

**NÖROLOJİK HASTALIKLARDA KULLANILAN BAZI
İLAÇLARIN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN KISA
SÜRELİ *IN VIVO* GENOTOKSİTE TEST
YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

ESRA ÖRENLİLİ YAYLAGÜL



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NÖROLOJİK HASTALIKLARDA KULLANILAN BAZI İLAÇLARIN
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN KISA SÜRELİ *IN VIVO* GENOTOKSİSİTE
TEST YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL

**Doç. Dr. Serap ÇELİKLER
(Danışman)**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GENEL BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BURSA 2012
Her Hakkı Saklıdır**

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı **beyan ederim.**

25/07/2012

Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NÖROLOJİK HASTALIKLARDA KULLANILAN BAZI İLAÇLARIN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN KISA SÜRELİ *IN VIVO* GENOTOKSİSİTE TEST YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Genel Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Serap ÇELİKLER

Bu çalışmada Parkinson hastalık tedavisinde kullanılan Levodopa ve Karbidopa ilaçlarının genotoksik, bir pirimidin nükleozidi olan Üridin'in antigenotoksik etkileri belirlenmeye çalışıldı. Bu amaçla *in vivo* fare kemik iliği Mikronükleus ve Komet Testleri gerçekleştirildi.

Çalışmada Levodopa ilacı 10, 50 ve 100 mg/kg dozlarda intraperitoneal (i.p.) yolla farelere enjekte edildi. Bu ilaç ile 24 saat muamele sonunda gerçekleştirilen fare kemik iliği Mikronükleus Testinde her üç doz grubunda meydana gelen mikronükleuslu polikromatik eritrositlerin (MNPCE) oranının kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. Komet Testi sonuçlarına göre, Levodopa uygulama gruplarında komet kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA, genetik hasar indeksi (GHİ) ve hasarlı hücre yüzdesinde doza bağlı olarak bir artış olduğu aynı zamanda kafa % DNA'sında istatistiksel olarak bir azalmanın meydana geldiği belirlendi.

Çalışmada aynı yolla uygulanan Karbidopa ilacının 1, 5 ve 10 mg/kg dozlarının genotoksik etkileri gözlemlenmedi.

Levodopa ve Karbidopa ilaçları birlikte 10/1, 50/5 ve 100/10 mg/kg dozlarda farelere i.p. olarak uygulandı. *In vivo* fare kemik iliği Mikronükleus ve Komet Testi verilerine göre 50/5 ve 100/10 mg/kg doz gruplarındaki PCE oranındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0,0001$). Komet Testi verilerine göre, kombine ilaç uygulamalarının Komet kuyruk uzunlukları negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 50/5 ve 100/10 mg/kg'lık doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu. Kuyruk % DNA oranlarında her üç doz grubunda meydana gelen artış, kafa % DNA verilerinde doz artışına bağlı olarak meydana gelen azalış ve genetik hasar indeks değerlerinde her üç doz grubunda meydana gelen artış negatif kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. Hasarlı hücre yüzde oranları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise, 50 ve 100 mg/kg doz gruplarındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu sonuçlarına ulaşıldı.

Yapılan *in vivo* Mikronükleus ve Komet Testi verileri değerlendirildiğinde, kullanılan 100 mg/kg Üridin dozunun genotoksik etki göstermediği gözlemlendi. Üridin'in

Levodopa'nın 10, 50 ve 100 mg/kg dozları ile kombine bir şekilde uygulanması sonucunda, Levodopa dozlarının meydana getirdiği MNPCE oranlarını sırasıyla 1,8, 2,15 ve 2,85 kat azalttığı belirlendi. Komet kuyruk uzunluğu oranlarını sırasıyla 2,09, 2,69 ve 4,94 kat azalttığı ve GHİ değerlerini ise, sırasıyla 2,59, 6,64 ve 6,18 kat azalttığı belirlendi.

Üridin'in 100 mg/kg dozunun Levodopa/Karbidopa kombinasyonunun 10/1, 50/5 ve 100/10 mg/kg doz grupları ile birlikte uygulaması sonucunda gerçekleştirilen fare kemik iliği Mikronükleus ve Komet Testi verilerine göre, uygulanan Üridin dozunun Levodopa/Karbidopa kombine dozlarının meydana getirdiği MNPCE oranlarını sırasıyla 1,03, 2,37 ve 3,83 kat, komet kuyruk uzunluğu oranlarını sırasıyla 2,35, 3,43 ve 4,29 kat, kuyruk % DNA oranlarını sırasıyla 5,73, 15,74 ve 17,13 kat GHİ oranlarını ise, sırasıyla 3,23, 5,73 ve 5,93 kat azalttığı ve hesaplanan hasarlı hücre yüzdesi oranlarını düşürdüğü sonucuna ulaşıldı.

Sonuç olarak, çalışmada genotoksik etkileri belirlenmeye çalışılan Levodopa ve Karbidopa ilaçlarının *in vivo* fare kemik iliği Mikronükleus ve Komet Testlerinde, Karbidopa uygulamasının genotoksik etki göstermediği sonucuna ulaşıldı. Levodopanin tek başına ve Karbidopa ile birlikte uygulanması sonucunda mikronükleus frekansının istatistiksel anlamlı bir şekilde arttığı belirlendi ($p < 0,0001$). Çalışmada kullanılan Üridin'in genotoksik etkisinin bulunmadığı, bunun yanı sıra Levodopa ve Levodopa/Karbidopa kombinasyonu ile birlikte kullanıldığında Levodopa ve Levodopa/Karbidopa kombinasyonunun meydana getirdiği genotoksik hasarları geri çevirdiği sonucuna ulaşıldı.

Anahtar kelime: Levodopa, karbidopa, üridin, mikronükleus, komet, genotoksik etki

2012, vii + 88 Sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE GENOTOXIC EFFECTS OF SOME DRUGS USED IN THE TREATMENT OF NEUROLOGICAL DISEASES WITH SHORT TERM *IN VIVO* GENOTOXICITY ASSAYS

Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL

Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Serap ÇELİKLER

In this study, genotoxic effects of Levodopa and Carbidopa, drugs that are used in treatment Parkinson's disease, and antigenotoxic effects of uridine, a pyrimidine nucleoside, are investigated. *In vivo* mouse bone marrow micronucleus test and Comet assay are used for this purpose.

Levodopa was administered to the mice by intraperitoneal injection at 10, 50 and 100 mg/kg doses. As a result of the mouse bone marrow micronucleus assay after 24 hours of treatment, the ratio of polychromatic erythrocyte with micronucleus increased significantly in all of the three dose groups compared to the control group. According to Comet assay results, an increase in Comet tail length, tail DNA percentage, DNA damage index and percentage of damaged cells in a dose dependent manner and a statistical decrease in head DNA percentage were determined in Levodopa treatment groups.

Carbidopa administered to the mice by intraperitoneal injection at 1, 5 and 10 mg/kg doses had no genotoxic effects.

Levodopa and Carbidopa were administered in combination to the mice by intraperitoneal injection at 10/1, 50/5 and 100/10 mg/kg doses. As a result of *in vivo* mouse bone marrow micronucleus assay and Comet assay, increase in the ratio of polychromatic erythrocyte with micronucleus in 50/5 and 100/10 mg/kg dose groups was statistically significant compared to the control group ($p < 0,0001$). According to Comet assay results, there was a statistically significant increase in Comet tail lengths in 50/5 and 100/10 mg/kg dose groups in combination treatment compared to negative control group. Increase in tail DNA percentage in all three dose groups, decrease in head DNA percentage with increasing doses and increase in DNA damage index values in all three dose groups were statistically significant compared to negative control. It was also found that increase in the percentage of damaged cells compared to control group in 50/5 and 100/10 mg/kg dose groups was statistically significant.

According to Comet assay and *in vivo* micronucleus assay, Uridine treatment at 100 mg/kg dose had no genotoxic effect. Combination of Uridine with 10, 50 and 100

mg/kg doses of Levodopa decreased the ratio of polychromatic erythrocyte with micronucleus 1,8-, 2,15- and 2,85-fold respectively. The same combination decreased Comet tail lengths 2,09-, 2,69- and 4,94-fold respectively and decreased genetic damage index values 2,59-, 6,64- and 6,18-fold respectively.

According to Comet assay and *in vivo* mouse bone marrow micronucleus assay performed with Uridine at 100 mg/kg dose and Levodopa/Carbidopa combination at 10/1, 50/5 and 100/10 mg/kg doses, administered Uridine dose decreased the ratio of polychromatic erythrocyte with micronucleus 1,03-, 2,37- and 3,83 -fold, the ratio of Comet tail lengths 2,35-, 3,43- and 4,29-fold, the ratio of tail DNA percentage 5,73-, 15,74- and 17,13-fold, the ratio of genetic damage index 3,23-, 5,73- and 5,93-fold respectively and the ratio of percentage of damaged cells, which would in turn arise from Levodopa/Carbidopa combination doses.

In conclusion, genotoxic effects of the drugs, Levodopa and Carbidopa are studied by using *in vivo* mouse bone marrow micronucleus test and Comet assay and it was found that Carbidopa treatment alone has no genotoxic effect. A statistically significant increase in micronucleus frequency was determined as a result of the treatment with Levodopa alone and its combination with Carbidopa ($p < 0,0001$). It was concluded that Uridine had no genotoxic effect; furthermore it reverts the genotoxic damage caused by Levodopa/Carbidopa combination when it is used in combination with these agents.

Keywords: Levodopa, carbidopa, uridine, micronucleus, comet, genotoxicity

2012, vii + 88 pages

TEŞEKKÜR

Bana bu konuda çalışma olanağı veren ve tezimin her aşamasında bilgi birikimine baŐvurduđum danıŐmanım Doç. Dr. Serap ÇELİKLER'e, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Mehmet CANSEV'e, çalıŐmalarımnda emeği geçen başta Sezin BOZDEMİR olmak üzere yüksek lisans arkadaŐlarım ve Farmakoloji Anabilim Dalı asistanlarına, maddi manevi desteğini esirgemeyen annem, babam ve eŐime teŐekkürlerimi sunarım.

Bu alıŐma Uludağ Üniversitesi Bilimsel AraŐtırmalar Projeleri Birimi'nce (Proje No: UAP(F)-2010/60) desteklenmiŐtir.

Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL
25/07/2012

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	İ
ABSTRACT.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Parkinson Hastalığı.....	4
2.1.1. Tanı ve klinik özellikler.....	7
2.1.2. Patolojik bulgular.....	8
2.1.3. Parkinson hastalığında nigrostriatal dopaminerjik sistemdeki temel değişiklikler.....	10
2.1.4. Parkinson hastalığında serbest radikal toksisitesi ve antioksidanlar.....	11
2.1.5. Epidemiyoloji ve genetik.....	13
2.1.6. Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlar.....	14
2.2. Levodopa.....	15
2.2.1. Levodopa farmakokinetiği.....	17
2.2.2. Levodopanin tedavide kullanılışı.....	18
2.2.3. Kombine Levodopa ilaçları.....	19
2.2.4. Levodopanin yan tesirleri.....	20
2.3. Üridin.....	21
2.4. Mutasyonlar ve <i>in vivo</i> Genotoksosite Test Sistemleri.....	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
3.1. Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanları.....	30
3.2. Kimyasallar.....	30
3.3. Doz Seçimi ve Muamele Süresi.....	32
3.4. Deney Grupları.....	33
3.5. Kemik İliği Mikronükleus Testi.....	34
3.6. Alkali Komet Testi.....	35
3.7. İstatistikî Değerlendirme.....	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Mikronükleus Test Sonuçları.....	37
4.2. Komet Test Sonuçları.....	50
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	72
KAYNAKLAR.....	81
ÖZGEÇMİŞ.....	88

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

kg	Kilogram
mg	Miligram
ml	Mililitre

Kısaltmalar

Kısaltmalar	Açıklama
CAS	Chemical Abstract Service
COMT	Katekol-O-Metiltransferaz
DA	Dopamin
DDC	Dopa-dekarboksilaz
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DOPAC	Dihidroksifenilasetik asit
EMS	Etil Metan Sulfonat
GHİ	Genetik Hasar İndeksi
GSH	Glutasyon
HO [·]	Hidroksil radikali
HVA	Homovanilik asid
H ₂ O ₂	Hidrojenperoksid
K	Karbidopa
L-Dopa	Levodopa
MAO	Monoaminoksidaz
MNNCE	Mikronükleuslu Normokromatik Eritrosit
MNPCE	Mikronükleuslu Polikromatik Eritrosit
NCE	Normokromatik Eritrosit
NOS	Nitrojenmonooksid Sentaz
O ₂ ⁻	Süperoksid radikal
PCE	Polikromatik Eritrosit
PH	Parkinson Hastalığı
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktif oksijen türleri)
SOD	Süperoksit dismutaz
UMP	Üridin monofosfat
Ü	Üridin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. İnsan beyni ve bölümleri (http://brainmind.com).....	3
Şekil 2.1.1. Substantia nigradaki değişim (http://www.nlm.nih.gov).....	5
Şekil 2.1.2. Corpus Striatumda azalan dopamin seviyesi (http://brainmind.com)	7
Şekil 2.1.1.1. Parkinson hastalarının genel görünümü (http://brainmind.com).....	7
Şekil 2.1.2.1. Parkinson hastalığında Lewy cisimciği (→ Lewy cisimciği, http://cobbersonthebrain.areavoices.com).....	9
Şekil 2.2.1. L-Dopa'nın enzimler yardımı ile dopamine dönüştürülmesi (http://www.nature.com).....	15
Şekil 2.2.2. L-Dopa'dan dopamin biyosentezi (http://en.wikipedia.org)	16
Şekil 2.2.1.1. Dopaminerjik ve noradrenerjik sinir uçları (http://www.psikofarma.info)	17
Şekil 2.2.1.2. Dopaminin yıkımı (http://en.wikipedia.org).....	18
Şekil 2.2.3.1. L-Dopa'nın Karbidopa varlığında kan-beyin engelini geçmesi (http://students.cis.uab.edu)	20
Şekil 4.1.1. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin MNPCE oranlarının kontrol grubu ile karşılaştırılması (**:p< 0,001, ***: p< 0,0001, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma).....	37
Şekil 4.1.2. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Mikronükleus testinin MNNCE oranlarının kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	39
Şekil 4.1.3. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin PCE/NCE oranlarının kontrol grubu ile karşılaştırılması (**: p < 0,001, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma).....	40
Şekil 4.1.4. Üridin ve L-Dopa ve Karbidopa'nın Üridin kombinasyonları ile gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin MNPCE oranlarının karşılaştırılması (**: p< 0,001, ***: p< 0,0001, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma, c: Levodopa doz grupları ile karşılaştırma, d: Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma)	42
Şekil 4.1.5. Üridin ve L-Dopa ve Karbidopa'nın Üridin kombinasyonları ile gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin MNNCE oranlarının karşılaştırılması (**: p< 0,001, ***: p< 0,0001, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma, c: Levodopa doz grupları ile karşılaştırma, d: Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma)	44
Şekil 4.1.6. Üridin ve L-Dopa ve Karbidopa'nın Üridin kombinasyonları ile gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin PCE/NCE oranlarının karşılaştırılması (*: p< 0,05, **: p< 0,001, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma, c: Levodopa doz grupları ile karşılaştırma, d: Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma)	45
Şekil 4.1.7. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Mikronükleus Testi sonucunda gözlenen mikronükleuslu bir PCE örneği (→, mikronükleus).....	48

Şekil 4.1.8. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Mikronükleus Testi sonucunda gözlenen mikronükleuslu bir NCE örneği (→, mikronükleus).....	48
Şekil 4.1.9. Üridin ile gerçekleştirilen Mikronükleus Testi sonucunda gözlenen mikronükleuslu bir PCE örneği (→, mikronükleus).....	49
Şekil 4.1.10. Üridin ile gerçekleştirilen Mikronükleus Testi sonucunda gözlenen mikronükleuslu bir NCE örneği (→, mikronükleus)	49
Şekil 4.2.1. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Kuyruk Uzunluklarının kontrol grubu ile karşılaştırılması	50
Şekil 4.2.2. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Kuyruk Moment Uzaklıklarının kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	53
Şekil 4.2.3. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Kuyruk % DNA'larının kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	54
Şekil 4.2.4. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Kafa % DNA'larının kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	55
Şekil 4.2.5. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Komet Testinin.....	56
Şekil 4.2.6. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Komet Testinin.....	57
Şekil 4.2.7. Üridin ve L-Dopa ve Karbidopa'nın Üridin kombinasyonları ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Kuyruk Uzunluğu oranlarının karşılaştırılması (*: p<0,05, ***: p< 0,001, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma, c: Levodopa doz grupları ile karşılaştırma, d: Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma)	62
Şekil 4.2.8. Üridin ve L-Dopa ve Karbidopa'nın Üridin kombinasyonları ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Kuyruk Moment Uzaklığı oranlarının karşılaştırılması (*: p<0,05, **: p<0,001, ***: p< 0,001, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma, c: Levodopa doz grupları ile karşılaştırma, d: Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma)	63
Şekil 4.2.9. Üridin ve L-Dopa ve Karbidopa'nın Üridin kombinasyonları ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Kuyruk % DNA oranlarının karşılaştırılması (**: p<0,001, ***: p< 0,0001, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma, c: Levodopa doz grupları ile karşılaştırma, d: Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma)	64
Şekil 4.2.10. Üridin ve L-Dopa ve Karbidopa'nın Üridin kombinasyonları ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Kafa % DNA oranlarının karşılaştırılması (**: p< 0,001, ***: p< 0,0001, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma, c: Levodopa doz grupları ile karşılaştırma, d: Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma)	65
Şekil 4.2.11. Üridin ve L-Dopa ve Karbidopa'nın Üridin kombinasyonları ile gerçekleştirilen Komet Testinin Genetik Hasar İndeksi oranlarının karşılaştırılması (***) : p< 0,0001, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma, c: Levodopa doz grupları ile karşılaştırma, d: Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma)	66

Şekil 4.2.12. Üridin ve L-Dopa ve Karbidopa'nın Üridin kombinasyonları ile gerçekleştirilen Komet Testinin Hasarlı Hücre Yüzdesi oranlarının karşılaştırılması (***) : $p < 0,0001$, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma, c: Levodopa doz grupları ile karşılaştırma, d: Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma)67

Şekil 4.2.13. Komet yöntemi ile agaroz jel üzerinde elektroforetik ortamda negatif kutuptan pozitif kutba doğru göç eden farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri. Tip 0- Hasarsız DNA; Tip 1-Çok az hasarlanmış DNA; Tip 2-Az hasarlanmış DNA; Tip 3-Hasarlanmış DNA; Tip 4- Tümüyle hasarlanmış DNA.71

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	31
Çizelge 4.1.1. Levodopa ve Karbidopa uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması	38
Çizelge 4.1.1. Levodopa ve Karbidopa uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması	43
Çizelge 4.2.1. Levodopa, Karbidopa ve Üridin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet Testinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması	51
Çizelge 4.2.2. Levodopa, Karbidopa ve Üridin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet Testinin Genetik Hasar İndeksi ve Hasarlı Hücre Yüzdesi ortalama değerlerinin karşılaştırılması	52
Çizelge 4.2.1. Levodopa, Karbidopa ve Üridin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet Testinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması	60
Çizelge 4.2.2. Levodopa, Karbidopa ve Üridin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet Testinin Genetik Hasar İndeksi ve Hasarlı Hücre Yüzdesi ortalama değerlerinin karşılaştırılması	61

1.GİRİŞ

Modern tıbbın ilerlemesine paralel olarak gelişen ilaçlar, hastalıkların tedavisinde en önemli faktörü oluştururken, aynı zamanda istenmeyen yan etkilere de sebep olabilmektedirler.

Parkinson hastalığı nörodejeneratif hastalıklardan biridir ve popülasyonun %2'sini etkilemektedir. Bu hastalık beyindeki gri bölge dopaminerjik nöronlarının nörodejeneratif kaybı ile karakterizedir. Nöronal kaybın sebebi tam olarak bilinmezken, gündemdeki bir hipoteze göre, dopaminin reaktif oksijen türlerine (ROS) hızlandırılmış ya da anormal otooksidasyonunun, direkt olarak nöron hasarına ve ölümüne sebep olduğu düşünülmektedir. Parkinson hastalığı farmakoterapisi dopaminerjik fonksiyonun yenilenmesi temeline dayanmaktadır (Halliwell ve ark. 1985, Evans 1993).

L-3-4-dihidroksifenilalanin (Levodopa, L-Dopa), dopaminin doğal öncülü ve Parkinson hastalığının semptomlarını kontrol etmek için en yaygın kullanılan tedavi ajanıdır. Ancak yakın zamanlı bazı çalışmalarda L-Dopa'nın *in vivo* nöronal hücrelere toksik olabileceği öne sürülmektedir (Walkinshaw 1995).

Üridin, bir pirimidin nükleozididir. Nükleik asitlerin, fosfolipidlerin yapısında bulunur ve glikojen sentezi ve nöronları koruma gibi işlevlerde yer alır (Cansev 2006). Üridin'in oksidatif stresin yol açtığı ROS'ların miktarını azaltarak, hücre toksisitesi üzerine olumlu bir etkisi gösterilmiş olup, deneysel Parkinson modelinde koruyucu bir etkisi ve viral kaynaklı mitokondrial DNA hasarlarının onarılması gibi etkileri rapor edilmektedir (Saydoff ve ark. 2004).

Özellikle insanların gıdalarla aldığı besin katkı maddeleri, kullandığı kozmetik ürünler ve ilaçlar gibi kimyasalların genotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde *in vivo* memeli test sisteminin kullanılması önerilmektedir. Bu sayede kendi başına genotoksik etki göstermeyen kimyasalların metabolizma ürünlerinin mutajenik etkileri de değerlendirmeye alınabilmektedir.

Genetik toksikoloji çalışmalarında ana amaç genetik hasarların belirlenmesi olduğundan, bu amaca hizmet edecek etkin test yöntemlerinin geliştirilmesine dair çalışmalar sürekli olarak kazanılmıştır. Bu amaçla geliştirilen çok çeşitli genotoksisite test yöntemleri mevcuttur.

Kromozom aberasyonlarının belirlenmesinde *in vivo* rodent kemik iliği Mikronükleus Testinden yararlanılmaktadır. Bölünmenin anafaz evresinde gecikmiş kromozomlar veya asentrik kromozom parçaları mikronükleus oluşumuna sebep olabilmektedir ve bunlar eritrositlerde daha kolay tanımlanmaktadır (IPCS 1985, Brusick 1987).

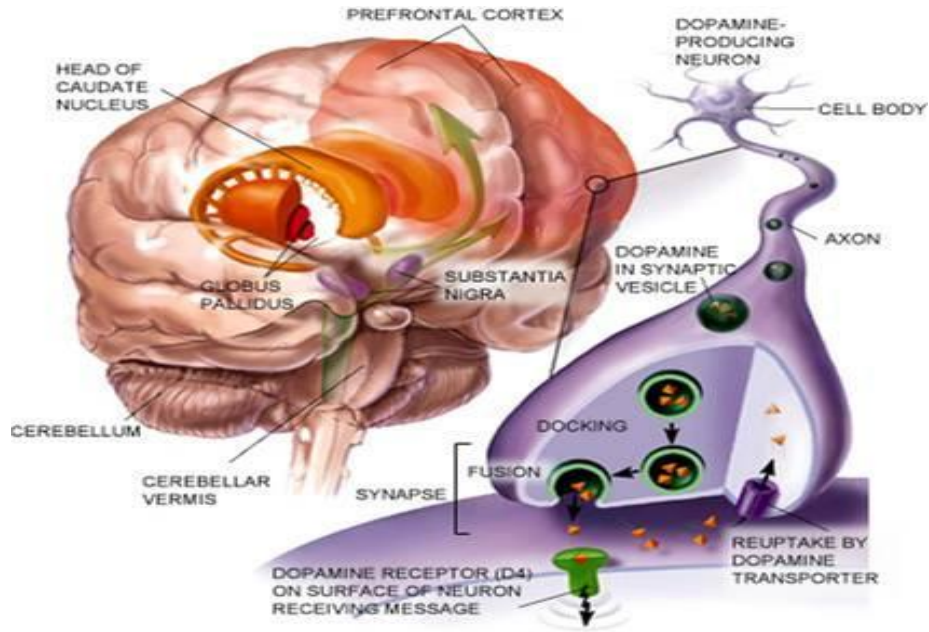
Son yıllarda üzerinde en çok çalışılan ve yaygın olarak kullanılan genotoksisite test yöntemlerinden birisinin de Komet Tekniği olduğu görülmektedir. Tek hücre jel elektroforezi (Single Cell Gel Electrophoresis, Comet Assay) olarak da isimlendirilen Komet Testi, DNA hasarını ölçmek ve analiz etmek amacıyla kullanılan, hızlı, basit, duyarlı ve yaygın kullanım alanına sahip bir yöntemdir (Olive 1999, Tice ve ark. 2000).

Bu alışmada, Parkinson hastalığı tedavi olarak kullanılan L-Dopa ve Karbidopa'nın genotoksik, üridin'in ise olası genotoksik/antigenotoksik etkileri *in vivo* yöntemlerle araştırılmıştır. Bu amaçla, genotoksisite çalışmalarında yaygın olarak kullanılan *in vivo* yöntemlerden fare kemik iliği Mikronükleus ve Komet Testleri kullanılarak değerlendirme yapılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Sinir sistemi oldukça kompleks biyokimyasal, fizyolojik ve anatomik özelliklere sahiptir. Nöronlar arası ileti elektriksel veya kimyasal haberci moleküller tarafından sağlanmaktadır. Bu iletişim sisteminin düzenlenebilmesi için beyinde enerji ihtiyacının sağlıklı olarak karşılanması gereklidir.

Beyin total vücut ağırlığının % 2'sini oluşturmasına rağmen, total vücut oksijeninin %20'sini kullanır. Beyin dokusu enerjisini yalnızca oksidatif metabolizmadan elde eder ve vücuttaki oksijenin büyük bölümünü kullanır (Şekil 2.1). Nöronal oksidatif fosforilasyon esnasında mitokondrial elektron transport zincirinden yüksek enerjili elektronların kaçıışı serbest radikallerin oluşumunu sağlar. Bu yüzden, beyin dokusu oksidan strese özellikle duyarlıdır. Nöronal ağ anatomik açıdan hasara uğramaya uygundur. Periferik hasara bağlı olarak aksonların uzama yeteneği de sınırlıdır. Rejenerasyon kapasitesi sınırlı olan beyinde, serbest radikallerin oluşmasını sağlayan metaller (örneğin demir) spesifik bölgelerde birikebilir (Halliwell ve ark. 1985, Evans 1993).



Şekil 2.1. İnsan beyni ve bölümleri (<http://brainmind.com>)

Beyin nörokimyasal oksidasyon ve otooksidasyonun yüksek olduğu bir organdır. Belirli beyin bölgelerinde ortak özelliklere sahip nöron popülasyonlarının oluşumu sonucunda nörodejeneratif hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklar, farklı klinik fenotiplere ve genetik etiyojolojiye sahip bir grup heterojen hastalıktır. Bunlar arasında Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarla birlikte, epilepsi, Friedrich ataksisi, Amiyotrofik lateral skleroz (ALS) yer almaktadır (Schapira 1998).

2.1.Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı (PH) ilk kez 1817 yılında James Parkinson tarafından yayınlanan 'An Essay on the Shaking Palsy' isimli bir kitapta tarif edilmiştir (Parkinson 1817, Fahn 2006).

Parkinson hastalığı çeşitli nörotransmitter sistemlerde değişiklik ile ilişkilidir, bunlardan en önemlisi de beyinde nigrostriatal dopaminerjik yolağın nöronlarının sayıca azalmasına bağlı olarak bazal gangliyonlardaki (özellikle corpus striatum'daki) nöromedyatör dopaminin fazla azalması sonucu gelişen kronik idiopatik bir hastalıktır (Ogawa ve ark. 1994, Kayaalp 2005, Cansev ve ark. 2008).

Yaş değişmez bir risk faktörü olup, artan yaşla korele olarak hastalık prevalansı artmaktadır. Aynı yaş grubu kontrollerle karşılaştırıldığında, hastalık grubunda mortalite oranının 2-5 kat daha arttığı saptanmıştır. Hayat kalitesinde düşüşe neden olması da önemli diğer bir problemdir (Bennett ve ark. 1996, Morens ve ark. 1996).

Çok sık görülen bu nörolojik hastalığın ABD istatistiklerine göre yıllık yeni olgu sayısı 100.000 kişide yaklaşık 20'dir.

Dört ana belirti ile kendini gösterir:

- (i) İsteğe göre hareket yapma olanaksızlığı veya hareketlere başlamada zorluk, hareketlerde yavaşlama (bradikinezi), maske yüz (bradimimi),
- (ii) Çizgili kaslarda rijidite,

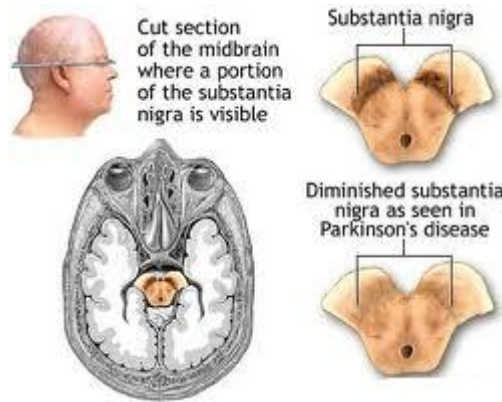
(iii) İstirahat halinde oluşan karakteristik tremor (genellikle 4-6 Hertz frekansında ve "hap yuvarlama" biçiminde)

(iv) Postüral instabilite, donakalım (akinezi) ve yürüme bozukluğu (öne eğik ayakları sürüyerek ve kolları sallamadan yürüme) (Kayaalp 2005).

Parkinson hastalığında temel patolojik değişiklikler dopaminerjik nöronların (DA) kaybı ve nigrostriatal sistemde Lewy cisimciklerinin ortaya çıkışıdır.

Parkinson hastalığında dopaminerjik nöronların kaybının sebebi tam olarak bilinmezken, hipotezlerden biri de dopaminin reaktif oksijen türlerine (ROS) ve/veya kinon ve semikinonlara otooksidasyonudur (Snyder ve ark. 1998, Ogawa ve ark. 1994).

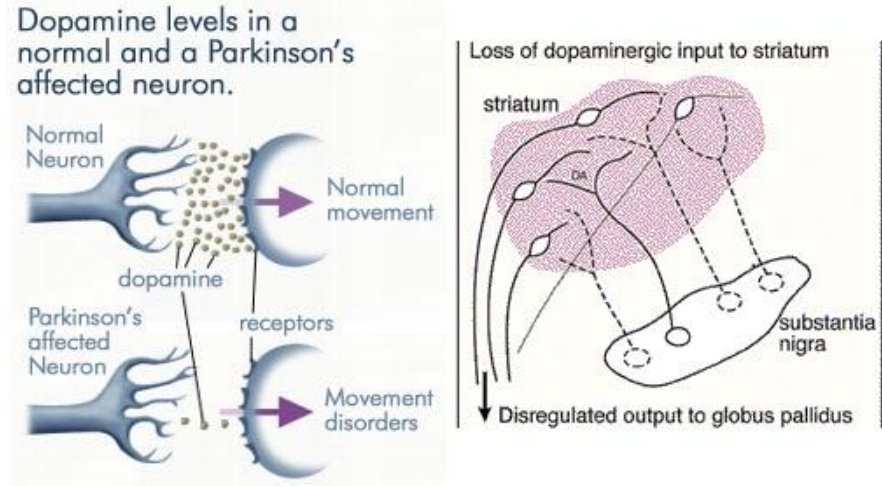
Hastalığın geleneksel tanısı, klinik bulgular ve dopamin tedavisine yanıt eşliğinde konulur. Erken tedaviye başlanan hastalarda, hastalığın muhtemel seyrini, süresini ve sonuçlarını tahmin etmenin daha kolay olduğu ortaya konmuştur. Ancak, Parkinson'un erken tanısı oldukça güçtür. Hastalıkta patolojik değişiklikler stereotipik olup, mezensefalondan alınan kesitlerde, substantia nigra alanında, melanin pigmentlerinin çok azalmış olduğu ya da yok olduğu gözlenmiştir (Şekil 2.1.1). Mikroskopik incelemede zona kompakta da nöron kaybı olduğu ve yaşayan nöronların anormal oldukları ve intrasitoplazmik hiyalin cisimcikleri (Lewy body) içerdikleri saptanmıştır. Patolojik değişiklikler substantia nigra ile sınırlı değildir. Başta serebral korteks, bazal ganglia, talamus, okulomotor nükleus, lokus seruleus ve vagusun dorsal motor nükleusu olmak üzere, tüm beyin ve beyin sapını tutan yaygın nöron kaybı vardır (Kayaalp 2005).



Şekil 2.1.1. Substantia nigradaki değişim (<http://www.nlm.nih.gov>)

Yaş artışı ile doğru orantılı olarak her insanda, dopaminerjik nöron kaybı olmaktadır. Normalde, bu kayıp, Parkinson hastalığının semptomlarını ortaya çıkarmak için gerekli dopamin sentezindeki azalma düzeyinin çok altındadır. Öte yandan, substantia nigradaki nöron kaybını artıran bir genetik yatkınlık ya da enfeksiyon, travma, toksin veya serbest radikal üretimi gibi süreci hızlandıran risk faktörleri olabilir. Günümüzde, özellikle serbest radikal üretimi, Parkinson hastalığı patogenezi için tercih edilen bir hipotezdir.

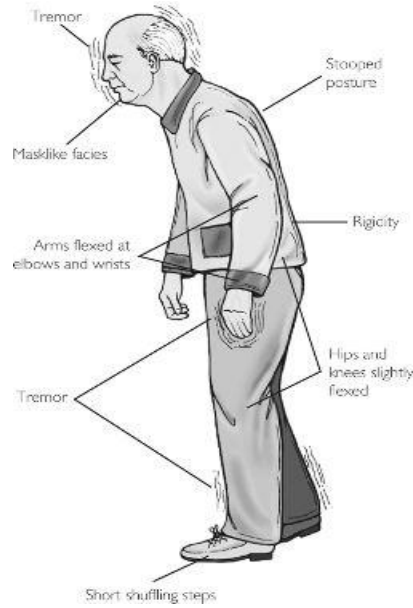
Çizgili kasların normal tonus ve kasılmalarında kontrol görevi bulunan corpus striatum'da asetilkolin ve dopamin beynin diğer pek çok yerlerine göre fazla bulunur. Bu iki endojen madde bu yerdeki sinapslarda impuls aşırımında nöromodülatör rolü oynarlar. Bunların striatumdaki nöronlar üzerinde zıt yönde etkileri vardır. Nigrostriatal dopaminerjik nöronlar intrastriatal kolinerjik nöronları inhibitör baskı altında tutarlar. Parkinson hastalarında yapılan otopsi incelemelerinde corpus striatum'da dopamin içeriğinin ileri derecede azaldığı görülmüştür (Şekil 2.1.2). Belirtilen duruma göre Parkinson hastalarının striatumunda kolinerjik ve dopaminerjik sistemlerin etkinliği arasındaki denge kolinerjik etkinliğin lehine olarak bozulmuştur. Bundan dolayı Parkinson hastalığının tedavisinde esas itibariyle, ya dopaminerjik etkinliği arttıran ilaçlar veya Santral Sinir Sistemi (SSS)'ne girebilen ve striatumda kolinerjik etkinliği azaltan antikolinerjik ilaçlar ya da bunların kombinasyonu kullanılır. Kullanılan bütün ilaçlar geçici bir tedavi sağlar; alındıkları sürece hastalık belirtilerinde düzelme yapabilirler. Tedavi kesildikten bir süre sonra hastalık tablosu yeniden belirir; bu hastalıkta ilaçla radikal tedavi henüz mümkün değildir (Kayaalp 2005).



Şekil 2.1.2. Corpus Striatumda azalan dopamin seviyesi (<http://brainmind.com>)

2.1.1. Tanı ve klinik özellikler

Parkinson hastalığının ilerleyen aşamalarında, ekstrapiramidal sinir sisteminin nörodejeneratif bozulması meydana gelir. Bu durum, iskelet ve kas sisteminin hareketliliğini ve kontrolünü etkileyerek, tremor (istem dışı titreme), rijidite (musküler hipertoni, katılık, bükülmezlik), bradikinezi (istemli hareketin anormal yavaşlaması) ve postüral dengesizliğe yol açar (Şekil 2.1.1.1, Galvan ve ark. 2008, Bugamelli ve ark. 2011).



Şekil 2.1.1.1. Parkinson hastalarının genel görünümü (<http://brainmind.com>)

Tanı klinik kriterler temel alınarak konulur. Yanlış tanı hastalıkta önemli bir problemdir. Parkinsonizm sendromunun pek çok nedeni vardır; bunlar arasında, farklı hastalık tedavileri için kullanılan ilaçlar, Wilson hastalığı ve diğer nörodejeneratif hastalıklar sayılabilir (Rajput ve ark. 1991).

Parkinson'da nöropatolojik inceleme halen altın standart olma özelliğini korumaktadır. Tanıyı kesinleştiren biyolojik gösterge yoktur. Otopsi çalışmalarında, ölüm öncesi Parkinson tanısı almış vakaların % 24'ünde yanlış tanı konulduğu saptanmıştır (Rajput ve ark. 1991).

Semptom ve bulguların asimetrik olması, istirahat tremoru varlığı ve Levodopa'ya olumlu yanıtın olması Parkinson hastalığını, diğer nedenlere bağlı gelişen parkinsonizm tablolarından ayırır (Riley ve ark. 1990, Kayaalp 2005).

4-6 Hz istirahat tremorunun diğer Parkinson sendromlarında oldukça nadir gözlenmesi ayırıcı tanı açısından fayda sağlayabilmekle beraber, Parkinson vakalarının yaklaşık % 25'inde bu bulguya rastlanmamaktadır (Hughes ve ark. 1993). Parkinson vakalarında Levodopa'ya başlangıç yanıtı % 90 oranındadır. Bu cevabın olmayışı, alternatif bir tanı lehine ipucu sağlamaktadır.

2.1.2. Patolojik bulgular

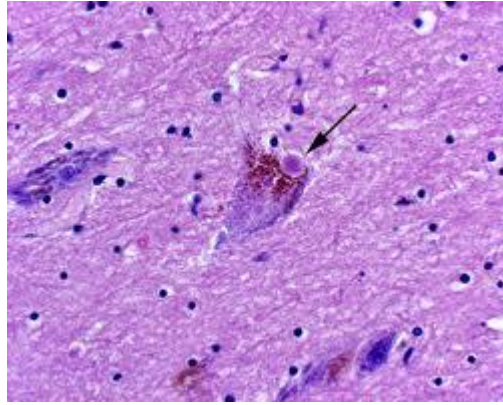
Substantia nigra pars kompakta'da nöronal dejenerasyonun artışına sebep olarak striatumdaki dopamin kaybı Parkinson hastalığında birincil patokimyasal özelliktir (Şekil 2.1.2, Kish ve ark. 1988, Contin ve ark. 2010).

Parkinson hastalığı seçilmiş ancak heterojen nöron popülasyonunun progresif oluşumu ile karakterizedir. Bunlar substantia nigra pars kompakta'daki nöromelanin yüklü dopaminerjik nöronlar, seçilmiş beyin sapı aminojik nükleusları (katekolaminerjik ve serotonerjik), Meynert kolinerjik nükleus bazalisi, hipotalamik nöronlar, küçük kortikal nöronlar, sempatik ganglia ve bağırsaktaki parasempatik nöronları içerir. Substantia nigra pars kompakta'da, nöronal kayıp, ventrolateral bölgede daha yoğundur

(semptomların başlangıç aşamasında kayıp % 60-70 oranındadır). Bunu medial ventral ve dorsal bölgeler takip eder (Fearnley 1991). Bu tip hücre kaybı Parkinson hastalığına spesifiktir. Sonuçta, putamenin dorsal ve orta bölümlerinde belirgin olmak üzere, striatal dopamin kaybı meydana gelir ve bu durum akinezi ve rijidite ile sonuçlanmaktadır. Bu tip hücre kaybı şekli aynı zamanda dopamin taşıyıcıları için messenger RNA ekspresyon derecesi ile ilişkilidir (Uhl 1994).

Diğer önemli bir patolojik bulgu da etkilenmiş beyin sapı bölgelerinde, özellikle vagusun dorsal motor nükleusunda Lewy cisimciklerinin ve dejenere ubikuitin-pozitif nöronal proseslerin (süreçler) gözlenmesidir.

Lewy cisimcikleri, eozinofilik hiyalin inklüzyon cisimciğidir (Şekil 2.1.2.1). Cisim içinde oluşan nörofilament birikiminin değişken nörofilament ekspresyonundan ziyade, bunların normal sentezini takiben protein sentezi sonrası değişimlerine bağlı olduğu düşünülmektedir (Bergeron 1996). Lewy cisimciği oluşum mekanizmasının, Parkinson hastalığı patogenezindeki önemi ve nörodejenerasyondaki rolü hala bilinmemektedir (Bergeron 1996).



Şekil 2.1.2.1. Parkinson hastalığında Lewy cisimciği (→ Lewy cisimciği, <http://cobbersonthebrain.areavoices.com>)

Lewy cisimciğinin, non spesifik bir oluşum olup, patogenez ile ilişkisi olmayan bir yapı olduğu da öne sürülmüştür. Bu tartışmanın temel noktası, Lewy cisimciğinin Parkinson'a spesifik olmayıp, diğer bir grup nörodejeneratif hastalıkta da gözlenmesidir. Bunların nöronların dejenerasyondan korunmak adına, salgıladıkları

toksik proteinlerin bir işareti olduğu fikri de diğer bir varsayımdır. Ancak, nörofilament alt ünitelerinden Lewy cisimciği oluşumu, akson içindeki nörofilamentlerin fonksiyonunu bozmakta ve substantia nigra pars kompakta'dan striatuma uzanan aksonal bağlantıya hasar vermektedir (Gibb ve ark. 1988, Trojanowski 1994).

2.1.3. Parkinson hastalığında nigrostriatal dopaminerjik sistemdeki temel değişiklikler

Parkinson hastalığı, hareketlerin ve çizgili kas tonusunun istem dışı kontrolünden ve optimizasyonundan sorumlu olan ve piramidal (kortikospinal) motor sistemden bağımsız, fakat onunla paralel şekilde çalışan ekstrapiramidal motor sistemin hastalığıdır. Bu sistemin omurilikteki motor nöronlarla direkt efferent ('output') veya direkt afferent ('input') bağlantısı yoktur.

Parkinson hastalığında primer bozukluğun mezensefalonda nigrostriatal dopaminerjik nöron köklerinin toplandığı substantia nigra'nın pars kompakta'sında olduğuna inanılmaktadır. Buradaki nöronların yıkılması sonucu, nöron sayısı ileri derecede azalmıştır. Nöron yıkımında substantia nigra'da meydana gelen aşağıdaki patolojik olayların rol aldığı ileri sürülmüştür:

- (i) Toksik oksijen radikallerinin ve hidrojen peroksidin oluşumunda artma ('oksidatif stres')
- (ii) Nöron membranında lipid peroksidasyonunun artması
- (iii) Demir metabolizmasının bozulması, hücre içi demir içeriğinin artması ve Haber-Weiss reaksiyonu ile serbest radikal oluşumunun artması.
- (iv) İntraselüler Ca^{+2} homeostazının bozulması ve serbest Ca^{+2} düzeyinin artması

Substantia nigra'daki dopaminerjik nöronların yıkımı sonucu bu nöronların aksonlarının sonlandığı striatum (nucleus caudatus+putamen)'daki dopaminerjik etkinlik belirgin şekilde azalır. Parkinson hastalığının belirtilerinin ortaya çıkması için striatumdaki dopamin düzeyinin %80'den fazla bir azalma göstermesi gerektiği saptanmıştır (Kayaalp 2005).

2.1.4. Parkinson hastalığında serbest radikal toksisitesi ve antioksidanlar

Son yıllarda çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda pek çok nörodejeneratif hastalığın etiolojisinde serbest radikal oluşumunun önemli rolü olduğuna ilişkin ipuçları elde edilmiştir (Beal 1995, Halliwell 1992).

Özellikle mitokondriler, endoplazmik retikulum ve çekirdek membranında yer alan serbest radikaller aracılığı ile oluşan oksidatif stres, Parkinson hastalığında nörodejenerasyon oluşumu ve ilerleme sürecinde önemli rol oynamaktadır. Mitokondrilerde oksidatif fosforilasyon ile moleküler oksijenin suya redüksiyonu sırasında reaktif oksijen türleri olarak tanımlanan süperoksid radikal (O_2^-), hidrojenperoksid (H_2O_2) ve hidroksil radikali (HO^\cdot) oluşur. Serbest radikal üretimi ile artmış kalsiyum akımı, nitrojenmonooksit sentaz (NOS) aktivasyonu, amiloidbeta-peptid ve enzimlerde yaşa bağlı fonksiyon kaybı gerçekleşir. Ayrıca, *in vitro* veriler, glutamat stimülasyonu ile ilişkili nöronların oksijen radikalleri oluşumu ile etkileştiklerini göstermiştir. Bu radikaller, tekrar hem glutamat salınımına hem de geri alım inhibisyonuna yol açarlar; böylece kısır döngü gerçekleşir (Herdegen 1997).

Nöronların membran yüzeyi sitoplazma hacmine oranlandığında, bu oranın membran yüzeyi lehine arttığı bilinmektedir. Beyin hücre zarları büyük oranda doymamış yağ asitlerinden oluşur, bunlar lipid peroksidasyon reaksiyonlarında serbest radikallerin başlıca substratlarıdır. Bununla beraber beyinin savunma mekanizması oldukça zayıftır, hemen hemen hiç katalaz içermez, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimleri ile glutatyon ve E vitamini düzeyleri sınırlıdır (Halliwell ve ark. 1985, Evans 1993).

Parkinson ve oksidatif stres bağlantısının anlaşılmasından sonra, antioksidanların medikal tedavide kullanımının önemi daha da artmıştır. Güçlü antioksidanlar, dopa toksisitesinin etkili blokerleridir (Voigtlander ve ark. 1998). Dopaminerjik nöronlarda monoaminoksidaz (MAO) aracılığı ile dopaminin oksidatif deaminasyonu ve otooksidasyonu ile hidrojen peroksit ve diğer oksijen radikalleri oluşur. Tersine MAO- inhibitörleri, radikal üretimini inhibe edebilirler (Jenner 2003).

Serbest oksijen radikalleri, ateroskleroz, diyabet, epilepsi, inflamatuvar hastalıklar ve kanser gibi pek çok hastalığın patogeneğinde rol oynamaktadır (Sudha ve ark. 2001, Celikler ve ark. 2009). Nigrostriatal yolda oksidatif hasar ve mitokondrial kompleks I'de kısmi eksikliklerin, Parkinson hastalığında dopaminerjik nöronların seçici kaybına sebep olduğu öne sürülmüştür (Jenner 2003, Cornetta ve ark. 2009).

DA'nın oksidatif metabolizması kinon, semikinon ve diğere reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturmaktadır (Mytilineou ve ark. 2003). Daha da önemlisi, DA'nın enzimatik oksidasyonu, hidrojen peroksit formasyonuna öncülük eden monoamin oksidaz tarafından katalizlenir, substantia nigra (SN) pars kompakta'da Fe^{+2} yüksek seviyesi bulunduğunda, H_2O_2 oldukça reaktif ve sitotoksik hidroksil radikali ($\cdot OH$) oluşturabilir. Nöronlar H_2O_2 tarafından direkt olarak ya da demir iyonlarının varlığında oluşturulan hidroksil radikalleri tarafından indirek olarak hasara uğrayabilirler. Sonuç olarak, Parkinson hastalığında periferik oksidasyon durumu L-Dopa tedavisi tarafından etkilenmiş olabilir (Cornetta ve ark. 2009).

Reaktif oksijen türlerinin (hidrojen peroksit, süperoksit, ve hidroksil radikali) oluşumu ve dopaminden ortaya çıkan dopamin semikinon serbest radikallerinin nigrostriatal dopaminerjik nöronlarda hücre ve hücre içi membranlara zarar verebileceği ve böylece Parkinson hastalığı karakteristiği olan bu nöronların azalmasının artışına neden olabileceği rapor edilmiştir (Perry ve ark. 1984, Muller 2011).

Dopamin ya monoaminoksidaz veya hidrojen peroksit oluşumu ile sonuçlanan otooksidasyon yolu ile okside olur. H_2O_2 , ferroz iyonların varlığında hidroksil radikaller oluşturarak nöronu direkt veya indirek yolla hasara uğratar. SN nöronlarında yer alan nöromelanin, bölgesel spesifik birikim potansiyeline sahip olup, bu yolla demir indirgenmesi, demir-indüklenmiş lipid peroksidasyonuna ve hücre ölümüne neden olur. H_2O_2 , redükte glutatyon (GSH) ile detoksifiye olur. Dolayısıyla dopamin turnover hızının artması veya GSH eksikliği oksidatif strese yol açar (Youdim ve ark. 1993, 1997).

Parkinson hastalığından dolayı ölen insanlar, otopsi edildiklerinde substantia nigra bölgesinde, indirgenmiş glutatyon (GSH) ve buna ait disülfid maddelerinin beyinlerinin diğer kısımlarına göre daha düşük seviyelerde olduğu ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Perry ve ark. 1982, 1984). GSH serbest radikallerin ortadan kaldırılması için bir anahtar maddedir. Substantia nigra bölgesindeki GSH eksikliği, bu özel nöronların hasar nedenini açıklayabilir (Perry ve ark. 1982). Özet olarak, serbest radikaller SN nöronlarının hasarına neden olan en önemli ajanlardır ve bu yolla Parkinson hastalığı ortaya çıkmaktadır.

2.1.5. Epidemiyoloji ve genetik

Parkinson hastalığı tüm etnik gruplarda görülmekle birlikte, bu hastalığın popülasyon içinde erkeklerde daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (Zhang ve ark. 1993). Prevelansı (olgu sayısı) 65-90 yaşları arasında artmaktadır. Tüm popülasyonun % 0.3'ünü etkilemekle beraber, bu oran 65 yaşın üzerinde %3'e yükselmektedir. Hastaların % 5-10'unda semptomlar 40 yaşın altında ortaya çıkmaktadır (Kayaalp 2005).

Hastalık ilk kez endüstriyel devrim zamanında tanımlanmış olsa da, antik Hint literatüründe (4500-1000 b.c.) tremor ve akineziyi tanımlayan açıklamalara rastlanmıştır (Manyam 1990). MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)'nin nigral hücre ölümüne yol açtığına anlaşılması çevresel faktörlerin hastalık etyopatogenezinde önemli bir rolü olduğu verisini sağlamıştır. Pek çok çalışma, diyetin hastalık patogenezindeki yerini belirlemiştir. Bunların çoğu yetersiz antioksidan alımı üzerine kuruludur. Çalışmalarda birbirinden farklı sonuçlar bulunmakla beraber, yapılan bir araştırmada Parkinson hastalarının E vitamini alımının kontrollerle karşılaştırıldığında daha düşük olduğu saptanmıştır (Rijk 1997).

Primer Parkinson Hastalığının idiyopatik (klasik) şeklinden başka seyrek görülen ailesel formları da vardır. Son yıllarda alfa-sinüklein ve parkin proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonların ailesel Parkinson hastalığının ortaya çıkmasına yol açtığı saptanmıştır. İlginç olarak alfa-sinüklein ve parkin, ailesel olmayan idiyopatik Parkinson hastalarının beyinlerinde bu hastalık için patognomonik (tanı koydurucu özel

belirti) bir bulgu olan Lewy cisimciklerinin içinde ubikuitin ile birlikte saptanmıştır. Parkin'in bir E3 ubikuitin ligaz olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular idiyopatik Parkinson hastalığında da ubikuitin-proteozom yolunun bozuk olabileceği varsayımına yol açmıştır (Kayaalp 2005).

Genetik faktörlerin Parkinson hastalığında önemli rolü olduğuna dair giderek artan deliller mevcuttur. Monozigotik ikizler üzerinde yapılan bir çalışmada, ikiz çiftlerinin her birinde hastalığa yakalanma zamanlarında bir uyum olduğunu ve 50 yaşın altında genetik faktörlerin etkisinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Tanner 1997)

Epidemiyolojik çalışmalar, yaş faktöründen başka, artan hastalık riskini işaret eden en önemli göstergenin aile öyküsü olduğunu ortaya koymuştur (Semchuk ve ark. 1993). Ancak, bazı ailelerde, ortak çevresel etkilenim faktörleri olduğu da göz ardı edilmemelidir.

2.1.6. Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlar

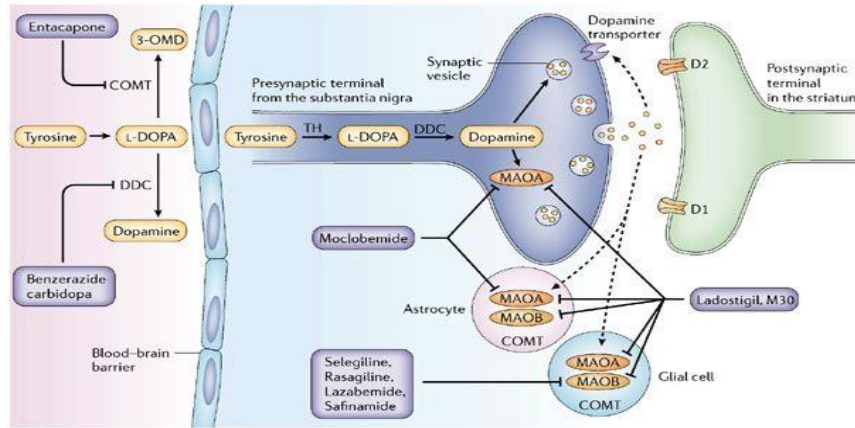
Anti Parkinson ilaçlar temel etki mekanizmalarına göre 3 gruba ayrılırlar:

- (i) Dopaminerjik etkinliği arttıran ilaçlar (Levodopa/Karbidopa, Bromokriptin vs)
- (ii) Santral etkili antikolinergik ilaçlar (Biperiden, Triheksifenidil vs.)
- (iii) Diğer ilaçlar (Trisiklik antidepresanlar, Alfa tokoferol)

2.2. Levodopa

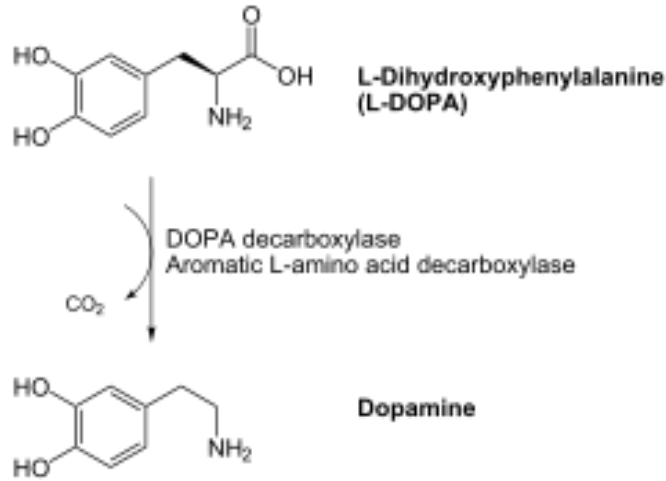
Levodopa (L-3,4-dihidroksifenilalanin, L-Dopa) Parkinson hastalığındaki ölüm sonrası incelemelerde bazal gangliyonlardaki dopamin düzeyinin düşüklüğünün saptanması üzerine 1960'ların başında beyinde dopamin düzeyini yükseltmek amacıyla tedaviye sokulmuş bir ilaçtır (Cotzias ve ark. 1969, Fahn 2008).

L-Dopa katekolamin sentez zincirinde dopaminin prekürsörüdür. Levodopa iki enzimatik, dopa-dekarboksilaz (DDC) ve katekol-O-metiltransferaz (COMT) yol ile kan-beyin hücre duvarını geçebilir (Şekil 2.2.1). Buna rağmen, normalden hızlı çalışan metabolizma nedeniyle verilen dozun en fazla % 1'i merkezi sinir sistemine ulaşabilir (Koller ve ark. 1998).



Şekil 2.2.1. L-Dopa'nın enzimler yardımı ile dopamine dönüştürülmesi (<http://www.nature.com>)

Dopamin (DA) dolaşımdan beyne nüfuz edemediği halde, Levodopa kan-beyin engelini aşar ve bazal gangliyonlardaki dopaminerjik sinir uçları tarafından alınır. Orada aromatik L-aminoasit dekarboksilaz (dopa-dekarboksilaz) enzimi tarafından dopamine çevrilir (Şekil 2.2.2). Bu enzim başta bağırsak çeperi, karaciğer, böbrek dokuları ve dopaminerjik, noradrenerjik ve serotonerjik sinir uçları olmak üzere vücutta oldukça yaygın bulunduğundan, Levodopa dokularda çabuk dekarboksile olarak çeşitli yerlerde dopamine dönüşür (Kayaalp 2005).



Şekil 2.2.2. L-Dopa'dan dopamin biyosentezi (<http://en.wikipedia.org>)

Ek olarak, L-Dopa periferik dönüşümü ile dolaşıma salınan dopamin, özellikle mide bulantısı ve hipotansiyon gibi istenmeyen yan etkilere de neden olabilir. L-Dopa bu nedenlerden dolayı, tedavide her zaman periferik DDC inhibitörü (Bensarizid ve Karbidopa) ile birlikte uygulanmaktadır (Bugamelli ve ark. 2011). Ne yazık ki, L-Dopa/DDC inhibitörünün kronik uygulamasının etkinliği zamanla azalır ve hastaların çoğunda istikrarsız (dengesiz) tepkiler ve diskinezi gelişir (Stocchi 2006).

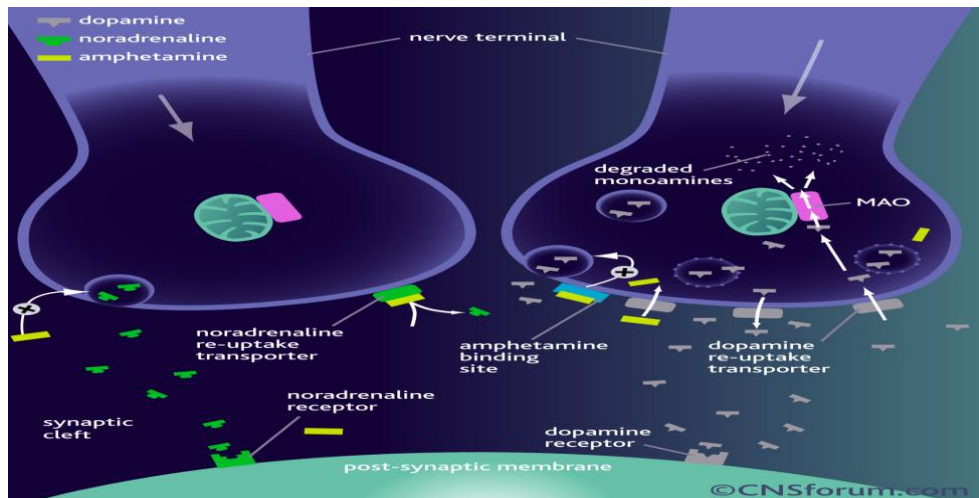
L-Dopa oto-oksidasyon süreçlerine 6-hidroksidopamin (6-OHDA), serbest radikaller ve kinonlar gibi toksik ürünlerin oluşumuna eğilimi olan katekolaminerjik nöronlar için spesifik bir nörotoksindir (Hefti ve ark. 1981).

Parkinson hastalarında azalmış dopaminin yeniden artması için en yaygın kullanılan tedavi L-Dopa'dır. L-Dopa tedavisi belirgin bir şekilde semptomları iyileştirmesine ve Parkinson hastalarının hayatta kalma süresini uzatmasına rağmen, bu ilacın uzun vadeli kullanımının sonucu yıpranma, on-off fenomenler, diskinezi (istemli hareketlerin bozulması) ve ruhsal (zihinsel) semptomlar gibi azaltılmış etkinlik ve artmış ters reaksiyonlar meydana gelmektedir. Böylelikle, Parkinson hastalığının kronik evresindeki hastaların yaşam kalitesini belirgin olarak düşürmektedir (Ogawa ve ark. 1994).

L-Dopa, Parkinson hastalığı semptomlarını iyileştirmek için gerekli teröpatik bir ilaç olmasına rağmen, doz ve uygulama yolu dikkatlice seçilmelidir. L-Dopa dozunu arttırmak, beyinde DA'yı artırırken serbest radikal oluşumuna da neden olur. Bu nedenle, Parkinson hastalarında etkili bir tedavi için diğer antiparkinson ilaçlarının eş zamanlı kullanımı ile L-Dopa dozu minimize edilmelidir (Ogawa ve ark 1994).

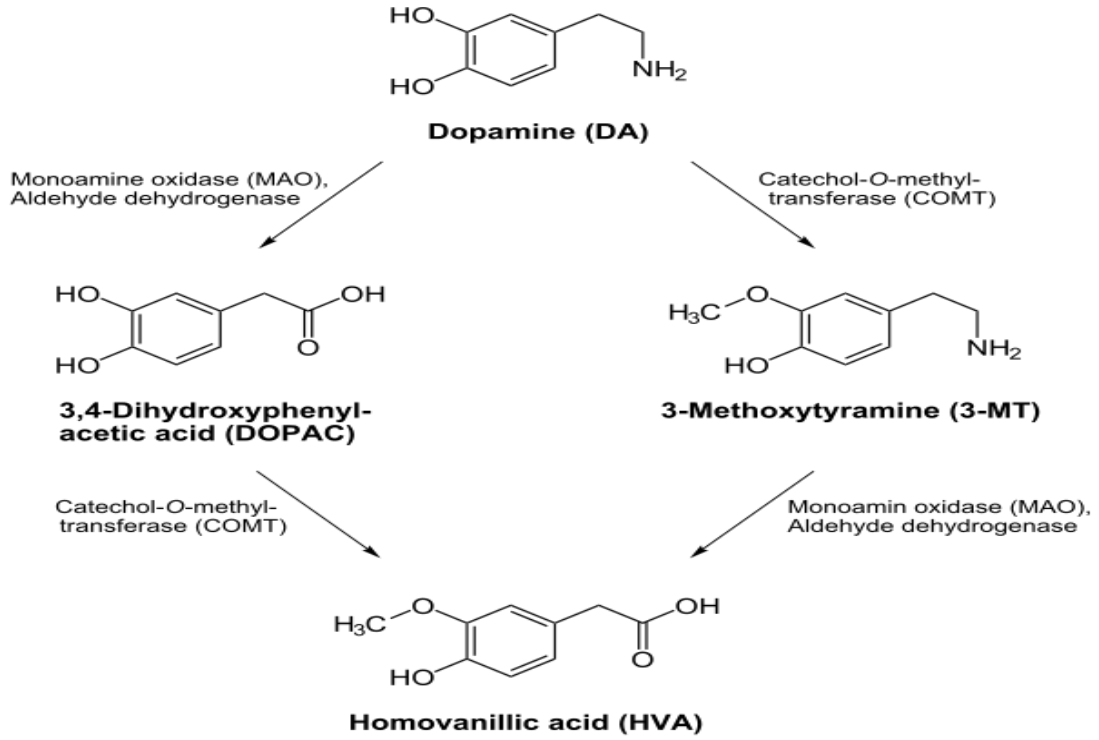
2.2.1. Levodopa farmakokinetiği

Levodopa ağız yolu ile alınır. Mide-barsak kanalından tam ve hızlı bir şekilde absorbe edilir. Levodopa barsak çeperi ve karaciğerden geçişi sırasında dopamine dönüştürülür ve sistemik dolaşıma geçebilen miktarın büyük bir kısmı periferdeki noradrenerjik (sempatik) sinir uçları tarafından alınır (Şekil 2.2.1.1). Bundan dolayı uygulanan dozun ancak çok az bir kısmı (%1-3) kan-beyin engelini aşır beyne nüfuz etmek ve santral etki yapmak olanağını bulur. Dopa-dekarboksilaz inhibitörleri (Bensarizid ve Karbidopa) ile birlikte verildiğinde beyine geçen fraksiyon artar (%5-10) ve terapötik etkinliği daha çabuk başlar. Levodopa'dan noradrenerjik sinir uçlarında oluşan dopamin'in dopamin- β -hidroksilaz tarafından noradrenalin'e dönüştürülmesi yavaş olur; fazla Levodopa verildiğinde dopamin bu sinir uçlarında birikir ve noradrenalin veziküllerinden bu amini kovar. Bu nedenle, Levodopa verildiğinde dopaminerjik sinir uçlarında dopamin miktarı arttığı halde noradrenerjik uçlarda noradrenalin düzeyi artmaz, aksine azalabilir. Bu durum periferde sempatik adrenerjik (noradrenerjik) aşırımı zayıflatır (Kayaalp 2005).



Şekil 2.2.1.1. Dopaminerjik ve noradrenerjik sinir uçları (<http://www.psikofarma.info>)

Dopamin, monoamin oksidaz (MAO) ve katekol-O-metil transferaz (COMT) enzimlerinin etkisi altında, başta Homovanilik asit (HVA, 3-metoksi-4-hidroksifenilasetik asit) olmak üzere çeşitli fenilkarboksilik asit türevlerine dönüşür (Şekil 2.2.1.2). HVA, idrardaki Levodopa metabolitlerinin %40'ını teşkil eder. Az miktarda Vanililmandelik asit (VMA)'de meydana gelir. Levodopanin vücutta biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitlerin sayısı 30 kadardır. Bunlardan bir kısmı etkin bileşiklerdir ve toksik tesirlerin bazılarında sorumlu olabilirler. Levodopa'nın metabolitleri özellikle bazik ortamda idrarda kırmızı-kahverengi renklenme yaparlar.



Şekil 2.2.1.2. Dopaminin yıkımı (<http://en.wikipedia.org>)

2.2.2. Levodopanin tedavide kullanılışı

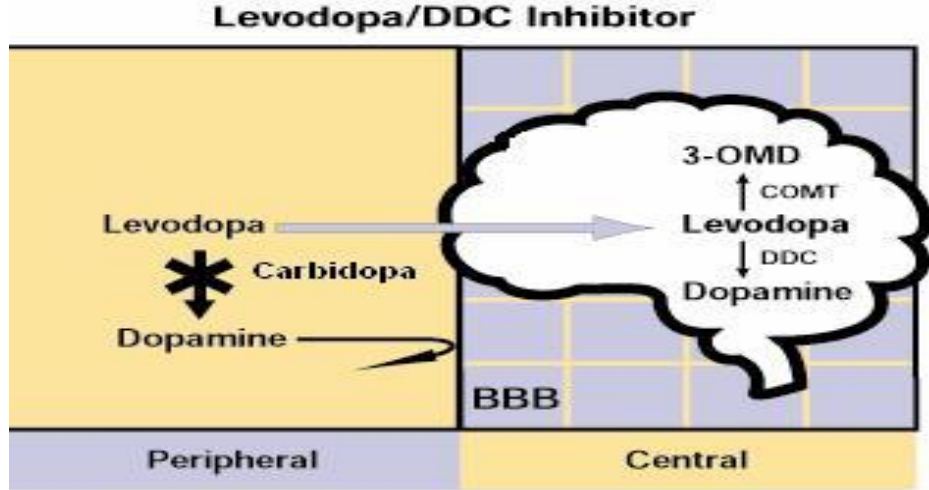
Levodopa, Parkinson hastalığında isteğe bağlı hareketlerde mevcut kısıtlılığı (akineziyi ve bradikineziyi) ve çizgili kas rijiditesini belirgin şekilde düzeltir; hastanın mobilitesini artırır ve onu günlük işlerini yapabilir duruma getirir. Kişiler arasında ilacın terapötik etkisine duyarlılık yönünden büyük fark vardır ve ilacın dozu hastanın gereksinimlerine

göre bireyselleştirilmelidir. Levodopanin yan tesirleri nedeni ile, doz hastalık belirtilerini tamamıyla düzeltecek düzeye kadar genellikle çıkarılamaz; bundan dolayı Levodopa ile birlikte, ona yardımcı olarak bromokriptin ve benzeri ilaçları, selejilini veya antikolinerjik ilaçları vermek gerekebilir. İlaça bağlı istem dışı hareketlerin (diskinezi) ortaya çıkması dozun daha arttırılmaması gerektiğini haber veren iyi bir göstergedir. Diskinezi tedavinin ileri döneminde ortaya çıkar (Kayaalp 2005).

Levodopa ile yıllarca devamlı tedavi gören hastalarda, tedavinin ilk iki yılında ilacın etkinliğinin güçlü olduğunu, daha sonra terapötik etkinliğin giderek azaldığını ve 3-5 yıllık uygulama sonunda kaybolduğunu ve hastalık belirtilerinin geri döndüğü bildirilmektedir. Bu durum esas olarak, progresif nitelikte olan hastalığın altında yatan patolojik bozukluğun (Dopaminerjik nöron yıkımının) zamanla ilerlemesine ve nigrostriatal nöronların tümünün veya tümüne yakın bir kısmının kaybolmasına bağlıdır. Striatumda Dopaminerjik sinir uçlarının tümüyle kaybolması, Levodopanin dopamine dönüşmesini de olanaksız hale getirir ve tedavide bir kısır döngü içine girilir (Kayaalp 2005).

2.2.3. Kombine Levodopa ilaçları

Levodopa'nın periferde yıkılmasını azaltmak ve böylece Santral Sinir Sistemine (SSS)'ne daha yüksek oranda girmesini sağlamak için, kan beyin engelini aşamayan ve periferik adrenerjik sinir uçları ile karaciğer ve diğer yerlerde bulunan aromatik L-amino asid dekarboksilaz (dopa-dekarboksilaz) enzimini inhibe eden Karbidopa (K) (alfa-metildopa hidrazin, Şekil 2.2.3.1) ve Benserizid adlı ilaçlar Levodopa ile birlikte kombine ilaç halinde kullanılmaktadır. Böyle bir kombinasyon, Levodopa'nın terapötik etkisinin birkaç gün içinde ve olağan dozunun 1/4'ünü kullanarak oluşturulmasına ve ayrıca periferik yan tesirlerinin ortadan kalkmasına olanak verir. Böylece dekarboksilaz inhibitörü ile birlikte kullanıldığında Levodopa dozu %75 oranında azaltılabilir (Kayaalp 2005).



Şekil 2.2.3.1. L-Dopa'nın Karbidopa varlığında kan-beyin engelini geçmesi (<http://students.cis.uab.edu>)

Levodopa'nın Karbidopa ile olan kombinasyonuna ko-kareldopa adı verilir. Türkiye'de pazarlanan ilaçlar 10 kısım Levodopa ve 1 kısım Karbidopa içerir. Periferik dopa-dekarboksilazın tam bir inhibisyonu için gereken günlük Karbidopa dozu 70-100 mg'dır.

2.2.4. Levodopanın yan tesirleri

Levodopa yeterli dozda kullanıldığında yan tesirleri fazla olan bir ilaçtır. Yan tesirlerin bir kısmı ilacın periferik etkilerine, diğerleri ise santral etkilerine bağlıdır. Başlıca yan tesirleri;

- (i) Gastrointestinal bozukluk
- (ii) Kardiyovasküler yan tesirler
- (iii) İstem dışı anormal hareketler (diskineziler)
- (iv) Yanıttaki dalgalanmalar (flüktüasyon)
- (v) Psişik ve psikiyatrik tesirler
- (vi) Diğer yan tesirler (Kontrindikasyonlar, Etkileşmeler)

2.3. Üridin

Üridin (Ü), bir pirimidin nükleozididir. Nükleik asitlerin, fosfolipidlerin yapısında bulunur ve glikojen sentezi ve nöronları koruma gibi işlevlerde yer alır. Üridin'in oksidatif stresin yol açtığı ROS'ların miktarını azaltarak, hücre toksisitesi üzerine olumlu bir etkisi gösterilmiş olup, deneysel Parkinson modelinde koruyucu bir etkisi ve viral kaynaklı mitokondrial DNA hasarlarının onarılması gibi etkileri rapor edilmektedir (Choi ve ark. 2006).

Yapılan çalışmalarda Üridin öncülü olan PN401'in Alzheimer hastalığı, hipoksi ve oksidatif strese yararlı etkileri olduğu ortaya konulmuştur. Sporadik Alzheimer hastalarının fibroblastlarında Üridin, doza bağımlı olarak hücre toksisitesine karşı koruyucudur. Ayrıca Üridin'in normal insan nöronal progenitör (NHNP) hücrelerinde oksidatif stresin indüklediği hücre toksisitesini azalttığı ve H₂O₂'den dolayı oluşan ROS oluşumlarının azalmasında etkili olduğu bildirilmiştir. Mortalite ve serebrokortikal apoptozise neden olduğu bilinen azid infüzyonunun ardından Üridin öncülü olan PN401 uygulaması ile bu komplikasyonlarda azalma meydana geldiği de yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır (Saydoff ve ark. 2004).

Üridin çeşitli beyin fonksiyonlarında önemli etkiler ortaya koymaktadır. Bunlardan bir tanesi nöronal membran fosfolipid sentezidir. Pirimidin nükleosidi olan Üridin, kan beyin bariyerini kolayca geçer ve beyin hücrelerine alınır. Orada Üridin-sitidin kinaz tarafından fosforillenerek, daha sonra CTP sentetaz tarafından CTP'ye dönüştürülecek olan UTP'ye çevrilir. CTP fosfolipid sentezinde hız-sınırlayıcı prekürsördür. CTP fosfokolin ile birlikte CDP-Kolin oluşturur ve nöronal membranda ana fosfolipid olan fosfotidilkolin (PC) oluşumunda görev alırlar (Sakamoto ve ark. 2007).

Üridin, sinir büyüme faktörü ile muamele edilen PC12 hücrelerinde nörit uzamasını teşvik etmiştir (Sakamoto ve ark. 2007).

Yetişkin gerbillerde yapılmış bir çalışmada, Üridin DHA (dokosaheksaenoik asit) ile birlikte verildiğinde membran fosfolipid ve sinaptik proteinlerini arttırdığı

gösterilmiştir. Bu sonuçlar, Üridin'in, DHA gibi nöronal ya da sinaptik membranlarda fosfolipid sentezini arttırabileceğini göstermektedir (Sakamoto ve ark. 2007).

Üridin'in beyinde dahil olduğu diğer bir yol da glikojen sentezidir. Beyinde glikojen sentezi meydana gelebilmektedir. Buna kanıt olarak nöronlarda ve astrositlerde glikojen sentaz enziminin ekspresyonudur (Cansev 2006).

Üridin'in beyin lipid (ör., fosfolipid) ve karbonhidrat (ör., glikojen) metabolizmalarında tutulumunun, Üridin nükleotidlerinin olası nörotransmitter rollerinin yanı sıra Üridin'in GABAerjik ve dopaminerjik iletim ile etkileşimi olduğu ileri sürülmektedir (Cansev 2006).

Üridin'in mitokondrial DNA'da viral kaynaklı meydana gelen hasarların onarılmasında da rol oynadığı gösterilmiştir (Venhoff ve ark. 2010). Bu bulgulara ilave olarak, bir Üridin kaynağı olan Üridin monofosfat (UMP) uygulamasının 6-OHDA ile striatum lezyonu yapılarak oluşturulan deneysel Parkinson modelinde koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (Cansev ve ark. 2008).

2.4. Mutasyonlar ve *in vivo* Genotoksisite Test Sistemleri

Çevremizde ilaçlar, pestisitler, besin katkı maddeleri gibi binlerce kimyasal madde bulunmakta ve bunlara sürekli yenileri katılmaktadır. İnsanlar bu maddelere bilerek (ilaç kullanımı, kozmetikler) ya da bilmeden (pestisitler) maruz kalmaktadır (IPCS 1985, Waters ve ark. 1999).

DNA'da meydana gelen hasarlar kromozom düzeyinde (kromozomal aberasyon veya mutasyon) veya gen düzeyinde (gen veya nokta mutasyonu) mutasyonlar olarak ortaya çıkmaktadır. Mutajenik kimyasallar, DNA ile interaksiyona girerek yapısında değişiklikler oluşturabilir. Bu interaksiyon sonucunda DNA'daki bazlar eksilerek ya da artarak veya bir bazın yerine diğerinin gelmesiyle genetik informasyonun değişimine sebep olabilirler. Bir genin nükleotid dizisinde ortaya çıkan değişimler ise, hatalı mRNA oluşumuna bağlı olarak, protein sentezinin ya tamamen engellenmesi ya da

değişmiş yapıda bir proteinin sentezi ile sonuçlanır. Nokta mutasyonları tek bir nükleotidi etkileyen mutasyonlardır. Bu tip mutasyonlar nötral (triplet kodunun kodladığı aminoasit değişmez veya benzer bir aminoasit gelir), missense (normalde kodlanan aminoasit yerine yapıya başka bir aminoasidin girmesine sebep olur) ve nonsense (genetik kodda zamansız biri stop kodunun oluşumu ile protein zincirinin vaktinden önce sonlanmasına sebep olur) mutasyonlar olarak bilinir (IPCS 1985).

Organizmadaki normal aerobik metabolizma sonucunda meydana gelen süperoksid radikalleri, hidrojen peroksit ve hidrosil radikalleri gibi reaktif oksijen türevleri DNA'da oksidatif hasar meydana getirebilirler. Böyle bir hasar sonucunda oluşan ürünler yanlış baz eşleşmelerine sebep olabilirler (Collins ve ark. 1996).

Kimyasalların mutajen etkilerinin saptanmasında değişik organizmalarda geliştirilen farklı test sistemleri kullanılabilir. Test organizması olarak bakterilerin kullanılması oldukça yaygındır (Waters ve ark. 1999). Bu sistem ilk olarak 1975'te Ames ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır ve bu yüzden Ames testi olarak bilinmektedir. Yüksek organizmaların aksine prokaryotlar büyük çoğunlukla tek bir halkasal DNA molekülü içerir ve bu sayede hücre duvarından geçen bileşik, DNA'ya kolayca tesir edebilir. Ancak bazı test kimyasalları kendileri direkt etki etmedikleri halde, metabolize olduktan sonraki ürünleri mutajen veya karsinojen etki gösterebilirler. Bakterilerde kimyasalların detoksifikasyonunu sağlayan enzim sistemleri bulunmadığından, bu test sisteminde ve diğer *in vitro* hücre kültürlerinde S9 fraksiyonu denilen bir enzim karışımı kullanılmaktadır. Bu amaçla genellikle sıçanlar kullanılır ve sıçanlara Aroclor 1254 veya fenobarbital ve 5,6-benzoflavon gibi karaciğer enzimlerini indükleyici kimyasallar enjekte edilir. Karaciğer parçalanıp yüksek hızda santrifüj edildiğinde üstte kalan sıvıda metabolik enzimler bulunur ve bunlar 9000 g'de süpernatantta bulduklarından bu karışıma S9 adı verilir (IPCS 1985).

Eukaryotik bir organizma olan *Drosophila melanogaster* (sirke sineği) ile gerçekleştirilen testler de genotoksisite testleri içinde önemli bir yere sahiptir (Brusick 1987). *Drosophila* kısa bir yaşam döngüsüne sahip ve biyoaktivasyondan sorumlu enzim sistemleri memelilerinkine benzeyen bir organizma olduğu için tercih

edilmektedir. Nokta (gen) mutasyonları (cinsiyete bağlı resesif letal test, zeste somatik göz mutasyon testi ve kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi gibi) ile kromozom hasarlarının (bölünemmeden kaynaklanan aneuploidi belirleme ve kısmi kromozom kaybı testleri ile yine somatik mutasyon ve rekombinasyon testi) belirlenmesi için *Drosophila*'da değişik genetik özellikte hatlar oluşturulmuştur (Brusick 1987, IPCS 1985).

In vitro memeli kültürlerinde yapılan gen mutasyon testlerinden en yaygın olanları fare L51787/TK (timidin kinaz gen lokusu) testi ile Çin hamsteri ovaryum hücreleri ile (CHO) Çin hamsteri fibroblast (V79) hücrelerinde Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase (HGPRT) gen lokusu testleridir. Bu testlerle ileri gen mutasyonları ve geniş delesyonlar saptanabilmektedir (Auletta ve ark. 1993).

Genetik toksisite çalışmalarında kullanılan test sistemlerinin her biri farklı genetik hasarları tespit etmek amacıyla geliştirilmiştir. Gen mutasyonlarının taranmasında bakteriyel test sistemleri, eukaryotik maya ve *in vitro* memeli hücre kültürleri ile *Drosophila* test sistemlerinin kullanılması önerilirken, kromozom aberasyonlarının belirlenmesinde *in vitro* sitogenetik testler, *in vivo* rodent kemik iliği kromozom aberasyon ve Mikronükleus Testleri, dominant letal test ve germ hücre kromozom aberasyon testlerinden yararlanılmaktadır (Brusick 1987).

Birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışma, çift zincir kırıklarının, S fazına etkili kimyasallar veya iyonize radyasyon ile oluşabildiğini göstermiştir (Tucker ve ark. 1996). Anafazda gecikmiş kromozomlar veya asentrik kromozom parçaları mikronükleus (MN) oluşumuna sebep olabilir ve bunlar her hücrede gözlenmekle beraber eritrositler gibi çekirdeksiz hücrelerde daha kolay tanımlanırlar (IPCS 1985). MN oluşumunun temelini DNA hasarı oluşturmaktadır. Organizmanın çeşitli mutajenik, klastojenik ve karsinojenik ajanlara maruz kalması sonucunda DNA'da harabiyet meydana gelmektedir. Genetik hasar ölçümünde, MN testinin toksikolojide, diyetle, ilaç sanayide, kanser riski oluşumu şüphesinde, radyoterapide önemi anlaşılmıştır. DNA hasar oranının *in vivo* ve *in vitro* olarak belirlenmesinde en ekonomik ve pratik tekniklerden biri haline gelmiştir (Fenech 2010). MN tekniği, insan periferik kan

lenfositlerinde, kemik iliğinde ve yanak mukoza hücresinde kimyasal ajanların genotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Tekniğin basit oluşu, kısa zamanda sonuca ulaşılması ve DNA harabiyeti konusunda güvenilir bilgi vermesi tekniği önemli hale getirmiştir (Fenech 2000).

Yaygın bir görüşe göre büyük mikronükleuslar iğ ipliği hasarından, daha küçük olanlar ise kromozom parçalarından oluşmaktadır. Ancak her iki durumda da kesin sınırlama yapmak çok doğru olmadığından bu tip mikronükleus sınıflamasında farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan biri antikinotokor antibody yöntemidir (Tucker ve ark. 1996). Bu yöntemde antikinotokor antikoru iğ ipliklerinin kromozomlara tutunduğu bölgeye bağlanarak mikronükleuslarda sentromer varlığı için bir marker oluşturmaktadır. Bu yöntemin yanı sıra C bantlama (sentromer bantlama), sentromer problemleri kullanarak Floresans In Situ Hibridizasyon (FISH) tekniği ile boyama da mikronükleusların sınıflamasında kullanılmaktadır (Verschaeve ve ark. 1988, Natarajan ve ark. 1996).

Hemen hemen tüm kısa zamanlı test prosedürleri, kromozom hasarlarının, gen mutasyonlarının veya DNA hasarlarının gösterilmesine dayanmaktadır. *In vitro* kısa zamanlı testler bakteriler ve mayalar ile kültürdeki hayvan hücrelerine test kimyasalının kısa süreli uygulamaları ile gerçekleşir. *In vitro* sitogenetik testlerde metabolik süreçler ve salgı sistemleri dikkate alınmamıştır. *In vivo* da ise bitkiler ve deney hayvanlarının birkaç saat ya da en fazla birkaç hafta süre ile test kimyasalı ile muamelesi söz konusudur (Adler 1985).

Hayvanların muamele edilmesi ve doku örneklerinin alınması sonucunda inceleme değişik şekillerde yapılabilir: Kromozomal aberasyonların metafazda incelenmesi ve mikronükleus frekansının tespiti gibi. Bu iki teknik genelde kemik iliğine uygulanır, fakat dalak, karaciğer, embriyo ve germ hücrelerine de uygulanabilirler (Adler 1985, IPCS 1985). Bu tür testlerde en sık fare, sıçan ve Çin hamsteri gibi deney hayvanları kullanılmakla birlikte daha özel amaçlar için Golden hamster, tavşan, evcil hayvanlar ve primatlar da kullanılabilir (Adler 1985).

Komet Testi çeşitli genotoksik etmenlerin neden olduğu DNA hasarını *in vitro* ve *in vivo* koşullarda ölçmek için yaygın olarak kullanılan hassas bir genotoksisite testidir (Olive 1999, Tice ve ark. 2000) ve düşük düzey hasarın olduğu normal insan hücrelerinde de çalışma için uygundur (Gedik ve ark. 2005). Singh ve ark. (1988) tarafından alkali koşullarda uygulanarak DNA çift sarmalının açılması için sağlanmış ve böylece de hem çift hem de tek iplik DNA kırıklarının belirlenmesine olanak sağlamışlardır. Diğer genotoksisite tayin yöntemleri ile karşılaştırıldığında, düşük düzeylerde DNA hasarının saptanabilmesindeki yüksek hassasiyeti, tek hücre düzeyinde çalışılabilir olması, kısa sürede ve kolay uygulanabilirliği ve düşük maliyeti Komet yönteminin avantajlarından biridir. Alkali Komet tekniği ile tek zincir kırıklarının tespiti mümkün olduğu gibi nötral Komet tekniği ile de çift zincir kırıklarının tespiti mümkün olmaktadır. (Tice ve ark. 2000).

Parkinson hastalığının patojenetik mekanizmasının merkezi sinir sistem hücrelerinde çalışılmasındaki zorluktan dolayı, bunun yerine periferik kan lenfositleri uygun bir çalışma modeli olarak kullanılmaktadır. Parkinson hastalarında periferik kan lenfositlerinin oksidatif ve apoptotik hasara maruz kalmış olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Blandini ve ark. 2004, Cornetta ve ark. 2009).

Parkinson hastalığında, metallerin olası tutulumu, Parkinson hastalarının substantia nigra'da serbest demir artışlarının bulunması ve mangan ve bakıra mesleki maruziyet bulgularıyla, Parkinson hastalığı için risk faktörleri oldukları düşünülmektedir. Mangan ve çinkonun her ikisinin dopamin oksidasyonu için çok iyi katalizör oldukları gösterilmiştir fakat daha az veri, metallerin memeli hücrelerinde dopamin toksisitesini arttırdığını ileri sürmektedir (Jenner 1991, Youdim ve ark. 1993, Gorell ve ark. 1997, Snyder ve ark. 1998).

Yakın zamanlı bazı çalışmalar L-Dopa'nın *in vivo* nöronal hücrelere toksik olabileceğini öne sürmektedir (Mena ve ark. 1992, Walkinshaw ve ark. 1995).

Bazı çalışmalar, L-Dopa'nın PH'nin nöronal ilerlemesini arttırdığını işaret ederken (Adams ve ark. 1991, Friedman ve ark. 1991, Yurek ve ark. 1991), bazıları da PH'nin

patolojisinin ilerlemesinde bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir (Scigliano ve ark. 1990, Cedarbaum ve ark. 1991). Bu çelişkili bulgular, kronik L-Dopa uygulamasının etkilerinin hastaya göre değişebileceğini öne sürmektedir (Ogawa ve ark. 1994).

Parkinson hastalığının bilinmeyen ana sebebini kapsayan ek faktörler, ekzojen Levodopa ile sürdürülen bombardımana hayatta kalan nigrostriatal nöronları daha savunmasız yapabilir (Ziv ve ark. 1997).

Biyomoleküller, özellikle DNA, reaktif oksijen türleri tarafından hasara uğrayabilir ve hücre ölümüne yol açar (Cornetta ve ark. 2009). Ayrıca Snyder ve ark. (1998), aktif oksijen türlerinin oluşumunun kromozom kırıklarını da indüklediğini bildirmişlerdir.

L-Dopa otooksidasyonu genotoksisite ve apoptotik hücre ölümüne sebep olan reaktif oksijen türlerinin oluşturulmasına sebep olabilmektedir (Snyder ve ark. 1998). Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, uzun dönem L-Dopa maruziyeti dopaminerjik nöronal hücre ölümünü arttırabilmekte ve hastalık gelişimini hızlandırmaktadır. Çünkü, L-Dopa serbest radikallerin oluşumunu tetikler ve mitokondrial enzimlerin aktivitesini engeller (Shin ve ark. 2009).

L-Dopa'nın kronik alımı beyinde dopaminerjik ya da noradrenerjik sinir hücrelerini etkileyerek 6-hidroksidopamin oluşumuna neden olabilir. L-Dopa'nın DA nöronlarına bu potansiyel toksisitesi Parkinson hastalığında, parkinsonizmin sebep olduğu nigrostriatal dejenerasyonun artışına ek bir neden olabilir. Ayrıca, hastalığın ilerlemesini hızlandırabilir (Hefti ve ark. 1981).

Dopamin'in demir iyonu varlığında nonenzimatik olarak okside olduğu ve bir dopaminerjik nörotoksin olan 6-hidroksidopamin'e (6-OHDA) dönüşebildiği bilinmektedir. L-Dopa tedavisi alan Parkinson hastalarının idrarlarında da 6-OHDA seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. Bu bulgular L-Dopa'nın *in vivo* oksidasyonla 6-OHDA'ya dönüşerek dopaminerjik nöronlara hasar verebileceğini düşündürmektedir (Borah ve ark. 2009).

Bakır, insan vücudunun birçok dokusunda bulunan gerekli bir iz elementtir. Bazı metalloproteinlerin ve enzimlerin redoks-aktif merkezlerini oluşturmanın dışında bakır, kromozomal DNA ile ilişkili olarak çekirdeklerde de bulunmuştur. Demir gibi, bakır da Fenton reaksiyonu aracılığıyla reaktif oksijen türlerini meydana getirmede önemli bir rol oynar. Kromatinin normal bir bileşeni gibi bakır, çekirdek DNA'sı yakınlarında ROS'ların üretimi ile genomik mutasyona sebep olabilen çeşitli endojen ve ksenobiyotik katekolik/fenolik bileşiklerin redoks siklusunu katalizleyebilir. Bazı geçiş metal iyonlarının, örneğin Cu^{+2} , 6-hidroksidopamin ve L-Dopa'yı da kapsayan katekollerin redoks siklusunu harekete geçirdiği kabul edilmiştir (Jung ve ark. 2001).

Nöronal kaybın doğası bilinmezken, hipotezlerden biri de, endojen dopaminin reaktif oksijen türlerine (ROS) ve/veya bu nöronların direk hasarına ve ölümüne sebep olan kinon ve semikinonlara hızlandırılmış ya da anormal oto-oksidasyonudur. Bu anormal oksidasyon, katalizör metallerin non-fizyolojik konsantrasyonundan meydana gelebilir. Parkinson hastalığında, tedavi edici L-Dopa'nın verilmesi, böyle bir mekanizmanın daha çok okside substrat sağlayarak daha fazla nöronal kaybı teşvik edebileceği bildirilmiştir (Fahn 1992). Çin hamster V79 hücreleri ile yapılan araştırmada L-Dopa ve dopaminin $MgCl_2$ ve $CuSO_4$ ile birlikte antiproliferatif aktivitesi olduğu gösterilmiştir (Snyder ve ark. 1998).

Kronik L-Dopa kullanımı ROS üretilmesini ve birikmesini stimüle eder. DNA gibi kritik öneme sahip biyomoleküller ROS'lar tarafından oksidatif hasara uğratılarak hücre ölümüne sebep olabilir. L-Dopa'nın dopamin nöronları üzerine ROS yolaklı toksik etkisinin varlığı ve hastalık gelişiminde önemli bir role sahip olduğu kabul edilmiştir (Andersen 2004).

L-Dopa'nın nöronlar üzerindeki toksisitesini belirlemek amacıyla çeşitli test yöntemlerinden faydalanılmıştır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanlar Komet ve Apoptosis yöntemleridir. L-Dopa tedavisi gören Parkinson hastalarından alınan kan örneklerine uygulanan Komet Testi sonucu DNA lezyonlarının miktarında sağlıklı bireylere oranla bir artış olduğu bildirilmiştir (Cornetta ve ark. 2009).

Levodopa tarafından apoptozisin aktivasyonundan sorumlu mekanizma hala bilinmemektedir. Apoptozis çoğunlukla DNA hasarı tarafından tetiklenmektedir. Levodopa ve türevlerinin olası genotoksitesisi bu ajanlara maruziyet sonrası 8-hidroksiguanozin birikiminin gösterilmesi ile desteklenir. Wick (1989), Levodopa ve dopaminin DNA tamirinin birçok vital enzimatik yollarını engelleyebileceğini göstermiştir. Bu datalar birlikte ele alındığında, hücre membran ve mitokondrisine ek olarak hücre çekirdeğinin de Levodopanin ortaya koyduğu hücrel toksisite olaylarında önemli bir hedef olduğunu göstermektedir (Ziv ve ark. 1997).

Levodopa nöronal hücelere belirgin olarak toksiktir. Kültüre alınmış postmitotik genç simpatik nöronlara Levodopa toksisitesine apoptozis indüksiyonu aracılık etmektedir. Artan L-Dopa dozuna bağlı olarak kültüre alınmış civciv nöronlarında apoptozisin indüklendiği ve yaşayabilir hücre sayısında azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir. Hücrelerin Levodopa'ya maruz kalması apoptozise özgü hücrel değişimleri, membran bleblerini ve nüklear fragmentasyonu ortaya koymaktadır (Ziv ve ark. 1997).

Memeli beyinlerinin bazı bölgelerinde kendiliğinden meydana gelen bir grup alkaloid tespit edilmiştir. Parkinson hastalığına sebep muhtemel faktör olarak bilinen 1-metil-4-fenil 1,2,3,6-tetrahidropiridin'e yapısal benzerliklerinden dolayı, tetrahydroisokuinolin alkaloidlerinin endojen nörotoksin olabilecekleri düşünülmüştür. Bu bileşiklerden biri Salsolinol'dür (SAL; 1-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline). SAL ilk olarak L-Dopa tedavisi gören Parkinson hastalarının idrarlarında ve daha sonra insan beyinde bulunmuştur. Bu alkaloidin orjini ve onun beyinde bulunuşu, bileşiğin bazı nörolojik ve psikiyatrik hastalığın sorumlusu olabileceğini öne sürmektedir (Nagatsu 1997, Naoi ve ark. 1999). SAL katekol bir kısma sahiptir, kuinoidal formu ve ana katekol arasındaki redoks döngüsü vasıtasıyla ROS ürettiği ve DNA hasar ve genotoksisiteye sebep olduğu tahmin edilmektedir (Jung ve ark. 2001).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada Parkinson hastalığında kullanılan L-Dopa ve Karbidopa'nın genotoksik etkisi ve Üridin'in olası genotoksik/antigenotoksik etkisi fare kemik iliği Mikronükleus ve Komet Testleri ile belirlenmeye çalışıldı.

3.1. Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanları

Araştırmada deney hayvanı olarak *Balb/c* türü erkek fareler kullanıldı. Çalışma için Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 23.02.2010 tarihli 2010-02/06 numaralı etik kurul izni alındı. Fareler Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Farelerin 25 g ve 8 haftalık olmalarına dikkat edildi. Fareler çelik kafeslerde, talaş kaplı zeminde ve 18-22 °C oda sıcaklığı, % 60 bağıl nem ortamında barındırıldılar. Farelere TSE'ye uygun üretilmiş standart pellet ve gerektiğinde taze çeşme suyu verildi.

Çalışmada Kemik iliği ve Komet Testleri için kullanılan ilaçların her doz grubunda ve kontrol gruplarında 4 adet erkek fare kullanıldı. Pozitif kontrol grubunda 2 adet erkek fare kullanıldı. Çözücü kontrol grubunda ise 4 adet erkek fare kullanıldı.

Bu çalışmada toplam 74 adet fare kullanıldı.

3.2. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan L-Dopa ve Karbidopa ve Üridin'in kimyasal formülleri ve CAS (Chemical Abstract Service) numaraları Çizelge 3.2.1'de verildi.

L-Dopa, Sigma (D1507) ≥ 98 %,

Karbidopa, Sigma (C1335) ≥ 98 %,

Üridin, Sigma (U3750) ≥ 99 % saflıktadır.

Çizelge 3.2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

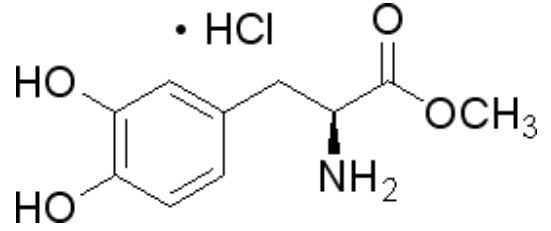
Kimyasal adı (Grubu)**CAS No****Kimyasal Yapısı****Safılık derecesi**

LEVODOPA (L-Dopa)

(L-3,4-Dihydroxyphenylalanine methyl ester hydrochloride)

1421-65-4

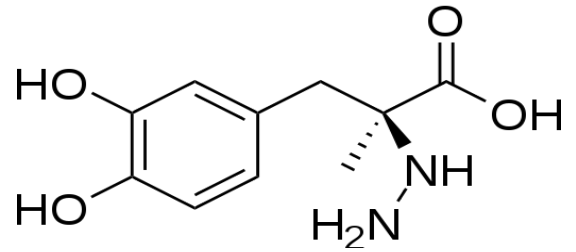
≥ 98 %

**KARBİDOPA**

S(-)-Carbidopa

28860-95-9

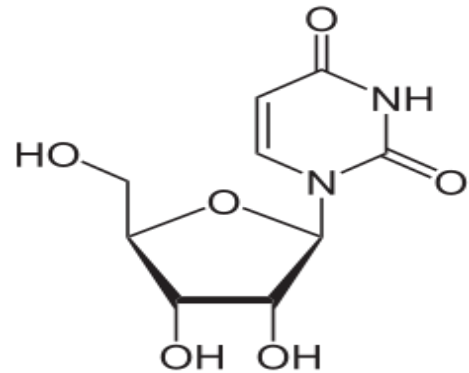
≥ 98 %

**ÜRİDİN**

Uridine

58-96-8

≥ 99 %



3.3. Doz Seçimi ve Muamele Süresi

Pozitif Kontrol

Pozitif kontrol için Etil metan sulfonat bileşiği (EMS; Sigma, M0880), 300 mg/kg tek dozda distile su ile sulandırılarak uygulandı. Bileşik farelere intraperitoneal olarak enjekte edildi.

Levodopa (L-3,4-dihidroksifenilalanin, L-Dopa)

Levodopa bileşiğinin doz seçimi amacıyla doz belirleme çalışmaları yapıldı. Sırasıyla 10, 50, 100, 250, 500 ve 1000 mg/kg dozlar farelere intraperitoneal olarak enjekte edildi. Çalışmalar sonucunda 10, 50 ve 100 mg/kg dozlar çalışma için belirlendi. İlaç enjeksiyondan hemen önce hazırlandı.

Levodopa bileşiği suda çözünmediği için ilacın hazırlanmasında distile su kullanıldı. Distile su kontrol grubuna 0,1 ml/fare olacak şekilde, doz gruplarına da distile su ve L-Dopa karışımı fare başına 0,1 ml olacak şekilde i.p. enjeksiyonla verildi.

Karbidopa

Bu bileşik Parkinson hastalığında Levodopa ile birlikte uygulanmaktadır. Türkiye’de pazarlanan ilaç 10 kısım Levodopa ve 1 kısım Karbidopa içerir. Doz denemeleri sonucu çalışmada kullanılmasına karar verilen Levodopa dozlarına karşılık 1, 5 ve 10 mg/kg Karbidopa dozları çalışma için belirlendi.

Karbidopa distile suda çözünmediğinden çözücü olarak 0,03 N HCl kullanılmıştır. Çözücü kontrol grubu çalışmaya ilave edilmiştir. . Çözücü ile Karbidopa karışımı fare başına 0,1 ml olacak şekilde i.p enjeksiyonla uygulandı.

Üridin

Üridin bileşiği ile doz belirleme çalışmaları gerçekleştirildi. Sırasıyla 100, 200, 400 ve 1000 mg/kg dozlar farelere intraperitoneal olarak enjekte edildi. 100 ve 200 mg/kg dozunda mikronükleus gözlenmedi. 400 ve 1000 mg/kg dozunda gözlenen mikronükleuslarda istatistiki anlamlılığa rastlanmadı. Levodopa ve Üridin’in birlikte uygulama dozu olarak, 100 mg/kg Üridin dozu seçildi. İlaç enjeksiyondan hemen önce hazırlandı.

Üridin suda çözünebilen bir bileşik olduğu için distile su ile çözüldü ve yine Levodopa için kullanılan distile su kontrol grubu verileri bu bileşik için de kullanıldı. İlaç ve distile su karışımı fare başına 0,1 ml olacak şekilde i.p. enjeksiyonla verildi.

Muamele Süresi

Kemik iliği Mikronükleus ve Komet Testlerinde 24 saat muamele süresi tüm bileşiklere uygulandı.

3.4. Deney Grupları

- I. Pozitif kontrol (EMS, 300 mg/kg)
- II. Negatif kontrol (Distile su, 0,1 ml/fare)
- III. Çözücü kontrol (HCl 0.03 N, 0,1 ml/fare)
- IV. Levodopa
 - 10 mg/kg
 - 50 mg/kg
 - 100 mg/kg
- V. Karbidopa
 - 1 mg/kg
 - 5 mg/kg
 - 10 mg/kg
- VI. Levodopa/Karbidopa
 - 10/1 mg/kg
 - 50/5 mg/kg
 - 100/10 mg/kg
- VII. Üridin (100 mg/kg)
- VIII. Üridin/Levodopa
 - 100/10 mg/kg
 - 100/50 mg/kg
 - 100/100 mg/kg

IX. Üridin/Levodopa/Karbidopa

- 100/10/1 mg/kg
- 100/50/5 mg/kg
- 100/100/10 mg/kg

3.5. Kemik İliği Mikronükleus Testi

Fare kemik iliği Mikronükleus Testi için, Adler (1985)'in metoduna göre fareler servikal dislokasyonla öldürülüp her iki femur kemiği çıkarılarak kas dokusundan temizlendi. Fetal Calf Serum (FCS) çekilmiş 1 ml'lik ince uçlu enjektör yardımı ile kemik iliği bir santrifüj tüpüne yıkanarak alındı. Her fare için bu işlem yapıldıktan sonra, tüpler 5 dakika 800 rpm'de santrifüj edildi ve üst kısımdaki süpernatant tamamen atıldı. Dipte kalan hücre süspansiyonu lam üzerine bir lamel yardımı ile yayılıp havada en az 12 saat süreyle kurumaya bırakıldı. Mikronükleus preparatları May Grünwald-Giemsa yöntemi ile boyandı. Bu amaçla, May Grünwald lamlar üzerine dökülerek 3 dakika süre ile boyandı. Ardından 3 dakika 1:1 oranda sulandırılmış May Grünwald ile boyanan preparatlar distile su ile yıkanarak 20 dakika %5 Giemsa ile boyandı ve distile su ile yıkanıp havada kurutuldu.

Preparatların değerlendirilmesinde Polikromatik (PCE) ve Normokromatik Eritrositler (NCE) dikkate alındı. Boyama işleminden sonra PCE'ler gri-mor, NCE'ler ise portakalımsı sarı renkte ayırt edilerek fare başına 1000 PCE sayıldı. Kimyasalların hücre bölünmesine olan etkisini belirlemek amacı ile PCE/NCE oranı belirlendi. Mikronükleuslu PCE ve NCE'ler ayrıca kaydedilerek 1000 PCE ve 1000 NCE'deki oranları belirlendi.

Değerlendirmeler 100x objektifte Kameram 21 Kamera Ataçmanlı Işık Mikroskobu ile gerçekleştirildi ve mikronükleuslu eritrositlerin bazıları Kameram 21 Kamera Ataçmanlı ve Komet yazılımlı floresans mikroskop görüntüleme sistemi ile fotoğraflandı.

3.6. Alkali Komet Testi

Alkali Komet Testi Singh ve ark. (1988)'nin yöntemine göre yapılmıştır. Hücre-agar karışım tabakasının deney esnasında lam üzerinden kayıp kaybolmasını engellemek için daha pürüzlü bir yüzey oluşturmak amacıyla, lamalar önceden % 0.65'lik Normal Kaynama Noktalı (NMP) agar ile kaplandı. Farelerden alınan kanlar Fosfat Buffer Salin (PBS) ile seyreltildi. Bu süspansiyondan 80µl alınarak, %0.65'lik 250µl Düşük Kaynama Noktalı (LMP) agar (25 - 35 °C) ile karıştırıldı. Bu karışımdan alınan 100µl örnek önceden hazırlanan NMP agar kaplı lamlara yayıldı ve bir lamel kapatılarak +4 °C 15 dakika bekletilerek jelin katılaşması sağlandı.

Agarın katılaşmasından sonra preparatlar üzerlerindeki lameller kaldırıldı ve şale içerisindeki soğuk Lizis Solüsyonuna yerleştirildi. Daha sonra tekrar buzdolabına (+4 °C) kaldırılarak 24 saat bekletildi. Lizis işleminden geçirilen preparatlar elektroforez tankına yerleştirildi ve tank soğuk Elektroforez Solüsyonu (Running Buffer) (pH: 13) ile dolduruldu. Preparatlar 15 dakika bu solüsyon içerisinde bekletildi.

Unwinding (DNA sarmalının açılması) işlemi tamamlanan preparatlara aynı tank ve solüsyon içerisinde elektrik akımı uygulanarak elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

Elektroforez işlemi takiben pH:13 değerindeki solüsyon içeren tanktan çıkarılan preparatlar pH ayarlamasını sağlamak amacıyla nötralizasyon işlemine alındı. Bunun için preparatlar soğuk Nötralizasyon tamponu içeren şalelere alınmak suretiyle nötralize edildi. Nötralizasyon işleminden sonra preparatlar soğuk distile sudan geçirildi. Kuruyan preparatlar Etidyum bromür (2µg/ml) ile boyandı ve üzerlerine bir lamel kapatıldıktan sonra Kameram 21 Kamera Ataçmanlı Floresans mikroskobu altında incelendi.

Preparatlar Komet yazılım programı (Kameram 21, Mikrosistem) ile değerlendirildi. Değerlendirmede Komet kuyruk uzunluğu, kuyruk moment uzaklığı, kuyruk % DNA, kafa % DNA, genetik hasar indeksi ve hasarlı hücre yüzdesi verilerinden yararlanıldı.

Genetik Hasar İndeksi (GHİ) şu formüle göre hesaplandı.

$$GHİ = \frac{(1 * \sum Tip1) + (2 * \sum Tip2) + (3 * \sum Tip3) + (4 * \sum Tip4)}{(\sum Tip0 + \sum Tip1 + \sum Tip2 + \sum Tip3 + \sum Tip4)}$$

Hasarlı Hücre Yüzdesi Formülü

$$\% \text{ Hasarlı Hücre} = \frac{\sum Tip2 + \sum Tip3 + \sum Tip4}{\sum Tip0 + \sum Tip1 + \sum Tip2 + \sum Tip3 + \sum Tip4}$$

3.7. İstatistikî Değerlendirme

Mikronükleus ve Komet Testlerinden elde edilen verilerin istatistikî değerlendirilmesi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı, fark grupları Tukey HSD testi ile $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde belirlendi. İstatistikî analizler SPSS 13.0 paket bilgisayar programında yapıldı.

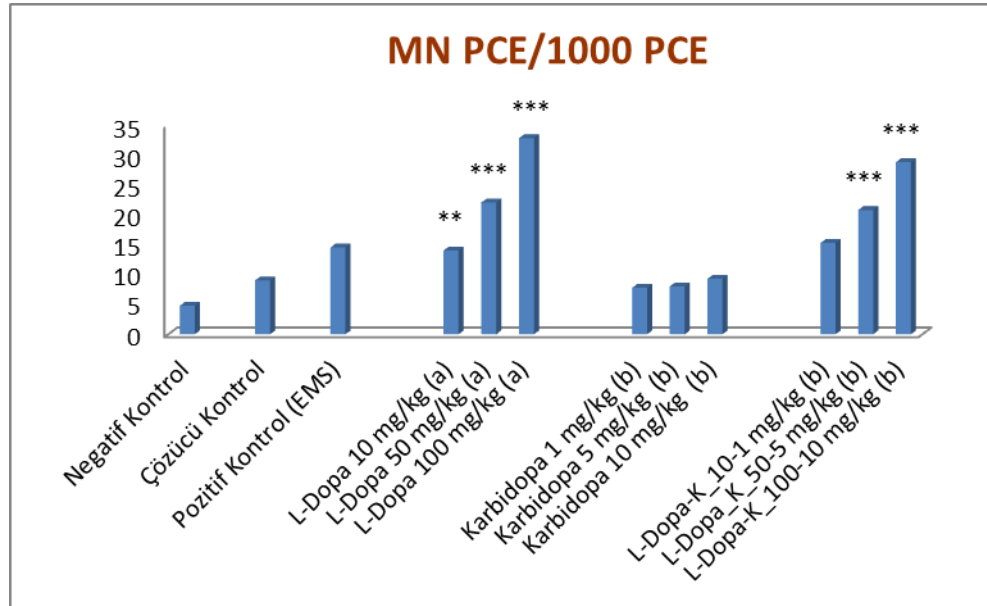
4. BULGULAR

Çalışmada kullanılan Levodopa, Karbidopa ve Üridin ile gerçekleştirilen Fare Kemik İliği Mikronükleus Testi sonuçları Çizelge 4.1.1, ve Şekil 4.1.1-10'da, Komet Testinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2.1-2 ve Şekil 4.2.1-13'te gösterilmektedir.

4.1. Mikronükleus Test Sonuçları

Levodopa distile su ile çözülerek 10, 50 ve 100 mg/kg dozları teste alındı. 24 saatlik L-Dopa uygulaması ile gerçekleştirilen fare kemik iliği Mikronükleus Testi sonuçları Çizelge 4.1.1 ve Şekil 4.1.1-3'te gösterilmektedir.

Mikronükleus Testi sonuçları değerlendirildiğinde Mikronükleuslu Polikromatik Eritrosit (MNPCE) oranı negatif kontrol grubunda ‰ 4,75 iken, 10 mg/kg'lık doz grubunda ‰ 14,00, 50 mg/kg doz grubunda ‰ 22,00, 100 mg/kg doz grubunda ‰ 32,75 olduğu ve kontrole göre her üç doz grubunda anlamlı artış olduğu belirlendi (Şekil 4.1.1, $p < 0,001$, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$ sırasıyla).



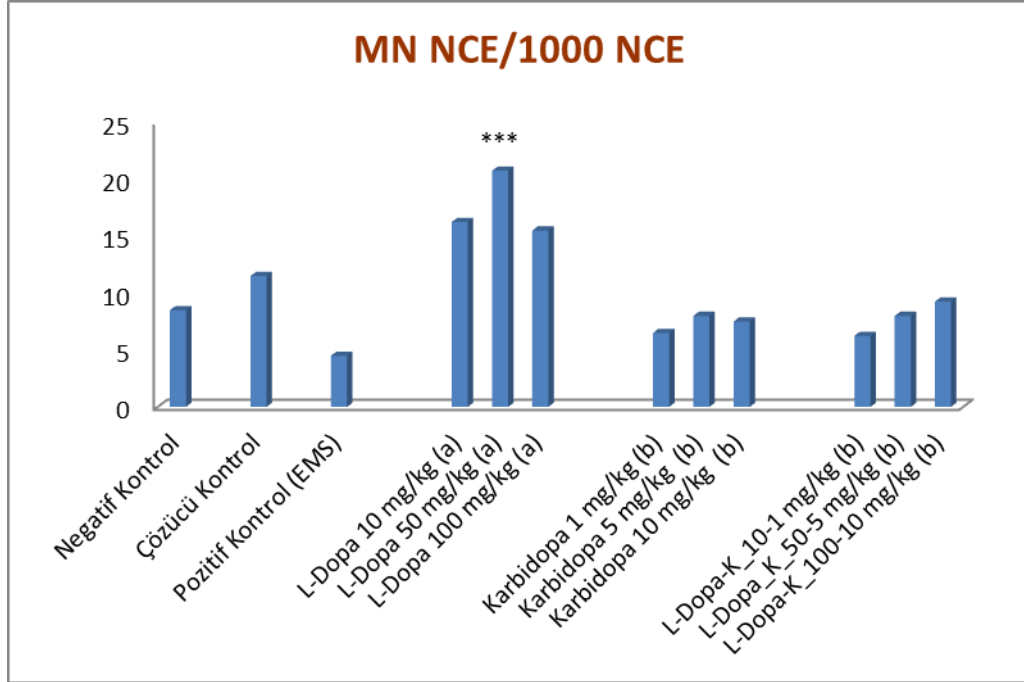
Şekil 4.1.1. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin MNPCE oranlarının kontrol grubu ile karşılaştırılması (**: $p < 0,001$, ***: $p < 0,0001$, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma)

Çizelge 4.1.1. Levodopa ve Karbidopa uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması

Madde	Doz (mg/kg)	N	MNPCE/1000 PCE	MNNCE/1000 NCE	PCE / NCE
Negatif Kontrol	Distile su	4	4.75 ± 0.50	8.50 ± 1.29	1.09 ± 0.23
	Çözücü	4	9.00 ± 1.15	11.50 ± 1.73	0.79 ± 0.10
Levodopa^a	10	4	14.00 ± 4.97**	16.25 ± 7.37	0.84 ± 0.33
	50	4	22.00 ± 3.92***	20.75 ± 5.62***	0.49 ± 0.16**
	100	4	32.75 ± 6.34***	15.50 ± 5.45	0.94 ± 0.26
Karbidopa^b	1	4	7.75 ± 2.06	6.50 ± 2.08	0.69 ± 0.14
	5	4	8.00 ± 0.82	8.00 ± 1.41	1.12 ± 0.11
	10	4	9.25 ± 2.63	7.50 ± 2.65	0.86 ± 0.10
Levodopa/Karbidopa^b	10/1	4	15.25 ± 1.71	6.25 ± 1.26	0.57 ± 0.05
	50/5	4	20.75 ± 1.26***	8.00 ± 1.83	0.68 ± 0.04
	100/10	4	28.75 ± 2.63***	9.25 ± 2.06	0.74 ± 0.12
Üridin^a	100	4	6.75 ± 0.96	10.00 ± 2.94	1.10 ± 0.43
	100/10	4	7.75 ± 1.26	10.75 ± 2.22	1.28 ± 0.20
Üridin/Levodopa^c	100/50	4	10.25 ± 0.96***	11.5 ± 1.73**	1.00 ± 0.15*
	100/100	4	11.50 ± 3.42***	15.50 ± 2.52	1.25 ± 0.27
	100/10/1	4	14.75 ± 2.36	6.25 ± 1.26	0.63 ± 0.06
Üridin/Levodopa/Karbidopa^d	100/50/5	4	8.75 ± 2.22***	9.25 ± 1.50	1.05 ± 0.22
	100/100/10	4	7.50 ± 1.73***	8.00 ± 0.82	1.02 ± 0.03
Pozitif Kontrol (EMS)	300	4	14.50 ± 0.58	4.50 ± 0.58	0.81 ± 0.01

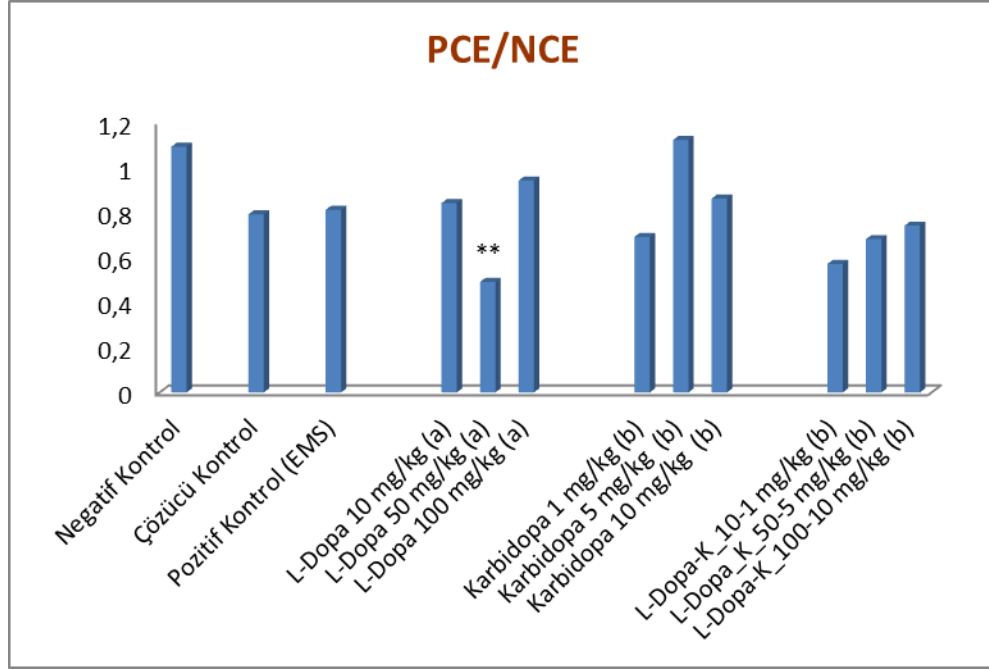
- a : Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma
b : Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma
c : Levodopa doz grupları ile karşılaştırma
d : Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma
* : p < 0,05
** : p < 0,001
*** : p < 0,0001

Mikronükleuslu Normokromatik Eritrositlerin (MNNCE) oranı ise negatif kontrol grubunda % 8,50, 10 mg/kg doz grubunda % 16,25, 50 mg/kg doz grubunda % 20,75, 100 mg/kg doz grubunda % 15,50 olarak bulundu ve kontrole göre sadece 50 mg/kg'lık dozda anlamlı bir artış olduğu görüldü (Şekil 4.1.2, $p < 0,0001$).



Şekil 4.1.2. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Mikronükleus testinin MNNCE oranlarının kontrol grubu ile karşılaştırılması (***: $p < 0,0001$, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma)

PCE/NCE oranına bakıldığında negatif kontrol grubundaki değer 1,09 iken 10, 50 ve 100 mg/kg doz gruplarında sırasıyla 0,84, 0,49 ve 0,94 olduğu ve kontrole göre sadece 50 mg/kg doz grubundaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1.3, $p < 0,001$).



Şekil 4.1.3. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin PCE/NCE oranlarının kontrol grubu ile karşılaştırılması (**: $p < 0,001$, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma)

Karbidopa asitli distile suda çözülerek 1, 5 ve 10 mg/kg olmak üzere 3 farklı dozda uygulandı.

Bu bileşikle 24 saat muamele sonucunda elde edilen mikronükleus verileri incelendiğinde (Çizelge 4.1.1), MNPCE oluşumu çözücü kontrol grubunda % 9,00 iken 1, 5 ve 10 mg/kg doz gruplarında sırasıyla % 7,75, % 8,00 ve % 9,25 olduğu belirlendi ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı belirlendi (Şekil 4.1.1).

MNNCE oranının çözücü kontrol grubunda % 11,50 olduğu, 1, 5 ve 10 mg/kg doz gruplarında sırasıyla % 6,50, % 8,00 ve % 7,50 değerlerine ulaştığı ve kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunmadığı belirlendi (Şekil 4.1.2).

PCE/NCE oranının çözücü kontrol grubunda 0,79 olduğu, 1, 5 ve 10 mg/kg doz gruplarında ise sırasıyla 0,69, 1,12 ve 0,86 olduğu belirlendi ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı belirlendi (Şekil 4.1.3).

Levodopa ve Karbidopa birlikte farklı dozlarda kombine edildi ve asitli distile su ile çözülerek teste alındı. Levodopa ve Karbidopa birlikte kullanıldığında elde edilen tüm Mikronükleus Testi verileri Çizelge 4.1.1 ve Şekil 4.1.1-3'te gösterilmektedir.

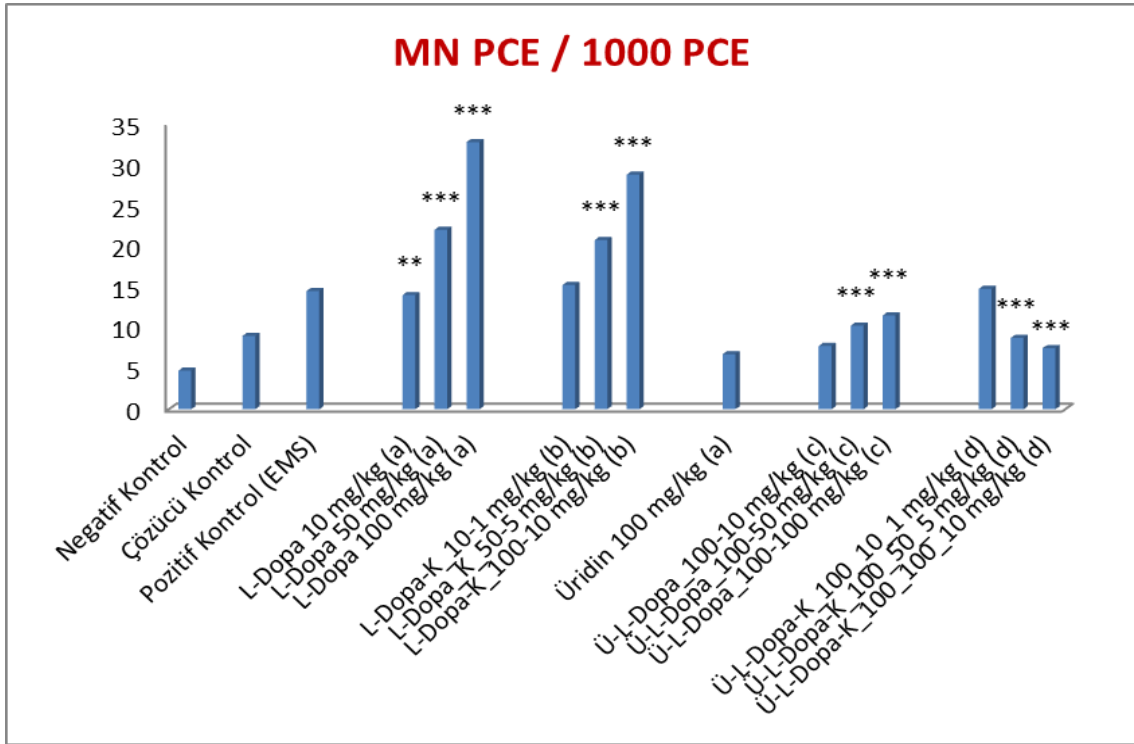
Mikronükleus Test sonuçları değerlendirildiğinde Mikronükleuslu Polikromatik Eritrosit (MNPCE) oranı çözücü kontrol grubunda % 9,00 iken 10/1 mg/kg doz grubunda % 15,25, 50/5 mg/kg doz grubunda % 20,75, 100/10 mg/kg doz grubunda % 28,75 olduğu ve kontrole göre 50/5 ve 100/10 mg/kg doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu belirlendi (Şekil 4.1.1, $p < 0,0001$).

Mikronükleuslu Normokromatik Eritrositlerin (MNNCE) oranı ise çözücü kontrol grubunda % 11,50, 10/1 mg/kg doz grubunda % 6,25, 50/5 mg/kg doz grubunda % 8,00, 100/10 mg/kg doz grubunda % 9,25 olduğu ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı belirlendi (Şekil 4.1.2).

PCE/NCE oranına bakıldığında çözücü kontrol grubundaki değer 0,79 iken 10/1, 50/5 ve 100/10 mg/kg doz gruplarında sırasıyla 0,57, 0,68 ve 0,74 olduğu ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı belirlendi (Şekil 4.1.3).

Üridin distile su ile çözülerek teste alındı. 24 saatlik Üridin uygulaması sonucu gerçekleştirilen fare kemik iliği Mikronükleus Testi sonuçları Çizelge 4.1.1 ve Şekil 4.1.4-6'da verilmektedir.

Mikronükleus Test sonuçları değerlendirildiğinde Mikronükleuslu Polikromatik Eritrosit (MNPCE) oranı negatif kontrol grubunda % 4,75 iken, 100 mg/kg'lık doz grubunda % 6,75 olduğu ve kontrole göre anlamlı bir artışın olmadığı belirlendi (Şekil 4.1.4).



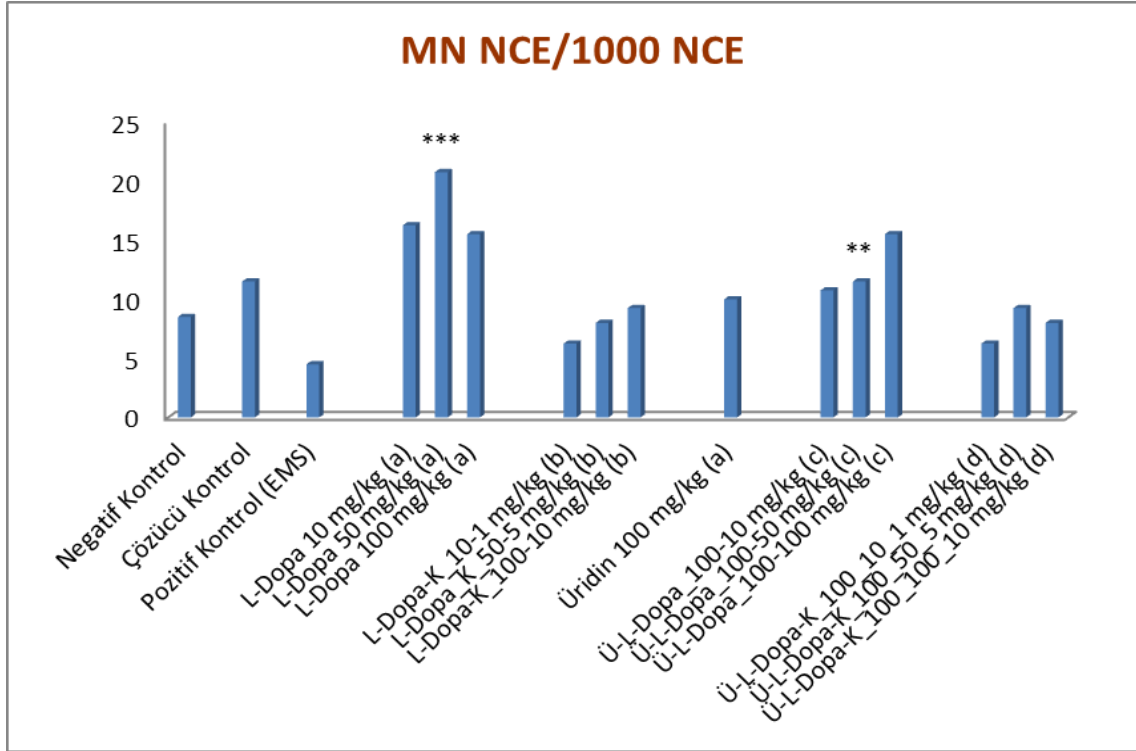
Şekil 4.1.4. Üridin ve L-Dopa ve Karbidopa'nın Üridin kombinasyonları ile gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin MNPCE oranlarının karşılaştırılması (**: $p < 0,001$, ***: $p < 0,0001$, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma, c: Levodopa doz grupları ile karşılaştırma, d: Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma)

Çizelge 4.1.1. Levodopa ve Karbidopa uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması

Madde	Doz (mg/kg)	N	MNPCE/1000 PCE	MNNCE/1000 NCE	PCE / NCE
Negatif Kontrol	Distile su	4	4.75 ± 0.50	8.50 ± 1.29	1.09 ± 0.23
	Çözücü	4	9.00 ± 1.15	11.50 ± 1.73	0.79 ± 0.10
Levodopa^a	10	4	14.00 ± 4.97**	16.25 ± 7.37	0.84 ± 0.33
	50	4	22.00 ± 3.92***	20.75 ± 5.62***	0.49 ± 0.16**
	100	4	32.75 ± 6.34***	15.50 ± 5.45	0.94 ± 0.26
Karbidopa^b	1	4	7.75 ± 2.06	6.50 ± 2.08	0.69 ± 0.14
	5	4	8.00 ± 0.82	8.00 ± 1.41	1.12 ± 0.11
	10	4	9.25 ± 2.63	7.50 ± 2.65	0.86 ± 0.10
Levodopa/Karbidopa^b	10/1	4	15.25 ± 1.71	6.25 ± 1.26	0.57 ± 0.05
	50/5	4	20.75 ± 1.26***	8.00 ± 1.83	0.68 ± 0.04
	100/10	4	28.75 ± 2.63***	9.25 ± 2.06	0.74 ± 0.12
Üridin^a	100	4	6.75 ± 0.96	10.00 ± 2.94	1.10 ± 0.43
	100/10	4	7.75 ± 1.26	10.75 ± 2.22	1.28 ± 0.20
Üridin/Levodopa^c	100/50	4	10.25 ± 0.96***	11.5 ± 1.73**	1.00 ± 0.15*
	100/100	4	11.50 ± 3.42***	15.50 ± 2.52	1.25 ± 0.27
	100/10/1	4	14.75 ± 2.36	6.25 ± 1.26	0.63 ± 0.06
Üridin/Levodopa/Karbidopa^d	100/50/5	4	8.75 ± 2.22***	9.25 ± 1.50	1.05 ± 0.22
	100/100/10	4	7.50 ± 1.73***	8.00 ± 0.82	1.02 ± 0.03
Pozitif Kontrol (EMS)	300	4	14.50 ± 0.58	4.50 ± 0.58	0.81 ± 0.01

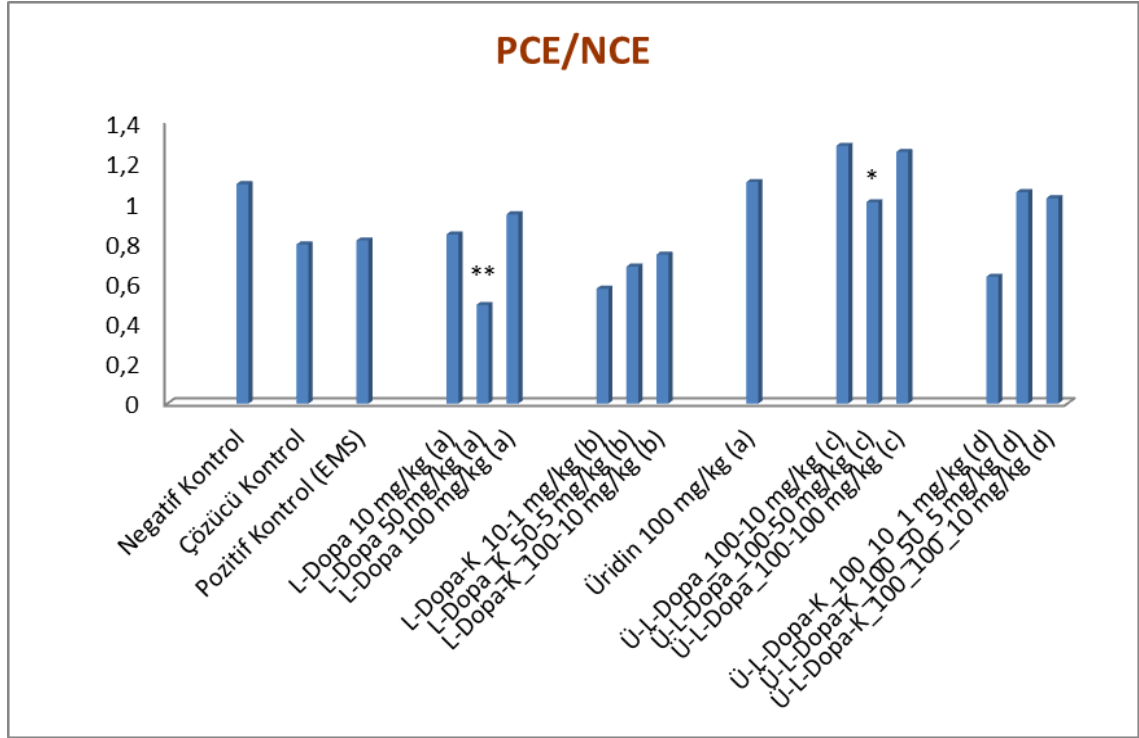
- a : Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma
b : Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma
c : Levodopa doz grupları ile karşılaştırma
d : Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma
* : p < 0,05
** : p < 0,001
*** : p < 0,0001

Mikronükleuslu Normokromatik Eritrositlerin (MNNCE) oranı ise kontrol grubunda % 8,50, 100 mg/kg doz grubunda % 10,00 olarak bulundu ve negatif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmadığı belirlendi (Şekil 4.1.5).



Şekil 4.1.5. Üridin ve L-Dopa ve Karbidopa'nın Üridin kombinasyonları ile gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin MNNCE oranlarının karşılaştırılması (**: $p < 0,001$, ***: $p < 0,0001$, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma, c: Levodopa doz grupları ile karşılaştırma, d: Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma)

PCE/NCE oranının negatif kontrol grubunda 1,09, 100 mg/kg Üridin doz gruplarında ise 1,10 olduğu ve kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunmadığı belirlendi (Şekil 4.1.6).



Şekil 4.1.6. Üridin ve L-Dopa ve Karbidopa'nın Üridin kombinasyonları ile gerçekleştirilen Mikronükleus Testinin PCE/NCE oranlarının karşılaştırılması (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,001$, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma, c: Levodopa doz grupları ile karşılaştırma, d: Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma)

Üridin'in 100 mg/kg dozu, Levodopa'nın 10, 50 ve 100 mg/kg dozları ile kombine uygulamaları sonucu test edildi. Üridin Levodopa kombinasyonları ile elde edilen tüm Mikronükleus Testi verileri Çizelge 4.1.1 ve Şekil 4.1.4-6'da verilmektedir.

Mikronükleus Test sonuçları değerlendirildiğinde, Mikronükleuslu Polikromatik Eritrosit (MNPCE) oranı Üridin/Levodopa 100/10 mg/kg doz grubunda % 7,75, 100/50 mg/kg doz grubunda % 10,25 ve 100/100 mg/kg doz grubunda % 11,50 olarak belirlendi. Üridin uygulamasının, 10 mg/kg Levodopanın meydana getirdiği MNPCE oranını 1,8 kat, 50 mg/kg Levodopa uygulamasını 2,15 kat ve 100 mg/kg Levodopa

uygulamasını ise 2,85 kat azalttığı bulundu. Üridin/Levodopa kombinasyonun 100/50 ve 100/100 mg/kg doz gruplarındaki azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.1.4, $p<0,0001$).

Mikronükleuslu Normokromatik Eritrosit (MNNCE) oranı Üridin/Levodopa 100/10 mg/kg doz grubunda ‰ 10,75, 100/50 mg/kg doz grubunda ‰ 11,50 ve 100/100 mg/kg doz grubunda ‰ 15,50 olarak belirlendi. Üridin uygulamasının, 10 mg/kg Levodopa'nın meydana getirdiği MNNCE oranını 1,51 kat, 50 mg/kg Levodopa uygulamasını 1,8 kat azalttığı ve 100 mg/kg Levodopa uygulamasında herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı bulundu. Üridin/Levodopa kombinasyonunun yalnızca 100/50 doz grubundaki azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.1.5, $p<0,001$).

PCE/NCE oranına bakıldığında, Üridin/Levodopa 100/10, 100/50 ve 100/100 mg/kg doz gruplarında sırasıyla 1,28, 1,00 ve 1,25 olarak belirlendi ve Levodopa'nın 10, 50 ve 100 mg/kg doz grupları ile karşılaştırıldığında yalnızca 100/50 mg/kg Üridin/Levodopa doz grubundaki değişikliğin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.1.6, $p<0,05$).

Üridin'in 100 mg/kg dozu, Levodopa/Karbidopa kombinasyonunun 10/1, 50/5 ve 100/10 mg/kg dozları ile kombine bir şekilde uygulanarak test edildi. Üridin/Levodopa /Karbidopa kombinasyonları ile elde edilen tüm Mikronükleus Testi verileri Çizelge 4.1.1 ve Şekil 4.1.4-6'da verilmektedir.

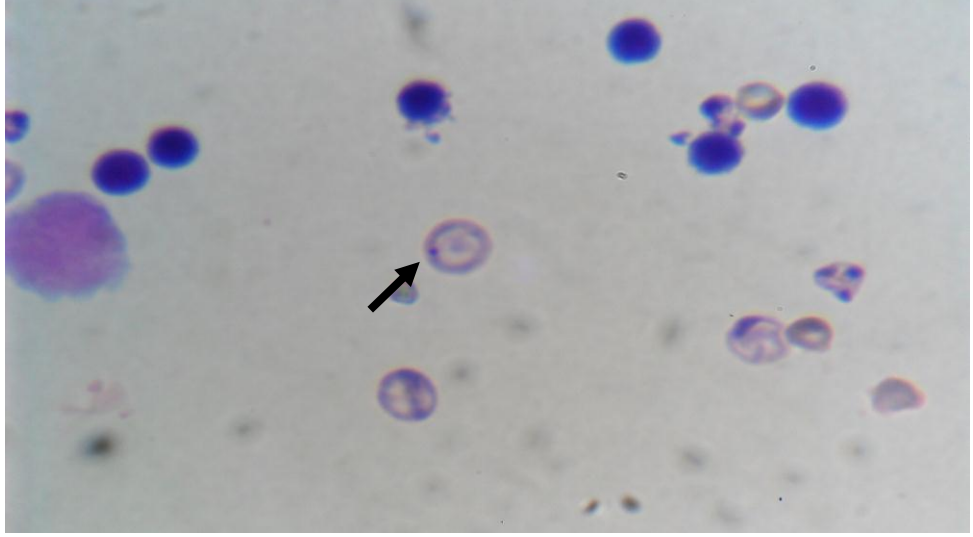
Mikronükleuslu Polikromatik Eritrosit (MNPCE) oranları değerlendirildiğinde Üridin/Levodopa/Karbidopa 100/10/1 mg/kg doz grubunda ‰ 14,75, 100/50/5 mg/kg doz grubunda ‰ 8,75 ve 100/100/10 mg/kg doz grubunda ‰ 7,50 olarak belirlendi. Üridin uygulamasının, 10/1 mg/kg Levodopa/Karbidopa uygulamasının meydana getirdiği MNPCE oranını 1,03 kat, 50/5 mg/kg Levodopa/Karbidopa uygulamasını 2,37 kat ve 100/10 mg/kg Levodopa/Karbidopa uygulamasının meydana getirdiği MNPCE oranını ise 3,83 kat azalttığı bulundu. Üridin/Levodopa/Karbidopa kombinasyonun

100/50/5 ve 100/100/10 mg/kg doz gruplarındaki azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.1.4, $p < 0,0001$).

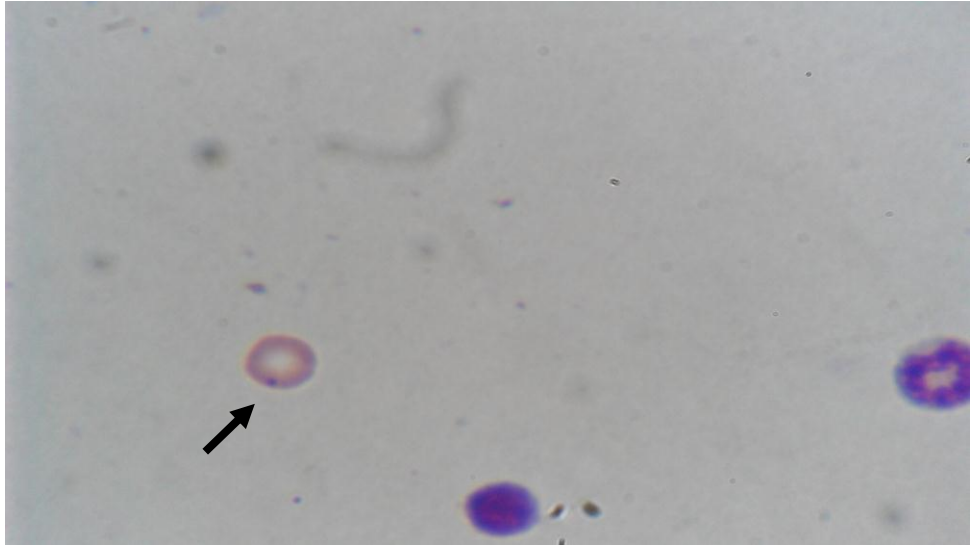
Mikronükleuslu Normokromatik Eritrosit (MNNCE) oranları değerlendirildiğinde Üridin/Levodopa/Karbidopa 100/10/1 mg/kg doz grubunda ‰ 6,25, 100/50/5 mg/kg doz grubunda ‰ 9,25 ve 100/100/10 mg/kg doz grubunda ‰ 8,00 olarak belirlendi. Üridin'in, Levodopa/Karbidopa kombine uygulamalarında meydana gelen MNNCE oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe sebep olmadığı belirlendi (Şekil 4.1.5).

PCE/NCE oranlarının, Üridin/Levodopa/Karbidopa 100/10/1, 100/50/5 ve 100/100/10 mg/kg doz gruplarında sırasıyla 0,63, 1,05 ve 1,02 olduğu ve Levodopa/Karbidopa kombinasyonununun 10/1, 50/5 ve 100/10 mg/kg doz grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı belirlendi (Şekil 4.1.6).

Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Mikronükleus Testi sonucunda PCE ve NCE’lerde gözlenen mikronükleus fotoğrafları Şekil 4.1.7-8’te görülmektedir.

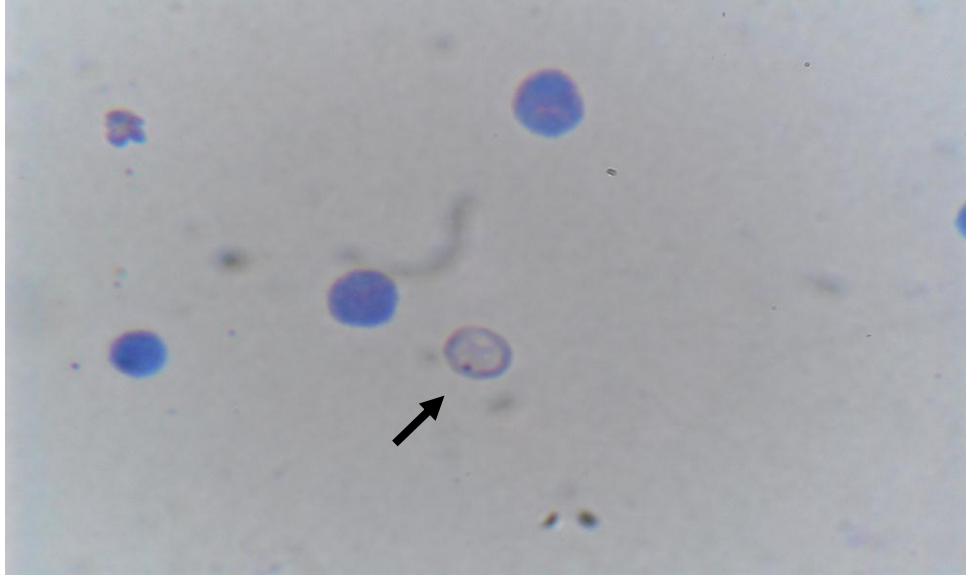


Şekil 4.1.7. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Mikronükleus Testi sonucunda gözlenen mikronükleuslu bir PCE rneği (→, mikronükleus)

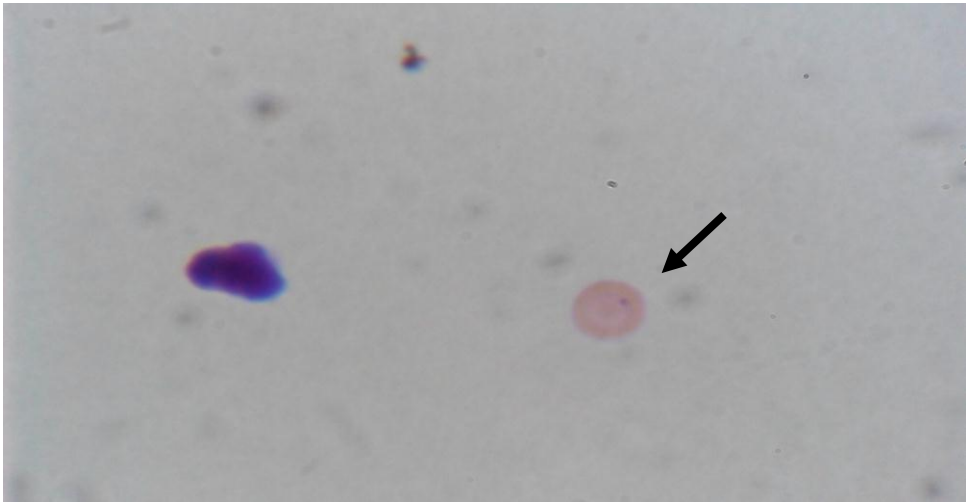


Şekil 4.1.8. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Mikronükleus Testi sonucunda gözlenen mikronükleuslu bir NCE rneği (→, mikronükleus)

Üridin ile gerçekleştirilen Mikronükleus Testi sonucunda PCE ve NCE'lerde gözlenen mikronükleus fotoğrafları Şekil 4.1.9-10'de görülmektedir.



Şekil 4.1.9. Üridin ile gerçekleştirilen Mikronükleus Testi sonucunda gözlenen mikronükleuslu bir PCE örneği (→, mikronükleus)

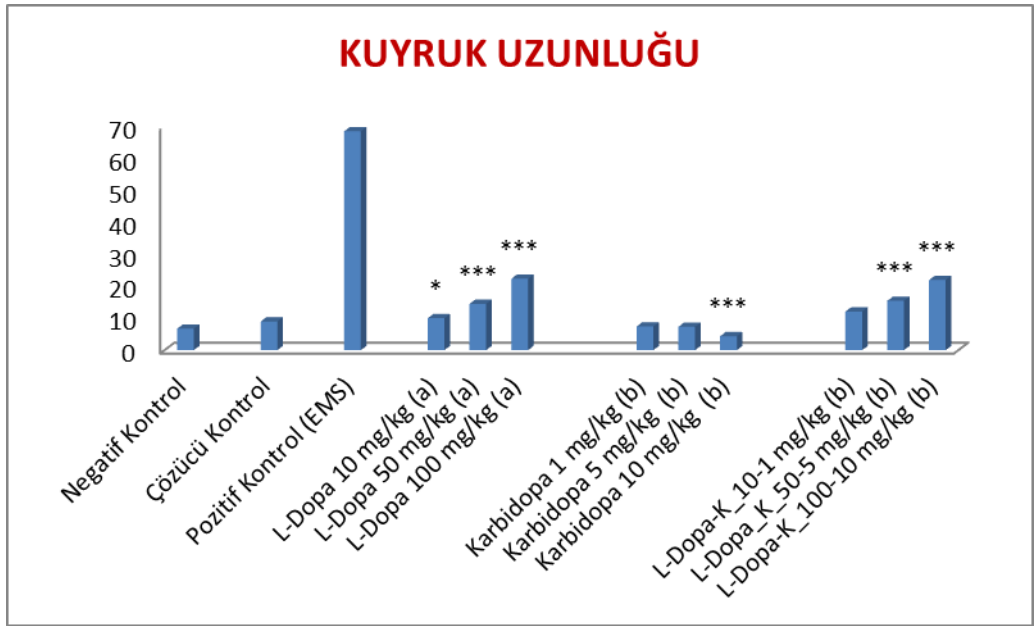


Şekil 4.1.10. Üridin ile gerçekleştirilen Mikronükleus Testi sonucunda gözlenen mikronükleuslu bir NCE örneği (→, mikronükleus)

4.2. Komet Test Sonuçları

Levodopa, Karbidopa ve Üridin ile gerçekleştirilen Komet Testine ait Komet kuyruk uzunlukları, kuyruk moment uzaklıkları, kuyruk % DNA, kafa % DNA, genetik hasar indeksi ve hasarlı hücre yüzdelere ait veriler Çizelge 4.2.1 ile 4.2.2’de ve Şekil 4.2.1-13’te verilmiştir.

24 saatlik Levodopa uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, Komet kuyruk uzunlukları oranı negatif kontrol grubunda 6,69 µm, 10 mg/kg’lık doz grubunda 10,01 µm, 50 mg/kg doz grubunda 14,48 µm, 100 mg/kg doz grubunda 22,34 µm olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her üç doz grubunda doza bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.2.1, $p<0,05$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, sırasıyla).



Şekil 4.2.1. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Kuyruk Uzunluklarının kontrol grubu ile karşılaştırılması (*: $p<0,05$, ***: $p<0,001$, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma)

Çizelge 4.2.1. Levodopa, Karbidopa ve Üridin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet Testinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması

Madde	Doz (mg/kg)	N	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Moment Uzaklığı (µm)	Kuyruk % DNA	Kafa % DNA
Negatif Kontrol	Distile su	4	6.69 ± 5.87	17.58 ± 2.47	2.76 ± 3.11	97.24 ± 3.10
	Çözücü	4	8.99 ± 5.48	18.93 ± 2.33	3.03 ± 2.44	96.97 ± 2.44
Levodopa ^a	10	4	10.01 ± 10.16*	15.75 ± 4.39**	8.42 ± 12.73***	91.58 ± 12.73***
	50	4	14.48 ± 10.59***	15.98 ± 4.53*	16.75 ± 16.87***	83.25 ± 16.87***
	100	4	22.34 ± 17.97***	19.81 ± 7.95***	25.66 ± 23.27***	74.34 ± 23.27***
Karbidopa ^b	1	4	7.40 ± 5.15	22.19 ± 3.61***	2.20 ± 1.97	97.80 ± 1.97
	5	4	7.31 ± 5.38	20.83 ± 3.47**	2.17 ± 1.85	97.83 ± 1.85
	10	4	4.37 ± 2.17***	15.30 ± 1.56***	1.99 ± 1.79	98.01 ± 1.79
Levodopa/Karbidopa ^b	10/1	4	12.10 ± 8.04***	16.75 ± 4.60***	7.96 ± 8.10**	92.04 ± 8.10**
	50/5	4	15.42 ± 9.19***	17.00 ± 3.90**	18.26 ± 17.84***	81.74 ± 17.84***
	100/10	4	21.94 ± 14.41***	21.48 ± 6.11***	21.07 ± 21.57***	78.93 ± 21.57***
Üridin ^a	100	4	5.97 ± 4.30	20.78 ± 3.17***	2.28 ± 2.52	97.72 ± 2.52
	100/10	4	4.78 ± 3.13***	20.39 ± 1.73***	1.87 ± 2.30***	98.13 ± 2.30***
Üridin/Levodopa ^c	100/50	4	5.39 ± 4.08***	21.59 ± 2.48***	1.29 ± 1.57***	98.71 ± 1.57***
	100/100	4	4.52 ± 2.66***	20.24 ± 2.07	1.19 ± 1.34***	98.81 ± 1.34***
	100/10/1	4	5.15 ± 3.03***	18.25 ± 1.77*	1.39 ± 1.34***	98.61 ± 1.34***
Üridin/Levodopa/Karbidopa ^d	100/50/5	4	4.49 ± 3.08***	18.76 ± 1.55**	1.16 ± 1.33***	98.84 ± 1.34***
	100/100/10	4	5.12 ± 4.26***	19.20 ± 2.48***	1.23 ± 1.45***	98.77 ± 1.45***
Pozitif Kontrol (EMS)	300	4	68.48 ± 21.06	41.11 ± 9.10	75.48 ± 21.33	24.52 ± 21.33

- a : Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma
b : Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma
c : Levodopa doz grupları ile karşılaştırma
d : Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma
* : p < 0,05
** : p < 0,001
*** : p < 0,0001

Çizelge 4.2.2. Levodopa, Karbidopa ve Üridin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet Testinin Genetik Hasar İndeksi ve Hasarlı Hücre Yüzdesi ortalama değerlerinin karşılaştırılması

Madde	Doz (mg/kg)	N	Genetik Hasar İndeksi	Hasarlı Hücre Yüzdesi
Negatif Kontrol	Distile su	4	0.36 ± 0.12	0.00 ± 0.00
	Çözücü	4	0.54 ± 0.02	0.00 ± 0.00
Levodopa^a	10	4	0.88 ± 0.40***	0.18 ± 0.19
	50	4	1.46 ± 0.11***	0.40 ± 0.05***
	100	4	1.73 ± 0.29***	0.53 ± 0.24***
Karbidopa^b	1	4	0.49 ± 0.07	0.005 ± 0.01
	5	4	0.51 ± 0.10	0.00 ± 0.00
	10	4	0.52 ± 0.05	0.00 ± 0.00
Levodopa/Karbidopa^b	10/1	4	1.13 ± 0.03***	0.10 ± 0.02
	50/5	4	1.49 ± 0.13***	0.39 ± 0.06***
	100/10	4	1.60 ± 0.05***	0.40 ± 0.02***
Üridin^a	100	4	0.38 ± 0.06	0.00 ± 0.00
	100/10	4	0.34 ± 0.07***	0.00 ± 0.00
Üridin/Levodopa^c	100/50	4	0.22 ± 0.11***	0.00 ± 0.00***
	100/100	4	0.28 ± 0.05***	0.00 ± 0.00***
	100/10/1	4	0.35 ± 0.05***	0.00 ± 0.00
Üridin/Levodopa/Karbidopa^d	100/50/5	4	0.26 ± 0.07***	0.00 ± 0.00***
	100/100/10	4	0.27 ± 0.03***	0.00 ± 0.00***
Pozitif Kontrol (EMS)	300	4	3.00 ± 0.14	0.99 ± 0.01

a : Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma

b : Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma

c : Levodopa doz grupları ile karşılaştırma

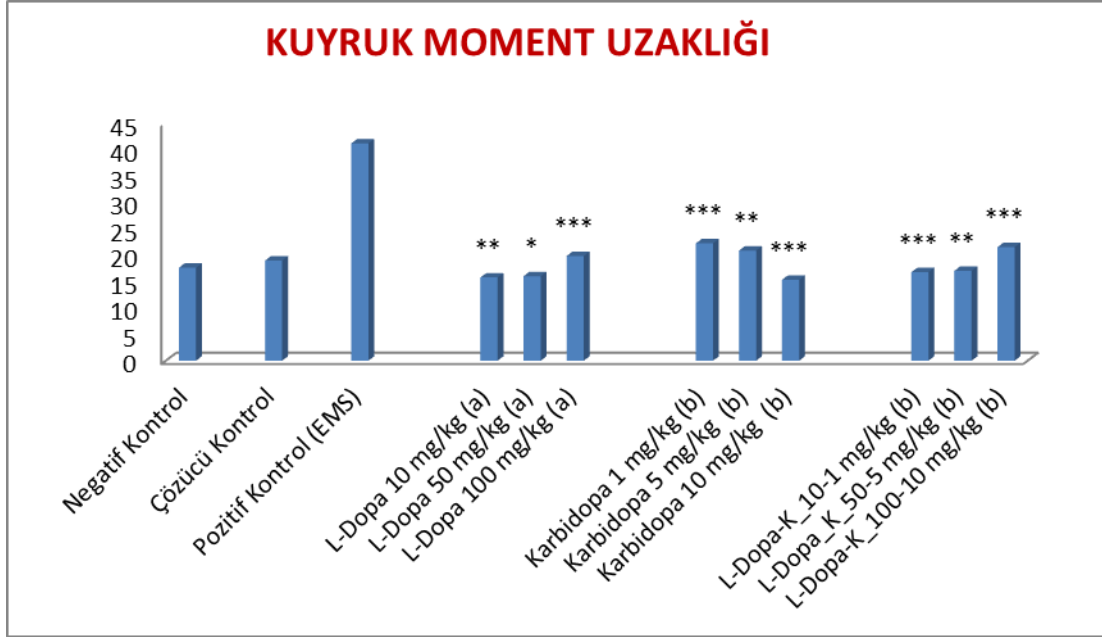
d : Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma

* : p < 0,05

** : p < 0,001

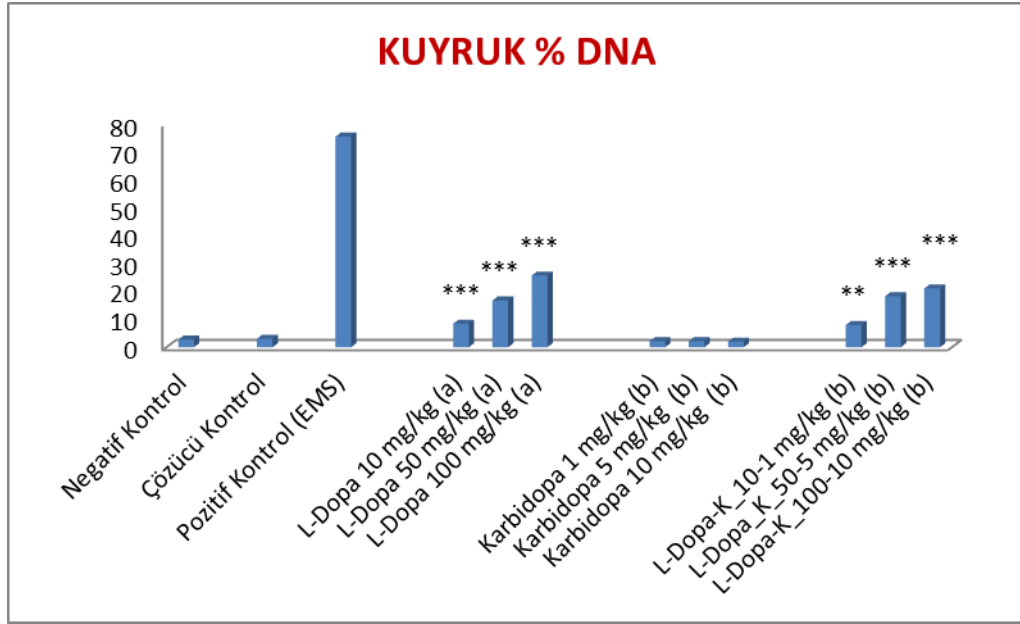
*** : p < 0,0001

Kuyruk moment uzaklık oranı ise negatif kontrol grubunda 17,58 μm , 10 mg/kg doz grubunda 15,75 μm , 50 mg/kg doz grubunda 15,98 μm , 100 mg/kg doz grubunda 19,81 μm olarak bulundu ve kontrole göre her üç doz grubunda da istatistiksel anlamlılık olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2.2, $p < 0,001$, $p < 0,05$, $p < 0,0001$, sırasıyla).



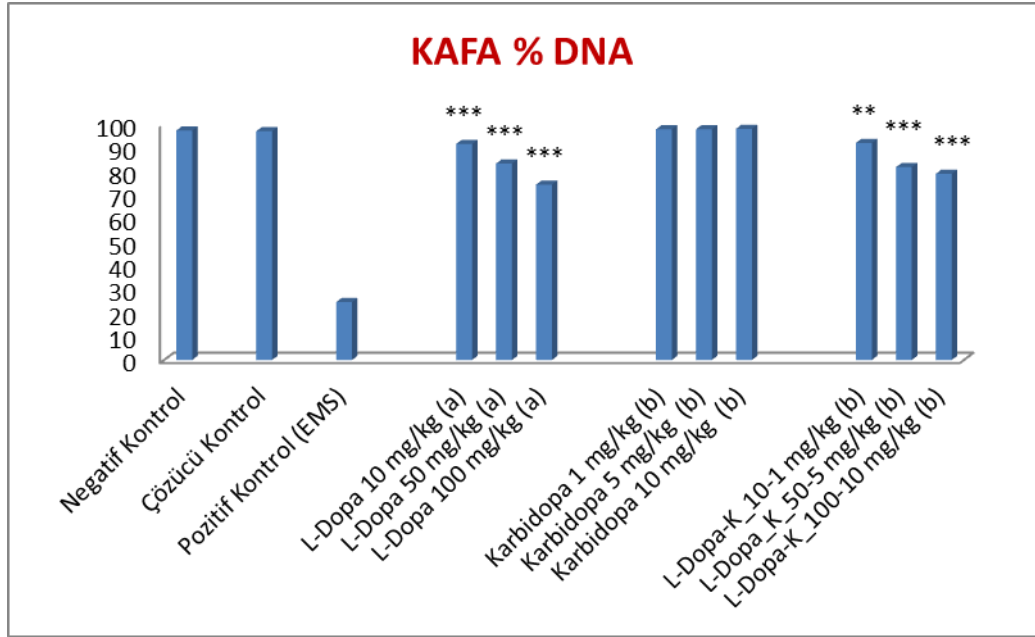
Şekil 4.2.2. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Kuyruk Moment Uzaklıklarının kontrol grubu ile karşılaştırılması (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,001$, ***: $p < 0,001$, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma)

Komet Kuyruk % DNA oranlarına bakıldığında negatif kontrol grubundaki değer % 2,76 iken 10, 50, 100 mg/kg doz gruplarında sırasıyla % 8,42, 16,75 ve 25,66 olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doza bağlı bir artışın söz konusu olduğu ve bu artışın her üç doz grubunda da istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.2.3, $p < 0,0001$).



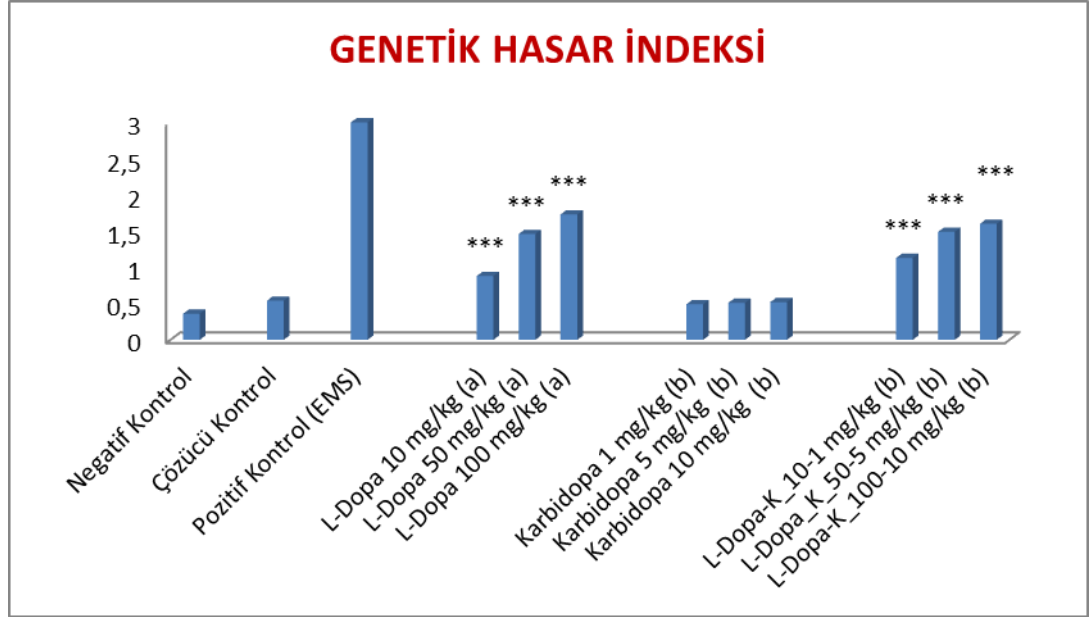
Şekil 4.2.3. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Kuyruk % DNA'larının kontrol grubu ile karşılaştırılması (**: $p < 0,001$, ***: $p < 0,0001$, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma)

Kafa % DNA oranlarına bakıldığında negatif kontrol grubundaki değer % 97,24 iken 10, 50, 100 mg/kg doz gruplarında sırasıyla % 91,58, 83,25 ve 74,34 olduğu gözlemlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doz artışına bağlı olarak kafa % DNA'sında bir azalışın olduğu ve her üç doz grubunda bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.2.4, $p < 0,0001$).



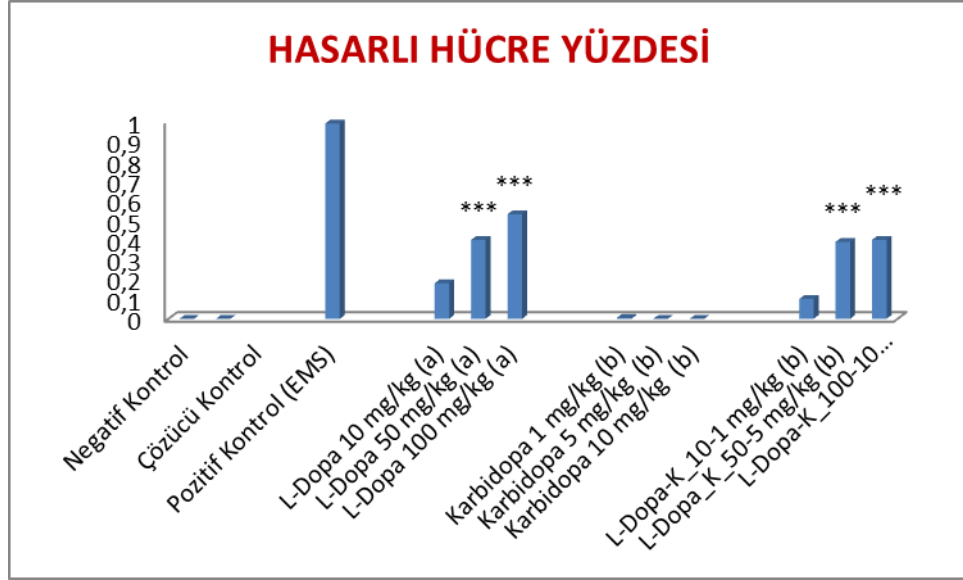
Şekil 4.2.4. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Kafa % DNA'larının kontrol grubu ile karşılaştırılması (**: $p < 0,001$, ***: $p < 0,0001$, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma)

Genetik hasar indeksi verileri değerlendirildiğinde negatif kontrol grubunda 0,36, 10 mg/kg doz grubunda 0,88, 50 mg/kg doz grubunda 1,46 ve 100 mg/kg doz grubunda 1,73 olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doza bağlı bir artış meydana geldiği gözlemlendi. Her üç doz grubunda meydana gelen bu artış istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.2.5, $p < 0,0001$).



Şekil 4.2.5. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Komet Testinin Genetik Hasar İndeksi'nin kontrol grubu ile karşılaştırılması (***: $p < 0,0001$, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma)

Hasarlı hücre yüzde oranları negatif kontrol grubunda % 0, Levodopa'nın 10, 50 ve 100 mg/kg doz gruplarında sırasıyla % 18, 40 ve 53 olarak belirlendi. 50 ve 100 mg/kg doz gruplarında meydana gelen artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2.6, $p < 0,0001$).



Şekil 4.2.6. Levodopa ve Karbidopa ile gerçekleştirilen Komet Testinin Hasarlı Hücre Yüzdesi'nin kontrol grubu ile karşılaştırılması (***) $p < 0,0001$, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma)

Karbidopa ilacı ile gerçekleştirilen Komet Testi verileri Çizelge 4.2.1 ve 4.2.2'de verilmiştir.

Karbidopa uygulamasından 24 saat sonra gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, Komet kuyruk uzunlukları oranı çözücü kontrol grubunda $8,99 \mu\text{m}$, 1 mg/kg'lık doz grubunda $7,40 \mu\text{m}$, 5 mg/kg doz grubunda $7,31 \mu\text{m}$, 10 mg/kg doz grubunda $4,37 \mu\text{m}$ olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sadece 10 mg/kg doz grubundaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.2.1, $p < 0,0001$).

Kuyruk moment uzaklık oranı ise çözücü kontrol grubunda $18,93 \mu\text{m}$, 1 mg/kg doz grubunda $22,19 \mu\text{m}$, 5 mg/kg doz grubunda $20,83 \mu\text{m}$, 10 mg/kg doz grubunda

15,30 µm olarak bulundu ve kontrole göre her 3 doz grubunda da istatistiksel anlamlılık olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2.2, $p<0,0001$, $p<0,001$, $p<0,0001$, sırasıyla).

Komet Kuyruk % DNA oranlarına bakıldığında çözücü kontrol grubundaki değer % 3,03 iken 1, 5, 10 mg/kg doz gruplarında sırasıyla % 2,20, 2,17 ve 1,99 olduğu ve çözücü kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin olmadığı belirlendi (Şekil 4.2.3).

Kafa % DNA oranlarına bakıldığında çözücü kontrol grubundaki değer % 96,97 iken 1, 5 ve 10 mg/kg doz gruplarında sırasıyla % 97,80, 97,83 ve 98,01 olduğu gözlemlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kafa % DNA'sında istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin olmadığı belirlendi (Şekil 4.2.4).

Genetik hasar indeksi verileri değerlendirildiğinde çözücü kontrol grubunda 0,54, 1 mg/kg doz grubunda 0,49, 5 mg/kg doz grubunda 0,51 ve 10 mg/kg doz grubunda 0,52 olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her üç doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin olmadığı belirlendi (Şekil 4.2.5).

Hasarlı hücre yüzde oranları çözücü kontrol grubunda 0, Karbidopa'nın 1 mg/kg doz grubunda % 5, 5 ve 10 mg/kg doz gruplarında 0 olarak belirlendi ve her üç doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin olmadığı belirlendi (Şekil 4.2.6).

Levodopa ve Karbidopa ilaçlarının kombine uygulamaları ile gerçekleştirilen Komet Testi verileri Çizelge 4.2.1 ve 4.2.2'de verilmiştir.

24 saatlik Levodopa/Karbidopa kombine uygulaması sonucu gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, Komet kuyruk uzunlukları oranı çözücü kontrol grubunda 8,99 µm, 10/1 mg/kg'lık doz grubunda 12,10 µm, 50/5 mg/kg doz grubunda 15,42 µm, 100 mg/kg doz grubunda 21,95 µm olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 50/5 ve 100/10 mg/kg doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.2.1, $p<0,0001$).

Kuyruk moment uzaklık oranı ise çözücü kontrol grubunda 18,93 μm , 10/1 mg/kg doz grubunda 16,75 μm , 50/5 mg/kg doz grubunda 17,00 μm , 100/10 mg/kg doz grubunda 21,48 μm olarak bulundu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doza bağlı bir artışın söz konusu olduğu ve her üç doz grubu için bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.2.2, $p<0,0001$, $p<0,001$, $p<0,0001$, sırasıyla).

Komet Kuyruk % DNA oranlarına bakıldığında çözücü kontrol grubundaki değer % 3,03 iken 10/1, 50/5 ve 100/10 mg/kg doz gruplarında sırasıyla % 7,96, 18,26 ve 21,07 olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doza bağlı bir artışın söz konusu olduğu ve bu artışın her üç doz grubu için istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.2.3, $p<0,001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, sırasıyla).

Kafa % DNA oranlarına bakıldığında çözücü kontrol grubundaki değer % 96,97 iken 10/1, 50/5 ve 100/10 mg/kg doz gruplarında sırasıyla % 92,04, 81,74 ve 78,93 olduğu gözlemlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doz artışına bağlı olarak kafa % DNA'sında bir azalışın olduğu ve her doz grubunda bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.2.4, $p<0,001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, sırasıyla).

Genetik hasar indeksi verileri değerlendirildiğinde çözücü kontrol grubunda 0,54, 10/1 mg/kg doz grubunda 1,13, 50/5 mg/kg doz grubunda 1,49 ve 100/10 mg/kg doz grubunda 1,60 olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doza bağlı bir artışın meydana geldiği gözlemlendi. Her üç doz grubunda meydana gelen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.2.5, $p<0,0001$).

Hasarlı hücre yüzde oranları çözücü kontrol grubunda % 0, Levodopa/Karbidopa kombinasyonu 10/1, 50/5 ve 100/10 mg/kg doz gruplarında sırasıyla % 10, 39 ve 40 olarak belirlendi ve 50 ve 100 mg/kg doz gruplarında meydana gelen artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2.6, $p<0,0001$).

Üridin ile gerçekleştirilen Komet Testi verileri Çizelge 4.2.1 ve 4.2.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2.1. Levodopa, Karbidopa ve Üridin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet Testinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması

Madde	Doz (mg/kg)	N	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Moment Uzaklığı (µm)	Kuyruk % DNA	Kafa % DNA
Negatif Kontrol	Distile su	4	6.69 ± 5.87	17.58 ± 2.47	2.76 ± 3.11	97.24 ± 3.10
	Çözücü	4	8.99 ± 5.48	18.93 ± 2.33	3.03 ± 2.44	96.97 ± 2.44
Levodopa ^a	10	4	10.01 ± 10.16*	15.75 ± 4.39**	8.42 ± 12.73***	91.58 ± 12.73***
	50	4	14.48 ± 10.59***	15.98 ± 4.53*	16.75 ± 16.87***	83.25 ± 16.87***
	100	4	22.34 ± 17.97***	19.81 ± 7.95***	25.66 ± 23.27***	74.34 ± 23.27***
Karbidopa ^b	1	4	7.40 ± 5.15	22.19 ± 3.61***	2.20 ± 1.97	97.80 ± 1.97
	5	4	7.31 ± 5.38	20.83 ± 3.47**	2.17 ± 1.85	97.83 ± 1.85
	10	4	4.37 ± 2.17***	15.30 ± 1.56***	1.99 ± 1.79	98.01 ± 1.79
Levodopa/Karbidopa ^b	10/1	4	12.10 ± 8.04***	16.75 ± 4.60***	7.96 ± 8.10**	92.04 ± 8.10**
	50/5	4	15.42 ± 9.19***	17.00 ± 3.90**	18.26 ± 17.84***	81.74 ± 17.84***
	100/10	4	21.94 ± 14.41***	21.48 ± 6.11***	21.07 ± 21.57***	78.93 ± 21.57***
Üridin ^a	100	4	5.97 ± 4.30	20.78 ± 3.17***	2.28 ± 2.52	97.72 ± 2.52
	100/10	4	4.78 ± 3.13***	20.39 ± 1.73***	1.87 ± 2.30***	98.13 ± 2.30***
Üridin/Levodopa ^c	100/50	4	5.39 ± 4.08***	21.59 ± 2.48***	1.29 ± 1.57***	98.71 ± 1.57***
	100/100	4	4.52 ± 2.66***	20.24 ± 2.07	1.19 ± 1.34***	98.81 ± 1.34***
	100/10/1	4	5.15 ± 3.03***	18.25 ± 1.77*	1.39 ± 1.34***	98.61 ± 1.34***
Üridin/Levodopa/Karbidopa ^d	100/50/5	4	4.49 ± 3.08***	18.76 ± 1.55**	1.16 ± 1.33***	98.84 ± 1.34***
	100/100/10	4	5.12 ± 4.26***	19.20 ± 2.48***	1.23 ± 1.45***	98.77 ± 1.45***
Pozitif Kontrol (EMS)	300	4	68.48 ± 21.06	41.11 ± 9.10	75.48 ± 21.33	24.52 ± 21.33

- a : Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma
b : Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma
c : Levodopa doz grupları ile karşılaştırma
d : Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma
* : p < 0,05
** : p < 0,001
*** : p < 0,0001

Çizelge 4.2.2. Levodopa, Karbidopa ve Üridin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet Testinin Genetik Hasar İndeksi ve Hasarlı Hücre Yüzdesi ortalama değerlerinin karşılaştırılması

Madde	Doz (mg/kg)	N	Genetik Hasar İndeksi	Hasarlı Hücre Yüzdesi
Negatif Kontrol	Distile su	4	0.36 ± 0.12	0.00 ± 0.00
	Çözücü	4	0.54 ± 0.02	0.00 ± 0.00
Levodopa^a	10	4	0.88 ± 0.40 ^{***}	0.18 ± 0.19
	50	4	1.46 ± 0.11 ^{***}	0.40 ± 0.05 ^{***}
	100	4	1.73 ± 0.29 ^{***}	0.53 ± 0.24 ^{***}
Karbidopa^b	1	4	0.49 ± 0.07	0.005 ± 0.01
	5	4	0.51 ± 0.10	0.00 ± 0.00
	10	4	0.52 ± 0.05	0.00 ± 0.00
Levodopa/Karbidopa^b	10/1	4	1.13 ± 0.03 ^{***}	0.10 ± 0.02
	50/5	4	1.49 ± 0.13 ^{***}	0.39 ± 0.06 ^{***}
	100/10	4	1.60 ± 0.05 ^{***}	0.40 ± 0.02 ^{***}
Üridin^a	100	4	0.38 ± 0.06	0.00 ± 0.00
	100/10	4	0.34 ± 0.07 ^{***}	0.00 ± 0.00
Üridin/Levodopa^c	100/50	4	0.22 ± 0.11 ^{***}	0.00 ± 0.00 ^{***}
	100/100	4	0.28 ± 0.05 ^{***}	0.00 ± 0.00 ^{***}
	100/10/1	4	0.35 ± 0.05 ^{***}	0.00 ± 0.00
Üridin/Levodopa/Karbidopa^d	100/50/5	4	0.26 ± 0.07 ^{***}	0.00 ± 0.00 ^{***}
	100/100/10	4	0.27 ± 0.03 ^{***}	0.00 ± 0.00 ^{***}
Pozitif Kontrol (EMS)	300	4	3.00 ± 0.14	0.99 ± 0.01

a : Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma

b : Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma

c : Levodopa doz grupları ile karşılaştırma

d : Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma

* : p < 0,05

** : p < 0,001

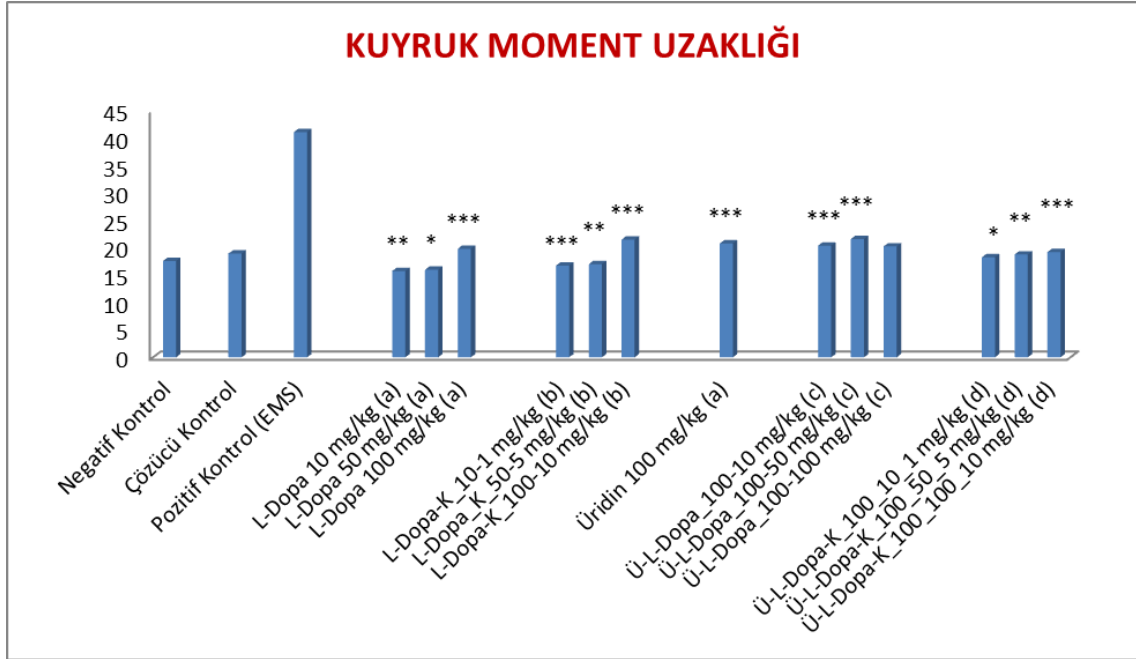
*** : p < 0,0001

Üridin uygulamasından 24 saat sonra gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, Komet kuyruk uzunlukları oranı negatif kontrol grubunda 6,69 μm ve 100 mg/kg Üridin doz grubunda 5,97 μm olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin olmadığı belirlendi (Şekil 4.2.7).



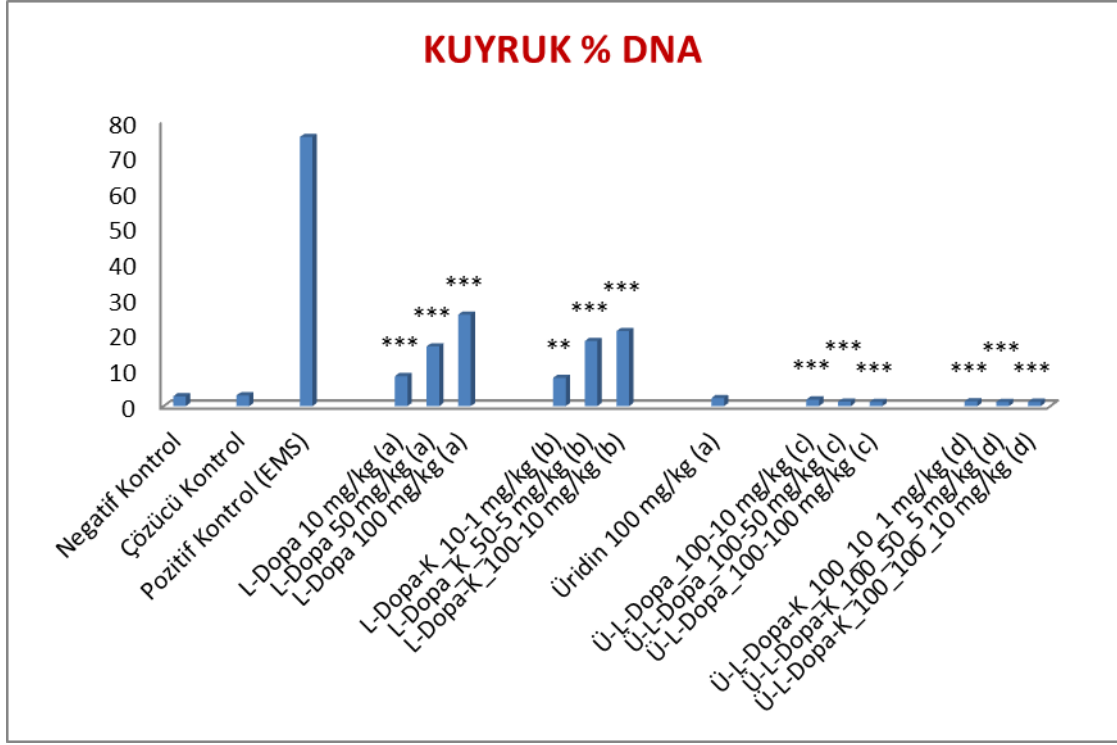
Şekil 4.2.7. Üridin ve L-Dopa ve Karbidopa'nın Üridin kombinasyonları ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Kuyruk Uzunluğu oranlarının karşılaştırılması (*: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma, c: Levodopa doz grupları ile karşılaştırma, d: Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma)

Kuyruk moment uzaklık oranı ise negatif kontrol grubunda 17,58 μm ve 100 mg/kg Üridin doz grubunda 20,78 μm olarak bulundu ve kontrole göre 100 mg/kg doz grubunda istatistiksel anlamlılık olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2.8, $p < 0,0001$).



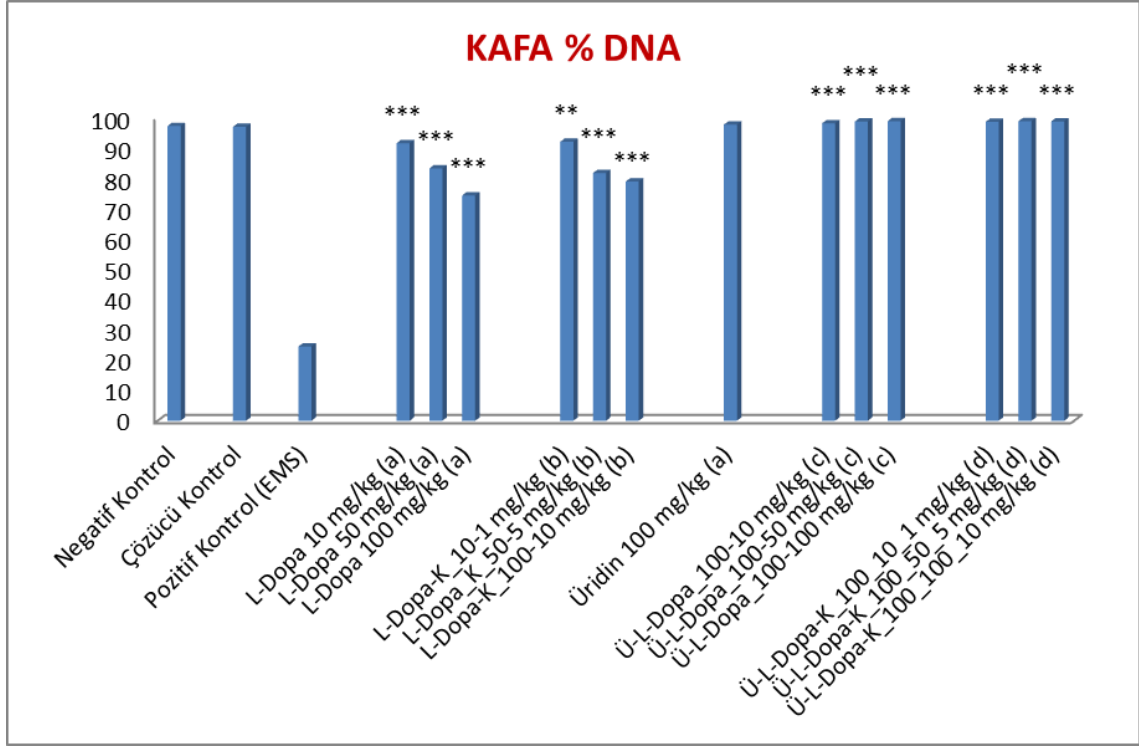
Şekil 4.2.8. Üridin ve L-Dopa ve Karbidopa'nın Üridin kombinasyonları ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Kuyruk Moment Uzaklığı oranlarının karşılaştırılması (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,001$, ***: $p < 0,001$, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma, c: Levodopa doz grupları ile karşılaştırma, d: Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma)

Komet Kuyruk % DNA oranlarına bakıldığında negatif kontrol grubundaki değer % 2,76 iken 100 mg/kg doz grubunda % 2,28 olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin olmadığı belirlendi (Şekil 4.2.9).



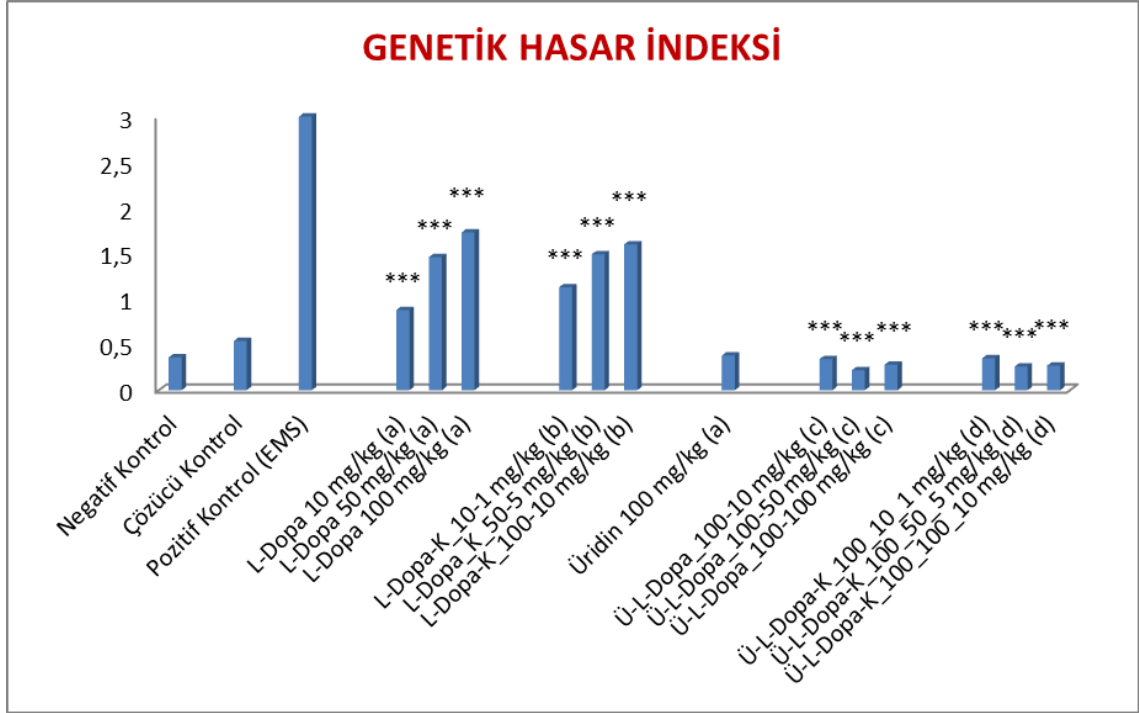
Şekil 4.2.9. Üridin ve L-Dopa ve Karbidopa'nın Üridin kombinasyonları ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Kuyruk % DNA oranlarının karşılaştırılması (**: $p < 0,001$, ***: $p < 0,0001$, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma, c: Levodopa doz grupları ile karşılaştırma, d: Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma)

Kafa % DNA oranlarına bakıldığında negatif kontrol grubundaki değer % 97,24 iken 100 mg/kg Üridin doz grubunda % 97,72 olduğu gözlemlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kafa % DNA'sında istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin olmadığı belirlendi (Şekil 4.2.10).



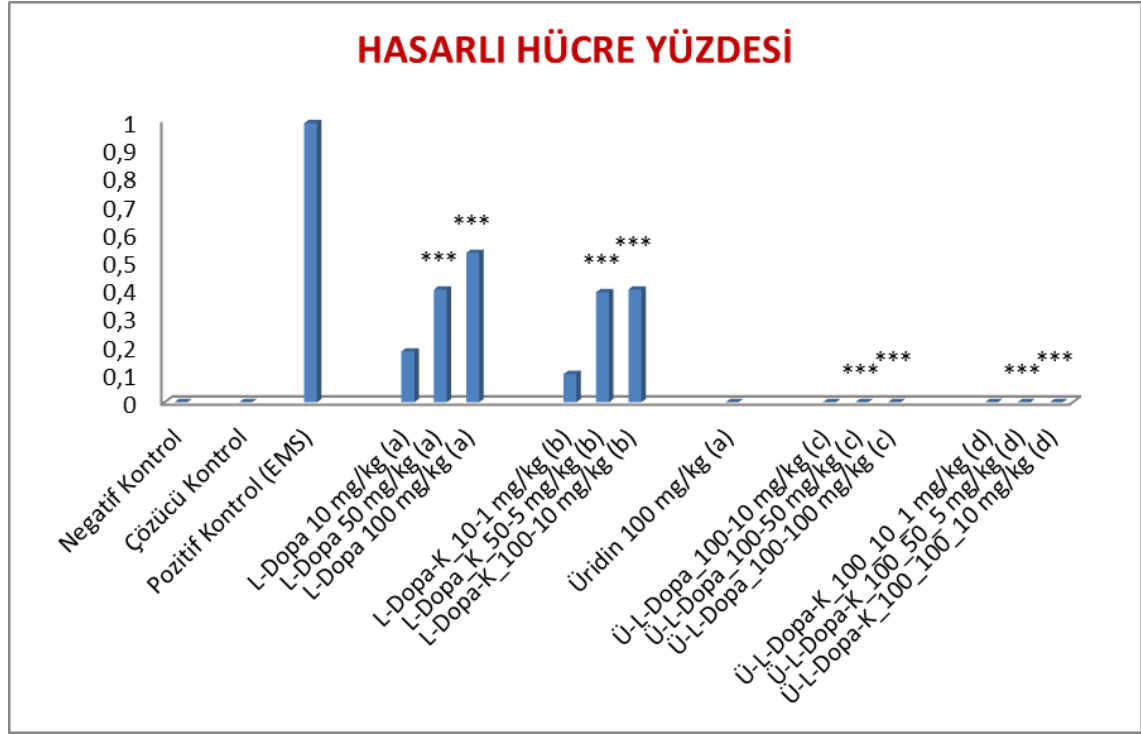
Şekil 4.2.10. Üridin ve L-Dopa ve Karbidopa'nın Üridin kombinasyonları ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Kafa % DNA oranlarının karşılaştırılması (**: $p < 0,001$, ***: $p < 0,0001$, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma, c: Levodopa doz grupları ile karşılaştırma, d: Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma)

Genetik hasar indeksi verileri değerlendirildiğinde negatif kontrol grubunda 0,36 ve Üridin'in 100 mg/kg doz grubunda 0,38 olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin olmadığı belirlendi (Şekil 4.2.11).



Şekil 4.2.11. Üridin ve L-Dopa ve Karbidopa'nın Üridin kombinasyonları ile gerçekleştirilen Komet Testinin Genetik Hasar İndeksi oranlarının karşılaştırılması (***) : $p < 0,0001$, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma, c: Levodopa doz grupları ile karşılaştırma, d: Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma)

Hasarlı hücre yüzde oranları negatif kontrol grubunda 0, Üridin'in 100 mg/kg doz grubunda da 0 olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin olmadığı belirlendi (Şekil 4.2.12).



Şekil 4.2.12. Üridin ve L-Dopa ve Karbidopa'nın Üridin kombinasyonları ile gerçekleştirilen Komet Testinin Hasarlı Hücre Yüzdesi oranlarının karşılaştırılması (***) : $p < 0,0001$, a: Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, b: Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırma, c: Levodopa doz grupları ile karşılaştırma, d: Levodopa-Karbidopa kombine doz grupları ile karşılaştırma)

Üridin'in 100 mg/kg dozu, Levodopa'nın 10, 50 ve 100 mg/kg dozları ile kombine bir şekilde uygulanarak test edildi. Üridin/Levodopa kombinasyonları ile elde edilen tüm Komet Testi verileri Çizelge 4.2.1 ve 4.2.2'de verilmektedir.

Üridin/Levodopa kombine uygulamasından 24 saat sonra gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, Komet kuyruk uzunluğu oranları, Üridin/Levodopa 100/10 mg/kg doz grubunda 4,78 μm , 100/50 mg/kg doz grubunda 5,39 μm ve 100/100 mg/kg doz grubunda 4,52 μm olarak belirlendi. 100 mg/kg Üridin uygulamasının, 10, 50 ve 100 mg/kg Levodopa uygulaması sonrasında ölçülen kuyruk

uzunluğu oranlarını sırasıyla 2,09, 2,69 ve 4,94 kat azalttığı bulundu. Her üç doz grubundaki azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.2.7, $p<0,0001$).

Kuyruk moment uzaklık oranları ise Üridin/Levodopa 100/10 mg/kg doz grubunda 20,39 μm , 100/50 mg/kg doz grubunda 21,59 μm ve 100/100 mg/kg doz grubunda 20,24 μm olarak belirlendi. 100/10 ve 100/50 mg/kg doz grubunda istatistiksel anlamlılık olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2.8, $p<0,0001$).

Komet Kuyruk % DNA oranlarına bakıldığında Üridin/Levodopa 100/10 mg/kg doz grubunda % 1,87, 100/50 mg/kg doz grubunda % 1,29, 100/100 mg/kg doz grubunda % 1,19 olarak belirlendi. 100 mg/kg Üridin uygulamasının, 10, 50 ve 100 mg/kg Levodopa uygulamasının meydana getirdiği Kuyruk % DNA oranlarını sırasıyla 4,50, 12,98 ve 21,56 kat azalttığı bulundu. Her üç doz grubundaki azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.2.9, $p<0,0001$).

Kafa % DNA oranlarına bakıldığında Üridin/Levodopa 100/10 mg/kg doz grubunda % 98,13, 100/50 mg/kg doz grubunda % 98,71, 100/100 mg/kg doz grubunda % 98,81 olarak belirlendi. 100 mg/kg Üridin uygulamasının, 10, 50 ve 100 mg/kg Levodopa uygulamasının meydana getirdiği Kafa % DNA oranlarını sırasıyla 1,07, 1,19 ve 1,32 kat arttırdığı bulundu. Her üç doz grubundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.2.10, $p<0,0001$).

Genetik hasar indeksi verileri değerlendirildiğinde Üridin/Levodopa 100/10 mg/kg doz grubunda 0,34, 100/50 mg/kg doz grubunda 0,22, 100/100 mg/kg doz grubunda 0,28 olarak belirlendi. 100 mg/kg Üridin uygulamasının, 10, 50 ve 100 mg/kg Levodopa uygulaması sonucu hesaplanan genetik hasar indeksi oranlarını sırasıyla 2,59, 6,64 ve 6,18 kat azalttığı bulundu. Her üç doz grubundaki azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.2.11, $p<0,0001$).

Hasarlı hücre yüzde oranları Üridin/Levodopa 100/10, 100/50 ve 100/100 mg/kg doz gruplarında 0 olarak belirlendi. 100 mg/kg Üridin uygulamasının, 10, 50 ve 100 mg/kg

Levodopa uygulaması sonucu hesaplanan Hasarlı hücre yüzde oranlarını azalttığı ve Üridin/Levodopa 100/50 ve 100/100 mg/kg doz gruplarındaki azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.2.12, $p<0,0001$).

Üridin'in 100 mg/kg dozu, Levodopa/Karbidopa kombinasyonununun 10/1, 50/5 ve 100/10 mg/kg dozları ile kombine bir şekilde uygulanarak test edildi. Üridin/Levodopa/Karbidopa kombinasyonları ile elde edilen tüm Komet Testi verileri Çizelge 4.2.1 ve 4.2.2'de verilmektedir.

Üridin/Levodopa/Karbidopa kombine uygulamasından 24 saat sonra gerçekleştirilen Komet Testi sonuçları değerlendirildiğinde, Komet kuyruk uzunluğu oranları, Üridin/Levodopa/Karbidopa 100/10/1 mg/kg doz grubunda 5,15 μm , 100/50/5 mg/kg doz grubunda 4,49 μm , 100/100/10 mg/kg doz grubunda 5,12 μm olarak belirlendi. 100 mg/kg Üridin uygulamasının, 10/1, 50/5 ve 100/10 mg/kg Levodopa/Karbidopa uygulaması sonrasında ölçülen kuyruk uzunluğu oranlarını sırasıyla 2,35, 3,43 ve 4,29 kat azalttığı bulundu. Her üç doz grubundaki azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.2.7, $p<0,0001$).

Kuyruk moment uzaklık oranları ise Üridin/Levodopa/Karbidopa 100/10/1 mg/kg doz grubunda 18,25 μm , 100/50/5 mg/kg doz grubunda 18,76 μm , 100/100/10 mg/kg doz grubunda 19,20 μm olarak belirlendi. Her üç doz grubunda istatistiksel anlamlılık olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2.8, $p<0,05$, $p<0,001$, $p<0,0001$).

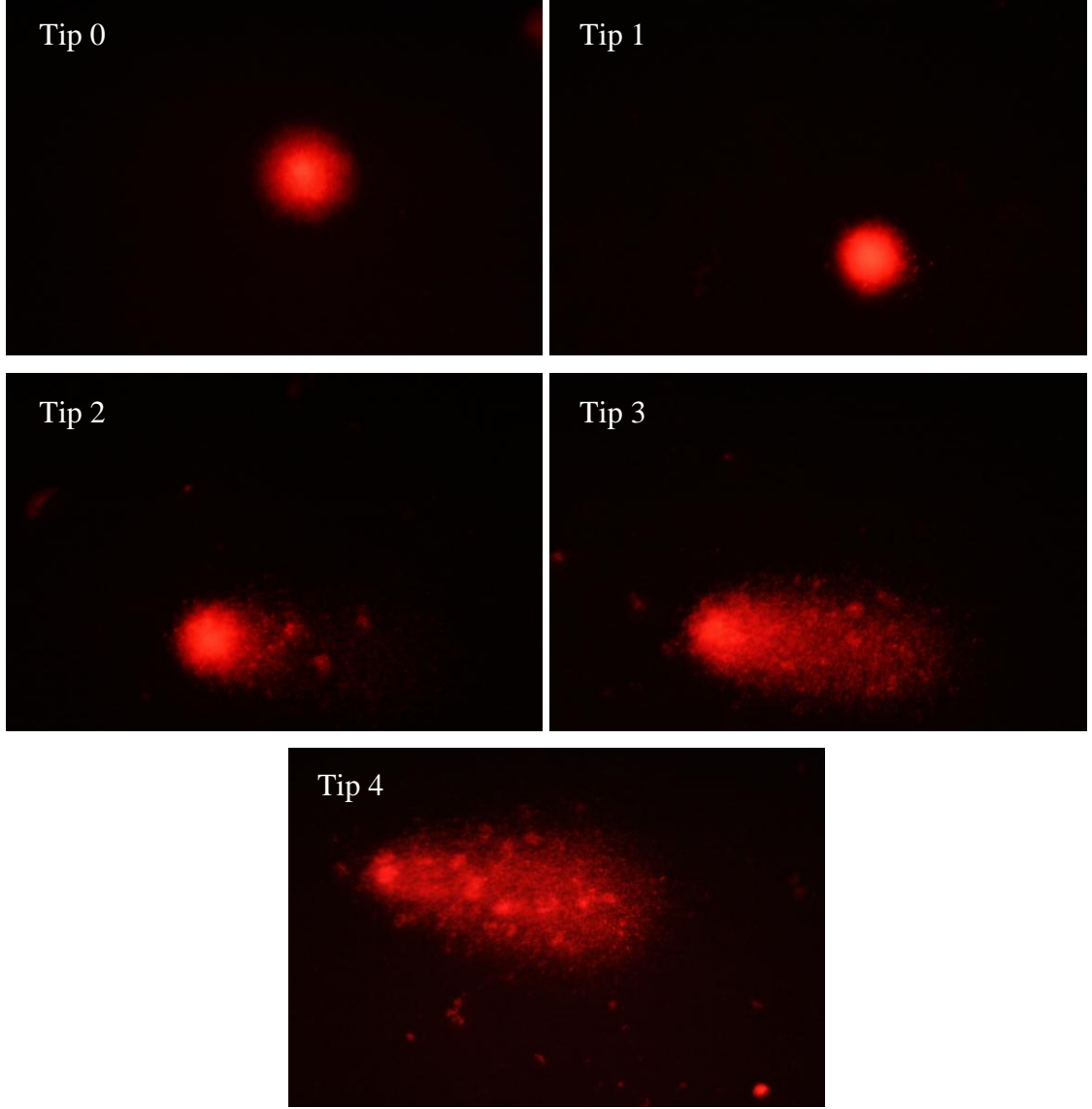
Komet Kuyruk % DNA oranlarına bakıldığında Üridin/Levodopa/Karbidopa 100/10/1 mg/kg doz grubunda % 1,39, 100/50/5 mg/kg doz grubunda % 1,16, 100/100/10 mg/kg doz grubunda % 1,23 olarak belirlendi. 100 mg/kg Üridin uygulamasının, 10/1, 50/5 ve 100/10 mg/kg Levodopa/Karbidopa uygulamasının meydana getirdiği Kuyruk % DNA oranlarını sırasıyla 5,73, 15,74 ve 17,13 kat azalttığı bulundu. Her üç doz grubundaki azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.2.9, $p<0,0001$).

Kafa % DNA oranlarına bakıldığında Üridin/Levodopa/Karbidopa 100/10/1 mg/kg doz grubunda % 98,61, 100/50/5 mg/kg doz grubunda % 98,84, 100/100/10 mg/kg doz grubunda % 98,77 olarak belirlendi. 100 mg/kg Üridin uygulamasının, 10/1, 50/5 ve 100/10 mg/kg Levodopa/Karbidopa uygulamasının meydana getirdiği Kafa % DNA oranlarını sırasıyla 1,07, 1,21 ve 1,25 kat arttırdığı bulundu. Her üç doz grubundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.2.10, $p < 0,0001$).

Genetik hasar indeksi verileri değerlendirildiğinde Üridin/Levodopa/Karbidopa 100/10/1 mg/kg doz grubunda 0,35, 100/50/5 mg/kg doz grubunda 0,26, 100/100/10 mg/kg doz grubunda 0,27 olarak belirlendi. 100 mg/kg Üridin uygulamasının, 10/1, 50/5 ve 100/10 mg/kg Levodopa/Karbidopa uygulaması sonucu hesaplanan genetik hasar indeksi oranlarını sırasıyla 3,23, 5,73 ve 5,93 kat azalttığı bulundu. Her üç doz grubundaki azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.2.11, $p < 0,0001$).

Hasarlı hücre yüzde oranları Üridin/Levodopa/Karbidopa 100/10/1, 100/50/5 ve 100/100/10 mg/kg doz gruplarında 0 olarak belirlendi. 100 mg/kg Üridin uygulamasının, 10/1, 50/5 ve 100/10 mg/kg Levodopa/Karbidopa uygulaması sonucu hesaplanan Hasarlı hücre yüzde oranlarını azalttığı ve Üridin/Levodopa/Karbidopa 100/50/5 ve 100/100/10 mg/kg doz gruplarındaki azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.2.12, $p < 0,0001$).

Levodopa, Karbidopa ve Üridin ile gerçekleştirilen Komet Testi sonucunda gözlenen hücre tiplerinin fotoğrafları Şekil 4.2.13’de görülmektedir.



Şekil 4.2.13. Komet yöntemi ile agaroz jel üzerinde elektroforetik ortamda negatif kutuptan pozitif kutba doğru göç eden farklı seviyelerde hasara uğramış DNA’ların görüntüleri. Tip 0- Hasarsız DNA; Tip 1-Çok az hasarlanmış DNA; Tip 2-Az hasarlanmış DNA; Tip 3-Hasarlanmış DNA; Tip 4- Tümüyle hasarlanmış DNA.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Patofizyolojik birçok konu açıklığa kavuşturulmuş olsa dahi, Parkinson hastalığının altında yatan patojenik mekanizmalar tam anlamıyla anlaşılammıştır ve oksidatif stres temel etiyojik faktörlerden biri olarak görülmektedir.

Nörodegeneratif hastalıklara sahip hastaların beyinlerinde lipid peroksidasyon, protein, DNA ve mitokondriyal oksidasyon düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Olanow 1993, Pardo 1995).

Oksidatif stres, hücrel antioksidan savunmasının reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerini toksik eşiğinin altında tutmaya yetersiz olduğu durumlarda ortaya çıkar. Bu durum; aşırı ROS üretimi, antioksidan savunma kaybı (azalmış glutatyon GSH) ya da her ikisine bağlı olabilir. Nöronların yüksek metabolik değeri, yüksek bir ROS üretim temeli ve dopaminin oksidatif metabolizması sitotoksik serbest radikal ürettiği için, substantia nigra nöronları oksidatif strese bilhassa meyillidir (Perry ve ark. 1982, Youdim ve ark. 1997).

Bu çalışmada Parkinson hastalığında en yaygın kullanıma sahip Levodopa ve Karbidopa ilaçlarının üç farklı dozu kullanılarak *in vivo* genotoksik etkileri, Üridin'in ise antigenotoksik etkisi *Balb-c* türü erkek farelerde kemik iliği Mikronükleus ve Komet Test yöntemleri ile belirlendi.

Fare kemik iliği Mikronükleus Test sonuçlarına göre (Çizelge 4.1.1) Levodopa'nın 10, 50 ve 100 mg/kg doz gruplarındaki MNPCE oran artışının negatif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. Yine aynı testte sadece 50 mg/kg Levodopa doz grubunda PCE/NCE oranında kontrole göre anlamlı bir azalma gözlemlendi. Bu azalma Levodopa'nın hücre toksisitesine yol açtığını işaret etmektedir. Komet Testi verileri (Çizelge 4.2.1 ve 4.2.2) değerlendirildiğinde, kullanılan her üç Levodopa dozunun, doza bağlı olarak komet kuyruk uzunluğu, kuyruk moment uzaklığı, kuyruk % DNA, genetik hasar indeksi ve hasarlı hücre yüzdesinde meydana getirdiği artışın, aynı zamanda kafa % DNA'sında meydana getirdiği azalışın istatistiksel olarak

anlamli olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Levodopa'nın kullanılan dozlarda hücre toksisitesine sebep olduğu sonucu her iki testin sonuçları birlikte değerlendirildiğinde birbirini doğrular niteliktedir.

Çalışmada Levodopa ve Karbidopa birlikte, üç farklı dozda farelere uygulandı ve fare kemik iliği Mikronükleus Testi sonuçları (Çizelge 4.1.1) incelendiğinde kullanılan 50/5 ve 100/10 mg/kg doz gruplarındaki MNPCE oluşumunun çözücü kontrole göre anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. PCE/NCE oranları incelendiğinde her üç doz grubunda da çözücü kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. Komet Testi verileri (Çizelge 4.2.1 ve 4.2.2) göz önüne alındığında Komet kuyruk uzunlukları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; 50/5 ve 100/10 mg/kg doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu, kuyruk moment uzaklık oranlarının ise her üç doz grubu için istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. ,Kuyruk % DNA verileri değerlendirildiğinde her üç doz grubunda meydana gelen artışın, kafa % DNA verilerinde doz artışına bağlı olarak meydana gelen azalışın, genetik hasar indeks değerlerinde meydana gelen artışın ve hasarlı hücre yüzde oranları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 50/5 ve 100/10 mg/kg doz gruplarındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu sonuçlarına ulaşıldı.

Levodopanın toksik etkilerini hücre membran lipid peroksidasyonu ve parçalanması ve mitokondriyal elektron taşıma zincirinin inhibisyonu ile ortaya koyduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Olanow 1993, Pardo 1995).

Apoptozis aktif bir hücre ölüm programıdır ve Parkinson hastalığında nigrostriatal dopaminerjik nöronların ölümünde bir rolü olabileceği düşünölmüştür. Parkinson hastalığının ana tedavisinde kullanılan L-Dopa'nın kültüre alınmış post mitotik civciv sinaptik nöronlarında apoptozisi başlatıcı bir etkiye sahip olduğu Ziv ve ark. (1997) tarafından ortaya konmuştur. Hücrelerin L-Dopa'ya maruz kalması ile apoptozise özgü hücresel değişimler, membran blebleri ve nüklear fragmentasyon ortaya çıkmaktadır.

Yapılan bazı çalışmalarda da endojen bir nörotransmitter olan dopaminin çeşitli hücre hatlarında apoptozisi tetiklediği gösterilmiştir (Ziv ve ark. 1994,1995).

L-Dopa'nın otooksidasyonu genotoksisite ve apoptotik hücre ölümüne sebep olan reaktif oksijen türlerinin oluşturulmasına sebep olabilmektedir (Snyder ve ark. 1998). Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, uzun dönem L-Dopa maruziyeti dopaminerjik nöronal hücre ölümünü arttırabilmekte ve hastalık gelişimini hızlandırmaktadır. Çünkü L-Dopa serbest radikallerin oluşumunu tetikler ve mitokondrial enzimlerin aktivitesini engeller (Shin ve ark. 2009).

Dopamin ve L-Dopa'nın çeşitli hücre tiplerinde apoptotik hücre ölümünü indüklediği (Josefsson ve ark. 1996, Pardo ve ark. 1995, Walkinshaw ve ark. 1995) ve zayıf mutajenitesi, DNA zincir kırıklarının ve DNA adductlarının oluşumunu teşvik ettiği, bu sebeple, DNA reaktif olabileceği gösterilmiştir (Glatt 1990, Levay ve ark. 1993).

Çin hamster V79 hücreleri kimyasalların çeşitliliğine büyük ölçüde duyarlı olduğu için klastojenik olayların ortaya konmasında bu hücrelerin kullanımı yaygınlık göstermektedir. Herhangi bir memeli hücre tipinde katekolaminlerin otooksidasyonunun aynı şekilde gerçekleştirilmesi beklenir ve V79 hücreleri için elde edilen sonuçlar nöronlarda meydana gelen genel süreçler için bir model olarak görev yapar. L-Dopa ve dopaminin klastojenik aktivitelerinin doğrudan gösterilmesi sınırlıdır ve mevcut çalışmalar ilk olarak geçiş metallerinin varlığında katekolamin-indüklenmiş klastojenitenin belirgin artışını göstermiştir. Sadece mangan ve bakır değil, L-Dopa ya da dopamin ile kombinasyonu da, V79 hücre proliferasyonunun şiddetli inhibisyonuna neden olur, fakat aynı zamanda mikronükleus formasyonu geliştirir. Parçalara ayrılmış bu kromatin birimleri bir ilacın klastojenik aktivitesinin indikatörü gibi düşünülür ve diğer teknikler tarafından ölçülen kromozomal aberasyonların meydana gelişi ve mikronükleus formasyonu arasında iyi bir korelasyon bulunmaktadır (Snyder ve ark. 1998).

L-Dopa'nın kendisinin serbest radikallere dönüşmesinden dolayı Parkinson hastalığının bu ilaç nedeniyle kötüleşmesi olasılığını düşündürmektedir (Ogawa ve ark. 1993). Ogawa ve ark. (1994) yapmış olduğu çalışmada beyindeki nöronal hasarın bir göstergesi olarak lipid peroksidasyonunu normal farelerde ve 6-hidroksidopamin (6-OHDA) ile katekolamin nöronları hasarlanmış farelerde incelemiştir. Normal

farelerde kronik L-Dopa tedavisi lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan tiyobarbitürik asit-tepki maddeleri (TBARS)'nin seviyesini serebral kortekste azaltmıştır. Buna karşılık, 6-OHDA ile katekolamin nöronları hasarlanmış farelerde, striatal dopamin seviyelerinin geri dönüşü kontrol farelerine benzemesine rağmen, kronik L-Dopa tedavisi ile TBARS striatum ve frontal kortekste belirgin bir şekilde artmıştır. Bu bulgular, uzun süre yüksek doz L-Dopa tedavisinin, Parkinson hastalığında olduğu gibi katekolamin nöronları hasarlı hastalarda nöronal hasarın gelişimini arttırdığını ortaya koymaktadır (Ogawa ve ark. 1994).

L-Dopa'nın kronik alımı beyinde dopaminerjik ya da noradrenerjik sinir hücrelerini etkileyerek 6-hidroksidopamin (6-OHDA) oluşumuna neden olabilmektedir. L-Dopa'nın DA nöronlarına bu potansiyel toksisitesi Parkinson hastalığında, parkinsonizmin sebep olduğu nigrostriatal dejenerasyonun artışına ek bir neden olabileceği, ayrıca hastalığın ilerlemesini hızlandırabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Hefti ve ark. 1981, Borah ve ark. 2009).

Memeli beyinlerinin bazı bölgelerinde kendiliğinden meydana gelen bir grup alkaloid tespit edilmiştir. Bu bileşiklerden biri Salsolinol'dür (SAL; 1-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline). SAL ilk olarak L-Dopa tedavisi gören Parkinson hastalarının idrarlarında ve daha sonra insan beyinde bulunmuştur. SAL katekol bir kısma sahiptir, kuinoidal formu ve ana katekol arasındaki redoks döngüsü vasıtasıyla ROS ürettiği ve DNA hasarı ve genotoksisiteye sebep olduğu tahmin edilmektedir (Jung ve ark. 2001).

Üridin'in 100 mg/kg dozu ile gerçekleştirilen fare kemik iliği Mikronükleus Testi sonuçlarına göre (Çizelge 4.1.1) meydana gelen MNPCE oranı negatif kontrol grubu oranları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin olmadığı sonucuna varıldı. PCE/NCE oranları değerlendirildiğinde negatif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. Üridin ile gerçekleştirilen Komet Testi verileri değerlendirildiğinde komet kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA, kafa % DNA, GHİ ve hasarlı hücre yüzdesi oranları kontrol grubu ile

karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın söz konusu olmadığı sonucuna ulaşıldı.

100 mg/kg Üridin dozu Levodopanın 10, 50 ve 100 mg/kg dozları ile kombine olarak uygulandı. 24 saatlik uygulama sonucunda gerçekleştirilen fare kemik iliği Mikronükleus Testi sonuçlarına (Çizelge 4.1.1) göre Üridin uygulamasının 10, 50 ve 100 mg/kg Levodopa uygulamalarının meydana getirdiği MNPCE oranlarını sırasıyla 1,8, 2,15 ve 2,85 kat azalttığı ve Üridin/Levodopa kombinasyonunda 100/50 ve 100/100 mg/kg doz gruplarındaki azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. PCE/NCE oranları göz önüne alındığında sadece 100/50 mg/kg Üridin/Levodopa doz grubundaki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu sonucuna ulaşıldı. Komet Testi verilerine (Çizelge 4.2.1 ve 4.2.2) göre 100 mg/kg Üridin uygulamasının 10, 50 ve 100 mg/kg Levodopa uygulamaları sonucu ölçülen komet kuyruk uzunluğu oranlarını sırasıyla 2,09, 2,69 ve 4,94 kat azalttığı, kuyruk % DNA oranlarını sırasıyla 4,50, 12,98 ve 21,56 kat azalttığı belirlendi. GHİ değerlerini ise, sırasıyla 2,59, 6,64 ve 6,18 kat azalttığı ve bu azalmaların her üç doz grubu için istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi. Kafa % DNA oranlarına bakıldığında 100 mg/kg Üridin uygulamasının 10, 50 ve 100 mg/kg Levodopa doz gruplarında ölçülen değerleri sırasıyla 1,07, 1,19 ve 1,32 kat arttırdığı ve her üç doz grubu için bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. Üridin uygulamasının Levodopa uygulaması sonrasında hesaplanan hasarlı hücre yüzdelerinde azalmaya sebep olduğu ve Üridin/Levodopa 100/50 ve 100/100 mg/kg doz gruplarındaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu sonucuna ulaşıldı.

Üridin'in 100 mg/kg dozu, Levodopa/Karbidopa kombinasyonunun 10/1, 50/5 ve 100/10 mg/kg dozları ile birlikte farelere i.p. olarak verilmiştir. Yapılan fare kemik iliği Mikronükleus Testi sonuçlarına (Çizelge 4.1.1) göre kullanılan 100 mg/kg Üridin dozu, 10/1, 50/5 ve 100/100 mg/kg Levodopa/ Karbidopa uygulamasının meydana getirdiği MNPCE oranlarını sırasıyla 1,03, 2,37 ve 3,83 kat azalttığı ve Üridin/Levodopa/Karbidopa kombinasyonunun 100/50/5 ve 100/100/10 mg/kg doz gruplarındaki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. PCE/NCE oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişime rastlanmadı. Komet Testi

sonuçlarına (Çizelge 4.2.1 ve 4.2.2) göre 100 mg/kg Üridin uygulamasının, 10/1, 50/5 ve 100/10 mg/kg Levodopa/Karbidopa uygulaması sonucu ölçülen komet kuyruk uzunluğu oranlarını sırasıyla 2,35, 3,43 ve 4,29 kat azalttığı, kuyruk % DNA oranlarını sırasıyla 5,73, 15,74 ve 17,13 kat azalttığı belirlendi. GHİ oranlarını ise, sırasıyla 3,23, 5,73 ve 5,93 kat azalttığı ve yine Levodopa/Karbidopa ilaç uygulamaları sonucu hesaplanan hasarlı hücre yüzde oranlarını düşürdüğü bulundu. Her üç doz grubunda meydana gelen bu azalışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu sonucuna ulaşıldı. 100 mg/kg Üridin uygulandıktan sonra 10/1, 50/5 ve 100/10 mg/kg Levodopa/Karbidopa uygulamaları sonucu ölçülen kafa % DNA oranlarını sırasıyla 1,07, 1,21 ve 1,25 kat arttırdığını ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi.

Üridin bir pirimidin nükleosididir ve dolaşımda ve dokularda bulunur. Üridin, nükleotidlerin (mono-, di-, tri-fosfat), nükleotid şekerlerin (UDP-glukoz ve UDP-galaktoz) ve nükleik asitlerin (RNA) birleşmesi ile glikojen biyosentezi ve protein-lipid glikozilasyonu, gibi fizyolojik işlemlere katılır. Üridin ayrıca 5' monofosfat (UMP) Üridin kaynağıdır (Cansev ve ark. 2005). Üridin, kan beyin bariyerini kolayca geçer ve beyin hücrelerine girer (Cansev 2006). Üridin'in DHA ile birlikte verilmesi yetişkin gerbil beyinlerinde membran fosfolipidleri ve sinaptik proteinleri arttırdığı (Wurtman ve ark. 2006), aynı zamanda striatal DA, DOPAC ve HVA seviyelerini ve TH seviyelerini ve aktivitesini muhtemelen nigrostriatal terminallerin ve sinapsların sayı ve/veya büyüklüklerini arttırarak kısmen eski haline getirdiği (Cansev ve ark. 2008) yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir.

Pirimidin ve türevleri, DNA ve RNA sentezi, biyolojik membranların düzenlenmesinde ve glikojen ve glikolizasyon reaksiyon sentezleri gibi çok geniş çeşitlilikteki hücrel süreçlerle ilişkilidir. Üridin öncülü olan PN401'in, 3-nitropropionik asit (3NP), mitokondrial kompleks II inhibitör, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) ve mitokondrial kompleks I inhibitörlerinin sebep olduğu toksikolojiye karşı nöroprotektif olduğu gösterilmiştir (Garcia ve ark. 2005).

Substantia nigradaki dopaminerjik nöronların seçici kaybı nedeni ile Parkinson hastalığı meydana gelmektedir. UDP'nin hem kök hücre çoğalması hem de dopaminerjik farklılaşmasına yol açabildiğine dair bulgular mevcuttur (Lecca ve ark. 2008).

Üridin'in mitokondrial DNA'da viral kaynaklı meydana gelen hasarların onarılmasında da rol oynadığı (Venhoff ve ark. 2010) ve hücre toksisitesine karşı koruyucu olduğu (Saydoff ve ark. 2004) da yapılan çalışmalar ile doğrulanmıştır. Ayrıca Üridin'in normal insan nöronal progenitör (NHNP) hücrelerinde oksidatif stresin indüklediği hücre toksisitesini azalttığı ve H₂O₂'den dolayı oluşan ROS oluşumlarının azalmasında etkili olduğu bildirilmiştir.

Sinir sisteminde urasil nükleositlerinin biyokimyasal ve reseptör aracılı etkileri ile genel koruyucu aktiviteleri literatürde gösterilmiştir. Üridin ağır hipoglisemi ve iskemi sırasında, beyin metabolizmasını koruyarak, beyin fonksiyonlarını koruyucu bir etkisi olduğu gösterilmiştir (Lecca ve ark. 2008).

Mortalite ve serebrokortikal apoptozise neden olduğu bilinen azid infüzyonunun ardından Üridin öncülü olan PN401 uygulaması ile bu komplikasyonlarda azalma meydana geldiği de yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır (Saydoff ve ark. 2004).

Üridin'in, doza bağlı olarak sporadik Alzheimer hastalarının fibroblastlarında hücre toksisitesine karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (Saydoff ve ark. 2004).

Gözlemlere göre diyetle Üridin takviyesi paralel olarak kandaki ve beyindeki Üridin konsantrasyonlarını arttırabilmekte ve çeşitli beyin patolojileri için teröpatik bir ajan olarak geliştirilmesi için ilginç fırsatlara yol açmaktadır (Lecca ve ark. 2008).

Pek çok nörodejeneratif hastalığın etyolojisinde genetik yatkınlık, çevresel faktörler gibi çok sayıda etken yer almaktadır. Santral sinir sisteminde oksidan hasarı önleme kapasitesinin bozulması sonucu beyinde ve sinir sisteminde reaktif oksijen bileşiklerinin istenmeyen etkileri gözlenebilir. Hastalıkların ilerlemesi, serbest radikal oluşumları,

nöroinflamasyon ve nöronlardaki toksisite arasındaki ilişkilerin ortaya çıkarılması tedavi şekillerinin belirlenmesinde yararlı olacaktır.

Günümüzde Parkinson hastalığı etyolojisinde rol oynadığı bilinen faktörlere yönelik nöroprotektif tedavi arayışları yoğun bir şekilde sürmektedir. Nöroprotektif tedavide Parkinson hastalığı etyopatogenezinde rolü olduğu gösterilen oksidatif stres, eksitotoksisite, inflamasyon, apoptozis ve enerji metabolizmasındaki bozukluklar gibi mekanizmalar hedeflenmiştir. Bu amaçla MAO-B inhibitörleri (selegilin, rasagilin), DA reseptör agonistleri (pergolide, pramipexole, ropinirole, apomorfın), glutamat (NMDA) antagonistleri (Riluzole), serbest radikal süpürücüleri (Vitamin E), kaspaz inhibitörleri (Minosiklin, cephalon), Koenzim Q-10 gibi birçok ilaç grubuyla tedavi arayışları sürmektedir. Ayrıca nöron yenileyici etkilerinden dolayı nörotrofik faktörler (beyin kökenli nörotrofik faktör, glial kökenli nörotrofik faktör) de araştırılmaktadır. Pre-klinik çalışmalarda birçok ilaç grubuyla ümit verici olumlu etkiler görülse de henüz faz çalışmaları sonucunda nöroprotektif etkinliği kanıtlanmış ve tedavide uygulamaya geçmiş bir madde yoktur. Bu yüzden her gün yeni aday ilaçlarla dejenerasyonu durduracak veya nörorejenerasyonu sağlayacak tedavi arayışları artarak devam etmektedir (Schapira 2007).

Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde Levodopa'nın hem kendisinin hem de metabolitlerinin genotoksik etkilerini, hücre membran lipid peroksidasyonu ve parçalanması ve mitokondriyal elektron taşıma zincirinin inhibisyonu, ROS üretimi ve apoptotik hücre ölümünü indükleyerek ortaya koyduğu gösterilmiştir (Cornetta ve ark. 2009). Aynı zamanda Üridin'in nöroprotektif etkileri olduğu, mitokondriyal kompleks inhibisyonunu engellediği ve artmış DOPAC ve HVA gibi metabolitlerin miktarını azalttığı bildirilmiştir.

Sonuç olarak, çalışmada genotoksik etkileri belirlenmeye çalışılan Levodopa ve Karbidopa ilaçları ile gerçekleştirilen *in vivo* fare kemik iliği Mikronükleus ve Komet Testleri değerlendirildiğinde, Karbidopa uygulamasının genotoksik etki göstermediği, Levodopanın tek başına ve Karbidopa ile birlikte uygulanması sonucunda mikronükleus frekansının, komet kuyruk uzunluklarının, kuyruk % DNA oranlarının istatistiksel

olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlendi ($p < 0,0001$). Bu sonuçlardan yola çıkarak, Levodopa'nın *in vivo* memeli hücrelerinde önemli genotoksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Muhtemelen Levodopa'nın bu genotoksik etkileri; direkt kendisinin etkisi, kendisinin otooksidasyonu sonucu meydana gelen metabolitlerinin ve ROS'ların hücrelere verdiği hasar sonucu oluşmaktadır. Çalışmada kullanılan Üridin'in yapılan *in vivo* fare kemik iliği Mikronükleus ve Komet Testleri ile genotoksik etkisinin olmadığı ve Levodopa ve Parkinson hastalığında en sık kullanıma sahip olan Levodopa/Karbidopa kombinasyonu ile birlikte kullanıldığında Levodopa/Karbidopa uygulamasının meydana getirdiği mikronükleus frekansını azalttığı, aynı zamanda DNA hasarını geri döndürdüğü sonuçlarına ulaşıldı. Üridin'in, Levodopa'nın sebep olduğu genotoksitesiyi geri çevirme yolunda etkili bir ajan olduğu ve bu etkisini Levodopa'nın ve matabolitlerinin sebep olduğu hasarları ve ROS oluşumunu azaltarak, aynı zamanda mitokondriyal kompleks inhibisyonunu önleyerek ortaya çıkardığı sonucunu düşündürmektedir. Bu da, Üridinin Parkinson hastalığı tedavisinde kullanılabilir yeni bir terapötik ajan olma olasılığını ortaya çıkarmaktadır.

Çalışma sonucu elde edilen verilerin ve sonuçların daha sonra yapılacak olan benzer çalışmalara kaynak ve yararlı olacağı kanısındayız. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda bu çalışma, Üridinin potansiyel terapötik etkisini ortaya koyması ve L-Dopa'nın genotoksitesisi ile ilgili literatürdeki boşlukları doldurmasından dolayı orjinal olarak değerlendirilmektedir.

KAYNAKLAR

- Adams, J.D., Odunze, I.N. 1991.** Oxygen free radicals and Parkinson's disease, *Free Radical Biol. Med.*, 10: 161-169.
- Adler, I.D., 1985.** Cytogenetic Test In Mammals, In: Venitt S., Parry J.M., Editors. *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, Oxford. IRL Press. 273-306.
- Andersen, J.K. 2004.** Iron dysregulation and Parkinson's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 6: S47-S52.
- Anonim, 2012.** Corpus Striatumda azalan dopamin seviyesi. <http://brainmind.com/BasalGanglia.html>-(Erişim tarihi: 25.02.2012).
- Anonim, 2012.** Dopaminerjik ve noradrenerjik sinir uçları. <http://www.psikofarma.info/ilaclarla-ilgili-genel-konular-psikofarmakolojik-yazilaretkenmaddeler/psikofarmakoloji/attachment/psikofarmakoloji> (Erişim tarihi: 25.02.2012).
- Anonim, 2012.** Dopaminin yıkımı. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Dopamine_degradation.svg (Erişim tarihi: 25.02.2012).
- Anonim, 2012.** İnsan beyni ve bölümleri. <http://brainmind.com/BasalGanglia.html>-(Erişim tarihi: 25.02.2012).
- Anonim, 2012.** L-Dopa'dan dopamin biyosentezi. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Catecholamines_biosynthesis.svg- (Erişim tarihi: 25.02.2012).
- Anonim, 2012.** L-Dopa'nın enzimler yardımı ile dopamine dönüştürülmesi. http://www.nature.com/nrn/journal/v7/n4/fig_tab/nrn1883_F1.html-(Erişim tarihi: 25.02.2012).
- Anonim, 2012.** L-Dopa'nın Karbidopa varlığında kan-beyin engelini geçmesi. <http://students.cis.uab.edu/porce/page3.html>-(Erişim tarihi: 25.02.2012).
- Anonim, 2012.** Parkinson hastalarının genel görünümü. <http://brainmind.com/BasalGanglia.html>-(Erişim tarihi: 25.02.2012).
- Anonim, 2012.** Parkinsonda Lewy cisimciği. <http://cobbersonthebrain.areavoices.com>-(Erişim tarihi: 25.02.2012).
- Anonim, 2012.** Substantia nigradadaki değişim. <http://students.cis.uab.edu/porce/page3.html>-(Erişim tarihi: 25.02.2012).
- Auletta, A.E., Dearfield, K.L., Cimino, M.C. 1993.** Mutagenicity Test Schemes and Guidelines: U.S EPA Office of Pollution Prevention and Toxics and Office of Pesticide Programs. *Env. Mol. Mutag.*, 21: 38-45.
- Beal, M.F. 1995.** Aging, energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.*, 38: 357-366.
- Bennett, D.A., Beckett, L.A., Murray, M.A., Shannon K.M., Goetz, C.G., Pilgrim, D.M., Evans, D.A. 1996.** Prevalence of parkinsonian signs and associated mortality in a community population of older people. *N Engl J Med* 334:71-76.

Bergeron, C., Petrunka, C., Weyer, L., Pollanen, M.S. 1996. Altered neurofilament expression does not contribute to Lewy body formation. *Am J Pathol.*, 148:267-272.

Blandini, F., Cosentino, M., Mangiagalli A., , Marino F., Samuele, A., Rasini E., Fancellu, R., Tassorelli, C., Pacchetti C., Martignoni, E., Riboldazzi G., Calandrella, D., Lecchini S., Frigo, G., Nappi, G. 2004. Modifications of apoptosis-related protein levels in lymphocytes of patients with Parkinson's disease. The effect of dopaminergic treatment. *J Neural Transm.*, 111: 1017–1030.

Brusick, D. 1987. Principles of Genetic Toxicology, 2nd Edition. Plenum, New York, p.284.

Bugamelli, F., Marcheselli, C., Barba, E., Raggi M.A.2011. Determination of l-dopa, carbidopa, 3-O-methyldopa and entacapone in human plasma by HPLC–ED. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 54: 562–567.

Cansev M, Watkins CJ, van der Beek E, Wurtman RJ. 2005. Oral uridine-5'-monophosphate (UMP) increases brain CDP-choline levels in gerbils. *Brain Res*, 1058:101–108.

Cansev M.,2006. Uridine and cytidine in the brain: their transport and utilization. *Brain Res Brain Res Rev*, 52:389–397.

Cansev M., Ulus, İ. H., Wang, L., Maher, T. J., Wurtman, R. J. 2008. Restorative Effects of Uridine Plus Docosahexaenoic Acid in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Neuroscience Research* 62: 206–209.

Cedarbaum, J.M., Gandy, S.E. and McDowell, F.H. 1991. "Early" initiation of Levodopa treatment does not promote the development of motor fluctuations, dyskinesias, or dementia in Parkinson's disease, *Neurology*, 41: 622 629.

Celikler, S., Tas, S., Vatan O., Ziyank-Ayvalik, S., Yildiz, G., Bilaloglu, R. 2009. Anti-hyperglycemic and antigenotoxic potential of *Ulva rigida* ethanolic extract in the experimental diabetes mellitus. *Food and Chemical Toxicology* 47:1837–1840.

Choi, J.W., Yoo, B.K., Shin, C.Y., Ryu, M.K., Ryu, J.H., el Kouni, M.H., Lee, J.C., Kim, W.K., Ko, K.H. 2006. Uridine prevents the glucose deprivation-induced death of immunostimulated astrocytes via the action of uridine phosphorylase. *Neurosci Res.*, 56(1):111-8.

Collins, A.R., Dusinska, M., Gedik, C.M., Stetina, R. 1996. Oxydative Damage to DNA, Do We Have a Reliable Biomarker? *Environ. Health Persp.*, 104(3): 465,469.

Contin, M., Martinelli, P.2010. Pharmacokinetics of Levodopa. *J Neurol.*, 257(2): S253–S261

Cornetta, T., Palma S., Aprile, I., Padua, L., Tonali, P., Testa, A., Cozzi, R.. 2009. Levodopa Therapy Reduces DNA Damage in Peripheral Blood Cells of Patients with Parkinson's Disease. *Cell Biol Toxicol.*, 25: 321-330.

Cotzias, G.C., Papavasiliou, P.S., Gellene, R. 1969. Modification of parkinsonism-chronic treatment with L-Dopa. *N Engl J Med.*, 280:337–345.

de Rijk, M.C., Breteler, M.M.B., den Breeijen, J.H. 1997. Dietary antioxidants and Parkinson disease: the Rotterdam Study. *Arch Neurol.*, 54:762-765.

- Evans, P.H. 1993.** Free radicals in brain metabolism and pathology. *British Med. Bull.* 49: 577-587.
- Fahn, S. 2006.** Levodopa in the treatment of Parkinson's disease *J Neural Transm [Suppl]* 71: 1–15.
- Fahn, S. 2008.** The History of Dopamine and Levodopa in the Treatment of Parkinson's Disease. *Movement Disorders, Vol. 23, Suppl. 3, S497–S508.*
- Fahn, S., Cohen, G. 1992.** The Oxidant Stress Hypothesis in Parkinson's Disease: Evidence Supporting It. *Ann Neurol*, 32:804-812.
- Fearnley, J.M., Lees A.J. 1991.** Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain.*, 114:2283-2301.
- Fenech, M. 2000.** The in micronucleus technique. *Mutation Research*, 455: 81-95.
- Fenech, M. 2010.** The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Phys.*, 98(2): 234-243.
- Friedman, A., Sienkiewicz, F. 1991.** Psychotic complications of long-term Levodopa treatment of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. Scand.*, 84: 111- 113.
- Galvan, A., Wichmann, T. 2008.** Pathophysiology of Parkinsonism. *Clin Neurophysiol*; 119(7): 1459–1474.
- Garcia R.A.G, Liu L., Hu Z., Gonzalez A., von Borstel R.W, Saydoff J.A. 2005.** Severe cytochromecoxidase inhibition *in vivo* does not induce a pyrimidine deficiency; neuroprotective action of oral uridine prodrug PN401 requires supraphysiological levels of uridine. *Brain Research* 1066: 164 – 171.
- Gedik, C.M., Collins, A. 2004.** Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *The FASEB Journal express article*10.1096/fj.04-1767fje.
- Gibb, W.R.G., Lees, A.J. 1988.** The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 51:745-752.
- Glatt, H. 1990.** Endogenous Mutagens Derived from amino acids. *Mutat. Research.*, 238: 235-243.
- Gorell, J.M., Johnson, C.C., Rybicki, B.A., Peterson, E.L., Kortsha, G.X., Brown, G.G., Richardson, R.J. 1997.** Occupational exposures to metals as risk factors for Parkinson's disease. *Neurology*, 48: 650–658.
- Halliwell, B. 1992.** Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: Fact or fiction? *Ann. Neurol.*, 32: S10-S15.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M.1985.** Oxygen radicals and the nervous system. *Trends. Neurol.Sci.* 1: 22-26.
- Hefti, F., Melamed, E., Bhawan, J., Wurtman, R.J. 1981.** Long-term administration of L-dopa does not damage dopaminergic neurons in the mouse. *Neurology*, 31: 1194-1195.
- Herdegen, T. 1997.** Neurobiologische Grundlagen der Funktion und degenerativen Störungen des Nervensystems. In: Herdegen T. Et al. *Klinische Neurobiologie. Spektrum Akademischer verlag, heilderberg*, 1-38.

- Hughes, A.J., Daniel, S.E., Blankson, S., Lees, A.J. 1993.** A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. *Arch Neurol.*, 50:140-148.
- IPCS., 1985.** Guide to Short-term Tests for Detecting Mutagenic and Carcinogenic Chemicals. World Health Organization. Geneva.
- in human melanoma cells. *J Invest Dermatol*, 92:329S-331s.
- Jenner, P. 1991.** Oxidative stress as a cause of Parkinson's disease, *Acta Neurol. Scand.* 84: 6–15.
- Jenner, P. 2003.** Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Ann Neurol.*, 53 (suppl 3):S26–S38.
- Josefsson, E., Bergquist, J., Ekman, R., Tarkowski, A. 1996.** Catecholamines are synthesized by mouse lymphocytes and regulate function of these cells by induction of apoptosis. *Immunology*, 88:140-146.
- Jung, Y-J., Youn, J-Y., Ryu, J-C., Surh, Y-J. 2001.** Salsolinol, a naturally occurring tetrahydroisoquinoline alkaloid, induces DNA damage and chromosomal aberrations in cultured Chinese hamster lung fibroblast cells. *Mutation Research*, 474: 25–33.
- Kayaalp, O. 2005.** Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe-Taş, Türkiye, 1583.
- Kish, S.J., Shannak, K., Hornykiewicz, O. 1988.** Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease: pathophysiologic and clinical implications. *N Engl J Med.*, 318:876-880.
- Koller, W.C., Rueda, M.G. 1998.** Mechanism of action of dopaminergic agents in Parkinson's disease, *Neurology*, 50: S11–S14.
- Levey, G., Bodell, W.J. 1993.** Detection of dopamine–DNA adducts: potential role in Parkinson's disease, *Carcinogenesis*, 14: 1241–1245.
- Lecca D., Ceruti S. 2008.** Uracil nucleotides : From metabolic intermediates to neuroprotection and neuroinflammation. *Biochemical Pharmacology*, 75: 1869-1881
- Manyam, B.V. 1990.** Paralysis agitans and Levodopa in 'Ayurveda': ancient Indian medical treatise. *Mov. Disord.*, 5:47-48.
- Mena, M.A., Pardo, B., Casarejos, M.J., Fahn, S., de Yebenes, J.G. 1992.** Neurotoxicity of Levodopa on Catecholamine-Rich Neurons. *Movement Disorders*, 7(1): 23-31.
- Morens, DAM, Davis, JW, Grandinetti, A, Ross, GW, Popper, JS, White, LR. 1996.** Epidemiologic observations on Parkinson's disease: incidence and mortality in a prospective study of middleaged men. *Neurology* 46:1044-1050.
- Mytilineou, C., Walker, R., JnoBaptiste, R., Olanow, C. 2003.** Levodopa is toxic to dopamine neurons in an in vitro but not an *in vivo* model of oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther.*, 304:792–800.
- Natarajan, A.T, Boel, J.J.W.A. 1996.** Current Cytogenetic Methods for Detecting Exposure and Effects of Mutagens and Carcinogens. *Environ. Health Persp.*, 104(3): 445-448.

- Ogawa, N., Asanuma, M., Kondo, Y., Kawada Y., Yamamoto, M., Mori, A. 1994.** Differential effects of chronic L-Dopa treatment on lipid peroxidation in the mouse brain with or without pretreatment with 6-hydroxydopamine. *Neuroscience Letters* 171 : 55-58.
- Olive P.L. 1999.** DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int. j. radiat. biol.*, vol. 75, no. 4, 395- 405.
- Ornetta, T., Palma, S., Aprile I., Padua, L., Tonali, P., Testa A., Cozzi R.. 2009.** Levodopa Therapy Reduces DNA Damage in Peripheral Blood Cells of Patients with Parkinson's Disease. *Cell Biol Toxicol.*, 25: 321-330.
- Pardo, B., Mena M.A., de Yébenes, J.G. 1995.** L-Dopa Inhibits Complex IV of the Electron Transport Chain in Catecholamine-Rich Human Neuroblastoma NB69 Cells. *J. Neurochem.*, 64, 576-582.
- Parkinson, J. 1871.** An essay on the shaking palsy. London,65.
- Perry, T.L., Godin, D.V., Hansen, S. 1982.** Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency? *Neurosci. Lett.*, 33: 305-310.
- Perry, T.L., Yong, V.W., Ito, M., Foulks, J.G., Wall, R.A., Godin, D.V., Clavier, R.M. 1984.** Nigrostriatal Dopaminergic Neurons Remain Undamaged in Rats Given High Doses of L-Dopa and Carbidopa Chronically. *J. Neurochem.*, 43: 990-993.
- Rajput, A.H., Rozdilsky, B., Rajput, A. 1991.** Accuracy of clinical diagnosis in parkinsonism – a prospective study. *Can J Neurol Sci.*,18:275-278.
- Sakamoto T., Cansev M., Richard J., Wurtman R.J. 2007.** Oral Supplementation with Docosahexaenoic Acid and Uridine-5'-Monophosphate Increases Dendritic Spine Density in Adult Gerbil Hippocampus. *Brain Res.*, 1182: 50–59.
- Schapira, A.H.V. 1998.** Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochem. Biophys. Acta* 1366: 211-223.
- Schapira A.H.V., 2007.** Future directions in the treatment of Parkinson's disease. *Mov Disord.*, 22 Suppl 17, 385-91.
- Scigliano, G., Musicco, M., Soliveri, P., Piccolo, I., Girotti, F., Giovannini, R., Caraceni, T. 1990.** Mortality associated with early and late Levodopa therapy initiation in Parkinson's disease. *Neurology*, 40: 265 269.
- Semchuk, K.M., Love, E.J., Lee, R.G. 1993.** Parkinson's disease: a test of the multifactorial etiologic hypothesis. *Neurology*, 43:1173-1180.
- Shin, J.Y., Park, H., Ahn Y.H., Lee, P.H. 2009.** Neuroprotective Effect of L-dopa on Dopaminergic Neurons is Comparable to Pramipexol in MPTP-treated Animal Model of Parkinson's Disease: A Direct Comparison Study. *Journal of Neurochemistry*, 111: 1042-1050.
- Snyder, R.D., Friedman, M.B. 1998.** Enhancement of Cytotoxicity and Clastogenicity of L-Dopa and Dopamine by Manganese and Copper. *Mutat. Res.*, 405: 1-8.
- Snyder, R.D., Friedman, M.B. 1998.** Enhancement of Cytotoxicity and Clastogenicity of L-Dopa and Dopamine by Manganese and Copper. *Mutat. Res.*, 405: 1-8.
- Stocchi, F. 2006.** The Levodopa wearing-off phenomenon in Parkinson's disease: pharmacokinetic considerations. *Expert Opin. Pharmacother.*, 7: 1399–1407.

- Sudha, K., Rao, A.V., Rao, A. 2001.** Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. *Clin Chim Acta.*, 303: 19-24
- Tanner, C.M., Ottman, R., Ellenberg, J.H. 1997.** Parkinson's disease (PD) concordance in elderly male monozygotic (MZ) and dizygotic (DZ) twins. *Neurology*, 48:Suppl:A333-A333.abstract
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. 2000.** Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:206-221.
- Trojanowski, J., Lee, V.M.Y. 1994.** Phosphorylation of neuronal cytoskeletal proteins in Alzheimer's disease and Lewy body dementias. *Ann N Y Acad Sci.*, 747:92-109.
- Tucker, J.D., Preston, R.J. 1996.** Chromosome Aberrations, Micronuclei, Aneuploidy, Sister Chromatid Exchanges and Cancer Risk Assessment. *Mutat. Res.*, 365: 147-159.
- Uhl, G.R., Walther, D., Mash, D., Faucheux, B., Javoy-Agid, F. 1994.** Dopamine transporter messenger RNA in Parkinson's disease and control substantia nigra neurons. *Ann Neurol.*, 35:494-498.
- Venhoff, N., Lebrecht, D., Deveaud, C., Beauvoit, B., Bonnet J., Müller, K., Kirschner, J., Venhoff, A.C., Walker, U. A. 2010.** Oral Uridine Supplementation Antagonizes the Peripheral Neuropathy and Encephalopathy induced by Antiretroviral Nucleoside Analogues, 24: 345-352.
- Verschaeve, L., Vanderkerken, K., Kirsch-Volders, M. 1988.** C Banding As Simple Tool to Discriminate Between Micronuclei Induced by Clastogens and Aneugen. *Stain Technology*, 63(6): 351-354.
- Voigtlander, von., P.F., Fici G.J., Althaus J.S. 1998.** Pharmacological approaches to counter the toxicity of dopa. *Aminoacids*, 14: 189-196.
- Walkinshaw G., Waters C.M. 1995.** Induction of Apoptosis in Catecholaminergic PC12 Cells by L-Dopa. *The American Society for Clinical Investigation, Inc.*95: 2458-2464.
- Waters, M.D., Stack, H.F., Jackson, M.A. 1999.** Genetic Toxicology Data In The Evaluation of Potential Human Environmental Carcinogens. *Mutat. Res.*, 437: 21 – 49.
- Wick, M.M. 1989.** Levodopa/dopamine analogs as inhibitors of DNA synthesis in human melanoma cells. *J. Invest Dermatol.* 92:329-331.
- Wurtman RJ, Ulus IH, Cansev M, Watkins CJ, Wang L, Marzloff G. 2006.** Synaptic proteins and phospholipids are increased in gerbil brain by administering uridine plus docosahexaenoic acid orally. *Brain Res*, 1088:83–92.
- Youdim, M.B., Ben-Shacher, D.1993.** The possible role of iron in the etiopathology of Parkinson's disease. *Mov Disord.*, 8: 1-12.
- Youdim, M.B., Riederer, P. 1997.** Understanding Parkinson's disease. *Sci Am.*, 1:38-45
- Yurek, D.M., Steece-Collier, K., Collier, T.J., Sladek, J.R. 1991.** Chronic Levodopa impairs the recovery of dopamine agonist-induced rotational behavior following neural grafting. *Exp. Brain Res.*, 86: 97-107.

Zhang, Z-X, Roman, G.C. 1993. Worldwide occurrence of Parkinson's disease: an updated review. *Neuroepidemiology*, 12:195-208.

Ziv, I., Zilkha-Falb, R., Offend, D., Shirvan, A., Barzilai, A., Melamed, E. 1997. Levodopa Induces Apoptosis in Cultured Neuronal Cells- A Possible Accelerator of Nigrostriatal Degeneration in Parkinson's Disease? *Movement Disorders*, 12: 17-23.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL

Doğum Yeri ve Tarihi : Karacabey / 11.09.1983

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Bursa Anadolu Kız Lisesi
(2002)

Lisans : Anadolu Üniversitesi- Fen Fakültesi- Biyoloji Bölümü
(2008)

Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi- Fen Edebiyat Fakültesi- Biyoloji
Bölümü
(2012)

Çalıştığı Kurum(lar) ve Yıl : -

İletişim (e-posta) : esra.orenlili@gmail.com

Yayınları* : -