



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**MESLEKSEL KURŞUN MARUZİYETİ OLAN BİREYLERDE
HFE GENİNDEKİ TEK NÜKLEOTİT POLİMORFİZMİNİN KAN
VE İDRAR KURŞUN DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

Asım HOCAOĞLU

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI ADLİ KİMYA VE
ADLİ TOKSİKOLOJİ PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Zeliha KAYAALTI**

**ANKARA
2016**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MESLEKSEL KURŞUN MARUZİYETİ OLAN BİREYLERDE
HFE GENİNDEKİ TEK NÜKLEOTİT POLİMORFİZMİNİN KAN
VE İDRAR KURŞUN DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

Asım HOCAOĞLU

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI ADLİ KİMYA VE
ADLİ TOKSİKOLOJİ PROGRAMI
DOKTRORA TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Zeliha KAYAALTI

Bu tez "Talasemi Hastalarında Metallerin Toksikokinetiğinde Rol Oynayan Enzim ve Talasemi Gen Polimorfizmlerinin Kan Metal Düzeyleri İle İlişkisinin Araştırılması" başlıklı ve 114S312 numaralı TÜBİTAK Projesi kapsamında desteklenmiştir.

ANKARA

2016

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Mesleksel Kurşun Maruziyeti Olan Bireylerde HFE Genindeki Tek Nükleotit Polimorfizminin Kan ve İdrar Kurşun Düzeylerine Etkisi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/ hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/ araştırma tarafımdan yapılmış olup tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Asım HOCAOĞLU

17.10.2016

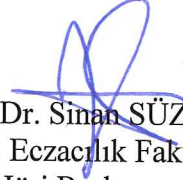
İmza


Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı
Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Doktora Programında


Asım HOCAOĞLU tarafından hazırlanan


“Mesleksel Kurşun Maruziyeti Olan Bireylerde HFE Genindeki Tek Nükleotid
Polimorfizminin Kan ve İdrar Kurşun Düzeylerine Etkisi” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak
OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

03.11.2016


Prof. Dr. Sinan SÜZEN
Ank.Ü. Eczacılık Fakültesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN
Hacettepe Ü. Eczacılık Fakültesi
Üye


Prof. Dr. Aslıhan AVCI
Ankara Ü. Tıp Fakültesi
Üye


Doç. Dr. Zeliha KAYAALTI
Ank.Ü. Adli Bilimler Enstitüsü
Üye


Doç. Dr. Onur ERDEM
Sağlık Bilimleri Ü. Gülhane Eğt. ve Arşt. Hast.
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. K. Zafer KARAER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	ix
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xii
Çizelgeler	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Kurşun	1
1.1.1. Kurşunun Tarihçesi	1
1.1.2. Kurşunun Özellikleri	1
1.1.3. Kurşun Maruziyeti	3
1.1.3.1. Kurşuna Çevresel Maruziyet	3
1.1.3.2. Mesleki Maruziyet	4
1.1.4. Kurşun Metabolizması	6
1.1.4.1. Absorpsiyon	6
1.1.4.2. Dağılım	8
1.1.4.3. Atılım	8
1.1.5. Kurşunun Sağlık Üzerine Etkileri	9
1.1.5.1. Kan Sistemi Üzerine Etkisi	10
1.1.5.2. Sinir Sistemi Üzerine Etkisi	12
1.1.5.3. Üriner Sistem Üzerine Etkileri	12
1.1.5.4. Karaciğer Üzerine Etkisi	13
1.1.5.5. Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkisi	14
	iv

1.1.5.6. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi	14
1.1.5.7. Endokrin Sistem Üzerine Etkisi	14
1.1.5.8. Kanser Oluşumu Üzerine Etkisi	15
1.1.5.9. Kurşunun Diğer Etkileri	16
1.1.6. Kurşun Zehirlenmesinde Tanı	16
1.1.7. Kurşun Maruziyetinde Tedavi ve Korunma	18
1.2. Biyolojik Materyallerde Metal Tayini	22
1.2.1 Metal Analizi İçin Ön Hazırlık İşlemleri	22
1.2.1.1. Yaş Yakma Yöntemi	23
1.2.1.2. Kuru Yakma Yöntemi	23
1.2.1.3. Mikrodalga ile Yakma Yöntemi	23
1.2.2. Metal Analizinde Kullanılan Cihazlar	25
1.2.2.1. Atomik Absorpsiyon Spektrometresi	25
1.2.2.2. İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi	26
1.2.2.2.1. ICP-MS Çalışma Prensipleri	27
1.3. Yüksek Demir Proteini (HFE)	29
1.3.1. HFE Proteininin Yapısı	29
1.3.2. HFE Geni	31
1.3.3. HFE Geninin Fonksiyonu	32
1.4. Genetik Polimorfizm	34
1.4.1. Polimorfizm Çeşitleri	35
1.4.1.1. DNA'daki Tekrar Dizileri	36
1.4.1.2. İnsersiyon	36
1.4.1.3. Delesyon	36
1.4.1.4. Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP)	36
1.4.1.4.1. SNP'lerin Protein Oluşumuna Etkileri	37

1.5. HFE Gen Mutasyonları ve Herediter Hemokromatozis	38
1.5.1. HFE Geninde H63D Polimorfizmi	38
1.6. Polimorfizm Analizi	39
1.6.1. DNA İzolasyonu	40
1.6.1.1. Fenol- Kloroform- İzosamil Alkol ile DNA İzolasyonu ve İzolasyon Bileşenleri	40
1.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	41
1.6.2.1. PCR'ın Aşamaları	42
1.6.2.2. PCR'ın Bileşenleri	43
1.6.3. Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi ve Bileşenleri	45
2. GEREÇ VE YÖNTEM	47
2.1. Gereçler	47
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	47
2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	48
2.2. Yöntem	50
2.2.1. Çalışma Grubunun Seçilmesi	50
2.2.2. Örneklerin Toplanması	51
2.2.3. Kan ve İdrar Örneklerinde Kurşun Analizi	51
2.2.3.1. Kan Örneklerinin ve İdrar Örneklerinin Kurşun Analizi İçin Hazırlanması	51
2.2.3.2. Kan ve İdrar Örneklerinde Kurşun Düzeyinin Belirlenmesi	52
2.2.3.3. Serumda Demir Düzeyinin Belirlenmesi	52
2.2.4. HFE Geni H63D Tek Nükleotid Polimorfizminin Belirlenmesi	54
2.2.4.1. Tam Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu	55
2.2.4.2. Agoroz Jel Elektroforezi ile DNA Varlığının Belirlenmesi	57
2.2.4.2.1. % 0,5'lik Agoroz Jel Hazırlanması	57
2.2.4.2.2. Örnek Hazırlanması ve Agoroz Jele Yüklenmesi	58

2.2.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	59
2.2.4.3.1 PCR Aşamasında Kullanılan Primerler	60
2.2.4.3.2. HFE Geninin H63D Polimorfizminin Belirlenmesi Amacıyla Yapılan PCR Bileşenleri ve Şartları	63
2.2.4.3.3. HFE geninin H63D Polimorfizminin Belirlenmesinde Kullanılan PCR Yöntemi ve PCR Programı	64
2.2.4.3.4. PCR'ın Kontrolü için %1'lik Agaroz Jel Hazırlanması	66
2.2.4.4. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi (RE) ile Kesimi	68
2.2.4.4.1. MboI Restriksiyon Enziminin Özellikleri	69
2.2.4.4.2. MboI Enzimi ile İnkübasyon Sonrası Genotiplendirme Yapmak Amacı ile %2,5'luk Agaroz Jel Hazırlanması	69
2.2.4.4.3. MboI Restriksiyon Enzimi ile Kesim ve SNP'nin Genotiplendirmesi	70
2.2.7. İstatistiksel Değerlendirme	70
3. BULGULAR	72
3.1. Genel Değerlendirmeler, Tanımlayıcı Bilgiler	72
3.2. Pb, Fe, Yaş ve Sigara İndeksi Arasındaki Korelasyon Analizi Sonuçları	73
3.3. Pb ve Fe düzeyleri ile Sigara İçimi Arasındaki İlişkinin Sonuçları	74
3.4. HFE H63D Gen Polimorfizmi Sonuçları	75
3.4.1. DNA İzolasyonu Varlığının Agaroz Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi	75
3.4.2. PCR Yöntemi ile DNA'nın Amplifiye Edilmesi	75
3.4.3. PCR-RFLP Ürününün MboI Restriksiyon Enzimi ile Kesimi	76
3.4.4. HFE geni H63D C→G Polimorfizmin Genotip Frekansları	78
3.4.5. HFE geni H63D C→G Polimorfizmin Alel Frekansları	79
3.4.6. Çalışma Grubumuzda Hardy-Weinberg Dengesinin Tespiti	79
3.5. HFE H63D Gen Polimorfizminin Tam Kan Pb, İdrar Pb ve Serum Fe Düzeylerine Etkisi	81
3.5.1. HFE H63D Gen Polimorfizminin Tam Kan Pb Düzeyine Etkisi	81
3.5.2. HFE H63D Gen Polimorfizminin İdrar Pb Düzeyine Etkisi	83

3.5.3. HFE H63D Gen Polimorfizminin Serum Fe Düzeyine Etkisi	85
4. TARTIŞMA	88
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	94
ÖZET	96
SUMMARY	97
KAYNAKLAR	98
EKLER	111
ÖZGEÇMİŞ	115



ÖNSÖZ

Gelişen teknoloji ve üretimlerle çevremiz gün be gün birçok toksik madde ve kirlenme ile karşı karşıya gelmektedir. Günümüz koşullarında kısıtlayıcı önlemler alınmasına ve birtakım yasal düzenlemeler getirilmesine rağmen ağır metallere maruziyeti sıfırlamak mümkün değildir. Organizmada birikme özelliği olan ve yarılanma ömürleri yıllar süren ağır metallerin neden olduğu yıkıcı toksik etkilerin daha iyi açıklanabilmesi, biyotransformasyonlarındaki genetik farklılıkların belirlenmesi, maruziyetin engellenmesi, koruyucu önlemlerin alınması ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi halk sağlığı ve işçi sağlığı açısından önemlidir.

Bu tez "Talasemi Hastalarında Metallerin Toksikokinetiğinde Rol Oynayan Enzim ve Talasemi Gen Polimorfizmlerinin Kan Metal Düzeyleri İle İlişkisinin Araştırılması" başlıklı ve 114S312 numaralı TÜBİTAK Projesi kapsamında desteklenmiştir.

Tez çalışmam süresince çalışkanlığı, azmi ve yol göstericiliği yanısıra, sosyal ilişkilerdeki başarısı ile her zaman örnek aldığım danışman hocam Adli Bilimler Enstitüsü Müdür Yardımcısı Sayın Doç. Dr. Zeliha KAYAALTI'na,

Laboratuvar çalışmaları esnasında bilgi ve tecrübelerini paylaşmaktan kaçınmayan, her zaman özverili, gayretli ve dürüst tavırlarıyla tam bir bilim insanı olduğunu düşündüğüm değerli arkadaşım Dr. Dilek KAYA AKYÜZLÜ'ye, ayrıca laboratuvar çalışmaları esnasında ayırmış olduğu zaman ve vermiş olduğu emeklerden dolayı Fezile ÖZDEMİR'e

Her zaman desteklerini yanımda hissettiğim kıymetli arkadaşım Dr. Ceylan DEMİR BAL'a ve AİLEME,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER ve KISALTMALAR

AAS	Atomik Absorpsiyon Spektrometresi
ACGIH	Amerikan Hükümet Endüstri Hijyenistler Konferansı
BAL	British-Anti-Lewiste
BEI	Biyolojik Maruziyet İndeksi
CaNa ₂ EDTA	Kalsiyum Disodyum Etilendiamintetraasetik Asit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DMSA	Dimerkoptosüksinik asid
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EP	Eritrosit Protoporfirin
F-AAS	Alevli- Atomik Absorpsiyon Spektrometresi
Fe	Demir
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
GF-AAS	Grafit Fırın- Atomik Absorpsiyon Spektrometresi
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HNO ₃	Nitrik Asit
H ₂ SO ₄	Sülfirik Asit
HCIO ₄	Perklorik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
HF	Hidroflorik Asit
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
ICP-MS	İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi
ICP-OES	İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektrometresi
K	Kelvin
L	Litre
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LH	Luteinize Edici Hormon

LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
mRNA	Mesenger Ribonukleik Asit
Na ⁺ /K ⁺ ATPaz	Sodyum Potasyum Adenozin Trifosfataz
OSHA	İş Sağlığı ve Güvenliği İdaresi
P	Fosfor
Pb	Kurşun
PbO	Kurşun Monoksit
PbS	Galen
PbSO ₄	Anglezit
PbCO ₃	Serusit
Pb ₃ O ₄	Kurşun Monoksit
PbSiO ₃	Kurşun Silikat
PbCrO ₄	Kurşun Kromat
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PIXE	Yüklü Parçacıklı X-Işını Emisyonu
RF	Radyo Frekansı
RFLP	Restrisiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
T4	Tiroksin
TNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
TLV	Eşik Sınır Değer
TSH	Tiroid Stimüle Edici Hormon
XRF	X-Ray Floresan
ZPP	Çinko Protoporfirin

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Kurşuna maruziyet kaynakları ve kurşunun sağlık üzerine etkileri	4
Şekil 1.2. Kurşun metabolizması	7
Şekil 1.3. Kan kurşun düzeylerinin çocuklar ve erişkinler üzerine olumsuz sağlık etkilerinin karşılaştırılması	10
Şekil 1.4. Kurşun maruziyetiyle hem sentezinin engellenmesinin şematik gösterimi	11
Şekil 1.5. Mikrodalgada magnetronun yer aldığı yakma ünitesi	24
Şekil 1.6. AAS işleyişini yansıtan şematik görünüm	25
Şekil 1.7. ICP-MS'in temel bileşenlerini yansıtan şematik görünüm	27
Şekil 1.8. Plazma ve pozitif yüklü iyonun oluşum mekanizması	28
Şekil 1.9. ICP-MS'de yer alan örnek ve süzücü konlar	28
Şekil 1.10. Kuadrapol kütle filtresi	29
Şekil 1.11. HFE'nin kristal yapısı	30
Şekil 1.12. 6. kromozom üzerinde yer alan HFE'nin lokalizasyonunun şematik gösterimi	31
Şekil 1.13. HFE geninde yer alan ekzon ve intronların şematik gösterimi	31
Şekil 1.14. HFE ve diferrik transferinin TfR1'e bağlanmasının şematik görünümü	33
Şekil 1.15. Karaciğer merkezli serum demir algılamasının şematik gösterimi	34
Şekil 1.16. Transisyon ve transversiyonun şematik görünümü	37
Şekil 1.17. H63D polimorfizminin şematik gösterimi	39
Şekil 1.18. Çoğaltılmak istenen DNA bölgesinin PCR yöntemiyle çoğaltılmasını gösteren basit şema	41
Şekil 1.19. PCR'da denatürasyon aşaması	42
Şekil 1.20. PCR'da primerlerin hedef bölgeye bağlanma aşamasının şematik görünümü	43
Şekil 1.21. Zincir uzaması aşaması	43
Şekil 2.1. Kurşunun kalibrasyon eğrisi	53

Şekil 2.2. Çalışmanın “internal standart” ile takip edilmesi	53
Şekil 2.3. HFE geni H63D tek nükleotid polimorfizmini belirleme basamakları	54
Şekil 2.4. Fenol-kloroform-izoamilalkol ekstraksiyonu	56
Şekil 2.5. DNA örneklerinin agaroz jele yüklenmesi	59
Şekil 2.6. TECHNE-TC 512 Thermal Cycle	60
Şekil 2.7. PCR bileşenleri	64
Şekil 2.8. MboI restriksiyon enziminin tanıma bölgesi ve kesim noktasının gösterimi	69
Şekil 2.9. MboI RE ile kesilmiş 294 bp’lik PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görünümü	70
Şekil 3.1. Amplifikasyonun ürününün %1’lik agaroz jel görüntüsü	75
Şekil 3.2. H63D “HH” homozigot genotipli bireylerde, 294 bp uzunluğundaki PCR ürününün MboI enzimi ile kesimi sonucunda oluşan oligonükleotid uzunluklarının şematik gösterimi	76
Şekil 3.3. H63D “DD” homozigot genotipli bireylerde, 294 bp uzunluğundaki PCR ürününün MboI enzimi ile kesimi sonucu oluşan oligonükleotid uzunluklarının şematik gösterimi	77
Şekil 3.4. Amplifikasyonun ürününün (394 bp) MboI restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu oluşan ürünlerin %2,5’luk agaroz jel görüntüsü	78
Şekil 3.5. HFE H63D gen polimorfizmi ile tam kan Pb düzeyi arasındaki ilişkinin grafik ile gösterimi	82
Şekil 3.6. HFE H63D gen polimorfizmi (HH ve HD+DD) ile tam kan Pb düzeyi arasındaki ilişkinin grafik ile gösterimi	83
Şekil 3.7. HFE H63D gen polimorfizmi ile idrar Pb düzeyi arasındaki ilişkinin grafik ile gösterimi	84
Şekil 3.8. HFE H63D gen polimorfizmi (HH ve HD+DD) ile idrar Pb düzeyi arasındaki ilişkinin grafik ile gösterimi	85
Şekil 3.9. HFE H63D gen polimorfizmi ile serum Fe düzeyi arasındaki ilişkinin grafik ile gösterimi	86
Şekil 3.10. HFE H63D gen polimorfizmi (HH ve HD+DD) ile serum Fe düzeyi arasındaki ilişkinin grafik ile gösterimi	87

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Kurşun ve bileşiklerinin sanayideki kullanım alanları	5
Çizelge 1.2. Akut kurşun toksisitesinin genel semptomları	9
Çizelge 1.3 OSHA tarafından kurşuna maruz kalan işçiler için tıbbi muayene önerisi	21
Çizelge 1.4. Genetik polimorfizm ve genetik mutasyon arasındaki farklılıklar	35
Çizelge 1.5. Fenol-kloroform-izoamil alkol ile DNA izolasyonu yönteminde kullanılan bileşenler	41
Çizelge 1.6. Standart PCR bileşenleri ve miktarları	44
Çizelge 2.1. Amplifikasyonda kullanılan primerler ve özellikleri	62
Çizelge 2.2. PCR'daki bileşenler, stoktaki ve reaksiyondaki konsantrasyonları	63
Çizelge 2.3. HFE geni H63D tek nükleotid polimorfizminin genel özellikleri	65
Çizelge 2.4. MboI Restriksiyon enzimi kesimindeki bileşen konsantrasyonları ve reaksiyon şartları	68
Çizelge 3.1. İşçilere ait genel değerlendirmeler ve tanımlayıcı bilgiler	72
Çizelge 3.2. Kan Pb, idrar Pb, serum Fe düzeyleri, yaş, çalışma süreleri ve sigara içim indeksi arasındaki korelasyonlar	73
Çizelge 3.3. Kan Pb, idrar Pb ve serum Fe düzeyleri ile sigara kullanımı arasındaki ilişki	74
Çizelge 3.4. Genotipler ve MboI restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotid büyüklükleri	77
Çizelge 3.5. Mesleksel olarak Pb'a maruz işçilerde HFE H63D gen polimorfizmi ile oluşan genotip frekansları	78
Çizelge 3.6. Mesleksel olarak Pb'a maruz işçilerde HFE H63D gen polimorfizmi ile oluşan alel frekansları	79
Çizelge 3.7. Çalıştığımız populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti	80
Çizelge 3.8. HFE H63D gen polimorfizmi ile tam kan Pb düzeyi arasındaki ilişki	82
Çizelge 3.9. HFE H63D gen polimorfizmi ile idrar Pb düzeyi arasındaki ilişki	84
Çizelge 3.10. HFE H63D gen polimorfizmi ile serum Fe düzeyi arasındaki ilişki	86

1.GİRİŞ

1.1. Kurşun

1.1.1. Kurşunun Tarihçesi

Yer kabuğunda doğal olarak bulunan mavimsi- gri renge sahip bir ağır metal olan kurşun, iki veya daha fazla elementle birleşik şekilde doğada bulunmaktadır. Doğada yaygın bulunması, erime noktasının ve yoğunluğunun düşük olması, kolay işlenebilir olması, madenlerden çok miktarda elde edilebilmesi ve diğer elementlerle kolaylıkla alaşım oluşturabilmesi nedeniyle yaygın olarak değişik alanlarda kullanılmakta ve insan faaliyetlerinin sonucu olarak da bol miktarda doğaya salınmaktadır (ATSDR, 2007).

Kurşun, antik uygarlıklar tarafından yaklaşık olarak 4000-5000 yıl önce gümüş üretimi sırasında yan ürün olarak keşfedilmiş ve yıllar içerisinde toksik etkilerinin olduğu saptanmıştır (Kahvecioğlu ve ark., 2006; Johnson, 1998). İlk olarak Romalılar tarafından su borusu yapımında kullanılan kurşun sonraki zamanlarda sofrta, mutfak ve makyaj malzemelerinde, ilerleyen yıllarda da ise elma suyu ve şarap gibi içecekleri tadlandırma amacıyla kullanılmıştır. 16. yüzyıldan itibaren tekne, boru, pencere, silah benzin, boya, pişirme cam kapları gibi birçok malzemenin yapımında kullanılan kurşunun yıllar içinde çevre ve insan sağlığı için toksik etkilerinin anlaşılması nedeniyle bir çok alanda kullanımında kısıtlamaya gidilmiştir. Bu kısıtlamalar sonucu günümüzde geçmişe oranla daha az uygulama alanı bulan kurşun, getirilen sınırlamalara rağmen halen endüstriyel olarak birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (García-Lestón ve ark., 2010).

1.1.2. Kurşunun Özellikleri

Kurşunun simgesi “Pb” dir. Adını Latince “plumbum” kelimesinin kısaltmasından almaktadır. Latince yumuşak metal anlamına gelen kelimenin

kökeni esas olarak Yunanca'daki "mólubdos" kelimesine dayanmaktadır. Periyodik tablonun IVA grubunda yer alan kurşunun atom ağırlığı 207,2 g/mol, özgül ağırlığı 11,4 g/cm³ ve atom numarası ise 82'dir. Kaynama noktası 1740 °C olan kurşunun erime noktası ise 327,43 °C'dir. +2 değerlikli kurşun nitrik asitle iyi çözünme özelliği gösterirken, su ile çok az çözünmekte, hidroklorik asit ve sülfirik asitle de çözünmeyen tuzlar oluşturmaktadır. Üç oksidasyon derecesi olan kurşunun Pb(II) formu doğada primer halde bulunurken aşırı oksidasyonun gerçekleştiği ortamlarda Pb(IV) oluşmakta, metalik kurşun olarak adlandırılan Pb(0) ise nadir olarak doğada yer almaktadır (Nordberg ve ark., 2007).

Yer kabuğunda doğal olarak bulunan kurşun tatsız, kokusuz, yumuşak, kolayca işlenerek çeşitli şekillere dönüştürülebilen ve diğer metallerle alaşım oluşturabilen bir ağır metaldir. Doğada uranyumun, aktinyumun ve toryumun radyoaktif bozunması sonucu sırasıyla ²⁰⁶Pb, ²⁰⁷Pb, ²⁰⁸Pb izotopları oluşmaktadır. Bu izotoplardan ²⁰⁴Pb doğada %1,35–1,5 oranında bulunmaktadır ve radyoaktif bozunma sonucu oluşmayan tek izotoptur. ²⁰⁸Pb %51–53, ²⁰⁶Pb %23,5–27, ²⁰⁷Pb ise %20,5–23 oranında doğada bulunmaktadır. Bunların yanı sıra kurşunun stabil olmayan dört formu daha bulunmakta olup bunlar ²¹⁰Pb, ²¹¹Pb, ²¹²Pb, ²¹⁴Pb'dir.

Doğada genellikle bileşikler halinde bulunan kurşunun sanayi alanında en çok kullanılan organik formları tetraetil kurşun, tetrametil kurşun, kurşun stearat; inorganik formları ise PbCO₃ (kurşun karbonat), PbS (kurşun sülfür), PbCrO₄ (kurşun kromat), PbSiO₃ (kurşun silikat), PbO (kurşun monoksit) ve Pb₃O₄ (kurşun tetraoksit)'tir. Cevher olarak en başta önem taşıyan ise galen (PbS), serüsit (PbCO₃) ve anglezittir (PbSO₄) (ATSDR, 2007; Sanders ve ark., 2009; Poreba ve ark., 2011; Tiwari ve ark, 2014).

1.1.3. Kurşun Maruziyeti

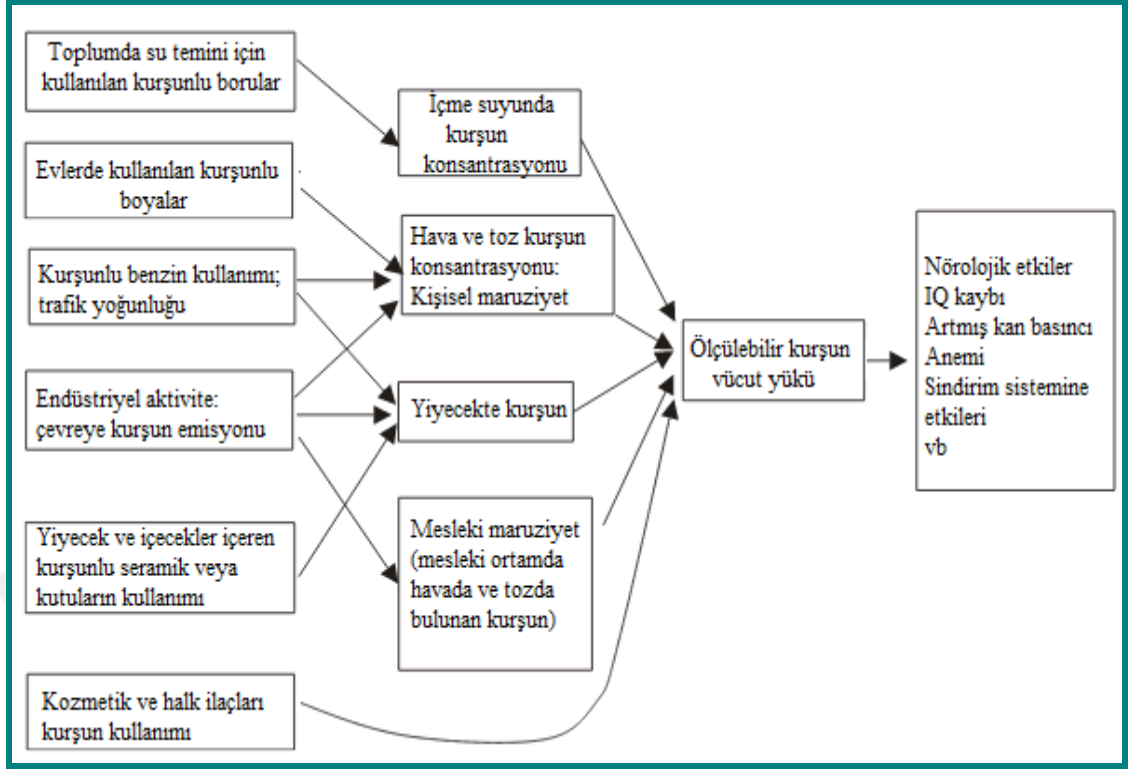
1.1.3.1. Kurşuna Çevresel Maruziyet

Çevrede doğal olarak bulunan kurşunun başlıca maruziyet kaynağı insan faaliyetleridir. Maden ve fabrika kaynaklı atıklar kurşun maruziyetinin başlıca çevresel maruziyet sebebi iken; kömür, petrol ve atıkların yakılması sonucunda da doğaya kurşun salınımı olmaktadır. Sanayi devriminin gerçekleşmesinden itibaren geçen son birkaç yüzyıl içerisinde çevredeki kurşun miktarı yaklaşık 1000 kat artış göstermiştir.

Kurşun, toprak ile temas ettiği zaman toprak partikülleri ile sıkı bir şekilde birleşir. Ayrıca biyolojik açıdan bozulmaya ve parçalanmaya uğramadığından toprakta birikme özelliği göstermektedir. Böylelikle zaman içinde toprağın fiziksel-kimyasal özelliklerine ve kurşun bileşiklerinin tipine bağlı olarak kurşun yer altındaki derin sulara dahi karışabilmekte veya yağmur suları aracılığı ile nehir ve denizlere kadar ulaşabilmektedir. Kontamine su ile bitkilere ve hayvanlara oradan da besin zincirinin en üstü olan insanlara kadar ulaşan kurşunun başlıca maruziyet kaynakları Şekil 1.1.'de verilmiştir.

Bugün özellikle şehir içi bölgelerinde kurşunun konsantrasyonunun fazla olmasının başlıca nedeni; geçmiş yıllarda kurşunlu boyaların, kurşunlu benzinin, pestisitlerin yaygın bir şekilde kullanılmış olmasıdır. Çevrede kurşun maruziyetinin en yoğun olduğu dönem kurşunlu benzinin kullanıldığı 1950- 2000'li yıllar arası olup 1979 yılında Amerika'da taşıtlardan çevreye yayılan kurşun miktarı 94,6 milyon kilogram iken bugün bu değer kurşunlu benzinlerin yasaklanması ile 2,2 kilograama kadar düşürülmüştür.

Bunların yanı sıra tıp alanında kullanılan bazı ilaçlar, kozmetik ürünler, vinil içeren maddeler, sigara dumanı gibi çeşitli kaynaklar da kurşun içerikleri nedeniyle çevresel maruziyete neden olabilmektedir (ATSDR, 2007; Paustenbach ve ark., 2006).



Şekil 1.1 Kurşuna maruziyet kaynakları ve kurşunun sağlık üzerine etkileri (Fewtrell ve ark., 2004’ makalesinden derlenmiştir).

1.1.3.2. Mesleki Maruziyet

Kurşun içeren boruların, kabloların, mühimmat malzemelerinin, radyasyona karşı koruyucu levhaların üretimi sürecinde kurşunun işlenmesi ve alaşımlarının hazırlanması aşamalarında işçiler yüksek miktarda kurşuna maruz kalmaktadır. Çizelge 1.1.’de yer yer verildiği şekilde günümüzde sanayinin çok çeşitli alanlarında kurşun kullanılmakta, özellikle akü üretiminin yapıldığı iş yerlerinde kurşuna maruziyet çok yoğun olmaktadır. Birçok işçi üzerinde yapılan çok çeşitli çalışmalar ile kurşunun toksik etkileri gösterilmiştir (Chen ve ark., 2012; Ghanwat ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2016).

Çizelge 1.1. Kurşun ve bileşiklerinin sanayideki kullanım alanları (Akdur ve ark., 1998).

KURŞUN VE BİLEŞİKLERİ	KULLANIM ALANLARI
Saf Metal	Kurşun boru, kurşun levha, kurşun üretimi ve işlemleri (eritme, döküm, oksitleme vs), çatı malzemesi, kurşunlu tel ve kablo yapımı, kurşun mermi, av saçmaları, X ışınları ve radyoaktif maddelerden korunma ekranları, reaksiyon kapları, depolama tankları yapımı
Alaşım ve İnorganik bileşikler	
Kurşun ve antimon alaşımı	Akümülatör levhaları yapımında
Kurşun monoksit (PbO, litarji , mürdesenk)	Metal dizi harfleri, lehimcilik, akümülatör yapımı ve bazı boyalar
Kırmızı kurşun (Pb ₃ O ₄ , Sülyen)	Paslanmaya karşı astar boya olarak
Kurşun karbomat (PbCO ₃ , Seruzit, Üstübeç)	Boya işlerinde
Kurşun silikat (PbSiO ₃)	Seramik sanayide toprak kapların sırlanmasında
Kurşun arsenat (PbHAsO ₄)	İnsektisit yapımında
Kurşun sülfür (PbS,Galena)	Lastik sanayisinde
Kurşun Kromat (PbCrO ₄)	Bazı Boyaların bileşiminde
Kurşun Stearat (Pb(C ₁₇ H ₃₅ COO) ₂)	Plastik madde yapımında
Kurşun tetraetil (Pb(C ₂ H ₅) ₄) ve Kurşun tetrametil (Pb(CH ₃) ₄)	Motor benzini içine oktani arttırmak için katkı maddesi olarak

İşçilerin toksik maddelerden korunması ve maruziyetin en aza indirilmesi için işyerlerinde maruziyet seviyesini gösterici bir takım sınır değerler tespit edilmiştir. Tekrarlanan maruziyet durumlarında bir kimyasalın olumsuz herhangi bir sağlık etkisine sebep olmayacak havadaki konsantrasyon değeri eşik sınır değer (Treshold Limit Value, TLV) olarak tanımlanırken; havada belirli bir konsantrasyonda bulunan kimyasalın inhalasyonu sonucunda vücuttaki konsantrasyonuna karşılık gelen değer ise biyolojik maruziyet indeksi (Biological Exposure Index, BEI) olarak tanımlanmaktadır.

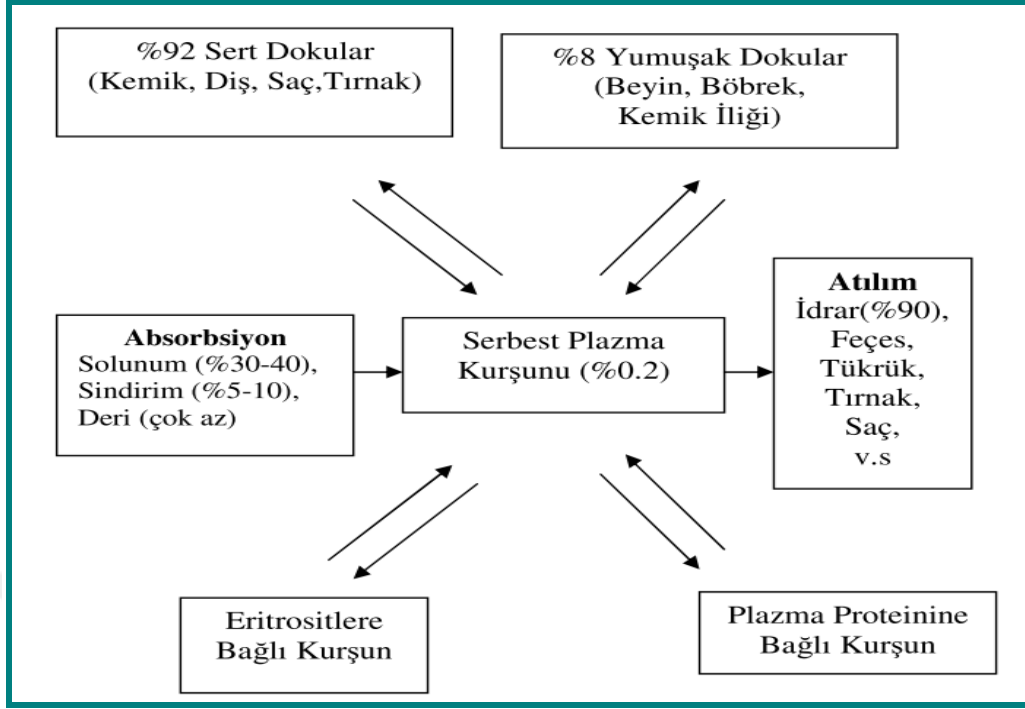
İş Sağlığı ve Güvenliği İdaresi (OSHA) tarafından Amerika'da iş yeri ortamı havasında kurşunun maksimum limit değeri $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ olarak belirlenmiştir. Bu değerler günde 8 saatlik çalışma süresi olan işyerlerinde havada maksimum bulunmasına izin verilebilir değer olup işçilerin 30 günden fazla $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 'ün üzerinde kurşuna maruz kalmasının söz konusu olduğu durumlarda ise solunum yolu koruma ekipmanlarına bakılmaksızın düzenli aralıklara tıbbi gözetim altında tutulmaları OSHA tarafından önerilmektedir. İşçilerin kanlarındaki kurşun konsantrasyon düzeyinin $60 \mu\text{g}/\text{dl}$ 'nin veya son üç ay içerisindeki kan kurşun düzeylerinin ortalamasının $50 \mu\text{g}/\text{dl}$ 'nin üzerinde olması durumunda ise tıbbi tedaviyle birlikte maruziyetin kesilmesi önerilmektedir (Staudinger ve ark, 1998).

Türkiye'de ise Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı tarafından 12.08.2013 tarihli ve 28733 no'lu Resmi Gazete'de yayımlanan Kimyasal Maddelerle Çalışmalarda Sağlık Ve Güvenlik Önlemleri Hakkında Yönetmeliğin Ek-2'sinde 100 ml kandaki bağlayıcı biyolojik kurşun üst sınır değeri $70 \mu\text{g}$ olarak belirlenmiştir. Ancak işçilerden herhangi birinin kan kurşun düzeyinin $40 \mu\text{g}/\text{dL}$ 'den fazla olması durumunda veya haftalık toplam 40 saat çalışılan bir iş yeri ortamındaki havadaki kurşun düzeyinin zaman ağırlıklı ortalama konsantrasyonunun $0,075 \text{ mg}/\text{m}^3$ 'ten fazla olması durumunda tıbbi gözetimin yapılması önerilmektedir (ACGIH, 2007; Safety ve Administration, 1978; Resmi Gazete- Ek-2, 2013).

1.1.4. Kurşun Metabolizması

1.1.4.1. Absorpsiyon

Kurşunun metabolizmasına ait şema şekil 1.2.'de yer almaktadır. Kurşun deri yoluyla, sindirim veya solunum yoluyla vücuda alınabilmektedir. Kurşunun organik formu lipidlerle kolayca çözünebilmekte ve deriden kolaylıkla geçebilmektedir ancak inorganik kurşunun deriden emilimi çok azdır. Kurşunun primer absorpsiyonu solunum yoluyla veya gastrointestinal yoldan emilimle olmaktadır (Rom ve Markowitz, 2007; Saryan ve Zenz, 1994).



Şekil 1.2. Kurşun metabolizması (Akdur ve ark.,1998).

Kurşunun gastrointestinal yoldan emilimi erişkinlerde %10-15 civarındayken, çocuklarda bu oran %40-50 seviyelerine çıkmaktadır. Kurşunun absorpsiyonu açlık durumunda veya demir, fosfor, kalsiyum, çinko gibi vücut için gerekli minerel ve elementlerce fakir diyetle beslenme durumunda artış göstermektedir (Lead, 1977; Rom ve Markowitz, 2007; Ziegler ve ark., 1978). Örneğin; demirin fazla olması bağırsaktan kurşun absorpsiyonunu azaltmaktadır (Ziegler ve ark. 1978).

Mesleki olarak kurşuna maruziyette kurşun absorpsiyonu daha çok solunum yoluyla gerçekleşmektedir. Solunum yoluyla kurşun absorpsiyonu,

- Solunum hacmine,
- Kurşun bileşiklerinin çözünürlüğüne ve boyutuna,
- Bireyin yaşı, fizyolojik ve diyet durumu, genetik yapısı gibi kişisel faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermeklr birlikte inhalasyon yoluyla alınan kurşun %30-40 oranında kana ulaşmaktadır (Saryan ve Zenz, 1994).

Mesleki maruziyette toz partiküllerinin 1 µm'den küçük olması, iş gücünün artmasına bağlı olarak hızlı ve derin inhalasyon durumu yukarıda da ifade edildiği gibi kurşun emilimini arttırıcı bir etki oluşturmaktadır (Papanikolaou ve ark., 2005b).

1.1.4.2. Dağılım

Absorbe olan kurşun kanda %99 oranında eritrositlere bağlanırken, %1 oranında ise plazmada ve serumda yer almaktadır. Kandaki kurşunun yumuşak dokulara dağılımı çok düşük olup 4-6 hafta içerisinde taşınımı olmaktadır. Serbest halde yayılabilen plazma fraksiyonu ise diş, kemik, dalak, karaciğer, akciğer, beyin ve böbrek gibi dokulara yoğun bir şekilde kurşun dağılımını sağlamaktadır (Saryan ve Zenz, 1994). Kurşunun kandaki yarı ömrü 35 gün, yumuşak dokuda yaklaşık olarak 40 gün, kemikte ise 20-30 yıldır (Grimsley ve Adams-Mount, 1994). Uzun süreli maruziyette kurşunun %95'i kemiklerde depolanmakta ve kalsiyumun yerini almaktadır (Barry, 1981; Sullivan Jr ve ark., 1992). Bireylerde kemiklerde kurşun birikimi yaşla birlikte artış göstermekte olup erkeklerde bu artış daha fazla olmakta ve birikim tibia bölgesinde yoğunlaşmaktadır (Barry, 1981).

1.1.4.3. Atılım

Kurşunun vücutta tutulumu ve atılımının yaşa bağlı olduğunu gösteren çalışmalar olmakla birlikte çocuklarda atılımının daha fazla olabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır. İnorganik kurşun vücutta metabolize olamazken diğer kurşunlu bileşikler karaciğerdeki p450 enzimleriyle oksitlenmektedir. Absorbe olan kurşunun %50-60'ı başlıca böbrekler ve safra yoluyla atılmaktadır. Gastrointestinal yolla atılım ise %25-30 civarında olmakta, %10-15 oranında da ter, saç, süt, tükürük, dökülen epitelyum hücreleri ve tırnakla atılabilmektedir (Saryan ve Zenz, 1994; Ziegler ve ark., 1978; Papanikolaou ve ark., 2005b).

1.1.5. Kurşunun Sağlık Üzerine Etkileri

Kurşun toksisitesini genel olarak enzimlerin aktivitelerini değiştirerek göstermektedir. Kurşun ya enzimlerin tiyol (-SH) gruplarına bağlanmakta veya enzimlerin çalışması için gerekli olan esansiyel metallerin yerini alarak enzimleri inaktive etmektedir. Böylelikle kurşun hem biyosentezi, böbrekler, sinir sistemi, kardiyovasküler sistem, üreme, karaciğer, gastrointestinal ve endokrin sistem gibi enzimsel aktivitelerin çok olduğu sistemler üzerinde toksisiteye neden olmaktadır (WHO, 2000).

Toksisite, maruziyetin akut veya kronik olmasına göre değişiklik göstermektedir. Akut zehirlenmeler daha çok mesleki maruziyete bağlı olarak ortaya çıkmakta olup oluşan semptomlar çizelge 1.2.'de yer almaktadır (Staudinger ve Roth, 1998).

Çizelge 1.2. Akut kurşun toksisitesinin genel semptomları (Staudinger ve Roth,1998)

Hafif	Orta	Şiddetli
Myalji	Başağrısı	Ensefalopati
İrritabilite	Tremor	Motor nöropatisi
Parestezi	Kusma	Nöbetler
Orta derecede yorgunluk	Genel yorgunluk	Koma
Aralıklı karın ağrıları	Yaygın karın ağrısı	Abdominal kolik
Letarji	Kilo kaybı	Kurşun çizgileri
	Libido kaybı	Oligüri
	Kabızlık	

Kronik maruziyette ise yaşa ve maruz kalınan doza bağlı olarak semptomlar çok çeşitli ve değişik olabilmektedir (Şekil 1.3.). Başağrısı, depresyon, halsizlik, artralji, libido kaybı, impotans ve maruziyetin devam etmesine bağlı olarak toksisitenin daha ileriye gitmesiyle birlikte böbrek yetmezliği, gut, hipertansiyon ve kronik ensefalopati oluşabilir (Cullen ve Rosenstock, 1994).

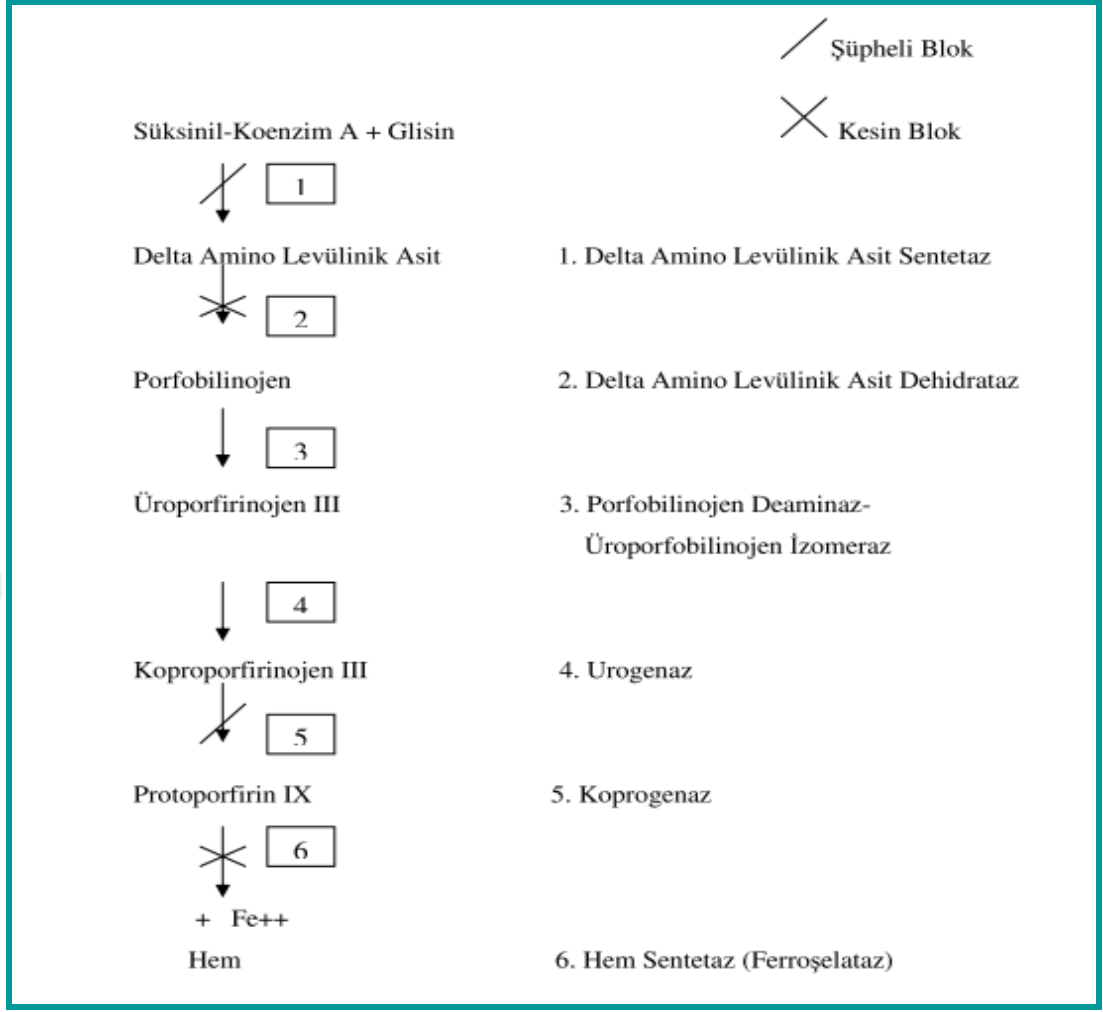
Çocuklar	Kan kurşun konsantrasyonu (µg/dL)	Yetişkinler
	150	← Encefalopati ← Nefropati
Ölüm →	100	← Anemi
Encefalopati → Nefropati → Anemi → Kolik →	50	← Erkek üreme sistemi üzerine etkileri ↓ Hemoglobin Sentezi ve Kadın üreme sistemi üzerine etkileri
↓ Hemoglobin Sentezi →	40	← ↓ Sinir iletim hızı
↓ D vitamini metabolizması →	30	← Sistolik Kan Basıncı
↓ Sinir iletim hızı →	20	← ↑ Eritrosit Protoporfirin (Erkek) ← ↑ Eritrosit Protoporfirin (Kadın)
↑ Eritrosit Protoporfirin → ↓ D Vitamini Metabolizması (?) → Gelişimsel toksisite → ↓ IQ, ↓ Duyma, ↓ Büyüme	10	
Transplasental transfer →		

Şekil 1.3. Kan kurşun düzeylerinin çocuklar ve erişkinler üzerine olumsuz sağlık etkilerinin karşılaştırılması (Meyer ve ark., 2008 makalesinden derlenmiştir).

1.1.5.1. Kan Sistemi Üzerine Etkisi

Amerika Çevre Koruma Ajansı (US Environmental Protection Agency, EPA) kurşuna maruziyete bağlı olarak hemoglobindeki azalmanın ortaya çıktığı kan kurşun düzeyini; çocuklar için 40 µg/dL, mesleki olarak kurşuna maruz kalan bireyler içinse 50 µg/dL olarak ifade etmiştir.

Kurşun, δ-aminolevülinik asitdehidrataz (ALAD) veya ferroşelataz protoporfirin IX'a demir bağlanmasını katalize eden ferroşelaz enziminin aktivitesini inhibe ederek hem biyosentezini azaltır ve hemoglobin sentezini engeller. Ferroşelataz enziminin inhibe olmasıyla eritrosit protoporfirinin kan ve plazmadaki derişimi artarken, ALAD enziminin de aktivitesinin azalmasıyla kan ve plazmada δ-aminolevülinik asit miktarı artarak hem biyosentezi engellenir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Kurşun maruziyetiyle hem sentezinin engellenmesinin şematik gösterimi (Akdur ve ark., 1998).

Hem biyosentezinin engellenmesiyle akut veya kronik maruziyete bağlı olarak eritrositlerde beneklenmenin de görüldüğü iki tip anemi ortaya çıkmaktadır. Akut ve yüksek dozda kurşuna maruziyet sonucu hemolitik anemi ortaya çıkmakta; kronik maruziyette ise hem biyosentezinin azalmasına bağlı olarak olgunlaşmamış eritrositlerle birlikte mikrositik veya hipokromik anemi meydana gelmektedir (ATSDR, 2007). Ayrıca kronik maruziyette, kurşun eritrositlerdeki sodyum potasyum adenozin trifosfatazı (Na^+/K^+ -ATPaz) inhibe ederek eritrositlerin membran yapısını bozar ve yaşam sürelerini kısaltır. Bu durum olarakta organların çoğunda hasar oluşmasına ve nöronal iletimin engellenmesine yol açmaktadır (Liu ve ark., 2008; Nordberg ve ark., 2007).

1.1.5.2. Sinir Sistemi Üzerine Etkisi

Kurşun, kan beyin bariyerini kolaylıkla geçebilen ve beyinin gri bölgesinde birikme özelliğine sahip bir elementtir. Kurşun beyinde noradrenalin, dopamin konsantrasyonunu ve asitilkolinesteraz enziminin aktivitesini azaltmaktadır (Aminoff, 2000; Goyer, 2001).

Kurşun maruziyetinde periferik veya santral sinir sisteminin etkilemesine bağlı olarak kişilerde bilişsel, davranışsal veya psikomotor patolojik semptomlar oluşabilir. Erişkinlerde kan kurşun düzeyi 100-120 µg/dL'yi, çocuklarda ise 80- 100 µg/dL'yi geçtiği zaman ensefalopati görülmektedir. Ensefalopatide beyincik ve beyin korteksinin etkilenmesine bağlı olarak baş ağrısı ve baş dönmesi şiddetli olarak ortaya çıkarken bunlarla birlikte tremor, halsizlik, depresyon, dikkat azalması gibi diğer semptomlar da oluşmaktadır. Kan kurşun düzeyinin 150 µg/dL'yi aştığı durumlarda ise uyku haliyle başlayıp koma ile sonuçlanan durumlar görülmektedir. Kurşuna bağlı ölüm ise akut ve yüksek doz maruziyet durumunda kalp yetmezliğine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Al Khayat ve ark., 1997; Goyer, 2001; Gulson ve ark., 1998; Robertson, 2000; Akdur ve ark., 1998).

Çocuklarda özellikle kan kurşun düzeyinin 40 µg/dL'yi aşmasıyla birlikte schwann hücre dejenerasyonu ve sinir iletiminde yavaşlamalar meydana gelmesiyle periferik sinir tutulumu daha yüksek oranda görülmektedir (Goyer, 2001; Yeh ve ark., 1995). Sinir tutulumu daha çok radial sinirlerde meydana gelmekte, önce parmaklarda düşme ardından da elde düşmeler şeklinde kendini göstermektedir. Sonuçta ağrısız ve bilateral felçler ortaya çıkmaktadır (Aminoff, 2000; Akdur ve ark., 1998).

1.1.5.3. Üriner Sistem Üzerine Etkileri

Kurşuna akut ve yüksek dozda maruziyet sonucu geri dönüşümü mümkün olan aminoasidüri, glukozuri, hiperfosfatüriyle eş zamanlı proksimal tubul hasarı ortaya çıkmaktadır. Maruziyetin sürekli veya tekrar ettiği kronik maruziyet durumunda ise

geri dönüşü olmayan kurşun nefropatisi görülür (ATSDR, 2007). Kan kurşun düzeyinin 60 µg/dL'yi aştığı durumlarda proksimal veya glomerüler böbrek hasarı oluşabilir. Ayrıca kronik maruziyette interstisyel fibrozis ve glomerüler skleroz şeklinde karakterize olan interstisyel nefrit gelişebilir (Lead, 1977).

1.1.5.4. Karaciğer Üzerine Etkisi

Kurşunun karaciğer üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla ratlar üzerinde bir takım deneyler yapılmıştır. Ratların kurşun asetata maruz bırakıldığı çalışmada yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) miktarının azaldığı, trigliseridinin ise doza bağlı olarak artış gösterdiği saptanmıştır. Çalışmada HDL'nin azalmasındaki mekanizma tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte kurşun maruziyetine bağlı olarak lipoproteinlipaz veya hepatik lipaz enzim aktivitelerinin azalmasıyla trigliseridinin artmış olabileceği ileri sürülmüştür (Skoczyńska ve ark., 1993).

Ratlara kurşun asetatın verildiği bir diğer çalışmada ise karaciğerden elde edilen homojenatta aspartataminotransferaz (AST) ve alaninaminotransferaz (ALT) enzimlerinin aktivitesinin azalmasına rağmen serumda bu enzimlerin aktivitelerinde herhangi bir değişikliğin olmadığı gösterilmiştir (Singh ve ark., 1994).

Kandaki kurşun düzeylerinin ortlaması 78 µg/dL olan işçi grubu üzerinde gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise bireylerin AST ve ALT enzimlerinin aktivitelerinde azalma, alkalenfosfataz (ALP) ve laktatdehidrogenaz (LDH) enzim aktivitelerinde ise artış olduğu saptanmıştır (Al-Neamy ve ark., 2001).

Kristal-Boneh ve ark. Tarafından yapılan bir çalışmada ise kontrol grubu ve kandaki kurşun düzeylerinin ortalaması 42,3 µg/dL olan işçilerin HDL ve total kolesterol konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir yükseliş olduğu saptanırken, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve trigliserid oranları karşılaştırıldığında anlamlı bir yükseliş tespit edilememiştir (Kristal-Boneh ve ark., 1999).

1.1.5.5. Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkisi

Kurşun maruziyetine bağlı olarak kan kurşun seviyesinin 80 µg/dL'yi aşmasıyla birlikte iştahsızlık, kabızlık, karın ağrısı ender durumlarda da ishal görülebilir. Kan kurşun düzeyinin 150 µg/dL'yi geçtiği durumlarda ise Na⁺/K⁺-ATPaz'ın inhibe olmasıyla sodyum hücre içerisine giremez ve kasılmalar oluşturur ki bu durum kurşun koliği olarak adlandırılır (Janin ve ark., 1984, Akdur ve ark., 1998,).

1.1.5.6. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi

Kurşuna yüksek maruziyet sonucu bireylerde hipertansiyon gelişme riski bulunmakta olup bu durum kurşuna maruz kişilerde beyin damar (serebrovasküler) veya kalp hastalıkları riskini arttırmaktadır. Kan kurşun düzeyinin 30 µg/dL'nin altında olduğu durumlarda kurşunun hipertansiyonla çok az ilişkili olduğu saptanmıştır (Hu, 1991).

Buna karşın çocuk popülasyon üzerinde yapılan bir çalışmada kan kurşun düzeyinin 10 µg/dL'nin altında saptanması durumunda dahi kurşunun hipertansiyon ile ilişkili olabileceğine yönelik bulgulara yer verilmiştir (ATSDR, 2007).

Victery ve ark. Tarfindan yapılan bir çalışmada ise çocuk yaşta kurşuna maruz kalan erişkin bireylerin, çocukluğunda kurşun maruziyeti geçmişi olmayan yetişkinlere göre hipertansiyona yakalanma riskinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (Victery ve ark., 1988).

1.1.5.7. Endokrin Sistem Üzerine Etkisi

Kan kurşun düzeyinin 40 µg/dL'yi aştığı durumlarda hipotalamus- hipofiz adrenal askı ve bununla bağlantılı olarak tiroid ve adrenal korteks hormonları etkilenmektedir. 40-60 µg/dL veya üzerindeki kan kurşun seviyesinin gözlemlendiği durumlarda tiroksinin (T4) ve tiroid uyarıcı hormonun (TSH) etkilendiği

saptanmıştır. Kontrol grubu ile kan kurşun düzeyleri 40 µg/dL'nin üzerinde olan bireylerin yer aldığı bir çalışmada T4 hormon düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunurken, TSH hormon seviyesi ise kontrol grubundaki bireylere göre normal veya daha düşük düzeyde saptanmıştır (Gustafson ve ark., 1989; Lopez ve ark., 2000; Singh ve ark., 2000).

Literatürde kurşunun üreme hormonları üzerine etkisine yönelik de bir çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalara göre kurşun luteinizing edici hormonun (LH) seviyesinde azalmaya, stimüle edici hormonun (FSH) seviyesinde ise artışa yol açarak kadınlarda menstrasyon döngüsünde düzensizliklere ve infertiliteye yol açabilmektedir. Hamilelik durumunda maruziyet söz konusu olduğunda ise kurşun plasentadan fetüse kolaylıkla geçerek olumsuz sağlık etkilerine neden olabilmektedir. Kadınlarda yukarıda ifade edilen olumsuz sağlık etkilerine neden olan kurşun erkeklerde ise maruziyet miktarına ve süresine bağlı olarak testislerde sperm anomalilerine, atrofiye, impotansa ve infertiliteye neden olabilmektedir (Gidlow, 2004; McGregor ve Mason, 1990; Goyer, 2001; Velicangil, 1980).

1.1.5.8. Kanser Oluşumu Üzerine Etkisi

1980'li yıllarda gerekli analitik yöntemlerin henüz gelişmemiş olması ve elde yeterli klinik verilerin bulunmamasından dolayı kurşun ve bileşiklerinin karsinojen olmadığı IARC tarafından açıklanmıştır. Ancak, yıllar içinde kurşunla çalışan işçilerden elde edilen veriler doğrultusunda bireylerin mide, akciğer ve mesane kanserlerine yakalandıklarının belirlenmesiyle inorganik kurşun bileşikleri IARC tarafından insanlar için olası karsinojen grubu olan 2A grubuna dahil edilmiştir (Chan-Seok ve ark., 1980; Gidlow, 2004; Humans, 2006).

İn vitro ortamlarda gerçekleştirilen deneyler sonucunda kurşunun deoksiribonükleik asit (DNA) polimeraz ve ligaz aktivitesini inhibe ederek DNA sentezini ve onarımını engellediği saptanmıştır (Popenoe ve Schmaeler, 1979; Skreb ve Habazin-Novak, 1975; Sirover ve Loeb, 1976). Yine yapılan bazı çalışmalarda

kurşunun UV, radyasyon gibi mutajenlerle birleşerek DNA onarımına engel oluşturduğu kanıtlanmıştır (Hartwig, 1994).

Kurşunun kanser mekanizması üzerine iki zıt görüş bildirilmektedir. Bir görüşe göre kurşun maruziyetine bağlı olarak kardeş kromatit değişimleri veya lenfositlerde kromozomal aberasyonun arttığı gösterilirken, diğer görüştekiler ise bunun olmadığını savunmaktadır (Bauchinger ve Schmid, 1972; Hartwig ve ark., 1990; Forni ve ark., 1976; Popenoe ve Schmaeler, 1979). Örneğin, invitro ortamda yapılan bir deneyde kurşun maruziyeti sonucu DNA protein çapraz bağlarının oluştuğu gösterilse de söz konusu bağ oluşumu kurşun maruziyetinin olduğu işçi grubunda gösterilememiştir (Wu ve ark., 2002).

1.1.5.9. Kurşunun Diğer Etkileri

Kurşun varlığında vücut için gerekli vitaminlerden biri olan vitamin D'nin hormonal formu olan 1,25- dihidroksivitamin D'ye dönüşümü engellenmektedir (Mahaffey ve ark., 1982). Yapılan bir çalışmada kan kurşun düzeyleri 33–120 µg/dL olan çocukların serum 1,25-dihidroksi vitamin D düzeylerinin önemsenecek derecede azaldığı saptanmıştır (Rosen ve ark., 1980). Kan kurşun konsantrasyonunun 62 µg/dL'nin altında olduğu durumlarda ise serum 1,25-dihidroksi vitamin D düzeylerinde az da olsa azalmanın olduğu görülmektedir. 62 µg/dL'nin üzerindeki kan kurşun düzeylerinde ise 1,25-dihidroksi vitamin D miktarının daha çok azalırken miktarında da azalma görülmektedir. Yüksek kan kurşun düzeylerinde 1,25-dihidroksi vitamin D ve serum total ve iyonize kalsiyum miktarındaki azalmaya ters olarak paratiroid hormonda (PTH) ise artış meydana geldiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Mahaffey ve ark., 1982).

1.1.6. Kurşun Zehirlenmesinde Tanı

Kurşun zehirlenmelerinde zehirlenme sonucu oluşan semptomlar maruziyet süresi, maruz kalınan doz, kurşunun maruz kalınan formu, bireyin yaşı, beslenme durumu, genetik yapısına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Kurşun

maruziyetinin tespitinde en önemli biyolojik numune kan ve idrar iken saç numunlerinden de kolaylıkla metal analizi yapılarak kurşun maruziyeti belirlenebilmektedir.

Önceden de ifade edildiği üzere kanda kurşun %99 oranında eritrositlerde, %1 oranında ise plazmada yer almaktadır. Kandaki yarılanma ömrünün 1 ay olması nedeniyle son dönem maruziyetinin belirlenmesinde tam kan teşhis ve tarama için tercih edilmektedir. Kronik maruziyetin gösterilmesinde saç ve tırnak kadar kritik olmasa da tam kan, uzun dönemli maruziyetlerde kemikte biriken kurşunun kana geçmesi sebebiyle uzun süreli maruziyetin belirlenmesinde biyolojik numune olarak önemli bir yere sahiptir (Hirata ve ark., 1996).

İdrar ise uzun dönemli kurşun maruziyetinin saptanmasında veya şelasyon tedavisi yapılan hastaların kurşun düzeylerin takibinde kullanılmaktadır. İdrardaki kurşun düzeyinin belirlenmesinde spot idrar örneği yerine 24 saatlik idrar örneği tercih edilmeli ve kontaminasyon olmaması için dikkatli olunması gerekmektedir. Yapılan bazı çalışmalar idrar kurşun düzeyinin tam kurşun düzeyini değil de plazma kurşun düzeyini yansıttığını göstermektedir (Hirata ve ark., 1996; Tsaih ve ark., 1999).

Saç ise kan ve idrara göre kolay toplanabilir bir örnek olması ve laboratuvara ulaştırılmasının yanı sıra muhafazasının kolay olması nedeniyle tercih edilse de kontaminasyon riskinin yüksek olması nedeniyle maruziyetin internal mi eksternal kaynaklı mı olduğunun belirlenmesinde zorluk çıkarmaktadır. Saçın bir aylık uzama oranı ortalama olarak 1 santimetre olup enseden alınan 1cm boyundaki numune son bir ayda maruz kalınan kurşun maruziyetini yansıtmaktadır. Bununla birlikte genel saçtaki kurşun konsantrasyonu içim kabul gören bir referans aralığı mevcut değildir (Deeming ve Weber, 1978; Saitoh ve ark., 1969; Taylor, 1986).

Eritrositlerde δ -ALAD aktivitesi ve protoporfirin IX düzeyi, idrarda ise protoporfirin, porfobilinojen, koproporfirin ve δ -ALA düzeylerinin değişmesi kurşuna maruziyetin biyolojik göstergeleridir. Kan kurşun düzeyinin 20 $\mu\text{g/dL}$ 'yi aştığı durumlarda δ -ALAD aktvitesindeki azalma kurşun konsantrasyonu ile korele

bir şekilde olmayabilir. Ayrıca, alkol kullanımına veya siroz gibi durumlara bağlı olarak δ -ALAD seviyesi düşüş gösterdiğinden bu parametre tek başına kurşun maruziyetinin tespiti için kullanılmamalıdır (Philip ve Gerson, 1994). Yüksek kan kurşun konsantrasyonunun olduğu durumlarda idrardaki ALA düzeyi artış gösterdiğinden iyi bir biyogösterge olarak kullanılabilirken, düşük kan kurşun düzeylerinde ALA seviyesinin etkilenmemesi nedeniyle düşük dozlu maruziyetlerin belirlenmesinde iyi bir biyogösterge özelliği taşımamaktadır (Somashekaraiah ve ark., 1990).

Kurşun miktarının yüksek olduğu durumlarda ferroşelataz kurşun tarafından inhibe edilerek Fe^{+2} iyonlarının protoporfirin IX'a bağlanması engellenir. Böylece, serbest çinko protoporfirin (ZPP) ve eritrosit protoporfirin (EP) düzeyleri artar. Kan kurşun düzeyi 30 $\mu g/dL$ 'yi geçtiği durumlarda, porfirialı bireylerde, sirozlu kişilerde, alkolizm durumunda veya demirin eksik olduğu durumlarda da protoporfirin düzeyi artar. Bunlar göz önüne alındığında protoporfirin de, ALA gibi düşük kurşun maruziyetinin belirlenmesinde kullanımı mümkün olmayan biyogösterge olarak tanımlanabilir (ATSDR, 2005; (Somashekaraiah ve ark., 1990).

Kurşunun kemikteki yarı ömrü 10 yıl olup geçmişe dönük kurşun maruziyetinin belirlenmesinde özellikle tabia ve patella kemiklerindeki kurşun düzeylerinin x-ray floresan (XRF) yöntemiyle belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Özellikle kemik kırılması, emzirme veya menopoz gibi durumlarda kemikteki kurşun kana girebilmesi nedeniyle kandaki kurşunun %40-70'i kemik kaynaklı olmaktadır (Hu ve ark., 1998).

1.1.7. Kurşun Maruziyetinde Tedavi ve Korunma

Kurşunun tedavisinde kurşunun vücuttan uzaklaştırılması amacıyla bir veya iki bölgeden metale bağlanabilen şelatörler uygulanır. Uygun şelatör kolay uygulanabilir olmalı, kurşunun atılımını artırmalı, güvenilir olmalı, toksisitenin ileri gitmesini engelleyerek, kurşun toksisitesine bağlı ortaya çıkan etkileri tersine çevirmelidir. Şelatörün uygulanması sonucu oluşan şelasyon-kurşun kompleksinin vücuttan

atılması gerekir ki aksi bir durumda oluşan kompleks bağlanmanın olduğu dokuda kalabilir veya diğer dokulara yayılabilir (Pocock ve ark., 1994).

Kurşun zehirlenmesinden şüphe edilen hastaya uygulanacak olan şelatör hastanın kan kurşun düzeyine ve gösterdiği semptomlara göre değişiklik gösterebilir. British-Anti-Lewist (BAL, dimerkaprol), kalsiyum disodyum etilendiamintetraasetik asit (CaNa_2EDTA) ve süksimer (DMSA, dimerkoptosüksinik asid) tedavide en yaygın kullanılan ilaçlardır. Kan kurşun düzeyi yüksek olan bireylerde intrevenöz uygulanan CaNa_2EDTA 'nın tek başına kullanılması durumunda bireyde gözlemlenen semptomlar kötüleşebilir. Kan kurşun düzeyi $70 \mu\text{g/dL}$ 'den yüksek olduğu durumlarda CaNa_2EDTA 'nın küçük moleküler yapıya sahip olan BAL ile birlikte uygulanması önerilmekte olup kurşun ensefalopatisi görülen bireylerde bu kombinasyonun kullanılması kurşunun uzaklaştırılmasında oldukça etkili bir ilaçtır (Binns ve ark., 2001). İki ilacın birlikte kullanılmasıyla CaNa_2EDTA 'nın tek başına kullanımına bağlı ortaya çıkabilecek biyokimyasal ve klinik kötüleşme engellenebilir (Needleman ve ark., 1979).

CaNa_2EDTA kurşunun idrarla atılımını 20-40 kat artırıyor olsa da uzun süre kullanıldığında böbrekte olumsuz etkilerin oluşmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle uzun süre kullanılacaksa böbrek fonksiyon testleri de düzenli olarak yapılmalıdır. Bunun yanı sıra kas içine uygulanan BAL, kurşunun feçes ve idrarla atılımına olanak sağladığından böbrek rahatsızlığı olan bireylerde bu şekilde kullanılabilir. Ancak BAL'ın glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi eksikliğinde de hemolize neden olması nedeniyle tedavi süresince yine gerekli testler düzenli şekilde yapılmalıdır (Özmert ve ark., 1996).

Bazı kişilerde ise semptomlar görülme dahi kan kurşun seviyesi yüksek çıkabilmektedir. Bu gibi durumlarda Amerika'da DMSA en çok tercih edilen ilaç olup 2,3 Dimerkaptopropan-1-sülfonat (DMPS, Dimaval) veya penisilamin de kullanılabilir. Kan kurşun düzeyinin $45 \mu\text{g/dL}$ 'den yüksek olduğu durumlarda BAL'ın suda çözünen bir analogu olan ve oral uygulanan DMSA tedavide tercih edilmektedir (Chisolm ve Kaplan, 1968; McIntire ve ark., 1973).

Kurşuna maruz kalan işçilerin sürekli olarak gözetim altında tutulması ve düzenli aralıklarla kontrollerden geçmesi gereklidir. OSHA tarafından kurşuna maruz kalan işçilerde uygulanması gereken tıbbi muayene önerisi Çizelge 1.3.'te yer almaktadır. Bunun yanı sıra OSHA tek seferde ölçülen kan kurşun düzeyinin 60 µg/dL'nin üzerinde olduğu durumlarda veya işçilerin kan kurşun düzeyi ortalamalarının 50 µg/dL ve üzerinde ölçüldüğü durumlarda, iş ortamlarından uzaklaştırılmalarının gerekli olduğunu ve bu kişilerin kan kurşun düzeyleri 40 µg/dL'nin altına düşünceye kadar tıbbi gözetim altında tutularak mevcut işlerinden uzaklaştırılmalarını önermektedir (Cullen ve Rosenstock, 1994; OSHA, 1978).

Türkiye'de de 2012 yılı itibari ile kabul edilen 6331 numaralı İş Sağlığı ve Güvenliği Kanunu uyarınca işçi sağlığını korumak ve güvenliklerini sağlamak amacıyla bir takım düzenlemeler yapılmıştır. Söz konusu kanun gereğince iş yerlerinde sürekli ve düzenli aralıklara risk değerlendirmesi, ortam havasının ölçülmesi, işçileri düzenli sağlık kontrollerinden geçmeleri önerilmektedir. İşveren işçinin sağlığını ve güvenliğini sağlamakla yükümlü olup işçinin kimyasala maruziyetini en aza indirmek adına gerekli koruyucu ekipmanları vermesi ve kullandırması gerekmektedir. İşçinin sağlığını tehdit eden bir durum söz konusu olduğunda ise işçi çalışmaktan kaçınma hakkını kullanabilmekte veya iş yeri ortamlarının değiştirilmesi için talepte bulunabilmektedir.

Çizelge 1.3. OSHA tarafından kurşuna maruz kalan işçiler için tıbbi muayene önerisi (OSHA, 1978).

Detaylı medikal ve mesleki hikayenin alınması	Özellikle kurşun maruziyetinin mesleki veya mesleki kaynaklı olup olmadığı sorgulanmalı, kişisel ve işyeri hijyeni, hematolojik, üreme, gastrointestinal, renal ve nörolojik hastalıklar açısından birey kontrol edilmelidir.
Fiziksel muayenenin yapılması	Kurşun maruziyetinde karşımıza çıkan özellikle nörolojik ve hematolojik anormalliklere dikkat edilmelidir. Buna ilaveten koruyucu maske kullanması gereken işçilerde pulmoner durum kontrol edilmelidir.
Kan analizleri	Kan kurşun seviyesi, serbest eritrosit protoforfirin ve çinko protoforfirin seviyesi, hematokrit, hemoglobin, serum kreatinin seviyesi, periferik yayma, idrar mikroskopisi kontrol edilmelidir.
<u>Medikal tedavinin uygulanması gereken durumlar</u>	
<ol style="list-style-type: none">1. İş yerinde çalışanlardan herhangi birinin bir yıl içerisinde kan kurşun seviyesinin 40 µ/dL'yi geçmesi durumunda.2. İşyeri ortamında hava kurşun seviyesinin aksiyon derecesinde veya üstünde olması durumunda.3. İşçinin kurşun maruziyeti belirtileri göstermesi durumunda.	

1.2. Biyolojik Materyallerde Metal Tayini

Enstrümental analizler dolayısıyla analitik toksikoloji alanında yaşanan hızlı gelişmeler sayesinde element analizlerine yönelik birçok yeni yöntem ve cihazların kullanıma girmesi söz konusu olmaktadır. Bunların başında geçmişten günümüze en çok kullanılan Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi (F-AAS) ve Grafit Fırın Atomik Absorpsiyon Spektrometresi (GF-AAS) gelmektedir. Son yıllarda ise daha hızlı analiz kabiliyeti, aynı anda çoklu metal ölçümü yapabilme özelliği ve daha az numune harcayarak analize olanak sağlaması avantajlarından dolayı İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS) ve İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektrometresi (ICP-OES) kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra X-Işını Floresan (KXRF), Diferansiyel Puls/Anodik Sıyırma Voltametrisi (DPASV/ASV), Yüklü Parçacıklı X-Işını Emisyonu (PIXE), İzotop Seyreltimsel Kütle Spektrometresi'nde (IDMS) kurşun tayininde kullanılan metodlar arasında yer almaktadır (NTP, 2003). Bu yöntemlerin tümünün biyolojik numunelerde kullanımı uygun olmayıp biyolojik numunelerden kurşun tayininde GF-AAS ve ICP-MS tercih edilirken organik kurşun tayininde gaz kromatografisi (GC) ile AAS kombine bir şekilde kullanılarak analiz gerçekleştirilmektedir. Ancak tüm bu cihazlarda ölçüm yapılabilmesi için biyolojik numunelerin çoğunlukla bir takım ön işlemlere tabi tutulması gerekmektedir.

1.2.1. Metal Analizi İçin Ön Hazırlık İşlemleri

Metaller ve eser elementler AAS ve ICP-MS cihazlarında analiz edilmeden önce yaş yakma, kuru yakma veya mikrodalga işlemlerinden biri ile çözünür hale getirilerek analize hazırlanmaktadır. Bu ön hazırlık işlemlerinden biyolojik numunelerin çalışılması için en uygun olanı mikrodalga ile yakma yöntemidir.

1.2.1.1. Yaş Yakma Yöntemi

Yaş yakma yönteminde katı halde bulunan örnekler ilk olarak homojenize edilerek kurumaya bırakılır. Ardından hassas terazide tartım işlemi ile ölçümlerin kaydı alınır. Sonrasında ise örneklerin çözünmesi amacıyla üzerlerine asit eklenerek üstleri kapatılır ve tamamen çözünme işlemi gerçekleşinceye kadar sıcak plaka üzerinde bekletilir. Numunenin tamamen çözünmesi için gerekli olan süre numunenin türüne ve çözünme işleminde kullanılan kimyasala göre değişiklik gösterebilmektedir. Çözünen numuneler soğuduktan sonra saf su ile seyreltilir ve süzülerek analize hazır hale getirilir (Srnkolj ve ark., 2005).

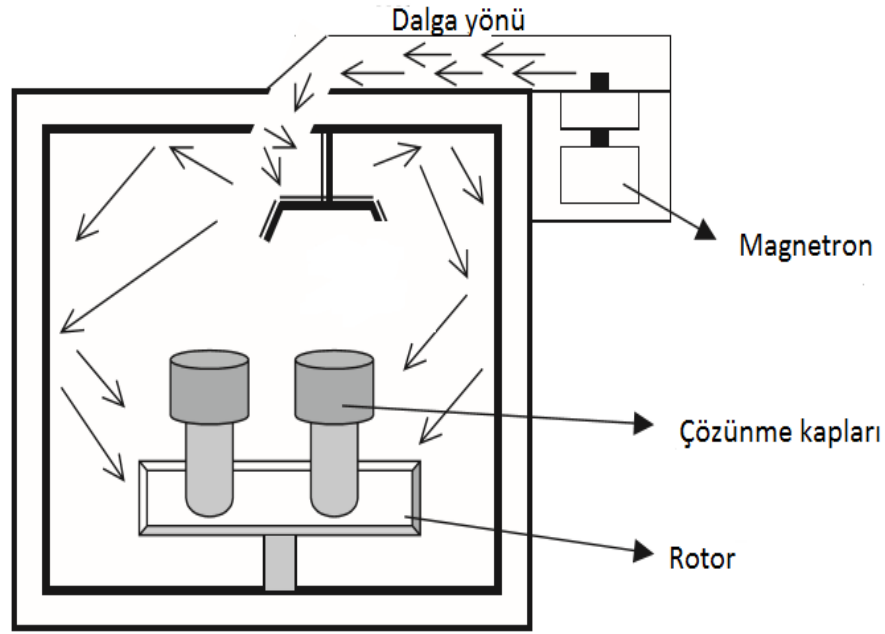
1.2.1.2. Kuru Yakma Yöntemi

Katı örnekler homojenize edilerek 500-700 °C'deki kül fırınlarında yakılmak üzere asite dayanıklı olan kuartz veya porselen krozelere yerleştirilirler. Örnekler gri renk alıncaya kadar yaklaşık olarak 2 saat yakma işlemine devam edilir. Örneklerin siyah renkte olması yanma işleminin başarılı bir şekilde gerçekleşmediğinin göstergesidir. Tam yanma işleminin gerçekleşmesiyle krozeler soğumaya bırakılır ve ardından numunenin çözünmesi için asit eklenir. Deiyonize su eklenerek süzülür ve analiz gerçekleştirilir. Yaş yakma işlemine göre fırın ile yakma işleminin yapılması avantajlı gibi görünse de numunelerin buharlaşması veya kontamine olması nedeniyle dezavantajlı da olabilmektedir. Ayrıca yakma işleminde önemli bir diğer nokta ise krozelerin yapısı olup platin, kuartz ve porselen olanların asite dayanıklı ancak baza karşı dayanıksız oldukları göz önünde bulundurulmalı ve krozelerden oluşabilecek kontaminasyonu engellemek amacıyla asitli su ile temizleme işlemi yapılmalıdır (Milačić ve Kralj, 2003).

1.2.1.3. Mikrodalga ile Yakma Yöntemi

Mikrodalga fırınlar genel olarak ısıtma amacıyla kullanılmaktadırlar ancak yıllar içinde biyolojik numunelerin hızlı yakılmasına olanak sağladığından, numune hazırlama amacıyla kullanım alanları genişlemiştir. Örneğin, ilk yıllarda açık

kaplarda yapılan yakma işlemi yerine kapalı kaplarda yakma yapılmasıyla yakma işlemi sırasında açığa çıkan zararlı dumanların yayılması, uçucu metallerin kaybının ve kontaminasyonun en aza indirgenmesi sağlanmıştır. Tüm bu avantajların yanı sıra mikrodalga ile yakma işleminde daha az kimyasalın kullanımı, söz konusu metodu yaş ve kuru yakmaya göre daha avantajlı ve daha çok tercih edilir hale getirmiştir. Mikrodalga için kullanılan metodlar kimyasala, sıcaklığa ve basınca göre değişiklik göstermektedir. Numune üzerine hidroklorik asit (HCl), nitrik asit (HNO₃), perklorik asit (HClO₄), hidroflorik asit (HF) veya sülfürik asit (H₂SO₄)'ten biri eklenerek örnek çözünür hale getirilir. Yüksek miktarda radyo frekansı gücü ve magnetron ile enerji ısıya dönüştürülerek numune kısa sürede tamamen yanmış hale getirilir (Şekil 1.5.) (Mantovi ve ark., 2003; Oliveira, 2003; Valiente ve ark., 2002).



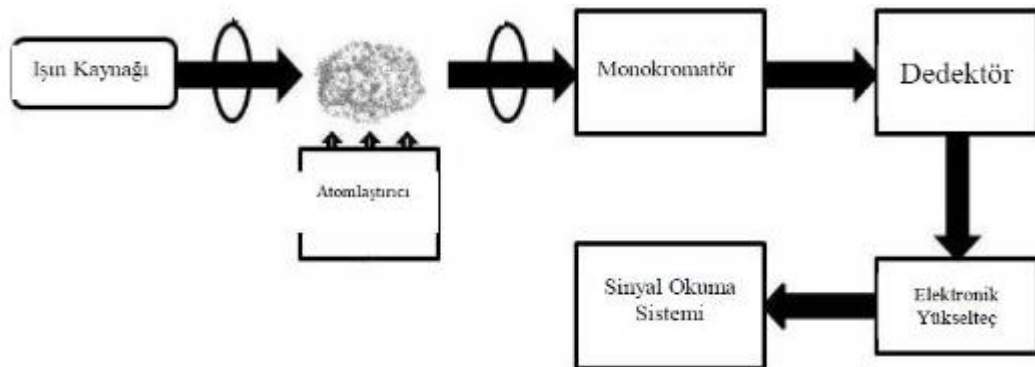
Şekil 1.5. Mikrodalgada magnetronun yer aldığı yakma ünitesi (Oliveira, 2003).

1.2.2. Metal Analizde Kullanılan Cihazlar

1.2.2.1. Atomik Absorpsiyon Spektrometresi

Gerekli ön işlemler sonucunda çözülmüş halde olan numunelerdeki elementlerin konsantrasyon tayini için en çok kullanılan cihazlardan biri olan Atomik Absorpsiyon Spektrometresinde (AAS), gaz formundaki serbest atomlar kendilerine özgün dalga boyundaki ışınları absorplaması ile elementlerin nicel analizi gerçekleştirilmektedir. Temelde beş ana parçadan oluşan cihazda yer alan parçalar ve işlevleri aşağıdaki gibi olup şekil 1.6.'da şematize edilmiştir.

- Analizi yapılmak istenen elemente özgü dalga boyunda ışık verebilen oyuk-katot lambaların yer aldığı ışın kaynağı,
- Numune içerisindeki elementlerin atomizasyonunu sağlayan atomlaştırıcı kısım,
- Analiz edilen dalga boyunu diğer dalga boylarından ayırt edildiği monokromatör kısım,
- Monokromatör ile saptanan ışığın şiddeti belirlendiği dedektör,
- Son olarak elde edilen verilerin elektronik ortama aktarıldığı sistem ki bu genellikle bir bilgisayardır (Agilent Technologies, 2010).



Şekil 1.6. AAS işleyişini yansıtan şematik görünüm (T.C. MEB, 2012).

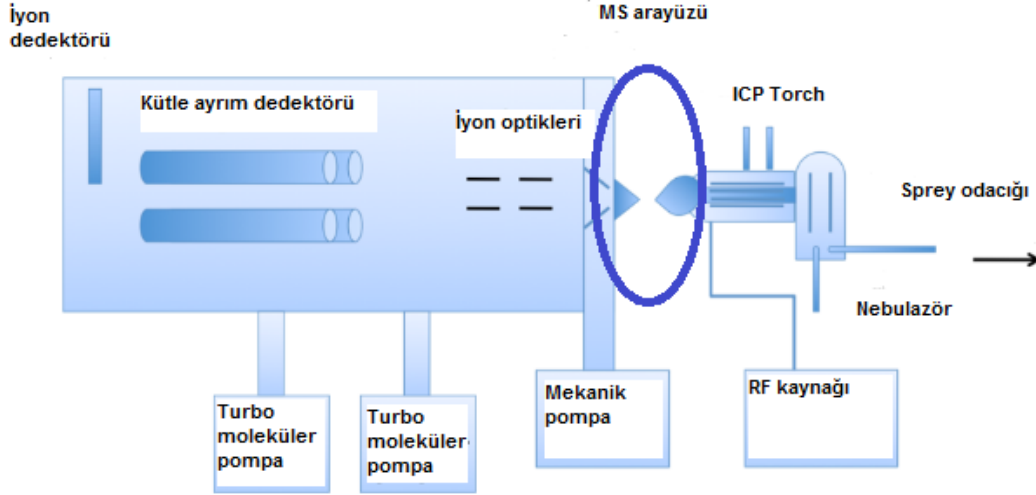
Kimyasal tarafından soğurulan ışık, analizi yapılan kimyasalın derişimi ile doğru orantılıdır. Lambert- Beer Kanunu olarak adlandırılan bu kanuna dayalı olarak çalışan AAS'de analizi yapılmak istenen elemente özgü oyuk- katot lambanın aktif hale getirilmesi için akım uygulanır. Akımla birlikte lamba içerisindeki asal gaz atomları iyonlaşarak katoda çarpar ve metaller uyarılır. Uyarılmış atomlar eski hallerine dönerken analizi yapılmak istenen metale spesifik dalga boyunda ışık yayarlar. Aynı zamanda numune alev veya yüksek elektrik akımıyla atomlaştırılır ve atomlarına ayrılmış element lambadan gelen kendine özgü dalga boyundaki ışığı absorplar. Böylece absorbe olunan ışık miktarı dedektör tarafından ölçülerek numunedeki elementin miktarı kantitatif olarak tayin edilir. Kısacası, ilk olarak konsantrasyonu belirli olan çözeltiler cihaza okutulularak kalibrasyon (konsantrasyon-absorbans) eğrisi elde edilir. Ardında da konsantrasyonu bilinmeyen numune cihaza okutulularak dedektör tarafından saptanan absorbans değeri elde edilir. Kalibrasyon eğrisinde elde edilen absorbansa karşılık gelen konsantrasyon değeri analizi yapılan numunede araştırılan elementin konsantrasyonunu belirtmektedir (Holler; Welz ve Sperling, 2008, Varian Australia Ltd, 1997, Agilent Technologies, 2010).

1.2.2.2. İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi

Günümüzde daha çok çevre, jeoloji, biyomedikal, eczacılık, nükleer, adli ve daha birçok alanda elementlerin analizinde ICP-MS tercih edilmektedir (Şekil 1.7.).

- Düşük dedeksiyon limiti (ppt),
- Yüksek konsantrasyonlarda sonuç verebilmesi,
- Tek seferde birden fazla metal ölçümü yapabilme özelliği,
- İzotop özelliğinin olması,
- Hızlı dedeksiyon,
- Yüksek matriks toleransı,
- Sinyal görüntü oranının daha düşük olması,

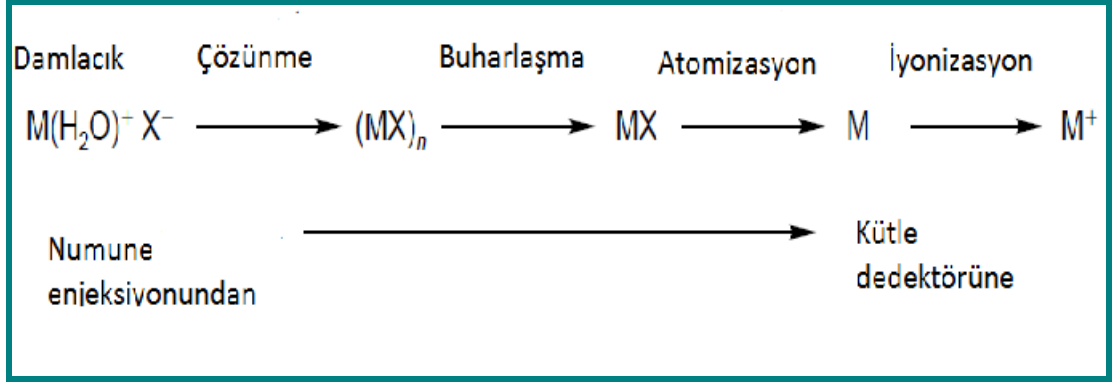
cihazı AAS, GF-AAS ve ICP- OES'e göre daha avantajlı kılmaktadır (Thomas, 2013, Agilent Technologies, 2015).



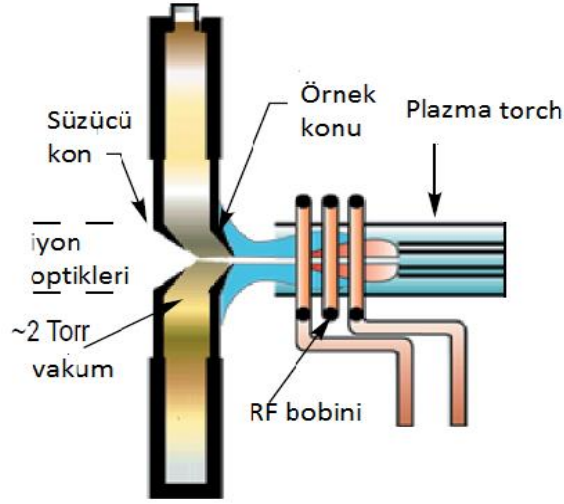
Şekil 1.7. ICP-MS'in temel bileşenlerini yansıtan şematik görünüm (Thomas , 2008).

1.2.2.2.1. ICP-MS Çalışma Prensibi

Numune, peristaltik pompa ile nebulizatöre iletilir. Sonrasında taşıyıcı gaz yardımıyla ki genellikle taşıyıcı gaz olarak argon tercih edilmektedir numune sprej odacığına püskürtülür. Büyük damlacıklar atık kısmına giderken küçük damlacıklar argon tarafından oluşturulan plazmaya taşınır. Plazma oluşumu ise; serbest elektronlar ile hızla salınan manyetik alanın (27 MHz) endüktif birleşmesiyle eş zamanlı olarak radyo sinyallerinin radyo frekansı (RF) bobini ile argon gazına iletilmesi neticesinde alev alıcı özellikte olmayan plazmanın ortaya çıkması şeklinde özetlemek mümkündür. Üç kuartz camın iç içe geçmesiyle oluşan torch adı verilen bölgede gerçekleştirilen bu işlem esnasında torch içerisindeki sıcaklık 6000-8000 kelvin (K)'e kadar yükselir ve numune öncelikle buharlaştırılırken ardından sırasıyla atomlaştırılır ve iyonlaştırılır (Şekil 1.8.). Bu süreç sonrasında açığa çıkan pozitif yüklü iyonlar süzücü ve örnek konuları ile atmosferik basıncın bulunduğu bölgeden yüksek vakumlu alana geçiş yaparlar (Şekil 1.9.).



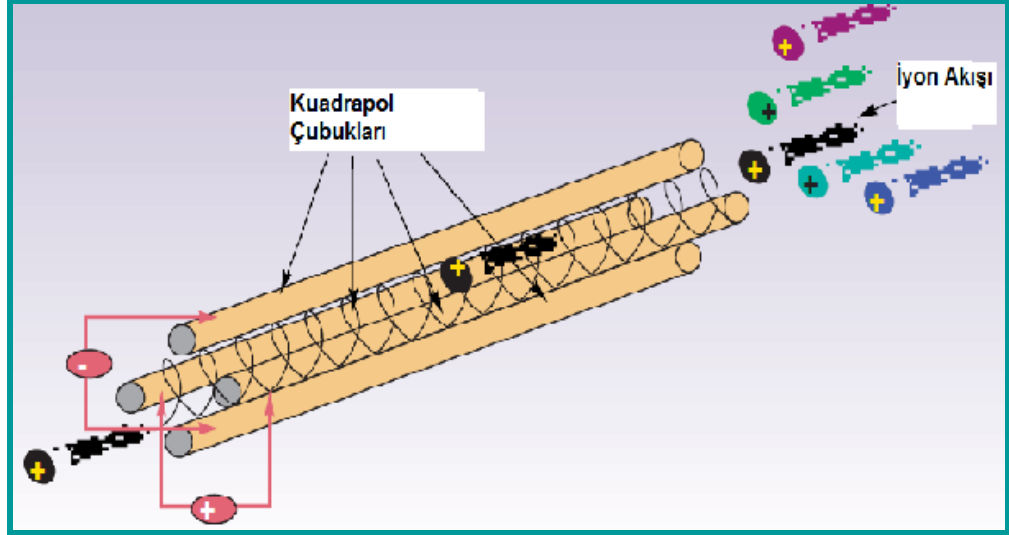
Şekil 1.8. Plazma ve pozitif yüklü iyonun oluşum mekanizması (Thomas, 2013).



Şekil 1.9. ICP-MS'de yer alan örnek ve süzücü konlar (Thomas, 2013).

Turbo moleküler pompalar basıncı 10^{-5} mbar seviyesine düşürünceye kadar çalışır. Böylece iyonlar kütle filtresine ulaşmadan basınç düşürülmüş olur. Sonrasında ise iyonlar, iyon lensleri aracılığıyla hidrojen veya helyum gibi gazların kullanılması suretiyle poliatomik yapıların parçalandığı interferans giderme ünitesine ulaşırlar. Ardında da kütle/yük oranlarına göre ayrışmalarının sağlanacağı 4 metal çubuktan oluşan kuadrapol kütle filtresine giderler. Kuadrapol içerisinde iyon hareketi oluşturmak amacıyla AC ve DC elektrik potansiyelleri zıt çubuklara (negatif veya pozitif potansiyele sahip olacak şekilde) uygulanır ve çubuklara uygulanan voltaja bağlı olarak iyonların seçimi yapılır (Şekil 1.10.). Ardından çoğaltıcı özellikteki dedektöre ulaşan iyonlar zıt yönde voltaja maruz bırakılarak,

dedektörden elektron koparması sağlanır ve bu şekilde ölçüm sağlanmış olur (May ve Wiedmeyer, 1998; Thomas, 2013).



Şekil 1.10. Kuadrapol kütle filtresi.

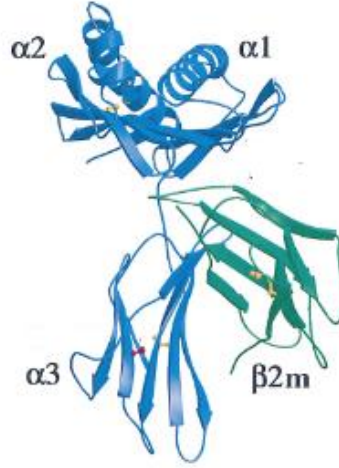
1.3. Yüksek Demir Proteini (HFE)

1996 yılında HLA genine benzerliğinden ötürü HLA-H olarak adlandırılan HFE, gen yapısının ve fonksiyonunun anlaşılmasıyla Yüksek Demir Proteini olarak adlandırılmıştır (Feder ve ark., 1996; Felitti ve ark., 1999; Powell ve ark., 2000; Hanson ve ark., 2001). İngilizcede Yüksek anlamına gelen high “H” ve demirin simgesi olan Fe’nin birleşimi olan HFE aynı zamanda İnsan Hematokromatozis Proteini olarak da bilinmektedir (Barton ve ark., 2015).

1.3.1. HFE Proteininin Yapısı

Başlıca karaciğer, ince bağırsak, yumurtalık hücrelerinde yüksek miktarda bulunan HFE proteini stoplazmanın içinde yer alan kısa bir kısım, hücre zarından geçişin olduğu bir bölüm ve hücre dışında yer alan (α_1 , α_2 , α_3) üç kısımdan oluşmaktadır (Lebron ve ark., 1998; Pietrangelo ve ark., 1998; Bennett ve ark., 2000; Martins ve ark., 2011; Whittington ve ark., 2002). Proteinde üstte paralel olmayan α

sarmalının yanı sıra peptit bağlayıcı α_1 ve α_2 ile antiparelel β iplikleri düzlem şeklinde bulunur. İmmüoglobüline benzer özellikte olan α_3 ise beta-2-mikroglobuline (β_2M) bağlanabilmektedir (Şekil 1.11.).

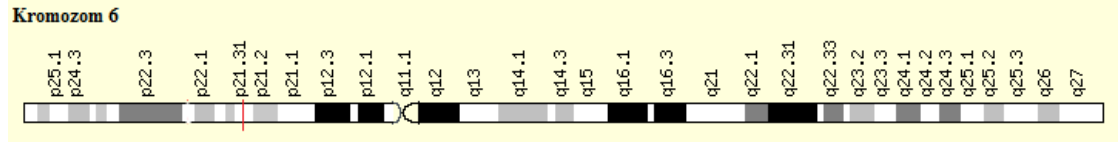


Şekil 1.11. HFE'nin kristal yapısı

Majör histokompabilite kompleksi- 1 (MHC-1) proteinine benzer bir genomik yapıya sahip olan HFE Proteini MHC-1 gibi bir hücre yüzey proteinidir (Feder ve ark., 1996a; Lebron ve ark., 1998; Bennett ve ark., 2000; Sánchez ve ark., 2001; Barton ve ark., 2015). HFE'nin MHC-1'e benzer bir diğer özelliği de proteinin tersiyer yapıya geçebilmesi için α_1 - α_2 etki alanı içinde β_2M bağlanmasını sağlamak amacıyla kovalent olmayan disülfid bağlarının oluşması için dört adet sistein sağlamasıdır (Feder ve ark., 1996b). Bu yapı sayesinde HFE endoplazmik retikulmdan plazma zarına taşınabilmektedir. Bunun yanı sıra iki peptidi bağlayan alan arasındaki oluğun dar olması nedeni ile de HFE, MHC-1'den farklı olarak antijen sunma özelliği taşımamaktadır (Feder ve ark., 1997). α_1 'in etkisi altında bulunan dört adet histidin HFE proteininin yapısal özelliğidir. α_2 ve α_3 'te bulunan dört adet sistein hücre dışı etkinliği sağlamak amacıyla disülfid köprüleri sağlar. α_3 aynı zamanda demir metabolizmasının düzenlenmesinde görevli olan β_2M ile ilişki kurulmasında gereklidir (Feder ve ark., 1996a; Parkkila ve ark., 1997a; Pietrangelo ve ark., 1998; Vujić, 2014).

1.3.2. HFE Geni

49 kDa büyüklüğündeki membran glikoproteini olan HFE proteini, 6. kromozomun kısa kolunda (6p21.3) ve HLA-A gen bölgesinin de telomerinin ortalama 4,6 megabaz pozisyonunda lokalize olan yaklaşık 10 kilobazlık HFE geni tarafından kodlanmaktadır (Şekil 1.12.).



Şekil 1.12. 6. kromozom üzerinde yer alan HFE'nin lokalizasyonunun şematik gösterimi (<http://www.genecards.org>).

Beyin hariç birçok dokuda sentezi gerçekleştirilen HFE geni yedi ekzon ve altı intron bölgesi içermekte olup, beş ekzon proteinin aynı bölgesini kodlarken aralarından bir ekzon farklı bir bölgenin sentezini sağlamaktadır (Feder ve ark., 1996; Pietrangelo ve ark., 1998; Bennett ve ark., 2000; Barton ve ark., 2015). Protein yapısında ekzon 1 sinyal peptid alanına, ekzon 2-4 proteinin hücre dışında kalan kısımları olan α_1 , α_2 , α_3 bölgelerine, ekzon 5 transmembran bölmesine, stop kodunu içeren ekzon 6 ise proteinin stoplazma içerisinde yer alan kuyruk kısmına denk düşmektedir. Yedinci ekzonun sentezi ise gerçekleşmemektedir (Sánchez ve ark., 2001; Barton ve ark., 2015) (Şekil 1.13.).



Şekil 1.13. HFE geninde yer alan ekzon ve intronların şematik gösterimi (Sánchez ve ark., 2001).

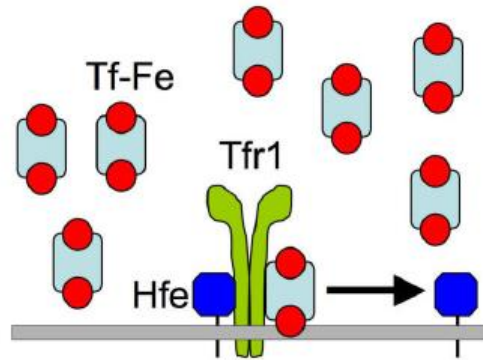
HFE proteini kolonda, karaciğerin sinodizal yerleşimli hücrelerinde, midede, safra kanalı epitel hücrelerinin bazolateralinde, bağırsak villus enterositlerinin apikal stoplazmasında ve ince bağırsağın duodenal kript hücrelerinin iç bölgesinde bulunmaktadır. HFE'nin ince bağırsaktaki kript hücrelerinin farklı bölgelerinde lokalize olması proteinin bu alanlarda farklı görevlere sahip olabileceğini gösterebilmektedir. Örneğin, HFE proteinin bağırsaklardaki varlığı demir emiliminin yanı sıra hücrel demir alımında da görev aldığı bir göstergesi olduğu şeklinde yorumlansa da halen HFE proteininin moleküler fonksiyonu hakkındaki belirsizlik devam etmektedir (Vujic Spasic ve ark., 2007; Parkkila ve ark., 1997a, Waheed ve ark., 1999, Parkkila ve ark., 1997b, Schmidt ve ark., 2008). HFE geni mRNA'sı ise en yüksek konsantrasyonda yumurtalık ve karaciğerde bunların yanı sıra testis, kalp, dalak ve böbrekte daha az bulunurken, duodenumda en az miktarda beyinde ise hiç bulunmamaktadır (Martins ve ark., 2011; Barton ve ark., 2015).

1.3.3. HFE Geninin Fonksiyonu

HFE geninin yüksek düzeyde bulunduğu duodenal kript hücreleri demir konsantrasyonuna duyarlı olup hücrel düzeyde demir emiliminden ve sistematüğinden sorumludur. Düşük demir seviyesi, kript ve enterosit hücrelerinde yer alan HFE proteininin β_2M subuniti tarafından algılanmakta ve düzenlenmektedir. Serum içerisinde transferrine bağlı demir miktarının düşük olması vücut demir depolarının düşük olduğunun bir göstergesi olup programlanmış kript hücreleri tarafından transferrine bağlı demir alımı azaltılmakta ve eş zamanlı olarak enterositlerde yer alan villuslardan demir emilimi artırılarak enterosit içinde demir birikmesi sağlanmaktadır. Düşük demir düzeyi lümende yer alan ve demir emilimi yapamayan kriptik hücreler tarafından algılanabilmekte ve 2-3 gün içinde enterositlere dönüştüklerinde hangi düzeyde demir emilimi yapacakları hakkında programlanmaktadır. Ancak bazı durumlarda yeni ve olgunlaşmış enterosit hücreleri arasında fizyolojik uyarının gecikmesine bağlı olarak mevcut demir düzeyi ve demir emilimi yanlış algılanabilmekte bunun sonucunda da enterositlerde fazla demir birikmektedir (Waheed ve ark., 1999).

HFE proteini demire doğrudan bağlanamamakta bunun yerine serum Fe-Tf derişimine bağlı olarak HFE TfR1 ve TfR2 ile etkileşime girerek hücrel demir emilimini düzenlemektedir (Parkkila ve ark., 1997a; Waheed ve ark., 1999; Goswami ve ark., 2006; Schmidt ve ark., 2008).

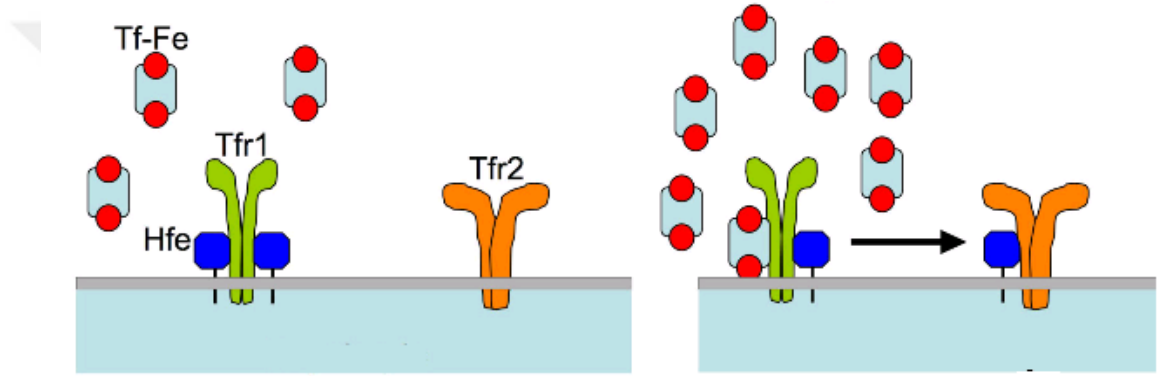
Düşük demir düzeyinin kript hücrelerindeki HFE tarafından algılanması sonucu HFE plazmada yer alan TfR1 ile etkileşerek demir emilimini düzenler. Transferrine bağlı demir miktarı fazla ise HFE-TfR1 kompleksi çözünerek HFE serbest hale geçer. Transferrin ile dolaşımda taşınan demir kript hücrelerine ulaştığında TfR1 ile birleşerek HFE'nin aktivasyonunu sağlamak üzere hücre içine sinyal gönderir. Böylece, diferriktransferrin duodenumun kript bölgesinde yer alan olgunlaşmamış enterosit hücrelerinin bazolateral yüzeyinde yer alan HFE-TfR1 kompleksi ile birleşerek, TfR1'inde yardımıyla endositoz yoluyla hücre içine alınır (Andrews, 2008; Schmidt ve ark., 2008; Pantopoulos, 2008) (Şekil 1.14.).



Şekil 1.14. HFE ve diferrik transferinin TfR1'e bağlanmasının şematik görünümü (Schmidt ve ark., 2008).

Hepatositlerde yüksek demir yükü HFE ile engellenmektedir. HFE bağlı sinyal aracılığıyla TfR1 ve HFE etkileşime girerek hepsidin ekspresyonunu düzenlenmektedir (Pantopoulos, 2008). Serumda Fe-Tf konsantrasyonu az ise HFE, TfR1 ile etkileşerek hücrel demir emilimi için önemli bir protein-protein kompleksi oluşturmaktadır (Schmidt ve ark., 2008) (Şekil 1.15.). Serum Fe-Tf derişimi yüksek ise bu durum HFE'nin β_2M subuniti tarafından algılanmaktadır. Böylece, demirin transferrine olan afinitesi 5-10 kat azalmakta ve Fe TfR1'e

bağlanmaktadır. Demirin TfR1'e bağlanmasıyla serbest kalan HFE ise hepsidin sentezini uyarmak üzere TfR2 ile birleşmektedir. Hepsidin sentezinin uyarılmasıyla dolaşımda hepsidin seviyesi artmakta ve buna bağlı olarak intestinalden demir emilimi azaltılırken makrofojlara da az demir salınımı yapması sağlanmaktadır. Ancak HFE veya TfR2 sentezi az, yok veya mutasyonlu ise Tf konsantrasyonu kompleks tarafından algılanamayacağından demir metabolizasyonu bozulabilmektedir (Schmidt ve ark., 2008; Gao ve ark., 2009; Gross ve ark., 1998).



Şekil 1.15. Karaciğer merkezli serum demir algılamasının şematik gösterimi (Schmidt ve ark., 2008).

1.4. Genetik Polimorfizm

Yaklaşık olarak 3×10^9 baz çiftinden oluşan insan DNA (Deoksiribonükleik asit)'sında 30,000'den fazla gen bulunmaktadır. Heliks yapısındaki DNA, 23 çift kromozom içinde histon proteinlerince paketlenir. DNA üzerinde yer alan ve spesifik bir ürünün sentezlenmesini sağlayan nükleotid dizisi gen olarak adlandırılmaktadır.

İki insanın genetik dizisi %99,9 oranında benzerlik gösterirken, bireylerin birbirinden farklılıkları sadece %0,01'lik kısımdır.

Genetik dizimdeki %0,01'lik farklılık, mutasyon veya polimorfizm kaynaklı ortaya çıkmaktadır. Bir populasyon içerisinde bir özellik için birden fazla fenotip

bulunuyorsa ve fenotiplerden her birinin populasyon içinde görülme sıklığı %1'den az ise “genetik mutasyon”, %1'den fazla ise “genetik polimorfizm” olarak adlandırılmaktadır (Gonzalez, 1999). Gen haritalanması, bireyin ksenobiyotiğe karşı duyarlılığı, hastalığa yatkınlığı, kanser tiplemesinde bireyin taşıdığı riskleri belirlemede, doku tiplmeleri polimorfizmler yardımıyla yapılabilmektedir. Genetik polimorfizmler de bir çeşit mutasyon sayılmakla birlikte Çizelge 1.4.'de yer aldığı temel bir takım farklılıklar sergilemektedir.

Çizelge 1.4. Genetik polimorfizm ve genetik mutasyon arasındaki farklılıklar.

	Genetik Polimorfizm	Genetik Mutasyon
Canlıya etkileri	Zararsız veya canlıya olumlu özellik katabilecek mutasyonlardır	Genellikle olumsuz etkilere neden olurken canlıya avantaj kazandırdığı durumlarda mevcuttur
Genetik hastalığa neden olma	Yok	Mutasyonun etki ettiği genetik bölgeye göre neden olabilirler/ olmayabilirler
Üremeye etkileri	Yok	Var
Populasyondaki frekansları	%1'den fazla	%1'den az

1.4.1. Polimorfizm Çeşitleri

DNA üzerinde farklı sayıda tekrar eden nükleotid dizileri, tek nükleotit polimorfizmi, insersiyon veya delesyon sonucu polimorfizmler meydana gelebilmektedir (Nussbaum ve ark., 2001).

1.4.1.1. DNA'daki Tekrar Dizileri

Mikrosatallitler adı verilen DNA'daki kısa tekrar dizileri rastgele konumlarda ve farklı sayıda tekrar içerecek şekilde genomda yer alarak polimorfik değişikliklere neden olabilmektedirler (Nussbaum ve ark., 2001).

1.4.1.2. İnsersiyon

DNA'ya tek bir nükleotidin veya nükleotidlerin eklenmesi insersiyon olarak adlandırılmaktadır. Söz konusu eklenme protein kodlayan bir gende ise nükleotid eklenmesine bağlı olarak proteinin amino asit dizilimi değişebilmekte ve çerçeve kayması meydana gelebilmektedir. Buna bağlı olarak ya sentezlenecek olan proteinin yapısı değişebilmekte ya da protein sentezi başarılı bir şekilde gerçekleşmemektedir (Emir ve Özden, 2006).

1.4.1.3. Delesyon

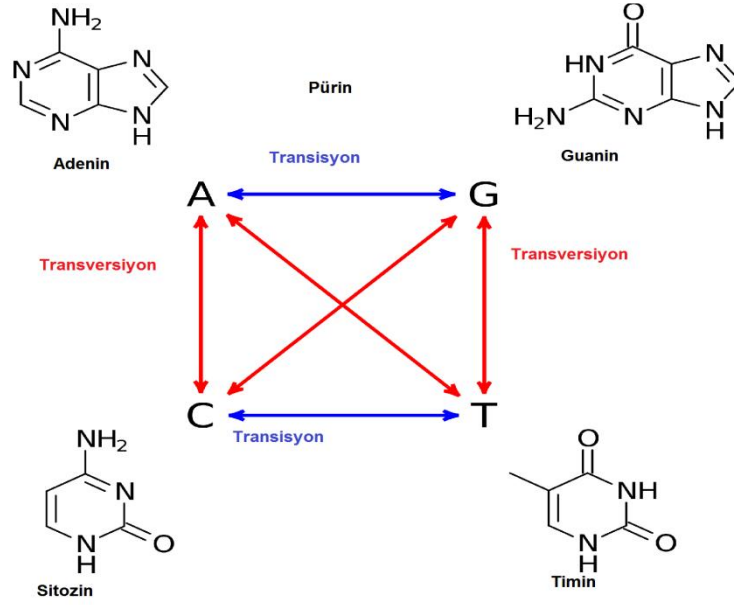
Tek bir nükleotidin veya nükleotidlerin DNA'dan kırılıp çıkması sonucu delesyon meydana gelmekte ve bunun sonucunda da normalden daha kısa gen oluşmakta ve genin sentezi başarılı bir şekilde gerçekleşmemektedir (Emir ve Özden, 2006).

1.4.1.4. Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)

DNA'da her 2000- 2500 baz da tek bir bazın transisyon veya transversiyon yoluyla değişmesi sonucu meydana gelen polimorfizm çeşitidir (Şekil 1.16.).

- *Transversiyon:* DNA'daki bir pirimidin bazının (C, T) bazının pürin bazına (A, G) veya tam tersinin olması transversiyon olarak adlandırılmaktadır.

- *Transisyon*: DNA'daki bir pürin bazının (A, G), pürin bazına veya bir primidin bazının (C, T) primidin bazına dönüşmesi olayıdır (Emir ve Özden, 2006).



Şekil 1.16. Transisyon ve transversiyonun şematik görünümü.

1.4.1.4.1. SNP'lerin Protein Oluşumuna Etkileri

Transisyon veya transversiyon sonucu oluşan tek nükleotid polimorfizmlerine bağlı olarak kodlanacak olan proteinin yapısında veya fonksiyonunda değişiklik meydana gelebilmektedir. SNP sonucu meydana gelen amino asit farklılığı, sentezlenecek olan proteinin fonksiyonuna veya yapısına etki etmiyor ise sessiz (silent) polimorfizm olarak tanımlanmaktadır. Ancak bazen SNP'ler sonucunda "dur" kodonları olan TAA, TAG veya TGA'dan biri kodlanmakta ve bunun sonucunda kodlanan proteinin sentezi durmakta veya işlevsel olmayan bir protein sentezi gerçekleşmektedir. Bazen de gen sentezinin başlama noktası olan promotor bölgede SNP'lerin oluşması sonucu gen sentezlenememekte veya gen ekspresyon düzeyi artabilmekte ya da azalabilmektedir (Williams ve Hayward, 2001).

Kısacası, SNP'ler meydana geldikleri bölgede önemli hücresel fonksiyonel değişikliklere neden olabilmektedirler. Gen tarafından kodlanacak olan proteinin yapısını, fonksiyonunu veya enzimlerin aktivitesini değiştirerek, hastalıkların oluşmasına, hastalık riskinin artmasına veya bireyin hastalığa ya da bir ksenobiyotiğe karşı dirençli olmasına neden olabilirler (Kruglyak, 1997).

1.5. HFE Gen Mutasyonları ve Herediter Hemokromatozis

Herediter hemokromatozis (HH) vücutta fazla demir birikmesi sonucu meydana gelen ve otozomal resesif geçiş özelliği gösteren bir hastalıktır. Söz konusu hastalık 37 allelik gen varyantı bulunan HFE geninde bir nokta mutasyonu sonucu oluşmaktadır (Fleming ve ark., 2002; Chen ve ark., 2012 Hanson ve ark., 2001). HFE gen bölgesinde sık rastlanan üç mutasyon HH ile ilişkilidir. Bunlar

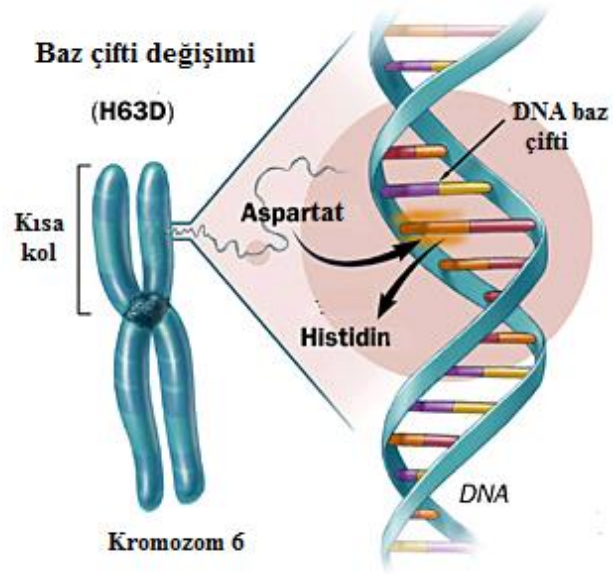
- “Majör” HH gen mutasyonu olan HFE'nin ekzon 4 bölgesinde yer alan C282Y (rs1800562) mutasyonu,
- HFE geninde ekzon 2 de yer alan H63D (rs1799945) “minör” HH mutasyonu,
- S65C mutasyonudur (Jeng ve ark., 2003).

Bireylerde H63D mutasyonu farklı iki alelde yer alıyorsa bireyler homozigot mutant, aynı alelde yer alıyor iseler kişiler heterozigot mutant veya mutasyon yok ise de yabancı tip (wild type) olarak adlandırılmaktadırlar (Pietrangelo, 2003).

1.5.1. HFE Geninde H63D Polimorfizmi

HFE gen bölgesinde ekzon 2'nin 187. nükleotidi olan C'den G'ye (C→G) transversiyonu sonucu translasyon aşamasında HFE proteininin α_1 subunitinin 63. pozisyonunda histidin yerine aspartat aminoasiti (His63Asp) kodlanmaktadır (Şekil 1.17.) (Feder ve ark., 1996, Beutler, 1997, Powell ve ark., 2000; Merryweather-

Clarke ve ark., 2000) (Şekil 1.15.). H63D polimorfizminin frekansı Avrupa popülasyonunda %15, Güney Amerika için %10-15, Asya popülasyonu için de %2'dir (Goche ve ark., 2002; Sohda ve ark., 2001).



Şekil 1.17. H63D polimorfizminin şematik gösterimi.

H63D polimorfizmi sonucu proteinde amino asit değişikliği olsa dahi proteinin üç boyutlu yapısında, hücre içi işlevinde veya hücre içi taşınım yapmasında herhangi bir değişiklik olmamaktadır. Ancak proteinin transferrin ile affinitesi değişmekte ve demir hemostazisi bozulabilmekte ve aşırı demir birikimi meydana gelebilmektedir (Parkkila ve ark., 1997a, Waheed ve ark., 1997, Beckman ve ark., 1999, Barton ve ark., 2015).

1.6. Polimorfizm Analizi

Polimorfizm analizlerinden birisi de polimeraz zincir reaksiyonu – restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemidir. Öncesinde kan, idrar, saç, tırnak, doku gibi biyolojik numunelerden DNA izolasyonu gerçekleştirilmelidir. Sonrasında elde edilen DNA üzerinde çalışılmak istenen bölge PCR adı verilen özel yöntemle çoğaltılarak, baz değişiminin saptanmasını sağlayan restriksiyon enzimleri

ile kesilmekte ve çoğaltılan gen bölgesi değişik uzunluklardaki fragmentlere ayrılmaktadır. Ardından fragment uzunluklarına göre genotipleme yapılarak polimorfizm sonuçları elde edilmektedir (Valdivielso ve Fernandez, 2006).

1.6.1. DNA İzolasyonu

Enzimler ve kimyasallar yardımıyla DNA'nın saf ve temiz bir şekilde elde edilmesi işlemi DNA izolasyonu olarak adlandırılmaktadır. İzolasyon için günümüzde genellikle kitler kullanılsa da Chelex, FTA Kağıt, Fenol-kloroform (organik izolasyon) gibi izolasyon yöntemleri de DNA eldesinde kullanılmaktadır (Wang, 2012; Ghatak, 2013).

1.6.1.1. Fenol-Kloroform-İzoamil Alkol ile DNA İzolasyonu ve İzolasyon Bileşenleri

Fenol- kloroform-izoamil alkol(25:24:1) ile DNA izolasyonu yönteminde örneklerin temizlenmesi amacıyla Tris- EDTA (TE) ile yıkama işlemi yapılır. Sonrasında ise Çizelge 1.5.'te yer alan çözelti ve enzimler kullanılarak izolasyon gerçekleştirilir. Elde edilen DNA'ya DNA's- RNA's free su ilave edilerek analiz zamanına kadar – 20 °C' de muhafazası sağlanır.

Çizelge 1.5. Fenol- kloroform-izoamil alkol ile DNA izolasyonu yönteminde kullanılan bileşenler.

Kullanılan Kimyasal/ Enzim	Görevi
Fenol	Proteinleri denatüre eder ve proteinleri bağlayarak DNA'dan ayrılmasını sağlar.
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) ve Proteinaz K	Hücre duvarında ve kromozom içinde DNA'nın paketli halde bulunmasını sağlayan proteinleri parçalar.
Kloroform	Fenol ve fenole bağlı proteinleri bağlayarak uzaklaştırır.
İzoamil alkol	DNA'nın sulu fazda ayrılmasını sağlar.
Saf Etanol	DNA'nın çökmesini sağlar.
%70' lik alkol	Tuzlar ve Na ⁺ gibi tek değerlikli katyonların çözünerek ortamdaki uzaklaşmasını sağlar.

1.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR)

PCR, DNA üzerinde polimorfizm olan bölgenin belirlenmesi amacı ile hedef bölgeyi içeren DNA kısmının bir tüp içerisinde, in vitro olarak, yaklaşık 35 kez çoğaltılması işlemidir. PCR işlemi ile eser miktardaki DNA kısa sürede çok miktarda ve başarılı bir şekilde çoğaltılabilmektedir. Bu amaçla PCR genetik araştırmalarda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Kubista ve ark., 2006) (Şekil 1.18.).



Şekil 1.18. Çoğaltılmak istenen DNA bölgesinin PCR yöntemiyle çoğaltılmasını gösteren basit şema.

1.6.2.1. PCR'in Aşamaları

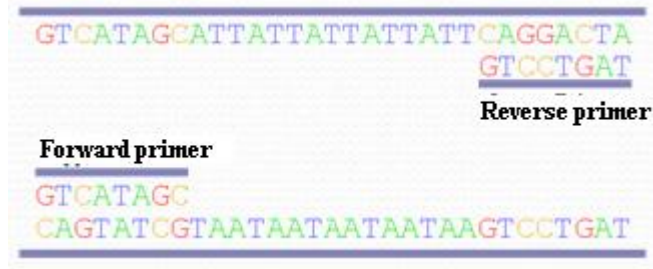
PCR; denatürasyon, primerlerin hedef bölgeye bağlanması ve zincir uzaması olmak üzere 3 ana aşamadan oluşmaktadır.

- 1) **Denatürasyon:** Sarmal halde bulunan çift iplik DNA'nın sıcaklık yardımıyla ipliklerinin birbirinden ayrılarak tek sarmal halini aldığı aşamadır (Şekil 1.19.). Bu aşamada DNA 90- 95 °C'de 5- 15 dakika ısıtılır.



Şekil 1.19. PCR'da denatürasyon aşaması.

- 2) **Primerlerin Hedef Bölgeye Bağlanması (Annealing):** Bu aşamada 17-30 nükleotid uzunluğundaki forward ve reverse primerler, çoğaltılmak istenen gen bölgesinin yanında bulunan spesifik bölgelerden DNA'ya bağlanır (Şekil 1.20.). Bağlanma sıcaklığı ve süresi primerlerin içerdiği pürin ve primidin bazları sayısına göre değişmektedir. Primerlerin Tm değerleri göz önüne alınarak bağlanma basamağı 50-70 °C arasında 30-60 saniyede gerçekleştirilmektedir.



Şekil 1.20. PCR’da primerlerin hedef bölgeye bağlanma aşamasının şematik görünümü.

- 3) **Zincir Uzaması Aşaması (Elongation):** Taq DNA polimeraz, orijinal DNA zincirinin karşısına 5’→3’ yönünde deoksiribonükleozid trifosfatları (dNTP) ekleyerek yeni DNA ipliğini sentezler (Şekil 1.21.). Uzama aşaması sonucunda DNA başarılı bir şekilde klonlanarak kopyası elde edilmiş olur. Bu aşamada sentez 70-75 °C’de ortalama 1-2 dakikada gerçekleşmektedir (Kalyanasundaram ve ark., 2013).



Şekil 1.21. Zincir uzaması aşaması.

1.6.2.2. PCR Bileşenleri

Standart bir PCR işleminde 50 µl’lik PCR reaksiyon tüpünde bulunması gereken bileşenler ve miktarları Çizelge 1.6.’da verildiği şekildedir (Wilson, 1997).

Çizelge 1.6. Standart PCR bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	50 µl'lik Reaksiyon Tüpündeki Konsantrasyon
10X PCR Buffer	1X
MgCl ₂ (25mM stok çözelti)	1-5mM
dNTP mix	Her birinden 0.2 mM
Forward Primer	0.2-0.5 µM
Reverse Primer	0.2-0.5 µM
Taq DNA Polimeraz	1.25-2.5 Unit
Genomik DNA	200 ng

Tampon Çözeltisi: Karışım içerisinde MgCl₂, Tris, KCl, tuzlar ve deterjanlar bulunmaktadır. MgCl₂, Taq polimerazın aktivitesini düzenlemektedir. Mg içeriğinin çok olması Taq polimerazın hızlı çalışmasına neden olmakta ve yeni sentezlenen iplik üzerine yanlış baz takma olasılığını artırmakta iken tam tersi durumda ise Mg konsantrasyonunun az olmasına bağlı olarak Taq polimeraz yavaş bir şekilde bazları takmasına neden olmakta ve bu durum belirli olan süre içerisinde yeni iplikçiğin başarılı bir şekilde sentezlenememesiyle sonuçlanmaktadır. MgCl₂'ün yanı sıra KCl de Taq polimerazın aktivitesine etki etmektedir.

Forward ve Reverse Primerler: Çoğaltılmak istenen DNA bölgesinin hemen önüne bağlanan 17-30 nükleotid uzunluğundaki sentetik oligonükleotidlerdir. Primerlerin Tm sıcaklıklarının bir birine yakın olması amacıyla içerdikleri pürin primidin sayısı bir birine yakın olmalı, primerler kendi içlerinde ve birbirleriyle komplementer özellikte olmamalı aynı zamanda DNA üzerinde çoğaltılmak istenen bölgeye özgü olup başka bir bölgeye bağlanmamalıdır. Tüm bu özellikleri taşıyan primerler seçilerek PCR işlemi gerçekleştirilmiştir (Pusterla ve ark., 2006).

dNTP'ler: Karışım içerisindeki A,G,C,T konsantrasyonu eşit olmalıdır.

Kalıp DNA Örneği: DNA analizi sonucunda elde edilen ve araştırılmak istenen DNA numunesi.

Taq DNA Polimeraz: Isıya dayanıklı olması nedeniyle *Thermus Aquaticus* adlı bakteriden elde edilen Taq DNA Polimeraz 72 °C'de maksimum aktivite göstermekte olup, saniyede yaklaşık olarak 100 dNTP'yi tanıyarak yeni dizinin sentezlenmesini sağlamaktadır.

1.6.3. Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve Bileşenleri

Restriksiyon enzimleri 4-6 baz uzunluğunda DNA üzerindeki spesifik bölgeleri tanıyan, bu bölgelere yakın veya bu bölgelerden kesim yaparak fragment oluşmasını sağlayan enzimlerdir (Murray, 2000; Pearson, 1984). RFLP yönteminde çalışılacak olan DNA, araştırmanın yapılacağı gen bölgesindeki polimorfizmin belirlenmesine olanak sağlayacak olan restriksiyon enzimi ve enzim tampon çözeltisi yöntemin temel bileşenlerini oluşturmaktadır. Enzimin kesim yapabileceği sıcaklıkta gerekli süre beklendikten sonra RFLP sonucunda farklı uzunlukta oligonükleotidler oluşur. Elde edilen oligonükleotidler jel elektroforezinde uzunluklarına göre ayırt edilir. Jelde elde edilen görüntü yardımıyla polimorfizmler, insersiyon, delesyon ve nokta mutasyonlarının tespiti mümkün olabilmektedir (Dowling, 1996).

Bu çalışmada;

Kurşun ve demir her ikisi de iki değerlikli katyonlardır ve biyokimyasal süreçlerde birbirlerinin yerini alabilmekte veya yarışmalı olarak davranabilmektedirler. Bu sebepten, kurşunun demir bağımlı çalışan biyolojik sistemlerin fonksiyonlarını etkilediği düşünülmektedir.

Tez çalışmasında amacımız, mesleksel kurşun maruziyeti olan ve kan kurşun ve idrar kurşun düzeyleri ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer: İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometresi) kullanılarak ölçülen ve yüksek kan kurşun düzeyi tespit edilen işçilerde demir metabolizmasında önemli rolü olan HFE gen bölgesinde ekzon2’de transversiyona bağlı oluşan H63D polimorfizm oranını belirleyerek bu polimorfizmin bireylerin kan ve idrar kurşun düzeylerine etkisini ve metal düzeyleri arasındaki korelasyonu araştırmaktır. Söz konusu çalışma Türkiye’de kurşuna maruz kalan işçilerde, HFE gen bölgesinde yer alan H63D polimorfizminin kan kurşun, idrar kurşun ve serum Fe düzeylerine etkisini araştıran ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Pb Standart Çözeltisi	High purity standards
Nitrik asit	Merck
Ultrasaf nitrik asit	Merck
Ultrasaf Hidroklorik asit	Merck
ICP-MS iç standart karışımı	Agilent
Tuning solüsyonu	Agilent
Sertifikalı referans materyal (CRM)	Seronorm
Restriksiyon FokI	New England Biolabs (NEB)
NEBuffer 4	New England Biolabs (NEB)
Primerler (HFE-Forward, HFE-Reverse)	Alpha DNA, Montreal
Etanol	Merck
Agaroz	Merck
Trizma Base	Merck
Borik asit	Merck
EDTA	Merck

DTT	Sigma
Etidyum Bromür	Applichem
6X yükleme çözeltisi	Qiagen
Saf etanol	Scharlau,Dop
DNA's RNA's içermeyen su	Qiagen
Hot Start Taq DNA polimeraz	Qiagen
Fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1)	Applichem
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Applichem
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck
Proteinaz K	Merck
100 bp ladder	Fermantase
Triton X	Scharlau
dNTP karışımı	Fermantase

2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

ICP-MS	Agilent 7700 series
Chiller	Agilent
Pompa	Edwards E2M18 Foreline Pump
Otosampler	Agilent ASX-500 Series
Otomatik mikropipetler	Scorex Ependorf,Thermo,Tipor-V

Mikrodalga fırın	Cem Mars 6
Thermal Cycle PCR cihazı	Techne Tc 512
Jel Görüntüleme cihazı	Syngene
Yatay elektroforez cihazı	Scie-Plas
Güç Kaynağı	Bio-Rad
Su banyosu	Nüve Bm 402
Otoklav	Nüve
Soğutmalı santrifüj cihazı	Hettich
Mikrodalga fırın	Arçelik
Dispenser	Scorex
Ultrasaf su üretme cihazı	Millipore
Çalkalayıcı	Biosan
Falkon tüp	Lp Italiana Spa
EDTA'lı eser element tüpü	BD
Laminar Flow kabin	Esco
Elektrikli hassas terazi	Schimadzu Libror
Vortex Karıştırıcı	Biosan
pH metre	Mettler Toledo
Laptop Cooler (-20°C)	Sigma
Ependorf steril tüpler	Axygen Genuine (0,2 ve 1,5ml'lik)

Pirojen free filtreli pipet uçları	Finntip(10l,100l,1000l)
Polipropilen, Kapaklı Tüpler (50 ml' lik)	
Cam Malzemeler (Erlen, ölçek vs.)	
Argon Tüp	Linde
Helyum Gazı	Linde
Biyokimya otoanalizörü	Abbott Aeroset (Abbott-USA)

2.2. Yöntem

Tez çalışması iki aşamadan oluşmaktadır:

- Birinci aşamada mesleksi kurşun maruziyeti olan bireylerdeki kan kurşun ve idrar kurşun düzeyleri ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer: İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometresi) kullanılarak ölçüldü. Ayrıca kurşuna maruz bireylerin serum demir düzeyleri biyokimya otoanalizöründe ölçülerek belirlendi.
- İkinci aşamada ise bireylerin tam kan örneklerinde HFE gen polimorfizmi belirlendi.

2.2.1. Çalışma Grubunun Seçilmesi

Tez çalışmasına, Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesine belli dönemlerde rutin muayene amaçlı gelen ve mesleksi kurşun maruziyeti bulunan 21-60 yaş aralığında 128 erkek işçi dahil edilmiştir. Hastaların kan kurşun düzeyleri ile idrar kurşun düzeyleri ölçülmüş ve kan kurşun düzeyi 30 µg/dL'nin üstünde olan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çalışma, Ankara Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'nun 09.09.2015 tarih, 905 Karar Nolu ve B.10.4İSM.4.06.68.49 sayılı etik kurul izni ile yapılmıştır. Etik kurul izninde

Helsinki Bildirgesine uyulmuştur. Hastalardan bilgi onam formu alınmıştır. Hastalardan yaşı, iş yerinde çalışma süreleri, sigara kullanıp kullanmadıkları, sigara kullanıyorlar ise ne kadar sigara kullandıkları bilgisi alınmıştır.

2.2.2. Örneklerin Toplanması

Kurşun analizi yapmak ve genetik analizlerde kullanılmak üzere, hastalardan intravenöz tam kan örneği, antikoagulan (K₂EDTA) içeren mor kapaklı vakumlu tüplere alınmıştır. Kan örneğinden 100 µL lik kısım yedeklemek amacı ile steril kağıtlara emdirilerek kurutulmuştur. Spot idrarda kurşun analizleri için idrar örnekleri temiz polipropilen idrar kablarına konulmuştur. Analizlere alınmaya kadar kan örnekleri +4 °C'de, idrar örnekleri ise -20 °C'de soğuk zincirde muhafaza edilmiştir.

2.2.3. Kan ve İdrar Örneklerinde Kurşun Analizi

2.2.3.1. Kan Örnekleri ve İdrar Örneklerinin Kurşun Analizleri İçin Hazırlanması

Kan örneklerinde kurşun analizi işlemleri için öncelikle mikrodalga fırında yakma yapıldı. Bu amaçla, tam kan içeren tüpler karıştırıcıda karıştırıldı ve 1 mL tam kan alınarak teflon kapların içerisine konuldu. Üzerine 5 mL %65'lik nitrik asit eklendi. En son olarak 5 mL ultra saf su ilave edilerek son hacim 11 mL'ye tamamlandı. Teflon kapların ağzı sıkıca kapatılarak mikrodalga fırındaki rotorlara yerleştirildi. Rotorlara yerleştirme işlemlerinde kapların dengede olmasına dikkat edildi. Mikrodalga fırında 800 W ve 220 °C'de 20 dakika yakma işlemi gerçekleştirildi. Yakma işlemi, Cem marka mikrodalga fırında gerçekleştirildi. Yakma işleminden sonra örneklerin soğuması beklendi. Çeker ocak altında dikkatli bir şekilde tüplerin kapakları açıldı ve örneklerin üzerine 10 mL ultra saf su eklenerek son hacim 21 mL'ye tamamlandı. Örneklerin tamamı daha sonra temiz falkon tüplere alındı.

İdrar örneklerinin analizinde ise, 50 mL suprapur nitrik asit ve 20 mL suprapur hidroklorik asit karıştırıldı ve ultra saf su kullanılarak bu karışım 1000 mL'ye tamamlandı. Bu asitli su karışımından 1,9 mL alınarak üzerine 0,1 mL idrar örneği eklendi.

2.2.3.2. Kan ve İdrar Örneklerinde Kurşun Düzeyinin Belirlenmesi

Tam kan ve idrar örneklerinde kurşun analizi ICP-MS Agilent 7700x (Tokyo, Japonya) cihazında gerçekleştirildi. Analizlere başlamadan önce cihazın kontrolü, kobalt, sezyum, talyum itriyum ve lityum içeren tuning solüsyonu kullanılarak bu metallerin kütleleri üzerinden yapıldı. Stok kurşun çözeltisinden (100 ppm'lik), 100 ppb' lik bir stok çözeltisi hazırlandı ve bu çözelti sırası ile 100 ppb, 50 ppb, 10 ppb, 5 ppb, 1 ppb, 0.5 ppb ve 0.1 ppb olarak dilüe edildi ve 7 noktalı kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil 2.1.). Ayrıca çalışma boyunca, çalışmayı kontrol etmek amacıyla bizmut, rodyum germanyum, indiyum, skandiyum, terbiyum ve litesyum gibi metallere oluşan internal standartlar, hem standartlar hem de örneklerle birlikte analiz edildi. Bu şekildeki analizlerin kütle kararlılığı takip edildi (Şekil 2.2.). Analizlerin doğruluğu, tam kanda Seronorm 210305 ve 210205 nolu sertifikalı referans numuneler, idrarda ise Seronorm 208605 ve 208505 nolu sertifikalı referans numuneler kullanılarak kontrol edildi. İşlemler; analiz yıkama, standartlar, yıkama, sertifikalı referans materyal, 10 numune, yıkama olacak şekilde ayarlandı ve analizler boyunca her 10 numunede bir yıkama işlemine devam edildi. Tüm okumalar 3 kez yapılarak ortalamaları alındı. Argon gazı, taşıyıcı ve plazma oluşturuucu gaz olarak, helyum gazı ise interferans giderici gaz olarak kullanıldı.

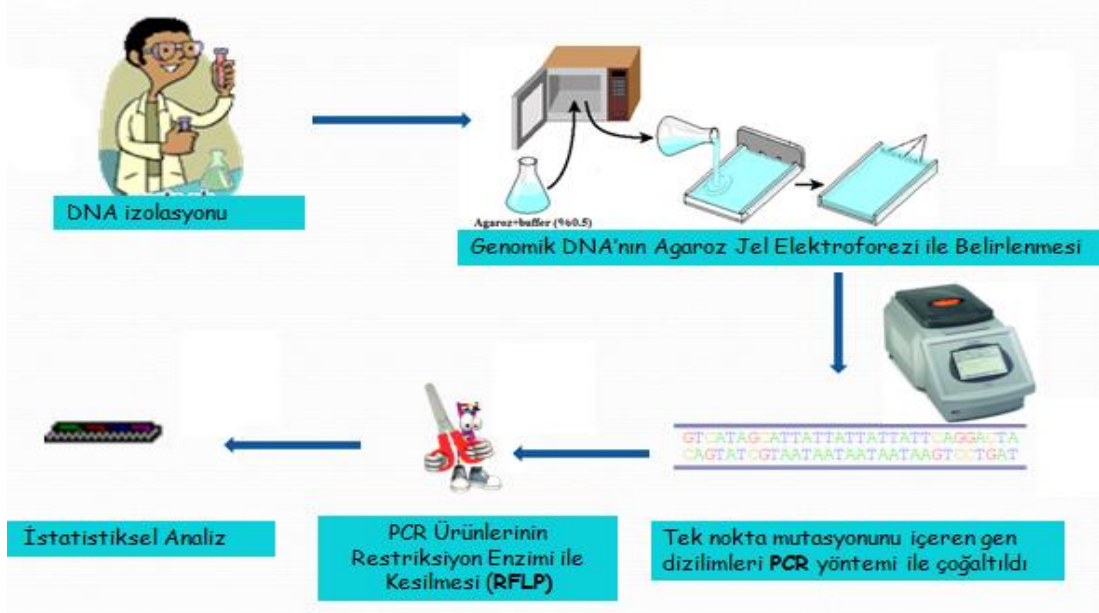
2.2.3.3. Serumda Demir Düzeyinin Belirlenmesi

Serumda demir analizi için ayrılan serumlar aynı gün içinde labortuvara ulaştırılarak Cobas (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) biyokimya otoanalizöründe ticari kit kullanılarak ferrozin ile demirin renkli bileşik meydana getirme esasına dayanarak çalışıldı.

2.2.4. HFE Geni H63D Tek Nükleotid Polimorfizminin Belirlenmesi

HFE geni H63D C→G tek nükleotid polimorfizmini belirlemek amacı ile aşağıda belirtilen basamaklar izlenmiştir (Şekil 2.3.).

- Sıvı kandan DNA İzolasyonu
- Genomik DNA Varlığının %0,5'lik Agaroz Jel Elektrofrezisi ile Belirlenmesi)
- H63D C→G tek nükleotid polimorfizmini içeren kısmın polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması
- PCR'ın Varlığının %1'lik agaroz jel ile belirlenmesi
- PCR ürünlerinin restriksiyon enzimi ile kesilmesi (RFLP)
- RFLP ürünlerin %2,5'luk agaroz jelde yürütülmesi
- Genotiplendirme



Şekil 2.3. HFE geni H63D tek nükleotid polimorfizmini belirleme basamakları.

2.2.4.1. Tam Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Tam kanda DNA'yı açığa çıkarabilmek için organik izolasyon (fenol-kloroform-izoamilalkol ekstraksiyon) yöntemi kullanıldı (Şekil 2.4.).

1. 100 µl tam kan örneği üzerine 1000 µL TE tampon konularak 1 dakika 12000 rpm'de santrifüj edildi. 1000 µl üst faz atılarak kalan kısım üzerine tekrar 100 µl TE tampon konuldu ve tekrar santrifüj yapıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.

2. 100 µL pelet üzerine;

45 µL NaCl (1 M)

40 µL SDS (%20'lik)

400 µL TE ve

10 µl proteinaz K eklendi ve karıştırmak amacı ile kısa bir vorteks yapıldı.

3. Tüm karışım 1.5-2 saat 56 °C'lik su banyosunda inkübe edildi,

4. Karışımın üzerine Fenol-kloroform-izoamil alkolden 500 µL ilave edildi ve görünüm ayran rengini alıncaya kadar kısa süre vorteks yapıldı.

5. 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.

6. Santrifüj sonrasında alt faz fazla hareket ettirilmeden üst faz yavaş bir şekilde pipet yardımı ile temiz bir ependorf tüpüne aktarıldı, alt faz atıldı.

7. Soğuk saf etil alkolden 1000 µL eklendi.

8. 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

9. Eppendorf tüpün alt kısmında bulunan pelete zarar vermeden etil alkol uzaklaştırıldı.

10. Oda sıcaklığındaki %70'lik etil alkolden 500 µl eklendi.

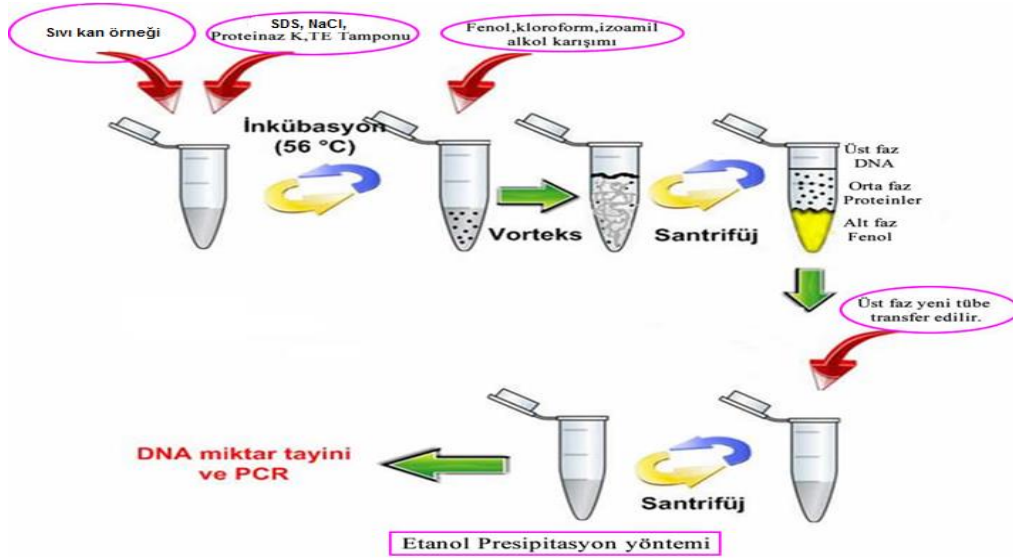
11. 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

12. Eppendorf tüp içerisinde bulunan alkol dikkatlice uzaklaştırıldı.

13. Tüpün dibinde kalan alkolün tamamen uçması için tüp kapağı açık bırakıldı. Bu aşama sıcak havalarda laminar flow altında oda koşullarında da yapılabilir. Ya da soğuk havalarda 37 °C'ye ayarlanmış etüvde de bırakılabilir.

14. Alkol tamamen uzaklaştıktan sonra 100 µL DNase- RNase free su ilave edildi.

Analiz yapıluncaya kadar DNA örnekleri -20 °C'de saklandı. Analizlerin tamamlanmasından sonra ise -86 °C'de muhafaza edildi.



Şekil 2.4. Fenol-kloroform-izoamilalkol ekstraksiyonu.

DNA izolasyonu yapılırken aşağıda belirtilen hususlara dikkat edildi.

- Proteinaz K -20 °C' de saklandı.
- %10'luk SDS oda koşullarında muhafaza edildi.
- Fenol-kloroform, TE ve NaCl +4°C'de muhafaza edildi.
- Ependorf tüpleri santrifüje konulurken oryantasyonları belirlenerek yerleştirildi (Pelet her zaman görünmeyebilir fakat bu şekilde peletin yeri tahmin edilir).
- DNA izolasyonu tamamen farklı bir odada yapıldı.
- Her izolasyon öncesi ve sonrasında çalışma ortamı ve kullanılan otomatik pipetler temizlendi.

2.2.4.2. Agaroz Jel Elektrofrez ile DNA Varlığının Belirlenmesi

%0,5'lik agaroz jel hazırlanarak elektroforez yöntemi ile DNA izolasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildi.

2.2.4.2.1. %0,5'lik Agaroz Jel Hazırlanması

1. 0,6 gr agaroz tartılarak 120 mL 1X TBE çözeltisi içinde çözüldü.
2. Erlenin üzeri alüminyum folyo ile kaplanıp çok sayıda delik açıldıktan sonra mikrodalga fırında kaynatıldı.
3. Çözelti sıcaklığı 50-60 °C oluncaya kadar oda sıcaklığında tutuldu.
4. Çözeltinin üzerine 10 mg/mL'lik 10 µL EtBr eklendi ve hafifçe çözelti pembeleşip homojen karışım sağlanıncaya kadar erlen çalkalandı (EtBr karsinojen olduğundan bu aşamada daha korunaklı eldivenler kullanılmalı ve EtBr için kullanılan pipet ayrı olmalı ve sadece EtBr çekiminde kullanılmalıdır).

5. Kalıbın bariyerleri takıldı ve jelin tarakları uygun mesafe bırakarak yerleştirildikten sonra agar kalıba döküldü. Jel üzerinde oluşan hava kabarcıkları jel katılaşmaya başlamadan önce pipet ucu yardımı ile patlatıldı (Patlatılmayan kabarcıklar elektrik akımını etkileyecek ve yürümenin düzgün olmamasına neden olacaktır).

6. Jelin katılaşması için oda sıcaklığında 30–45 dakika bekletildi.

7. Kalıptaki bariyerler ve taraklar çıkarılarak kalıp elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan jel kuyucuklarının, tankın katot (-) tarafına yerleştirilmesine dikkat edildi (DNA – yüklü olduğundan doğru kısma yerleştirmek oldukça önemlidir).

8. Jelin üzerini 0,5 cm kaplayacak şekilde 1X TBE çözeltisi tank içerisine eklendi.

2.2.4.2.2. Örnek Hazırlanması ve Agaroze Jele Yüklenmesi

Kan örneklerinden DNA izolasyonunun başarılı şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini belirleyebilmek amacıyla agaroz jelde yürütme işlemi gerçekleştirildi (Şekil 2.5.). Bu amaçla:

1. 15 cm uzunluğunda kesilmiş parafilm buz kalıbı üzerine yerleştirildi.

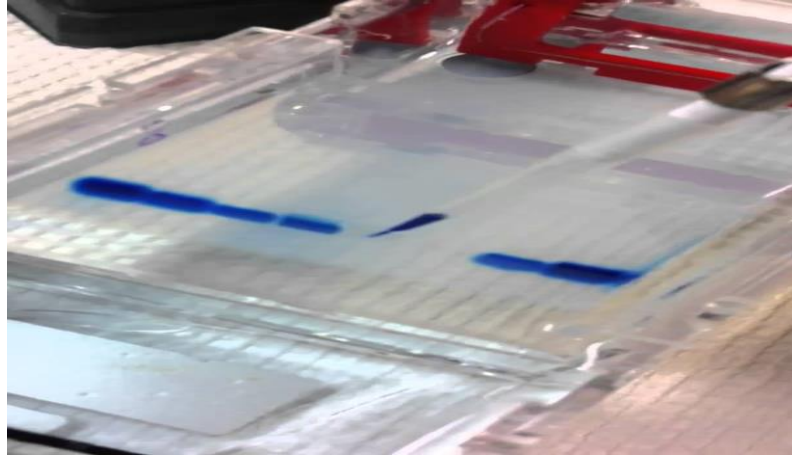
2. Parafilm üzerine 1 µL 6X Jel Yükleme Bufferı ve 5 µL DNA konularak iyice karışması için mikropipet yardımıyla homojenize edildi.

3. DNA ve yükleme bufferın tamamı alınarak jel kuyucuklarına yerleştirildi. Bu işlem esnasında jeli delmemeye dikkat edildi.

4. Tankın kapağı kapatılarak anot ve katot uçlarının bağlantıları takıldı.

5. Güç kaynağı 100 volt ve 70 ampere ayarlanarak örneklerin 45 dakika jel üzerinde yürütülmesi sağlandı.

6. Sonuçlar Jel görüntüleme sistemi (Syngene) ile UV işığı altında değerlendirildi.



şekil 2.5. DNA rneklerinin agaroz jele yüklenmesi.

2.2.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR: Polymerase Chain Reaction)

Polimeraz Zincir Reaksiyonunda “n” sayıda döngü uygulanarak hedef bölgenin 2^n kadar çoğaltılması sağlanmış olur. PCR işleminde, önceden döngü sayısı ve uygulanacak olan sıcaklık programları ayarlanır ve bu ayarlar ısı döngü aygıtı verilen thermocycler cihazları ile gerçekleştirilir (Klug, 2003).

-20 C’de tutulan izole DNA rnekleri oda koşulunda bırakılarak kendi halinde buzunun çözünmesi sağlandı. PCR işlemi, TECHNE TC 512 Thermal Cycle cihazında gerçekleştirildi (şekil 2.6.) ve hedeflenen DNA bölgesi 35 döngüyle 2^{35} kez ağaltıldı. Her PCR analizi setinde pozitif ve negatif örnekler kontrol amacı ile kullanıldı.



Şekil 2.6. TECHNE-TC 512 Thermal Cycle.

PCR yaparken kontaminasyonu önlemek için dikkat edilmesi gereken hususlar:

- Örnek alma, DNA izolasyonu ve PCR farklı odalarda gerçekleştirildi.
- Otoklavlanabilen tüm malzemeler otoklavlanarak steril edildi.
- Otomatik pipetler ile çalışmanın yapıldığı ortamlar, her analiz öncesi ve sonrasında %70'lik etil alkol kullanılarak temizlendi.
- Analizlerin her aşamasında steril tüpler ve filtreli pipet uçları kullanıldı.
- DNA izolasyonu ve PCR hava sirkülasyonu olan laminar kabinler kullanılarak yapıldı.
- Laminar kabin ortamı steril olması için analiz öncesinde ve analiz sonrasında 45 dakika boyunca UV ışık kaynağı açılarak çalıştırıldı.
- Analizlerin tüm aşamasında kullanılan eldivenler sık sık değiştirildi.

2.2.4.3.1. PCR Aşamasında Kullanılan Primerler

HFE geni 6. kromozomun kısa kolunda yer alır. HFE geni H63D tek nükleotid polimorfizmindeki C→G baz transversiyonunu belirlemek için bu bölgeye spesifik Forward (F) ve Reverse (R) primerleri kullanıldı ve 294 bp'lik oligonükleotid

çoğaltıldı. Yüksek performanslı tuz bulundurmayan (HPSF: High Performance Salt Free) primerler, Alpha DNA firmasına sentezlettirildi.

Bir amplifikasyon işleminde primer seçimi oldukça dikkat edilmesi gereken ana unsurlardan bir tanesidir.

Bu çalışmada primer seçiminde aşağıdaki özelliklere dikkat edildi:

- Primerlerin baz uzunluklarının uygun olmasına (18-25 bp uzunluğunda),
- Primerlerin sadece amplifikasyonu yapılacak bölgeye komplementer olmasına,
- PCR yapılacak hedef bölgenin agaroz jelde rahat görülebileceği uzunlukta olmasına,
- Primerlerin bağlanma sıcaklıklarının benzer olması için, içerdikleri pürin ve pirimidin bazlarının birbirine yakın sayıda olmasına,
- Forward ve reverse Primerlerinin birbirlerinin komplementeri olmamasına,
- Primerler kendi içerisinde komplementer olmamasına,
- Primerlerde arka arkaya kısa tekrarlar bulunmamasına.

Primer sekansları:

Forward primer (F primer): F: 5'- ACATGGTTAAGGCCTGTTGC -3'

Reverse primer (R primer): R: 5'- CTTGCTGTGGTTGTGATTTTC- 3' (Elmrghni ve ark., 2011).

PCR'da kullanılan primerlerin sekansları ve özellikleri Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Amplifikasyonda kullanılan primerler ve özellikleri.

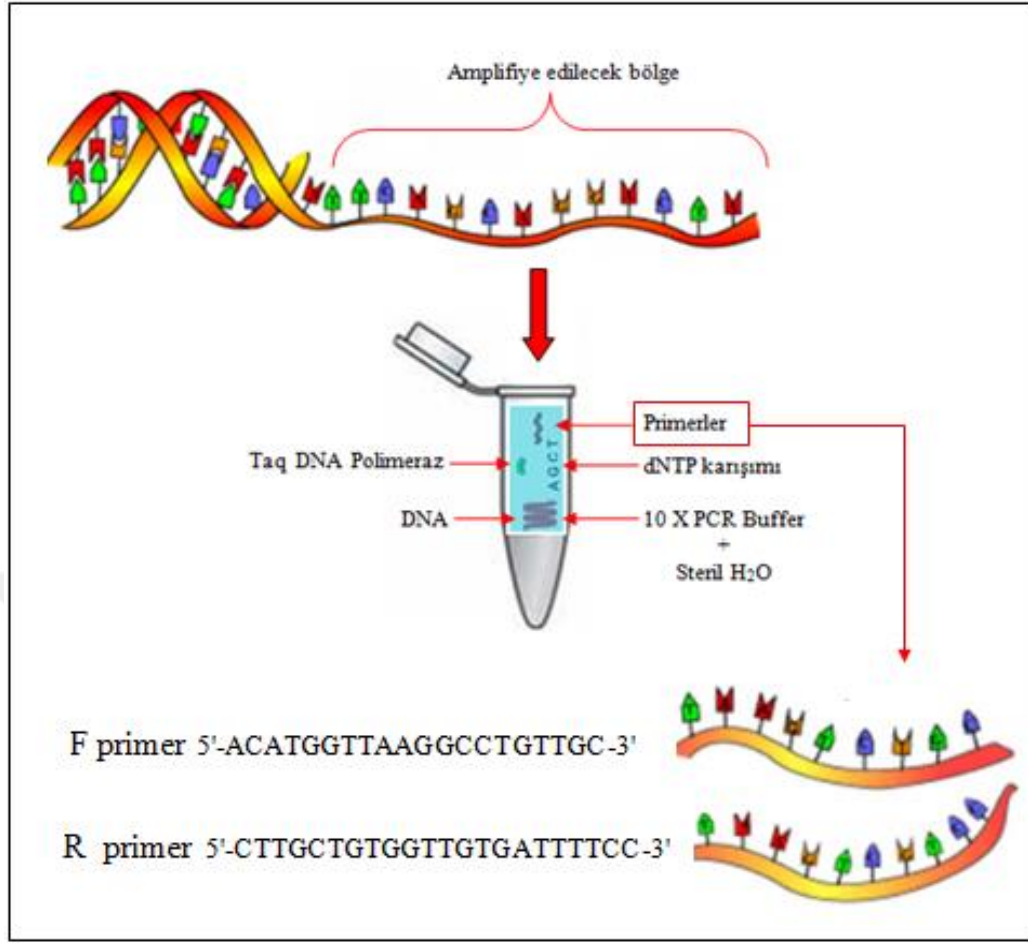
PRİMERİN ÖZELLİKLERİ	F PRİMER	R PRİMER
Sekansı	5'-ACATGGTTAAGGCCTGTTGC- 3'	5'-CTTGCTGTGGTTGTGATTTTCC- 3'
Kromozomdaki yeri	26090810 - 26090829	260911082 - 26091103
Uzunluğu	20 bp	22 bp
GC içeriği	%50,00	%45,45
Tm sıcaklığı (Erime Sıcaklığı)	60,0 °C	61,8 °C
Primerler arası Tm farkı	1,8 °C	
PCR ürününün uzunluğu	294 bp	
26090810-26091103 bazlar arasındaki oluşan PCR ürünü	<p>ACATGGTTAAGGCCTGTTGCCTCTGTCTCCAGGTTACACTCTCTGCACTA</p> <p>CCTCTTCATGGGTGCCTCAGAGCAGGACCTTGGTCTTTCTTGTTTGAAG</p> <p>CTTTGGGCTACGTGGATGACCAGCTGTTCGTGTTCTATGATCATGAGAGT</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">SNP (C→G transversiyonu)</p> <p>CGCCGTGTGGAGCCCCGAACCTCCATGGGTTTCCAGTAGAATTTCAAGCCA</p> <p>GATGTGGCTGCAGCTGAGTCAGAGTCTGAAAGGGTGGGATCACATGTTCA</p> <p>CTGTTGACTTCTGGACTATTATGGAAAATCACAACCACAGCAAG</p>	

2.2.4.3.2. HFE geninin H63D Polimorfizminin Belirlenmesi Amacıyla Yapılan PCR Bileşenleri ve Şartları

HFE genindeki H63D tek nükleotid polimorfizmini belirlemek amacı ile PCR işlemi yapıldı. Standart bir PCR bileşeninde, PCR Buffer, F Primer, R Primer, Hot Star Taq DNA Polimeraz, dNTP karışımı ve kalıp DNA bulunmaktadır (Şekil 2.7.). PCR'da bulunan bileşenler, bileşenlerin konsantrasyonları, toplam reaksiyondaki miktarları ve reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonları ile ilgili bilgiler Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. PCR'daki bileşenler, stoktaki ve reaksiyondaki konsantrasyonları.

BİLEŞENLER	Stoktaki Konsantrasyon	Reaksiyona Konulan Miktar	Reaksiyon Karışımındaki Final Konsantrasyon (50 µl'lik)
10 X PCR Buffer	10X	5 µl	1X
MgCl₂	25 mM	3 µL	1.5 mM
dNTP karışımı	2mM	5 µL	200 µM
F Primer	10 pmol/ µl	1 µL	10 pmol
R Primer	10 pmol/ µl	1 µL	10 pmol
Hot Star Taq DNA Polimeraz	5 U/ µl	0.25 µL	1.25 U
Kalıp DNA		5 µL	~200 ng
Steril H₂O		50 µl'ye tamamlayıncaya kadar	



Şekil 2.7. PCR bileşenleri.

2.2.4.3.3. HFE geninin H63D Polimorfizminin Belirlenmesinde Kullanılan PCR Yöntemi ve PCR Programı

HFE geninde 181 tek nükleotid polimorfizmi bulunmaktadır. Bu polimorfizmlerden bir tanesi de H63D C→G tek nükleotid transversiyon polimorfizmidir (rs1799945). Polimorfizmde baz değişimi kromozom üzerindeki 26090952. pozisyonda olmaktadır.

HFE geninde 348 aminoasit bulunmaktadır. Bu polimorfizmde HFE geninde 26090952. pozisyondaki C bazının G bazına dönüşümü sonucunda, 63. sıradaki aminoasit, histidinden (CAT) aspartik aside (GAT) dönüşmektedir.

H63D tek nükleotid polimorfizminin genel özellikleri Çizelge 2.3.'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. HFE geni H63D tek nükleotid polimorfizminin genel özellikleri.

HFE H63D Polimorfizmi	
HFE Geni Kimlik Numarası (Gen ID)	3077
Kromozomdaki yeri	6.kromozom, 6p21.3
Gen Giriş Numarası (Accession Numarası)	NP_001287678
Gende Aminoasid Sayısı	348
rs numarası	rs1799945
Gendeki Baz Numarası	26090952. pozisyonunda
Nükleotid değişimi	C→G
Aminoasit değişimi	CAT→GAT Histidin (H) → Aspartik Asid (D)
Primer sekansları (5'-3')	F: 5'-GATGCCAGCTGGCCCTGGCACTG-3' R: 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3'
Restriksiyon enzimi	MboI (Moraxella bovis)

HFE geninin H63D Polimorfizminin belirlenmesinde, denatürasyon (denaturation), bağlanma (annealing) ve uzama (elongation) basamaklarının yer aldığı klasik PCR yöntemi uygulanmıştır. Forward ve Reverse primerleri kullanılarak oluşturulan 294 bp'lik PCR ürünü için aşağıdaki program gerçekleştirilmiştir.

PCR programı aşağıda belirtilen şekilde 35 döngüde gerçekleştirildi.

- 94° C’de 10 dakika (başlangıç denatürasyonu)
 - 94° C’de 60 saniye (denatürasyon)
 - 60° C’de 60 saniye (bağlanma)
 - 72° C’de 60 saniye (uzama,sentez)
- } 35 döngü
- 72° C’de 5 dakika
 - 4° C’ de ∞ dakika

PCR Thermal Cycle cihazında amplifikasyonu tamamlanan PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütülünceye kadar -20° C’de bekletildi.

2.2.4.3.4. PCR’ın Kontrolü için %1’lik Agaroz Jel Hazırlanması

PCR’ın başarılı olup olmadığının belirlenebilmesi ve bir sonraki aşamaya geçebilmesi için tüm PCR ürünleri %1’lik agaroz jelde yürütüldü. Bu amaçla:

1. 1,2 gr agaroz tartılarak 120 ml 1X TBE çözeltisi içerisinde çözüldü.
2. Erlenin üzeri alüminyum folyo ile kaplanıp çok sayıda delik açıldıktan sonra mikrodalga fırında kaynatıldı.
3. Çözelti sıcaklığı 50-60 °C oluncaya kadar oda sıcaklığında tutuldu.
4. Çözeltinin üzerine 10 mg/mL’lik 10 µL EtBr eklendi ve hafifçe çözelti pembeleşip homojen karışım sağlanıncaya kadar erlen çalkalandı (EtBr karsinogen

olduğundan bu aşamada daha korunaklı eldivenler kullanılmalı ve EtBr için kullanılan pipet ayrı olmalı ve sadece EtBr çekiminde kullanılmalıdır).

5. Kalıbın bariyerleri takıldı ve jelin tarakları uygun mesafe bırakarak yerleştirildikten sonra agar kalıba döküldü. Jel üzerinde oluşan hava kabarcıkları jel katılaşmaya başlamadan önce pipet ucu yardımı ile patlatıldı (Patlatılmayan kabarcıklar elektrik akımını etkileyecek ve yürümenin düzgün olmamasına neden olacaktır).

6. Jelin katılaşması için oda sıcaklığında 30–45 dakika bekletildi.

7. Kalıptaki bariyerler ve taraklar çıkarılarak kalıp elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan jel kuyucuklarının, tankın katot (-) tarafına yerleştirilmesine dikkat edildi (DNA – yüklü olduğundan doğru kısma yerleştirmek oldukça önemlidir).

8. Jelin üzerini 0,5 cm kaplayacak şekilde 1X TBE çözeltisi tank içerisine eklendi.

9. 15 cm uzunluğunda kesilmiş parafilm buz kalıbı üzerine yerleştirildi.

10. Parafilm üzerine 1 µL 6XJel Yükleme Bufferı ve 5 µl DNA konularak iyice karışması için mikropipet yardımıyla homojenize edildi.

11. DNA ve yükleme bufferın tamamı alınarak jel kuyucuklarına yerleştirildi. Bu işlem esnasında jeli delmemeye dikkat edildi.

12. Tankın kapağı kapatılarak anot ve katot uçlarının bağlantıları takıldı.

13. Güç kaynağı 100 volt ve 70 ampere ayarlanarak örneklerin 45 dakika jel üzerinde yürütülmesi sağlandı.

14. Sonuçlar Jel görüntüleme sistemi (Syngene) ile UV ışığı altında değerlendirildi.

2.2.4.4. PCR ürünlerinin Restriksiyon Enzimi (RE) ile Kesimi

Çalışmada mesleksi olarak kurşun maruziyeti olan bireylerde HFE genindeki H63D C→G tek nükleotid polimorfizmini belirlemek amacıyla, 294 bp'lik PCR ürünü, SNP'nin olduğu bölgeyi tanıyan MboI (New England Biolabs) Restriksiyon enzimi (RE) kullanılarak restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemi ile yapıldı. Bu aşamada da RFLP işleminin kontrolü amacı ile negatif ve pozitif örnekler kullanıldı.

RFLP yönteminde, son hacim 30 µL olacak biçimde reaksiyon karışımı hazırlandı. Tüm işlemler buz kalıbı üzerinde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımına, 10 µL PCR ürünü, 1 µL MboI, 2 µL MboI NEB4 tamponu, 0,2 µL Bovine Serum Albumin (BSA) eklendi ve son hacim 30 µL oluncaya kadar dH₂O ile tamamlandı. Hazırlanan reaksiyon karışımı 1 gece boyunca etüvde 37 °C'de inkübasyona konuldu. RFLP yönteminde kullanılan bileşenler ve miktarları Çizelge 2.4'de verilmiştir.

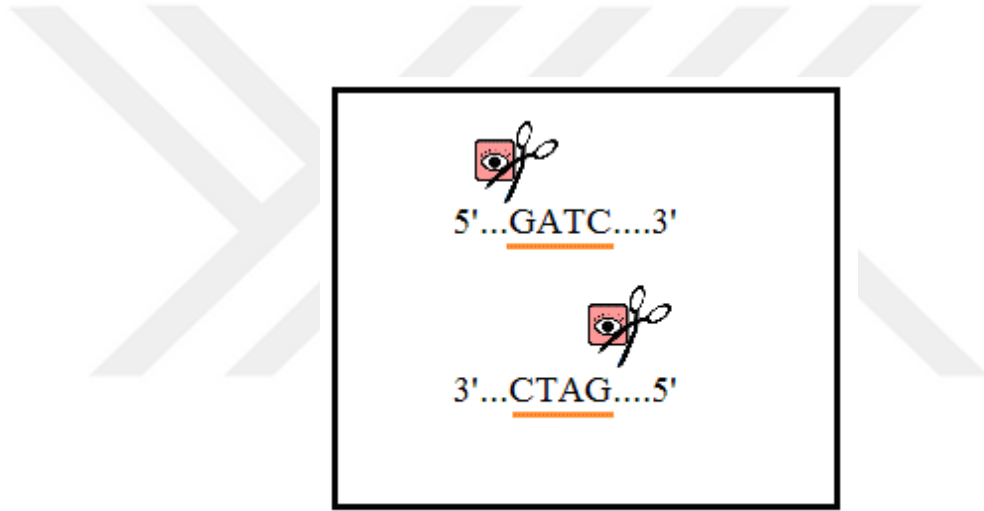
Çizelge 2.4. MboI Restriksiyon enzimi kesimindeki bileşen konsantrasyonları ve reaksiyon şartları.

Bileşenler	Miktarlar	Çalışma Sıcaklığı	Süre
MboI NEB4 tamponu	2 µl		
Bovine Serum Albumin (BSA)	0,2 µl	37 °C	1 gece
PCR ürünü	10 µl		inkübasyon
MboI Enzim	1 µl		
dH ₂ O	30 µl'ye tamamlayıncaya kadar		
Son hacim	30 µl		

RFLP yöntemi ile kesim işleminden sonra elde edilen ürünler analizlere alınmaya kadar -20 °C’de bekletilmiştir.

2.2.4.4.1 MboI Restriksiyon Enziminin Özellikleri

MboI restriksiyon enzimi (New England Biolabs), Moraxella bovis isimli bakteriden elde edilmiştir ve ismini bakterinin ilk harflerinden almıştır. Restriksiyon enzimi DNA dizilimini, 5’ ucundan **GATC** hedef bölgesini tanıyarak, 3’ ucundan ise **CTAG** hedef bölgesini tanıyarak kesmektedir (Şekil 2.8.).



Şekil 2.8. MboI restriksiyon enziminin tanıma bölgesi ve kesim noktasının gösterimi.

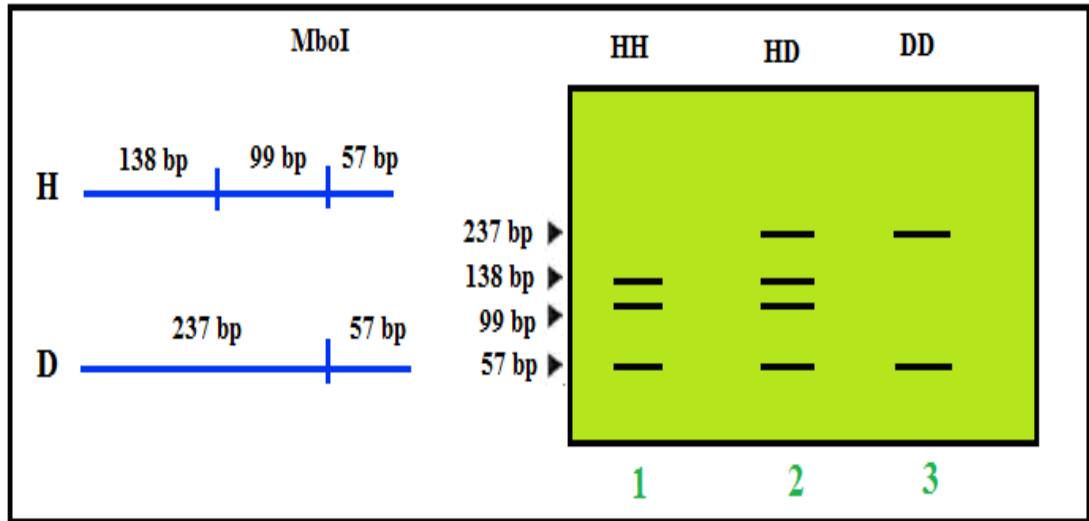
2.2.4.4.2. MboI Enzimi ile İnkübasyon Sonrası Genotiplendirme Yapmak Amacı ile %2,5’luk Agaroz Jel Hazırlanması

PCR ürünleri MboI Restriksiyon enzimi kullanılarak 37 °C’de bir gece inkübe edildikten sonra, genotiplendirmeyi yapabilmek amacıyla %2,5’luk agaroz jel hazırlanmıştır. Agaroz jel hazırlanmasında, bölüm 2.2.4.3.4’de basamakları anlatılan işlemler yapılmıştır. Ancak restriksiyon enzimi kesimi ile mevcut PCR ürünü daha küçük oligonükleotid parçalarına ayrılacağından, daha düzgün bir yürüme ve jel görüntüsü elde edebilmek amacıyla, bu aşamadaki jel yoğunluğu %2,5 olarak

hazırlanmıştır. Bu sebeple, bölüm 2.2.4.3.4, 1. Maddeki agaroz miktarı 3 gram olarak tartılmıştır.

2.2.4.4.3. MboI Restriksiyon Enzimi ile Kesim ve SNP'nin Genotiplendirmesi

HFE genindeki H63D C→G tek nükleotid polimorfizmini belirlemek amacıyla, 294 bp'lik PCR ürününün MboI Restriksiyon Enzimi ile Kesimi sonucunda; HH genotipli bireylerde: 138 bp, 99 bp ve 57 bp'lik oligonükleotidler, DD genotipli bireylerde: 237 bp ve 57 bp'lik oligonükleotidler, HD genotipli bireylerde ise: 237 bp, 138 bp, 99 bp ve 57 bp'lik oligonükleotidler oluşacaktır (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. MboI RE ile kesilmiş 294 bp'lik PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görünümü. 1.HH genotip (138 bp, 99 bp ve 57 bp), 2. HD genotip (237 bp, 138 bp, 99 bp ve 57 bp), 3. DD genotip (237 bp ve 57 bp).

2.2.7. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmanın istatistiksel olarak değerlendirilmesinde “The Statistical Package for Social Science for Windows (SPSS verison 16)” programı kullanıldı.

Ölçülebilen sürekli değişkenlerin normal dağılımını kontrol etmek için (Homojenite testi) Kolmogorov-Smirnov testi yapıldı. Normal dağılıma uyan metrik

verilerin tanımlayıcı istatistikleri ortalama±standart sapma şeklinde ifade edildi. Ayrıca minimum-maximum değerler de tanımlayıcı bilgilerde verildi. Normal dağılıma uyan değişkenlerin ikiden fazla grup arasındaki karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (One-Way-ANOVA) kullanıldı. İki grubun istatistiksel olarak değerlendirilmesinde ise Student-T testi kullanıldı. Metrik veriler arasında korelasyon olup olmadığı Pearson Korelasyon testi ile araştırıldı.

HFE genindeki H63D C→G tek nükleotid polimorfizmindeki genotip ve alel frekansları Hardy-Weinberg dengesi (eşitliği) kullanılarak “ χ^2 ” ile hesaplandı. Tüm istatistiksel analiz sonuçları için $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.BULGULAR

3.1. Genel Değerlendirmeler, Tanımlayıcı Bilgiler

Çalışmamızda, Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesine rutin muayene amaçlı başvuru yapan ve kan kurşun değeri 30 µg/dL'den yüksek olan 128 erkek hasta dahil edildi. 30 µg/dL Amerikan Hükümet Endüstri Hijyenistler Konferansının (ACGIH) belirlediği biyolojik maruziyet sınırır. Çalışmaya dahil olan işçilerin kan kurşun ve demir ile idarar kurşun düzeyleri ölçüldü. İşçilerin 83 tanesi sigara içerken, 45 tanesi sigara içmiyordu.

Sigara içim indeksi: (*Günde içilen sigara adedi x yıl*) olarak hesaplandı.

Çalışmaya katılan mesleksi olarak kurşuna maruz kalan işçiler ile ilgili bilgiler Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. İşçilere ait genel değerlendirmeler ve tanımlayıcı bilgiler.

Parametreler	n	Ortalama±S.S	Minimum	Maksimum
Yaş	128	37,27± 8,94	21	60
Çalışma Süresi	128	12,33±7,20	1	30
Kan Pb (µg/dL)	128	56,21±15,29	35,00	94,40
Serum Fe (mg/L)	128	309,66±164,06	34,00	572,00
İdrar Pb (µg/L)	128	78,37±62,44	7,20	261,00
Sigara İçim İndeksi	128	281,42±199,15	10	1200

3.2. Pb, Fe, Yaş ve Sigara İndeksi Arasındaki Korelasyon Analizi Sonuçları

Mesleksel kurşun maruziyeti olan işçilerin kan kurşun, idrar kurşun, serum demir düzeyleri, yaş, çalışma süreleri ve sigara içim indeksi ile ilgili Pearson Korelasyon analizi sonuçları Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kan Pb, idrar Pb, serum Fe düzeyleri, yaş, çalışma süreleri ve sigara içim indeksi arasındaki korelasyonlar.

		İdrar Pb (µg/L)	Kan Fe (mg/L)	Yaş	Çalışma süresi (yıl)	Sigara içim indeksi
Kan Pb (µg/dL)	r	0,456**	-0,286**	0,096	0,138	0,049
	p	0,0001	0,0001	0,281	0,184	0,658
İdrar Pb (µg/L)	r	1	-0,007	0,073	0,063	0,163
	p	-	0,935	0,413	0,543	0,141
Serum Fe (mg/L)	r	-0,007	1	-0,168	-0,251*	-0,027
	p	0,935	-	0,058	0,015	0,810

(*p<0,05; **p<0,001).

Bu sonuçlara göre;

- ✓ Kan Pb ile idrar Pb düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon (r= 0,456; p<0.001),
- ✓ Kan Pb ile serum Fe düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon (r= -0,286; p<0.001)
- ✓ Serum Fe ile işçilerin işyerinde çalışma süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon (r= -0,251; p<0.05), tespit edilmiştir.

3.3. Pb ve Fe düzeyleri ile Sigara İçimi Arasındaki İlişkinin Sonuçları

İşçilerin kan Pb, idrar Pb ve serum Fe düzeylerinin sigara kullanımı ile ilişkilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Student-T testi kullanılmış ve sonuçlar Çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Kan Pb, idrar Pb ve serum Fe düzeyleri ile sigara kullanımı arasındaki ilişki.

Sigara Kullanımı		n	Ortalama±S.S	Minimum	Maximum	p değeri
Kan Pb (µg/dL)	kullanıyor	83	59,52±15,59	35,70	94,40	0,0001**
	kullanmıyor	45	50,09±12,78	35,00	87,40	
İdrar Pb (µg/L)	kullanıyor	83	86,42±63,35	7,20	261,00	0,0001**
	kullanmıyor	45	63,52±58,53	7,50	210,00	
Serum Fe (mg/L)	kullanıyor	83	232,77±172,72	38,00	522,00	0,024*
	kullanmıyor	45	351,35±143,78	34,00	572,00	

(*p<0,05; **p<0,001).

Bu sonuçlara göre;

- ✓ Kan Pb düzeyi sigara kullanan işçilerde 59,52±15,59 µg/dL iken kullanmayanlarda 50,09±12,78 µg/dL olarak tespit edilmiştir ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.001),
- ✓ İdrar Pb düzeyi sigara kullanan işçilerde 86,42±63,35 µg/L iken kullanmayanlarda 63,52±58,53 µg/L olarak tespit edilmiştir ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.001),
- ✓ Serum Fe düzeyi sigara kullanan işçilerde 232,77±172,72 mg/L iken kullanmayanlarda 351,35±143,78 mg/L olarak tespit edilmiştir ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05),

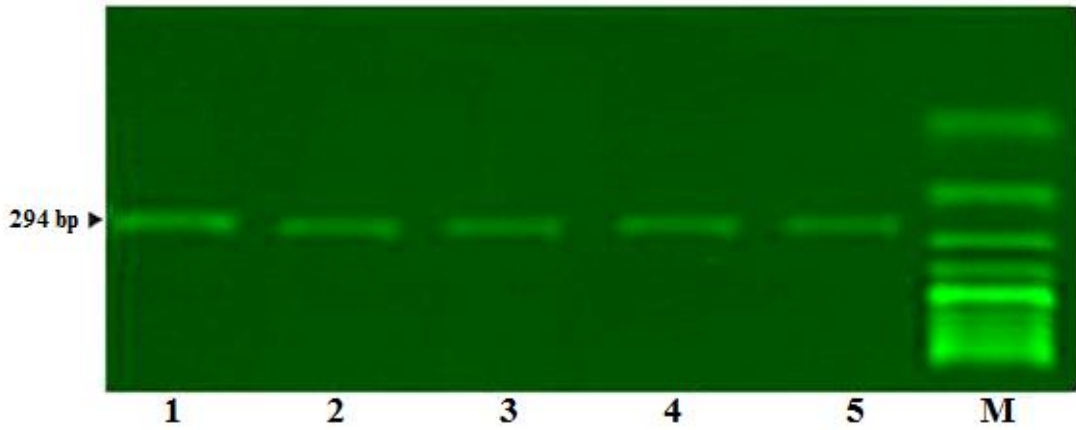
3.4. HFE H63D Gen Polimorfizmi Sonuçları

3.4.1. DNA İzolasyonu Varlığının Agaroz Jel Elektrofrez ile Belirlenmesi

Çalışmamızda kullanılan tam kan örneklerinden DNA izolasyonu fenol kloroform izoamil alkol yöntemi kullanılarak yapıldı ve DNA'nın varlığı %0,5'lik agaroz jel elektrofrez ile belirlendi. Agaroz jelde tüm DNA'ların PCR aşamasında kullanılabilir kalitede olduğu gözlemlendi.

3.4.2. PCR Yöntemi ile DNA'nın Amplifiye Edilmesi

HFE, 6. kromozomda 6p21.3 bölgesinde yer alan, 1046 bp uzunluğunda ve 348 aminoasitten oluşan bir gendir. Bu çalışmada HFE geni H63D C→G tek nükleotid polimorfizmini belirlemek amacıyla polimorfik olan bölgeyi de içeren 294 bp'lik bölge 2^{35} defa çoğaltıldı. PCR sonrasında %1'lik agaroz jel elektrofrezinde PCR ürünü yürütülerek jel görüntüleme sisteminde UV ışık altında görüntülemesi yapıldı ve 294 bp'lik PCR ürünlerimiz tespit edilerek fotoğraflandı (Şekil 3.1.).



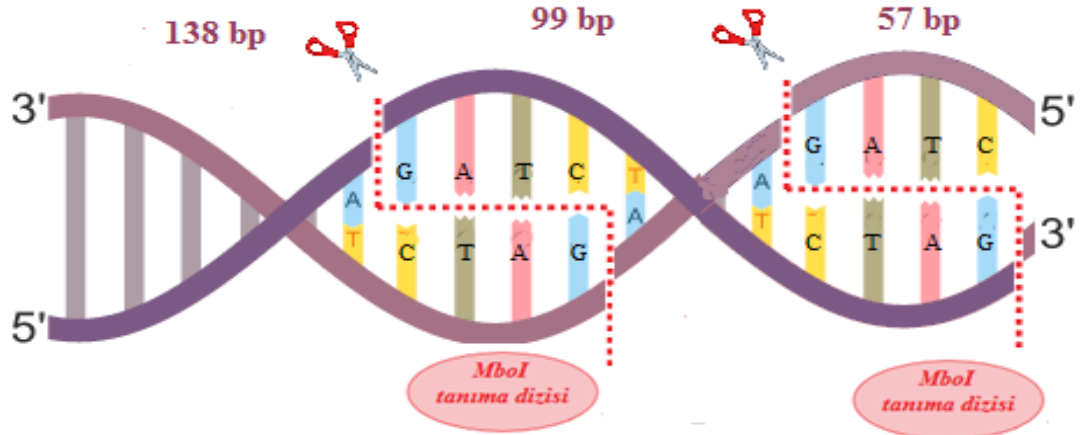
Şekil 3.1. Amplifikasyon ürününün %1'lik agaroz jel görüntüsü (M=100 bp ladder; 1, 2, 3, 4 ve 5= 294 bp PCR ürünü).

3.4.3. PCR-RFLP Ürününün MboI Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

HFE geni H63D C→G gen polimorfizmini belirlemek amacı ile çoğaltılmış PCR ürünlerimiz, MboI restriksiyon enzimi kullanılarak RFLP yöntemi ile kesildi. Bu işlemde gereç ve yöntemdeki 2.2.4.4. bölümünde belirtilen reaksiyon bileşenleri hazırlanarak 294 bp'lik PCR ürünü MboI restriksiyon enzimi ile 37 °C'de gece boyu inkübe edildi. MboI enzimi 294 bp'lik oligonükleotid dizisini 5' ucundan GATC hedef bölgesinden, 3' ucundan ise CTAG hedef bölgesinden tanıyarak kesmektedir.

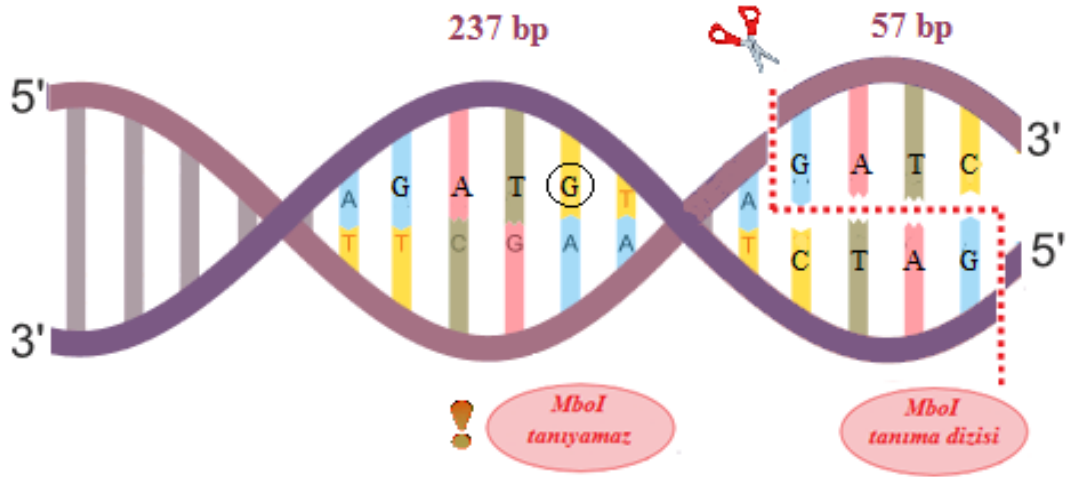
Bireyler H63D "HH" homozigot genotipli ise,

MboI restriksiyon enzimi 294 bp'lik PCR ürünü üzerindeki GATC dizisini tanıyarak iki noktadan kesim yapar ve böylelikle 138 bp, 99 bp ve 57 bp'lik üç oligonükleotid oluşmaktadır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. H63D "HH" homozigot genotipli bireylerde, 294 bp uzunluğundaki PCR ürününün MboI enzimi ile kesimi ile oluşan oligonükleotid uzunluklarının şematik gösterimi.

Bireyler H63D "DD" homozigot genotipli bireyler ise 294 bp'lik PCR ürünü üzerinde C bazı yerine G bazı bulunduğundan MboI restriksiyon enzimi tek noktayı tanıyarak bir yerden kesim yapmakta ve böylelikle 237 bp ve 57 bp'lik iki farklı uzunlukta oligonükleotid oluşmaktadır (Şekil 3.3).

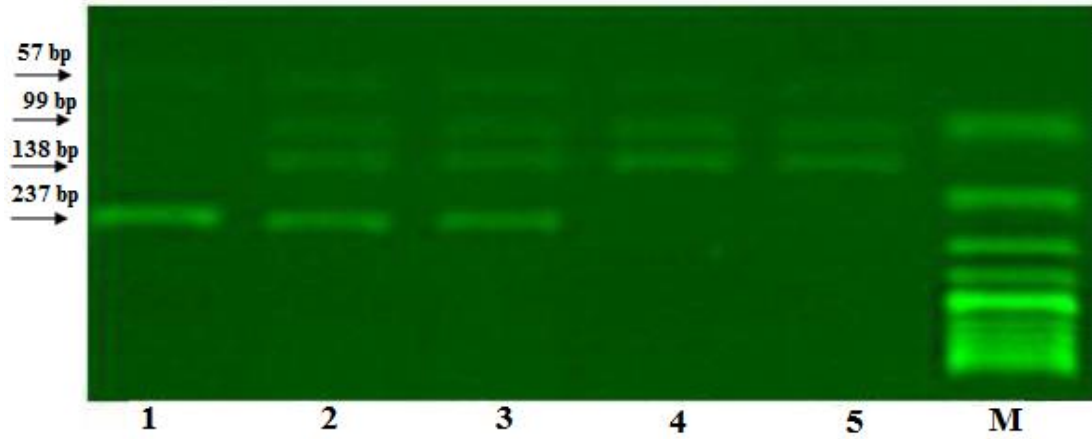


Şekil 3.3. H63D “DD” homozigot genotipli bireylerde, 294 bp uzunluğundaki PCR ürününün MboI enzimi ile kesimi ile oluşan oligonükleotid uzunluklarının şematik gösterimi.

Bireyler H63D “HD” heterozigot genotipli bireyler ise %2,5’lik agaroz jel üzerinde hem HH genotipli bireyler gibi, 138 bp, 99 bp ve 57 bp’lik oligonükleotidler hem de DD genotipli bireyler gibi 237 bp ve 57 bp’lik oligonükleotidler görülmektedir (Şekil 3.4., Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.4. Genotipler ve MboI restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotid büyüklükleri.

GENOTİPLER	MboI restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotid uzunlukları
H63H genotip	138 bp, 99 bp ve 57 bp
D63D genotip	237 bp ve 57 bp
H63D Genotip	237 bp, 138 bp, 99 bp ve 57 bp



Şekil 3.4. Amplifikasyon ürününün (394 bp) MboI restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucunda oluşan ürünlerin %2,5'lük agaroz jel görüntüsü. 1= DD genotip (237 bp ve 57 bp), 2 ve 3= HD genotipler (237 bp, 138 bp, 99 bp ve 57 bp), 4 ve 5= HH genotipler (138 bp, 99 bp ve 57 bp), M=100 bp ladder.

3.4.4. HFE geni H63D C→G Polimorfizmin Genotip Frekansları

Çalışmamız sonucunda, mesleksel olarak Pb'a maruz kalan erkek işçilerde (n=128) HFE geni H63D gen polimorfizmi; %84,4 homozigot HH, %13,3'ü heterozigot HD ve %2,3'ü de homozigot DD olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.5.).

Çizelge 3.5. Mesleksel olarak Pb'a maruz işçilerde HFE H63D gen polimorfizmi ile oluşan genotip frekansları

Polimorfizm	HFE H63D Genotip Frekansı (n:128)	
	n	%
Homozigot HH	108	84,4
Heterozigot HD	17	13,3
Homozigot DD	3	2,3

HFE geni H63D kodonundaki C→G'ye tek bazlık değişiklik ile meydana gelen bu polimorfizmde, histidin aminoasidi (CAT) yerine aspartik asid (GAT) aminoasidi bulunmaktadır. Aminoasid bazında değişiklik yapan bu transversiyon polimorfizmde, 63. kodonda histidin veya aspartik asidin bulunması, farklı elektroforetik hareketliliğe sahip yapısal olarak değişmiş proteinin oluşumuna neden olmaktadır.

3.4.5. HFE geni H63D C→G Polimorfizmin Alel Frekansları

Bireylerin HFE geni H63D polimorfizmi alel frekansları (n:256); H alel frekansı; %91,0 (n:233), D alel frekansı ise %9,0 (n:23) olarak tespit edildi (Çizelge 3.6.).

Çizelge 3.6. Mesleksel olarak Pb'a maruz işçilerde HFE H63D gen polimorfizmi ile oluşan genotip frekansları

Alel	HFE H63D Alel Frekansları (n:256)	
	n	%
H aleli	233	91,0
D aleli	23	9,0

3.4.6. Çalışma grubumuzda Hardy-Weinberg dengesinin tespiti

Hardy-Weinberg belirli ve sabit şartlarda genotiplerin ve her iki alel sabit kalması ve dengede olması durumudur. Bu genetik dengenin sağlanabilmesi için aşağıda belirlenen koşulların olması gerekmektedir;

- Çalışması yapılacak gende mutasyon/polimorfizm gözlenmemelidir.

- b) Çalışma için seçtiğimiz popülasyon, genetik analizler için yeterli sayıda olmalıdır.
- c) Popülasyona dışarıdan ve içeriden çok fazla sayıda göç olmamalıdır.
- d) Üreme belirli koşullarda değil, tamamen rastgele olmalıdır.
- e) Çevresel şartlar belli özellikteki bireylerin yaşama ve üremesi için çok avantajlı, diğerleri için dezavantajlı olmamalı herkese eşit şans verilmelidir.
- f) Hardy-Weinberg dengesi ise, $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ eşitliği ile hesaplanmaktadır (birinci alelin frekansı “p”, ikinci alelin frekansı “q” olarak adlandırılır) (Ayala ve Kiger 1980).

Çalışmamızda yapılan istatistiksel analizlere göre, HFE geni H63D gen polimorfizmi genotip ve alel frekanslarının Hardy-Weinberg dengesinde olduğu hesaplanmıştır ($p > 0,05$). Hardy-Weinberg dengesinin hesaplanmasında χ^2 testi kullanılmıştır. Hardy-Weinberg istatistiksel hesaplama sonucunun $p > 0,05$ olması, popülasyonda beklenen ve gözlenen genotip frekanslarının birbirine yakın olması, popülasyonun dengede olması anlamını taşımaktadır. Bu işlemler sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 3.7.'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. Çalıştığımız popülasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti.

	H63D HH Homozigot (n)	H63D HD Heterozigot (n)	H63D DD Homozigot (n)	Toplam (n)
Gözlenen	108	17	3	128
Beklenen	106,03	20,93	1,03	127,99
Serbestlik Derecesi			χ^2	p=0,069
	2		3.289	

3.5. HFE H63D Gen Polimorfizminin Tam Kan Pb, İdrar Pb ve Serum Fe Düzeylerine Etkisi

Çalışmamızın bu bölümünde, mesleksi olarak Pb maruziyeti olan bireylerde ölçmüş olduğumuz kan Pb, idrar Pb ve serum Fe düzeyleri ile HFE H63D gen polimorfizmi arasındaki ilişki istatistiksel olarak analiz edildi.

Tüm verilerin homojenite testi Kolmogorov-Smirnov ile yapıldı. Verilerimizin normal dağılım gösterdiği tespit edildi ($p>0,05$) ve bu nedenle parametrik testlerle analizler değerlendirildi. Normal dağılıma uyan metrik verilerin tanımlayıcı istatistikleri ortalama±standart sapma şeklinde ifade edildi. Ayrıca minimum-maximum değerler de tanımlayıcı bilgilerde verildi.

Genotip frekansları ile metal düzeyleri arasındaki ilişki tek yönlü varyans analizi One-Way Anova ile yapıldı. Çalışma grubumuzda sadece 3 kişide HFE DD homozigot genotip tespit edildi. Bu nedenle HD heterozigot ($n=17$) ve DD homozigot ($n=3$) genotipler birleştirilerek (HD+DD; $n=20$) istatistiksel analizler yapıldı. HH Homozigot ve HD+DD genotipleri ile metal düzeyleri arasındaki ilişki de Student-T testi ile yapıldı.

3.5.1. HFE H63D Gen Polimorfizminin Tam Kan Pb Düzeyine Etkisi

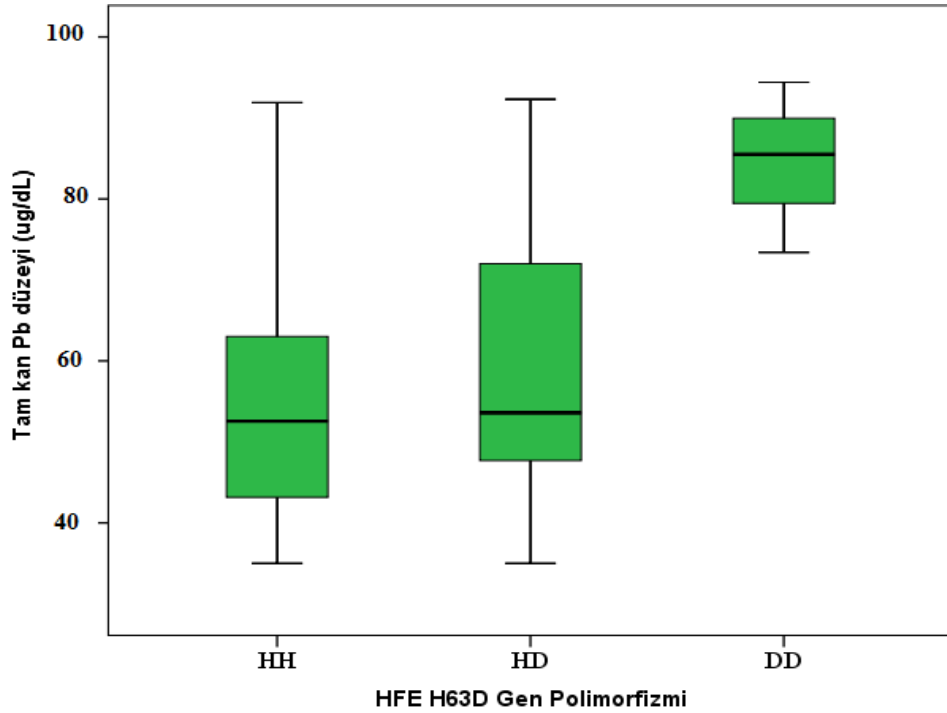
Bireylerin HFE H63D gen polimorfizmleri ile tam kan Pb düzeyleri değerlendirildiğinde;

- ✓ HFE genotipleri ile kan Pb düzeyleri arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı ilişki tespit edilmiştir ($p=0,003$) (Çizelge 3.8.; Şekil 3.5.).
- ✓ HH ve HD+DD genotipleri ile kan Pb düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0,032$) (Şekil 3.6.)

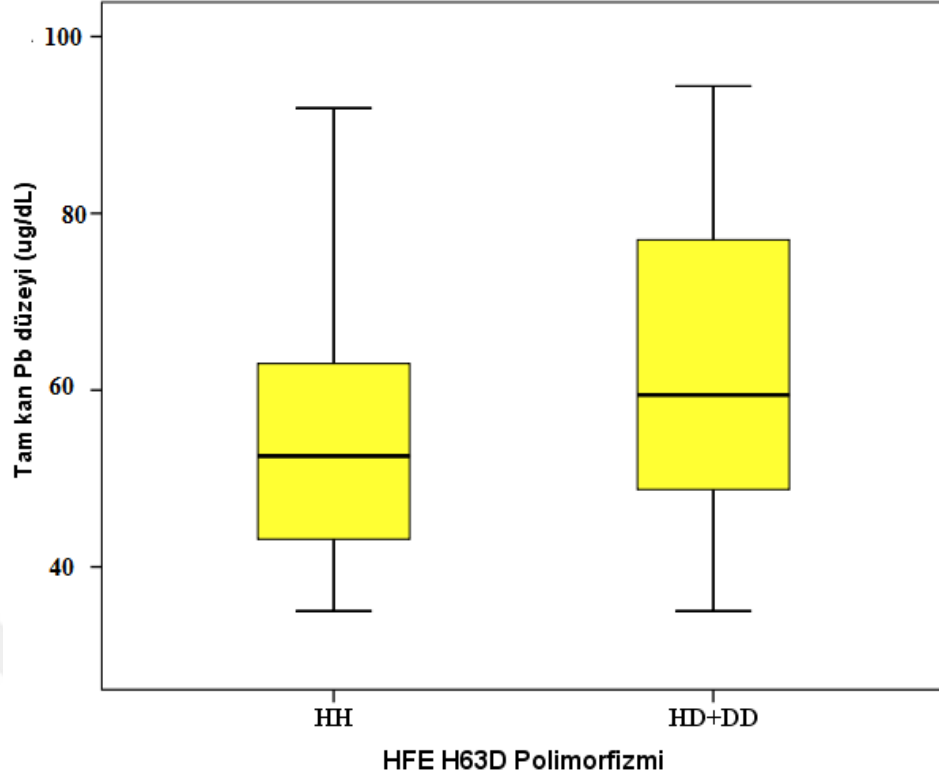
Çizelge 3.8. HFE H63D gen polimorfizmi ile tam kan Pb düzeyi arasındaki ilişki.

HFE H63D Genotipleri	n (128)	Kan Pb düzeyleri ($\mu\text{g/dL}$)			P
		Ortalama \pm S.S	Minimum	Maksimum	
Homozigot HH	108	54,96 \pm 14,46	35,00	91,90	0,003**
Heterozigot HD	17	59,12 \pm 16,58	35,00	92,30	
Homozigot DD	3	84,43 \pm 10,54	73,40	94,40	
HH	108	54,96 \pm 14,46	35,00	91,90	0,032*
HD+DD	20	62,92 \pm 18,14	35,00	94,40	
Toplam	128	56,21 \pm 15,29	35,00	94,40	

(*p<0,05; **p<0,01)



Şekil 3.5. HFE H63D gen polimorfizmi ile tam kan Pb düzeyi arasındaki ilişkinin grafik ile gösterimi.



Şekil 3.6. HFE H63D gen polimorfizmi (HH ve HD+DD) ile tam kan Pb düzeyi arasındaki ilişkinin grafik ile gösterimi.

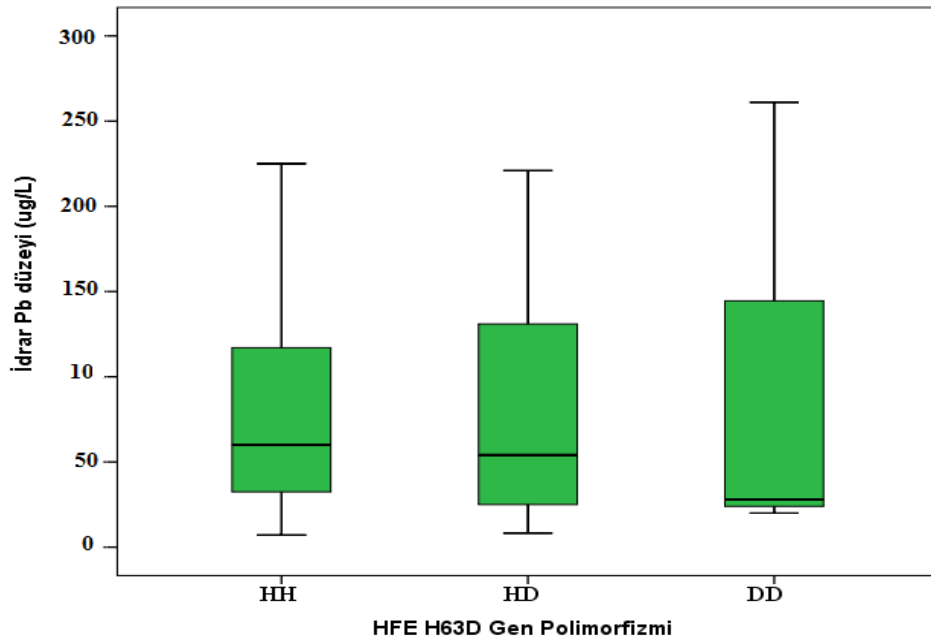
3.5.2. HFE H63D Gen Polimorfizminin İdrar Pb Düzeyine Etkisi

Bireylerin HFE H63D gen polimorfizmleri ile idrar Pb düzeyleri değerlendirildiğinde;

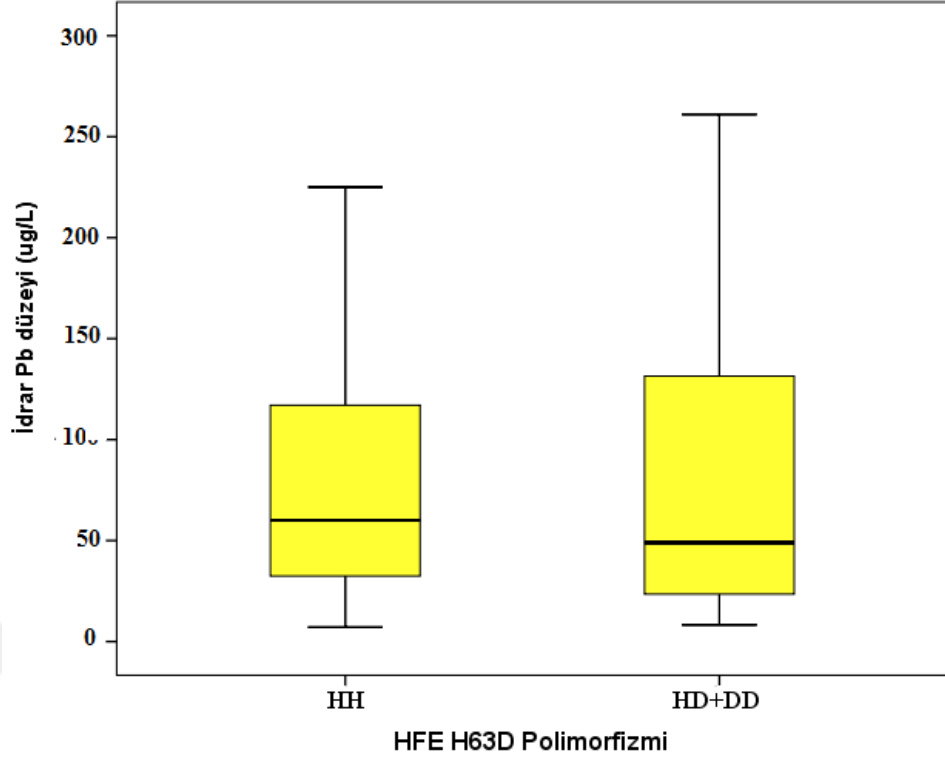
- ✓ HFE genotipleri ile idrar Pb düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilememiştir ($p=0,778$) (Çizelge 3.9.; Şekil 3.7.).
- ✓ HH ve HD+DD genotipleri ile idrar Pb düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır ($p=0,679$) (Şekil 3.8.).

Çizelge 3.9. HFE H63D gen polimorfizmi ile idrar Pb düzeyi arasındaki ilişki.

HFE H63D Genotipleri	n (128)	İdrar Pb düzeyleri (µg/L)			p
		Ortalama±S.S	Minimum	Maksimum	
Homozigot HH	108	77,38±59,83	7,20	225,00	0,778
Heterozigot HD	17	80,31±67,35	8,22	221,00	
Homozigot DD	3	103,00±136,89	20,00	261,00	
HH	108	77,38±59,83	7,20	225,00	0,679
HD+DD	20	83,71±76,56	8,22	261,00	
Toplam	128	78,37±62,44	7,20	261,00	



Şekil 3.7. HFE H63D gen polimorfizmi ile idrar Pb düzeyi arasındaki ilişkinin grafik ile gösterimi.



Şekil 3.8. HFE H63D gen polimorfizmi (HH ve HD+DD) ile idrar Pb düzeyi arasındaki ilişkinin grafik ile gösterimi.

3.5.3. HFE H63D Gen Polimorfizminin Serum Fe Düzeyine Etkisi

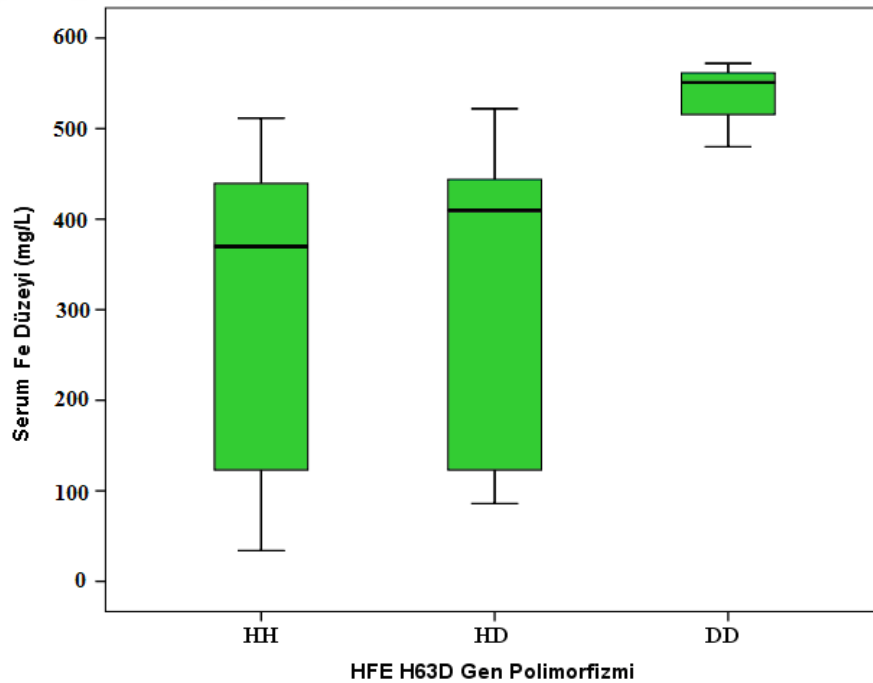
Bireylerin HFE H63D gen polimorfizmleri ile serum Fe düzeyleri değerlendirildiğinde;

- ✓ HFE genotipleri ile serum Fe düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmiştir ($p=0,047$) (Çizelge 3.10.; Şekil 3.9.).
- ✓ HH ve HD+DD genotipleri ile idrar Pb düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır ($p=0,166$) (Şekil 3.10.).

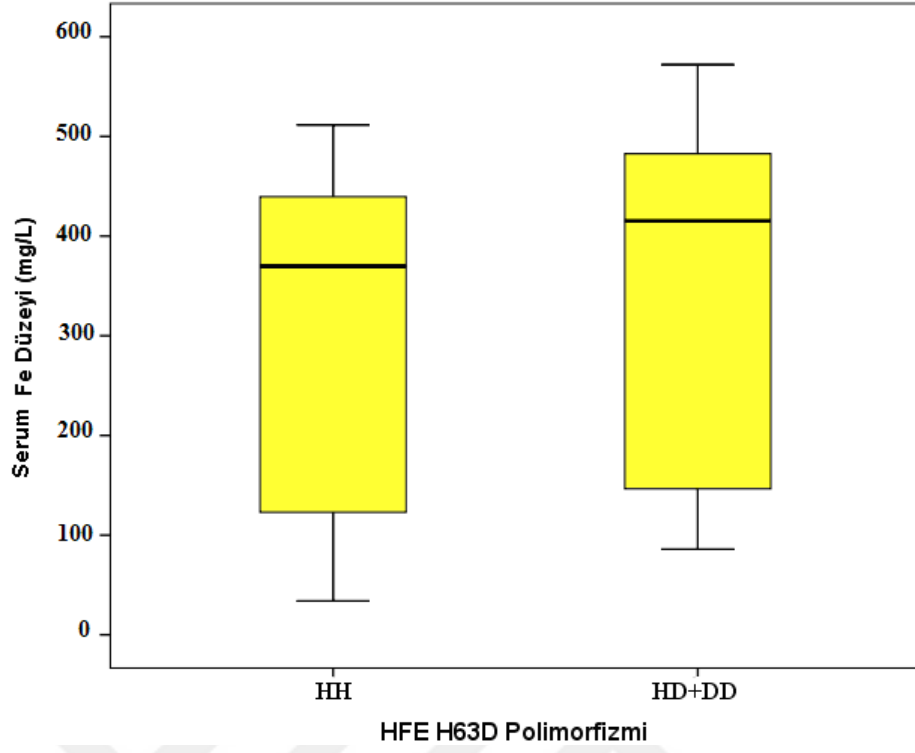
Çizelge 3.10. HFE H63D gen polimorfizmi ile serum Fe düzeyi arasındaki ilişki.

HFE H63D Genotipleri	n (128)	Serum Fe düzeyleri (mg/L)			p
		Ortalama±S.S	Minimum	Maksimum	
Homozigot HH	108	300,99±161,58	34,00	511,60	0,047*
Heterozigot HD	17	325,10±168,87	86,00	522,00	
Homozigot DD	3	534,33±48,21	480,00	572,00	
HH	108	300,99±161,58	34,00	511,60	0,166
HH+DD	20	356,49±173,59	86,00	572,00	
Toplam	128	309,66±164,06	34,00	572,00	

*(p<0,05)



Şekil 3.9. HFE H63D gen polimorfizmi ile serum Fe düzeyi arasındaki ilişkinin grafik ile gösterimi.



Şekil 3.10. HFE H63D gen polimorfizmi (HH ve HD+DD) ile serum Fe düzeyi arasındaki ilişkinin grafik ile gösterimi.

4. TARTIŞMA

Kurşun maruziyetinin başlıca kaynakları mesleki ve çevresel maruziyet olup her ikisinde de en önemli kurşun kaynağı insan aktiviteleridir. Son üç yüzyılda kurşun miktarı bin kat artış göstermiştir. Bunun en önemli kaynağı 1950- 2000’li yıllarda kurşunlu benzinin kullanımına bağlı olarak çevreye yayılan kurşun iken kurşunun pestisit ve boyalarda da kullanımı yıllarca kurşunun çevrede bulunması ve yayılmasına neden olmuştur. Yıllar içinde kurşunun birçok üründe kullanımına yasaklamalar ve sınırlamalar getirilmiş olsa dahi madenlerden kurşun çıkarılması, işlenmesi ve alaşımlarının hazırlanması, metal geri dönüşümünde, akü ve radyasyona karşı koruyucu levhaların üretiminde kurşun kullanımı, kurşun içeren kablo, boru, ağırlık ve mühimmat malzemelerinin üretimi ve kullanımı nedeniyle mesleki maruziyetin önüne geçilememektedir (ATSDR, 2007; Chen ve ark., 2012; Ghanwat ve ark., 2016; Szymańska-Chabowska ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2016).

Biyolojik maruziyet indeksi, mesleki ortam havasında belirli bir konsantrasyonda bulunan kimyasalın inhalasyonuna bağlı olarak vücuttaki derişimine denk gelen ve herhangi bir sağlık sorununa yol açmayacak değer olarak adlandırılmaktadır. OSHA işyeri ortamında yapılan kontroller sırasında işçilerden herhangi birinin kan düzeyinin 40 µg/dL’yi geçmesi halinde, işçinin kurşun toksisitesine dair semptomlar göstermesi veya işyeri ortam havasındaki kurşun düzeyinin aksiyon derecesinde veya üzerinde olduğu durumlarda işçilere şelasyon tedavisinin uygulanmasını öngörmektedir (Lead, 1977). Ülkemizde de 6331 numaralı İş Sağlığı ve Güvenliği Kanunu gereğince işçi sağlığını korumak ve güvenliklerini sağlamak amacıyla iş yeri ortamında sürekli ve düzenli aralıklara risk değerlendirmesi, iş yeri havasının ölçülmesi, işçilerin eldiven, maske gibi çeşitli koruyucu ekipmanları kullanması ve işçilerin düzenli sağlık kontrollerinden geçmeleri önerilmektedir. Gerek mesleki maruziyeti engellemek adına gerekse çevresel kaynaklı popülasyonlarda görülebilecek kurşun toksisitesini en aza indirmek adına her geçen gün birçok önlemler ve yasal düzenlemeler yapılmaktadır. Ancak, genetik olarak kurşuna duyarlı bireylerin korunması için düzenleyici standartlar mevcut olmayıp, korunmaları için de spesifik bir yöntem mevcut değildir. Bununla

birlikte genetik farklılığın belirlenmesi, kurşun toksisitesine olan yatkınlığın saptanmasına bağlı olarak bireylerin tedavilerinin planlanmasına, maruziyetlerinin engellenmesine ve populasyon bazında halk sağlığının korunmasına katkı sağlayabilir (ATSDR, 2005; Billick, 1981; Claudio ve ark., 1997; Deeming ve Weber, 1978; WHO, 2000).

Kurşun organizma için gerekli olan bir metal değildir. Özellikle sinir sistemi üzerine olumsuz etkisi olan kurşuna yüksek dozda maruziyet sonucu ensefalopati (Goyer, 1990; Rudner ve Brady, 1988), anemi (Wright, 1999), böbrek hasarları (Chia ve ark., 1995; Goyer, 1989), kardiyovasküler sistemi etkilemesi nedeniyle hipertansiyon (De Kort ve ark., 1987; Pirkle ve ark., 1985) ve fertilitede toksisite (Hu, 1991; Lancranjan ve ark., 1975) görülebilmektedir.

Daha çok eritroblastta daha az ise kemik iliğinde hemoglobin sentezi için demir alınımını düzenleyen transferin reseptörü (TfR) transmembran bir glikoproteindir. Hücre yüzeyindeki TfR konsantrasyonu hücrenin demir ihtiyacına göre değişiklik göstermektedir. Hücrede demirin fazla olduğu durumda TfR derişimi azalırken, hücrenin demir eksikliği çektiği durumlarda demir alınımını artırmak amacıyla TfR konsantrasyonu artmaktadır. HFE proteininin TfR ile olan ilişkisi demir metabolizasyonunda görev aldığıın göstergesi olup, HFE tüm hücrelerde bulunmakla birlikte, özellikle karaciğer ve gastrointestinal sistemde bağırsaklarda demir emiliminin yüksek miktarda olduğu ileum kript hücrelerinde yaygın olarak yer almaktadır. HFE bağırsak epitelyum hücrelerinin bazolateralinde ekspre olmakta ve demir düzeyini algılayarak hücre içinde veya epitelyum katmanlar arasında demirin transportunu düzenlemektedir (Gross ve ark., 1998). Demir düzeyine göre HFE proteini, transferrin- demir (Fe-Tf) molekülüne karşı TfR için rekabet ederek, hücre içi demir homeostazisini sağlar (Kayaaltı ve ark., 2015).

Kurşunun toksikokinetiğine ve biyobirikimine etki eden polimorfik genlerden birisi de hemokromatozisten sorumlu olan HFE genidir. Katyonik yüklerinin aynı olması nedeniyle kurşun demirin izlemiş olduğu biyolojik yolları izleyerek, hücrelerde metabolize olabilmektedir (Wright ve ark., 1999). Bu tez çalışmasına mesleksel kurşuna maruz kalan, kan kurşun düzeyi ölçülen ve 35 µg/dL'nin üzerinde

olan 128 işçi dahil edilmiştir. İlk olarak işçilerin kan kurşun ve idrar kurşun düzeyleri ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer: İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometresi) kullanılarak ölçülmüş, kan ve idrar kurşun ile serum demir düzeyleri arasındaki korelasyon hesaplanmıştır. İkinci aşamada ise demir metabolizmasında önemli rolü olan HFE gen bölgesinde 63. kodanda His/Asp değişimine yol açan C→G tek nükleotit polimorfizmi araştırılmıştır.

Hepatosellüler karsinom hastaları ve sağlıklı bireyler üzerinde yapılan bir çalışma ile miyokardiyal enfarktüs hastası ve sağlıklı bireyler üzerinde yapılan HFE H63D polimorfizmi ile hastalıklar arasındaki ilişkilerin araştırıldığı çalışmalarda, HFE H63D polimorfizminin, hepatosellüler karsinomu veya miyokardiyal enfarktüs riskini artırdığına dair bir ilişki saptanamamıştır (Boige ve ark.,2003; Candore ve ark., 2003). Buna karşın HFE H63D polimorfizmi ile hipertansiyona yaklanma riskinin araştırıldığı bir çalışmada D alleli taşıyıcı olanların H alleli taşıyıcı olanlara göre hipertansiyon hastası olma riskleri daha yüksek bulunmuştur (Maatta, 2015). Söz konusu çalışmalarda araştırmaya dahil olan bireylerin kurşuna maruziyeti bulunmamaktadır. Bizim çalışmamıza katılan bireyler, kurşun toksisitesine bağlı semptomları göstermemekte idi. Dolayısı ile çalışmamızda, HFE geni H63D polimorfizmi ile diğer kronik hastalıklar arasındaki ilişki üzerine bir araştırma yapılamamıştır. Ancak kurşunun fertilizasyon, kanser, kardiyovasküler, hipertansiyon üzerine etkileri olduğu göz önüne alınarak kronik kurşun maruziyeti bulunan belirli yaşa erişmiş yani maruziyete bağlı olarak söz konusu hastalıkların daha fazla görülmesi beklenen bir çalışma grubunda üzerinde yapılacak HFE H63D polimorfizm veya kurşun metabolizasyonunda görev alan diğer genetik faktörlerin de araştırılacağı çalışmaların planlanarak hayata geçirilmesi toksikogenetik araştırmalar için büyük önem taşıyacaktır.

Populasyonlar ve işçi grupları üzerinde alkol ve sigara kullanmanın kan kurşun düzeyine etkisini araştıran birçok çalışma yapılmıştır. Populasyon üzerinde yapılan bir araştırmada günde 20 sigara içilmesi durumunda sigaradaki kurşunun inhalasyonuna bağlı olarak kan kurşun düzeyinin 1-5 ppb arttığı saptanmıştır. Ancak araştırmacılar, sigara içenler ile içmeyenler arasındaki yüksek kan kurşun

konsantrasyon farkının sebebinin sigaradaki kurşunun inhalasyonuna bağlı olarak ortaya çıktığının söylenmesinin yetersiz olacağını belirtmiştir (Weyermann ve Brenner, 1997). Mesleki kurşun maruziyeti üzerinde yürütülen bir diğer çalışmada ise sigara içenlerde kan kurşun düzeyinin yüksek bulunmasının sebebi sigara içimi sırasında el ve ağızla temasın sık olması sonucu kurşunun sindirim ve deriden aynı zamanda da sigaradaki kurşun partiküllerinin inhalasyon yoluyla vücuda alınması sonucu olduğu öne sürülmüştür (Tola ve Nordman, 1977). Söz konusu çalışmamızda da sigara kullananların kan kurşun konsantrasyonu $59,52 \pm 15,59$ $\mu\text{g/dL}$, idrar kurşun düzeyleri ise $86,42 \pm 63,35$ $\mu\text{g/L}$ iken sigara kullanmayanların kan kurşun düzeyleri $50,09 \pm 12,78$ $\mu\text{g/dL}$, idrar kurşun düzeyleri ise $63,52 \pm 58,53$ $\mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur. Sigara içen işçilerin kan ve idrarlarındaki kurşun düzeyleri sigara içmeyen işçilere oranla yüksek tespit edilmiş olup bu yükseklik istatistiksel açıdan da anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Çalışmamızdaki bu sonuçlara göre, işçilerin kurşuna maruz kalan elleriyle sigara içmesine bağlı olarak gastrointestinal kanaldan kurşun alınımının artmış olabileceği, aynı zamanda bu bireylerin sigara içimi sırasında inhalasyon ile de sigaradaki kurşuna bağlı maruziyetlerinin artmış olabileceği söylenebilir. Sürekli olarak kurşuna maruz olan işçilerin sigaraya bağlı olarak artmış olabilecek yüksek kan kurşun ve idrar düzeylerinin azaltılabilmesi adına iş yerlerinde sigara kullanımını engelleyecek bir takım düzenlemeler yapılabilir veya söz konusu kişilerin kurşunla maruziyetinin daha az olabileceği bir iş sahasında çalışmalarına olanak sağlanabilir.

HFE gen varyantlarına ve yaş, cinsiyet gibi bireysel farklılıklara göre bireylerin kan kurşun düzeyleri değişiklik gösterebilmektedir. Mesleki olarak kurşuna maruz kalan bireylerde temel toksikolojik parametrelerin HFE ve diğer bazı genlerle ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada H alleli bulunan bireylerin D alleli olan bireylere göre daha az kan kurşun düzeyine sahip olduğu saptanmıştır (Szymańska-Chabowska ve ark., 2015). Hopkins ve arkadaşları tarafından (2008) gerçekleştirilen bir çalışmada yaşa ve cinsiyete bağlı olarak bireylerin demir ihtiyaçlarının ve demir depolamalarının zamana bağlı olarak değişebileceği saptanmış ve genç bireylerin demir ihtiyaçlarının daha fazla olduğu ve HFE geni için taşıyıcı olan bireylerde kurşun emiliminin diğer bireylere oranla artabildiği tespit edilmiştir (Hopkins ve

ark., 2008). Bunun yanısıra yaşlı erkekler üzerinde yapılan bir diğer çalışmada HFE varyantlarının daha düşük kan kurşun konsantrasyonuna sahip olduğu bulunmuştur (Wright ve ark., 2004). Yürütülen bir diğer çalışmada da HFE genotipi ile erişkinlerdeki kan kurşun düzeyleri arasında bir farklılık gözlemlenmemiştir (Whitfield ve ark., 2007). Bu tez çalışmasında ise yaş ortalamaları $37,27 \pm 8,94$ olan erkek bireylerin kan kurşun düzeyleri HH genotipi için $54,96 \pm 14,46$, HD genotipi için $59,12 \pm 16,58$ ve DD genotipi için ise $84,43 \pm 10,54$ olarak tespit edilmiş olup, HFE varyantlarında kurşun emiliminin daha fazla olduğu bulunmuştur. Elde edilen verilerde HD ve DD genotipine sahip olan bireylerin vücutlarında daha fazla kurşun biriktirdiklerini kısacası kurşuna daha duyarlı olduklarını göstermektedir. Sürekli kurşuna mesleki maruziyeti olan bireylerin kurşuna daha az maruz kalabilecekleri bir iş yeri ortamında çalışmaları sağlanabilir. Ayrıca, Türkiye’de de 2012 yılı itibari ile kabul edilen 6331 numaralı İş Sağlığı ve Güvenliği Kanunu uyarınca işveren çalışanlarını düzenli sağlık kontrollerinden geçirerek işçilerinin sağlık durumlarının stabil kalmasını, kurşun toksisitesine bağlı gelişebilecek olumsuz sağlık durumlarının oluşmasını engelleyebilir. İlerideki çalışmalarla kurşun metabolizmasında görev alan genetik faktörlerin etkisinin aydınlatılmasıyla ve henüz kanun kapsamında olmayan genetik analizlerin de ilerleyen yıllarda yasalarda yerini alması ile gerek kurşun gerekse diğer ağır metallere bağlı işçilerde oluşabilecek olumsuz sağlık durumlarının önüne geçilebilecektir. İşçilerdeki genetik farklılıklara göre, ağır metallerin toksik etkileri de farklılık gösterebilecektir. Genetik farklılıklar belirlenerek işçilerin metal maruziyetine bağlı hastalık ve kansere yakalanma riskleri en aza indirgenebilecek böylelikle hastalanma oranındaki düşüğe bağlı olarak tanı, tedavi amaçlı yapılan harcamalarda azaltılmaya gidilerek ülke ekonomisine de katkıda bulunulabilecektir.

Kalıtsal hemokromatozis’in görüldüğü bir vaka-kontrol çalışmasında demir emiliminin artışıyla paralel olarak kurşun emiliminde de artış olduğu gözlemlenmiştir (Barton ve ark., 1994; Wright ve ark., 2003). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre de HFE geni kodon 63 His/Asp bölgesindeki polimorfizm ve Fe ile Pb derişimleri arasındaki ilişkiye bakıldığında; heterozigot (HD) ve homozigot atipik (DD) bireylerde serum Fe ($356,49 \pm 173,59$) ve kan Pb ($62,92 \pm 18,14$) konsantrasyonları, homozigot tipik (HH) ($62,92 \pm 18,14$) ($54,96 \pm 14,46$)

bireylere göre daha yüksek saptanmıştır. Serumda Fe-Tf derişimi yüksek olduğu zaman serumdaki yüksek demir derişimi HFE'nin β 2M alt uniti tarafından algılanmakta böylece HFE-TfR1'den ayrılarak bağırsaklardan demir emilimini artırmak üzere TfR2 ile birleşmektedir. HFE'den ayrılan TfR1 ise transferine ilgisi 5-10 kat azalan Fe ile birleşmektedir. Buradan yola çıkarak HH genotipli bireylerde HFE proteini Fe-Tf derişimini dolaylı olarak algılayarak serumdaki demir konsantrasyonunu düzenleyebildiğini söyleyebiliriz. Bu da serumda ve kanda düşük demir ve kurşun düzeyinin saptanmış olmasının nedeni olarak açıklanabilir. Buna karşın, HD ve DD genotipli bireylerde ise HFE'de meydana gelen polimorfizme bağılı olarak HFE proteini Fe-Tf konsantrasyonunu kısacası serumdaki demir konsantrasyonunu algılayamadığından ve demir konsantrasyonunu düzenleyemediğinden dolayı da HD ve DD genotipli bireylerin kan ve serumlarında yüksek demir ve kurşun düzeylerine neden olabileceğini öne sürebiliriz.

Çalışmamızda HFE geni H63D polimorfizminin idrar kurşun düzeyi üzerine etkisi de araştırılmış ve DD genotipine sahip bireylerin ($103,00 \pm 136,89$) idrar kurşun düzeyleri HD ($80,31 \pm 67,35$) ve HH ($77,38 \pm 59,83$) genotipli bireylere göre daha yüksek saptanmış olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,778$).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasına, Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesine belli dönemlerde rutin muayene amaçlı başvuran ve mesleksi kurşun maruziyeti bulunan 128 erkek işçi dahil edilmiştir. Kan kurşun düzeyi 35 µg/dL'nin üstünde olan işçilerin idrar kurşun ve serum demir düzeyleri de ölçülerek, HFE gen polimorfizminin bu metal düzeylerine etkisi araştırılmıştır.

İşçilerin ortalama kan Pb düzeyi 56,21±15,29 µg/dL (min:35,00 µg/dL; max:94,40 µg/dL), idrar Pb düzeyi 78,37±62,44 µg/L (min: 7,20 µg/L; max: 261,00 µg/L) ve Fe düzeyleri 309,66±164,06 mg/L (min: 34,00; max:572) olarak tespit edilmiştir. Yapılan korelasyon analizi sonuçlarına göre de, kan Pb ile idrar Pb düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon ($r= 0,456$; $p<0.001$), kan Pb ile serum Fe düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon ($r= -0,286$; $p<0.001$) ve serum Fe ile işçilerin işyerinde çalışma süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon ($r= -0,251$; $p<0.05$) belirlenmiştir.

HFE geni 63. pozisyonundaki polimorfizm analizleri sonucuna göre; işçilerin %84,4'ü ($n=108$) homozigot HH genotipi, %13,3'ü ($n=13$) heterozigot ve %2,3'ü ($n=3$) homozigot DD genotip olarak belirlenmiştir.

Genotip sonuçları ve metal düzeyleri arasındaki ilişki araştırıldığında, HH genotipli, HD genotipli ve DD genotipli işçilerde sırasıyla ortalama **kan kurşun düzeyi** 54,96±14,46 µg/dL, 59,12±16,58 µg/dL ve 84,43±10,54 µg/dL olarak hesaplanırken, ortalama **idrara kurşun düzeyi** sırasıyla, 77,38±59,83 µg/L, 80,31±67,35 µg/L ve 103,00±136,89 µg/L, ortalama **serum demir düzeyi** sırasıyla 300,99±161,58 mg/L, 325,10±168,87 mg/L ve 534,33±48,21 mg/L olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre DD homozigot genotipli bireylerde, HH homozigot ve HD heterozigot genotipli bireylere göre kan Pb ve serum Fe düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edilirken (sırasıyla $p=0,003$ ve $p=0,047$); idrar Pb düzeyi, HD ve DD genotipli bireylerde HH genotipli bireylere göre yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,778$).

Çalışmamıza katılan 128 işçiden 83'ü sigara kullanıyor, 45'i kullanmıyordu. Sigara kullanımı ve kan Pb, idrar Pb ve serum Fe düzeyi arasındaki ilişki istatistiksel olarak analiz edildiğinde, sigara kullanan bireylerde kan Pb ($p=0,0001$) ve idrar Pb ($p=0,0001$) düzeyleri yüksek, serum Fe düzeyi düşük bulunmuştur ($p=0,024$). Bu sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamıza katılan işçiler, aynı işyerinde ve aynı koşullarda, aynı koruyucu ekipmanları kullanarak çalışmaktadırlar. Ancak bazı işçilerin kan Pb düzeyi, idrar Pb düzeyi ve serum Fe düzeyinin diğerlerinden oldukça farklı olduğu tespit edilmiştir. Çalışmadaki amacımız bu farklılıkların HFE H63D gen polimorfizmi ile ilişkisi olup olmadığını araştırmaktı. Sonuç olarak kan Pb ve idrar Pb düzeylerinin HFE H63D polimorfik bireylerde yüksek olduğu, Fe düzeylerinin ise düşük olduğu tespit edilmiştir. Günümüz koşullarında kısıtlayıcı önlemler alınmasına ve birtakım yasal düzenlemeler getirilmesine rağmen ağır metallere maruziyeti sınırlamak mümkün görünmemektedir. Organizmada birikme özelliği olan ve yarılanma ömürleri yıllar süren ağır metallerin neden olduğu yıkıcı toksik etkilerin daha iyi açıklanabilmesi, biyotransformasyonlarındaki genetik farklılıkların belirlenmesi, maruziyetin engellenmesi, koruyucu önlemlerin alınması ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi halk ve işçi sağlığı açısından önemlidir.

Bu çalışma Türk toplumunda HFE gen polimorfizminin ağır metallere maruz kalan işçilerde kan Pb, idrar Pb ve serum Fe düzeylerine etkisinin araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğindedir. Çalışmamızın sonuçlarının, planlanacak daha kapsamlı çalışmalarla kurşun metabolizmasında rol oynayan diğer genetik faktörlerin etkilerinin araştırılmasında yardımcı olacağı düşünülmektedir.

ÖZET

Mesleksel Kurşun Maruziyeti Olan Bireylerde HFE Genindeki Tek Nükleotid Polimorfizminin Kan ve İdrar Kurşun Düzeylerine Etkisi

Kurşun yerkabuğunda bulunan, erime derecesinin düşük olması nedeniyle kolay işlenebilen ve iş yaşamında oldukça yaygın olarak kullanılan en eski metallere biridir. Kurşun toksik bir metaldir ve +2 değerlikli katyon olması nedeni demir, kalsiyum, çinko ve bakır gibi bazı esansiyel metallere birlikte aynı metabolik yolağı izleyebilmektedir. HFE, demir konsantrasyonuna duyarlı olup hücresel düzeyde demir taşınmasından sorumlu olan bir genidir. Düşük demir seviyesi kript ve enterosit hücrelerinde yer alan HFE proteini tarafından algılanarak düzenlenmektedir.

Çalışmada, Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesi'ne rutin kontroller için başvuran ve yüksek kan kurşun düzeyine sahip 128 işçide HFE H63D C→G tek nükleotid polimorfizminin kan Pb, idrar Pb ve serum Fe düzeyine etkisi araştırıldı. Kan ve idrar örneklerindeki Pb düzeyi indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS) ile belirlendi. Ortalama kan Pb, idrar Pb ve serum Fe düzeyleri, sırasıyla 56,21±15,29 µg/dL, 309,66±164,06 mg/L ve 78,37±62,44 µg/L olarak belirlendi. HFE H63D C→G gen polimorfizminin genotiplendirmesi, PCR-RFLP tekniği ile yapıldı. Genotiplendirme sonuçlarına göre, HFE H63D genotip frekansları, %84,4 HH, %13,3 HD ve %2,3 DD olarak belirlendi.

Genotip sonuçları ile metal düzeyleri arasındaki ilişki karşılaştırıldığında, HH genotipli, HD genotipli ve DD genotipli işçilerde sırasıyla ortalama kan kurşun düzeyi 54,96±14,46 µg/dL, 59,12±16,58 µg/dL ve 84,43±10,54 µg/dL olarak hesaplanırken, ortalama idrar kurşun düzeyi sırasıyla, 77,38±59,83 µg/L, 80,31±67,35 µg/L ve 103,00±136,89 µg/L, ortalama serum demir düzeyi sırasıyla 300,99±161,58 mg/L, 325,10±168,87 mg/L ve 534,33±48,21 mg/L olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre DD homozigot genotipli bireylerde, HH homozigot ve HD heterozigot genotipli bireylere göre kan Pb ve serum Fe düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edilirken (sırasıyla p=0,003 ve p=0,047); idrar Pb düzeyi, HD ve DD genotipli bireylerde HH genotipli bireylere göre yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,778).

Bu çalışmada ilk defa Türk toplumunda HFE gen polimorfizminin ağır metallere maruz kalan işçilerdeki kan Pb, idrar Pb ve serum Fe düzeylerine etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarının, planlanacak daha kapsamlı çalışmalarla kurşun metabolizmasında rol oynayan diğer genetik faktörlerin etkilerinin araştırılmasında yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Demir, HFE, idrar, kan, kurşun, mesleksel maruziyet, polimorfizm.

SUMMARY

The Effect of Single Nucleotide Polymorphism in the HFE Gene on Urine and Blood Lead Level in High Level Lead Exposed Individuals

Lead which is found in earth's crust, is one of the ancient metals. That is commonly used in occupational environment due to its easy processable ability and low melting point. Lead is a toxic metal and it can follow same metabolic pathways with essential metals such as iron, calcium, zinc and copper due to its divalent properties. HFE gene is sensitive for iron concentration and it regulates the transport of iron at the cellular level. Low iron level is detected and regulated by HFE protein which is located in crypt and enterocyte cells.

In this study the effect of C→G single nucleotide polymorphism in HFE H63D on blood and urinary Pb levels as well as serum iron levels were evaluated in 128 workers who admitted to the Ankara Occupational Diseases Hospital for routine healthy controls and who had high blood lead levels. Urinary and blood lead levels were measured with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Mean whole blood and urinary Pb levels and serum iron levels were 56.21 ± 15.29 $\mu\text{g/dL}$, 309.66 ± 164.06 mg/L and 78.37 ± 62.44 $\mu\text{g/L}$, respectively. HFE H63D polymorphism was genotyped with PCR-RFLP technique. The genotype frequencies of HFE H63D were 84.4% for HH, 13.3% for HD and 2.3% for DD genotypes.

Blood and urinary lead levels and serum iron levels were compared according to HFE H63D genotypes. The mean blood level was 54.96 ± 14.46 $\mu\text{g/dL}$ for HH genotype, 59.12 ± 16.58 $\mu\text{g/dL}$ for HD genotype and 84.43 ± 10.54 $\mu\text{g/dL}$ for DD genotype. Mean urinary lead levels were detected as 77.38 ± 59.83 $\mu\text{g/L}$, 80.31 ± 67.35 $\mu\text{g/L}$ and 103.00 ± 136.89 $\mu\text{g/L}$ for HH, HD and DD genotypes, respectively. The mean serum iron levels were 300.99 ± 161.58 mg/L , 325.10 ± 168.87 mg/L and 534.33 ± 48.21 mg/L for HH, HD and DD genotypes, respectively. As a result of statistical analysis, blood Pb and serum iron levels of individuals with homozygote DD genotype were higher than individuals with heterozygote HD and homozygote HH genotype and the results were statistically significant ($p=0.003$ and $p=0.047$, respectively). Although, the urinary Pb levels were found to be higher in workers with HD and DD genotypes than those with HH genotype, but this difference could not reach statistical significance ($p=0.778$).

The effect of HFE H63D polymorphism on whole blood lead, urinary lead and serum iron levels was examined for the first time in Turkish workers exposed to toxic metals. We thought that the results of the present study can be used in the future studies that will search the effect of other genetic factors playing roles in lead toxicokinetics.

Key Words: Blood, HFE, iron, lead, occupational exposure, polymorphism.

KAYNAKLAR

- ACGIH T. (2007). BEIs. Threshold limits values for chemical substances and physical agents. Biological exposure indices. *Cincinnati: ACGIH*.
- AGILENT TECHNOLOGIES INC. (2010). Analytical Methods For Graphite Tube Atomizers User's Guide. 7th Edition. Australia.
- AGILENT TECHNOLOGIES INC. (2015) . Advances in ICP-MS Agilent 7900 ICP-MS Series.
- AKDUR R, ÇÖL M, IŞIK A, İDİL A, DURMUŞOĞLU M, TUNÇBİLEK A. (1998). *Halk Sağlığı Ankara: Antip AŞ Yayınları: 453-462*.
- AL KHAYAT A, MENON N, ALIDINA M. (1997). Acute lead encephalopathy in early infancy--clinical presentation and outcome. *Annals of tropical paediatrics, 17: 39-44*.
- AL-NEAMY F, ALMEHDI A, ALWASH R, PASHA M, IBRAHİM A, BENER A. (2001). Occupational lead exposure and amino acid profiles and liver function tests in industrial workers. *International journal of environmental health research, 11: 181-188*.
- AMINOFF M. (2000). Effects of occupational toxins on the nervous system. *Neurology in clinical practice, the neurological disorders. 3rd ed. Butterworth-Heinemann: 1517-1518*.
- ANDREWS, N.C. (2008). Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood, 112(2):219-30*.
- ATSDR (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY). (2005). Toxicological profile for lead.(Draft for public comment). US Department of health and human services. *Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, USA*.
- ATSDR (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY). (2007). Health Effects. In: Toxicological Profile for Lead. *Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, USA. 25-276*.
- AYALA FJ, KIGER FJ. (1980). Modern Genetics. *Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc, California. 601-605*.
- BARRY P. (1981). Concentrations of lead in the tissues of children. *British journal of industrial medicine, 38: 61-71*.

- BARTON JC, EDWARDS CQ, ACTON RT. (2015). HFE gene: Structure, function, mutations, and associated iron abnormalities. *Gene.*, **574(2)**:179-92.
- BARTON JC, PATTON MA, EDWARDS CQ, GRIFFEN LM, KUSHNER JP, ET AL. (1994). Blood lead concentrations in hereditary hemochromatosis. *J Lab Clin Med.*, **124**:193–198.
- BAUCHINGER M, SCHMID E. (1972). Chromosome analysis of cultures of Chinese hamster cells after treatment with lead acetate. *Mutat Res*, **14**: 95-100.
- BECKMAN LE, VAN LANDEGHEM GF, SIKSTROM C, WAHLIN A, MARKEVARN B, HALLMANS G, LENNER P, ATHLIN L, STENLING R, BECKMAN L. (1999). Interaction between haemochromatosis and transferrin receptor genes in different neoplastic disorders. *Carcinogenesis.*, **20(7)**:1231-3.
- BENNETT MJ, LEBRON JA, BJORKMAN PJ. (2000). Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. *Nature.*, **403(6765)**:46-53.
- BEUTLER E. (1997). The significance of the 187G (H63D) mutation in hemochromatosis. *Am J Hum Genet.*, **61(3)**:762-4.
- BİLİR N, İş Sağlığı ve Güvenliği Kitabı (2004). *Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara.*
- BILLICK IH. (1981). Lead: a case study in interagency policy-making. *Environmental Health Perspectives*, **42**: 73.
- BOIGE V, CASTERA L, DE ROUX N, GANNE-CARRIE N, DUCOT B, PELLETIER G, BEAUGRAND M, BUFFET C. (2003). Lack of association between HFE gene mutations and hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Gut*. **52(8)**:1178-81.
- CANDORE G, BALISTRERI CR, LIO D, MANTOVANI V, COLONNA-ROMANO G, CHIAPPELLI M, TAMPIERI C, LICASTRO F, BRANZI A, AVERNA M, CARUSO M, HOFFMANN E, CARUSO C. (2003). Association between HFE mutations and acute myocardial infarction: a study in patients from Northern and Southern Italy. *Blood Cells Mol Dis*. **31(1)**:57-62.
- CHAN-SEOK M, ZUO-WEN Z, SHINICHIRO S, TAKAO W, DEOG-HWAN M, CHAE-UN L, BYUNG-KOOK L, KYU-DONG A, SE-HOON L, MASAYUKI I. (1980). Lead and lead compounds. *IARC Monogr, Eval, Carcinog. Risk Chem. Hum*, **23**: 325-415.
- CHEN J, ENNS CA. (2012). Hereditary hemochromatosis and transferrin receptor 2. *Biochim Biophys Acta.*, **1820(3)**:256-63.

- CHEN L, XU Z, LIU M, HUANG Y, FAN R, SU Y, HU G, PENG X, PENG X. (2012). Lead exposure assessment from study near a lead-acid battery factory in China. *Science of the total environment*, **429**: 191-198.
- CHIA K, JEYARATNAM J, LEE J, TAN C, ONG H, ONG C, LEE E. (1995). Lead-induced nephropathy: relationship between various biological exposure indices and early markers of nephrotoxicity. *American journal of industrial medicine*, **27**: 883-895.
- CHISOLM JJ, KAPLAN E. (1968). Lead poisoning in childhood—comprehensive management and prevention. *The Journal of pediatrics*, **73**: 942-950.
- CLAUDIO L, LEE T, WOLFF MS, WETMUR JG. (1997). A murine model of genetic susceptibility to lead bioaccumulation. *Toxicological Sciences*, **35**: 84-90A.
- CULLEN M, ROSENSTOCK L. (1994). Textbook of clinical occupational and environmental medicine. *Philadelphia: WB Saunders*.
- ÇALIŞMA VE SOSYAL GÜVENLİK BAKANLIĞI. (2013). Kimyasal maddelerle Çalışmalarda Sağlık ve Güvenlik Önlemleri Hakkında Yönetmelik. 12.08.2013 tarihli ve 28733 sayılı *Resmi Gazete*.
- DE KORT W, VERSCHOOR M, WIBOWO A, VAN HEMMEN J. (1987). Occupational exposure to lead and blood pressure: a study in 105 workers. *American journal of industrial medicine*, **11**: 145-156.
- DEEMING S, WEBER CW. (1978). Hair analysis of trace minerals in human subjects as influenced by age, sex, and contraceptive drugs. *Am J Clin Nutr*, **31**: 1175-1180.
- DOWLING T. (1996). Nucleic acids III. Analysis of fragments and restriction sites. *Molecular systematics*, 249-320.
- ELMRGHNI S, DIXON RA, WILLIAMS DR. (2011). Frequencies of HFE gene mutations associated with haemochromatosis in the population of Libya living in Benghazi. *Int J Clin Exp Med*. **4(3)**:200-4.
- EMİR F, ÖZDEN A. (2006). Genetik polimorfizm ve polimorfizm çalışmaları. *Güncel Gastroenteroloji*. **10 (1)**: 24-28.
- FEDER JN, GNIRKE A, THOMAS W, TSUCHIHASHI Z, ve ark. (1996). A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet.*, **13(4)**:399-408.
- FEDER JN, TSUCHIHASHI Z, IRRINKI A, LEE VK, MAPA FA, MORIKANG E, PRASS CE, STARNES SM, WOLFF RK, PARKKILA S, SLY WS,

- SCHATZMAN RC. (1997). The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem.*, **272**:14025–14028.
- FELITTI VJ, BEUTLE, E. (1999). New developments in hereditary hemochromatosis. *Am. J. Med. Sci.*, **318(4)**:257-68.
- FLEMING RE, AHMANN JR, MIGAS MC, WAHEED A, KOEFFLER HP, KAWABATA H, BRITTON RS, BACON BR, SLY WS. (2002). Targeted mutagenesis of the murine transferrin receptor-2 gene produces hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **99**:10653-8.
- FORNI A, CAMBIAGHI G, SECCHI GC. (1976). Initial occupational exposure to lead: Chromosome and Biochemical findings. *Arch Environ Health*, **31**: 73-78.
- GAO J, CHEN J, KRAMER M, TSUKAMOTO H, ZHANG AS, ENNS CA. (2009). Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab.*, **9(3)**:217-27.
- GHANWAT GH, PATIL AJ, PATIL JA, KSHIRSAGAR MS, SONTAKKE A, AYACHIT RK. (2016). Biochemical effects of lead exposure on oxidative stress and antioxidant status of battery manufacturing workers of Western Maharashtra, India. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, **27**: 141-146.
- GHATAK S, Muthukumaran, R.B., Nachimuthu, S. K. (2013). A Simple Method of Genomic DNA Extraction from Human Samples for PCR- RFLP Analysis. *Journal of Biomolecular Techniques* **24**: 224– 231.
- GIDLOW D. (2004). Lead toxicity. *Occupational Medicine*, **54**: 76-81.
- GOCHEE PA, POWELL LW, CULLEN DJ, DU SART D, ROSSI E, OLYNYK JK. A population based study of the biochemical and clinical expression of the H63D hemochromatosis mutation. *Gastroenterology* **2002;122**: 646–51.
- GONZALEZ FJ. (1999). Polymorphisms in xenobiotic metabolism. In Molecular and Applied Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes. *Life Sciences Pharmacogenetics*. **303**: 91-110.
- GOSWAMI T, ANDREWS NC. (2006). Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J Biol Chem.*, **281(39)**:28494-8.

- GOYER R. (1989). Mechanisms of lead and cadmium nephrotoxicity. *Toxicology Letters*, **46**: 153-162.
- GOYER R. (2001). Clarkson. TW Toxic effects of metals. *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*.
- GOYER RA. (1990). Lead toxicity: from overt to subclinical to subtle health effects. *Environmental Health Perspectives*, **86**: 177.
- GRIMSLEY EW, ADAMS-MOUNT L. (1994). Occupational lead intoxication: report of four cases. *Southern medical journal*, **87**: 689-691.
- GROSS CN, IRRINKI A, FEDER JN, ENNS CA. (1998). Co-trafficking of HFE, a nonclassical major histocompatibility complex class I protein, with the transferrin receptor implies a role in intracellular iron regulation. *J Biol Chem.*, **273(34)**:22068-74.
- GULSON BL, JAMESON CW, MAHAFFEY KR, MIZON KJ, PATISON N, LAW AJ, KORSCH MJ, SALTER MA. (1998). Relationships of lead in breast milk to lead in blood, urine, and diet of the infant and mother. *Environmental Health Perspectives*, **106**: 667.
- GUSTAFSON A, HEDNER P, SCHUTZ A, SKERFVING S. (1989). Occupational lead exposure and pituitary function. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, **61**: 277-281.
- HANSON EH, IMPERATORE G, BURKE W. (2001). HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review. *Human Genome Epidemiology. Am. J. Epidemiol.*, **154(3)**:193-206.
- HARTWIG A, SCHLEPEGRELL R, BEYERSMANN D. (1990). Indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammalian cells. *Mutat Res*, **241**: 75-82.
- HIRATA M, YOSHIDA T, MIYAJIMA K, KOSAKA H, TABUCHI T. (1996). Correlation between lead in plasma and other indicators of lead exposure among lead-exposed workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, **68**: 58-63.
- HOLLER SW. Analitik Kimya Temelleri 1. Cilt. *Bilim Yayıncılık*, 71.
- HOPKINS MR, ETTINGER AS, HERNANDEZ-AVILA M, SCHWARTZ J, TELLEZ-ROJO MM, LAMADRID-FIGUEROA H, BELLINGER D, HU H, WRIGH RO. (2008). Variants in iron metabolism genes predict higher blood lead levels in young children. *Environ Health Perspect.*, **116(9)**:1261-6.

- HU H, RABINOWITZ M, SMITH D. (1998). Bone lead as a biological marker in epidemiologic studies of chronic toxicity: conceptual paradigms. *Environmental Health Perspectives*, **106**: 1.
- HU H. (1991). Knowledge of diagnosis and reproductive history among survivors of childhood plumbism. *American Journal of Public Health*, **81**: 1070-1072.
- HUMANS I. (2006). Inorganic and organic lead compounds. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, **87**: 1.
- JANIN Y, COUINAUD C, STONE A, WISE L. (1984). The "lead-induced colic" syndrome in lead intoxication. *Surgery Annual*, **17**: 287-307.
- JENG MR, ADAMS-GRAVES P, HOWARD TA, WHORTON MR, LI CS, WARE, RE. (2003). Identification of hemochromatosis gene polymorphisms in chronically transfused patients with sickle cell disease. *Am J Hematol.*, **74(4)**:243-8.
- JOHNSON FM. (1998).The genetic effects of environmental lead. *Mutat Res.*, **410(2)**:123-40.
- KAHVECİOĞLU O, KARTAL G, GÜVEN A, TİMUR S. (2006). Metallerin Çevresel Etkileri-1. *TMMOB Metalurji Mühendisleri Odası, Metalurji Dergisi*, Sayı 136.
- KALYANASUNDARAM D, KIM JH, YEO WH, OH K, LEE KH, KIM MH, RYEW SM, AHN SG, GAO D, CANGELOSI GA, CHUNG JH. (2013). Rapid extraction and preservation of genomic DNA from human samples. *Anal Bioanal Chem.* **405 (6)**: 1977– 1983.
- KAYAALTI Z, KAYA- AKYÜZLÜ D, SÖYLEMEZ E, SÖYLEMEZOĞLU T. (2015). Maternal hemochromatosis gene H63D single-nucleotide polymorphism and lead levels of placental tissue, maternal and umbilical cord blood. *Environmental Research.* **140**: 456– 461.
- KLUG SW, CUMMINGS RM. (2003). Genetik Kavramlar. Genlerin Kromozom Üzerindeki Organizasyonu. *Palme Yayıncılık.* 553-575.
- KRISTAL-BONEH E, COLLIER D, FROOM P, HARARI G, RIBAK J. (1999). The association between occupational lead exposure and serum cholesterol and lipoprotein levels. *American Journal of Public Health*, **89**: 1083-1087.
- KRUGLYAK L. (1997). The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nature Genetics*, **17**: 21-24.

- LANCRANJAN I, POPESCU HI, GAVANESCU O, KLEPSCH I, SERBANESCU M. (1975). Reproductive ability of workmen occupationally exposed to lead. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, **30**: 396-401.
- LEAD W. (1977). Environmental Health Criteria no 3: Geneva.
- LEBRON JA, BENNETT MJ, VAUGHN DE, CHIRINO AJ, SNOW PM, MINTIER GA, FEDER JN, BJORKMAN PJ. (1998). Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell.*, **93(1)**:111-23.
- LIU J, GOYER RA, WAALKES MP. (2008). Toxic effects of metals. *Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poisons*: 931-979.
- LOPEZ C, PINEIRO A, NUNEZ N, AVAGNINA A, VILLAAMIL E, ROSES O. (2000). Thyroid hormone changes in males exposed to lead in the Buenos Aires area (Argentina). *Pharmacological Research*, **42**: 599-602.
- MAATTA KM, NIKKARI ST, KUNNAS TA. (2015) Genetic variant coding for iron regulatory protein HFE contributes to hypertension, the TAMRISK study. *Medicine (Baltimore)*. **94(4)**:464.
- MAHAFFEY KR, ROSEN JF, CHESNEY RW, PEELER JT, SMITH CM, DELUCA HF. (1982). Association between age, blood lead concentration, and serum 1,25-dihydroxycholecalciferol levels in children. *Am J Clin Nutr*, **35**: 1327-1331.
- MANTOVI P, BONAZZI G, MAESTRI E, MARMIROLI N. (2003). Accumulation Of Copper And Zinc From Liquid Manure In Agricultural Soils And Crop Plants. *Plant And Soil*, **250**: 249-257.
- MARTINS R, SILVA B, PROENCA D, FAUSTINO P. (2011). Differential HFE gene expression is regulated by alternative splicing in human tissues. *PLoS One.*, **6(3)**:17542.
- MAY TW, WIEDMEYER RH. (1998). A Table of polyatomic interferences in ICP-MS. *Atomic Spectroscopy-Norwalk Connecticut*, **19**: 150-155.
- MCGREGOR A, MASON H. (1990). Chronic occupational lead exposure and testicular endocrine function. *Human & Experimental Toxicology*, **9**: 371-376.
- MCINTIRE MS, WOLF GL, ANGLE CR. (1973). Red cell lead and δ -amino levulinic acid dehydratase. *Clinical Toxicology*, **6**: 183-188.
- MERRYWEATHER-CLARKE AT, POINTON JJ, JOUANOLLE AM, ROCHETTE J, ROBSON KJ. (2000). Geography of HFE C282Y and H63D mutations. *Genetic Test.*, **4(2)**:183-198.

- MEYER PA, BROWN MJ, FALK H. (2008). Global approach to reducing lead exposure and poisoning. *Mutat Res.*, **659(1-2)**:166-75.
- MILACIC R, KRALJ B. (2003). Determination Of Zn, Cu, Cd, Pb, Ni And Cr In Some Slovenian Foodstuffs. *European Food Research And Technology*, **217**: 211-214.
- MURRAY NE. (2000). Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**: 412-434.
- NORDBERG G, FOWLER B, NORDBERG M, FRIBERG L. (2007). Handbook on the toxicology of metals, 3rd edn. *Academic, Boston*.
- NTP U. (2003). Report On Carcinogens Background Document For Lead And Lead Compounds (Us Department Of Health And Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program (Ntp)).
- NUSSBAUM R, MCINNES R, WILLARD H. (2001). Genetic variation in populations. *Thompson and Thompson Genetics in Medicine. 6th Edition. Philadelphia: WB Saunders Company*.
- OLIVEIRA ED. (2003). Sample Preparation For Atomic Spectroscopy: Evolution And Future Trends. *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, **14**: 174-182.
- PANTOPOULOS K. (2008). Function of the hemochromatosis protein HFE: Lessons from animal models. *World J. Gastroenterol.*, **14(45)**:6893-901.
- PAPANIKOLAOU NC, HATZIDAKI EG, BELIVANIS S. (2005). Lead toxicity update. A brief review. *Med Sci Monit.*, **11(10)**: 329-336.
- PARKKILA S, WAHEED A, BRITTON RS, BACON BR, ZHOU XY, TOMATSU, S, FLEMING RE, SLY WS. (1997a). Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. *Proc. Natl. Acad Sci. USA.*, **94 (24)**:13198-202.
- PARKKILA S, WAHEED A, BRITTON RS, FEDER JN, TSUCHIHASHI Z, SCHATZMAN RC, BACON BR, SLY WS. (1997b). Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **94 (6)**:2534-9.
- PAUSTENBACH D, GALBRAITH D. (2006). Biomonitoring and biomarkers: exposure assessment will never be the same. *Environ Health Perspect.*, **114(8)**:1143-9.

- PEARSON P. (1984). Restriction fragment length polymorphisms (RFLP's) and their use in mapping the human genome. *Progress in Clinical and Biological Research*, **177**: 23-36.
- PHILIP AT, GERSON B. (1994). Lead poisoning--Part I. Incidence, etiology, and toxicokinetics. *Clinics in Laboratory Medicine*, **14**: 423-444.
- PIETRANGELO A, CAMASCHELLA C. (1998). Molecular genetics and control of iron metabolism in hemochromatosis. *Haematologica*, **83(5)**:456-61.
- PIETRANGELO A. (2003). Haemochromatosis. *Gut*, **52 (2)**: 23-30.
- PIRKLE JL, SCHWARTZ J, LANDIS JR, HARLAN WR. (1985). The relationship between blood lead levels and blood pressure and its cardiovascular risk implications. *American Journal of Epidemiology*, **121**: 246-258.
- POPENOE EA, SCHMAELER MA. (1979). Interaction of human DNA polymerase beta with ions of copper, lead, and cadmium. *Arch Biochem Biophys*, **196**: 109-120.
- POREBA R, GAC P, POREBA M, ANDRZEJAK R. (2011). Environmental and occupational exposure to lead as a potential risk factor for cardiovascular disease. *Environ Toxicol Pharmacol*, **31(2)**:267-77.
- POWELL LW, SUBRAMANIAM VN, YAPP TR. (2000). Haemochromatosis in the new millennium. *J. Hepatol.*, **32(1)**:48-62.
- PUSTERLA JE, MADIGAN AND CM, LEUTENEGGER. (2006). Real-Time Polymerase Chain Reaction: A Novel Molecular Diagnostic Tool for Equine Infectious Diseases N. *J Vet Intern Med*. **20**: 3-12.
- ROBERTSON W. (2000). Chronic poisoning: Trace metals and others. *Cecil's Textbook of Medicine*. Goldman L, Bennett JC (eds.) WB Saunders Co: 70-72.
- ROM WN, MARKOWITZ SB. (2007). *Environmental and occupational medicine*: Lippincott Williams & Wilkins.
- ROSEN JF, CHESNEY RW, HAMSTRA A, DELUCA HF, MAHAFFEY KR. (1980). Reduction in 1,25-dihydroxyvitamin D in children with increased lead absorption. *N Engl J Med*, **302**: 1128-1131. doi:10.1056/nejm198005153022006.
- RUDNER N, BRADY M. (1988). Children with elevated lead levels. *Journal of Pediatric Health Care*, **2**: 46-49.
- SAFETY O, ADMINISTRATION H. (1978). Occupational exposure to lead--final standard. *Federal Register*, **43**: 52988.

- SAITOH M, UZUKA M, SAKAMOTO M, KOBORI T. (1969). Rate of hair growth. *Advances in Biology of Skin*, **9**: 183-201.
- SANCHEZ M, BRUGUERA M, RODES J, OLIVA R. (2001). Complete characterization of the 3' region of the human and mouse hereditary hemochromatosis HFE gene and detection of novel splicing forms. *Blood Cells Mol Dis.*, **27(1)**:35-43.
- SANDERS T, LIU Y, BUCHNER V, TCHOUNWOU PB. (2009). Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: a review. *Rev Environ Health.*, **24(1)**:15-45.
- SARYAN LA, ZENZ C. (1994). Lead and its compounds. *Occupational Medicine*, **3**: 506-541.
- SCHMIDT PJ, TORAN PT, GIANNETTI AM, BJORKMAN PJ, ANDREWS NC. (2008). The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab.*, **7(3)**:205-14.
- SINGH B, CHANDRAN V, BANDHU HK, MITTAL BR, BHATTACHARYA A, JINDAL SK, VARMA S. (2000). Impact of lead exposure on pituitary-thyroid axis in humans. *Biometals*, **13**: 187-192.
- SINGH B, DHAWAN D, NEHRU B, GARG M, MANGAL P, CHAND B, TREHAN P. (1994). Impact of lead pollution on the status of other trace metals in blood and alterations in hepatic functions. *Biological Trace Element Research*, **40**: 21-29.
- SIROVER MA, LOEB LA. (1976). Infidelity of DNA synthesis in vitro: screening for potential metal mutagens or carcinogens. *Science*, **194**: 1434-1436.
- SKOCZYNSKA A, SMOLIK R, JELEN M. (1993). Lipid abnormalities in rats given small doses of lead. *Archives of Toxicology*, **67**: 200-204.
- SKREB Y, HABAZIN-NOVAK V. (1975). Reversible inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in human cells by lead chloride. *Toxicology*, **5**: 167-174.
- SMRKOLJ P, POGRAJC L, HLASTAN-RIBIC C, STIBILJ V. (2005). Selenium Content In Selected Slovenian Foodstuffs And Estimated Daily Intakes Of Selenium. *Food Chemistry*, **90**: 691-697.
- SOHDA T, OKUBO R, KAMIMURA S, OHKAWARA T. (2001). Hemochromatosis with HFE gene mutation in a Japanese patient. *Am. J. Gastroenterol.* **96**: 2487-8.

- SOMASHEKARAIHAH B, VENKAIHAH B, PRASAD A. (1990). Biochemical diagnosis of occupational exposure to lead toxicity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **44**: 268-275.
- STAUDINGER KC, ROTH VS. (1998). Occupational lead poisoning. *American Family Physician*, **57**: 719-726, 731-712.
- SULLIVAN JR JB, KRIEGER GB, THOMAS RJ. (1992). Hazardous Materials Toxicology: Clinical Principles of Environmental Health. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, **34**: 365-371.
- SZYMANSKA-CHABOWSKA A, LACZMANSKI L, JEDRYCHOWSKA I, CHABOWSKI M, GAC P, JANUS A, GOSLAWSKA K, SMYK B, SOLSKA U, MAZUR G. (2015). The relationship between selected VDR, HFE and ALAD gene polymorphisms and several basic toxicological parameters among persons occupationally exposed to lead. *Toxicology*, **334**: 12-21.
- T.C. MİLLİ EĞİTİM BAKANLIĞI (2012). Kimya Teknolojisi Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi. Ankara.
- TAYLOR A. (1986). Usefulness of measurements of trace elements in hair. *Annals of Clinical Biochemistry: An International Journal of Biochemistry in Medicine*, **23**: 364-378.
- THOMAS R. (2008). Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners, CRC Press, Boca Raton, 2nd edn.
- THOMAS R. (2013). Practical Guide To Icp-MS: A Tutorial For Beginners: Crc Press.
- TIWARI S, TRIPATHI IP, TIWARI HL. (2014). Blood Lead Level -A Review. *International Journal of Scientific Engineering and Technology.*, **3(4)**: 330-333.
- TOLA S, NORDMAN C. (1977). Smoking and blood lead concentrations in lead-exposed workers and an unexposed population. *Environmental Research*, **13**: 250-255.
- VALIENTE L, PICCINNA M, ALE ER, GRILLO A, SMICHOWSKI P. (2002). Determination Of Selenium In Dietary Supplements By ETTAS And Hg-AAS: A Comparative Study. *Atomic Spectroscopy-Norwalk Connecticut*-, **23**: 129-134.
- VARIAN BASIC ATOMIC ABSORPTION THEORY AUSTRALIA PTY LTD (A.C.N. 004 559 540)1997.
- VELİCANGİL S. (1980). Koruyucu ve Sosyal Tıp. *Filiz Kitabevi*: 364-368.

- VICTERY W, TYROLER H, VOLPE R, GRANT L. (1988). Summary of discussion sessions: symposium on lead-blood pressure relationships. *Environmental Health Perspectives*, **78**: 139.
- VUJIC SPASIC M, KISS J, HERRMANN T, KESSLER R, STOLTE J, GALY B, RATHKOLB B, WOLF E, STREMMEL W, HENTZE MW, MUCKENTHALER MU. (2007). Physiologic systemic iron metabolism in mice deficient for duodenal Hfe. *Blood.*, **109(10)**:4511-7.
- VUJIC, M. (2014). Molecular basis of HFE-hemochromatosis. *Front. Pharmacol.*, **11**:5-42.
- WAHEED A, PARKKILA S, SAARNIO J, FLEMING RE, ZHOU XY, TOMATSU S, BRITTON RS, BACON BR, SLY WS. (1999). Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **96(4)**:1579-84.
- WANG JCC, WANG A, GAO J, CAO S, SAMAD I, ZHANG D, RITLAND C, CUI JZ, MATSUBARA JA. (2012). Technical Brief: Isolation of total DNA from postmortem human eye tissues and quality comparison between iris and retina. *Molecular Vision*. **18**: 3049- 3056.
- WELZ B, SPERLING M. (2008). *Atomic Absorption Spectrometry*: John Wiley & Sons.
- WEYERMANN M, BRENNER H. (1997). Alcohol consumption and smoking habits as determinants of blood lead levels in a national population sample from Germany. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, **52**: 233-239.
- WHITFIELD JB, DY V, MCQUILTY R, ZHU G, MONTGOMERY GW, FERREIRA MA, DUFFY DL, NEALE MC, HEIJMANS BT, HEATH AC, MARTIN NG. (2007). Evidence of genetic effects on blood lead concentration. *Environ Health Perspect.*, **115(8)**:1224-30.
- WHITTINGTON CA, KOWDLEY KV. (2002). Review article: haemochromatosis. *Aliment Pharmacol Ther.*, **16 (12)**:1963-75.
- WILLIAMS S J, HAYWARD NK. (2001). The impact of the human genome project on medical genetics. *Trends in Molecular Medicine*. **7(5)**: 187-231.
- WILSON IG. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3741-3751.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2000). Air quality guidelines for Europe.
- WRIGHT RO, SHANNON MW, WRIGHT RJ, HU H. (1999). Association between iron deficiency and low-level lead poisoning in an urban primary care clinic. *American Journal of Public Health*, **89**: 1049-1053.
- WRIGHT RO, SILVERMAN EK, SCHWARTZ J, TSAIH SW, SENTER J, SPARROW D, WEISS ST, ARO A, HU H. (2004). Association between hemochromatosis genotype and lead exposure among elderly men: the normative aging study. *Environ Health Perspect*. **112(6)**:746-50.
- WRIGHT RO, TSAIH SW, SCHWARTZ J, WRIGHT RJ, HU H. (2003). Association between iron deficiency and blood lead level in a longitudinal analysis of children followed in an urban primary care clinic. *J Pediatr*. **142(1)**:9-14.
- WRIGHT RO. (1999). The role of iron therapy in childhood plumbism. *Current Opinion in Pediatrics*, **11**: 255-258.
- YEH JH, CHANG YC, WANG JD. (1995). Combined electroneurographic and electromyographic studies in lead workers. *Occupational and Environmental Medicine*, **52**: 415-419.
- ZHANG F, LIU Y, ZHANG H, BAN Y, WANG J, LIU J, ZHONG L, CHEN X, ZHU B. (2016). Investigation and Evaluation of Children's Blood Lead Levels around a Lead Battery Factory and Influencing Factors. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **13**: 541.
- ZIEGLER EE, EDWARDS BB, JENSEN RL, MAHAFFEY KR, FOMON SJ. (1978). Absorption and retention of lead by infants. *Pediatric Research*, **12**: 29-34.

EKLER



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
Ankara İli Kamu Hastaneleri Birliği 2 Nolu Genel Sekreterliği
Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Baştabipliği
Klinik Araştırma Etik Kurulu

Sayı : B.10.4.ISM.4.06.68.49/

09.09.2015

Konu: Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Etik Kurul Kararı

KEÇİÖREN EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMA ETİK KURULU

"Mesleksi Yüksek Kurşun Maruziyeti Olan Bireylerde Ağır Metal Toksikokinetiğinde Rol Oynayan Gen Polimorfizmlerinin Kurşun Düzeylerine Etkisi" adlı klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına ve kurulumuz kararının sağlık bakanlığına arzına gerek olmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.

Op.Dr. Ömer Faruk TANER
Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurul
Pınarbaşı Mahallesi Sanatoryum Cad.
Ardahan Sokak No:25 Keçiören / ANKARA
Web: www.akgah.gov.tr

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Mesleksi Yüksek Kurşun Maruziyeti Olan Bireylerde Ağır Metal Toksikokinetiğinde Rol Oynayan Gen Polimorfizmlerinin Kurşun Düzeylerine Etkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 2012-AKAEK-15
	AÇIK ADRESİ:	Pınarbaşı Mah. Sanatoryum Cad. Ardehan Sok. No:25 06380 Keçiören / Ankara
	TELEFON	0312 356 90 00-1117
	FAKS	
	E-POSTA	etikkurulkeah@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Uzman Doktor Ceylan BAL			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Klinik Biyokimya			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	S.B. TKHK Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesi			
	DESTEKLEYİCİ	TÜBİTAK PROJESİ			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	Uzman Doktor Ceylan BAL			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 4	<input type="checkbox"/>		
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma	<input checked="" type="checkbox"/>	Bireysel araştırma projesi			
Diger ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: **Op.Dr.Ömer Faruk TANER**
İmza:

ASLI GİBİDİR
Zeliha KIZILGİLGE
Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Mesleki Yüksek Kurşun Maruziyeti Olan Bireylerde Ağır Metal Toksikokinetiğinde Rol Oynayan Gen Polimorfizmlerinin Kurşun Düzeylerine Etkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dil			
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	06.07.2015	PRO 1.1	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU Hasta Grubu Kontrol Grubu	06.07.2015 06.07.2015	1.1 1.1	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama					
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>					
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>					
	İLAN	<input type="checkbox"/>					
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>					
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>					
	GUVENLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>					
	DİĞER:	<input type="checkbox"/>					
KARAR BELGELERİ	Karar No:905	Tarih: 09.09.2015					
Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.							

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Op.Dr.Ömer Faruk TANER

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilgili		Katılma*	İmza
Op.Dr.Ömer Faruk TANER Bşk	Plastik Ve Rekonstrüktif Cerrahi	Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Baran ACAR Bşk.Yardımcısı	Kulak Burun Boğaz Hastalıkları	Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Doç.Dr. ,Derun Taner ERTUĞRUL Bilgilendirmede görevli üye	Endokrinoloji	Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Prof. Dr Ahmet ERGÜN	Fizyoloji	Ankara Önv. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Op.Dr.Ömer Faruk TANER
İmza:

ASLI GİRİŞİ
Zelma ÖZDİLGE
Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Sekreteri

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Mesleki Yüksek Kurşun Maruziyeti Olan Bireylerde Ağır Metal Toksikokinetiğinde Rol Oynayan Gen Polimorfizmlerinin Kurşun Düzeylerine Etkisi							
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		-							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kararı	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Katılım *	İmza	
Prof. Dr. Mehmet Ali ERGÜN	Tıbbi Genetik	Gazi Üniv. Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mustafa N. İLHAN	Halk Sağlığı, İş Ve Meslek Hastalıkları	Gazi Üniv. Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Ecz. Dr. İyıl ÖZAKCA	Farmakoloji (PhD)	Ankara Üniv. Ecz. Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Nermin ÇAPAN	Göğüs Hastalıkları	Atatürk Göğüs Hst. Ve Göğüs Cer. E.A.H.	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Op. Dr. Selim Şakir Erken GÜLHAN	Göğüs Cerrahisi	Atatürk Göğüs Hst. Ve Göğüs Cer. E.A.H.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Semih DEĞERLİ	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Şamil HIZLI	Çocuk Gastroenteroloji	Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Selma UYSAL RAMADAN	Radyodiagnostik	Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Av. Abdullah Emin TEKİN	Avukat	Serbest	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Necmettin TEKİN	Din Görevlisi	Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

*:Toplantıda Bulunma

ASLI GİRİDİ
Zelma ÖZBİLGE
Başkan Yardımcısı ve Üyesi
Etik Kurul Başkanı

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Op. Dr. Ömer Faruk TANER
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Asım
Soyadı : Hocaoğlu
Doğum Yeri ve Tarihi : Trabzon, 1977
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresi : Ertuğrulgazi Mah. Şehit İsmail Kılıç Sok, No:9/6 Cebeci Ankara
E-Posta : asimhocaoglu@hotmail.com

II- Eğitim Bilgileri

1992-1995 Ankara Lisesi
1995-1999 Lisans/Biyolog, Hacettepe Üniversitesi / Ankara
2001-2004 Yüksek Lisans/Uzman Biyolog Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biy. ve Genetik ABD

III- Mesleki Deneyimi

2002-2003 Biyolog/SSK Başkanlığı Buca Seyfi Demirsoy Hastanesi
2003-2011 Biyolog/ T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesi
2011-2016 Biyolog/ T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu
2016- Daire Başkanı/ T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu

IV-Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

2016- Sosyal Güvenlik Kurumu Tıbbi Cihaz Ödeme Komisyonu Yedek Üyesi

V- Bilimsel Bildiri ve Makaleler

- Ulusal bilimsel toplantılarda 1 adet sözel bildiri.
- Ulusal ve Uluslararası bilimsel toplantılarda 7 adet yazılı bildiri.
- Ulusal hakemli dergilerde yayımlanmış 2 adet bilimsel makale.

YAYINLAR ve PROJELER

- C.Bal, A. Hocaoğlu, M. Büyükşekerci, O. Torun Güngör, L. Tutkun, O. H. Yılmaz. Neutrophil Lymphocyte Ratio in Benzene Exposed Workers. P-05-28. In Abstracts of the 51th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), Toxicology Letters 2015-13-16 S149
- M. Büyükşekerci, C.Bal, A. Hocaoğlu, M. E. Alagüney, O. H. Yılmaz, E. Tutkun. Copper, Selenium, Zinc and Chromium Status in Occupational Manganese Exposed Workers. P-05-21. In Abstracts of the 51th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), Toxicology Letters 2015-13-16 S147
- M. E. Alagüney, C.Bal, A. Hocaoğlu, M. Büyükşekerci, L. Tutkun, O. H. Yılmaz. The Trace Element Pattern in Occupational Lead Exposed Workers. P-05-22. In Abstracts of the 51th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), Toxicology Letters 2015-13-16 S147
- A.Hocaoğlu, C. Bal, M. Ercan, A. Böke, L. Tutkun, O. H. Yılmaz. Evaluation of Gamma Glutamyltransferase Status in Arsenic Exposed Workers. P-05-24. In Abstracts of the 51th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), Toxicology Letters 2015-13-16 S148
- M. Büyükşekerci, C. Bal, M. E. Alagüney, E. R.Ağış, M. Gündüzöz, A. Hocaoğlu, L. Tutkun, Ö. H.Yılmaz. Evaluation of folate and vitamin B12

levels in lead exposed workers Dicle Med J 2015;42(3): 294-298
Doi:10.5798/diclemedj.0921.2015.03.0577

- C. Bal, M. Büyükşekerci, M. Ercan, A. Hocaoglu, H. T. Çelik, S. Abuşoğlu, E. Tutkun, Ö. H.Yılmaz. Farklı Selenyum Seviyelerinin tiroid sentezi üzerine etkisi, Doi:10.5505/Turk Hijyen.2015.17037
- Asım Hocaoglu, Osman Arıkan Nacar. Tıbbi Cihaz klinik Araştırmaları ve Performans Değerlendirme Çalışmalarında Temel İlkeler Böl.1 Klinik Araştırmalar Kitabı, Editör Prof. Dr. Hamdi Akan, Bilimsel Tıp Yayınevi, 2014
- Asım Hocaoglu, “Klinik Araştırmalarda Etik ve Yasal Sorumluluklar” Sözlü Sunum 1. Adli Toksikoloji Kongresi 29-30/11/2014
- C. Bal, A. Hocaoglu, M. Ercan, M. Gündüzöz, S. Abuşoğlu, H. Yılmaz, E. Tutkun, "Benzen Maruziyeti Olan İşçilerin Biyokimyasal ve Hematolojik Olarak İncelenmesi" Adli Bilimler Bahar Sempozyumu, 2014
- A. Hocaoglu, C. Bal, H.T. Çelik, S. Abuşoğlu,H.Yılmaz,E. Tutkun. Mean platelet volume level in chromium exposed workers. P-2.3. In Abstracts of the 50th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), Toxicology Letters 2014-09-10 229 Supplement:S93
- A. Hocaoglu, A. G. Demir, C. Göker, O. A. Nacar, I. Koksal, A. S. Septioglu. Medical device clinical investigations and performance evaluation studies in Turkey Turkish Medicine and Medical Devices Agency, WHO- 2013