

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
KESİN RAPORU**

Proje Başlığı

Aterosklerotik kardiyovasküler hastalığı olan bireylerin bazı metal düzeyleri ile mitokondrial ve nükleer DNA hasarı arasındaki ilişkinin araştırılması

Proje Yürütücüsünün İsmi

Prof.Dr. Tülin Söylemezoğlu

Yardımcı Araştırmacıların İsmi

Yrd.Doç.Dr. Zeliha Kayaaltı

Uzm. Dr. Levent Şahiner

Dr. Kim.Görkem Mergen

Dr. Bio. Vugar Aliyev

Uzm. Bio. Esmâ Söylemez

Proje Numarası

09B5150001

Başlama Tarihi

Ocak 2009

Bitiş Tarihi

Ocak 2012

Rapor Tarihi

15.01.2012

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri

Ankara - 2012

RAPOR FORMATI

Bilgisayarda 12 punto büyüklüğünde karakterler ile, tercihan "Times New Roman" stili kullanılarak yazılacak ve aşağıdaki kesimlerden (alt kesimler de dahildir) oluşacaktır.

I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri Aterosklerotik kardiyovasküler hastalığı olan bireylerin bazı metal düzeyleri ile mitokondrial ve nükleer DNA hasarı arasındaki ilişkinin araştırılması

Investigation of relationship between some metal levels, mitochondrial and nuclear DNA damage in atherosclerotic cardiovascular disease patients.

II. Amaç ve Kapsam

Aterosklerotik kardiyovasküler hastalığı belirlenmiş olan bireylerde ve kontrol grubunda; çevreden maruz kalınan toksik metaller ile esansiyel iz elementlerin kan örneklerindeki düzeylerinde ve hasta bireylerle kontrol grubu arasında bu yönden fark olup olmadığı, ayrıca hasta ve kontrol gruplarında metal düzeyleri ile mtDNA ve nükleer DNA da oluşan hasarlar araştırılarak kronik metal maruziyeti sonucu ortaya çıkan toksik etkilere yeni bir bakış açısı kazandırılması amaçlanmıştır.

Satın almalarındaki aksaklıklar nedeniyle nükleer DNA hasar ölçüm yöntemi olan Komet analizlerinin aterosklerotik hastaların örneklerinde yapılması olanağını ortadan kaldırmıştır. Bu nedenle nükleer DNA hasarı sadece kontrol grubunda belirlenmiştir.

III. Materyal ve Yöntem

1.1. Serum Örneklerinde iz element Düzeylerinin belirlenmesi

Serum örneklerinde Zn ve Cu düzeyleri ölçümü için Alevli Atomik Absorbsiyon Tekniği ile Varian AA240FS Fast Sequential Atomik Absorbsiyon Spektrometre cihazı kullanıldı.

1.2. Serum Örneklerinde Çinko Düzeyinin belirlenmesi

Serum örneklerinde Zn analizi için Varian AA240FS Fast Sequential Atomik Absorbsiyon Spektrometre cihazı kullanıldı. Alev tipi olarak Hava/Asetilen kullanıldı ve hava akışı 13,5 L/dak, asetilen akışı 2 L/dak ve ölçüm zamanı 4.0 s olarak ayarlandı. 1000 ppm'lik Zn stok solüsyonundan kalibrasyon eğrisini oluşturmak üzere 0,4 ppm, 0,2 ppm, 0,4 ppm, 0,6 ppm, 0,8 ve 1,0 ppm konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı. Hazırlanan standartlara 5 µl %65 saflıkta HNO₃ eklendi. Kalibrasyon eğrisini oluşturmak amacı ile her bir standart çözelti için 3 kez ölçüm yapıldı. Zn analizi için cihazın dalga boyu 213,9 nm olarak ayarlandı. Piklerin ölçümü pik yüksekliği ile, kalibrasyon hesabı ise integrasyon ile yapıldı. Kalibrasyon 50 örnekte bir tekrarlandı. Örnekler için yine 3 kez ölçüm yapıldı.

1.3. Serum Örneklerinde Bakır Düzeyinin belirlenmesi

Serum örneklerinde Cu analizi için Varian AA240FS Fast Sequential Atomik Absorbsiyon Spektrometre cihazı kullanıldı. Alev tipi olarak Hava/Asetilen kullanıldı ve hava akışı 13,5 L/dak, asetilen akışı 2 L/dak ve ölçüm zamanı 4.0 s olarak ayarlandı. 1000 ppm'lik Bakır stok çözeltisinden kalibrasyon eğrisini oluşturmak üzere 0,1 ppm, 0,2 ppm, 0,3 ppm, 0,4 ppm ve 0,5 ppm konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı. Hazırlanan standartlara piklerin düzgün çıkmasını sağlamak amacı ile 5 ul %65 saflıkta HNO₃ eklendi. Kalibrasyon eğrisini oluşturmak amacı ile her bir standart çözelti için 3 kez ölçüm yapıldı. Bakır analizi için cihazın dalgaboyu 324,8 nm olarak ayarlandı. Piklerin ölçümü pik yüksekliği ile, kalibrasyon hesabı ise integrasyon ile yapıldı. Kalibrasyon 50 örnekte bir tekrarlandı. Örnekler için yine 3 kez ölçüm yapıldı.

1.4. Kanda Toksik metallerin Düzeylerinin belirlenmesi

Pb ve Cd analizi için Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesinden sağlanan kan örnekleri antikoagülan olarak K₂EDTA içeren mor kapaklı vakumlu tüplere alınarak +4 °C' de saklandı.

1.5. Analiz Öncesi İşlemler

Tam kan örneklerinden 1'er ml alınıp üzerine 9 ml % 65'lik HNO₃ eklenerek mikrodalga fırına ait yüksek ısıya dayanıklı teflon tüplere kondu. Mikrodalga fırında kan örneklerine yıkılama işlemi uygulanmak için uygun program ayarlanmıştır. Mikrodalgada uygulanan programa ait veriler aşağıdaki çizelgede verilmiştir. Yakma işlemi tamamlanmış örneklerin toplam hacmi deiyonize su kullanılarak 20 ml'ye tamamlanmıştır.

1.6. Tam Kan Örneklerinde Kadmiyum Düzeyinin belirlenmesi

Mikrodalga fırında asitle yakılmış tam kan örneklerinde Cd düzeyleri Grafit Fırın Tekniği ile Varian AA240Z Zeeman Atomik Absorbsiyon Spektrometre cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Atomlaştırıcı olarak grafit fırın, ortam gazı olarak Argon gazı kullanılmıştır. 1000 ppm'lik kadmiyum stok solüsyonundan kalibrasyon eğrisini oluşturmak üzere 2 ppb konsantrasyonunda standart hazırlanarak, 0.5 ppb, 1.0 ppb, ve 1.5 ppb konsantrasyonları ile kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Pik düzeltilmesi amacıyla modifier olarak amonyum dihidrojen fosfat kullanıldı. Hazırlanan standartlara 5 µl %65 saflıkta HNO₃ eklendi. Kalibrasyon eğrisini oluşturmak amacı ile her bir standart çözelti için 3 kez ölçüm yapıldı. Cd analizi için ölçüm yapılan dalgaboyu 228,8 nm olarak ayarlandı. Piklerin ölçümü pik yüksekliği ile; kalibrasyon hesabı ise konsantrasyon modu ile yapıldı. Kalibrasyon 50 örnekte bir tekrarlandı. Örnekler için ise 3 er kez ölçüm yapıldı.

1.7. Tam Kan Örneklerinde Kurşun Düzeyinin belirlenmesi

Analiz için uygun duruma getirilmiş olan tam kan örneklerindeki toplam kurşun metali analizi için grafit fırın teknikli atomik absorbsiyon spektroskopisi kullanılmıştır. Atomlaştırıcı olarak grafit fırın ve ortam gazı olarak Argon kullanıldı. Daha önceden deiyonize su ile hacimce 20 ml'ye tamamlanan örneklere ek bir seyreltme işlemi uygulanmamıştır. Yöntemde kalibrasyon eğrisi oluşturmak amacıyla konsantrasyonu 1000 ppm olan kurşun stok çözeltisinden 5, 10 ve 15 ppb'lik konsantrasyonlarda standart çözeltileri hazırlanmıştır. Pik düzeltilmesi amacıyla modifier olarak orto fosforik asit kullanıldı.

2. Mitokondrial DNA hasarının belirlenmesi:

Gönüllülerin EDTA'lı tüp içerisine alınan sıvı kan örneklerinden 200 µl'si kullanılarak Qiagen QIAamp DNA Mini Kit ile DNA izolasyonları yapılmış ve izole edilen DNA'lar kolondan geçirilerek purifiye edilmiştir. Mitokondrideki 5 kb ve 7 kb.lik delesyon bölgelerini de içerecek şekilde tabloda belirtilen primer çiftleri kullanılarak, PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tekniği ile mitokondriyal DNA'nın ilgili bölgeleri çoğaltılmıştır. Kontrol bölgeleri ile birlikte çoğaltılan oligonükleotidler, %1.2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Tüm örneklerle ilgili çalışma tamamlandıktan sonra jel görüntüleme sisteminde değerlendirilmiş ve fotoğraflaması yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirmeler SPSS v16 programında değerlendirilmiş, ölçümle elde edilen değişkenler bakımından bağımsız iki grubun karşılaştırılmasında Parametrik testlerden "Student T" testi, bağımsız ikiden fazla grubun karşılaştırılmasında ise "One-way anova" analizi kullanılmıştır. Homojen dağılmayan verilere ise bağımsız iki grubun karşılaştırılmasında Non-parametrik testlerden "Mann Whitney U" testi, bağımsız ikiden fazla grubun karşılaştırılmasında ise "Kruskal Wallis" testi uygulanmıştır. Kategorik değişkenler bakımından ilişki ya da gruplar arası farklılık incelemesinde χ^2 (ki-kare) testi uygulanmıştır. Tanımlayıcı istatistik olarak nitel değişkenlerde oran, nicel değişkenlerde ise ortalama±standart sapma veya ortanca (minimum-maksimum) verilmiştir. p<0,05

istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Uygulanan yöntem tablo 1 dedir.

Tablo1 Mitokondrial DNA hasarının belirlenmesi için uygulanan yöntem

Primer Çifti	Amplifikasyon Amacı	MtDNA'da mutasyon olduğunda PCR ürününün uzunluğu
L1-H1 L1: 5'-GGAGTAATCCAGGTCGGT-3' H1: 5'-AATGATGGCTAGGGTACTT-3'	Kontrol	675 bp
L3-H2 L3: 5'-GCCCGTATTTACCCTATAGC-3' H2: 5'-GGGGAAGCGAGGTTGACCTG-3'	mtDNA'da 4977 bp delesyonu belirlemek	423 bp
L4-H4 L4: 5'-CTCTAGAGCCCACTGTAAAG-3' H4: 5'-GTTGAGGGTTGATTGCTGTAC-3'	mtDNA'da 7436 bp delesyonu belirlemek	508 bp

3. Nükleer DNA hasarının belirlenmesi :

Çalışmanın bu kısmı hasta grubu ile ekte verilen dilekçede açıklandığı şekilde aterosklerotik hastalarla yapılamayıp metal maruziyeti olanlar, sigara kullananlar ve kontrol grubu olmak üzere 3 ayrı gruba yapılmıştır. Kurulan yöntem ve sonuçlar aşağıdadır. Komet Yöntemi ile lenfosit nükleer DNA hasarının belirlenmesi: Çalışmada öncelikle nDNA hasarını belirlemek üzere yöntem standardizasyonu yapılmıştır. Lamlar % 65' lik HMA ile kaplanıp oda sıcaklığında kurutulur. Ependorf tüpdeki 1'er mL PBS üzerine heparinli tüplerden alınan 100 µl kan eklenip vortekslenir. 100 µl histopaque tüpün dibine eklenir. 1500 rpm de 3 dakika santrifüj edilir. Ayrılan lenfositlerden 50 µl alınır. Hücreler % 0.55'lik LMA ile karıştırılarak önceden HMA ile kaplanıp kurutulmuş lama yayılır, lamelle kapatılır ve buz üzerinde agar katılışmaya kadar bekletilir. Bu arada stok lysis çözeltisinden hazırlanan günlük taze lysis çözeltisi (%10 DMSO, % 1 TritonX-100) hazırlanır ve +4 °C 'ye kaldırılır. Lamların üzerindeki lameller kenarından çekilerek hazırlanan lysis çözeltisine konulur, en az 1 saat buzdolabında bekletilir. Soğuk elektroforez çözeltisi tankın içine doldurulur ve lysis çöeltisinden çıkarılan lamlar tanka aktarılır. Lamlar bu çözelti içinde DNA çift sarmalının açılması amacıyla 20 dakika bekletilir. Daha sonra elektroforez tankı 25 V ve 300 mA'da 20 dakika çalıştırılır. Böylece sağlanan elektrik akımı sayesinde negatif yüklü DNA sarmal kırıklarının anoda doğru göç etmesi sağlanır. Süre sonunda elektroforez tankından çıkarılan lamlar, oluşan kimyasal reaksiyonu stabilize etmek, fazla tuz ve deterjanı uzaklaştırmak amacıyla nötralizasyon tamponuyla 3 kez 5'er dakika yıkanır. Fiksasyon işlemi için lamlar sırasıyla %50'lik, %75'lik ve %100'lük alkollerde 5'er dakika yıkanıp kurumaya bırakılır. Bu işlem sonrasında her preparat üzerine floresan renk vermesi için 60 µl etidyum bromür çözeltisi (20 µl/ml) ile boyanır. Lamlar boyandıktan sonra her birey için hazırlanan preparattan yaklaşık 15 bölge taranarak rastgele seçilen 100 lenfosit hücresi, Olympus BX50 floresan mikroskopta incelenmiştir. Sonuçlar 4 parametre [tail moment (TM) tail intensity (TI), tail DNA (DNAt), and olive tail moment (OTM)] ile değerlendirilir.

IV. Analiz ve Bulgular

1. Metal düzeyleri:

Aterosklerotik hasta ve kontrol gruplarındaki Cd, Pb, Cu ve Zn düzeyleri tablo 2 de verilmiştir.

Tablo 2. Aterosklerotik hasta ve kontrol gruplarındaki Cd, Pb, Cu ve Zn düzeyleri

Metaller	Ateroskleroz hasta (n=194) Ortalama±S.S.	Kontrol (n=198) Ortalama±S.S.	p	Toplam (n=392) Ortalama±S.S.
Cd (ppb)	2.19±2.14	1.33±1.19	<0.001	1.75±1.78
Pb (ppb)	31.59±16.22	26.54±9.99	<0.001	29.04±13.66
Cu (ppm)	0.78±0.35	0.96±0.28	<0.001	0.87±0.33
Zn (ppm)	0.85±0.19	0.92±0.34	<0.01	0.89±0.28

2. mt DNA hasarları

Ateroskleroz hastalarında ve kontrol grubunda 4977 mtDNA delesyonu sonuçları tablo 3 de verilmiştir.

Tablo 3. 4977 v e 7436 dmtDNA'ların ateroskleroz hasta ve kontrol grupları arasındaki frekansları

mtDNA Delesyonları		Ateroskleroz Hasta N=194 (%)	Kontrol N=198 (%)	Odds ratio (95% CI)	p
4977 dmtDNA	+	31 (%16.0)	9 (%4.5)	3.515 (1.719-7.188)	0.001
	-	163 (%84)	189 (%95.5)	0.880 (0.822-0.943)	
7436 dmtDNA	+	5 (%2.6)	1 (%0.5)	5.103 (0.602-43.282)	0.095
	-	189 (%97.4)	197 (%99.5)	0.979 (0.955-1.004)	

Ateroskleroz hastalarında ve kontrol grubunda 7436 mtDNA delesyonu ile ilgili sonuçlar Tablo 4 de görülmektedir.

Tablo 4. Ateroskleroz hasta ve kontrol grubunda, 4977 ve 7436 dmtDNA'ların yaş ile ilişkisi

Gruplar	Delesyonlar	N	Ortalama Yaş±S.S	Minimum	Maksimum	Median	p	
Ateroskleroz Hasta	4977 bp dmtDNA	+	31	69.84±7.24	53	83	70	0.001
		-	163	59.90±10.20	41	85	59	
	7436 bp dmtDNA	+	5	75.80±10.06	59	85	79	0.006
		-	189	61.11±10.19	41	85	61	
Kontrol	4977 bp dmtDNA	+	9	79.11±7.39	65	85	83	0.001
		-	189	59.80±11.01	41	85	57	
	7436 bp dmtDNA	+	1	85	85	85	85	0.093
		-	197	60.55±11.48	41	85	57	

mtDNA delesyonlarının metal düzeyleri ile ilişkisi:

Ateroskleroz hasta ve kontrol grubunda, 4977 bp ve 7436 bp dmtDNA'ların Cd, Pb, Zn ve Cu düzeyleri ile ilişkisi tablo 5 ve 6 de görülmektedir.

Tablo 5 :Ateroskleroz hasta grubunda mtDNA delesyonlarının metal düzeyleri ile ilişkisi

Metaller (Ort±S.S)	Ateroskleroz Hasta Grup					
	4977 bp dmtDNA		p	7436 bp dmtDNA		p
	(+) N=31	(-) N=163		(+) N=5	(-) N=189	
Cd (ppb)	2.55±2.06	2.12±2.15	0.304	2.98±4.11	2.17±2.07	0.402
Pb (ppb)	31.66±15.41	31.58±16.42	0.980	44.39±16.31	31.15±15.80	0.051
Zn (ppm)	0.88±0.20	0.84±0.19	0.382	1.04±0.22	0.84±0.19	0.058
Cu (ppm)	0.82±0.35	0.77±0.35	0.479	1.09±0.31	0.77±0.35	0.055

Tablo 6 : Kontrol grubunda mtDNA delesyonlarının metal düzeyleri ile ilişkisi

Metaller (Ort±S.S)	Kontrol grup					
	4977 bp dmtDNA		p	7436 bp dmtDNA		p
	(+) N=9	(-) N=189		(+) N=1	(-) N=197	
Cd (ppb)	2.60±4.45	1.26±0.75	0.001	0.40	1.33±1.20	0.732
Pb (ppb)	35.63±16.49	26.27±9.69	0.007	33.43	26.66±10.24	0.349
Zn (ppm)	1.19±0.39	0.91±0.33	0.014	1.44	0.92±0.34	0.132
Cu (ppm)	1.00±0.17	0.97±0.29	0.664	0.81	0.96±0.28	0.494

3. Nükleer DNA hasarı ile ilgili çalışmalar:

Bu çalışmalar iki ayrı grupta toplanmıştır :

İlk grupta bilinen kurşun maruziyeti olan gönüllülerde komet parametreleri ölçülmüştür. Bu gruba ait sonuçlar tablo 7 da verilmiştir.

Tablo 7: Kurşun maruziyeti olan bireyler ve kontrol grubunun komet değerleri

Sigara İçimi	Gruplar	n	TI Ort.±S.S	DNA _t Ort.±S.S	TM Ort.±S.S	OTM Ort.±S.S
Sigara İçenler	Maruz	35	54029.66±20217.22	88.52±33.30	4.34±1.22	525.91±471.12
	Kontrol	35	28344.88±7534.19	52.90±16.65	2.63±0.48	236.25±289.69
p			<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Sigara İçmeyenler	Maruz	26	52043.99±14108.73	99.29±23.86	4.41±0.73	986.53±777.94
	Kontrol	26	32769.08±5139.66	68.16±12.85	3.01±0.36	417.04±336.56
p			<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

İkinci grupta ise sigara içen ve içmeyen bireylerin kan kadmiyum düzeyleri ölçülerek Komet parametreleri arasındaki ilişki değerlendirilmiştir.

Kontrol grubu kan örneklerinde Komet parametreleri ve Cd konsantrasyonları için elde edilen ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri Tablo 8 de verilmiştir.

Tablo 8 : Komet Parametreleri ve Cd Konsantrasyonlarının Ortalama, Standart Sapma, Minimum ve Maksimum Değerleri.

	n	Ortalama	S. Sapma	Minimum	Maksimum
Komet Uzunluğu	120	26,06	3,39	14,05	37,75
Komet Yoğunluğu	120	58019,53	18797,35	32859,00	148116,00
Baş uzunluğu	120	16,09	1,72	9,27	21,06
Baş Yoğunluğu	120	84366,74	15977,59	39234,00	129995,00
Kuyruk uzunluğu	120	5,20	1,15	2,50	10,58
Kuyruk Yoğunluğu	120	37980,31	8099,62	15399,00	68610,00
Kuyruk Momenti	120	3,40	0,59	1,88	5,10
Olive Kuyruk Momenti	120	495,80	457,91	11,70	2591,34
Cd (ppb)	120	1,21	1,42	0,10	13,10

Sigara İçimi ile Cd Düzeyi ve Komet Parametreleri arasındaki ilişki

Sigara içen ve içmeyen gruptaki Cd düzeyleri ile 9 komet parametresi arasındaki ilişki istatistiksel olarak hesaplanmış ve sonuçlar sonuçlar Tablo 9 da gösterilmiştir.

Tablo 9: Sigara İçen ve İçmeyenlerde Cd ve Komet Parametreleri sonuçları

	Kontrol grubu(n=60) (Ort. ± S. S.)	Sigara İçen Grubu(n=60) (Ort. ± S. S.)	p
Cd (ppb)	0.64±0.47	1.77±1.78	<0.01*
Komet Uzunluğu	25.53±1.26	26.60±4.59	>0.05
Komet Yoğunluğu	53581.33±3952.60	62457.73±25631.69	<0.01*
Baş uzunluğu	16.01±0.74	16.17±2.32	>0.05
Baş Yoğunluğu	83080.74±5916.58	85652.73±21829.43	>0,05
Kuyruk uzunluğu	4.94±0.32	5.47±1.55	<0.01*
Kuyruk Yoğunluğu	37624.85±3779.95	38335.78±10852.39	>0.05
DNA Kuyruğu	78.83±7.88	72.02±25.71	>0.05
Kuyruk Momenti	3.39±0.29	3.40±0.79	>0.05
Olive Kuyruk Momenti	603.83±513.90	387.77±367.54	<0.01*

Sigara İçiminin Kadın ve Erkek Gruplarında Cd Düzeyine ve Comet Parametrelerine Etkisi

Çalışmadaki kadın ve erkek gruplar, sigara içen ve kontrol grubu olarak ayrılarak, Cd düzeyi ve 9 comet parametresi açısından istatistiksel olarak değerlendirme yapılmış ve sonuçlar, Tablo 10 ve 11 da gösterilmiştir.

Tablo 10: Sigara İçen ve İçmeyen Kadın Gruplarında Cd ve komet Parametreleri Arasındaki İlişki.

	Kadın		
	Kontrol grubu (Ort. ± S. S.) (n =30)	Sigara İçen Grubu (Ort. ± S. S.) (n=30)	p
Cd(ppb)	0.59±0.41	1.98±2.30	<0.05*
Komet Uzunluğu	25.48±1.31	27.66±4.15	<0.01**
Komet Yoğunluğu	53518.84±4453.24	65944.78±24412.60	<0.01**
Baş uzunluğu	15.90±0.70	16.97±2.07	<0.01**
Baş Yoğunluğu	81501.92±6123.98	93780.03±21551.04	<0.01**
Kuyruk uzunluğu	4.97±0.34	5.60±1.40	<0.01**
Kuyruk Yoğunluğu	36483.84±3376.3	41573.08±9035.40	<0.01**
DNA Kuyruğu	76.59±6.93	75.31±27.10	>0.05
Kuyruk Momenti	3.31±0.26	3.59±0.70	<0.05*
Olive Kuyruk Momenti	499.46±441.17	348.79±294.10	>0.05

Tablo 11 Sigara İçen ve İçmeyen Erkek Gruplarında Cd ve komet Parametreleri Arasındaki İlişki.

	Erkek		
	Kontrol grubu (Ort. ± S. S.) (n =30)	Sigara İçen Grubu (Ort. ± S. S.) (n=30)	p
Cd(ppb)	0.69±0.53	1.56±1.04	<0.01**
Komet Uzunluğu	25.58±1.22	25.54±4.83	>0.05
Komet Yoğunluğu	53643.82±3456.20	58970.68±26748. 63	>0.05
Baş uzunluğu	16.11±0.77	15.36±2.31	>0.05
Baş Yoğunluğu	84659.56±5344.03	77525.44±19192. 99	>0.05
Kuyruk uzunluğu	4.91±0.29	5.33±1.70	>0.05
Kuyruk Yoğunluğu	38765.86±3869.83	35098.48±11674. 27	>0.05
DNA Kuyruğu	81.08±8.24	68.74±24.24	<0.05*
Kuyruk Momenti	3.47±0.30	3.21±0.84	>0.05
Olive Kuyruk Momenti	708.21±565.80	426.76±430.33	<0.05*

V. Sonuç ve Öneriler

Aterosklerotik hastalarda metal düzeyleriyle ilgili sonuçlar

Cd, Pb, Cu ve Zn düzeyleri ateroskleroz hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir. Hasta grubunda, kontrol grubuna göre; kan Cd ve Pb düzeyleri yüksek ($p < 0.001$), serum Cu ($p < 0.001$) ve Zn ($p < 0.01$) düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar aşağıda özetlenen kardiyovasküler hastalıklarla toksik metal maruziyeti arasındaki pozitif, iz element düzeyleri ile negatif ilişki görülmesi ile ilgili literatür bilgisi ile uyum göstermektedir.

Çevresel kurşun maruziyetinin sorun olduğu ülkelerde, kardiyovasküler sistemde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olduğu için hipertansiyon yanında ateroskleroz gelişiminden de bu maruziyetin sorumlu olduğu ileri sürülmektedir

(Zawadzki ve ark. 2006). Sigara kullanılması periferal arteriyel hastalıkların gelişmesinde bilinen bir etken olup, kurşun ve kadmiyum maruziyetinde önemli bir kaynak olduğu için bu yönden ayrıca önem kazanmaktadır (Navas-Acien ve ark. 2004). Kurşun maruziyetinin kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi uzun süredir bilinip, bu konuda birçok çalışma yapılmışken (Navas-Acien 2007), kadmiyum maruziyetinin de (Navas-Acien 2005) risk faktörlerinden olduğu üzerinde durulmaktadır. Kurşun ve kadmiyumun kardiyovasküler etkileri ile ilgili yapılan çalışmaların çoğunda kan basıncını yükseltmeleri üzerinde durulmuştur (Nawrot ve ark. 2002, Staessen ve ark. 2000). Kadmiyum maruziyeti ile ateroskleroz ve hipertansiyon gelişmesi arasında bağlantı kuran birçok çalışma bulunmaktadır (Tellez-Plaza ve ark.2008, Navas-Acien ve ark. 2005). Kadmiyumun, birçok proinflamatuvar mediyatörün endotel hücrelerden salınmasına neden olarak aterosklerotik süreci başlattığı düşünülmektedir (Szuster-Ciesielska ve ark. 2000). Diğer taraftan esansiyel iz elementlerden çinkonun hücresel bütünlükte rolü olduğu bilinmektedir. Çinko gen transkripsiyonunun kontrolünde ve diğer birçok temel mekanizmada rol alır (Vallee ve Falchuk 1993), membran stabilize edici özelliğine ek olarak; geçiş metalleri tarafından reaktif oksijen türlerinin üretimini inhibe etmesi ve sülfidril grupları oksidasyona karşı koruması ile antioksidan etki gösterir (Oteiza ve ark. 1995, Bray ve Bettger 1990). Kadmiyum ve tümör nekroz faktör (TNF) benzer sitotoksik etki gösterdiğinden; TNF sinyal yollarının kadmiyum veya çinko ile paylaşıldığı düşünülmektedir (Kaji ve ark., 1993). Çinko noksanlığının da ateroskleroz nedeni olabileceği ileri sürülmektedir (Beattie ve Kwun 2004). Kandaki kurşun düzeyinin yükselmesi ile kardiyovasküler mortalitenin artması arasında korelasyon söz konusudur (Lustberg ve Silbergeld 2002). Birçok klinik ve popülasyon çalışması, kurşun maruziyeti ile hipertansiyon, serebrovasküler hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklardaki artış insidansı arasında doğru orantı olduğunu göstermektedir (Fanning 1988, Sokas ve ark. 1997). İnsan ve hayvan deneyleri ile uzun süreli düşük dozda kurşun maruziyetinin hipertansiyona neden olduğu ortaya konmuştur. Afrika-Amerikan ırkında hipertansiyon ve mortalite beyaz ırktan oldukça yüksektir. Genel olarak Afrika-Amerikan ırkında arteriyel kan basıncı beyaz ırktan daha yüksek olduğu için, düşük düzeyde kurşun maruziyetinde bile kurşuna bağlı hipertansiyon ve yüksek mortalite gelişebilmektedir (Vupputuri ve ark. 2003). Kandaki kurşun düzeyinin artması ile sistolik ve diastolik kan basıncının yükselmesi arasındaki ilişki altmıştan fazla ortak çalışmanın 3 meta analizi ile ortaya konmuştur (Staessen ve ark. 1994; Schwartz 1995, Nawrot 2002). Postmenopoz dönemindeki kadınlarda, kemiklerden kurşunun geri salınması hipertansiyon için risk oluşturmaktadır. Menopoz öncesi ve sonrası dönem kadınlarda yapılan bir çalışmada, kan kurşun düzeyi yüksek olanların hipertansiyon riski, kan kurşun düzeyi düşük olan kadınlardan 3-4 kat yüksek bulunmuştur (Nash ve ark. 2003). 2125 katılımcı ile yapılan çalışmada, ayak bileği-kol basınç indeksi (ABI) ile ölçülen periferal arter hastalıklarının insidansı ile, kandaki kurşun ve kadmiyum düzeyleri arasında

korelasyon bulunmuştur, periferik arter hastalıkları olan bireylerdeki kurşun düzeyi hasta olmayan bireylerden %13,8; kadmiyum düzeyi ise %16 fazla bulunmuştur (Navas-Acien ve ark. 2004). Vasküler endotel kan basıncı regülasyonu, anjiyojenezis, ateroskleroz, inflamasyon, tümör oluşumu ve tümör metastazı gibi birçok fizyolojik ve patolojik işlemde rol oynar (Bauersachs ve Schafer 2004, Davignon ve Ganz 2004, Houtman 1993, Pearson ve Prozialeck 2001). Vasküler endotelin kadmiyum toksisitesinde hedef organ olduğu ilk olarak 1950'li yıllarda memeli testislerinde yapılan çalışmalarda ödem ve hemoraji gelişiminin oluşması ile ortaya konmuştur (Gunn ve ark. 1961, Hoey 1966). Daha sonraki çalışmalarda kadmiyumun kapiler ve venlerin endotel hücreleri arasındaki bağlantının bozulmasına neden olarak vasküler geçirgenliği artırdığı gösterilmiştir (Aoki ve Hoffer 1978, Fende ve Niewenhuis 1977). Kadmiyuma yüksek dozda akut maruziyette hedef dokunun vasküler endotel olduğu gösterilmiştir, vasküler endotelin bütünlüğünün bozulması ile geçirgenliğinin arttığı ve sonuçta hedef organlarda ödem, hemoraji, hipoksi, inflamasyon, ve hasarlar oluştuğu gösterilmiştir (Nolan ve Shaikh, 1986). Kadmiyum maruziyeti, genellikle düşük dozlarda kronik maruziyet olarak görülür ve uzun yarı ömrü nedeni ile (15-30 yıl) karaciğer, böbrek ve kalpte birikir (Nordberg ve ark. 1986). Vücuda alım yoluna bakılmaksızın, kadmiyum, sistemik dolaşıma geçerek, kandaki protein ve diğer materyallere bağlanır (Bridges ve Zalups 2005, Zalups ve Ahmad 2003). Dolaşımdaki kadmiyum, metallothioneine bağlanır veya albumin, aminoasitler, sülfidril, glutatyon ve sistein gibi bileşiklerle etkileşir. Kadmiyum-metallothionein kompleksi, proksimal tübül epitelyumu gibi bazı özel dokular dışındaki birçok dokudan geçemez; proksimal tübüllerden kolay geçmesi nedeni ile genellikle kadmiyumun nefrotoksik etkileri ortaya çıkar (Foulkes 1978, Squibb ve ark. 1984, Dudley ve ark. 1985, Kotsonis ve Klassen 1978). Vasküler endotelin izole edilebilme tekniği geliştikten sonra insan göbek kordonu ve aort makrovasküler endotel hücrelerinde kadmiyum toksisitesi incelendiğinde, hücre ölümü ancak yüksek dozda kadmiyum uygulandığında görülmüştür. Kadmiyum hücre ölümü yerine, endotel hücre fonksiyonlarında bozulmaya neden olarak toksisitesini göstermektedir (Kaji ve ark. 1992a, 1992b, Kishimoto ve ark. 1991). Uterus, plesanta, testis, akciğer ve karaciğer gibi hemorajik hasara açık organlarda, kadmiyum ilk olarak mikrovasküler geçirgenliği artırır. Kan hücreleri, sıvı ve proteinler kapilerden sızarak, dokular arasındaki boşluklara geçer. Mekanizma tam olarak bilinmemekle beraber, kapiler endotel hücrelerdeki bağlanmaya aracılık eden komplekslerin yapısının, geçirgenliğin artması ile birlikte bozulduğu öne sürülmektedir (Niewenhuis ve ark. 1997, Peereboom-Stegeman ve Jongstra-Spaapen 1979). Kadmiyumun vasküler endotel üzerine etkisi nedeni ile ateroskleroz ve hipertansiyon gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir (Nakagawa ve Nishijo 1996, Navas-Acien ve ark. 2005, Tomera ve ark. 1994). Kadmiyumun endotel hücrelerden proinflamatuvar mediyatörler salması, aterosklerozdaki inflamatuvar bileşikler artırır (Szuster-Ciesielka ve ark. 2000). Antitrombotik ajanların salınımını artırarak, lökosit ve trombositlerin endotele

yapışmasını stimüle eder (Hernandez ve Macia 1996, Yamamoto ve ark. 1993). Kadmiyum, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu destekleyerek, kan damarlarının sertliğini artıran ekstraselüler bileşenlerin üretimini artırır (Abraham ve ark. 2000, Fujiwara ve ark. 1998, Jeong ve ark. 2004).

Aterosklerotik hastalarda mitokondriyal DNA hasarı ile ilgili sonuçlar

4977 mtDNA delesyonu, ateroskleroz hastalarında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak oldukça yüksek bulunmuştur ($p<0.01$); 95% CI, 3.515 (1.719-7.188). Kontrol grubunda 4977 mtDNA delesyonunun oranı %4.5 iken, ateroskleroz hastalarında %16.0 olarak tespit edilmiştir.

Sitoplazmanın şekilli unsurlarından birisi olan mitokondri organeli hücre ve organizma için gerekli enerjinin üretiminden sorumludur. Biyolojik oksidasyon yaparak enerji açığa çıkarırlar. İçinde bulunduğu hücrenin fonksiyon durumuna göre sayı, şekil ve büyüklükleri değişir, hareketlidirler (Chance ve ark. 1979). Hücrenin yapı ve fonksiyonuna göre bir hücre içerisinde 1 000-10 000 arasında mitokondri organeli, her mitokondri organelinde de 2-10 adet mitokondriyal DNA kopyası bulunmaktadır. Buna karşın hücre içerisinde çekirdek DNA'sı tektir (Gray 1989). mtDNA, 5 mikron boyunda, çift zincirli dairesel bir yapıdır. Yoğunluk farkı ile dış kısımda ağır zincir (H strand) iç kısımda ise hafif zincir (L strand) bulunmaktadır. 16.569 baz çifti uzunluğundadır. Ağır zincir Guanin bakımından, hafif zincir ise sitozin bakımından zengindir. Mitokondriyal DNA, mRNA'ya (mesajcı RNA) dönüşen, ancak proteine dönüşmeyen intron bölgesi içermez. Sadece, proteine dönüşen ekzon kısımları mevcuttur (Ellis ve Reid 1994). mtDNA'da 37 gen bulunur. Bu genler enerjinin üretimi ve ATP'nin depolanmasından sorumludurlar (Anderson ve ark.1981).

7436 mtDNA delesyonu, kontrol grubunda sadece 1 kişide tespit edilirken, ateroskleroz hasta grubunda 5 kişide tespit edilmiştir. 7436 bp mtDNA delesyonu, 4977 bp mtDNA delesyonuna göre daha büyük bir delesyon olduğundan, bu delesyonun frekansı, hem hasta hem de kontrol grubunda daha düşüktür. Frekansları düşük olduğundan, 7436 bp mtDNA delesyonunun oranı açısından, hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$; 95% CI, 5.103 (0.602-43.282) .

Hem aterosklerotik hastalarda hem de kontrol grubunda, yaş ile 4977 bp mtDNA delesyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmiştir ($p<0.01$). Yaş arttıkça, hasta ve kontrol grubundaki bireylerde 4977 mtDNA delesyon frekansı artmıştır. 7436 bp mtDNA delesyonu, ateroskleroz hastalarında 5 bireyde tespit edilmiş ve bu delesyon ile yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p<0.01$). Ateroskleroz hasta grubunda bu delesyona sahip olan bireylerin yaş ortalaması 75.80 ± 10.06 iken, delesyonsuz hasta bireylerin yaş ortalaması 61.11 ± 10.19 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubunda ise sadece 1 bireyde 7436 bp mtDNA delesyonu bulunmuştur. Dolayısı ile kontrol grubunda 7436 bp mtDNA delesyonu ile yaş arasında istatistiksel anlamlılık

hesaplanmamıştır ($p>0.05$). Bu sonuçlar aşağıda açıklanan literatür bilgisi ile uyum göstermektedir.

Yaşlanma ve aşırı oksidatif strese karşı antioksidan enzim sistemlerinin yeterli olmaması sonucu hücre içeriğindeki lipidler, proteinler ve DNA hasara uğrar. Ancak mtDNA, histon kılıfı bulunmayan nükleer DNA kadar etkili tamir sistemlerine sahip olmadığı için oksidatif hasara daha duyarlı olduğu gibi mitokondriyal DNA'da mutasyon hızı çekirdek DNA'sına göre 10 kat daha fazladır (Yakes1997). Mitokondrinin oksidatif hasara duyarlılığı ve antioksidan sistemlerin yaşa bağlı olarak azalması (Harman 1998) mitokondrinin yaşlılıkla bağlantılı hastalıklarla ilgili araştırmalarda önemini belirlemektedir. Radyasyon, inflamasyon, artan parsiyel oksijen basıncı, hava kirliliği (O_3 , NO_2), sigara ve reperfüzyon hasarı reaktif oksijen ara ürünlerinin oluşumunu uyaran faktörlerdir (Borish ve ark 1987, Machlin ve Bendich 1987). mtDNA mutasyonları ile hastalıklar arasındaki bağlantı ilk kez nöromusküler hastalıklarla ilgili olarak ortaya atılmıştır (Holt ve ark.1989). Daha sonraları ise kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklarla bağlantı kurulan sonuçlar yayınlanmıştır (Wright ve ark. 2004). Günümüze dek yapılmış olan araştırmalar fizyolojik yaşlanma, prematür yaşlanma semptomları; Alzheimer hastalığı, diyabet, kalp hastalıkları, sağırılık, optik sinir dejenerasyonu, birçok ilerleyici kas hastalığı ve kanser gibi yaşlanma ile sıklıkları artan hastalıkların mutasyona uğramış DNA içeren disfonksiyonel mitokondrilerin varlığı ile ilgili olduğunu ortaya koymuştur. Klinik tablo ve hastalığın şiddeti, mitokondriyal DNA mutasyonun tipine, mutant DNA'nın oranına ve doku dağılımına bağlıdır (Wallace 1994, Ozawa 1995). Yaşlanma sırasında birçok organda mitokondrial biyoenerji fonksiyonu azalmaktadır. Bu azalma mtDNA daki mutasyonların birikimi ile açıklanmaktadır. İnsanlarda, mtDNA delesyonları, mtDNA duplikasyonları, nokta mutasyonları olmak üzere üç tip mtDNA mutasyonu açıklanmıştır. mtDNA 4977 bp de görülen delesyonun değişik insan dokularında yaşlanmayla arttığı konusunda genelde görüş birliği bulunmaktadır. Bu mutasyonun aynı bireyden alınan farklı dokularda benzer şekilde görülebildiği, ancak de ileri sürülmektedir (Liu ve ark. 1998). Mitokondrial delesyonlar dokuya özgüdür ve mitokondrial değişikliklerin miktarı, mitokondrial disfonksiyonun ciddiyeti ile uyum gösterir (Frahm ve ark.2005), ancak enerji üretimi engellenmedikçe organ disfonksiyonuna neden olmazlar fakat organların metabolik ve fonksiyonel durumunun göstergesidirler (Kim ve ark 2000).

Mitokondriyal fonksiyon bozukluğundan özellikle kalp gibi enerji gereksinimi fazla olan organlar etkilenir (Bindoff 2003). Mitokondrial hasarla reaktif oksijen türlerinin salınımı artar bu nedenle mtDNA hasarları miyokard krizlerinin oluşmasında önemli rol oynar (Tsutsui ve ark. 2009). mtDNA hasarlarının çoğalması ve oksidatif hasarın, kardiyovasküler hastalıklar gibi yaşlanmaya bağlı hastalıkların gelişmesinde rol oynadığı bildirilmiş ve ateroskleroz lezyonları olan koroner kalp hastalarının kanlarında mtDNA 4977 delesyonlarının daha fazla

görüldüğü bildirilmiştir (Botto ve ark. 2005). En fazla çalışılan mitokondrial DNA delesyonları 4977 bp ve 7436 bp bölgelerindedir. 4977 bp ve 7436 bp mtDNA delesyonları yaşlı bireylerin çeşitli doku örneklerinde daha fazla oranda bulunduğu gibi, aterosklerotik kardiyovasküler hastaların kalplerinde de bu delesyonların oranı fazladır (Corral-Debrinski ve ark. 1992, Bogliolo ve ark. 1999, Lai ve ark. 2003, Botto ve ark. 2005, Mohamed 2006). Grubumuzun daha önceki çalışmalarında da yaşlıların saç örneklerinde ve Miyokardiyal infarktüs nedeniyle hayatını kaybedenlerin kalp dokularında bu delesyonların oranı kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde fazla bulunmuştur (Kayaaltı ve ark. 2009, Kayaaltı ve Söylemezoğlu 2010).

Aterosklerotik hastalarda mitokondriyal DNA hasarı ve metal düzeyi ile ilgili sonuçlar

Ateroskleroz hasta ve kontrol gruplarında, 4977 bp ve 7436 bp mtDNA delesyonlarının Cd, Pb, Zn ve Cu düzeyleri ile ilişkisi incelendiğinde, sadece kontrol grubunda, Cd, Pb ve Zn düzeyleri ile 4977 bp mtDNA delesyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmiştir. Kontrol grubunda, 4977 bp delesyonlu bireylerin Cd, Pb ve Zn düzeyleri, bu delesyonu olmayan bireylere göre yüksek bulunmuştur.

Metallerin hücre, doku ve organizmalar düzeyinde mtDNA delesyonları (Kessel ve ark. 2002, Takebayashi ve ark. 2003, Takaki ve ark. 2004a, Takaki ve ark. 2004b, Partridge ve ark. 2007) neden olmaları ile ilgili bazı çalışmalar bulunmakla birlikte bu çalışmalar genelde kadmiyumla böbrek dokularında görülen mtDNA hasarı veya doku-hücre kültürlerinde arsenikle ortaya çıkan mtDNA hasarı ile ilgilidir. İnsanlarda metal maruziyeti veya metal düzeyi ile lenfosit mtDNA s1 ile ilişki kurulan çalışmaya rastlanmamıştır.

Lenfosit nükleer DNA hasarı ile ilgili sonuçlar

Satın almaldaki gecikmeler nedeniyle nükleer DNA hasar ölçüm yöntemi olan Komet analizleri, aterosklerotik hastalardan örnek toplama aşamasında kurulamamış, kardiyolog hekimin görev yerinin değişmesi nedeniyle aynı etik kurul izni ile tekrar hasta örneği toplama olanağı kalmamış, bu yöntemde taze kan örnekleri ile çalışılması gerektiğinden çalışmanın bu kısmının aterosklerotik hastaların örneklerinde yapılması olanağını da ortadan kaldırmıştır. Bu nedenle nükleer DNA hasarı sadece sonradan yürütülen bir tez için toplanan kurşun maruziyeti bilinen işçilerde değişik komet parametreleri değerlendirilirken, diğer bir tez içinse kontrol grubunda sigara içen ve içmeyen gruplarda, kan kadmiyum düzeyleri ve değişik parametreler belirlenmiştir. İlk grupta bilinen kurşun maruziyeti olan gönüllülerde komet parametreleri ölçülmüş, ikinci grupta ise sigara içen ve içmeyen bireylerin kan kadmiyum düzeyleri ölçülerek Komet parametreleri arasındaki ilişki değerlendirilmiştir.

Birinci grubu oluşturan ve kurşun maruziyeti olan bireylerde TI, DNA_t, TM and OTM değerleri kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı düzeyde yüksek

bulunmuştur($p<0.01$).

Sigara içen ve kontrol grubu arasında, Cd düzeyi, CI, TL ve OTM komet parametreleri açısından istatistiksel olarak oldukça anlamlı ilişki bulunmuştur ($p<0,05$), ancak diğer komet parametreleri arasında (CL, HL, HI, TI, DNAt ve TM) istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$).

Komet analizlerinin kontrol grubu ile alınan sonuçlarına göre, DNA hasar derecesi 9 komet parametresine göre değerlendirilmiştir. Sigara içen ve içmeyen gruplarda Cd düzeylerine ve CI, TL and OTM gibi komet parametrelerine göre istatistiksel olarak çok anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$), bununla birlikte diğer komet parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Sigara içen bireyleri cinsiyete göre ayırıp sonuçları değerlendirdiğimizde ise sigara içen kadınlarda içmeyenlere göre CL, CI, HL, HI, TL, TI komet parametreleri çok anlamlı ($p<0,01$), Cd düzeyi ve TM parametresi ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Buna karşın, sigara içen erkekler ile içmeyenler karşılaştırıldığında, sadece Cd düzeyi, DT ve OTM komet parametrelerine göre istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($p<0,05$). Korelasyon açısından değerlendirildiğinde, Cd düzeyi ile yaş ve komet parametreleri arasında anlamlılık bulunmazken ($p>0,05$), komet parametrelerinin kendi arasında istatistiksel olarak çok anlamlı sonuçlar bulunmuştur ($p<0,01$). Sigara indeksine göre değerlendirildiğinde, kadın bireylerde TM komet parametresine göre, erkek bireylerde ise CL, HL, HI, TI and OTM parametrelerine göre istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur. Ayrıca, yaş, Cd düzeyi ve komet parametrelerinin korelasyonunda ise her hangi bir istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır ($p>0,05$). Bu sonuçlara göre, sigara kullanımının sebep olduğu DNA hasarına karşı kadınların daha duyarlı olduğu ileri sürülebilir.

Metallerin, Komet yöntemi ile belirlenmiş olan lenfosit DNA hasarına (Danadevi ve ark. 2003, Danadevi ve ark. 2004, Palus ve ark. 2003, Mateuca ve ark. 2005, Goulart ve ark. 2005, Grover ve ark. 2010, Olewińska ve ark. 2010, Restrepo ve ark. 2000) neden olmaları ile ilgili birçok çalışma bulunmakta ve bulgularımızla uyumlu sonuçları bildirildiği görülmektedir.

Daha sonraki çalışmalarımızda; çeşitli toksik maddelere maruz kalan gruplarda mt DNA hasarı, nükleer DNA hasarının kan örneklerinin yanısıra saç folikülleri ve bukal mukoza örneklerinde de ölçülmesi ve bulunan sonuçların DNA onarım enzimlerindeki polimorfizmler veya bu enzimlerin ekspresyonları ile karşılaştırılmasını düşünmekteyiz.

VI. Kaynaklar

1. Abraham D, Hofbauer R, Schafer R, Blumer R, Paulus P. Zinc supplementation on the development of cardiovascular disease in the elderly. *J. Nutr. Elderly*, 2000; **8**:49-57.
2. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981; 290:457-465
3. Aoki A, Hoffer AP. Reexamination of the lesions in rat testis caused by cadmium. *Biol. Reprod.* 1978;**18 (4)**: 579–591.
4. Bauersachs J, Schafer A. Endothelial dysfunction in heart failure: mechanisms and therapeutic approaches. *Curr. Vasc. Pharm.*, 2004;**2 (2)**:115–124.
5. Beattie JH, Kwun IS. Is zinc deficiency a risk factor for atherosclerosis? *Br J Nutr.* 2004; 91(2):177-81.
6. Bindoff L. Mitochondria and the heart. *Eur Heart J.* 2003; 24:221-4
7. Bogliolo M, Izzotti A, De Flora S, Carli C, Abbondandolo A, Degan P. Detection of the “4977 bp” mitochondrial DNA deletion in human atherosclerotic lesions. *Mutagenesis*. 1999;14:77-82
8. Borish E.T., Prior W.A., Venuugopal S.: DNA synthesis is blocked by cigarette tar-induced DNA single-strand breaks. *Carcinogenesis* 1987; 8: 1517–1520.
9. Botto N, Berti S, Manfredi S, Al-Jabri A, Federici C, Clerico A, Ciofini E, Biagini A, Andreassi MG. Detection of mtDNA with 4977 bp deletion in blood cells and atherosclerotic lesions of patients with coronary artery disease. *Mutat Res.* 2005 Feb 15;570(1):81-8.
10. Botto N, Berti S, Manfredi S. Detection of mtDNA with 4977 bp deletion in blood cells and atherosclerotic lesions of patients with coronary artery disease. *Mutat Res.* 2005; 570:81-88
11. Bray TM, Bettger WJ. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Rad. Biol. Med.* 1990;8:281
12. Bridges CC, Zalups RK. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol. Appl. Pharm.* 2005; **204**: 274–308
13. CHANCE B, H SIES, A BOVERIS. Hydroperoxide metabolism in mamalian organs. *Physiol.Rev.* 1979; 59:527-603.
14. Corral-Debrinski M, Shoffner JM, Lott MT, Wallace DC. Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease. *Mutat Res.* 1992; 275:169-80.
15. Danadevi K, Rozati,R., Banu,B.S., Rao,P.H. and Grover,P. DNA damage in workers exposed to lead using comet assay. *Toxicology*, 2003;187, 183–193.
16. Danadevi,K., Rozati,R., Banu,B.S. and Grover,P. Genotoxic evaluation of welders occupationally exposed to chromium and nickel using the Comet and micronucleus assays. *Mutagenesis*, 2004; 19, 35–41.
17. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;23 Suppl 1, **109**: 327-332.
18. Dudley RE, Gammal LM, Klaassen CD. Cadmium-induced hepatic and renal injury in chronically exposed rats: likely role of hepatic cadmium– metallothionein in nephrotoxicity. *Toxicol.. Appl. Pharm.*, 1985;**77(3)**: 414–426.
19. ELLIS EM.,REID GA. Assembly of Mitochondrial Membranes. *Subcell. Biochem.* 1994;22 : 151-181.
20. Fanning D. A mortality study of lead workers, 1926-1985. *Arch. Environ. Health.* 1988; **43**:247-251.
21. Fende PL, Niewenhuis RJ. An electron microscopic study of the effects of cadmium chloride on cryptorchid testes of the rat. *Biol. Reprod.* 1977;**16(3)**:298–305.
22. Foulkes EC. Renal tubular transport of cadmium–metallothionein. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 1978; **45 (2)**: 505–512.

23. Frahm T, Mohamed SA, Bruse P, Gemund C, Oehmichen M, Meissner C.: Lack of age-related increase of mitochondrial DNA amount in brain, skeletal muscle and human heart. *Mech Ageing Dev.* 2005;126(11):1192-200.
24. Fujiwara Y, Watanabe S, Kaji T. Promotion of cultured vascular smooth muscle cell proliferation by low levels of cadmium. *Tox. Lett.*, 1998; **94 (3)**: 175–180.
25. GRAY MW. Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annu.Rev.Cell.Biol.* 1989; 5:25-50
26. Grover P, Rekhadevi PV, Danadevi K, Vuyyuri SB, Mahboob M, Rahman MF. Genotoxicity evaluation in workers occupationally exposed to lead. *Int J Hyg Environ Health.* 2010 Mar;213(2):99-106. Epub 2010 Feb 12.
27. Gunn SA, Gould TC, Anderson WAD. Zinc protection against cadmium injury to rat testis. *Arch. Path.*, 1961;**71**: 274–281.
28. Harman, D., Aging: phenomena and theories. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1998; 854: 1–7.
29. Hernandez M, Macia M. Free peripheral sulfhydryl groups, CD11/ CD18 integrins, and calcium are required in the cadmium and nickel enhancement of human-polymorphonuclear leukocyte adherence. *Arch. Environ. Contam. Tox.*, 1996; **30(4)**:437–443.
30. Hoey MJ. The effects of metallic salts on the histology and functioning of the rat testis. *J. Reprod. Fertil.* 1966;**12(3)**:461–472
31. Holt IJ, Harding AE, Cooper JM, Schapira AH, Toscano A, Clark JB, Morgan-Hughes JA.;Mitochondrial myopathies: clinical and biochemical features of 30 patients with major deletions of muscle mitochondrial DNA. *Ann Neurol.* 1989; 26(6):699-708.
32. Houtman JP. Prolonged low-level cadmium intake and atherosclerosis. *Sci. Total. Environ.*, 1993; **138**:31–36.
33. Jeong EM, Moon CH, Kim CS, Lee SH, Baik EJ, Moon CK, Jung YS. Cadmium stimulates the expression of ICAM-1 via NF-kappaB activation in cerebrovascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2004; **320 (3)**: 887–892.
34. Kaji T, Fujiwara Y, Koyanagi E, Yamamoto C, Mishima A, Sakamoto M, Kozuka H. Protective effect of copper against cadmium cytotoxicity on cultured vascular endothelial cells. *Tox. Lett.*, 1992a;**63(1)**:13–20
35. Kaji T, Mishima A, Koyanagi E, Yamamoto C, Sakamoto M, Kozuka H. Possible mechanism for zinc protection against cadmium cytotoxicity in cultured vascular endothelial cells. *Toxicology*, 1992b;**76(3)**:257–270.
36. Kaji T, Yamamoto C, Tsubaki S. Metallothionein induction by cadmium, cytokines, thrombin and endotbelin-1 in cultured vascular endothelial cells. *Life Sci.*, 1993; 53:1185.
37. Kayaaltı Z, Cantürk N, Şahiner L, Odabaşı M, Söylemezoğlu T. Detection of Mitochondrial DNA Deletions in Heart Tissue with Acute Myocardial Infarction *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2009, 62(1):25-29
38. Kayaaltı Z, Söylemezoğlu T. Türk Populasyonunda Mitokondriyal DNA Delesyonlarında Yaşlanma ve Sigara Kullanımının Etkisi. *TÜRKİYE KLİNİKLERİ TIP BİLİMLERİ DERGİSİ.* 2010; **30 (4)** 1292-1298
39. Kessel M, Liu SX, Xu A, Santella R, Hei TK. (2002) Arsenic induces oxidative DNA damage in mammalian cells. *Mol Cell Biochem.* 234-235(1-2):301-8.
40. Kim H, Oh E, Im H, Mun J, Yang M, Khim JY, Lee E, Lim SH, Kong MH, Lee M, Sul D.Oxidative damages in the DNA, lipids, and proteins of rats exposed to isofluranes and alcohols. *Toxicology.* 2006;220(2-3):169-78.
41. Kisimoto T, Fukuzawa Y, Abe M, Isobe M, Hashimoto M, Tada M. Cadmium injury of cultured human vascular endothelial cells. *Hum. Cell*, 1991; **4(4)**:329–334.
42. Kotsonis FN, Klaassen CD. The relationship of metallothionein to the toxicity of cadmium after prolonged oral administration to rats. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 1978;**46(1)**:39–54.
43. Lai LP, Tsai CC, Su MJ, et al. Atrial fibrillation is associated with accumulation of aging-related

- common type mitochondrial DNA deletion mutation in human atrial tissue. *Chest*. 2003; 123:539-44
44. Liu CS, Kao SH, Wei YH. Smoking-associated mitochondrial DNA mutations in human hair follicles. *Environ Mol Mutagen*. 1997;30(1):47-55.
 45. Lustberg M, Silbergeld E. Blood lead levels and mortality. *Arch. Intern. Med*. 2002;162:2443-2449.
 46. Machlin L.J. Bendich A.: Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J*. 1987;1(6): 441–445.
 47. Mateuca,R., Aka,P.V., De Boeck,M., Hauspie,R., Kirsh-Volders,M. and Lison,D. Influence of hOGG1, XRCC1 and XRCC3 genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts. *Toxicol. Lett.*, 2005;156, 277–288.
 48. Mohamed SA, Hanke T, Erasmi AW, et al. Mitochondrial DNA deletions and the aging heart. *Exp Gerontol*. 2006; 41:508-17
 49. Nakagawa H, Nishijo M. Environmental cadmium exposure, hypertension and cardiovascular risk. *J Cardiovasc Risk*, 1996; **3(1)**:11-7.
 50. Nash D, Magder L, Lustberg M. Blood lead, blood pressure, and hypertension in perimenopausal and postmenopausal women. *JAMA*, 2003;**289**:1523-1532.
 51. Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld EK, Rothenberg SJ. Lead exposure and cardiovascular disease--a systematic review. *Environ Health Perspect*. 2007;115(3):472-82.
 52. Navas-Acien A, Selvin E, Sharrett AR, Calderon-Aranda E, Silbergeld E, Guallar E Lead, cadmium, smoking, and increased risk of peripheral arterial disease. *Circulation*. 2004; 109(25):3196-3201.
 53. Navas-Acien A, Silbergeld EK, Sharrett R, Calderon-Aranda E, Selvin E, Guallar E Metals in urine and peripheral arterial disease. *Environ Health Perspect*. 2005;113(2):164-9.
 54. Nawrot TS, Thijs L, Den Hond EM, Roels HA, Staessen JA. An epidemiological re-appraisal of the association between blood pressure and blood lead: a meta-analysis. *J Hum Hypertens*. 2002;16: 123–131.
 55. Niewenhuis RJ, Dimitriu C, Prozialeck WC. Ultrastructural characterization of the early changes in intercellular junctions in response to cadmium (Cd²⁺) exposure in LLC-PK1 cells. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 1997;**142(1)**:1–12.
 56. Nolan, CV, Shaikh ZA. The vascular endothelium as a target tissue in acute cadmium toxicity. *Life Sci.*, 1986;**39(16)**:1403–1409.
 57. Nordberg M, Nordberg GF. Toxicological Aspects of Metallothionein. *Cellular Molecular Biology* 2000; **46**: 451–463.
 58. Olewińska E, Kasperczyk A, Kapka L, Kozłowska A, Pawlas N, Dobrakowski M, Birkner E, Kasperczyk S. Level of DNA damage in lead-exposed workers. *Ann Agric Environ Med*. 2010 Dec;17(2):231-6
 59. Oteiza PI, Olin KL, Fraga CG. Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes. *J. Nutr*. 1995;125:823
 60. OZAWA T. Mechanism of Mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochim. Biophys. Acta*. 1995;1271:177-89
 61. Palus J, Rydzynski K, Dziubaltowska E, Wyszynska K, Natarajan AT, Nilsson R. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat Res*. 2003; 9;540(1):19-28.
 62. Partridge MA, Huang SX, Hernandez-Rosa E, Davidson MM, Hei TK. Arsenic induced mitochondrial DNA damage and altered mitochondrial oxidative function: implications for genotoxic mechanisms in mammalian cells. *Cancer Res*. 2007; 67(11):5239-47.
 63. Pearson CA, Prozialeck WC. E-cadherin, beta-catenin and cadmium carcinogenesis. *Med. Hypotheses*, 2001; **56(5)**:573–581.
 64. Peereboom-Stegeman JH, Jongstra-Spaapen EJ. The effect of a single sublethal administration of cadmium chloride on the microcirculation in the uterus of the rat. *Toxicology* 1979; **13(3)**:199–213.

65. Restrepo HG, Sicard D, Torres MM. DNA damage and repair in cells of lead exposed people. *Am J Ind Med.* 2000 Sep;38(3):330-4.
66. Schwartz J. Lead, blood pressure, and cardiovascular disease in men. *Arch. Environ. Health,* 1995;50:31-37.
67. Sokas R.K., Simmens S., Sophar K. Lead levels in Maryland construction workers. *Am. J. Ind. Med.,* 1997; 31(2):188-194
68. Squibb K, Pritchard JB, Fowler BA. Cadmium–metallothionein nephropathy: relationships between ultrastructural/biochemical alterations and intracellular cadmium binding. *J. Pharm. Exper. Therap.,* 1984;229(1):311–321.
69. Staessen JA, Kuznetsova T, Roels HA, Emelianov D, Fagard R. Exposure to cadmium and conventional and ambulatory blood pressures in a prospective population study: Public Health and Environmental Exposure to Cadmium Study Group. *Am J Hypertens.* 2000;13: 146–156.
70. Szuster-Ciesielska A., Lokaj I. Kandefér-Szerszen M. The influence of cadmium and zinc ions on the interferon and tumor necrosis factor production in bovine aorta endothelial cells. *Toxicology* 2000;145 (2–3): 135–145.
71. Takaki A, Jimi S, Segawa M, Hisano S, Takebayashi S, Iwasaki H. Long-term cadmium exposure accelerates age-related mitochondrial changes in renal epithelial cells. *Toxicology.* 2004 Oct 15;203(1-3):145-54.
72. Takaki A, Jimi S, Segawa M, Iwasaki H. Cadmium-induced nephropathy in rats is mediated by expression of senescence-associated beta-galactosidase and accumulation of mitochondrial DNA deletion. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Apr;1011:332-8.
73. Takebayashi S, Jimi S, Segawa M, Takaki A. Mitochondrial DNA deletion of proximal tubules is the result of itai-itai disease. *Clin Exp Nephrol.* 2003; 7(1):18-26.
74. Tellez-Plaza M, Navas-Acien A, Crainiceanu CM, Guallar E. Cadmium exposure and hypertension in the 1999-2004 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Environ Health Perspect.* 2008;116(1):51-6.
75. Tomera JF Lilford K, Kukulka SP. Friend KD. Harakal C. Divalent cations in hypertension with implications to heart disease: calcium, cadmium interactions, *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1994; 16 (2): 97–107.
76. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. *Cardiovasc Res.* 2009; 81:449-56
77. Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* 1993; 73(1):79-118.
78. Vupputuri S, He J, Muntner P. Blood lead level is associated with elevated blood pressure in blacks. *Hypertension.* 2003; 41:463-468.
79. WALLACE DC.: Mitochondrial DNA Sequence variation in human evolution and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994;91:8739-46
80. Wright AF, Jacobson SG, Cideciyan AV, Roman AJ, Shu X, Vlachantoni D, McInnes RR, Riemersma RA.: Lifespan and mitochondrial control of neurodegeneration. *Nat Genet.* 2004; 36(11):1153-8
81. Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:514–519.
82. Yamamoto C, Kaji T, Sakamoto M, Kozuka H. Cadmium stimulation of plasminogen activator inhibitor-1 release from human vascular endothelial cells in culture. *Toxicology.* 1993; 83(1–3): 215–223.
83. Zalups RK, Ahmad S. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol. Appl. Pharm.* 2003; 186 (3): 163–188.
84. Zawadzki M, Poreba R, Gać P (2006). Mechanisms and toxic effects of lead on the cardiovascular system. *Med Pr.* 57(6):543-9.

VII. Ekler

a) Mali Bilanço ve Açıklamalar

Sıra No	Malzemenin Cinsi	Miktarı	Ölçü Birimi	KDVli Fiyatı
1	8-HYDROXYQUINOLINE 100 GR	1	adet	141.60
2	AGAROSE 10 G	1	adet	94.40
3	DIMETHYL SULFOXIDE FOR SYNTHESIS 2,5 LT	1	adet	82.60
4	ETHIDIUM BROMIDE 1 GR	1	adet	23.60
5	EDTA -DISODIUM SALT 500 GR.	1	adet	35.40
6	HISTOPAQUE FICOLL 100 ML	1	adet	70.80
7	HYDROCHLORIC ACID EXTRA PURE %37 2,5 LT	1	adet	35.40
8	LAM BUZLU KESME A KALITE 50 AD/KT	10	kutu	295.00
9	LAM RENKLIUNIMARK KENARLARI TRASLI PP A 50 AD/PK	10	kutu	531.00
10	LAMEL 24X32 MM 100 AD/KT	1	kutu	17.70
11	LAUROYLSARCOSINE SOD.SALT 50 GR.	1	adet	23.60
12	PHOSPHATE BUFFERED SALINE 100 TABLET	1	adet	53.10
13	POLY-L-LYSINE SOLUTION 100 ML.	1	adet	153.40
14	POTASSIUM CHLORID KCl 1 KG.	1	adet	29.50
15	POTASSIUM HYDROXIDE 1 KG.	1	adet	64.90
16	RPMI-1640 MEDIUM 100ML	10	adet	354.00
17	SODIUM CHLORIDE EXTRA PURE 1 KG.	1	adet	35.40
18	SODIUM HYDROXIDE EX. PURE 1 KG	1	adet	53.10
19	TRITON X-100 100 ML	1	adet	35.40
20	TRIS HIDROKSİMİTİLAMİNOMETHAN 25 G.	1	adet	41.30
21	ŞALE CAM DİK YUVARLAK KAPAKLI 10LAMLK	1	adet	29.50
22	ŞALE CAM YATIK DÖRT KÖŞE 10LAM	1	adet	29.50

23	Absorption Celss CGA 76/77 (PK2)	1	adet	4,130.00
24	GTA Tubes Partitioned PyroBox 10	1	adet	2,124.00
25	Graphite Electrode	1	adet	1,121.00
26	Vials 2ml Conical (1000) Plthn	1	adet	826.00
27	Floresan ataçmanlı Kamera	1	adet	18,821.00
28	Kit Capillary Spares	1	adet	2,537.00
29	0.2 ml lik PCR Tüpü 1000 lik (10x100lük)	5 Paket	100 adet X10 Kutu	472.00
30	1-10 ul pipet ucu 10x96 lık steril-T	5 Paket	96 Adet X 10 Kutu	472.00
31	100 bp DNA Ladder	5 Adet	Adet	442.00
32	10X TBE Buffer	5 Adet	1LT	265.50
33	Agaroz	1 Adet	500 GR	174.64
34	Hotstart Taq DNA Polymerase	2 Adet	1000 Ünite	2,851.20
35	Phenol-chloroform –isoamylalcohol	5 Adet	100ML	501.50
36	Proteinase K	15 Adet	1ML	531.00
37	dNTP Mix 2mM	10 Adet	1ML	153.40
38	12V 18 Ah Tam Bakımsız Akü (AAS güç kaynağı için sarf malzemesi)	30	adet	1,309.80
	Toplam			38,962.74 TL

b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar

Bu kalemden sadece “Floresan ataçmanlı Kamera” satın alınmıştır. Bu kamera “Komet analiz” yönteminde kullanılmakta olan ve daha önceki projelerle satın alınmış olan donanımın çalışabilmesi için gerekli bir cihaz olup halen sürmekte olan Komet analizlerinin yer alacağı aşağıda yazılı tezlerle, yapılması planlanmış ve etik izinleri alınmış olan araştırmalarda gereklidir.

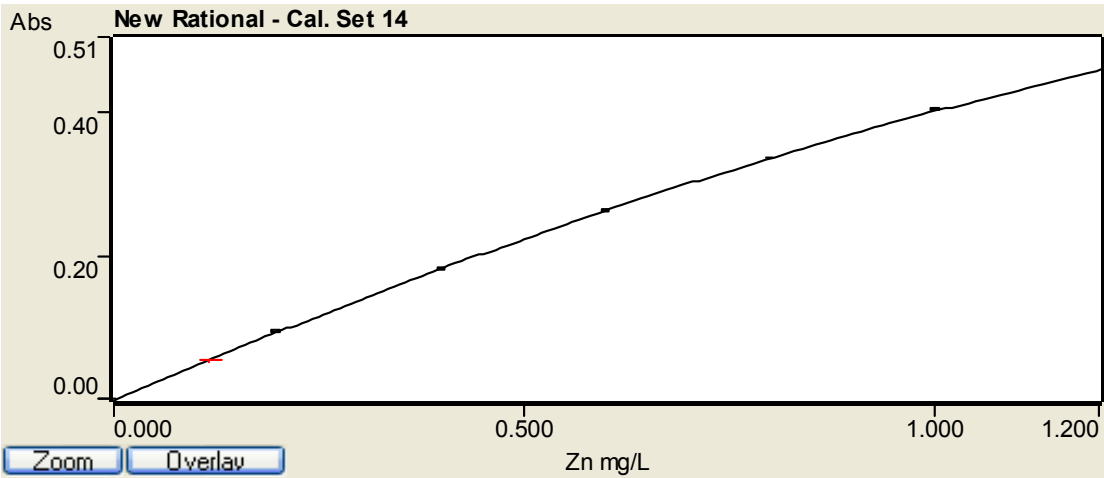
1. Metallerle maruz kalan bireylerde lenfosit DNA hasarının XRCC1 ve XRCC3 gen polimorfizmleri ile ilişkisi. Doktora tezi. İlknur Yavuz . Danışman: Prof.Dr. Tülin Söylemezoğlu
2. Organik çözücülere maruz kalan bireylerde lenfosit DNA hasarının XRCC1 ve XRCC3 gen polimorfizmleri ile ilişkisi. Doktora tezi. Ayşegül Bacaksız . Danışman Prof.Dr. Gülin Güvendik
3. “Toplumumuzda silikozis gelişiminde rol oynayan aday gen polimorfizmlerinin ve DNA hasarının araştırılması ile maruziyetle ilgili biyogösterge olarak hidrokspirolin düzeyinin belirlenmesi” konulu araştırma. Prof.Dr. Tülin Söylemezoğlu ve Yrd. Doç. Dr. Zeliha Kayaaltı.

4. “Mesleki polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) maruziyetinde mitokondriyal ve nükleer DNA hasarının belirlenmesi ve idrarda PAH metabolitlerinin düzeylerinin analizi ile, bu metabolitlerin oluşumu ve atılımına detoksifikasyon enzimlerindeki gen polimorfizmlerinin etkisinin araştırılması”. konulu araştırma. Prof.Dr. Tülin Söylemezoğlu ve Yrd. Doç. Dr. Zeliha Kayaaltı. Uzm. Bio. Emrah Dural

c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar (varsa Kesim III'de yer almayan analiz ayrıntıları)

Tablo12: AAS Çinko düzeyi belirleme parametreleri

Element – matriks	: Zn-Serum
Enstrüman	: Flame
Konsantrasyon birimi	: ppm
Enstrüman modu	: Absorbans
Örnekleme	:Manuel
Kalibrasyon modu	: Konsantrasyon
Ölçüm modu	: İntegrasyon
Standart tekrarı	: 3
Örnek tekrarı	: 3
Eğri çizimi	: 7 noktalı
Konsantrasyon ondalık aralığı	: 3 basamak
Dalgaboyu	: 213.9 nm
Slit genişliği	: 0.5 nm
Gain	: % 38
Akım	:1.0 Ma
Background	: BC on



Şekil 1 : Çinko kalibrasyon grafiği

Tablo13: Çinko kalibrasyon grafiği değerleri

Method: Zn Serum (Flame)
 Cal. Set 14
 Curve Fit = New Rational
 Calibration Mode = Concentration
 Characteristic Conc = 0.009 mg/L
 r = 1.0000

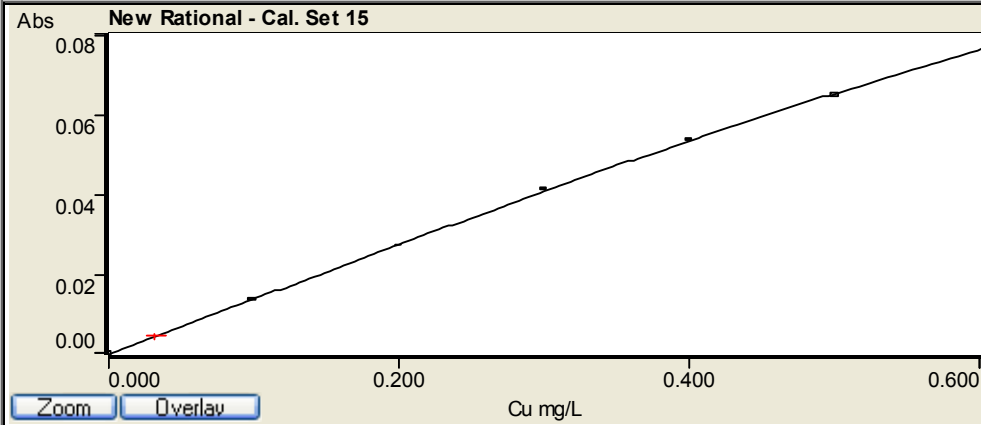
Conc = A

$$(-0.32030 \times A \times A - 0.06146 \times A + 0.47673)$$

	0.000	-0.0008	-0.002	0.002
CAL ZERO	0.000	-0.0008	-0.002	0.002
STANDARD 1	0.200	0.0948	0.203	-0.003
STANDARD 2	0.400	0.1809	0.397	0.003
STANDARD 3	0.600	0.2624	0.598	0.002
STANDARD 4	0.800	0.3354	0.798	0.002
STANDARD 5	1.000	0.4017	1.003	-0.003

Tablo 14: AAS Bakır düzeyi belirleme parametreleri

Element – matriks	: Cu-Serum
Enstrüman	:Flame
Konsantrasyon birimi	: ppm
Enstrüman modu	: Absorbans
Örnekleme	:Manuel
Kalibrasyon modu	: Konsantrasyon
Ölçüm modu	: İntegrasyon
Standart tekrarı	: 3
Örnek tekrarı	: 3
Eğri çizimi	: 7 noktalı
Konsantrasyon ondalık aralığı	: 3 basamak
Dalgaboyu	: 324.8 nm
Slit genişliği	: 0.5 nm
Gain	: % 38
Akım	:1.0 mA
Background	: BC on



Şekil 2: Bakır kalibrasyon grafiği

Tablo 15: Bakır kalibrasyon grafiği değerleri

Method: Cu Serum (Flame)
 Cal. Set 15
 Curve Fit = New Rational
 Calibration Mode = Concentration
 Characteristic Conc = 0.033 mg/L
 r = 1.0000

Conc = A

$$(-3.70855 \times A \times A + 0.18608 \times A + 0.13384)$$

	A	Y	Y _{calc}	Residual
CAL ZERO	0.000	-0.0015	-0.011	0.011
STANDARD 1	0.100	0.0135	0.099	0.001
STANDARD 2	0.200	0.0270	0.199	0.001
STANDARD 3	0.300	0.0410	0.303	-0.003
STANDARD 4	0.400	0.0535	0.401	-0.001
STANDARD 5	0.500	0.0648	0.497	0.003

Tablo 16. Mikrodalga fırında kan örnekleri yakma programı.

Basamak	Güç(W)	% Güç	Zaman(da k.)	Basınç	Sıcaklık(°C)	Bekleme(da k.)
1	800	100	15	Maks.	200	5

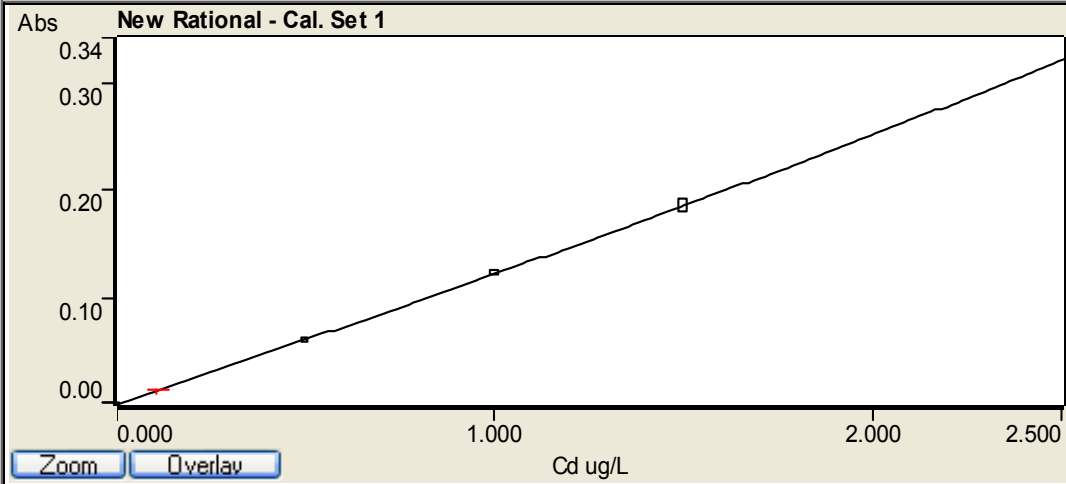
Tablo 17. AAS Kadmiyum analiz aşamaları

Step	Sıcaklık (°C)	Zaman (s)	Akış (L/dak)	Okuma	Sinyal Toplama
1	85	5.0	0.3	Hayır	Hayır
2	95	40	0.3	Hayır	Hayır
3	140	20	0.3	Hayır	Hayır
4	300	10	0.3	Hayır	Hayır

5	450	5.0	0.1	Hayır	Hayır
6	450	5.0	0.1	Hayır	Hayır
7	650	10	0.3	Hayır	Hayır
8	650	10	0.3	Hayır	Evet
9	650	1.0	0.0	Evet	Evet
10	2500	1.0	0.0	Evet	Evet
11	2500	1.0	0.3	Evet	Evet

Tablo 18. AAS kadmiyum düzeyi belirleme parametreleri

Element – matriks	: Cd-Kan
Enstrüman	: Zeeman
Konsantrasyon birimi	: ppb
Enstrüman modu	: Absorbans
Örnekleme	: Otomatik
Kalibrasyon modu	: Konsantrasyon
Ölçüm modu	: Pik yüksekliği
Standart tekrarı	: 3
Örnek tekrarı	: 2
Eğri çizimi	: 7 noktalı
Konsantrasyon ondalık aralığı	: 3 basamak
Dalgaboyu	: 228.8 nm
Slit genişliği	: 0.5 nm
Gain	: % 55
Akım	: 4.0 mA
Background	: BC on



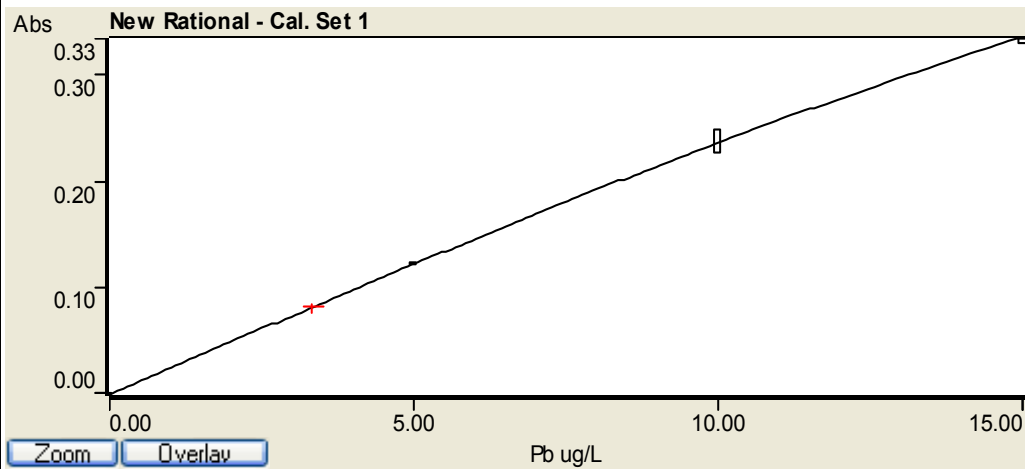
Şekil 5 Kadmiyum kalibrasyon grafiği.

Tablo 19: Kadmiyum kalibrasyon grafiği değerleri

Method: Cd Optimised KAN Cd (Zeeman)
 Cal. Set 1
 Curve Fit = Linear
 Calibration Mode = Concentration
 Characteristic Conc = -0.014 ug/L
 r = 0.9999

$$\text{Abs} = 0.12282 \times C + 0.00616$$

CAL ZERO	0.000	0.0072	0.009	-0.009
STANDARD 1	0.500	0.0659	0.486	0.014
STANDARD 2	1.000	0.1292	1.002	-0.002
STANDARD 3	1.500	0.1908	1.503	-0.003



Şekil 6: Kurşun kalibrasyon grafiği

Tablo 20: Kurşun kalibrasyon grafiği değerleri

Method: Pb KAN (Zeeman)
 Cal. Set 1
 Curve Fit = New Rational
 Calibration Mode = Concentration
 Characteristic Conc = 0.18 ug/L
 r = 1.0000

Conc = A

(-0.03033 x A x A + 0.00457 x A + 0.02419)
 CAL ZERO 0.00 0.0145 0.60 -0.60
 STANDARD 1 5.00 0.1211 4.98 0.02
 STANDARD 2 10.00 0.2367 10.04 -0.04
 STANDARD 3 15.00 0.3344 14.98 0.02

Tablo 21: AAS Kurşun analiz aşamaları

Basamak	Sıcaklık (C°)	Zaman (s)	Akış Hızı (L/dak)	Gaz Tipi	Okuma	Sinyal Toplama
1	85	5.0	0.3	Normal	Yok	Yok
2	95	50.0	0.3	Normal	Yok	Yok
3	120	15.0	0.3	Normal	Yok	Yok
4	550	5.0	0.3	Normal	Yok	Yok
5	550	5.0	0.3	Normal	Yok	Yok
6	550	2.0	0.3	Normal	Yok	Yok
7	200	6.1	0.3	Normal	Yok	Var
8	200	0.0	0.0	Normal	Var	Var
9	650	0.9	0.0	Normal	Var	Var
10	2150	2.0	0.0	Normal	Var	Var
11	2150	2.0	0.3	Normal	Yok	Var
12	2600	2.0	0.3	Normal	Yok	Yok
13	2600	2.0	0.3	Normal	Yok	Yok

Tablo 22: AAS Kurşun düzeyi belirleme parametreleri

Element - matriks	: Pb-Kan
Enstrüman	: Zeeman
Konsantrasyon birimi	: ppb
Enstrüman modu	: Absorbans
Örnekleme	: Otomatik

Kalibrasyon modu	: Konsantrasyon
Ölçüm modu	: Pik yüksekliği
Standart tekrarı	: 3
Örnek tekrarı	: 2
Eğri çizimi	: 7 noktalı
Konsantrasyon ondalık aralığı	: 3 basamak
Dalgaboyu	: 283.3 nm
Slit genişliği	: 0.5 nm
Gain	: % 39
Akım	:10 mA
Background	: BC on

d) Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar) **(Altyapı Projeleri için uygulanmaz)**

1. Soylemezoglu T.; Soylemez E.; Kayaalti Z. Aliyev, V . The effect of cigarette smoking according to eight comet assay parameters 47th Congress of the European-Societies-of-Toxicology (Paris, FRANCE AUG 28-31, 2011) TOXICOLOGY LETTERS 2011 ; 205 (1): S135-S135 DOI: 10.1016/j.toxlet.2011.05.482
2. Soylemezoglu T.; Kayaalti Z.; Soylemez E, Bacaksız, A, Tutkun, E. Evaluation of DNA damage by comet assay in metal exposed Turkish population. 47th Congress of the European-Societies-of-Toxicology(Paris, FRANCE AUG 28-31, 2011) TOXICOLOGY LETTERS 2011 ; 205 (1) S196-S196 DOI: 10.1016/j.toxlet.2011.05.677
3. Kayaalti Z.; Soylemez E.; Yalcin S, Soylemezoglu T. Validation of comet assay for detecting DNA damage in whole blood samples. 47th Congress of the European-Societies-of-Toxicology (Paris, FRANCE AUG 28-31, 2011) TOXICOLOGY LETTERS 2011 ; 205 (1) : S204-S204 DOI: 10.1016/j.toxlet.2011.05.702

e) Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler **(Altyapı Projeleri için uygulanmaz)**

NOT: Verilen kesin rapor bir (1) nüsha olarak ciltsiz şekilde verilecek, kesin rapor Komisyon onayından sonra ciltlenerek bir kopyasının yer aldığı CD ile birlikte sunulacaktır. Kesin raporda proje sonuçlarını içeren, ISI' nın SCI veya SSCI veya AHCI dizinleri kapsamında ve diğer uluslar arası dizinlerce taranan hakemli dergilerde yayınlanmış makaleler, III. Materyal ve Yöntem ve IV. Analiz ve Bulgular bölümleri yerine kabul edilir.

TARİH

18. 03.2012

ADI VE SOYADI

Prof.Dr. Tülin Söylemezoglu

İMZA