin plazma Hcy seviyesi üzerinde arttırıcı bir etkisi olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (112).

Todorovic ve ark. PH patogenezinde MTHFR geni C677T polimorfizmi ve L-dopa tedavisinin etkileşimini araştırdıkları çalışmalarında, 83 L-dopa tedavisi alan ve 30 tedavi almayan olmak üzere toplam 113 hastayı incelemişlerdir. Aynı zamanda çalışmaya 53 sağlıklı birey kontrol grubu olarak dahil edilmiştir. Analiz yöntemi olarak RFLP metodunu seçtikleri çalışmalarında, Hcy seviyesinin her iki hasta grubunda da kontrollere göre önemli oranda yüksek olduğunu saptamışlardır ($P<0.05$). Ayrıca TT genotipini taşıyan bütün gruplarda Hcy seviyesinin diğer genotipleri taşıyanlara göre yüksek olduğunu bulmuşlardır ($P<0.001$). Bizim çalışmamızda ise Hcy düzeyi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. Ancak TT genotipini taşıyan hastalarda ve kontrollerde Hcy seviyesi yüksek olarak tespit edildi. Ayrıca L-dopa tedavisi alan hastalar kendi içerisinde değerlendirildiğinde de TT genotipini taşıyan olguların plazma Hcy seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlendi. Sonuç olarak plazma Hcy

düzeyi üzerinde L-dopa tedavisinden ziyade TT genotipinin etkisinin belirgin olduğu saptanmıştır (113).

Religa ve ark. PH tanısı alan olgularda MTHFR gen polimorfizmi ve hiperhomosisteinemi ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında L-dopa tedavisi alan 99, tedavi almayan 15 olgu olmak üzere toplam 114 hastayı değerlendirmişlerdir. Araştırmalarında 100 sağlıklı bireyi kontrol grubu olarak seçmişlerdir. Plazma Hcy seviyesi üzerine polimorfizmin etkisi kadar L-dopa dozu ve tedavi süresini de değerlendirdikleri çalışmalarında L-dopa tedavisi alan hastaların plazma Hcy düzeylerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu saptamışlardır ($P<0.05$). L-dopa dozu ile Hcy düzeyleri arasında bir ilişki saptanmazken hastalık süresinin plazma Hcy düzeylerini arttırıcı bir faktör olabileceğini belirtmişlerdir. C677T polimorfizmi açısından allel frekansında kontrol grubuna göre bir fark saptamamışlardır (114). Bizim çalışmamızda da L-dopa tedavisi alan hastaların plazma Hcy seviyeleri kontrol grubuna göre yüksek olarak saptanmışsa da istatistiksel olarak bir anlamlılık elde edilememiştir. Hastalık süresi ile plazma Hcy seviyesi arasında bir ilişki de saptanmamıştır. Çalışmamızda plazma Hcy düzeyi üzerinde hastalık süresinden ziyade TT genotipinin etkisinin belirgin olduğu saptanmıştır.

Yuan ve ark. 48 L-dopa tedavisi alan, 28 tedavi almayan PH tanısı alan olguları dahil ettikleri çalışmalarında plazma Hcy seviyelerinin L-dopa tedavisi ve MTHFR polimorfizmi ile ilişkisini araştırmışlardır. Çalışmalarına 110 sağlıklı bireyi kontrol grubu olarak dahil etmişlerdir. Plazma Hcy seviyelerinin L-dopa tedavisi alan bireylerde tedavi almayan hastalara ve kontrol grubuna göre belirgin derecede yüksek olduğunu saptamışlardır. Ayrıca plazma Hcy seviyesinin L-dopa tedavisi alan ve TT genotipini taşıyan hastalarda en yüksek seviyede olduğunu saptamışlar ve A1298C polimorfizminin belirgin etkisinin olmadığını belirtmişlerdir (115). Çalışmamız Yuan ve ark.larının bulguları ile benzerlik göstermektedir. Ancak bizim hasta grubumuzda L-dopa tedavisi alan hastalardaki plazma Hcy seviyeleri Yuan ve ark.larının hasta grubuna göre çok yüksek değildi. Çalışmamızda en yüksek Hcy düzeyleri tedaviden bağımsız olarak TT genotipine sahip olan bireylerde saptandı.

Çalışmamız sonucunda L-dopa tedavisi alanlar ile entakapon kombinasyonu alanlar arasında Hcy düzeyi açısından anlamlı fark bulunamamıştır. Bu durumun

hasta grubumuzda verilen L-dopa tedavi dozunun düşük kalmasına bağlı olabileceği düşünüldü. Ayrıca hastalarımızın L-dopa kullanım süresinin (2,14+-4,1 yıl) diğer çalışma gruplarına göre (6.3-15 yıl) kısa olmasının da her iki grup arasında fark bulunamamasına sebep olabileceği şeklinde yorumlandı. Bununla birlikte çalışmamıza dahil edilen hasta sayısının az olması da anlamlı sonuç elde etmemizi engellemiş olabilir.

Tablo 5.1. Farklı toplumlardaki Hcy düzeyleri (L+: levodopa tedavisi; L+COMT- I: levodopa ve COMT-I tedavisi alan)

	Ülke	Çalışma Düzeni	Hasta Kontrol(K)	N	Hcy (µmol/L)
Allain ve ark. 1995	Fransa	Vaka -Kontrol	L+ K	32 25	14.5 9.8
Kuhn ve ark. 1998	Almanya	Vaka -Kontrol	L+ K	22 22	17.3 13.5
Yasui K ve ark. 2000	Japonya	Vaka -Kontrol	L+ K	90 50	16.3 10.2
Blandini ve ark. 2001	İtalya	Vaka -Kontrol	L+ K	36 31	16.9 10.8
Kuhn ve ark. 2001	Almanya	Vaka -Kontrol	L+ K	132 54	17.3 13.1
Muller ve ark. 2001	Almanya	Vaka -Kontrol	L+ K	20 20	12.75 8.98
Brattsrom ve ark. 2001	İsviçre	Vaka -Kontrol	L+ K	54 132	17.3 13.1
Lamberti ve ark. 2004	İtalya	Vaka -Kontrol	L+ L+COMT-I K	26 20 32	17.7 14.4 10.3
Özkan S.ve ark. 2004	Türkiye	Vaka -Kontrol	L+ L+DA DA K	10 10 10 10	22.5 17.75 14.21 11.3
Çalışmamız 2011	Türkiye	Vaka -Kontrol	L+ DA L+E K	26 11 33 100	19.56 18.76 17.13 15.7

Tablo 5.1 de görüldüğü gibi plazma Hcy düzeyi toplumlar arasında farklılık göstermektedir. Çalışmamızda tedavi alan her iki grupta ve kontrol bireylerinde plazma Hcy düzeyinin normalin üzerinde saptanması, bu durumun toplumsal bir özellik sonucu olabileceğini düşündürmüştür. Analiz sonucunda hastalarımız ile kontrollerimiz arasında plazma Hcy düzeyi açısından anlamlı fark bulunmadı. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamasının kontrol grubunun değerlerinin normalin üstünde olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü. Literatür ile uyumlu olarak PH tanısı alan olgularda MTHFR geni C677T polimorfizminin plazma Hcy seviyesi ile ilişkili olduğu saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Adams RD, Victor M, Ropper AH. Principles of Neurology. 6 th ed.New York, NY:McGraw-Hill; 1997:1067-1068.
2. Duvasion RC. History of Parkinsonism.Pharmacology and Therapeutics. 1937;32:1-17.
3. Korell M, Taner CM.Epidemiology of Parkinson's Disease: An Overwiev.In: Edabi M, Pfeiffer RF,editörs.Parkinson's Disease.New York:CRC Pres;2005.p.39-50.
4. Tanner CM. Epidemiology of Parkinson's disease.Neurol Clin 1992 ;10:317-29.
5. Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL,Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, et al. Incidence of Parkinson's disease: variation by age,gender, and race/ethnicity. Am J Epidemiol 2003;157:1015-22.
6. Harada H, Nishikawa S, Takahaski K.Epidemiology of Parkinson's disease in Japanese city.Arch Neurol.1983;40:151-154.
7. Torun Ş, Uysal M, Gücüyener D, Özdemir G.Parkison's Disease in Eskisehir, Turkey.Eur J.1995; 2(1):44-45.
8. Mårs U, Larsson BS.Pheomelanin as a binding site for drugs and chemicals. Pigment Cell Res 1999;12:266-74
9. Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, ShrivastavaS. A meta-analysis of Parkinson's diseaseand exposure to pesticides. Neurotoxicology 2000;21:435-40.
10. De Rijk MC, Breteler MMB, den Breeijen JH.Dietary antioxidants and Parkinson disease: the Rotterdam Study.Arch Neurol.1997;54:762-765
11. Hernan MA, Takkouche B, Caamano-Isorna F,Gestal-Otero JJ. A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. Ann Neurol 2002 52:276-84
12. Fall PA, Fredrikson M, Axelson O, Granérus AK. Nutritional and occupational factors influencing the risk of Parkinson's disease: a case-control study in

- southeastern Sweden. *Mov Disord* 1999;14:28-37. 43. Ross GW, Abbott RD, Petrovitch H, White LR, Tanner CM. Relationship between caffeine intake and parkinson disease *JAMA* 2000; 284:1378-9.
13. Brighina L, Frigerio R, Schneider NK, Lesnick TG, de AM, Cunningham JM, Farrer MJ, Lincoln SJ, Checkoway H, Rocca WA, Maraganore DM. Alpha-synuclein, pesticides, and Parkinson disease: a case control study. *Neurology*. 2008;70(16 Pt 2):1461-1469.
 14. Weintraub D, Stern MB. Psychiatric complications in Parkinson disease. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2005;13(10):844-851.
 15. Rajput AH. Clinical features of tremor in extrapyramidal syndromes. In: Findley LJ, Koller WC, editörs. *Handbook of tremor Disorders*. New York: Marcel Dekker Inc; 1995. s. 275-291.
 16. Paulson HL, Stern MB. Clinical Manifestations of Parkinson's Disease. In: Watts RL, Koller WC (eds), *Movement Disorders Neurologic Principles & Practice*. New York: McGraw-Hill, 2004; 233-245.
 17. Gilroy J. 'Movement Disorders' Basic Neurology. USA: The McGraw-Hill Companies; 2000.
 18. Fahn S. Parkinsonism. In: Rowland LP, editör. *Merrit's Textbook of Neurology*. 9th ed. Baltimore: Md. Lipincott Williams Wilkins; 1995. p. 713-730
 19. Çakmur R. Parkinson hastalığının epidemiyolojisi ve klinik özellikleri. *Türkiye Klinikleri Nöroloji Dergisi*. 2008;15-17.
 20. Apaydın H. Alfa-Sinüklein hastalıkları. *Parkinson Hastalığı ve Hareket Bozukları dergisi*. 1999;2(1):23-30.
 21. Stacky M. Managing late complications of Parkinson's disease. *Medical Clinics of North America*. 1999;83(2):469-480.
 22. Poewe WH, Wenning GK. Natural history of Parkinson's disease. 1998, *Ann Neurol* 44 (Suppl 1):1-9.)
 23. Elibol B. Parkinson hastalığından patogenez: Nöron kaybı mekanizmaları. *Türkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics*. 2008;1(4):15-22.

24. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *J Neurochem.* 2006;97(6):1634-1658.
25. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurol Sci.* 1985;1:22-26.
26. Evans PH. Free radicals in brain metabolism and pathology. *British Med Bull.* 1993;49:577-587
27. Shapira AH. Etiology of Parkinson's disease *Neurology* 2006;66:S10-S23.
28. Fukae J, Mizuno Y, Hattori N. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Mitochondria*, 2007;7:58-62.
29. Shapira AHV. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2008, 7:97-109.
30. Tofaris GK, Spillantini MG. Physiological and pathological properties of alpha-synuclein. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(2):194-201.
31. Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R. et al. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276, 2045–2047.
32. Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M. and Goedert, M. (1998). α -synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95, 6469–6473.
33. Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R. et al. (2003) Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*, 302, 841
34. Vila M, Przedborski S, Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease, *Nature Med*, 2004;10(Suppl): S58-S62.
35. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N., Mutations in the Parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 1998; 392: 605-608.

36. Zhang Y, Gao J, Chung KKK, Huang H, Dawson VL, Dawson TM., Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 13354-13359.
37. Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Yoshino H, Imai H, Kitami T, Sato K, Kuroda R, Tomiyama H, Mizoguchi K, Murata M, Toda T, Imoto I, Inazawa J, Mizonu Y, Hattori N. Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2006;59(2):298-309.
38. Tofaris GK, Garcia Reitböck P, Humby T, et al. Pathological changes in dopaminergic nerve cells of the substantia nigra and olfactory bulb in mice transgenic for truncated human alpha-synuclein(1-120): implications for Lewy body disorders. *J Neurosci* 2006;12:26:3942- 50.
39. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura M, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. 1998;392(6676):605-608.
40. Stenson PD. 2008. The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff [online]. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> html [01/10/2010].
41. Frézal J. 20/10/2010. Genatlas Université René Descartes - Paris. <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/> html [21/10/2010].
42. Zhang Y, Gao J, Chung KKK, Huang H, Dawson VL, Dawson TM. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000;97:13354-13359.
43. van de Warrenburg BPC, Lammens M, Lucking CB. Clinical and pathologic abnormalities in a family with parkinsonism and parkin gene mutations. *Neurology*. 2001;56:555-557.
44. Gasser T, Muller-Myhsok B, Wszolek ZK, et al. A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet* 1998;18:262-5.

45. Gong B, Lez nik E. The role of ubiquitin C-ter - minallyhydrolase L1 in neurodegenerative disorders. *Drug News Perspect* 2007;20:365-7
46. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del TD, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deler T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *2004;304(5674):1158-1160.*
47. Valente EM, Salvi S, Ialongo T, Marongiu R, Elia AE, Caputo V, Romito L, Albanese A, Dallapiccola B, Bentivoglio AR. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol.* 2004;56(3)336-341.
48. van Duijin CM, Dekker MC, Bonifati V, Galjaard RJ, Houwing-Duistermaat JJ, Snijders PJ, Testers L, Breedveld GJ, Horstink M, Sandkuijl LA, van Swieten JC, Oostra BA, Heutink P. Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *2001;69(3)629-634.*
49. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joesse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijin CM, Oostra BA, Heutink P. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *2003;299(5604):256-259.*
50. Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S, Obata F. A new locus for Parkinson's disease (Park8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol.* 2002;51:296-301.
51. Zimprich A, Muller-Myhsok B, Farrer M, Leitner P, Sharma M, Hulihan M, Lockhart P, Strongosky A, Kachergus J, Calne DB, Stoessl J, Uitti RJ, Pfeiffer RF, Trenkwalder C, Homann N, Ott E, Wenzel K, Asmus F, Hardy J, Wszolek Z, Gasser T. The PARK8 locus in autosomal dominant parkinsonism: confirmation of linkage and further delineation of the disease-containing interval. *2004;74(1)11-19.*
52. Lu YW, Tan EK. Molecular biology changes associated with LRRK2 mutations in Parkinson's disease. *J Neurosci Res.* 2008;86:1895-901.

53. Ramirez A, Heimbach A, Gründemann J, Stiller B, Dampshire D, Cid LP. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-typeATPase. *Nat Genet.*2006;38:1184-91.
54. Finkelstein JD. Homocysteine: A history in progress. *Nutr Rev* 2000; 58: 193-204.
55. Ueland PM: Homocysteine species as components plasma redox thiol status. *Clin Chem* 1995;4:340-2
56. Banerjee R, Evande R, Kabil ., Ojha S, Taoka S. Reaction mechanism and regulation of cystathionine b-synthase. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; 1647: 30-35.
57. Okada E, Tohda G, Oida K, Kosaka S, Tada H, Takahashi S, et al. Hyperhomocysteinemia is a risk factor for coronary arteriosclerosis in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22: 484-490.
58. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper's Biochemistry.* Connecticut: Appleton and Lange 1991:557-8.
59. Gilman AG, Rail TW, Nies AS, Taylor P. Hematopoietic agents. In: *The pharmacological basis of therapeutics.* New York: Pergamon Press Inc, 1990.
60. Montgomery R, Dryer RL, Conway TW, Spector AA. *Biochemistry: A case oriented approach.* St Louis: CV Mosby Company, 1983:612-3.
61. Davis RE, Niool DJ. Folicacid. *Int J Biochem* 1988; 20:133-9.
62. Clarok WG, Brater IDC, Johnson AR. Antianemic drugs. In: *Goth's Medical Pharmacology.* St.Louis: CV Mosby Company, 1988:612-3.
63. Spector R, Lorenzo AV. Folate transport in the central nervous system. *Am J Physiol* 1975; 229:777-82.
64. Miller JW, Nadeau MR, Smith J, Smith D, Selhub J. Folate-deficiencyinduced homocysteinaemia in rats: disruption of S-adenosylmethionine's co-ordinate regulation of homocysteine metabolism. *Biochem J* 1994;298(Pt 2):415–9.
65. Kraus JP: *Biochemistry molecular genetics of cystathionine betasynthase deficiency.* *Eur J Pediatr* 1998; 157:(suppl2) S 50-3

66. Ogier de Baulny H, Gerard M, Saudubray JM, Zittoun J: Remethylation defects: guidelines for clinical diagnosis and treatment. *Eur J Pediatr* 1998;157:(suppl 2) S 77-83
67. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH: Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993; 270:2693-8.
68. Herzlick BC. Plasma homocysteine, folate, vitamin B6 and coronary disease risk. *Journal of the American College of Nutrition* 1996;14:109-110
69. Chaveau P, et al: Hyperhomocysteinemia: A risk factor for atherosclerosis in chronic uremic patients. *Kidney International* 1993; 41(suppl): S 72-7
70. Friedman JÁ, Dwyer JT. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for cardiovascular disease in patients undergoing hemodialysis. *Nutrition Review* 1995;53:197-201.
71. Savage D, et al: Sensitivity of serum methylmalonic acid and folate deficiencies. *American Journal of Medicine* 1993; 96:239-46.
72. Sung JJ, et al: Hyperhomocysteinemia, helicobacter pylori and coronary heart disease. *Heart* 1996;76:305-7.
73. Refsum H, et al. Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia; Changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. *Cancer Research* 1991; 51:821-35
74. Sara JR, Rosemary L, Kathy S, et al. homocysteine : The latest risk factor for heart disease. *Dimensions of Critical Care Nursing*. 1992;19 : 11
75. Ueland PM, Refsum H: Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med* 1989; 114:473-501
76. Blankenhorn DH, et al. Colestipol plus niacin therapy elevates plasma homocysteine levels. *Coronary Artery Disease*. 1991;2:557-60.
77. Vermaak WJ, et al : Vitamin B6 nutrition status and cigarette smoking. *Am J Clin Nutr* 1990 ; 51 : 1058 – 61

78. Mc Donald CC, Stewart HH. Fetal myocardial infarction in the Scottish adjuvant tamoxifen trial. *British Medical Journal* 1991 ; 302 : 435 – 7
79. Miller JW, Selhub J, Nadeau MR, Thomas CA, Feldman RG, Wolf PA. Effect of L-dopa on plasma homocysteine in PD patients: relationship to B-vitamin status. *Neurology* 2003;60(7):1125–9.
80. Blandini F, Fancellu R, Martignoni E, Mangiagalli A, Pacchetti C, Samuele A, Nappi G. Plasma homocysteine and l-dopa metabolism in patients with Parkinson disease. *Clin Chem* 2001;47(6):1102–4.
81. Brattström L. Plasma homocysteine and MTHFR C677T genotype in levodopa-treated patients with PD. *Neurology* 2001;56(2):281.
82. Müller T, Woitalla D, Fowler B, Kuhn W. 3-OMD and homocysteine plasma levels in parkinsonian patients. *J Neural Transm* 2002;109(2): 175–9.
83. Miller JW, Shukitt-Hale B, Villalobos-Molina R, Nadeau MR, Selhub J, Joseph JA. Effect of L-Dopa and the Catechol-O-Methyltransferase inhibitor Ro 41-0960 on sulphur amino acid metabolites in rats. *Clin Neuropharmacol* 1997;20:55–66.
84. Yassin MS, Cheng H, Ekblom J, Orelund L. Inhibitors of catecholamine metabolizing enzymes cause changes in S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in the rat brain. *Neurochem Int* 1998;32(1):53–9.
85. van den BM, van der Knaap MS, Boers GH, Stehouwer CD, Rauwerda JA, Valk J. Hyperhomocysteinaemia; with reference to its neuroradiological aspects. *Neuroradiology* 1995;37:403–11.
86. Watkins D, Rosenblatt DS. Functional methionine synthase deficiency (cblE and cblG): clinical and biochemical heterogeneity. *Am J Med Genet* 1989;3:427–34.
87. Andreotti F, Burzotta F, Manzoli A, Robinson K. Homocysteine and risk of cardiovascular disease. *J Thromb Thrombolysis* 2000;9: 13–21.
88. Perry IJ. Serum total homocysteine concentration and risk of stroke. *Lancet* 1996;348:1526.

89. Blundell G, Rose FA, Tudball N. Homocysteine induced endothelial cell toxicity and its protection. *Biochem Soc Trans* 1994;22:341S.
90. Blundell G, Jones BG, Rose FA, Tudball N. Homocysteine mediated endothelial cell toxicity and its amelioration. *Atherosclerosis* 1996;122: 163–72.
91. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994;15:7–10.
92. Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2003;26: 137–46.
93. Troen AM. The central nervous system in animal models of hyperhomocysteinemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29:1140–51.
94. Herrmann W, Knapp JP. Hyperhomocysteinemia: a new risk factor for degenerative diseases. *Clin Lab* 2002;48:471–8
95. Schlüssel E, Preibisch G, Putter S, Elstner EF. Homocysteine-induced oxidative damage: mechanisms and possible roles in neurodegenerative and atherogenic processes. *Z Naturforsch [C]* 1995;50:699–707.
96. Thompson GA, Kilpatrick IC. The neurotransmitter candidature of sulphur-containing excitatory amino acids in the mammalian central nervous system. *Pharmacol Ther* 1996;72:25–36.
97. Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, et al. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci* 2000;20: 6920–6.
98. Ho PI, Ortiz D, Rogers E, Shea TB. Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *J Neurosci Res* 2002;70:694–702.
99. Kruman II, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y, et al. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2002;22:1752–62.

100. Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV, et al. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94: 5923–8.
101. Duan W, Ladenheim B, Cutler RG, Kruman II, Cadet JL, Mattson MP. Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2002;80:101–10.
102. Homberger G, Linnebank M, Winter C, et al. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Genet*, 2000; 8: 725-9.
103. Weisberg I, Tran P, Christensen B, et al. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998; 64: 169-72.
104. Tonetti C., Burtscher A., Bories D., Tulliez M., Zittoun J. Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency in Four Siblings: A Clinical, Biochemical, and Molecular Study of the Family. *Am J Med Genet* (2000), 91(5), 363-367
105. Emre Tepeli ve ark. Eskişehir İlinde İdiyopatik Tekrarlayan Gebelik Kayıpları İle Metilentetrahidrofolat Reduktaz (MTHFR) C677T Ve A1298C Polimorfizmleri Arasındaki İlişki *Osmangazi Tıp Dergisi* 2007; 29(1):1-11
106. Van der Put, N. M. J., Gabreels, F., Stevens, E. M. B., Smeitink, J. A. M., Trijbels, F. J. M., Eskes, T. K. A. B., van den Heuvel, L. P., Blom, H. J. A second mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am. J. Hum. Genet.* 62: 1044-1051, 1998.
107. Strachan, T., Read, A.P., *Human Molecular Genetics 2*, 2nd Edition, BIOS Scientific Publishers, Ltd., Oxford, UK, (1999).
108. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, Thomas JW, *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications.* ASM, Washington D.C. 1993
109. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F., Cornelius, F.B.III., Thompson & Thompson *Tıbbi Genetik*, 6. Baskı, Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Saunders 2005,

110. Valkovic, P, Benetin J, Blazicek P, Valkovicova L, Gmitterova K, Kukumberg P. Reduced plasmahomocysteine levels in levodopa/entacapone tread Parkinson patients. *Parkinsonism and Related Disorders* 11 (2005) 253-256
111. Jueng Lin J, Chu Yueh K, San Liu C, Tung Liu J and Zong Lin S. 5,10 Methylene tetrahydrofolate Reductase C677T Gene Polymorphism Can Influence Age at Onset of Parkinson's Disease. *Acta Neurol Taiwan* 2007; 16: 150-157.
112. Caccamo D, Gorgone G, Curro M, Parisi G, Di Ioiro W, Menichetti C, Belcastro V, Parnetti L, Rossi A, Pisani F, Ientile R, Calabresi P. Effect of MTHFR Polymorphisms on Hyperhomocysteinemia in Levodopa-treated Parkinsonian Patients. *Neuromol Med* (2007) 9: 249-254.
113. Todorovic Z, Dzoljic E, Novakovic I, Mirkovic D, Stojanovic R, Nestic Z, Krajinovic M, Prostran M, Kostic V. Homocysteine serum levels and MTHFR C677T genotype in patients with Parkinson's disease, with and without levodopa therapy. *Journal of the Neurological Sciences* 248 (2006) 56-61.
114. Religa D, Czyzewski K, Styczynska M, Peplonska B, Lolk J, Chodakowska M, Stepian K, Winbland B, Barcikowska M. Hyperhomocysteinemia and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in patients with Parkinson's disease *Neuroscience Letters* 404 (2006) 56–60
115. Yue Yuan R, Juan Sheu J, Ming Yu J, Jong Hu C, Jy Tseng I, Sum Ho C, Ying Yeh C, Lin Hung Y, Ru Chiang T. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and plasma homocysteine in levodopa-treated and non-treated Parkinson's disease patients. *Journal of the Neurological Sciences* 287 (2009) 64–68.

