

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**VİTİLİGOLU HASTALARDA
MİKRONÜKLEUS SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Zeynep SÜT**

**Tezi Yöneten
Prof.Dr.Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ**

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Haziran 2006
KAYSERİ**

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**VİTİLİGOLU HASTALARDA
MİKRONÜKLEUS SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Zeynep SÜT**

**Tezi Yöneten
Prof.Dr.Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ**

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından SBY-04-33 nolu
proje ile desteklenmiştir**

**Haziran 2006
KAYSERİ**

Prof.Dr.Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ danışmanlığında **Zeynep SÜT** tarafından hazırlanan “**Vitiligolu Hastalarda Mikronükleus Sıklığının Araştırılması**” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji** Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

..../..../2006
(Tez savunma sınav tarihi yazılacak)

JÜRİ :

İmza

Üye :

Üye :

Üye :

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU

TEŞEKKÜR

“Vitiligolu Hastalarda Mikronükleus Sıklığının Araştırılması” isimli Yüksek Lisans tezimin hazırlanmasında ve akademik eğitimimde emek ve yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof.Dr.Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ’a, çalışmalarım boyunca beni destekleyen ve yönlendiren hocalarım Prof.Dr.Halil DEMİRTAŞ’a ve Doç.Dr.Nurhan CÜCER’e ve laboratuvar çalışmalarımda büyük yardımlarını gördüğüm arkadaşlarım Araş.Gör.Zuhal HAMURCU ve Araş.Gör.Nalan İMAMOĞLU’na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, araştırma süresince hastaların tanısının konmasını ve hastalardan kan alınımını sağlayan ve desteğini esirgemeyen Sayın Doç.Dr.Ayten Ferahbaş’a, hastaların klinik muayenelerini yapan ve kan örneklerini alan Dermatoloji Anabilim Dalı Asistanlarına ve zorluk çıkarmadan kan örneklerini veren kişilere teşekkür ederim.

Sürekli olarak maddî ve manevî yönden emeklerini esirgemeyen aileme saygı ve şükranlarımı sunarım.

**VİTİLİGOLU HASTALARDA MİKRONÜKLEUS
SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI
ÖZET**

Vitiligo, epidermisdeki melanositlerin kaybından ortaya çıkan depigmentasyon alanları ile karakterize yaygın bir cilt hastalığıdır. Vitiligonun etiyojisini açıklamak için bazı hipotezler var olmasına rağmen vitiligonun etiyojisi hala tam olarak açıklanamamıştır.

Çalışmamızda, DNA yada kromozom seviyesinde hasarların işareti olarak önerilen mikronukleus (MN) testi kullanılarak, 21 vitiligolu hasta ve 21 sağlıklı kontrol çalışıldı. Hasta ve kontrollerden periferik kan örnekleri alındı ve kültüre edildi. Sitokinezi durdurmak için, kültürler 44. saatte 3 µg/ml son konsantrasyonda sitokalazin B (Cyt-B) eklendi ve 72. saatte kültürler sonlandırıldı.

Vitiligolu hastaların MN değerleri 0.93 ± 0.58 (ortalama \pm SS) ve kontrol kişilerin MN değerleri 0.58 ± 0.32 idi. Kontrol kişilerle karşılaştırıldığında, vitiligolu hastaların MN değerlerinin istatistiksel olarak kontrollerin MN değerlerinden daha yüksek olduğu bulundu ($p=0.012$).

Sonuçlarımız, vitiligolu hastaların lenfositlerinde kromozomal hasarın varlığına işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Deri hastalıkları, Lenfosit, Mikronukleus, Vitiligo

INVESTIGATION OF MICRONUCLEUS FREQUENCY IN PATIENTS WITH VITILIGO

ABSTRACT

Vitiligo is a common skin disorder characterized by areas of depigmentation resulting from loss of melanocytes in the epidermis. Several hypotheses exist to explain the aetiology of vitiligo; however the aetiology of vitiligo remains unclear.

In the present study, we studied 21 patients with vitiligo and 21 healthy controls, using the micronucleus (MN) assay proposed as a marker of damages at the DNA or chromosome level. Peripheral blood samples were obtained and cultured from patients and controls. To block cytokinesis, at 44 h of incubation, cytochalasin-B (Cyt-B) was added to cultures to give a final concentration of 3 µg/ml, and cells harvested at 72 h.

MN frequencies in cultured peripheral lymphocytes of patients with vitiligo and controls were 0.93 ± 0.58 (mean \pm SD) and 0.58 ± 0.32 , respectively. As compared with controls, MN frequencies of patients with vitiligo were found statistically higher than MN frequencies of controls ($p=0.012$).

Our results indicate the presence of chromosomal damage in lymphocytes of patients with vitiligo.

Key Words: Lymphocytes, Micronucleus, Skin diseases, Vitiligo

İÇİNDEKİLER**Sayfa No**

İÇ KAPAK	I
KABUL VE ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.VİTİLİGO.....	3
2.1.1. Patogenez.....	4
2.1.2. Klinik Özellikler	9
2.1.3. Tanı	10
2.1.4. Tedavi	11
2.2.MELANOSİTLER.....	12
2.2.1. Melanin Üretimi.....	13
2.2.2. Melanozomlar ve Deri Rengi.....	14
2.2.3. Pigmentasyonun Regülasyonu	14

	<u>Sayfa No</u>
2.3.IN VİTRO NÜKLEUS TEKNİĞİ	15
2.3.1. İnsan Lenfositlerindeki Standart Sitokinez-Blok Mikronükleus Analizi.....	18
2.3.2. Sitozin Arabinozid Mikronükleus Analizi Kullanarak Go/G1 Evresindeki İnsan Lenfositlerinde Çıkarılıp Yeniden Tamir Edilen DNA Lezyonlarının Ölçülmesi.....	19
2.3.3. Sitokinez-Bloklı ve Sitokinez-Bloksuz Hücrelerdeki Mikronükleus Analizi	21
2.3.4. Mikronükleus ve Non-disjunction'daki Kromozom Kaybını Ölçmek İçin Geliştirilen Moleküler Teknikler	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. GEREÇLER	23
3.2. YÖNTEM.....	25
4. BULGULAR.....	31
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	34
6. KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

Sayfa no

Tablo 4.1.	Vitiligolu hasta grubunun yaşları, cinsiyetleri, total binükleer hücre sayıları, MN'lu binükleer hücre sayıları, total MN sayısı ve MN frekansı (%)	32
Tablo 4.2.	Kontrol grubunun yaşları, cinsiyetleri, total binükleer hücre sayıları, MN'lu binükleer hücre sayıları, total MN sayısı ve MN frekansı (%).	33
Şekil 2.1.	Mikronükleus oluşumu. (a) Mikronükleuslar, anafaz'da geri kalan kromozomlar ve asentrik kromozom parçalarından orjin alır. (b) Sentromerleri ile hücrenin karşı kutuplarına çekilen disentrik kromozomlardan nükleoplazmik köprü oluşumu ve asentrik kromozom parçasından eş zamanlı olarak mikronükleusun oluşumu	17
Şekil 2.2.	Bir bölünme döngüsü içinde eksizyon ile onarılabılır DNA lezyonunun ARA ile MN'lara dönüşümü	20
Resim 3.1.	MN'lu binükleer (BN) hücre	30

KISALTMALAR

ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
ARA	: Arabinozid
BN	: Binükleer
CBMN	: Sitokinez Bloklü Mikronükleus
CLA	: Kutanöz lenfosit ilişkili antijen
CMV	: Sitomegalovirüs
CTL	: Sitotoksik T lenfosit
Cyt-B	: Sitokalazin B
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DOPA	: Dihidroksi fenil alanin
HLA	: İnsan lökosit antijen
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
ISH	: İn situ hibridizasyon
KKD	: Kardeş Kromatid Değişimi
KLM	: Keratinosit-Langerhans hücresi-melanosit birimi
M	: Molar
MN	: Mikronükleus
MNBN	: Mikronükleuslu Binükleer Hücre
MSH	: Melanosit stimüle edici hormon
PHA	: Fitohemaglutinin
PUVA	: Psoralen +Ultraviyole A
RNA	: Ribonükleik Asit
TR/TR	: Thioredoxin/thioredoxin
Tryp 1 ve 2	: Tirozin ilişkili protein 1 ve 2
UV	: Ultraviyole
UVA	: Ultraviyole A
UVB	: Ultraviyole B

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Vitiligo deride renk kaybına uğramış beyaz plaklarla seyreden kronik, genelde ilerleyici bir deri hastalığıdır. Vitiligo alanlarında deri beyaz görünürken çevresindeki bölgeler normal renktedir ve bu bölgelerde cilde rengini veren melanositlerdeki hasar nedeniyle tüyler ve kıllarda da beyazlık görülür. Renk kaybı olan bölgeler, çeşitli büyüklüklerde ve değişik sınır yapıları içerebilirler. Kimi zaman bir nokta kadar küçükken, kimi zaman el ayası kadar büyük ve hatta tüm deriyi etkilemiş olabilir. En sık etkilenen bölgeler ise yüz, dudak, boyun, göğüs, penis, diz, dirsek ve el sırtlarıdır. Beyaz bölgeler ultraviyole (UV) ışınına karşı hassas olurlar. UV'nin özellikle deri kanseri gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir. Güneş yanıklarından, darbelerden sonra yeni vitiligo bölgeleri gelişebilir. Bu hastalık, otoimmün kökenli olup vücuttaki renk yapan hücrelere karşı vücudun yıkıcı hücrelerinin aktive olmasıyla başlar. Hastalık, genellikle 20 yaştan önce başlar. Ailede bulunması, kişide görülme ihtimalini artırabilir ve özellikle vücudun bağışıklık sisteminin zayıfladığı stres, ameliyat, hastalık dönemlerinde vitiligonun başlaması ve artması daha olasıdır. Vitiligo bazen çıktığı bölgelerde sınırlı kalırken bazen ise yayılmaya ve hatta yeni bölgelerde gelişmeye yönelir. Melanositler melanin pigmenti üreten hücrelerdir, melanin de epidermisdeki keratinositleri bir şemsiye gibi UV ışınlarına karşı korumaktadır. Toplumda görülme sıklığı %0.5-2 arasında değişmekte ve her iki cinsi de eşit olarak etkilemektedir.

Günümüzde kesin olarak vitiligonun nedeni bilinmemekte ve vitiligo hastalığının patogenezi üzerine araştırmalar devam etmektedir. Mikronukleus (MN) testi, DNA ya da kromozom seviyesinde lezyonları belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir metottur. MN'lar, bölünen hücrelerde kromozom parçalarını ya da tüm kromozomları içerebilirler. řu anki bilgilerimize göre, vitiligolu hastaların lenfositlerindeki MN sıklığının araştırılması üzerine yapılan çalışmalara rastlanamamıştır. Çalışmamızdaki amacımız, bu metodu kullanarak ve vitiligolu hastaların lenfositlerindeki MN sıklığını uygun kontrollere ait MN sıklığı ile karşılaştırarak vitiligolu hastalardaki genetik hasarı belirlemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.VİTİLİGO

Vitiligo, sınırlı depigmente maküllerle karakterize, kazanılmış, idiopatik bir hastalıktır. Vitiligo; ciltteki pigmentlerin kaybolması sonucu, beyaz yamalar şeklinde vücudun her yerinde görülebilen bir hastalıktır. Genellikle vücudun sağ ve sol tarafında simetrik olarak görünür. En fazla görüldüğü yerler; yüz, dudak, el, kol, bacak ve genital bölgelerdir. Vitiligo alanlarında deri beyaz görünürken çevresindeki bölgeler normal renktedir ve bu bölgelerde cilde rengini veren melanositlerdeki hasar nedeniyle tüyler ve kıllarda da beyazlık görülür. Renk kaybı olan bölgeler çeşitli büyüklüklerde ve değişik sınır yapıları içerebilirler. Kimi zaman bir nokta kadar küçükken, kimi zaman el ayası kadar büyük ve hatta tüm deriyi etkilemiş olabilir. Vitiligo, genel dünya popülasyonda yaklaşık olarak % 0.5-2 arasında görülme sıklığı değişmekte ve her iki cinsi de etkilemektedir (1, 2). Genellikle çocuklukta başlar. Genelde aileseldir, ancak kalıtım şekli tam olarak bilinmemektedir (2). Vitiligolu bir çok hasta hastalıklarının başlangıcını özel hayat olaylarına bağlarlar (Fiziksel incinme, güneş yanığı, duygusal incinme, hastalık, ya da gebelik). Koebner fenomeni haricinde bu faktörlerin gerçekten vitiligoya neden olduğu ya da vitiligoyu hızlandırdığına dair bir kanıt yoktur (1).

2.1.1. Patogenez

Vitiligo bir melanositopeni mi yoksa melanopeni midir? Genel olarak vitiligo derisinde fonksiyonel bir melanosit kaybı olduğu kabul edilir ve histokimyasal olarak anlaşılan bu melanositlerin kaybı onların yıkımının sonucudur. Bununla beraber, melanositler hala vitiligo derisinde bulunur, fakat melanojenik aktivitesi olmayan farklılaşmamış durumdadır. Yapılan bir çalışmada, uzun süreli vitiligo hastalarının pigmentsiz epidermisinde hala melanosit olduğu bulunmuştur (3). Vitiligoda melanosit yıkımı, melanosit sayısının zamanla azalmasıyla sonuçlanan yavaş bir süreçtir.

Uzun zamandan beri bilindiği üzere, dopa-pozitif melanosit olmayan absolute vitiligo tipine ilaveten, melanositleri yaranın içinde kalan fakat dopa pozitivitesi azalan “relative tip” vitiligolar vardır. Vitiligonun relative tiplerinin absolute tipinin habercisi olması muhtemeldir. Vitiligo lezyonlarının epidermisindeki bir immunohistolojik çalışmada, melanosit markırlar (melanojenik aktivite ile ilgili ya da ilgisiz) kullanılmış ve tanımlanabilir melanosit bulunamamıştır (4). Bunun yanında melanosit farklılaşmasında erken ifade edilen bir protein olan c-kit reseptörü vitiligo derisinde belirlenememiş. Sonuç olarak, varolan bilgiye göre muhtemelen melanositler vitiligo lezyonlarında çok küçük sayılarda vardır ya da yoktur.

Vitiligo Bütün Epidermal Melanin Birimini İçine Alır : Sitoplazmik vakualizasyon ve/veya ekstrasellüler granüler materyalin varlığı (değişmiş keratinositlerin sitoplazmasından köken alabilir), normal görünümlü deride, perilezyonal deride ve nadiren lezyonal deride tespit edilmiştir (5). Vitiligo epidermisindeki vakuolar dejenerasyonun fokal alanları, özellikle bazal tabakada gözlenmiştir. Langerhans hücrelerinin yoğunluğu ya histokimyasal tekniklerle (ATPaz) ya da monoklonal antibadilerle (OKT6 ve anti-HLA-DR) değerlendirilmiş ve değişken şekilde azalan, normal ya da artan olarak rapor edilmiştir. Aslında, muhtemelen epidermal Langerhans hücrelerinin sayısı sabit değildir ve vitiligonun seyri boyunca değişir. Örneğin, epidermal Langerhans hücrelerinin yoğunluğu trikrom vitiligonun çeşitli bölgelerinde dikkat çekici şekilde farklıdır (6). Langerhans hücrelerinin fonksiyonelliğinin vitiligonun patogenezi ile nasıl ilişkili olduğu tam olarak kurulamamıştır. Tüm bu gözlemler gösteriyor ki vitiligo tüm keratinosit – Langerhans hücresi – melanosit birimini (KLM) etkiler (7).

Vitiligonun Genetiği : Vitiligonun ailesel vakaları yaygındır, prevalansı % 6-38 arasında değişir. Aile çalışmaları, vitiligonun beklenen tek otozomal genetik kalıtım modeline uymadığını göstermektedir. Vitiligonun 3 ya da 4 otozomal lokusta resesif genlerle kontrol edildiği öne sürülür (8). Kalıtımın çeşitli modelleri önerilmiş ve araştırılmış ve bir bireyin hastalığı kontrol eden tüm lokuslardaki resesif genler için homozigot olabileceği önerilmiştir. Fakat bu vitiligo genlerinin hiçbiri henüz tanımlanamamıştır.

İnsan lökosit antijenlerini (HLA) inceleyen vaka-kontrol çalışmaları, HLA DR4 ve vitiligo arasında pozitif bir ilişki olduğunu ve DR3 ile negatif bir ilişki olduğunu göstermiştir.

Vitiligo ve sitotoksik T lenfosit antijen-4 geni polimorfizmi arasında bir ilişki bulunamamıştır (9). Guanozin trifosfat siklohidrolaz I genindeki missense mutasyonların vitiligoya neden olabileceği kaydedilmiştir (10). Bununla birlikte ileri moleküler çalışmalarla, kromozom 2p16'da haritalanan son zamanlarda VIT1 olarak adlandırılan bir gen tanımlanmıştır. Vitiligoda VIT1'in rolü ve fonksiyonlarının daha iyi anlaşılması için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (11). Diğer bir çalışmada da, katalaz geninin vitiligo ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (12).

Serbest Radikal Savunmasında Yıkımının Sonucu Olarak Vitiligo : Wood'un lamba incelemesi ile, klinik olarak vitiligonun beyaz derisinin karakteristik bir sarı/yeşil ya da mavimsi floresana sahip olduğu gösterilmiştir (13). Bu klinik inceleme, bu floresanın iki farklı okside pteridinlerin (mavimsi floresanı ile 6-biopterin ve sarı-yeşil floresanı ile 7-biopterin) birikmesi sonucu ortaya çıktığını göstermiştir. Bu 6- ve 7-tetrahidrobiopterinlerin fazla birikimi, vitiligolu hastalarda tetrahidrobiopterin homeostazisinde bir metabolik defektin önemine işaret eder. Bu defekt hidrojen peroksit (H_2O_2)'nin fazla oluşumuyla sonuçlanır. Vitiligodaki epidermal H_2O_2 'nin yüksek seviyeleri, non-invaziv Fourier transform Raman spektroskopisi ile in vivo olarak doğrulanmıştır. Vitiligo epidermisindeki H_2O_2 birikiminin sonucu, katalazın porfirin aktif bölgesinin oksidatif degradasyonudur ve vitiligoda bu enzimin seviyesinin düşmesi ile sonuçlanır. İn vitro olarak, normal insan melanositleri H_2O_2 'e artan duyarlılık gösterir (1).

Biopterin metabolizmasındaki anormallikten başka, vitiligo hastalarında epidermal H_2O_2 'nin tanımlanmış diğer kaynakları, thioredoxin/thioredoxin (TR/TR) redüktazın kalsiyum ile inhibisyonu ve monoamin oksidaz A'nın artan seviyeleri ile ilişkili olarak kateşolamin biyosentezinin artmasıdır. Gerçekten vitiligo keratinositleri, defektif kalsiyum emilimine sahiptir. Bu, keratinosit ve melanositlerin hücre membranında olduğu kadar, sitoplazmadaki TR/TR redüktazı inhibe eden hücre içi kalsiyum düzeylerinin artışına yol açar. Oksidatif strese yol açan tüm bu biyokimyasal anormallikler (melanositotoksik bileşiklerin birikimi ve doğal detoksifiye edici süreçlerin inhibisyonu), vitiligo derisindeki melanositlerin yıkımına katkıda bulunabilir (1).

Melanosit Büyüme Faktörü Eksikliği Teorisi : Etkilenmemiş ve perilezyonal deriden elde edilen vitiligo melanositlerinin defektif in vitro büyümesi ve geçiş kapasiteleri tanımlanmıştır. İlginç bir şekilde, bu büyüme defektleri, fetal akciğer fibroblast-kökenli büyüme faktörlerinin ilavesi ile kısmi olarak doğrulanır. Vitiligo hastalarının perilezyonal derisinde, yetişkin insan derisi ile karşılaştırıldığında, Kit reseptörünü eksprese eden melanositlerin sayısında azalma vardır (14). Bu azalmanın melanosit büyümesindeki defektden sorumlu olduğu vitiligoda tam olarak gösterilememiştir.

Melatonin Reseptör Hipotezi : Bu hipotez melanin öncüllerinin sitotoksitesine dayanan kendi kendine-yıkım teorisidir. Vitiligodaki melanositlerin final yıkımı, melatonin reseptörünün aktivasyonu ile sebep olunan melanogenezin disregülasyonu ile başlayan birçok reaksiyondan oluşur (15). Bu hipotez oldukça ilginçtir. Bununla birlikte, in vivo şartlarda insan melanositleri üzerine melatoninin etkisi hakkında çok az şey bilinir. Ayrıca mürin melanoma hücrelerinde melatonin için nanomolar-afinite bağlanma bölgelerinin ekspresyonu gösterilmesine rağmen, normal insan melanositleri melatonin reseptörlerini eksprese etse bile tartışmalıdır.

Vitiligo Sinir Sistemini Kapsayan Bir Hastalık mıdır? Vitiligonun genellikle duygusal travma ya da stresli olaylar ile hazırlandığı düşünülür. Bununla birlikte bu durum sadece anekdotal olaylara dayanır. Ultrayapısal çalışmalar perilezyonal deri ya da yapısal değişimlerde (akson kabarıklıkları, bazal membranın duplikasyonu) dermal sinir uçları ile melanositler arasındaki yaygın olan direkt temasları gösterir, fakat bu morfolojik bulguların önemi bilinmemektedir.

Muhtemel nöromediatör sapmaları ifade gösteren lokal fizyolojik anormallikler, vitiligo hastalarında rapor edilmiştir. Yeni nöromediatörlerin bulunması, onların vitiligonun patogenezinde olabilecek rollerinin araştırılmasına yol açmıştır (16). β -endorfin ve met-enkefalin salınımındaki sapmalar, vitiligo derisindeki nöropeptidlerin değişen dengesi ile vitiligo hastalarında rapor edilmiştir. Bu gözlemler, nöropeptidlerin vitiligonun melanosit dejenerasyonu/yıkımında kritik rolü olabileceğini gösterir.

Vitiligo Otoimmün Bir Hastalık mıdır? Otoimmün teorisi, değişen humoral ya da hücrel immun reaksiyonların melanosit yıkımında sonuçlandığını ileri sürer. Vitiligo, hipo- ve hipertiroidizm ve daha az sıklıkla pernisiyöz anemi, Addison's hastalığı ya da poliglandular yetersizlikler (hipoparatiroidizmi içeren) gibi otoimmün endokrinopatiler ile ilişkilidir. Beklendiği gibi, bu antiorgan antibadilerin sirkülasyonu ile beraberdir. Ayrıca, melanositler için tirozinaz ve tirozin ilişkili protein 1 ve 2 gibi (Tryp1, Tryp2) farklı melanosit antijenlerine karşı antibadiler vitiligo hastalarının serasında belirlenmiştir. Son zamanlarda, erişkin insan derisi melanositlerinde eksprese edilen iki transkripsiyon faktörü (SOX9 ve SOX10) ve melanin yoğunluklu hormon reseptör 1, otoimmün poliendokrin sendromu tip I ya da idiopatik vitiligo hastalarında otoantijenler olarak tanımlanmıştır (17). Vitiligodaki humoral bağışıklığın rolü, gösterilmiştir (18). Vitiligolu hastalarda hücrel bağışıklıkta anormallikler olduğu ve vitiligoda melanosit ölümünde T hücrelerinin büyük rolü olduğu ileri sürülmektedir.

Otoimmün vitiligolu hastaların periferal kanında melanosit-spesifik sitotoksik T lenfositlerinin fazla olduğu, melanositlerin yıkımında rol oynayabileceği rapor edilmiştir (19). Diğer bir raporda, vitiligolu hastaların kanında melanosit-spesifik sitotoksik T lenfositlerin (CTL) varlığı gösterilmiştir: Bu $CD8^+$ hücreleri, MELAN-A/MART-1, tirozinaz ve gp100'e karşı spesifik sitotoksik yanıt göstermiştir. HLA-A2'nin de belirlenmesi, MELAN-A/MART-1'e karşı dominant olarak yöneltili melanosit-spesifik $CD8^+$ T lenfositlerin hastalık aktivitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (20). Sonuç olarak, melanosit antijeni MELAN-A'ya spesifik kütanöz lenfosit ilişkili antijen (CLA) tanımlı CTL, vitiligo derisinden köken alan T-hücrelerinde bulunur. Tüm bu gözlemler, vitiligonun bir $CD8^+$ T-hücre-aracılı otoimmün hastalık olduğu hipotezini destekler.

Vitiligo Bir Viral Hastalık mıdır? Sitomegalovirüs (CMV) DNA'sı bazı vitiligo hastaların derisinde ilgili ve ilgisiz olarak tanımlanmıştır. Bu gözlem, vitiligonun alt

grup hastalarında CMV enfeksiyonu ile ortaya çıkabileceği hipotezine öncülük eder (21).

Vitiligoda Apoptoz : Bcl2^{-/-} farelerde, kıl pigmentasyonu ilk kıl folikül döngüsü boyunca normaldir. Fakat, ikinci kıl döngüsü sırasında kıl örtüsünde grileşme ve beyazlaşmaya neden olan kıl folikül melanositlerinin ilerleyen kaybı gözlenmiştir. Pigment kaybına uğrayan kılın histolojik analizleri, melanositlerin kaybolmasının erken apoptozun sonucu olduğunu göstermiştir (22). Bununla birlikte, apoptoz regülatör moleküllerinin araştırılması ve vitiligo melanositlerinin apoptoz şüphesi için normal kontrol pigment hücreleri ile karşılaştırıldığında, melanositlerin ortadan kaybolmasının olasılıkla apoptoz regülatör moleküllerin disregülasyonu ile ilişkili olmadığını göstermiştir (23).

Melanositlerin İntrinsik Defekti : Vitiligo melanositleri, melanosit ölümüne yol açan intrinsik bir defekte sahiptir. Aslında, kültürdeki vitiligo melanositleri düz endoplazmik retikulumun genişlemesi gibi, çeşitli anormallikler gösterir. Bu, düz endoplazmik retikulumun yapı ve/veya fonksiyonundaki anomalliğin vitiligo patogenezinde bir rol oynayabileceğini gösterir. Son zamanlarda yapılan bir çalışma, vitiligo melanositlerinde TRYP1'in ekspresyonunda anormallik olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu hücrelerde erken hücre ölümüyle sonuçlanan oksidatif strese (ultraviyole B) karşı duyarlılıkta bir artış vardır. Bu gözlemler, vitiligo lezyonlarındaki melanositlerin ortadan kayboluşunun, Tryp1'in anormal süreci ve sentezi ile ve melanogenez şaperon, kalneksin ile anormal etkileşimiyle ilişkili olduğunu ileri sürer (1).

Bu hipotezler çok çarpıcı olmalarına rağmen, hiçbiri henüz kanıtlanamamıştır. Elimizde bulunan bilgilere göre, muhtemelen vitiligodaki foliküler ve epidermal melanositlerin kaybı birçok farklı patogenetik mekanizmaların sonucu olabilir. Vitiligo diye tanımlanan bu hastalık, muhtemelen tek bir hastalık değildir, aynı zamanda farklı birçok hastalıktan oluşmuş bir sendromdur (24). Bu yüzden, genetik faktörler, stres, toksik bileşiklerin birikimi, enfeksiyon, otoimmünite, değişen hücresel çevre, zarar verici melanosit göçü ve proliferasyonunu içine alan vitiligo fenomenine ilişkin birleşik bir teori öne sürülür (25).

2.1.2. Klinik Özellikleri

Vitiligonun en genel formu, normal deri ile çevrili melaninsiz makül ya da yamalardan oluşur. Renk genellikle süt beyazı ya da kirli beyazdır. Vitiligo makülleri genellikle

yuvarlak, oval ya da doğrusal şekildedir. Kenarlar genellikle dış bükeydir, ve depigmentasyon sürecinde normal pigmentli deriye istila eder. Lezyonlar zamanla merkezden dışa doğru yayılır, fakat bu genişleme yavaş ya da hızlı olabilir. Vitiligo maküllerinin boyutları, milimetre ya da santimetre büyüklüğünde olabilir. Çok açık tenli insanlarda, lezyonlar çok görünür değildir, fakat onlar Wood'un lamba incelemesi ile ya da etkilenmemiş derinin bronzlaşması ile kolaylıkla ayırt edilebilir. Koyu tenli insanlarda, vitiligolu deri ile normal pigmentli deri arasındaki zıtlık dikkat çekicidir. Genellikle vitiligo asemptomatiktir, fakat sıklıkla etkilenmiş deri kaşıntılı olabilir (1).

Vitiligo vücudun herhangi bir yerinde oluşabilmesine rağmen, karakteristik modeller vardır. Vitiligo lokalizasyonunun en etkileyici özelliği, yüz, ellerin dorsal yüzü, meme başı, aksilla, umbilikus, sakrum, ve inguinal ve anogenital bölgeler gibi normal olarak hiperpigmentli bölgelere sık lokalize olmasıdır. Tipik olarak yüzde görülen vitiligo, gözlerin ve ağız çevresinde ve ekstremiteler üzerinde oluşur. Kemik çıkıntısı, ayak ve ellerin dorsal yüzü gibi tekrarlayan travmalara maruz kalan bölgelerde yaygın olarak görülür. Giysilerle tekrarlı temas ya da baskı oluşturan bölgeler (kemer, omuz bandı, yaka gibi) ve sürtünme bölgeleri (vücut kıvrımı, koltukaltı, genital bölge, perineal bölgeler) sıklıkla etkilenir. Açık tenli bireylerde avuç içi, dudak ve ağız mukozasında etkilenen bölgeleri Wood'un lamba incelemesi olmadan ayırt etmek zordur. Akrofasiyal vitiligoda bir ya da daha fazla parmakların tırnak çevresi, dudak depigmentasyonu ile ilişkili olabilir ve izole bir bulgu olabilir (1).

Vitiligolu hastalarda lökotişi görülebilir, ancak hastalık aktivitesi ile ilişkili değildir. Kafa derisindeki vitiligo genellikle beyaz ya da gri saç toplulukları şeklinde olur (poliosis). Bütün kafa derisindeki saçlarda total depigmentasyon meydana gelebilir ya da sadece birkaç folikül beyaz saçların yayılmasına yol açabilir. 30 yaşından önce izole olarak erken grileşme ya da beyazlama vitiligonun bir formunda meydana gelebilir. Vitiligoda depigmentli saçın spontan repigmentasyonu meydana gelmez (1).

Vitiligonun Klinik Sınıflandırılması : Vitiligonun farklı tipleri için bir çok sınıflandırma yapmak mümkündür. Genelde 2 major form tanımlanır: unilateral form (segmental olarak da adlandırılır), ve bilateral form (vitiligo vulgaris olarak da adlandırılır).

Aşağıdaki sınıflandırma şekli vitiligonun 3 genel tipini tanımlar: lokalize, genel ve universal.

Lokelize

- **Fokal:** Bir alanda bir ya da daha fazla makül, fakat segmental yayılımı açık değildir.
- **Unilateral:** Vücudun unilateral segmentini içeren bir ya da daha fazla makül.
- **Mukozal:** Sadece mukus membranları.

Genel

- **Vulgaris:** Geniş olarak yayılmış yamalar.
- **Akrofasiyal:** Distal ekstremiteler ve yüz.
- **Karışık:** Akrofasiyal ve vulgaris ya da segmental ve akrofasiyal ve/veya vulgaris.

Universal

- Tamamen ya da tamama yakın depigmentasyon.

Vitiligolu hastaların %90'dan fazlası genel tiptedir. Geri kalanında, lokalize vitiligo universal vitiligodan daha yaygındır (1).

2.1.3. Tanı

Tam bir depigmentasyon varlığında ayırıcı tanı, kimyasal lökoderma, melanoma ya da skleroderma ile ilişkili lökoderma, postinflamatuar depigmentasyon ve treponemiyozis ya da anchocerciasis'in son evrelerini içine alır. Genç kişinin vücudunda tek bir yuvarlak lezyon varsa evre III halonevus olarak ele alınır. Erken lezyonlar ya da kısmi pigment kaybı olan lezyonların, postinflamatuar hipopigmentasyon, pitriyazis (tinea) versikolar ya da diğer kütanöz infeksiyonlardan (lepra gibi) ayrılması gerekir. Güçlü topikal kortikosteroidler ile ön tedavi hipomelanozise de yol açabilir (1).

2.1.4. Tedavi

Bu kronik hastalık mutlak olarak doktor tarafından takip gerektirir. Öncelikle hastanın yanlışları yapmayarak hastalığın artışına katkıda bulunmaması amaçlanır. Güneşe çıkış saatleri hastaların kontrol altına alınır. Güneşten koruma faktörü olarak 15 faktör üstü bir koruyucu hastaya önerilir. Güneşte aşırı kalmanın doğuracağı sonuçlar hakkında kişiler bilgilendirilir. Tedavi, ya normal deri rengine dönüş (repigmentasyon), ya da az

miktarda kalmış normal renkteki alanların rengini açmak (depigmentasyon) şeklinde olabilir. Repigmentasyon metodlarının hiçbiri tümüyle veya kalıcı değildir (26).

Repigmentasyon Tedavisi

1) Topikal Kortikosteroidler: Kortikosteroid içeren kremler, küçük vitiligolu alanların renginin geri dönmesinde etkilidir. Bu yöntem, diğer tedaviler ile birlikte de uygulanabilir. Ancak, bu ajanların, deriyi inceltme gibi yan etkileri vardır ve doktor kontrolünde kullanılmalıdırlar.

2) PUVA Tedavisi: Psoralen adında bir ajan kullanılır. Bu ajan, deriyi ışığa duyarlı kılar. Ardından deri, özel bir tip UVA ışığına maruz bırakılır. Özel bir tıbbi donanım gerekir. Eğer vitiligo sınırlı bir aladaysa UVA tedavisinden önce psoralen sadece deriye uygulanabilir. Ancak genellikle hap olarak ağızdan verilir. PUVA ile tedavide yüz, gövde ve kol ve bacakların gövdeye yakın kısımlarında eski deri renginin kazanılma ihtimali %50-70 tir. El ve ayaklar zayıf cevap verir. Genellikle 1 yıl boyunca haftada 2 kez tedavi gerekir. PUVA'nın güneş yanığına benzer reaksiyon oluşturmaya sık rastlanır. Uzun dönemde kullanıldığında deride çillenme görülebilir ve deri kanseri riski artar. Psoralen, gözleri de ışığa daha duyarlı kıldığı için UVA bloke edici güneş gözlüğü günbatımına kadar kullanılmalıdır. Böylelikle katarakt oluşumu riski azalır. PUVA, 12 yaşın altındaki çocuklarda, gebelerde, süt veren annelerde veya belli bazı durumlarda (ilaç kullanımı, hastalık) uygulanmaz.

Grefleme : Normal deri alanının vitiligolu alana transferi sadece belli bazı merkezlerde ve belli bir grup hastada yapılabilir. Genellikle tedavi edilen alanlarda renk tamamen geri dönmez.

Depigmentasyon Tedavisi : Vitiligosu çok yaygın hastalar için en pratik yöntem, kalan pigmente alanın renginin açılıp tüm vücuda aynı rengin kazandırılmasıdır. Bu, hidrokinonların monobenzil eter formu ile sağlanabilir. Bu tedavi yaklaşık bir yıl alır. Sonuç kalıcıdır.

2.2.MELANOSİTLER

Melanositler, epidermisteki melanin üreten hücrelerdir. Bazal keratinositlerin arasında bulunurlar, rutin kesitlerde yaklaşık olarak her 10. bazal hücreye bir melanosit düşer. Melanosit, melanozomlarda paketlenmiş melanini yakın keratinositlere transfer eden dendritik bir hücredir. Her bir melanosit, epidermal melanin birimini oluşturmak üzere yaklaşık olarak 36 keratinosit ile bağlantılıdır. Melanositler, rutin kesitlerde sitoplazma büzüntüleri ile belirgindir (2).

Kutanöz melanositler embriyolojik nöral tüpten oluşurlar. Nöral tüp kapanırken, bir grup hücre dorsolateral olarak göç eder, nöral krestini oluşturur. Onlar birçok doku elementlerinin (periferal nöronlar, schwann hücreleri, glial hücreler, çeşitli iskelet ve bağ doku komponentleri ve melanositler gibi) öncülleridir. Retina melanositleri nöral endoderm olarak bilinen primitif ön beyinin dış kesesinden gelişmiştir. Bu primitif melanositler melanoblast olarak bilinir. Melanosit göçünün kontrolü az anlaşılmıştır, ancak önemli bir sinyal iletim yolu, hematopoetik büyüme faktörüne bağlanan bir tirozin kinaz reseptörü olan c-kit protoonkogenini içine alır. Bütün melanositler tirozinaz içerir ve melanin üretirler, fakat sadece kutanöz melanositler normal olarak melanini diğer hücrelere transfer etme yeteneğine sahiptirler; bu yüzden “sekretuar melanositler” Masson olarak adlandırılır. Bu kutanöz melanositler yaklaşık olarak 3. fetal ayda deri ve saç folikülünün içine ulaşırlar. Bazal tabaka melanositlerinin normal olarak oldukça stabil popülasyon olmalarına karşın, saç folikül melanositleri siklik bir profile sahiptirler ve saç matriksi ve dermal papilla arasındaki etkileşim ile indüklenen yeni anagen saçlar olarak sayı ve aktiviteleri artar. Birçok pigmente bağlı bozukluklar hem deri hem de saç melanositlerini içerir. Melanositlerin dağılımında şaşırtıcı bir şekilde ırksal ve cinsiyete bağlı farklılıklar vardır. Melanositlerin aktivitesi, melanozomların özelliği ve transferin etkinliği, renk farklılıklarını belirler. Derideki milimetre karedeki melanositlerin sayısı, bölgeden bölgeye değişir. Yüz ve genital bölgede en yüksek sayıdadır ve yaklaşık olarak 1100 – 1300 melanosit/mm² bulunur. Melanositlerin sayısı kronik olarak ışığa maruz kalmayla artar fakat yaş ile azalır (2).

Melanositler yüksek oranda dendritik hücrelerdir, bununla birlikte sıradan kesitlerde bunu anlamak zordur. Sıklıkla kesit, 1 ya da 2 pigmentli dentrit gösterir. Epidermis dermisten ayrıldığında ve sonra 1920’de Bloch tarafından geliştirilen DOPA metodu ile

boyandığında, melanositlerin gerçek dentritik özellikleri daha iyi ayırt edilir. Melanosit, amacı melanin üretmek ve salgılamak olduğundan tek hücreli bez gibi görünebilir (2).

Elektron mikroskopunda, tonofilamentsiz ve yakın hücrelerle desmozomal bağlantısı olmayan büyük bir hücre olarak görünür. Bununla birlikte, keratinositlerin hemidesmosomlarına benzeyen yapıları vardır. Tüm salgı yapıcı hücrelerde olduğu gibi, endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı vardır. Tirozinaz ve diğer enzimler granüllü endoplazmik retikulumda oluşturulur ve melanozom olarak bilinen küçük veziküllere transfer edilir. Melanozomlar, dendritlerin uçlarına göç ederler. Bu ince pigment dolu hücre uzantıları keratinositler arasında yer alır (2).

2.2.1. Melanin Üretimi

Melanin üretiminin biyokimyası, tirozinaz enziminin etrafında toplanmıştır. Fakat oldukça komplekstir ve iyi anlaşılammıştır. Melanin üretimindeki anahtar amino asit tirozin ya da hidroksi fenilalanin'dir. Melanozomlarda, tirozin DOPA'ya (dihidroksi fenil alanin) dönüştürülür ve DOPA-quinon'a oksitlenir. Bloch reaksiyonu, DOPA'yı deri tabakalarına ekler, hızlı oksidasyonla kahverengi DOPA-quinon oluşur; melanosit ve onların dendritlerini tanımlamak için iyi bir yoldur. Bakır içeren tirozinaz enzimi kromozom 11q14-21'de şifrelenir ve bu ilk 2 basamak için enzime ihtiyaç duyulur, fakat geri kalan süreç için metal iyonları gibi çeşitli kofaktörler ve diğer enzimler de regülatör bir rol oynarlar. Tirozinaz mRNA ve enzim seviyeleri siyah ve beyaz deride yaklaşık olarak aynıdır (2).

Melaninin son ürün oluşum yolu, Raper-Mason yolu olarak bilinir. DOPA-quinon seviyesinde süreç çeşitlenir. Bazı enzimler, lökoDOPAkrom (sikloDOPA), DOPAkrom, 5,6-dihidroksindol ve indol-5,6-quinonu içeren bir seri bisiklik ürün oluştururlar. Tautomeraz reaksiyonu, benzer fakat karboksilik asitli moleküller oluşturur. Bu ürünler eumelaninleri oluşturmak üzere polimerize olurlar. Feomelaninler ve trikromlar, çeşitli polimerizasyon basamakları boyunca DOPA-quinona glutatyon ve sistein eklenmesi ile oluşturulurlar.

Böylece insan derisinde 3 tip melanin vardır:

1. **Eumelaninler:** Koyu kahverengi ya da siyah; siklik; çözünmez.

2. **Feomelaninler:** Kırmızı, sarı; sülfür içerirler; siklik değildir; alkali solusyonlarda çözünürler.
3. **Trikromlar:** Yoğun kırmızı; sülfürce zengin; diğer özellikleri feomelanine benzerdir.

Eumelaninler koyu renkli saçtan sorumludur, feomelaninler kumral ve kırmızı saçtan (trikromların da önemli olduğu) sorumludur. Deride genellikle karışık haldedir, fakat koyu tenli bireyler baskın olarak eumelanine sahiptir (2).

2.2.2. Melanozomlar ve Deri Rengi

Melanozomların keratinositler içindeki dizilişi siyah ve beyaz deride farklıdır. Siyahtaki bir keratinosit 400 melanozom içerebilirken, beyazdaki sadece 100 tane içerebilir. Beyazlarda, Doğulu ve Amerikalı Kızılderililerde, melanozomlar yaklaşık olarak $0.6 \times 0.3 \mu\text{m}$ büyüklüğündedir ve sıklıkla birlikte kompleks oluştururlar. Siyah ırkta ve Avustralya Aborijinlerinde daha büyük, yaklaşık olarak $1.2 \times 0.6 \mu\text{m}$ ve kompleksler halinden ziyade tek tek bulunurlar. Beyazlarda melanozomlar epidermisin daha alt tabakalarında degradasyon geçirmeye başlar, siyahlarda ise melanozomlar stratum korneumu içeren tüm epidermal tabakalarda bulunur. Saçlardaki melanozomlar genellikle deridekinden daha büyüktür (2).

2.2.3. Pigmentasyonun Regülasyonu

Hem temel deri hem de saç renkleri ışığa maruz kalındığında ortaya çıkan bronzlaşma ya da kararma eğilimi karakteristik olarak kalıtılır. Saç ya da deri rengi, primer olarak melanozomların rengi, büyüklüğü, miktarı ve dağılımı ile belirlenir. Kişinin temel renginin değişmesindeki ana faktör güneş ışığına maruz kalmadır. 2 tip kararma meydana gelir:

- **Hemen Pigmentasyon:** UVA'ya maruz kalma dakikalardan saatlere kadar kararmayı sağlar; olgunlaşmamış melanin formları oksitlenir, kararmaya başlar ve melanozomlar transfer için dendritlerin uçlarına hızla hareket eder. (Meirowsky Fenomen).
- **Geç Pigmentasyon:** UVB ışığı yüksek tirozinaz seviyelerini oluşturur, daha fazla melanin içeren melanozomların sayısı artar ve keratinositlere transferi artar. Bu günler ya da haftalar alır. Ayrıca, güneş ışığı ya da UV radyasyonuna maruz

kalma daha fazla kronik olduğunda, fonksiyon gören melanositlerin sayısında bir artış da vardır (2).

Pigmenti kontrol eden diğer faktörler de vardır. Bir dermatolog olan Lerner ve Takahashi (1956) melanosit stimüle edici hormonu (MSH) keşfettiler (27). Omurgalılarda hipofiz hormonudur ve melanin üretiminin regülasyonunda anahtar bir rol oynar. Hem α - hem β -MSH tanımlanmıştır ve bunlar insanlarda önemli bir rol oynaması için yeterli ölçüde üretilmez. ACTH ve β -lipotropin pigmentasyonu potansiyel olarak etkileyebilen diğer hipofiz hormonlarıdır. MSH ve ACTH arasında yapısal benzerlikler vardır, bu yüzden Addison's hastalığında görülen hiperpigmentasyon aşırı MSH ya da MSH benzeri aktivite oluşumu ile sekonder olabilir. Doku kültür deneylerinde, insan melanositleri MSH stimülasyonu ile daha dendritik ve daha koyu olurlar. Plasenta ve fetal hipofiz de MSH salgılar, pigmental sistemin gelişiminde önemli bir rol oynar ve melasma ve melanositik nevinin koyulaşması gibi gebelikte görülen pigmental değişimlerin bazılarında sorumlu olabilirler. Östrojenler de önemli olabilirler, melasma hemen hemen kadınlarla sınırlıdır, fakat güneşe maruz kalmayı ve sıklıkla yüksek hormonal seviyeleri gerektirir. Areolae, linea alba ve genitya gebelikte koyulaşabilir (2).

Pigmentasyon, UV radyasyon hasarına cevap olarak keratinositler tarafından salgılanan çeşitli büyüme faktörleri ile stimüle edilir. GM-CSF, nitrik oksit ve birçok diğerleri örnek olarak verilebilir. Diğer bir güçlü uyarıcı, özellikle DNA tamir süreci boyunca salınan timidin dinükleotidleri gibi küçük DNA parçalarının varlığıdır (2).

2.3. İN VİTRO MİKRONÜKLEUS TEKNİĞİ

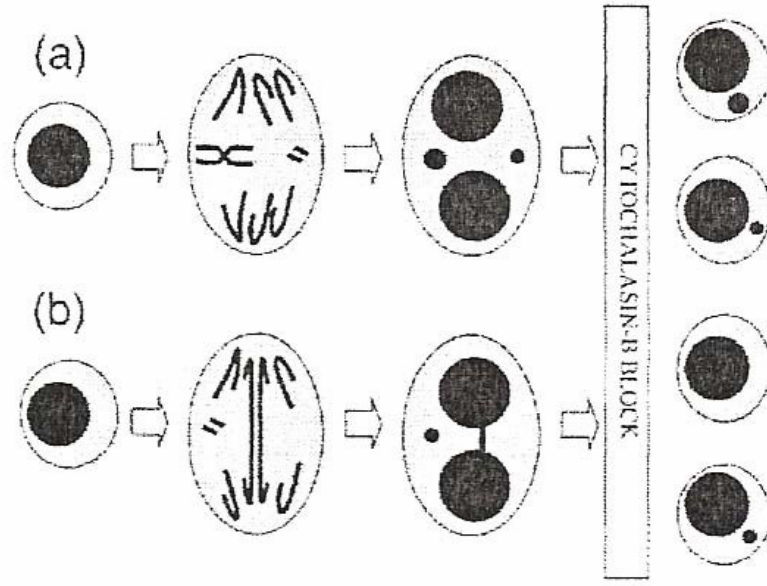
Radyasyona ve karsinojenik kimyasallara maruz kalındığı zaman kromozomlarda hasarların oluşması, fiziksel ve kimyasal ajanların ökaryotik hücrelerin genetik materyalinde büyük değişikliklere neden olduğunu gösterir (28).

Kromozom yapısının tam anlamıyla anlaşılmasına rağmen, kromozom anormallikleri DNA seviyesindeki hasarların belirtisidir, örneğin kromozom kırılmaları, DNA'daki çift iplik yapısının tekrar tamir edilememesinden meydana gelebilir (29). Kromozom kaybı ve kromozomların hatalı ayrılışı (non-disjunction), kanserde ve yaşlanmada çok önemli olaylardır ve metafazdan önce iğ ipliklerinde, sentromerde ya da kromozom yapısındaki bozukluklarla ortaya çıkabilir (30-32).

Klasik sitogenetik tekniklerde, metafaz evresindeki kromozomları gözleyerek ve anormallikleri sayarak kromozomlar incelenmektedir (33). Bu yaklaşım detaylı bir analiz yapılmasını sağlar ancak metafazdaki daha kompleks anormalliklerin birer birer sayılmasında yetersizlikleri vardır ve kromozom kusurlarını tesbit etmede daha basit yeni metotlar geliştirilmiştir.

Schmid (34) ve Heddle (35) birbirinden bağımsız olarak *in vivo* kromozom kusurunu analiz etmek için alternatif ve daha basit bir yaklaşım ileri sürmüşlerdir. Bu yaklaşım, kemik iliği gibi bölünen hücrelerde, hematologlar tarafından Howell-Jolly badileri olarak bilinen, mikronükleusların (MNi) ölçümüdür. Kemik iliği ve periferal kanda bulunan eritrositlerde Mikronükleus testi, *in vivo* sitogenetik analizidir ve genetik toksikolojide kullanılmaktadır. Ancak *in vivo* veya *in vitro* olarak diğer hücre gruplarına uygulanabilir bir metot değildir ve *in vitro* çekirdekli hücrelerde MN'ları ölçmek için metotlar geliştirilmiştir.

MN'lar, mitoz sırasında kutuplara gidemeyen tüm kromozomlar ya da sentromeri olmayan kromozom kırıklarını içeren bölünen hücrelerde görülebilir. Telofazda, geri kalan kromozomlar ve parçaları etrafında nükleer bir zar oluşur ve bu yapı hücrenin ana çekirdeğinden daha küçük olduğundan "mikronükleus (MN)" olarak adlandırılır (Şekil 2.1). Bundan dolayı, MN'lar hem kromozom kırılması hem de kromozom kaybının uygun ve güvenilir ölçümünü sağlar. MN'lar çekirdek bölünmesi tamamlandıktan sonra oluştuğu için, MN'lar hücre döngüsünün binükleer (iki çekirdekli, BN) safhasında ideal olarak ölçülür (36, 37). Bazen binükleer hücrelerde nükleuslar arasında nükleoplazmik köprüler gözlenmektedir. Bunlar olasılıkla disentrik kromozomlar olabilir. İki sentromer hücrenin karşı kutbuna çekilmekte ve DNA oluşan köprü sonucunda nükleer zarla etrafı çevrenmektedir (Şekil 2.1). Böylece binükleer hücrelerde nükleoplazmik köprüler mikronükleus hesaplanması yanısıra kromozom yeniden düzenlenmesinin tamamlayıcı ölçümüne olanak sağlar.



Şekil 2.1. Mikronükleus oluşumu. (a) Mikronükleuslar, anafaz'da geri kalan kromozomlar ve asentrik kromozom parçalarından orjin alır. (b) Sentromerleri ile hücrenin karşı kutuplarına çekilen disentrik kromozomlardan nükleoplazmik köprü oluşumu; ve asentrik kromozom parçasından eş zamanlı olarak mikronükleusun oluşumu.

Sitokalazin-B (Cyt-B), binükleer evrede hücre bölünmesini bloke eder. Bu şema, sadece 2 çift kromozomlu bir hipotetik hücre örneğini göstermektedir.

Bu analiz, bölünmeyen ya da hücre bölünme kinetiği tam olarak anlaşılammış ve kontrol edilemeyen bölünen hücre gruplarında etkili ve kantitatif olarak kullanılamayabilir. Sonuç olarak bir hücre popülasyonunda bölünmeyen ve mitoz geçiren hücreleri ayırt etmek için bir metodun geliştirilmesi gerekmektedir. Üstelik bir ya da daha fazla nükleer bölünmeden sonra MN'ların akıbeti belirsiz olduğundan, bir nükleer bölünmeyi tamamlayan hücrelerin tanımlanması çok önemlidir.

Stathmokinetik, flow sitometrik ve DNA etiketleme esasına dayanan birkaç metod önerilmiştir. Ancak kolaylığından dolayı sitokinez-bloklü mikronükleus (CBMN) metodu tercih edilmiştir (36-38).

CBMN analizinde, bir nükleer bölünmeyi tamamlayan hücreler, sitokalazin-B (Cyt-B) kullanılarak sitokinez bloke edilir ve bu hücreler binükleer hücreler olarak tanımlanır (Şekil 2.1). Cyt-B, sitokinez esnasında kardeş nükleuslar arasındaki sitoplazmayı daraltan mikrofilament halkasının oluşması için gerekli olan aktin polimerazasyonun bir inhibitörüdür (39). Cyt-B'nin kullanılması, bölünen hücrelerin eş zamanlı derecesine ve oranına bakmaksızın bölünen hücre popülasyonunun

binükleer evresinde bütün bölünen hücrelerin birikimine neden olur. MN'lar, sonra sadece binükleer hücrelerde skorlanır, böylece hücre bölünme kinetiğinde farklılıklar olan hücre popülasyonları arasında kromozom hasarlarının karşılaştırılmasında güvenilir bir metot olarak kullanılabilir. Başlangıçta bu metot kültüre edilen insan lenfositleri için geliştirilmiştir (36, 37). Ancak günümüzde solid tümör ve kemik iliği hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerine de adapte edilmiş bir metottur (40, 41). Ayrıca yeni gelişmeler olmaktadır. Bu gelişmeler aşağıda verilmiştir: (a) kromozom parçalarından ve kromozomlardan orjin alan MN'ların ayırt edilmesi (42-47), (b) bir hücre bölünmesi içinde kesip çıkartılarak tamir edilen (eksizyon-tamiri) bölgelerin MN'lara dönüşmesi (48), (c) binükleer hücrelerde non-disjunction olaylarını tanımlamak için moleküler problemlerin kullanılması (49-51), (d) CBMN analizi içine nekrotik ve apoptotik hücrelerin katılması (52, 53).

Son olarak, yeni kimyasalların genotoksitesini test etmek için metafaz analizi yerine mikronükleus analizinin kullanılması önerilmektedir (54, 55).

2.3.1. İnsan Lenfositlerindeki Standart Sitokinez-Blok Mikronükleus Analizi

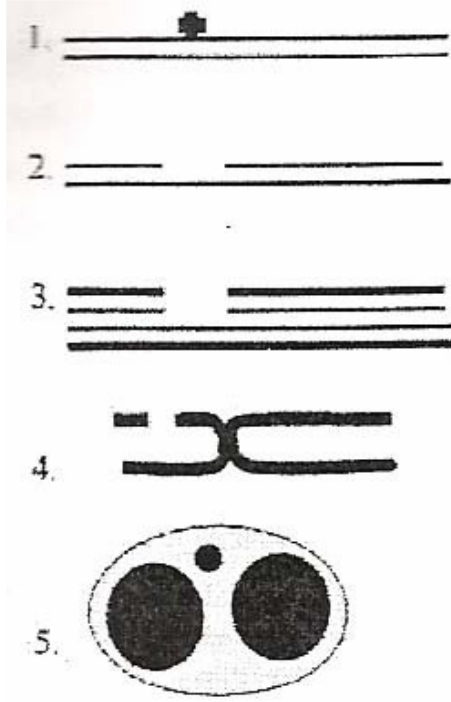
Bu metodda, fitohemaglutinin (PHA) stimülasyonunu takiben bir nükleer bölünmeyi tamamlayan hücrelerdeki MN'lar sayılır. Cyt-B, ilk mitotik bölünmeden önce eklenmelidir ve Cyt-B ile sitokinez bloke edildikten sonra BN hücreler oluşmaktadır. Optimal kültür koşulları, PHA stimülasyonundan sonra 72 saatte canlı hücrelerin oranı (nekrotik ve apoptotik hücreler hariç) olarak %35-60 veya daha fazla BN hücreler elde edilmektedir. Bu prosedürde kullanılan solusyonlar ve araçlar steril edilmelidir (56).

İnsan Lenfositleri İçin Kan Kültürü: İnsan lenfositlerinde, CBMN analizi tam kan kültürü kullanarak da gerçekleştirilebilir. 0.4-0.5 ml tam kan, fetal kalf serum, L-gulutamin, antibiyotik ve PHA ile desteklenmiş 4.5 ml kültür ortamına eklenir. Cyt-B, PHA stimülasyondan sonra 44. saatte eklenir. Binükleer hücrelerinin biriktiği Cyt-B'nin optimal konsantrasyonu, tam kan kültüründe 6 µg/ml'dir (57). Binükleer lenfositler, Cyt-B eklendikten 28 saat sonra, kırmızı kan hücrelerini parçalamak için 0,075 M KCl ile muamele edilir ve lama aktarmadan ve boyanmadan önce metanol:asetik asit ile fikse edilir (smear hücrelerinde lamlar kuruduktan sonra fikse edilir). Alternatif olarak, Ficoll gradienti kullanılarak tam kan kültüründen binükleer

lenfositleri izole etmek mümkündür. İzole edilen hücreler daha sonra sitosantrifugasyon ile lamlara transfer edilir. Sonra hücreler fikse edilir ve boyanır.

2.3.2. Sitozin Arabinozid Mikronükleus Analizi Kullanarak Go/G1 Evresindeki İnsan Lenfositlerinde Çıkartılıp Yeniden Tamir Edilen DNA Lezyonlarının Ölçülmesi

Çeşitli genotoksinlere maruz kalmasını takiben insan Go lenfositlerindeki MN cevabının analiz edilmesinden sonra mikronükleus şekillenmesi yaygın bir kanıt oluşturabilir, ancak iplik kırılması veya iğ ipliği hasarından ziyade DNA üzerinde baz lezyonları ve adduktlarını indükleyen kimyasal ve ultraviyole radyasyonu için sitotoksite çok düşüktür (48). Bu hipoteze göre, bu durum ya lezyonların yeterli onarımından ya da tamir edilemeyen böyle bölgelerin DNA'da çift iplik kırığına dönüşmemesinden dolayıdır. Bununla birlikte, çıkartılıp yeniden tamir edilme sitozin arabinozid (ARA) ile inhibe edildiğinde, ARA lezyonlar tek iplik kırığına dönüşür, böylece DNA sentezi sonucunda çift iplik kırığı oluşur. Bu çift iplik kırığı DNA sentezini takiben asentrik parça oluşumuna yol açar ve bir bölünme döngüsünde MN gibi ifade edilir (Şekil 2.2) (48, 57). Lenfosit kültürünün ilk 16 saati içinde (DNA sentezinden önce) ARA eklenmesi, UV veya MNU uygulamasından sonra MN'da doza bağlı artışa neden olduğu (10 kat veya daha fazla) gösterilmiştir. Bununla birlikte, X-ışınına maruz kaldığında ARA-indüksiyonu 1.8 kat arttı, çünkü DNA adduktları veya baz lezyonlarının oranı DNA iplik kırılmalarının indüksiyonu ile bağlantılıdır. Bu metot, çıkarma-onarmayı indükleyen pestisitleri tanımlamak ve çıkarma-onarmayı indükleyen veya indüklemeyen genotoksik ajanlar arasında ayırım yapmak için kullanılmıştır (58). ARA protokolu, özellikle güçlü bir sitotoksik etkilerin zayıf MN indüksiyonu ile gözlemlendiği durumlarda, CBMN analizi için önemlidir. ARA metodu kullanarak kesip çıkartılarak tamir edilen DNA lezyonlarının ölçülmesi sadece CBMN analizi kullanmak suretiyle mümkündür çünkü; (a) kesip çıkartılarak tamir edilen DNA lezyonlarının MN'ye dönüşmesi sadece çekirdek bölünmesi tamamlanmış hücrelerde meydana gelir, (b) ARA eklenmesi hücre bölünme kinetiğini değiştirebilir, Cyt-B olmaksızın MN analizlerindeki sonuçlar şaşırtıcı olabilir.



Şekil 2.2. Bir bölünme döngüsü içinde eksizyon ile onarılabilir DNA lezyonunun ARA ile MN'lara dönüşümü.

- 1 DNA üzerindeki addukt
- 2 Adduktun kesilmesi ve ARA ile gap-fillingin inhibe edilmesi tek iplik kırığında sonuçlanır
- 3 Replikatif DNA sentezini takiben tek iplik kırığı çift iplik kırığına dönüşür
- 4 Çift iplik kırığı, kromatid kırık olarak ifade edilir
- 5 Geri kalan kromatid parçası MN olarak ifade olur.

DNA polimerazın ARA ile inhibisyonu, replikatif DNA sentezi geçiren hücrelerde DNA iplik kırılmalarına neden olabilir. Üstelik G₁ fazı sırasında ve S-fazından önce ARA'a maruziyeti ile beraber PHA ile uyarılmış G₀ lenfositlerinde bu metodu kullanmak mümkündür, çünkü kesip çıkartılarak tamir etme G₁ fazı esnasında aktive edilir. Pratikte, bunun anlamı hücreler, PHA stimülasyonundan sonra ilk 16-20 saatleri sırasında ARA varlığında hücrelerin kültüre edilmesidir. Daha sonra bu hücreler, ARA'ı ayırmak için yıkanır ve DNA polimeraz ARA inhibisyonunu geri döndürmek için deoksisitidin içeren kültür ortamında inkübe edilir. Sonra standart CBMN protokolü izlenir (48, 58).

2.3.3. Sitokinez-Bloklı ve Sitokinez-Bloksuz Hücrelerdeki Mikronükleus Analizi

Binükleer hücreleri elde etmek için kullanılan Cyt-B'nin MN oluşumunda bazı karışıklıklara sebep olduğu ile ilgili bazı tartışmalar vardır (55). Normal hücrelerle yapılan çalışmalarda Cyt-B'nin MN'ları indüklediği veya sitokinezde hücreleri bloke etmek için kullanılan dozlardaki binükleer hücrelerde MN frekansı ile Cyt-B'nin doza bağlı etkisi olmadığı gösterilmiştir (37, 59-61). Son bir çalışmada sitokinez-bloke edilen binükleer hücrelerde iğ ipliği zehirleri tarafından indüklenen MN oluşumunun beklenenden daha az olduğu öne sürülmüştür, çünkü kutuplar arası mesafenin kısalması geri kalan kromozom parçaları ya da tam kromozomların nükleusa geri katılma olasılığını artırabilir. Fakat bu CBMN analizinin etkinliğini azaltmaz (62).

Hücre bölünme kinetiğinin yetersiz kontrollerinden dolayı yanlış negatif sonuçlardan kaçınmak ve Cyt-B'nin olası etkisini en aza indirmek için Cyt-B kullanmadan in vitro MN analiziyle ilgili araştırmalara ilgi artmıştır. Normal hücrelerde CBMN analiziyle elde edilen hatalı bir pozitif sonucun kanıtı olmamasına karşın, zaten Cyt-B kullanılan insan lenfosit kültürlerindeki MN indüksiyonu ile ilgili MN analizi için yeterli kanıt vardır (37, 38, 63). Yine de; Cyt-B'li veya Cyt-B'siz karşılaştırmalı son MN çalışmaları, eğer iyi büyüyen hücreler kullanılırsa kültür ve çekirdek bölünme koşulları en iyi seviyede olursa, güçlü klastojenler test edildiği zaman Cyt-B'li ve Cyt-B'siz MN analizleri arasındaki sonuçlarını karşılaştırmanın mümkün olduğunu göstermiştir (64, 65). MN oluşumunun matematiksel modeli, (1) BN hücrelerdeki MN sayımı mikronükleus frekansının belirlenmesinde güvenilir bir yoldur ve (2) sitokinez-blok olmadan yapılan kültürlerdeki mononükleer (tek çekirdekli) hücrelerde MN sayımı, test edilen kimyasal çekirdek bölünmesini inhibe ettiğinde veya kültür koşulları optimal sayıda hücre bölünmesine izin vermediğinde yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkarabilir (66). Sonuç olarak, Cyt-B'siz kültürlerdeki mononükleer hücrelerdeki mikronükleusların sayılmasıyla elde edilen mikronükleus frekansı sonuçları, yanlış negatif sonuçlardan dolayı CBMN analizi kullanılarak doğrulanmalıdır.

2.3.4. Mikronükleus ve Non-disjunction'daki Kromozom Kaybını Ölçmek İçin Geliştirilen Moleküler Teknikler

CBMN analizinde, MN'ların tam kromozomlardan mı yoksa asentrik parçalardan mı köken aldığını ayırt etmek, sentromerik DNA propları ya da kinetokor proteinlerine

(aktif kromozomların sentromerik bölgesinde toplanan) bağlanan antibadiler kullanarak mümkündür. İnsan hücrelerinde veya diğer hücre tiplerinde kromozom büyüklükleri heterojen olduğundan ve küçük bir MN ya büyük bir kromozomun parçasını ya da küçük bir kromozomun tümünü içerebildiğinden, MN büyüklüğü bu ayırım için kullanılamaz. Kullanım açısından anti-kinetokor antibadi metodu en basit ve ucuz bir tekniktir (67), ancak bu yaklaşımla tek olan kromozomlar arasında ayırım yapılamaz ve inaktif sentromerler üzerinde kinetokorların olmamasından dolayı kromozom kaybı belirlenemeyebilir (68). Sentromerik bölgeleri tanımlamak için kullanılan in situ hibridizasyon (ISH) yöntemi çok pahalı ve zahmetlidir, ancak daha spesifiklik sağlar. Örneğin, tek kromozomlar için sentromerik proplar kullanılabilir, bu proplar BN hücrelerde non-disjunctional (ayrılmama) olayların (yavru nükleuslarda homolog kromozomların eşit dağılmaması gibi) belirlenmesine olanak sağlar (44).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

Demirbaş Malzemeler

1. Etüv (Heto/ Cell Hause 200)
2. Su banyosu (Thermal)
3. Vorteks (Janke & Kunkel VF2)
4. Mikroskop (Nikon Labophot 2, Olympus model CHK)
5. Santrifüj (ALC PK 110 ve Nüve NF 815)
6. Hassas terazi (Kern S 2000)
7. Derin dondurucu
8. Buzdolabı
9. Dengeleme terazisi
10. Otomatik pipet
11. Fotomikroskop (Olympus BH-2)

Sarf Malzemeler

1. Ham's F10 (Biological Industries, B101-090-1B)
2. L-Glutamin (Biological Industries, B103-020-1C)
3. Fetal calf serum (Biological Industries, B104-001-1B)
4. Fitohemagglutinin (Biological Industries, B1-12-006-1H)
5. Penisilin-Streptomisin (Sigma, 03-031-1C)
6. Sitokalazin-B (Sigma, C-6762)
7. Heparin (Nevparin, Mustafa Nevzat İlaç Sanayi)
8. Giemsa (Merck, 5400512)
9. KH_2PO_4 (merck, 9021622)
10. $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$ (Merck, K1690176)
11. Glasial asetik asit (Merck, 247K18855556)
12. Metanol (Merck, 502K05275408)
13. Ksilol (Merck, 207K037553)
14. Entellan® (Merck, 640171987)
15. İmmersiyon yağı® (Merck, 09403569)
16. KCL (Merck, 340TA611835)
17. Alkol (%96'lık Tekel)
18. Distile su
19. Tüplük
20. Çeşitli cam malzemeler
21. Konik tabanlı 10ml'lik steril kültür tüpü
22. Enjektör
23. Çeşitli ebatlarda puarlar
24. Pastör pipeti
25. Lam (Geschliffen-Mattarant, objectrager 76x26 mm)
26. Lamel (Menzel-Glasser 24x32)

3.2. YÖNTEM

Çalışma Grubu

Çalışma protokolu Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurulu'nca kabul edildi. Hastalara ve kontrollere çalışmanın amacı anlatıldı ve yazılı onayları alındı. Çalışma Nisan 2005 ve Nisan 2006 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı Polikliniği'ne başvuran, vitiligo tanısı konmuş, sigara kullanmayan ve vitiligo tedavisi için daha önce UV yada herhangi bir sistemik tedavi almamış olan 14'ü kadın, 7'si erkek 21 vitiligolu hasta çalışmaya alındı. Yaş, cinsiyet ve sosyoekonomik açıdan aynı olan ve son üç ayda herhangi bir ilaç, sigara ve alkol kullanmayan sağlıklı 21 kişi de kontrol olarak seçildi.

Mikronükleus Elde Etmek İçin Kullanılan Yöntem

Mikronükleus yöntemi, periferik kandan kromozom analizi yapmak için kullanılan yöntemin (kültür ortamının hazırlanması, örneklerin alınması, ekim yapılması) aynı olup sadece çıkarım ve preparat hazırlama işlemlerinde farklılıklar vardır. Ayrıca 44. saatte Sitokalazin-B (Cyt-B) eklenmiştir (69).

1. Kültür Ortamının (Besiyeri) Hazırlanması

Kullanılan malzemeler ve miktarları;

Malzeme	Miktarı
Ham's F10	100 cc
L-glutamin	5 cc
Fitohemaglutinin	2,5 cc
Fetal calf serum	33 cc
Penisilin-streptomisin	1 cc
Heparin	1 cc

Besiyeri, steril ortamda 100 cc'lik Ham's F10 içine yukarıdaki diğer malzemeler eklenip, elle yavaş bir şekilde bir kaç kez karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan medyum yine steril ortamda 5'er cc olmak üzere steril vidalı kapaklı konik tabanlı kültür tüplerine bölünüp, 10-15 dakika laboratuvarında bekletildikten sonra kan örneklerinin ekimi yapıldı yada -20 °C'de dondurularak saklandı.

2. Kan Örneklerinin Alınması

Hasta ve kontrol grubundan her bir kişinin, 5 ml'lik steril ve 0.1- 0.2 cc heparin içeren enjektörler kullanılarak periferik kanları alındı. Daha sonra kan örneklerinin bekletilmeden kültür ortamlarına ekimi yapıldı.

3. Kültür Tekniği

Önceden 37 °C'ye getirilmiş olan 5 cc medyum içeren kültür tüplerine steril ortamda, alınan kan örneklerinin 3-4 damlası dışarı atıldıktan sonra 12 damla (0.4 ml) kan ilave edildi. Tüplerin üzerine hasta ve kontrol kişilerin adı yazıldı ve her bir kişi için 2 tüpe ekim yapıldı. Tüpler hafifçe karıştırılarak 37 °C'lik etüvde 44. saatte Cyt-B eklenmek koşuluyla 72 saat kültüre edildi.

1mg Cyt-B (Sigma, 6762) 5 ml dimetil sülfoksitte çözdürülerek hazırlandı. Çıkarımın 44. saatinde kültür tüpleri etüvden çıkartılarak steril ortamda her bir tüpe 75 µl (final konsantrasyonu: 3µg/ml) Cyt-B ilave edilerek tekrar etüve konuldu.

4. Çıkarım İşlemleri

Umegaki ve arkadaşlarının MN elde etmek için çalışmasında kullanılan Balasem ve Ali metoduna göre çıkarım işlemleri yapıldı (69-71).

- 0.1 M hipotonik solüsyonu, 1.864g KCL tartılıp distile su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.
1. 72 saat inkubasyondan sonra kültür tüpleri etüvden çıkartılarak 1000 rpm'de 9 dakika santrifüj yapıldı.
 2. Dipte 0.6-0.7 ml kalıncaya kadar üstteki süpernatantlar atıldı.
 3. Daha sonra hücrelere laboratuvar ısısında beklemiş olan 0.1M hipotonik solusyonundan 6 ml eklenerek 4 dakika laboratuvar ısısında bekletildi.
 4. Hücreler hipotonik solüsyonunda bekletildikten sonra 9 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi.
 5. Süpernatantları atılıp üzerine taze hazırlanmış soğuk fiksatiften 6 ml (3:1, metanol: glacial asetik asit) yavaşça damla damla ilave edilip bekletmeden 9 dakika 1000 rpm'de santrifüj yapıldı.

6. Süpernatantları tekrar atılıp üzerine aynı fiksatiften 6 ml ilave edilip, 9 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi.
7. Dipte 0.7 ml fiksatifli hücre bırakılarak süpernatantları tekrar atıldı ve bir gün buzdolabında (+4 °C) bekletildi.

5. Preparat Hazırlama

Lamlar temizlenerek içinde %70'lik metanol bulunan şaleye yerleştirilip soğuyuncaya kadar buzdolabı buzlukunda bekletildi. Daha sonra şaleden çıkarılan lamlar iyice kurulandı. Pastör pipeti ile fiksatifli hücre içeren kültür tüplerine pipetaj yapılarak hücre süspansiyonundan pastör pipeti yardımıyla lamlara yakın mesafeden (1- 2cm yukarıdan) 9- 10 damla damlatıldı. Lamlara kuvvetlice üflenerek hücrelerin lam üzerine iyice dağılması sağlandı ve kurumaya bırakıldı. Her kültür tüpü için ayrı pastör pipeti kullanılarak farklı preparatlar hazırlandı ve lamlar ayrı ayrı kodlandı.

6. Preparatların Boyanması ve Saklanması

Boyama için gerekli olan solusyonlar;

- 0.06 M KH_2PO_4 solusyonu: 6.124 g KH_2PO_4 tartılıp distile su ile 750 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.
- 0.06 M Na_2HPO_4 solusyonu: 8.010 g Na_2HPO_4 tartılıp distile su ile 750 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

49 ml KH_2PO_4 + 51 ml Na_2HPO_4 (sorenson tamponu) balon josedde karıştırılıp, 100 ml'lik solusyondan 5 cc dışarı atıldı. 5 cc giemsa boyası bu tampona eklenerek tekrar karıştırıldı.

Kurumuş olan preparatlar yeni hazırlanan %5'lik giemsa da 6 dakika boyandıktan hemen sonra 2 kez distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar ksilolden geçirildikten sonra kanada balsamı (entellan) damlatılarak lamelle kapatıldı.

7. Lamların İncelenmesi ve MN Sıklığının Değerlendirilmesi

Lamlar en iyi 1000X'lik büyütmede incelenir. Lamlar ışık veya floresans mikroskopta bakılmalıdır. Lamlar analizden önce numaralandırılmalıdır. Her bir duplike kültürden alınan lamlar için bir skor elde edilmelidir. Her bir preparat aşağıdaki bilgileri içermelidir (69):

1. MN'ların sayısı, en azından 1000 BN hücrede sayılmalıdır ve 1000 BN hücre başına MN frekansı hesaplanmalıdır. BN hücrede MN'ların sayılmasında kullanılan kriterler detaylı bir şekilde aşağıda açıklanmıştır.
2. Sıfır, bir veya daha fazla MN içeren BN hücre dağılımı; tek bir BN hücrede MN sayısı normalde sağlıklı bireylerin lenfositlerinde 0 ila 3 arasında değişmektedir ancak genotoksine ve yaşa bağlı olarak 3'den fazla olabilir.
3. Mikronükleuslu BN hücrelerinin frekansı, en azından 1000 BN hücrede bulunmalıdır.
4. 1000 BN hücresinde nükleoplazmik köprü frekansı hesaplanmalıdır.
5. 500 hücre başına tek çekirdekli (mononükleer), iki çekirdekli, üç çekirdekli ve dört çekirdekli hücrelerin oranı hesaplanmalıdır. Bu bilgiye dayanarak çekirdek bölünme indeksi oluşturulabilir.
6. Canlı ya da apoptoz veya nekrozdan dolayı ölen hücrelerin sayısı, aynı preparat üzerinde 500 hücre başına tek-, iki- ve çok-çekirdekli hücreler sayılırken sayılabilir.

Hücreyi tanımlayamadığımızda sayılan hücrelere dahil etmeden geçebiliriz.

8. Sitokinezi Bloke Edilmiş Binükleer Hücreleri Tanımlama Kriterleri:

MN frekansı değerlendirilecek olan sitokinezi bloke edilmiş hücreler aşağıdaki kriterleri içermek zorundadır (69).

1. Hücreler binükleer (iki çekirdekli) olmalıdır.
2. Binükleer hücredeki iki çekirdeğin boyutu yaklaşık olarak aynı olmalı ve yoğun boyanmalıdır.
3. Binükleer hücredeki iki çekirdek nükleoplazmik bir köprü ile bağlanabilir. Bu nükleoplazmik köprü çekirdek çapının $\frac{1}{4}$ 'ünden büyük olmamalıdır.
4. Binükleer hücredeki iki çekirdek birbirine temas edebilir, ancak ideal olarak birbirinin üzerine çıkmamış olmalıdır. İki çekirdeği üst üste çıkmış olan bir hücre eğer her bir çekirdeğin çekirdek sınırları ayırt edilebiliyorsa sayılmalıdır.
5. Binükleer hücrenin sitoplazmik sınırı yada zar yapısı bozulmamış olmalı ve komşu hücrelerin sitoplazmik sınırından açıkça ayırt edilebilmelidir.

9. Mikronükleus Sayma Kriterleri

MN'lar morfolojik olarak çekirdek ile aynı ancak çekirdekten daha küçüktür. MN özellikleri aşağıda belirtilmiştir (69):

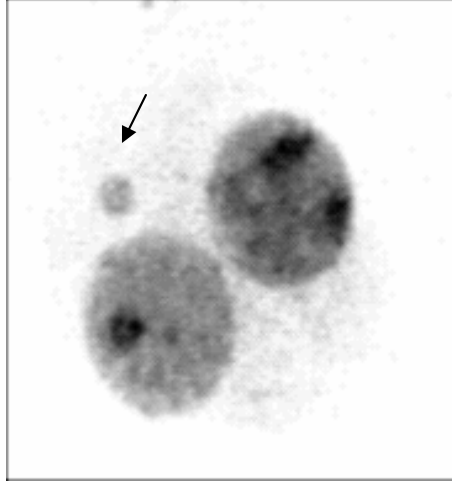
- a) İnsan lenfositlerindeki MN'ların çapı, genellikle ana çekirdeğin ortalama çapının 1/16 ve 1/3'ü arasında değişmektedir.
- b) MN'lar kırılğan olmamalıdır ve böylece boyanan partiküller gibi artefaktlardan kolayca ayırt edilebilir.
- c) MN'lar ana çekirdekle birleşmiş veya bağlantılı olmamalıdır.
- d) MN'lar ana çekirdeğe temas edilebilir ancak üstüne binmiş olmamalıdır ve mikronükleer sınır çekirdek sınırından ayırt edilebilir olmalıdır.
- e) MN'lar genellikle ana çekirdekle aynı yoğunlukta boyanmalıdır, ana çekirdek bazen daha yoğun (koyu) boyanabilir.
- f) Hücrelerin 6 tane MN'dan daha fazlasını içermemesi gerekir.

10. Mikronükleus Sayımı

Sayılan çekirdeklerin tekrar sayılmaması için ışık mikroskopunda 400X büyütmede sitoplazması dağılmayıp sınırları belli olan çekirdekler belirlendi ve sadece bunlar sayıldı. Hem hasta hem kontrol grubu için duplike kültürlerden hazırlanan preparatlarda 1000 BN hücre sayıldı ve mikronükleuslar kaydedildi.

11. İstatistiksel Değerlendirme

Hasta ve kontrol grubuna ait MN değerleri istatistiksel olarak non-parametrik testlerden Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Ayrıca hasta ve kontrol grubunun MN değerlerinin, yaş ve cinsiyet ile ilişkisi lineer regresyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama±standart sapma olarak verildi. P değeri < 0.05 olduğunda anlamlı kabul edildi.



Resim 3.1. MN'lu binükleer (BN) hücre

4. BULGULAR

Vitiligolu hasta (21 kişi) ve kontrol olarak seşilen kişilerden (21 kişi) alınan kan örnekleri materyal ve metotta belirtilen yöntemlere göre hazırlanan kültür ortamına ekilmiş ve yapılan preparatlarda ışık mikroskobu yardımıyla MN frekansı değerlendirilmiştir.

Vitiligolu hastaların yaş aralığı 12-41 ve kontrol grubundaki kişilerin yaş aralığı 11-42 arasında değişmektedir. Vitiligolu hastaların yaş ortalaması 21.48 ± 9.78 ve kontrol grubundaki kişilerin yaş ortalaması 21.52 ± 9.80 'dır (Tablo 4.1. ve 4.2.). Vitiligolu hastaların ve kontrol grubundaki kişilerin 14'ü kadın ve 7'si erkektir. Vitiligolu hasta ve kontrol grubundaki kişilerin yaşları Mann-Whitney U testine göre karşılaştırıldığında, aralarında fark bulunamamıştır ($p=0.970$).

Vitiligolu hasta ve kontrol grubundaki kişilerin lenfositlerindeki total binükleer hücre sayıları, MN'lu binükleer hücre sayıları, total MN sayısı, MN frekansı (%) ve diğer özellikleri (yaş ve cinsiyet) sırası ile Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.'de gösterilmiştir. Vitiligolu hastaların MN değerleri ortalaması 0.93 ± 0.58 ve kontrol kişilerin MN değerleri ortalaması 0.58 ± 0.32 olarak bulunmuştur. Vitiligolu hastalarla kontrol olarak seşilen grubun MN frekansları Mann-Whitney U testine göre karşılaştırıldığında MN değerleri arasında fark bulunmuştur ($p=0.012$). Her iki grub binükleer hücredeki MN sayıları açısından değerlendirildiğinde, 2 ve 3 MN'lu binükleer hücreler vitiligolu hastalarda gözlenirken kontrol kişilerde bulunamamıştır ve kontrol grubunda bulunan MN'ların tümü 1 MN'lu binükleer hücrelerdir (Tablo 4.1 ve 4.2).

Vitiligolu hasta ve kontrol grubunda, yaş ve cinsiyetin MN değerleri ile ilişkisini incelemek için lineer regresyon analizleri yapılmıştır. Vitiligolu hastaların ($p=0.220$; $Rsq=0.078$) ve kontrol grubunun ($p=0.008$; $Rsq=0.313$) yaşları ile MN frekansları arasındaki ilişkiye bakıldığında, kontrol grubunda yaşa bağlı olarak MN frekansının arttığı bulunmuştur. Vitiligolu hastaların ($p=0.779$; $Rsq=0.004$) ve kontrol grubundaki kişilerin ($p=0.457$; $Rsq=0.029$) cinsiyet ile MN frekansları arasındaki ilişki kendi aralarında karşılaştırıldığında, cinsiyet ile MN değerleri arasındaki ilişkinin de istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur.

Tablo 4.1. Vitiligolu hasta grubunun yaşları, cinsiyetleri, total binükleer hücre sayıları, MN'lu binükleer hücre sayıları, total MN sayısı ve MN frekansı (%)

Grup (Hasta)	Yaş (yıl)	Cinsiyet	Total binükleer hücrelerin sayısı	MN'lu binükleer hücrelerin sayısı					Total MN sayısı	MN frekansı % ortalama
				1 MN	2 MN	3 MN	4 MN	5 MN		
1	22	K	1127	1	-	-		-	1	0.09
2	12	K	1026	7	1	-		1	14	1.37
3	41	E	1096	13	1	-		-	15	1.37
4	14	E	1016	5	2	-		-	9	0.89
5	14	K	1064	7	1	-		-	9	0.85
6	24	K	1035	9	1	-		-	11	1.06
7	16	K	1012	9	1	-		-	11	1.09
8	14	E	1020	5	-	-		-	5	0.49
9	13	K	1089	3	-	1		-	6	0.55
10	12	K	1013	9	-	-		-	9	0.89
11	31	K	1032	26	2	-		-	30	2.91
12	22	K	1020	1	-	-		-	1	0.10
13	13	K	1010	10	-	-		-	10	0.99
14	20	K	1007	6	1	-		-	8	0.79
15	21	K	1010	7	-	-		-	7	0.69
16	38	E	1007	2	2	-		-	4	0.40
17	14	K	1000	8	-	-		-	8	0.8
18	29	K	1017	11	1	-		-	13	1.28
19	43	E	1000	13	-	-		-	13	1.3
20	14	E	1057	6	2	-		-	10	0.95
21	24	E	1025	5	-	1		-	8	0.78
Ort±SS	21.48± 9.78									0.93±0.58

MN: Mikronukleus, SS: Standart sapma (SD)

Tablo 4.2.Kontrol grubunun yaşları, cinsiyetleri, total binükleer hücre sayıları, MN'lu binükleer hücre sayıları, total MN sayısı ve MN frekansı (%).

Grup (Kontrol)	Yaş (yıl)	Cinsiyet	Total binükleerh ücrelerin sayısı	MN'lu binükleer hücrelerin sayısı					Total MN sayısı	MN frekans % ortalama
				1 MN	2 MN	3 MN	4 MN	5 MN		
1	23	K	1039	3					3	0.29
2	11	K	1009	4					4	0.40
3	42	E	1015	14					14	1.38
4	12	E	1028	7					7	0.68
5	16	K	1021	2					2	0.20
6	24	K	1019	8					8	0.79
7	15	K	1047	12					12	1.15
8	15	E	1042	4					4	0.38
9	13	K	1020	5					5	0.49
10	13	K	1015	4					4	0.39
11	33	K	1045	10					10	0.96
12	21	K	1018	3					3	0.30
13	13	K	1079	2					2	0.19
14	19	K	1010	5					5	0.50
15	23	K	1035	9					9	0.87
16	37	E	1036	4					4	0.39
17	14	K	1068	4					4	0.38
18	28	K	1103	8					8	0.73
19	42	E	1007	9					9	0.89
20	14	E	1097	4					4	0.37
21	24	E	1125	6					6	0.53
Ort±SS	21.52±9.80									0.58±0.32

MN: Mikronukleus, SS: Standart sapma (SD),

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Vitiligo; ciltteki pigmentlerin kaybolması sonucu, beyaz yamalar şeklinde vücudun her yerinde görülebilen bir hastalıktır. Genellikle vücudun sağ ve sol tarafında simetrik olarak gözükür. En fazla görüldüğü yerler; yüz, dudak, el, kol, bacak ve genital bölgelerdir. Vitiligo hastalarının çoğu sağlıklı bir bünyeye sahiptirler. Bu rahatsızlığın ciltteki renk açıklığından, yani görünümünden başka herhangi bir rahatsızlık belirtisi yoktur. Görülme sıklığı toplumda %0.5-2 arasındadır. Vücutta görülen her beyaz leke vitiligo anlamına gelmez ayırımın yapılması uzman doktor muayenesini ve wood lambası diye adlandırılan özel bir ışık muayenesini gerektirir. Kuruluğa bağlı lekeler, mantar lekeleri, ekzema bölgeleri vitiligo ile karışabilir. Bu hastalık, otoimmün kökenli olup vücuttaki renk yapan hücrelere karşı vücudun yıkıcı hücrelerinin aktive olmasıyla başlar. Ailede bulunması, kişide görülme ihtimalini artırabilir ve özellikle vücudun bağışıklık sisteminin zayıfladığı stres, ameliyat, hastalık dönemlerinde vitiligonun başlaması ve artması daha olasıdır. Vitiligo bazen çıktığı bölgelerde sınırlı kalırken bazen yayılmaya ve hatta yeni bölgelerde gelişmeye yönelir (1, 2).

Vitiligonun patogenezi hakkında çok çarpıcı hipotezler öne sürülmesine rağmen, hiçbiri henüz tam olarak kanıtlanamamıştır. Bunların en iyi bilinenleri otoimmün hipotez, nöral hipotez, ve melanositlerin kendi kendilerini yıkma hipotezleridir. Otoimmün hipotez: Melanositlerin bazal tabakadaki normal turnover sırasında melanositlere karşı otoimmün reaksiyon gelişir. Melanositlere karşı gelişebilen sitotoksik antijenler onları yok edebilir. Vitiligolu hastalarda birçok otoantikorlar gösterilmiştir, fakat bunlar arasında melanositlere karşı olanlarını bulmak zordur.

Ayrıca, genellikle vitiligo lekelerinin aktif sınırında inflamator reaksiyonu, lenfositleri gösterir. Nöral hipotez: Sıklıkla vitiligo lezyonları, dermatomal bir dağılım gösterir, böylece melanositlerin yıkımından sorumlu olan nörokimyasal bir aracının olduğu öne sürülür. Melanositlerin kendi kendilerini yıkmaya hipotezi: Melanin sentezi sırasında oluşan toksik ürünlerin melanositleri yıkmasıdır. Elimizde bulunan bilgilere göre, muhtemelen vitiligodaki foliküler ve epidermal melanositlerin kaybı birçok farklı patogenetik mekanizmaların sonucu olabilir. Vitiligo olarak tanımlanan bu hastalık, muhtemelen tek bir hastalık değildir, aynı zamanda farklı birçok hastalıktan oluşan bir sendromdur (24). Bu yüzden, genetik faktörler, stres, toksik bileşiklerin birikimi, enfeksiyon, otoimmünite, değişen hücresel çevre, zarar verici melanosit göçü ve proliferasyonunu içine alan vitiligo fenomenine ilişkin birleşik bir teori öne sürülür (25).

Kromozom yapısının tam anlamıyla anlaşılmasına rağmen, kromozom seviyesinde görülen anormallikler DNA seviyesindeki hasarların belirtisidir, örneğin kromozom kırılmaları, DNA'daki çift iplik yapının tamir edilememesinden meydana gelebilir (29). Kromozom kaybı ve kromozomların hatalı ayrılışı (non-disjunction), kanserde ve yaşlanmada çok önemli olaylardır ve metafazdan önce iğ ipliklerinde, sentromerde yada kromozom yapısındaki bozukluklarla ortaya çıkabilir (30-32). MN'lar, mitoz sırasında kutuplara gidemeyen tüm kromozomlar ya da sentromeri olmayan kromozom kırıklarını içeren bölünen hücrelerde görülebilir. Telofazda, geri kalan kromozomlar ve parçaları etrafında nükleer bir zar oluşur ve bu yapı hücrenin ana çekirdeğinden daha küçük olduğundan "mikronükleus (MN)" olarak adlandırılır. Bundan dolayı, MN'lar hem kromozom kırılması hem de kromozom kaybının uygun ve güvenilir ölçümünü sağlar. MN'lar çekirdek bölünmesi tamamlandıktan sonra oluştuğu için, MN'lar hücre döngüsünün binükleer (iki çekirdekli, BN) safhasında ideal olarak ölçülür (36, 37).

Çalışmamızda, Vitiligolu hastaların MN değerleri (0.93 ± 0.58) ile kontrol kişilerin MN değerleri (0.58 ± 0.32) Mann-Whitney U testine göre karşılaştırıldığında, MN değerleri arasında fark bulunmuştur ($p=0.012$). Ayrıca, her iki grubun binükleer hücredeki MN sayıları değerlendirildiğinde, 2 ve 3 MN'lu binükleer hücreler vitiligolu hastalarda gözlenirken kontrol kişilerde bulunamamıştır ve kontrol grubunda bulunan MN'ların tümü 1 MN'lu binükleer hücrelerdir (Tablo 4.1 ve 4.2).

Sigara kullanmanın ve UV'nin MN frekansını artırıcı etkisi bilinmektedir ve sistemik tedavinin de etkisi olabileceği düşünülerek, çalışmaya alınan vitiligolu hastaların sigara kullanmamalarına ve vitiligo tedavisi için daha önce UV yada herhangi bir sistemik tedavi almamış olmalarına özellikle dikkat edilmiştir.

Aslında vitiligolu hastalara ait MN değerleri (0.93 ± 0.58) çok yüksek gibi görünmese de, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.012$). Ayrıca, kontrol grubunda bulunduğumuz gibi MN değerleri yaşa bağlı olarak arttığı için (78), vitiligolu hastalara ait MN değerleri ile genel topluma ait MN değerleri arasında karşılaştırma yapmak zordur. Bu nedenle, vitiligolu hastalara ait MN değerleri ile yaş, cinsiyet ve sosyoekonomik açıdan aynı olan sağlıklı kişilere ait MN değerleri arasında karşılaştırma yaptığımızda, aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bulmamız önemlidir.

Vitiligo ve MN ile ilgili kaynak tarama sonuçlarımıza göre, şimdiye kadar bizim çalışmamıza benzer şekilde yapılmış bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Vitiligoyla ilgili olarak bulunan mutajenite çalışmaları, daha çok vitiligo hastalığında kullanılan tedavilerin etkileri üzerinedir. Ancak, sistemik sklerozis ve sistemik lupus eritematozus gibi otoimmün hastalıklarda, hastaların lenfositleri kültüre edilerek MN frekansının değerlendirildiği çalışmalar vardır. Bu çalışmalara göre, sistemik sklerozisli hastaların kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı şekilde daha yüksek MN değerlerine sahip olduğu, fakat sistemik lupus eritematozuslu hastaların daha yüksek MN değerlerine sahip olmadığı bulunmuştur (72-74). Raynaud fenomenili hastaların kültüre edilmiş lenfositleri üzerinde yapılan MN çalışmalarında ise, Raynaud fenomenili hastaların kontrollerden daha yüksek MN frekansına sahip olduğu ve idiopatik Raynaud fenomenili kişilerin spontan MN frekansının kontrollerden farklı olmadığı (73), ve şüpheli presklerodermik Raynaud fenomenili hastaların kontrollere ve idiopatik Raynaud fenomenili kişilere göre daha yüksek MN frekansına sahip olduğu (75) gösterilmiştir.

Vitiligo gibi kutanöz bozukluklar arasında yer alan psoriasisli hastalar üzerine yapılan bir çalışmada, tedavi almamış hastaların lenfositlerindeki kardeş kromatit değişiminin (KKD; genetik hasarı belirlemek için kullanılan başka bir test) normal seviyelerde olduğu gösterilmiştir (76). Kutanöz bozukluklar arasında yer alan Mycosis fungoidesli hastalarda da KKD'nin ve kromozom kırıklarının normal

sınırlar içinde olduğu bulunmuştur (77). Psoriasisli ve Mycosis fungoidesli hastalara ait normal seviyelerdeki KKD bulguları bizim vitiligo hastalarındaki yüksek MN sonuçlarımızla uygunluk göstermemektedir.

Başka bir bakış açısıyla da, hastalık (vitiligo) ortaya çıkmadan önceki MN değerleri ile hastalık ortaya çıktıktan sonraki MN değerleri arasında karşılaştırma yapmak mümkün olabilseydi; vitiligolu hastaların kültüre edilmiş lenfositlerindeki MN artışı, vitiligo hastalığındaki genetik hasarın kesin göstergesi olabilirdi.

Bu çalışmaya ilave olarak, vitiligolu hastaların lezyonlu ve lezyonsuz bölgelerinden alınan doku örneklerinin hücre kültürleri yapılarak MN frekanslarının değerlendirilmesi düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmadaki kontrollerle karşılaştırdığımızda vitiligolu hastalarda bulduğumuz yüksek MN sonuçları, vitiligolu hastaların lenfositlerinde kromozomal hasarın varlığına işaret etmektedir. Bu sonuçlara göre kanser riski gözönünde tutularak, vitiligolu hastaların tedavisinde daha dikkatli yaklaşımlarda bulunulmalı ve hastalar takip edilmelidir.

6. KAYNAKLAR

1. Ortonne JP. Vitiligo and Other Disorders of Hypopigmentation, In: Bologna JL., Jorizzo JL, Rapini RP, Horn TD, Mascaró JM, Saurat J-H, Mancini AJ, Salasche SJ, Stingl G (eds), *Dermatology* (vol. 1), 1st ed., Mosby, London, 2003, pp 947-973.
2. Braun-Falco O, Plewing G, Wolff HH, Burgdorf WHC. Disorders of Melanin Pigmentation, In: *Dermatology*, 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin, 2000, pp 1013-1042.
3. Tobin DJ, Swanson NN, Pittelkow MR, Peters EM, Schallreuter KU. Melanocytes are not absent in lesional skin of long duration vitiligo. *J Pathol* 2000, 191:407-416.
4. Le Poole IC, van den Wijngaard R, Westerhof W, Dutrieux RP, Das PK. Loss of melanocytes in vitiligo lesions. *J Invest Dermatol* 1992, 98:541.
5. Moellmann G, Klein-Angerer S, Scollay DA, Nordlund JJ, Lerner AB. Extracellular granular material and degeneration of keratinocytes in the normally pigmented epidermis of patients with vitiligo. *J Invest Dermatol* 1982, 79:32-30.
6. Hann SK, Kim YS, Yoo JH, Chun YS. Clinical and histopathologic characteristics of trichrome vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 2000, 42(4):589-596.
7. Nordlund JJ, Ortonne JP. Vitiligo and depigmentation. In: Weston WL (ed), *Current Problems in Dermatology*. Mosby Year Book 1992, pp 3-30.
8. Majumder PP, Das SK, Li CC. A genetical model for vitiligo. *Am J Hum Genet* 1988, 43:119-125.
9. Kemp EH, Ajjan RA, Waterman EA, et al. Analysis of a microsatellite polymorphism of the cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 gene in patients with vitiligo. *Br J Dermatol* 1999, 140:73-78.

10. de la Fuente-Fernandez R. Mutations in GTP-cyclohydrolase I gene and vitiligo. *Lancet* 1997, 350:640.
11. Le Poole C, Sarangarajan R, Zhao Y, et al. 'VIT1', A novel gene associated with vitiligo. *Pigment Cell Res* 2001, 14:475-484.
12. Casp CB, She JX, McCormack WT. Genetic association of the catalase gene (CAT) with vitiligo susceptibility. *Pigment Cell Res* 2002, 15:62-66.
13. Schallreuter KU, Wood JM, Pittelkow MR, et al. Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science* 1994, 263:1444-1446.
14. Norris A, Todd C, Graham A, Quinn AG, Thody AJ. The expression of the c-kit receptor by epidermal melanocytes may be reduced in vitiligo. *Br J Dermatol* 1996, 134:299-306.
15. Slominski A, Paus R, Bomirski A. Hypothesis: possible role for the melatonin receptor in vitiligo: discussion paper. *J R Soc Med* 1989, 82:539-541.
16. Al'Abadie M, Gawkrödger DJ, Senior HJ, Warren MA, Bleehen SS. Neuro-ultrastructural and neuropeptide studies in vitiligo. *Clin Exp Dermatol* 1992, 15:284-289.
17. Hedstrand H, Ekwall O, Olsson MJ, et al. The transcription factors SOX9 and SOX10 are vitiligo autoantigens in autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Biol Chem* 2001, 276:35390-35395.
18. Das PK, van den Wijngaard RM, WankowiczKalinska A, Le Poole IC. A symbiotic concept of autoimmunity and tumour immunity: lessons from vitiligo. *Trends Immunol* 2001, 22:130-136.
19. Ogg GS, Rod Dunbar P, Romero P, Chen JL, Cerundolo V. High frequency of skin-homing melanocyte-specific cytotoxic T lymphocytes in autoimmune vitiligo. *J Exp Med* 1998, 188:1203-1208.
20. Lang KS, Caroli CC, Muhm A, et al. HLA-A2 restricted, melanocyte-specific CD8(+) T lymphocytes detected in vitiligo patients are related to disease activity and are predominantly directed against MelanA/MART1. *J Invest Dermatol* 2001, 116:891-897.
21. Grimes PE, Sevall JS, Vojdani A. Cytomegalovirus DNA identified in skin biopsy specimens of patients with vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 1996, 35:21-26.

22. Yamamura K, Kamada S, Ito S, Nakagawa K, Ichihashi M, Tsujimoto Y. Accelerated disappearance of melanocytes in bcl-2 deficient mice. *Cancer Res* 1996, 56:3546-3550.
23. van den Wijngaard RM, Aten J, Scheepmaker A, et al. Expression and modulation of apoptosis regulatory molecules in human melanocytes: significance in vitiligo. *Br J Dermatol* 2000, 143:573-581.
24. Gilhar A, Pillar T, Eidelman S, Etzioni A. Vitiligo and idiopathic guttate hypomelanosis. Repigmentation of skin following engraftment onto nude mice. *Arch Dermatol* 1989, 125:1363-1366.
25. Le Poole IC, Das PK, van den Wijngaard RM, Bos JD, Westerhof W. Review of the etiopathomechanism of vitiligo: a convergence theory. *Exp Dermatol* 1993, 2:145-153.
26. <http://www.haydarpasanumune.gov.tr/hastalik/dvitiligo.shtml>
27. Lerner AB, Takahashi Y. Hormonal control of melanin pigmentation. *Recent Progr Hormone Res* 1956, 12:303-320.
28. Evans HJ. Molecular mechanisms in the induction of chromosome aberrations, in: D.Sobels(Eds), *Progress in genetic toxicology*, Elsevier North Holland Biomedical Press, 1977; pp.57-74.
29. Savage JRK. Update on target theory as applied to chromosomal aberrations. *Env Mol Mutagen* 1993; 22: 198-207.
30. Evans HJ. Cytogenet. : Overview. *Prog Clin Biol Res* 1990; 340B: 301-323.
31. Dellarco L, Mavournin KH, Tice RR. Aneuploidy and health risk assessment: current status and future directions. *Environ Mutagen* 1985; 7: 405-424.
32. Guttenbach M, Schmid M. Exclusion of specific human chromosomes into micronuclei by 5-azacytidine treatment of lymphocyte cultures. *Exp Cell Res* 1994; 211: 127-132.
33. Natarajan AT, Obe G. Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: cytogenetic assays, in: J.A.Heddele (ed.), *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*, Academic press, New York, 1982; pp.171-213.
34. Schind W. The micronucleus test. *Mutat Res* 1975; 31: 9-15.
35. Hedle JA. A rapid in vivo test for chromosome damage. *Mutat Res* 1973; 18: 187-192.

36. Fenech M, Morley AA. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios* 1985; 43: 29-36.
37. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronucleus method in human lymphocytes. *Mutat Res* 1985; 147: 29-36.
38. Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low-dose x-irradiation. *Mutat Res* 1986; 161: 193-198.
39. Carter SB. Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature* 1967; 213: 261-264.
40. Masunaga S, Ono K, Abe M. A method for the selective measurement of the radiosensitivity of quiescent cells in solid tumours-combination of immunofluorescence staining to BrdU and micronucleus assay. *Radiat Res* 1991; 125: 243-247.
41. Odigiri Y, Takemoto K, Fenech M. Micronucleus induction in cytokinesis-blocked Mouse bone-marrow cells in vitro following in vivo exposure to X-irradiation and cyclophosphamide. *Env Mol Mutagen* 1994; 24: 61-67.
42. Degraffi F, Tanzarella C. Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: a new assay for the aneuploidy. *Mutat Res* 1988; 203: 339-345.
43. Thompson EJ, Perry PE. The identification of micronucleated chromosomes: a possible assay for aneuploidy. *Mutagenesis* 1988; 3: 415-418.
44. Farooqi Z, Darroudi F, Natarajan AT. Use of fluorescence in situ hybridisation for the detection of aneuploidy in cytokinesis-blocked Mouse splenonocytes. *Mutagenesis* 1993; 8: 329-334.
45. Hando JC, Nath J, Tucker JD. *Sex chromosoma*. 1994; 103: 186-192.
46. Parry EM, Henderson L, Mackay JM. Guidelines for testing of chemicals. Procedures for the detection of chemically induced aneuploidy: recommendations of a UK Environmental Mutagen Society working group. *Mutagenesis* 1995; 10 (1): 1-14.
47. Elhajouji A, Hummellen P, Van, Kirsch-Volders M. Indications for a threshold of chemically induced aneuploidy in vitro in human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 1995; 26: 292-304.

48. Fenech M, Neville S. Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes. *Env Mol Mutagen* 1992; 19(1): 227-236.
49. Zijno A, Marcon F, Leopardi P, Crebelli R. Simultaneous detection of X-chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-blocked human lymphocytes by in situ hybridisation with a centromeric DNA probe; implications for the human lymphocyte in vitro micronucleus assay using cytochalasin-B. *Mutagenesis* 1994; 9 (3): 225-232.
50. Elhajouji A, Tibakdi F, Kirsch-Volders M. Indication for thresholds of chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human lymphocytes. *Mutagenesis* 1997; 12: 133-140.
51. Schuele M, Rupa DS, Eastmont DA. A critical evaluation of centromeric labelling to distinguish micronuclei induced by chromosomal loss and breakage in vitro. *Mutat Res* 1997; 392: 81-95.
52. Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Cundari E, Hummelen P. Van. The in vitro micronucleus test: a multi-end-point assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat Res* 1997; 392: 19-30.
53. Fenech M, Crott J, Turner J, Brown S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis* 1999; 14 (6): 605-612.
54. Kirsch-Volders M. (Ed). The *In Vitro* Micronucleus Assay in Human Lymphocytes. Special Issue, *Mutat Res* 1997; 392: Special Issue (1,2).
55. Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardeme M, et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group, Washington International Workshop on Genotoxicity Test Procedures. (25-26 March 1999) 2000.
56. Fenech M, Rinaldi J, Surrallés J. The origin of micronuclei induced by cytosine arabinoside and its synergistic interaction with hydroxyurea in human lymphocytes. *Mutagenesis* 1994; 9(3): 273-277.
57. Surrallés J, Carbonell E, Marcos R, Degraffi F, Antoccia A, Tanzarella C. A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 1992; 7 (6): 407-410.

58. Surrales J, Xamena N, Creus A, Morcos R. The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair. *Mutat Res* 1995; 341(1-2): 43-59.
59. Wakata A, Sasaki MS. Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells: comparison with types and rates of chromosome aberrations. *Mutat Res* 1987; 190: 51-57.
60. Prosser JS, Moquet JE, Lloyd DC, Edwards AA. Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes. *Mutat Res* 1988; 199: 37-45.
61. Lindholm C, Norpa H, Hayashi M, Sorsa M. Induction of micronuclei and anaphase aberrations by cytochalasin-B in human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 1991; 260: 369-375.
62. Minissi S, Gustavino B, Degrossi F, Tanzarella C, Rizzoni M. Effect of cytochalasin-B on the induction of chromosome missegregation by colchicine at low concentrations in human lymphocytes. *Mutagenesis* 1999; 14: 43-49.
63. Fenech M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res* 1997; 392: 11-18.
64. Kalweit S, Utesch D, Hude W, Von der Madle S. Chemically induced micronucleus formation in V79 cells-comparison of three different test procedures. *Mutat Res* 1999; 439(2): 183-190.
65. Matsushima T, Hayashi M, Matsuoka A, Ishidate M. Jr, Miura KF, Shimizu H, Suzuki Y, Morimoto K, Ogura H, Mure K, Koshi K, Sofuni T. Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis* 1999; 14(6): 569-580.
66. Fenech M. Mathematical model of the in vitro micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not scored specifically in binucleated cells or cells that have completed one nuclear division. *Mutagenesis* 2000; 15 (4): 329-336.
67. Vig BK, Swearingin SE. Sequence of centromere separation: kinetochore formation in induced lagging end micronuclei. *Mutagenesis* 1986; 1: 193-198.
68. Earnshaw WC, Migeon BR. Three related centromere proteins are absent from the inactive centromere of a stable dicentric chromosome. *Chromosoma* 1985; 92: 290-296.
69. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 2000; 455: 81-95.

70. Umegaki K, Ikegami S, Inoue K, et al. Beta-carotene prevents X-ray induction of micronuclei in human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 409-412.
71. Balasem AN, and Ali AS. Establishment of dose-response relationships between doses of CS-317 γ -rays and frequencies of micronuclei in human peripheral blood. *Mutat Res* 1991; 259: 133-138.
72. Porciello G, Scarpato R, Storino F, et al. The high frequency of spontaneous micronuclei observed in lymphocytes of systemic sclerosis patients: preliminary results. *Reumatismo* 2002, 54(1): 36-39.
73. Porciello G, Scarpato R, Ferri C, et al. Spontaneous chromosome damage (micronuclei) in systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon. *J Rheumatol* 2003, 30(6): 1244-1247.
74. Migliore L, Bevilacqua C, Scarpato R. Cytogenetic study and FISH analysis in lymphocytes of systemic lupus erythematosus (SLE) and systemic sclerosis (SS) patients. *Mutagenesis* 1999, 14(2): 227-231.
75. Porciello G, Scarpato R, Storino F, et al. Chromosome aberrations, valued as frequency of spontaneous micronuclei, in subjects with suspected presclerodermic Raynaud's phenomenon. *Reumatismo*. 2003, 55(1): 28-33.
76. Crippa L, Gilardi S, Assimacopoulos A, Engel E. Sister chromatid exchange in patients affected by severe psoriasis. *J Genet Hum* 1983, 31 Suppl 5: 377-384.
77. Clemmensen OJ, Bendtzen K, Andersen V, et al. Lymphocyte function and chromosome aberrations in patients with early mycosis fungoides and parapsoriasis en plaques. *J Invest Dermatol* 1983, 81 (4): 308-313.
78. Au WW, Walker DM, Ward JB Jr, Whorton E, Legator MS, Singh V. Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes of cigarette smokers. *Mutat Res* 1991, 260(2):137-144.

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Batman’da doğdu. İlkokulu Şanlıurfa / Suruç Atatürk ilköğretim okulu’nda okudu. Orta okulu Çankırı Kız Meslek Lisesi’nde birincilikle, lise tahsilini de 1995 yılında Bayburt Kız Meslek Lisesi’nde birincilikle tamamladı. Aynı yıl girmiş olduğu üniversite sınavında Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı.1999 yılında aynı bölümden iyi dereceyle mezun oldu. 2003 yılının güz döneminde Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nın açmış olduğu Yüksek Lisans sınavını kazanarak aynı bölümde yüksek lisans eğitimine başladı. Ders döneminden sonra “Vitiligolu Hastalarda Mikronükleus Sıklığının Araştırılması” isimli Yüksek Lisans tezini hazırladı.