



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**MESLEKİ OLARAK ARSENİĞE MARUZ KALAN  
BİREYLERDEKİ GLUT1 GEN  
POLİMORFİZMİNİN İDRAR ARSENİK  
DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

**Fezile ÖZDEMİR**

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI**

**ADLİ KİMYA VE ADLİ TOKSİKOLOJİ PROGRAMI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Zeliha KAYAALTI**

**2014- ANKARA**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MESLEKİ OLARAK ARSENİĞE MARUZ KALAN  
BİREYLERDEKİ GLUT1 GEN  
POLİMORFİZMİNİN İDRAR ARSENİK  
DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

**Fezile ÖZDEMİR**

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI  
ADLİ KİMYA VE ADLİ TOKSİKOLOJİ PROGRAMI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Zeliha KAYAALTI**

**2014- ANKARA**

**KABUL ve ONAY**

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Arsenik	1
1.1.1. Arseniğin Tarihçesi ve Kullanım Alanları	2
1.1.2. Arseniğin Bileşikleri	3
1.1.2.1. Organik ve İnorganik Arsenik Bileşikleri	3
1.1.2.2. Arsenik Maruziyeti	4
1.1.3.1. Maruziyet Kaynakları	4
1.1.3.1.1. Su Kaynaklı Maruziyet	5
1.1.3.1.2. Hava Kaynaklı Maruziyet	5
1.1.3.1.3. Toprak Kaynaklı Maruziyet	6
1.1.3.2. Maruziyet Yolları	6
1.1.4. Arseniğin Toksikokinetiği	9
1.1.4.1. Absorbsiyon	9
1.1.4.2. Dağılım	10
1.1.4.3. Metabolizma	11
1.1.4.3.1. Arsenatın Arsenite İndirgenmesi	12
1.1.4.3.2. Arseniğin Metilasyonu	14
1.1.4.4. Atılımı	16

1.1.4.5. Depolanması	16
1.1.5. Arseniğin Toksisitesi	17
1.1.5.1. Akut Toksisitesi	17
1.1.5.2. Kronik Toksisitesi	18
1.1.6. Arseniğin Karsinogenik Etkileri	19
1.1.7. Zehirlenmenin Tanımlanması ve Biyolojik İndikatörler	20
1.1.8. Tedavi	20
1.1.9. Arseniğin Toksikokinetiğine Etki Eden Genetik Faktörlerin Önemi	21
1.1.10. Glukoz Taşıyıcı Proteini (Glut1)	21
<b>1. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>	<b>23</b>
2.1. Gereçler	23
2.1.1. Kullanılan Araçlar ve Gereçler	23
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	24
2.1.3. Deney Protokolü	25
2.1.3.1. Çalışma Grubu	25
2.1.3.2. Biyolojik Örneklerin Toplanması	26
2.1.4. Yöntem	26
2.1.4.1. Arsenik Analizi	26
2.1.4.1.1. Arsenik Düzeyinin Belirlenmesi İçin Yapılan Ön İşlemler	26
2.1.4.1.2. İdrar Örneklerinden Arsenik Analizi	27
2.1.4.2. Glut1 Genotiplerinin PCR- RFLP Yöntemi İle Belirlenmesi	31
2.1.4.2.1. Sıvı Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu	31
2.1.4.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	33
2.1.4.2.2.1. Primerler	36
2.1.4.2.2.2. PCR Programı	37

2.1.4.2.3. PCR Ürünleri İçin Agaroz Jel Elektroforezinin Hazırlanması	38
2.1.4.2.4. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi	39
2.1.4.2.4.1. HpyCH4V Restriksiyon Enzimi ile Kesim İşlemi	40
2.1.4.2.5. Restriksiyon İşlemi ile İnkübasyondan Sonra Agaroz Jel Elektroforezinin Hazırlanması	41
2.1.4.2.6. İstatistiksel Analiz	42
<b>3. BULGULAR</b>	43
3.1. Arseniğe Maruz Bireylerde Glut1 A2841T Polimorfizm Analiz Sonuçları	43
3.2. Arseniğe Maruz Kalan Bireylerde Glut1 A2841T İdrar Arsenik Polimorfizmi Sonuçları ile İdrar Arsenik Düzeylerinin Karşılaştırılması	45
<b>4. TARTIŞMA</b>	47
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	52
<b>ÖZET</b>	54
<b>SUMMARY</b>	55
<b>KAYNAKLAR</b>	56
<b>EKLER</b>	63
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	65

## ÖNSÖZ

Bu çalışmada, mesleki olarak sürekli arseniğe maruz kalan bireylerde, arseniğin taşınmasında ve özellikle idrarla atılımında rol oynayan Glut1 A2841T tek nükleotid polimorfizminin (Single Nucleotide Polymorphism: SNP), idrar arsenik düzeyine etkisi araştırılmıştır. İdrardaki arsenik düzeyi atomik absorpsiyon spektrometri yöntemi ile ölçülmüş ve gen polimorfizmleri PCR- RFLP yöntemi ile belirlenmiştir. Dünya genelinde ve son yıllarda ülkemizdeki kronik arsenik maruziyetine bağlı hastalıkların ve kanser gelişimine bağlı olarak; çalışmamızda arsenik toksikokinetiğinde rol oynayan genetik mekanizmaların aydınlatılması amaçlanmıştır.

Hayatımın önemli dönüm noktalarından birini oluşturan, kapısını çaldığım günden itibaren tüm akademik bilgi ve birikimini benimle paylaşan, tüm çalışmalarında bana yol gösteren, yetiştiren, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, gölgesinde yetismekten büyük onur duyduğum değerli danışman hocam **Doç. Dr. Zeliha KAYAALTI**'na,

Laboratuvar çalışmalarında ve yüksek lisans eğitimim boyunca zamanını, sabrını, yardımını esirgemeyen, tüm kalbi iyilikle dolu değerli hocam **Dr. Dilek Kaya AKYÜZLÜ**'ye,

Tüm hayatım boyunca bana inan, her zaman yanımda olup beni destekleyen **AİLEME** sonsuz teşekkürler...

**SİMGELER ve KISALTMALAR**

µg	Mikrogram
A	Adenin
AAS	Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi
AQP	Aquagliseroporinler
As	Arsenik
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Arsenik Trioksit
AS3MT	Arsenik 3-metiltransferaz
AsH <sub>3</sub>	Arsin
AsIII	Arsenit
AsV	Arsenat
ATG	arsenik triglutasyon
ATP	Adenozin trifosfat
bp	Base pair= baz çifti
C	Sitozin
CAREX	CARcinogen EXposure
DMAG	Dimetil Arsenik Glutasyon
DMAIII	Dimetil arsinöz asit
DMAV	Dimetil arsenik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	deoksiribonükleozid trifosfat'lar
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
F primer	Forward Primer (İleri doğru olan primer)
g	Gram
G	Guanin
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GLUT1	Glukoz Transporter 1
GR	Glutasyon redüktaz enzimi
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon disülfid



GST	Glutasyon-S-transferaz
HNO <sub>3</sub>	Nitrik asit
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPSF	Yüksek Performanslı Tuz Free (High Performance Salt Free)
IA	İnorganik Arsenik
IARC	The International Agency for Research on Cancer
kDa	kilo Dalton
kg	kilogram
L	Litre
m <sup>3</sup>	Milimetre küp
MADG	Monometil Arsenik Diglutasyon
mg	Miligram
ml	Milimetre
MMAIII	Monometilarsonoz asit
MMAV	Monometilarsonik asit
MRP	Multidrug-Resistance Associated Protein
NADPH	Nikotinamid dinükleotit fosfat
ng	Nanogram
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health
PCR	Polymerase Chain Reaction
PNP	Pürin Nükleozit Fosforilaz
ppb	Milyarda bir birim
ppm	Milyonda bir birim
R primer	Reverse Primer (Aksi yönde olan primer)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	Revolutions per minute
SAM	S-adenozil-metiyonin
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SNP	Tek nükleotid poimorfizm (Single Nucleotid Polymorphism)
T	Timin
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris EDTA

UV	Ultra viyole
WHO	World Health Organization

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.1.</b>	Arseniğin atom numarası ve ağırlığı ile saf arseniğe ait görüntü.	1
<b>Şekil 1.2.</b>	Arsenik içerikli tōrapatik amaçlı kullanılan sabun	2
<b>Şekil 1.3.</b>	Bazı organik ve inorganik arsenik bileşiklerini kimyasal yapısı	4
<b>Şekil 1.4.</b>	İçme sularındaki arsenik konsantrasyonu yüksek olan bazı ülkelerde ki durum	7
<b>Şekil 1.5.</b>	Arsenik ile kontamine olmuş yer altı suyu ve toprakta yetişen bitkinin doğrudan ya da dolaylı olarak insana ulaşmasını gösteren besin zinciri.	8
<b>Şekil 1.6.</b>	Arseniğin hücre içine alınması ve metilasyonu	11
<b>Şekil 1.7.</b>	Hücre içi tiyol- glutatyonların (GSH) arsenatı arsenite indirgemesi sonucu arsenitle birlikte tri- GSH kompleksinin oluşumu	12
<b>Şekil 1.8.</b>	AsV'in bir arsenat redüktaz olan Cdc25B enzimi ile AsIII'e indirgenmesi	13
<b>Şekil 1.9.</b>	Arseniğin oksidatif (klasik) metilasyonu ve indirgeyici (alternatif) yolakla metilasyonu	15
<b>Şekil 1.10.</b>	Deride hiperkeratozis ve tırnaklarda Mee's çizgilerine ait görüntü	17
<b>Şekil 1.11.</b>	Kronik arsenik maruziyetine bağlı oluşan siyah ayak hastalığı	18
<b>Şekil 1.12.</b>	Glukozun Glut1 yardımı ile hücre içine alınması	22
<b>Şekil 2.1.</b>	Grafit fırınlı AAS cihazının işleyişini gösteren şema	28
<b>Şekil 2.2.</b>	Arsenik Analizine Ait Kalibrasyon Eğrisi	29
<b>Şekil 2.3.</b>	PCR'in Aşamaları	34
<b>Şekil 2.4.</b>	PCR'in Basamakları	35

- Şekil 2.5.** Glut1 genine ait 337bp'lik amplifikasyon ürünü. 39
- Şekil 2.6.** Glut1 A2841T genotipleme için PCR ile amplifiye edilen 337bp'lik baz dizilimi, HpyCH4V primerleri ve tek nokta mutasyonu. 41
- Şekil 2.7.** 337 bp'lik PCR ürününün HpyCH4V enzimi ile kesimi sonucunda oluşan oligonükleotidler ve uzunlukları. 42
- Şekil 3.1.** Glut1 A2841T gen polimorfizmi ve idrar arsenik düzeyi arasındaki ilişki. 46

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 1.1.</b> Kırsal, şehir merkezi ve endüstriyel faaliyetlerin yapıldığı bölgelerin havasındaki arsenik düzeyleri.	6
<b>Çizelge 2.1.</b> Grafit fırın sıcaklık programı.	28
<b>Çizelge 2.2.</b> Biyolojik örneklerde arsenik analizi için Varian AA240Z Zeeman Atomik Absorbsiyon Spektrometre cihazında uygulanan metod.	30
<b>Çizelge 2.3.</b> Fenol- Kloroform İzolasyon yönteminde kullanılan enzim ve proteinler ve görevleri.	31
<b>Çizelge 2.4.</b> PCR bileşenleri ile stoktaki ve reaksiyondaki konsantrasyonları	36
<b>Çizelge 2.5.</b> Glut1 A2841T gen bölgelerinin çoğltılması için kullanılan F ve R primerler ait özellikler.	37
<b>Çizelge 2.6.</b> Glut1 Gen bölgesinin amplikasyonunda kullanılan PCR programı.	37
<b>Çizelge 2.7.</b> Glut1 gen polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan restriksiyon enzimi ve kesim ürünlerinin uzunlukları.	40
<b>Çizelge 3.1.</b> Arseniğe maruz bireylerin Glut1 A2841T polimorfizmine ait genotip frekansları.	44
<b>Çizelge 3.2.</b> Arseniğe maruz bireylerin Glut1 A2841T gen polimorfizmi ile oluşan alel frekansları.	44
<b>Çizelge 3.3.</b> Çalıştığımız populasyonun Glut1 A2841 gen polimorfizmine ait alel ve genotip verilerinin Hardy- Weinberg dengesine uyumunun göstergesi.	45
<b>Çizelge 3.4.</b> Arseniğe maruz bireylerde Glut1 A2841T polimorfizmi sonucu AA, AT ve TT genotipleri ile idrar arsenik düzeylerinin istatistiksel değerlendirilmesi.	45
<b>Çizelge 3.5.</b> İdrar arsenik düzeyi ile Glut1 A2841T polimorfizmi sonucunda oluşan AA ve AT+ TT genotipleri arasındaki ilişki	46

# 1.GİRİŞ

## 1.1. Arsenik

Çevrede doğal olarak bulunan arsenik, periyodik cetvelin VA sınıfında yer almakta ve As simgesiyle ifade edilmektedir. Arseniğin atom numarası 33, atom ağırlığı ise 74,92 g/mol' dür. (Hughes ve ark., 2011; Gribble ve ark., 2012). Fizikokimyasal olarak hem metallere hem de ametallere benzerlik gösteren arsenik metaloid olarak sınıflandırılmaktadır (Hughes ve ark. 2011; ATSDR, 2007).



**Şekil 1.1.** Arseniğin atom numarası ve ağırlığı ile saf arseniğe ait görüntü. (<http://www.mindat.org/min-357.html>).

Kokusuz, çelik grisi bir renge sahip olan arsenik, doğada genel olarak inorganik formda bulunmaktadır. Klorin, oksijen veya sülfür ile birleşen arsenik bileşikleri, inorganik arsenik bileşikleri olarak adlandırılır iken; yapısında karbon ve hidrojen bulunduran arsenikli bileşikler ise organik arsenikli bileşikler olarak tanımlanmaktadır (ATSDR, 2007).

### 1.1.1. Arseniğin Tarihçesi ve Kullanım Alanları

Farsça bir kelime olan “Zarnikh” kelimesinden türeyen ve Yunanca’ ya “Sarı zırnık” yani “Arsenikon” olarak geçen arsenik yüzyıllar boyunca “Kralların zehri ve zehirlerin kralı” olarak ün yapmıştır. Tarih içinde ilk kez Albertus Magnus tarafından izole edilen arsenikli bileşikler, ilk başlarda terapötik amaçlarla kullanılmıştır. Organik arsenikler, spiroket ve protozoolardan kaynaklanan; inorganik arsenik bileşikleri ise lösemi, sedef hastalığı, bronşiyal astım kaynaklı hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (Liu ve ark., 2008; Hughes ve ark., 2011).



**Şekil 1.2.** Arsenik içerikli tōrapatik amaçlı kullanılan sabun. (<http://kingofpoisons.com/2012/11/16/arsenic-can-make-you-beautiful-2/>).

Arsenik kokusuz, tatsız, renksiz olmasıyla içecek ve yiyeceklere kolaylıkla karıştırılabildiğinden, cinayet ve intihar aracı olarak kullanılarak, Orta ağ dönemine damgasını vurmuştur (Liu ve ark., 2008; Hughes ve ark., 2011). Analitik toksikolojinin öncüsü olarak kabul edilen Marsh testi, 1840 yılında kocasını arsenik içeren yiyecekler ile zehirleyen Marie LaFarge davasında gündeme gelmiş olup, arseniğın kalitatif olarak belirlendiğı ilk çalışmadır (Hughes ve ark., 2011).

Bunların yanı sıra sanayide tahta koruyucu olarak, madencilikte, metalürjide, cam üretimi ile yarı iletken maddelerin üretilmesi sırasında, bilgisayar çiplerinde, boyalarda da arsenikten yararlanılmıştır. Madencilik alanında; kurşun, bakır rezervlerinin eritilmesi sırasında yan ürün olarak ortaya çıkabilmektedir. Tarım zararlılarına karşı herbisit, pestisit, insektisitlerin içeriğinde ayrıca, pamuk kurutucu

ve yaprak dökücü özelliğinden dolayı tarım alanında da oldukça tercih edilmektedir. Kümes hayvanları ve domuzların kilolarını artırmak ve onları hastalıklardan korumak için besin katkı maddesi olarak parazit ilaçlarının ve deri koruyucuların içinde arsenikli bileşiklerinden yararlanılmıştır. Zaman içinde bazı kişisel bakım eşyalarında, oyuncaklarda, mumlarda, gıdalarda da arsenik kullanılmıştır (IARC, 2011; ATSDR, 2007; Hughes ve ark., 2011).

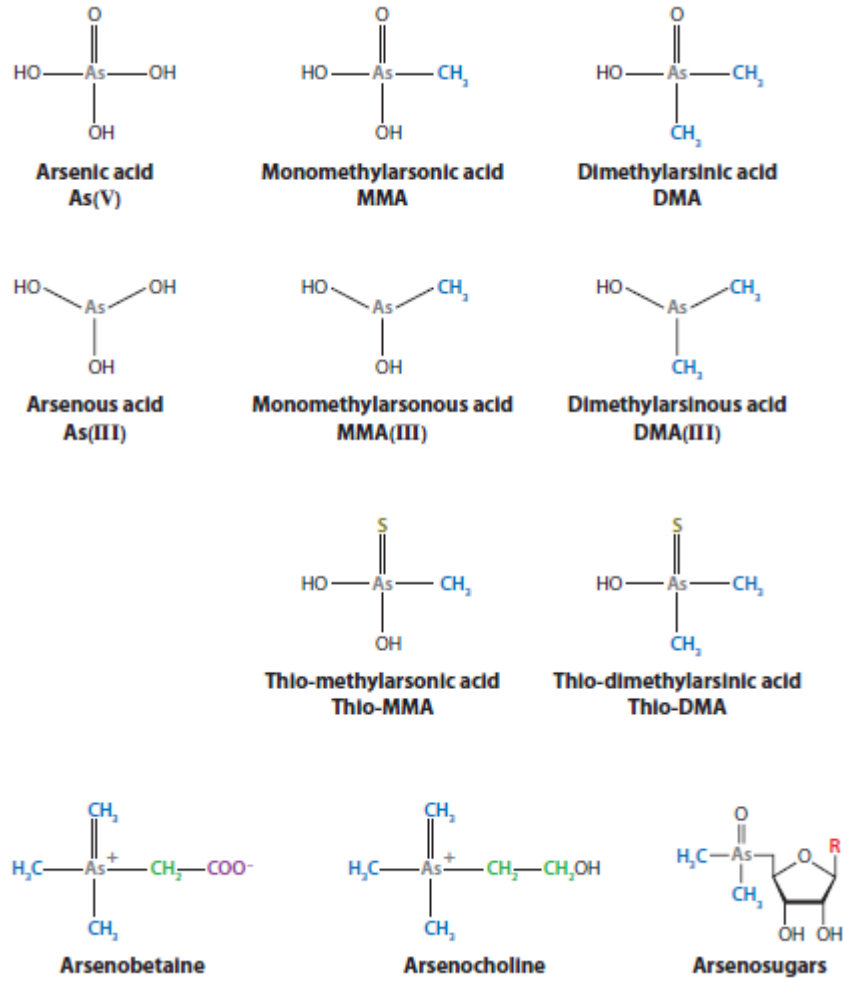
### **1.1.2. Arsenik Bileşikleri**

Arsenik doğada çok kolay bir şekilde okside olabilmektedir. Dört oksidasyon basamağı (-3, 0, +3 ve +5) olan arseniğin doğada en çok +3 ve +5 değerlikli formları bulunmaktadır (Liu ve ark., 2008; WHO, 2011). Ortamın pH değeri, redoks potansiyeli, mikrobiyal aktivitenin varlığı, potasyum, kalsiyum, demir, sülfür gibi iyonların varlığı arseniğin oksidasyonunu etkileyen önemli faktörlerdir (Bissen ve Frimmel, 2003).

#### **1.1.2.1. Organik ve İnorganik Arsenik Bileşikleri**

Doğada başlıca inorganik halde bulunan arsenik, bir takım seri tepkimeler sonucu organik foruma dönüşebilmektedir. Bununla birlikte arsin gazı ( $AsH_3$ ) şeklinde de bulunabilmektedir. Organik arsenikli bileşikler metil veya dimetil türevleri şeklinde iken inorganik yapıdaki arsenikli bileşikler ise arsenit ( $As^{+3}$ ) veya arsenat ( $As^{+5}$ ) şeklindedir (Rossman, 2003; Vural, ; Vahter 2009; Watanebe ve Hirano, 2012). Şekil 1.3'te bazı arsenik bileşiklerinin kimyasal yapısı verilmiştir.





**Şekil 1.3.** Bazı organik ve inorganik arsenik bileşiklerini kimyasal yapısı (Vahter, 2009).

### 1.1.3. Arsenik Maruziyeti

#### 1.1.3.1. Maruziyet Kaynakları

Yeryüzünde en çok bulunan 20. element olan arsenik doğal olarak veya antropojenik olarak doğaya salınabilmektedir. Madencilik faaliyetleri, fosil yakıt kullanımı, endüstriyel faaliyetler, tarım zararlılarını yok etmek için kullanılan pestisit, herbisit, fungusit gibi tarım ilaçları arsenik kaynaklarının üçte ikisini oluşturan antropojenik kaynaklardır. Volkanik aktiviteler, bitki atıkları, tozlar, düşük sıcaklıklı buharlaşma arseniğin doğal kaynaklarıdır (IARC, 2011; Basu ve ark., 2001). İnsanlar, arseniğe

daha çok su yolu ile maruz kalabildiği gibi toprak veya hava yolu ile de arseniğe maruziyet gerçekleşebilmektedir (IARC, 2011).

#### **1.1.3.1.1. Su Kaynaklı Maruziyet**

Yüzey sularında başlıca arsenat (AsV), oksijensiz yer altı sularında ise arsenit (AsIII) formunda bulunan arseniğin konsantrasyonu ve formu suyun oksijen kapasitesine, suyun kaynağına, suyun arsenik kaynağına uzaklığına veya biyolojik aktiviteye göre değişiklik gösterebilmektedir (IARC, 2011; Watanabe ve Hirano, 2012). Nehir ve göl gibi su kaynaklarındaki arsenik konsantrasyonu 10 µg/L'den az iken, sülfid minerallerin ve volkanik bölgelerdeki arsenik düzeyi 3mg/L, antropojenik kaynaklara yakın yerlerdeki su kaynaklarının arsenik düzeyleri ise 5 mg/L' den fazla olabilmektedir (IARC,2011).

#### **1.1.3.1.2. Hava Kaynaklı Maruziyet**

Volkanik veya antropojenik aktiviteler sonucu arsenik bileşikleri havaya karışabilmektedir. Doğal olarak volkanik aktiviteler sonucunda meydana gelen sızıntılar, toz partikülleri hava kaynaklı doğal arsenik maruziyetini göstermektedir. Arsenik içerikli pestisitlerin kullanımı, madencilik faaliyetleri gibi insan faaliyetleri sonucunda da havadaki arsenik düzeyinde değişiklik olabilmektedir. Özellikle maden yataklarının nemlendirilmesi işlemi sırasında havaya çok miktarda arsin gazı (AsH<sub>3</sub>) salınmaktadır (IARC, 2011; Vural, 2005; WHO, 2011). Endüstriyel aktivitelerin çok olduğu bölgelerde 5 değerlikli arsenik başta olmak üzere 3 ve 5 değerlikli inorganik arsenik karışımları bulunmaktadır (IARC, 2011; WHO, 2011). Çizelge 1.1.'de çeşitli bölgelerin havasındaki arsenik düzeyleri verilerine ait değerler sunulmuştur.

**Çizelge 1.1.** Kırsal, şehir merkezi ve endüstriyel faaliyetlerin yapıldığı bölgelerin havasındaki arsenik düzeyleri (IARC, 2011).

Bölge	Arsenik düzeyi (ng/m <sup>3</sup> )
Kırsal bölge havası	0.02
Şehir merkezi havası	3- 200
Endüstriyel bölge yakınlarındaki hava	>1000

### 1.1.3.1.3. Toprak Kaynaklı Maruziyet

Doğal olarak bol oksijenli topraklarda arsenat (AsV) formunda bulunan arsenik, oksijenin az olduğu bölgelerde daha çok üç değerlikli yani arsenit şeklinde bulunmaktadır. EPA verilerine göre toprakta müsaade edilebilir değer 24 mg/kg olarak belirlenmesine karşın; doğada jeolojik oluşumlara bağlı olarak arsenik seviyesi 1- 40 mg/kg arasında değişiklik gösterebilir. Ayrıca pestisit kullanımı veya endüstriyel faaliyetler sonucu antropojenik kaynaklardan çevreye salınan arsenik sonucu toprağın arsenik düzeyi 5- 3000 mg/kg' a kadar ulaşabilmektedir (IARC, 2011; Singh ve ark., 2015; Hughes, 2011).

### 1.1.3.2. Maruziyet Yolları

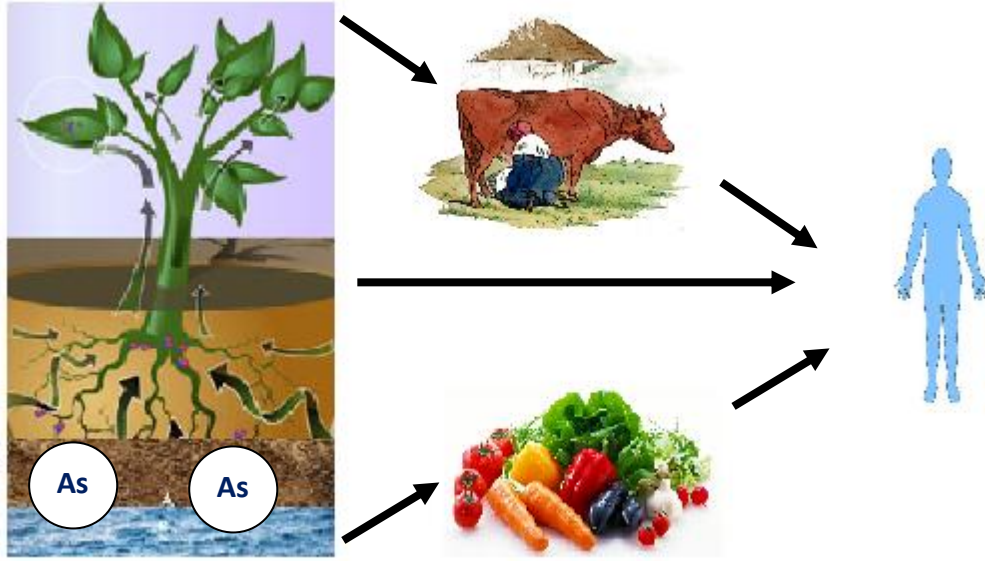
Arseniğe inhalasyonla, deriden absorpsiyonla, oral veya gastrointestinal yolla; kazara, intihar, cinayet amacı ile veya mesleki olarak maruz kalabilmekteyiz. En çok maruziyet As ile kontamine olmuş içme sularının tüketilmesi ile olmaktadır. WHO verilerine göre suda bulunmasına izin verilen arsenik konsantrasyonu  $\leq 10 \mu\text{g/L}$  ve maksimum kabul edilebilir değer ise  $50 \mu\text{g/L}$  olarak belirlenmiştir (Basu ve ark. 2001; Vural, 2005; Liu ve ark., 2008). Bangladeş, Çin, Hindistan, Arjantin, Meksika, Tayvan, Vietnam, Şili, Avustralya' nın bazı bölgeleri ve endüstriyel faaliyetlerin çok olduğu Japonya, Tayland ve Brezilya' nın bazı bölgelerindeki su kaynakları, arsenik ile kontamine olmuş başlıca maruziyet kaynaklarıdır. Türkiye' de ise Ege ve döküm işçiliğinin çok olduğu Kütahya bölgelerinde yer altı ve içme sularında arsenik

düzeyi yüksek konsantrasyonda bulunmuştur (Ünlü ve ark., 2011; Başkan ve Pala, 2009). Su kaynaklarında ve toprakta, kemolitotrofik arsenit oksitleyici mikroorganizmalar veya arsenat- indirgeyici prokaryotların indirgenme veya oksitlenme aktiviteleri sonucu arsenik konsantrasyonları artış göstermektedir (IARC, 2011; Watanabe ve Hirano, 2012) (Şekil 1.4.).



**Şekil 1.4.** İçme sularındaki arsenik konsantrasyonu yüksek olan bazı ülkelerdeki durum (Reich, 2011).

Bunun yanı sıra As içeren su ile yetiştirilen veya As ile kontamine olmuş toprakta yetişen bitkiler veya arsenikli pestisit ile muamele olmuş gıdaların tüketilmesi sonucu As'e maruz kalabilmektedir. Meyve, sebze ve deniz ürünlerinde organik arsenik bileşikleri; süt ürünlerinde, kümes hayvanları ve diğer hayvan etlerinde ve gevreklerde ise inorganik arsenik bileşikleri daha fazla bulunmaktadır (IARC, 2011; WHO, 2011). Ülkemizde İzmir bölgesinde bulunan deniz canlılarında arseniğe rastlanmıştır (Küçüksezgin ve ark., 2014



**Şekil 1.5.** Arsenik ile kontamine olmuş yer altı suyu ve toprakta yetişen bitkinin doğrudan ya da dolaylı olarak insana ulaşmasını gösteren besin zinciri.

Pestisit, herbisit gibi tarım ilaçlarının üretiminin yanı sıra arsenik cevheri bulunan paslanmaz metallerin dökümünün yapıldığı fabrikalarda ve kömür yakıtlı santrallerde çalışan işçi gruplarında, başta inhalasyonla ve deri yolu ile olmak üzere mesleki maruziyet görülebilmektedir (Vural, 2005; Liu ve ark., 2008; IARC, 2011). 1981- 1983 yılları arasında arsenik ve arsenik bileşiklerine maruz kalan işçilerin sayısını belirlemek amacıyla Amerika’da bulunan Ulusal Mesleksel Güvenlik ve Sağlık Kuruluşu (National Institute for Occupational Safety and Health) tarafından yapılan araştırmada 70,000 (16,000’i kadın) işçinin arsenik ve türevlerine maruz kaldığı saptanmıştır. Avrupa’da ise CAREX (Carcinogen Exposure) verilerine göre 147,569 işçi; Kanada’da ise 25,000 işçi arsenik ve bileşiklerine mesleki olarak maruz kalmaktadır (IARC, 2011). Türkiye’de metalürji işçilerinde yapılan analizlerde mesleki maruziyet sonucu işçilerin saçlarında arseniğe rastlanmıştır (Türksoy, 2013).

#### **1.1.4. Arseniğin Toksikokinetiği**

Arseniğin absorpsiyonunu, vücuttaki dağılımını, metabolizmasını ve atılımını içeren metabolik olayların tümü arseniğin toksikokinetiğini oluşturmaktadır. Buna ilaveten toksik maddenin hangi dozda ne kadar süre canlıda bulunur ise toksisiteye neden olabileceğini belirtmektedir. Toksikiteyi, toksik maddenin enzimler, reseptörler gibi hedef bölgelere bağlanma afiniteleri yani toksikodinamikleri de etki etmektedir (Liu ve ark., 2008; Özyazgan, 2002).

##### **1.1.4.1. Absorpsiyon**

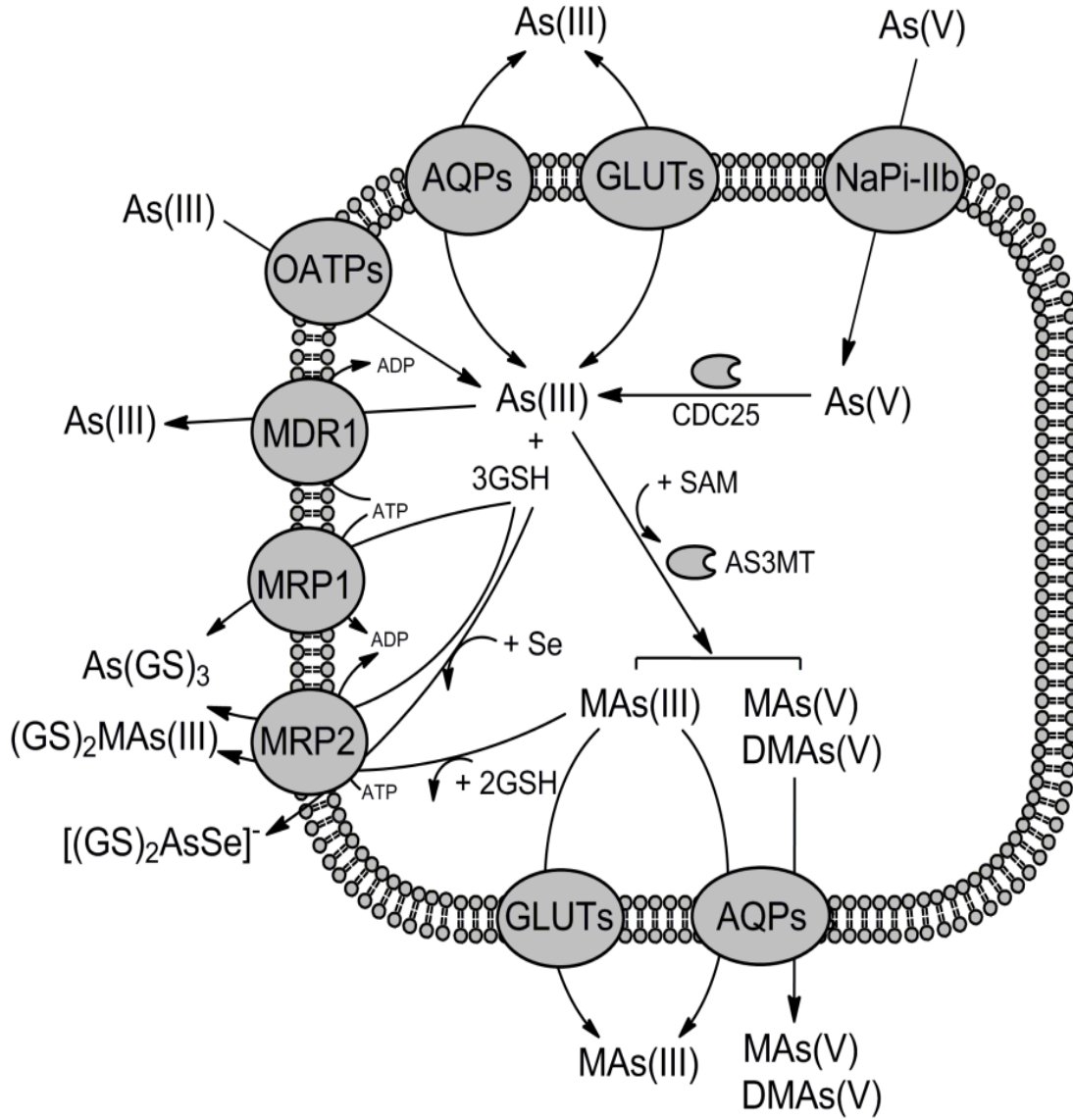
Arseniğe maruziyet başlıca gastrointestinal yolla, daha az ise inhalasyon ve deriden absorpsiyonla gerçekleşmektedir. Mesleki olarak arseniğe maruz kalanlarda inhalasyon başlıca maruziyet yoludur. Arsenik bileşiğinin partikül büyüklüğüne, çözünürlüğüne ve kimyasal yapısına göre absorpsiyonunda değişiklik gözlemlenebilir. İnhalasyonla alınan arsenik partikülleri üst solunum yollarında toplanır ve siller yardımı ile gastrointestinal bölgeye taşınır. Partiküller %80 oranında akciğer ve gastrointestinalde absorbe edilirler. Havada bulunan arsenik çoğunlukla +3 değerlikli formda olup, döküm işçileri genellikle arsenik trioksit ( $As_2O_3$ ) maruz kalmaktadır (ATSDR, 2005; IARC, 2011; Yağmur ve Hancı, 2002; Şanlı ve Kaya, 1984). Nefes alma hızı  $20 m^3$  olarak göz önüne alındığında, inhalasyonla maruz kalan arsenik konsantrasyonu kırsal bölgelerde 20- 200 ng/gün, endüstriyel faaliyetlerin olmadığı bölgelerde ise 400- 600 ng/gün olduğu tahmin edilmektedir (IARC, 2011).

Besinler ve içeceklerden alınan günlük toplam arsenik konsantrasyonu genellikle 20-300  $\mu g$ 'dır (IARC, 2011). Oral yolla alınan düşük çözünürlüğe sahip olan arsenik trioksit, kurşun arsenit ve galyum arsenit gibi bileşiklere göre oral yolla alımda daha az absorbe olur (Liu ve ark., 2008).

Bağırsaklardan arseniğin absorpsiyonunda pKa ve pH değerleri önemli birer kriter olup, arseniğin bağırsaklardan absorpsiyonu için gerekli olan en uygun pH değeri yaklaşık olarak 5'tir. Absorbe olan arsenik ve metabolitleri karaciğer, böbrek, dalak ve akciğer gibi organlarda birikir (Silver ve Misra, 1984; WHO, 2011).  $As^{+3}$  (arsenit),  $As^{+5}$  e (arsenat) göre hücelere daha hızlı alınmaktadır. Arsenatlar hücre içine girdiği zaman arsenite dönüştürülmekte, daha sonra ise metilasyona uğramaktadırlar. Metilasyon sonucunda MMAIII, MMAV, DMAV oluşmaktadır (Rosen ve Liu, 2009; IARC, 2011). Arsenit, arsenata; metilenmiş arsenikli bileşikler de arsenite göre daha toksik özelliktedir (Liu ve ark., 2006; Sumi ve Himeno, 2012). Fiziko- kimyasal yapısı fosfata benzerlik gösteren arsenatın hücre içine alınması fosfat kanalları ile olur iken,  $As^{III}$  ve metilenmiş arsenik bileşikleri ise hücre zarı kanal proteinleri olan aquagliseroporinler (AQP, başlıca AQP9) aracılığıyla pasif taşıma yoluyla hücreye alınmaktadır. Bunun yanı sıra AQP'lerin az bulunduğu beyin, kalp, böbrek gibi organlarda, eritrositlerde ve epitelyum hücrelerinde MMAIII, arsenit ve diğer metilenmiş arsenikli bileşiklerin taşınmasında glukoz taşıyıcı protein GLUT1 ve GLUT4 de rol oynamaktadır (Rosen ve Liu, 2009; Zangi ve Filella, 2012; Dziubinska ve ark., 2012) (Şekil 1.6).

#### 1.1.4.2. Dağılımı

Absorbe olan arsenik ve bileşikleri kanda globüne bağlanarak taşınır (Vural, 1984). Maruziyet düzeyi ve arseniğin değeri, dokulara dağılımında etkili olan parametrelerdir (Hulla, 2014). Başlıca karaciğerde metabolize olan arsenik sırasıyla en çok karaciğer, böbrek, kas, kalp, dalak, pankreas, akciğerler ve cerebellumda depolanmaktadır (ATSDR, 2005).  $As^{III}$  böbrek, karaciğer, safra kesesinde, beyinde ve iskelet sisteminde 2- 25 kat daha fazla bulunmaktadır (Hulla, 2014). Bununla birlikte sülfidril gruplarına yüksek afinitesi olan arsenik, kronik maruziyette keratine zengin olan saç, tırnak gibi dokularda birikmektedir (ATSDR, 2005).



**Şekil 1.6.** Arseniğin hücre içine alınması ve metilasyonu (Dziubinska ve ark., 2012).

### 1.1.4.3. Metabolizması

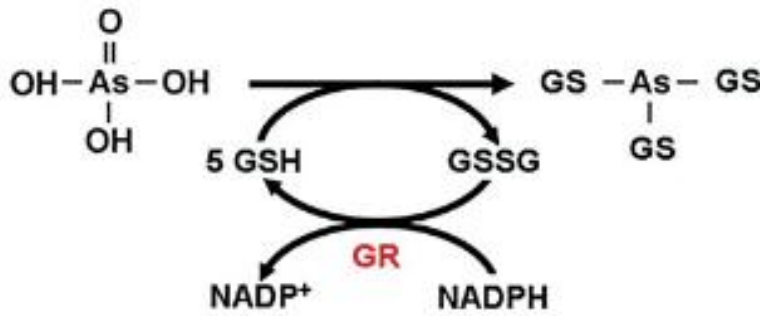
Arsenik maruziyeti sonrasında inorganik arseniğin (iAs) biyotransformasyonu, canlılarda maruziyet sonrasında meydana gelecek olan zararlı etkilerin ve arsenik maruziyetine bağlı gelişen hastalıkların ortaya çıkmasında büyük önem taşımaktadır (Bailey ve ark., 2013). Arsenik biyometilasyonu iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşama AsV içeren bileşiklerin indirgenmesini, ikinci aşama ise AsIII içeren



bileşiklerin metillenmesini kapsamaktadır (Drobná ve ark., 2010). Arseniğin metilasyonu esas olarak karaciğerde, daha az olarak ta böbrekte gerçekleşmektedir (Stamatelos ve ark., 2011; Rossman, 2003). Ölümcül dozda arsenik trioksitle zehirlenmiş bir kişinin çeşitli dokularında yapılan arsenik analizlerinde; en fazla arsenik karaciğerde, daha az ise böbrekte ve kas dokusunda bulunmuştur. Dokulardaki arsenik düzeyleri sırasıyla 147 µg/g, 26,6 µg/g ve 12,3 µg/g olup diğer organlardaki ve kandaki arsenik konsantrasyonu ise 10 µg/g'in altında tespit edilmiştir (Drobná ve ark., 2010).

#### 1.1.4.3.1. Arsenatın (AsV) Arsenite (AsIII) İndirgenmesi

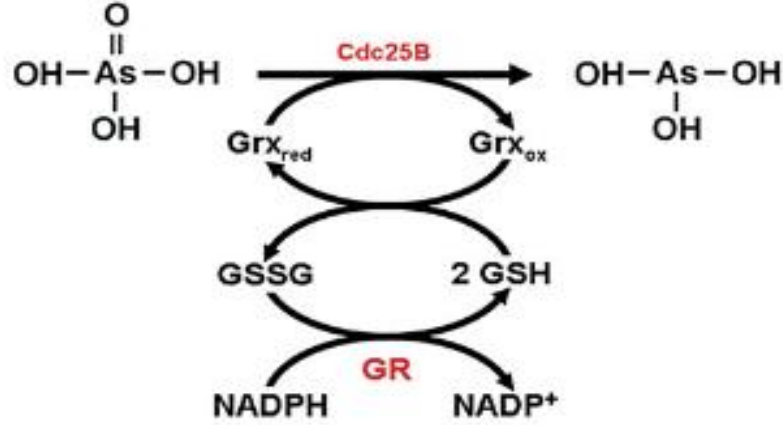
Çevrede yaygın bir forum olarak bulunan arsenat direkt olarak metillenmemektedir. 5 değerlikli olan arsenatın metillenebilmesi için öncelikle kendisine göre daha toksik, üç değerlikli forum olan arsenite indirgenmesi gerekmektedir (Rossman,2003). Bu indirgenme reaksiyonu için literatürde farklı mekanizmaların olduğu gösterilmiştir. Enzimler olmadan gerçekleşen indirgenme yolağında glutatyon (GSH) gibi tiyoller AsV' i AsIII' e indirgeyebilmektedir ve tri- glutatyon (tri-GSH) kompleksini oluşturmaktadır. (Rossman, 2003; IARC, 2011).



**Şekil 1.7.** Hücre içi tiyol- glutatyonların (GSH) arsenatı arsenite indirgenmesi sonucu arsenitle birlikte tri- GSH kompleksinin oluşumu (Thomas, 2010).

Arsenat redüktazlar, AsV'in AsIII'e iki elektron indirgenmesini katalizlemektedir. Ökaryotlarda glutaredoksin ve glutatyon, indirgeyici arsenik

redüktaz olarak görev alırken; memelilerde ise Cdc25B enzimi arsenik redüktaz olarak işlev görmektedir. İnsanlarda bulunan bir tirozin trifosfataz olan Cdc25B enzimi glutaredoksini ( $\text{Grx}_{\text{red}}$ ) kullanarak arsenatı arsenite indirgemektedir. Okside olan glutaredoksin ise glutatyon redüktaz enzimi (GR) ve GSH'ın yardımıyla GSH disülfide (GSSG) indirgenmektedir (Thomas, 2010; Bhattacharjee ve ark., 2010).



**Şekil 1.8.** AsV'in bir arsenat redüktaz olan Cdc25B enzimi ile AsIII'e indirgenmesi (Thomas, 2010).

Glutatyon konsantrasyonu göz önüne alındığı zaman bu yolak yavaş ilerlemektedir. Ancak tiyollerin varlığında pürin nükleozit fosforilaz (PNP), gliseraldehit- 3- fosfat dehidrogenaz, glikojen fosforilaz a, fosfotransasetilaz ve arseniz S- adenzilmetiltransferaz gibi bazı enzimlerin yardımı ile arsenatın indirgenmesi hızlandırılabilir (Bhattacharjee ve ark., 2010; Rossman, 2003; Thomas, 2010). Yapılan çalışmalarda bu enzimlerin doğrudan arsenatı arsenite indirgemediği; ilk olarak arsenatı kararsız arsenillenmiş ürünlere dönüştürdükleri gösterilmiştir. Bu kararsız ürünler de ditiotritol (DTT) veya glutatyon gibi tiyollerle daha hızlı bir şekilde arsenite indirgenmektedir (Gregus ve ark., 2009). Pürin nükleozit trifosfat enzimi ise indirgenme reaksiyonu için bir tiol ve bir kofaktöre ihtiyaç duymaktadır. Ancak, bu kofaktör henüz tanımlanmamıştır. Sıçanlar üzerine yapılan bir çalışmada, PNP'nin fosfat yerine arsenatı kullanarak, arsenatı doğrudan arsenite indirgediği gösterilmiştir (Gregus ve Nemeti, 2002).

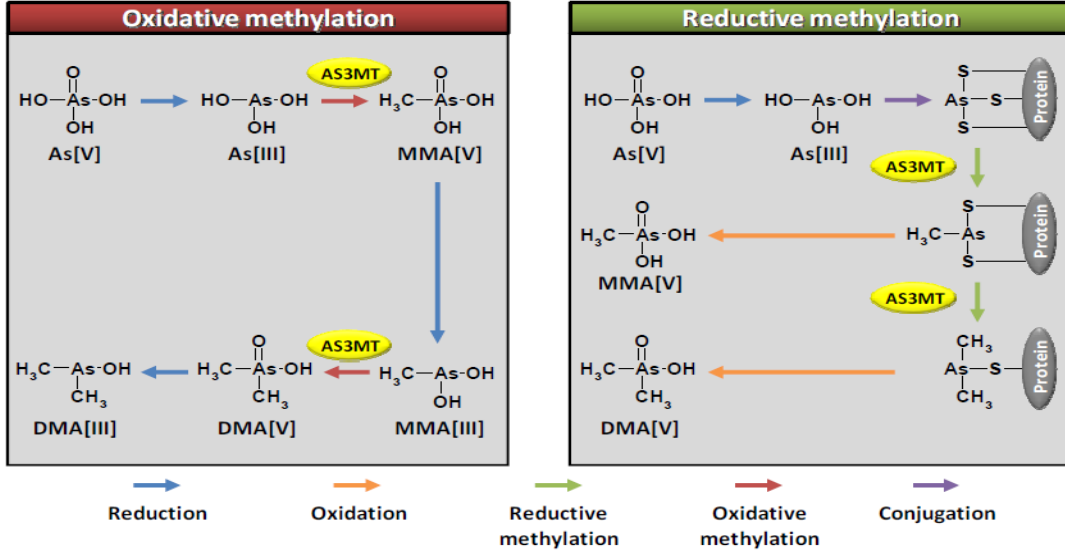
### 1.1.4.3.2. Arseniğin Metilasyonu

Biyotransformasyonda önemli bir basamak olan metilasyon sonucunda, AsV ve AsIII'e göre hem daha toksik hem de atılımı daha çok olan metilenmiş arsenik bileşikleri meydana gelmektedir. Burada inorganik formların metilasyonu sonucu daha toksik arsenik bileşikleri (MMAV ve DMAV) olduğu için bu olay " inorganik arseniğin detoksifikasyonu" olarak adlandırılmaktadır (Bhattacharjee ve ark., 2013; Thomas, 2010; Rossman; 2003).

Literatürde arsenitin metilasyonunda iki yolak bulunmaktadır. Klasik yolak olarak ta bilinen oksidatif metilasyonda, 2 metilasyon ve 3 indirgenme tepkimesi sonucu metilasyon meydana gelmekte ve son ürün olarak dimetil arsinöz asit (DMAIII) oluşmaktadır. Bu yolakta monometilarsenik asit (MMAV) gibi +5 değerlikli oksidatif bileşikler, dimetil arsinöz asit (DMAIII) gibi +3 değerlikli bileşiklerden önce oluşmakta, bu da diğer yolak ile aradaki farklardan biridir. Metilasyon sırasında gerekli olan metil grubu S- adenozil-metiyonin (SAM)' den sağlanmaktadır (Drobná ve ark, 2010; Rossman; 2003). Arsenat, arsenite indirgendikten sonra metilasyonun ilk basamağında SAM metil grubunu enzimatik olarak arsenite transfer eder ve MMAV oluşur. Glutasyon- S- transferaz omega sınıfı 1- 1 (GSTO1- 1) enzimi, glutasyonu indirgeyici olarak kullanarak, MMAV'nin DMAIII'e indirgenmesini katalizlemektedir. Daha sonra ise 3- metiltransferaz (AS3MT) enzimi NADPH ve tioredoksini kullanarak DMAIII'ü metiller ve DMAV'i oluşturur. Son olarak ta GST- omega ile DMAV, DMAIII' e indirgenmektedir (Rossman, 2003; Agusa ve ark., 2011).

Metilasyon için bir diğer yol ise 2005 yılında ortaya atılan alternatif yolak olarak ta bilinen indirgeyici metilasyon yolağıdır. Kısaca bu yolakta; substratları ATG ve MADG olan AS3MT enzimi, arseniti proteinlerin tiol gruplarına bağlar. Ardından da proteinlerden ayırıp glutatayonla birleştirerek As- glutasyon kompleksini oluşturmakta ve DMAV'ye çevirmektedir. Detayında ise arsenat, arsenite indirgendikten sonra arsenit glutasyon ile birleşir ve ATG' e oluşur. Daha sonra AS3MT enzimi SAM'den elde ettiği metil grubunu ATG' ye aktararak

MADG' yi meydan getirir. AS3MT enziminin, MADG'yi metilleyerek DMAG'yi oluşturduğu düşünülmektedir. MADG, MMAIII ile denge halinde olup denge glutatyon konsantrasyonuna bağlı olarak değişebilmekte ve MMAIII, MMAV' ye okside olabilmektedir (Hayawaka ve ark., 2005; ATSDR, 2007; Agusa ve ark., 2011).



**Şekil 1.9.** Arseniğin oksidatif (klasik) metilasyonu ve indirgeyici (alternatif) yolakla metilasyonu (Agusa ve ark., 2011).

Her iki yolağında ortak noktasından biri arsenik metilasyonunun AS3MT enzimi tarafından yapılmasıdır (Drobná, 2010). Alternatif yolak, MMAV' nin ve DMAV' nin klasik yolakta olduğu gibi arsenik metabolizmasının ara ürünü değil de, son ürünü olduğunu ileri sürmektedir. Ayrıca, bu yolakta +3 değerlikli arsenik bileşiklerinin, +5 değerlilerden önce oluşması ve reaksiyonlar sonucunda bazı ara ürünlerinde (arsenik triglutatyon (ATG), monometil arsenik diglutatyon (MADG) ve dimetil arsenik glutatyon (DMAG)) oluşması bu yolağı klasik yolaktan ayıran farklılıklardır (Hayawaka ve ark., 2005; Stamatelos, ve ark., 2011).

Arsin gazının da metabolizasyonu aynı şekilde olur iken, özellikle deniz canlılarında bulunan arsenobatin insanlar tarafından metabolize edilememektedir (ATSDR, 2007).

#### 1.1.4.4. Atılımı

Karaciğerde metilasyona uğrayan arseniğin başlıca atılım yolu idrar olup ayrıca deri dökülmesi ve terleme yoluyla da arsenik vücuttan atılmaktadır (Tokar ve ark., 2013; Sears, ve ark. 2012). İdrarda arseniğin birincil metabolitleri MMA, DMA ve +5 değerlikli MMAV ve DMAV'dır. İdrardaki toplam arseniğin %25'ten az bir kısmını ise AsIII ve AsV oluşturmaktadır (Apostoli ve ark., 1999; Hayawaka ve ark., 2005). İnsanlarda iAs' nin yarılanma ömrü 4 gün olup, yakın zaman maruziyetinin belirlenmesinde idrar, kana göre daha iyi bir indikatördür (Yağmur ve Hancı, 2002; Çizmecioğlu ve Yanturalı, 2008). İdrar üzerine yapılan bazı çalışmalarda; DMA (%DMA) değeri yüksek olan bireylerin, yüksek metilasyon kapasitesine sahip olduğu yani, vücutlarından daha fazla arseniği atabildiği gösterilmiştir. Bir başka çalışmalarda ise arsenik maruziyetine bağlı gelişen hastalığa sahip bireylerin idrarlarında, MMA değerinin yüksek konsantrasyonda olduğu saptanmıştır (Agusa ve ark., 2011). Sürekli olarak içme suyundan arseniğe maruz kalan popülasyonlar üzerinde yapılan idrar analizleri sonucunda, idrar örneklerinin % 60- 70 oranında DMA, % 10- 20 oranında MMA ve % 10- 30 oranında ise iAs' nin bulunduğu tespit edilmiştir (Vahter, 2000; Bailey ve ark., 2013).

#### 1.1.4.5. Depolanması

Tüm arsenik bileşikleri böbrek, akciğer, idrar, deri, kan ve karaciğer gibi yumuşak dokularda, arsenaminler ise kemiklerde birikme özelliğindedir (IARC, 2011; Vural, 2005). Özellikle uzun süreli kronik maruziyette, sülfidril (-SH) gruplarına yüksek bağlanma afinitesi olan trivalen arsenik saç, tırnak, deri gibi sülfidril gruplarını yoğun olarak ihtiva eden keratince zengin bölgelerde birikmektedir (Yağmur ve Hancı, 2002; Bhattacharjee ve ark., 2013). Arsenik maruziyetine en hassas organ deridir. Derinin keratin tabakasındaki sülfidril gruplarıyla birleşen arsenik, deri üzerinde yağmur damlasına benzer pigmentasyona neden olmaktadır. Özellikle avuç içi ile ayak tabanlarında yoğunlaşan hipo- veya hiper- pigmentasyonlaşma "Hiperkeratoz" olarak adlandırılmaktadır. Tırnaklarda biriken arsenik ise "Mee's

Çizgileri” olarak adlandırılan, tırnaklarda enine beyaz karakteristik çizgilerin oluşmasına neden olmaktadır. Hiperkeratozis ve Mee’s çizgileri kronik arsenik maruziyetinin gözle görülür karakteristik özellikleridir (Şekil 1.10). Sonuç olarak uzun süreli arsenik maruziyetine bağlı ölümlerde saç, kıl, tırnak önemli birer analiz numunesidir (Vural, 2005). Ancak uzun süreli maruziyetlerde arsenik miktarının belirlenmesinde saç örneklerinden daha çok yararlanılmaktadır (Çizmecioğlu ve Yanturalı, 2008; Vural, 2005).



**Şekil 1.10.** Deride hiperkeratozis ve tırnaklarda Mee’s çizgilerine ait görüntü. (<http://www.balikesirtabip.org.tr/tur/index.php?q=node/717#.VIISMdKsXfc> ve <http://stanfordmedicine25.stanford.edu/the25/hand.html>).

### 1.1.5. Arseniğin Toksisitesi

#### 1.1.5.1. Akut Toksisitesi

Akut zehirlenmenin ilk belirtileri maruziyetten yaklaşık olarak 30 dakika sonra başlamaktadır (Hulla, 2014). Oral yolla alımda; arsenik gastrointestinalde mukoz membranları tahriş ederek, burada kanamalara yol açabilmektedir. Baş ağrısı, nefeste As kokusu, ağızda metalik tat, iştahsızlık, bulantı ve diyareye bağlı olarak sıvı ve elektrolit kaybı başlıca belirtilerdir. Bazen hafif sarılık, anemi, zehirlenmenin derecesine bağlı olarak deride kızarıklık, halüsinasyon, kriz, perifer sinir sisteminde duyu kaybı, enfeksiyon, koma durumu görülebilir. 70- 80 mg iAs’e maruz kalmak ölümcül olabilmektedir (Vural, 2005; Liu ve ark., 2008; Hulla, 2014).

### 1.1.5.2. Kronik Toksikite

Günümüzde arseniğe kronik maruziyet, daha çok mesleki olarak ve geçmişten günümüze kadar gelen arsenik miktarı yüksek olan suların içme suyu olarak tüketilmesi sonucu meydana gelmektedir. Halen birçok toplumun sorunu olan arsenikli sular en büyük kronik maruziyet sebebidir.

Kronik toksisitenin ilk belirtileri sarılık ile başlamakta, ardından ise siroz gelişmektedir. Maruziyetin devam etmesi sonucu bu durum hepatoselüler karsinoma neden olabilmektedir (Liu ve Waalker, 2008; Klassen, 2008).

Arseniğin sülfidril gruplarına olan yüksek ilgisi nedeniyle kreatin yapısına sahip olan saç, tırnak ve deride depolandığı bilinmektedir. Uzun süreli maruziyette arseniğe en hassas doku olan deride, hiperpigmentasyon şeklinde görülen lezyonlar zamanla bazal hücre karsinomuna, skuamoz hücre karsinomuna veya Bowen hastalığına neden olabilmektedir. Özellikle yüksek miktarda iAs içeren içme sularını tüketen Tayvan halkında, alt ekstremitelerde gangren oluşumu gözlemlenmiştir. Bu durum “Siyah Ayak (Blackfoot) Hastalığı” olarak adlandırılmaktadır (Vural, 2005; Liu ve ark., 2008) (Şekil 1.11) .



**Şekil 1.11.** Kronik arsenik maruziyetine bağlı oluşan siyah ayak hastalığı (<http://www.betterlifelabs.org/overview05.html>).

Özellikle organik arsenik bileşikleri, periferik ve merkezi sinir sistemine etki etmektedir. Proksimalden, distal kas gruplarına ilerleyebilecek kas güçsüzlüğüne, ellerde ve ayaklarda uyuşukluğa neden olabilmektedirler (Liu ve ark., 2008; Tokar ve ark., 2013).

Kronik arsenik maruziyeti sonucu akciğer hastalıkları, periferik nöropati, kardiyovasküler problemler, anemi ve özellikle mesleki maruziyeti bulunanlarda diyabet gibi hastalıklarında geliştiği görülmüştür. Ayrıca kronik alım sonucu tüm doku ve organlarda maligniteler görülebilmektedir (Bhattacharjee ve ark., 2013; Liu ve ark., 2008; Basu ve ark., 2001; Kim ve ark., 2013; Islam ve ark., 2012).

#### **1.1.6. Arseniğin Karsinojenik Etkileri**

“Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC- The International Agency for Research on Cancer) tarafından Grup I karsinojen olarak sınıflandırılan inorganik arsenik özellikle kromozomal aberasyonlara neden olarak kanseri tetiklemektedir. Arseniğin inorganik ve metilenmiş hallerinin yanı sıra arsenik metabolizasyonunun ara ürünleri olan tioarsenikli bileşiklerin de sitotoksik ve genotoksik özellikleri bulunmaktadır (Liu ve Waalkers, 2008; Bhattacharjee ve ark., 2013). Uzun süreli arsenik maruziyeti sonucu karaciğer, deri, akciğer, prostat, mesane kanserleri oluşabilmektedir (Chernova ve ark., 2012).

Arsenik süperoksit, hidrojen peroksit ve diğer reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasını sağlayarak veya DNA’ nın metilasyonunda değişikliklere neden olarak kansere sebebiyet verebilmektedir. Oksijenin bol olarak bulunduğu akciğerler, arseniğe bağlı kanser oluşumuna hassas organlardır (Sun ve ark., 2011; Hughes ve ark., 2011).

Yapılan bazı çalışmalarda mesleki olarak arseniğe maruz kalan işçilerde ile döküm fabrikalarına yakın olarak yaşayan kişilerde, akciğer kanserinin görülme



sıklığı yüksek olarak gözlemlenmiştir (Sun ve ark., 2011; Liu ve ark., 2008; Demir ve ark., 2014).

Uzun süreli maruziyette arseniğin deride birikmesiyle bazal veya skomatöz hücrelerde kanser meydana gelebilmektedir. Bazal hücre karsinomları yayılmadan lokal olarak kalır iken skomatöz hücre karsinomları yüksek metastaz yapma özgülüğüne sahiptir (Vural, 2005).

### **1.1.7. Zehirlenmenin Tanımlanması ve Biyolojik İndikatörler**

İdrarda, dokuda, kusmukta, mide yıkama suyunda, kan, saç ve tırnakta As miktarı tayin edilebilir. Kandaki arseniğin yarılanma süresi kısa olduğu için kandan birkaç ay içindeki akut zehirlenmeler; idrarda ise yakın zamandaki maruziyet ölçülebilir. Saç ve tırnak ise geçmiş maruziyeti belirlemek için kullanılacak iyi birer indikatördür. As ile ölümlü vakalarda  $As_2O_3$  veya diğer As bileşiklerine ait kalıntılar yine bu biyolojik örneklerde tespit edilebilir. As biyolojik dokularda Reinsch ve modifiye Gutzeit deneyi ile tanımlanabildiği gibi atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile çok duyarlı ve kesin olarak saptanabilir (Liu ve ark., 2008; Vural, 2005).

### **1.1.8. Tedavi**

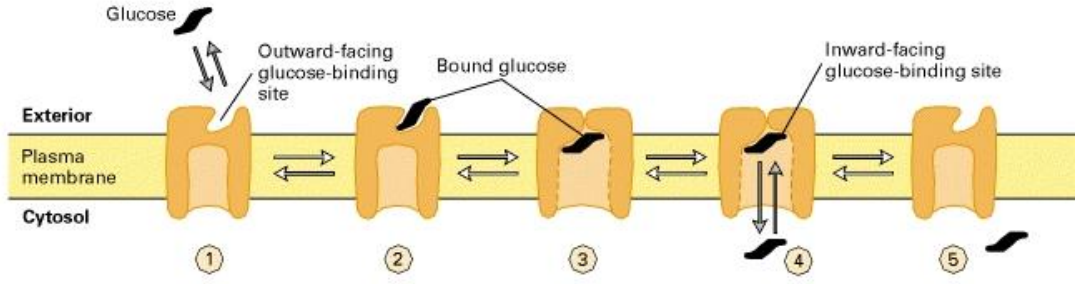
Sistemik antidot olarak BAL (British Anti Lewisit) veya penisilinamin gibi şelasyon ajanları kullanılır. Gerekirse yapay solunum veya oksijen tedavisi uygulanabilir. Karbonhidrat ve protein bakımından az yağlı diyet verilir (Vural, 2005).

### **1.1.9. Arsenik Toksikokinetiğinde Genetik Faktörlerin Önemi**

Yaş, cinsiyet, hamilelik, sigara kullanımı, diyet durumu, arseniğe maruziyet süresi ve maruziyet yolu bunların yanı sıra genetik faktörler As toksikokinetiğinde önemli birer faktördür (Agusa ve ark., 2011). Özellikle bireyler arasında görülen bazı genetik farklılıklar (polimorfizmler), toksisite ve toksisiteye karşı oluşan cevaplarda önemli rol oynamaktadır. Bazı bireyler, arseniğin toksikokinetiğinde görev alan proteinleri veya enzimleri kodlayan gen bölgelerindeki polimorfizmler nedeniyle arseniğe daha duyarlı hale gelebilmekte ve diğer bireylere göre vücutlarında daha fazla arsenik biriktirme eğilimde olabilmektedir. Bu da toksisite ve arseniğe bağlı hastalıkların gelişmesinde büyük rol oynamaktadır.

#### **1.1.10. Glukoz Taşıyıcı Protein 1 (Glut1) (SLC2A1)**

55 kDa ağırlığında, 12 alfa- helikal transmembran domaini içeren Glut1, ilk olarak eritrositlerden izole edilmiştir ve glukoz taşınmasında görev alan bir bazolateral membran proteinidir. Glut1 esasen kardiyovasküler sistemde ve merkezi sinir sisteminde astrositlerde, kan- beyin bariyerinde, böbrekte, daha az ise adipoz dokuda, kas ve karaciğerde glukoz taşınmasında görev alan proteindir (Robichaud, ve ark., 2011; Silva ve ark., 2010; Wood ve Trayhurn, 2003). Biri hücre membranının dışında diğeri ise hücre membranının içinde olmak üzere iki konfrmasyonel formu bulunan Glut, uniporter bir proteindir ve glukozun iki yönlü taşınmasını sağlar (Lodish ve ark., 2000).



**Şekil 1.12.** Glukozun Glut1 yardımı ile hücre içine alınması; eğer hücre içi glukoz konsantrasyonu artar ise taşınım ters yönlü olarak ta gerçekleşebilmektedir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21669/figure/A4046/?report=objectonly>).

Arseniğin alımına baktığımızda ise, memelilerde arsenatın fosfat kanallarıyla, arsenit ve metilenmiş bileşiklerinin karaciğerde ve astrositlerde AQP7 ve AQP9 ile taşındığı biliniyordu. Daha sonraki yıllarda yapılan araştırmalarda, memelilerde eritrositlerde, epitelyum hücrelerinde, kan- beyin bariyeri ile böbreklerin tübüler ve glomerular bölgelerinde arsenitin ve metil arsenik asitin taşınmasından sorumlu olan bazal hücre proteininin Glut1 olduğu saptanmıştır (Liu ve ark., 2006; Rosen ve Liu, 2009; Calatayud, 2012).

Bu çalışmada amaç, mesleki olarak arseniğe maruz kalan 100 bireyin; idrarlarındaki arsenik düzeylerini belirlemek ve arseniğin toksikokinetiğinde rol oynayan Glut1 genindeki polimorfizmin, idrar arsenik düzeyine olan ilişkisini araştırmaktır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereçler

#### 2.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Steril ependorf tüp (1,5 ml ve 0,2 ml' lik)	Axygen Genuine
Pipet uçları (10 µl, 100 µl, 1000µl)	Finntip
Otomatik mikropipetler	Ependorf, Thermo
Vorteks karıştırıcı	Biosan
Santrifüj	Heraeus
Su Banyosu	Nüve Bm 402
Otoklav	Nüve
Soğutmalı Santrifüj Cihazı	Hettich
Su Purifikasyon Sistem	Human Up 900
Etüv	Memmert
Mikrodalga fırın	Arçelik
Elektrikli hassas terazi	Schimadzu Libror
pH metre	Mettler Toledo
Laminar Flow kabin	ESCO
Thermal Cycle PCR cihazı	Techne Tc512
Yatay elektroforez cihazı	Scie-Plas
Güç Kaynağı	Bio-Rad
Jel Görüntüleme cihazı	Syngene
Mikrodalha fırın	Mars X Press

Hassas Terazı	Metler Toledo 4 Digit
Manyetik Karıştırıcı	Mirak
Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi	Varian AA24OFS Fast Sequential
Grafit Komponent Tüpler	Varian GTA
Grafit Tüp Atomizer	Varian GTA 120
As Oyuk Katot Lambası	Varian Spectra AA Lamp
Vial (2 ml)	Pothtech Elkay
Polipropilen, Kapaklı Tüpler ( 15, 20 ml' lik)	
Hava Asetilen Tüpü	
Argon Gazı Tüpü	
Cam Malzemeler	

### 2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

EDTA	Merck
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Applichem
Sodyum klorür (NaCl)	Merck
Proteinaz K	Merck
Fenol- kloroform- izoamil alkol (25: 24: 1)	Applichem
Etanol	Merck
Saf etanol	Scharlau, Dop
Triton X	Scharlau
Trizma Base	Merck
DTT	Sigma
Primerler	Alpha DNA, Montreal

Etidyum Bromür	Applichem
Agaroz	Prona
DNA's, RNA's free water	Qiagen
Restriksiyon Enzimi (HpyCH4V)	NEB (New England Biolab)
Hot Star Taq DNA Polimeraz	Qiagen
100 bp ladder	Fermentas
Borik asit	Merck
6X loading çözeltisi	Qiagen
Amonyum dihidrojen fosfat	Merck
HNO <sub>3</sub> (%65' lik)	Merck
Hidroklorik Asit	Merck
Hidrojen Peroksit	Merck
Sodyum Hidroksit	Merck
As Standart	AA Standart Etanol pour SCP Science

### 2.1.3. Deney Protokolü

#### 2.1.3.1. Çalışma Grubu

Kütahya Eti- Gümüş Fabrikası'nda çalışan ve Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesi'ne sağlık kontrolüne gelen 100 birey çalışma hakkında bilgilendirilerek, kan ve idrar örnekleri toplanmış ayrıca yaşları ile maruziyet süreleride not edilmiştir. Arsenik konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla idrar ve Glut1 gen polimorfizminin belirlenmesi için de kan örneklerinden yararlanılmıştır.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 08.04.2013 tarihli ve 06-242- 13 sayılı izni ile yürütülen çalışmada, genetik çalışmalar ve metal incelemeleri

Ankara Üniversitesi Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilimdalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

### **2.1.3.2. Biyolojik Örneklerinin Toplanması**

Çalışma grubunu oluşturan 100 bireyin her birinden yaklaşık olarak 100 ml idrar örnekleri, idrar kaplarına alınmış ve örnekler analiz zamanına kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ ' de saklanmıştır. Sıvı kan örnekleri ise 10'ar ml alınarak EDTA'lı vakumlu tüplere alınmış ve analize kadar  $+4^{\circ}\text{C}$ ' de saklanmıştır.

### **2.1.4. Yöntem**

Çalışma iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada idrar örneklerinin arsenik düzeylerini belirlemek amacıyla atomik absorpsiyon spektrometri yöntemiyle ölçüm yapılmıştır. İkinci aşamada ise bireylerin kan örneklerinden Glut1 genotipleri belirlenmiştir. Son olarak ta genotip verileri ile idrar arsenik düzeyleri arasındaki ilişki araştırılmıştır.

#### **2.1.4.1. Arsenik Analizi**

##### **2.1.4.1.1. Arsenik Düzeyinin Belirlenebilmesi için Yapılan Ön İşlemler**

İşçilerden toplanan ve bekletilmekte olan idrar örneklerinden 1' er ml alınarak döner kapaklı polipropilen tüplere (15ml'lik) aktarılmıştır. Örnekler mikrodalga fırında yıkılama işlemi yapılmadan, sadece 5 ml %65' lik nitrik asit ( $\text{HNO}_3$ ) ile muamele edilmiştir. Toplam hacim deiyonize su ile 10 ml' ye tamamlanarak kapaklı polipropilen tüpler içerisinde  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

#### 2.1.4.1.2. İdrar Örneklerinin Arsenik Analizi

İdrar örneklerinin arsenik analizi için Grafit Fırınlı Atomik Absorpsiyon Spektrometre cihazı (Varian AA240Z Zeeman Atomik Absorpsiyon Spektrometre) kullanılmıştır. Tayin duyarlılığının alevli atomik absospsiyon spektrometresine göre 10-100 kat daha geniş olmasından, yanıcı ve zehirli gaz kullanılmamasından, örnek hazırlamak için zaman kaybına gerek olmadığından ve analiz süresinin 2 dakika kadar kısa olmasından dolayı grafit fırınlı AAS cihazı tercih edilmiştir (Agilent Technologies Inc. 2010).

Bir çözelti içinde konsantrasyonu bilinmeyen elementlerin analizi için en uygun metotlardan biri olan Atomik Absorpsiyon Spektorometrisi'nin temeli Lamber- Beer kanuna dayanmaktadır. Atomlar ışığı absorblayabilirler ve atomlar tarafından absorbe edilen dalga boyu belirli bir elemente özgüdür. Kanuna göre de kimyasal bir madde tarafından absorbe olunan ışık, analizi yapılan kimyasalın konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

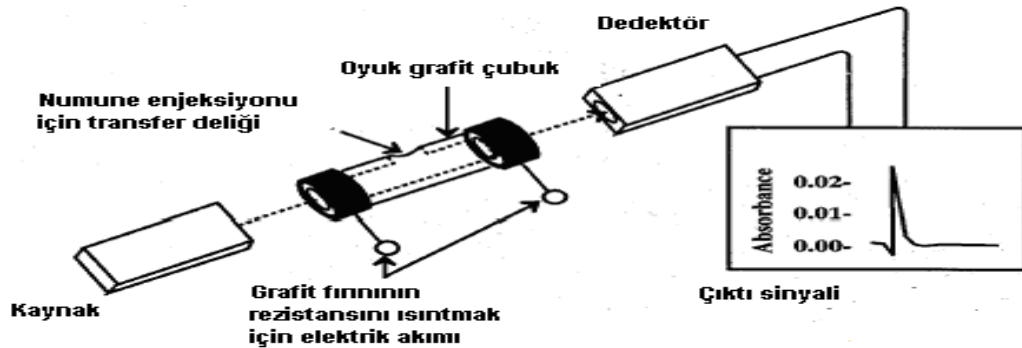
Cihazda ilk olarak, ölçümü yapılmak istenen elemente özgü lamba aktif hale getirilir. Elemente özgü lambanın anot ve katot olmak üzere iki ucu bulunmaktadır. Cihaz analize başladığı zaman, lambaya gelen akımla birlikte lamba içindeki asal gaz atomları iyonlaşarak katota çarparlar ve katot üzerindeki metalleri uyarırlar. Uyarılmış hale gelen atomlar eski hallerine dönerken ölçümü yapılmak istenen metale özgü dalga boyunda ışık yayarlar. Eş zamanlı olarak grafit fırın atomizer içinde sıcaklık kademeli olarak artırılarak, ön işlemlerden geçirilerek analize uygun hale getirilen, konsantrasyonu araştırılmak istenen elementi içeren, örnek çözelti elektiriksel olarak kurutulur. Küllemeyle matriksi uzaklaştırılan numune, atomizasyon sonucu atomlaştırılır. Çalışmadaki idrar örneklerinin arsenik analizine ait grafit fırın sıcaklık progamı Çizelge 2.1.'de verilmiştir.



Çizelge 2.1. Grafit fırın sıcaklık programı.

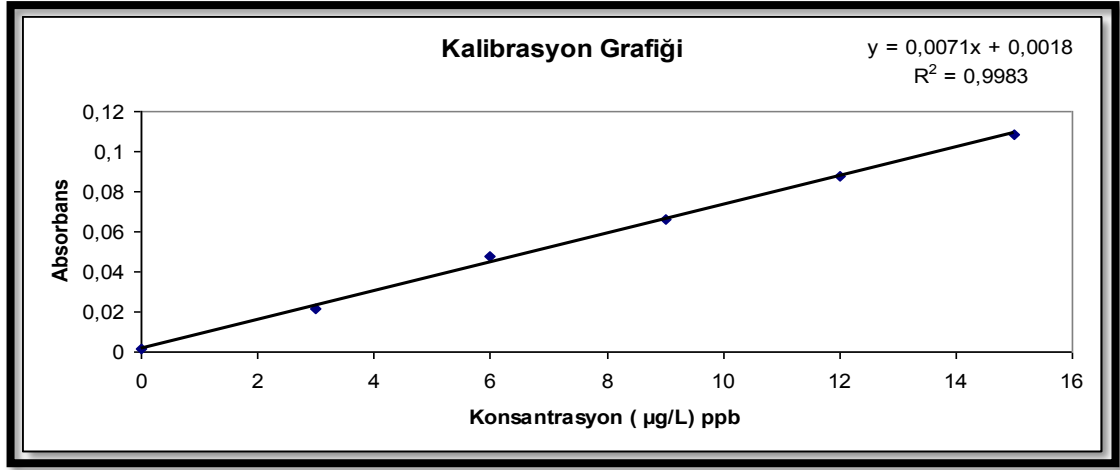
Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman (s)	Akış (L/min)	Sinyal		Okuma	
				Toplama			
1	85	5	0.3	×	Hayır	×	Hayır
2	95	40	0.3	×	Hayır	×	Hayır
3	120	10	0.3	×	Hayır	×	Hayır
4	800	5	0.3	×	Hayır	×	Hayır
5	800	1	0.3	×	Hayır	×	Hayır
6	800	2	0.0	×	Hayır	×	Evet
7	2450	0.9	0.0	√	Evet	×	Evet
8	2450	2	0.0	√	Evet	√	Evet
9	2450	2	0.3	√	Hayır	√	Evet

Atomlarına ayrılmış element, lambadan belirli (kendine özgü) bir dalga boyunda gelen fotonları absorblar. Absorbe edilen ışık miktarı dedektör tarafından ölçülür. Burada absorbe edilen enerjinin miktarı ile numune içindeki elementin konsantrasyonu orantılıdır. Bu metotta ilk olarak konsantrasyonu bilinen standart bir çözelti atomlarına ayrıştırılarak absorbans değerleri grafiğe aktarılarak kalibrasyon eğrisi çizilir. Ardından konsantrasyonu araştırılmak istenen çözelti için ölçüm yapılır. Sonuç olarak konsantrasyonu bilinmeyen bu kimyasalın içindeki elementin kalibrasyon grafiğinde absorbans değerine karşılık gelen konsantrasyon değeri bulunur (Agilent Technologies, 2010; T.C. MEB, 2012).



Şekil 2.1. Grafit fırınlı AAS cihazının işleyişini gösteren şema (<http://www.notkurdu.com/aas-grafit-firin-166656/>).

Çalışmamızda ise ön işlem gerçekleştirilerek bekletilen idrar örneklerinin ölçümü yapılmadan önce kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Eğri için 1000 ppb' lik arsenik stok solüsyonundan %2'lik nitrik asit kullanılarak, 3, 6, 9, 12 ve 15 ppb' lik konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Arsenik analizi için dalga boyu 193,8 nm' ye ayarlanarak, atomlaştırıcı olarak grafit fırın, ortam gazı olarak ta Argon gazı kullanılmıştır. Daha sonra sırasıyla 3 ppb, 6 ppb, 9 ppb, 12 ppb ve 15 ppb'lik solüsyonlar cihaza okutularak 5 noktalı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Eğrinin oluşturulması sırasında standart çözeltilerin her birinden 3'er kez ölçüm yapılmıştır. Kalibrasyon 50 örnekte bir tekrarlanmış ve her bir örnek için üçer kez ölçüm yapılmıştır.



	Konsantrasyon (ppb)	Absorbans	%RSD
Cal Zero	0,000	0,0013	4,9
Standart 1	3,000	0,0215	7,8
Standart 2	6,000	0,0478	2,7
Standart 3	9,000	0,0660	2,2
Standart 4	12,000	0,0875	6,9
Standart 5	15,000	0,1082	2,8
Reslope	6,000	0,0467	2,2
Reagent blank	0,000	0,109	7,4

**Şekil 2.2.** Arsenik analizine ait kalibrasyon eğrisi.

**Çizelge 2.2.** Biyolojik örneklerde arsenik analizi için Varian AA240Z Zeeman Atomik Absorpsiyon Spektrometre cihazında uygulanan metod.

<i>Element – matris</i>	<i>As – Biyolojik Örnek</i>
<i>Enstrüman</i>	<i>Zeeman</i>
<i>Konsantrasyon birimi</i>	<i>µg /L</i>
<i>Enstrüman modu</i>	<i>Absorbans</i>
<i>Örnekleme</i>	<i>Otonormal</i>
<i>Kalibrasyon modu</i>	<i>Konsantrasyon</i>
<i>Ölçüm modu</i>	<i>Pik yüksekliği</i>
<i>Standart tekrarı</i>	<i>3</i>
<i>Örnek tekrarı</i>	<i>3</i>
<i>Eğri çizimi</i>	<i>7 noktalı</i>
<i>Konsantrasyon ondalık aralığı</i>	<i>2 basamak</i>
<i>Dalga boyu</i>	<i>193,7 nm</i>
<i>Slit genişliği</i>	<i>0.5 nm</i>
<i>Gain</i>	<i>% 64</i>
<i>Akım</i>	<i>12 mA</i>
<i>Background</i>	<i>BC on</i>
<i>Standart 1</i>	<i>3 µg /L</i>
<i>Standart 2</i>	<i>6 µg/L</i>
<i>Standart 3</i>	<i>9 µg /L</i>
<i>Standart 4</i>	<i>12 µg/L</i>
<i>Eğri düzeltilmesi standardı</i>	<i>Standart 2 (6 ppb)</i>
<i>Reslope alt limit</i>	<i>% 75</i>
<i>Reslope üst limit</i>	<i>% 125</i>
<i>Rekalibrasyon</i>	<i>50 örnekte bir</i>
<i>Kalibrasyon algoritması</i>	<i>Linear Origin</i>
<i>Total enjeksiyon hacmi</i>	<i>: 25µl</i>
<i>Ana standart konsantrasyonu</i>	<i>: 15 µg /L</i>

## 2.1.4.2. GLUT 1 Genotiplerinin PCR-RFLP Yöntemi ile Belirlenmesi

### 2.1.4.2.1. Sıvı Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Moleküler incelemelerin yapılması için DNA'nın saf olarak elde edilmesi gerekmektedir. Bazı kimyasal maddeler ve enzimler yardımı ile hücre duvarı, hücre zarı ve proteinlerin uzaklaştırılması ile DNA'nın saf elde edilmesi işlemi DNA İzolasyonu olarak adlandırılmaktadır. DNA ekstraksiyonu için başlıca Chelex İzolasyonu, Fenol- Kloroform İzolasyonu veya FTA Kağıt İzolasyon yöntemleri bulunmaktadır. Çalışmamızda Fenol- Kloroform yöntemi ile izolasyon yapılmıştır. Yöntemde kimyasallar ve enzimler ile DNA ekstraksiyonu yapılmaktadır (Wang, 2012; Ghatak, 2013). Fenol- Kloroform İzolasyon yönteminde kullanılan kimyasallar, enzimler ve kullanım amaçları Çizelge 2.3.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.3.** Fenol- Kloroform İzolasyon yönteminde kullanılan enzim, proteinler ve görevleri.

Kullanılan Kimyasal/ Enzim	Görevi
Fenol	Proteinleri denatüre ederek, proteinlerin DNA'dan ayrılmasını sağlamak
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) ve Proteinaz K	Hücre duvarını parçalamak, kromozomlar içinde bulunan DNA'yı koruyan proteinleri parçalamak
Fenol	Proteinleri bağlar
Kloroform	Fenölü ve fenölün kendine bağladığı proteinleri bağlayarak uzaklaştırır
İzoamil alkol	DNA'nın sulu faz içinde ayrılmasını sağlar
Saf Etanol	Ortamdaki su molekülleri ile rekabet ederek DNA'nın çökmesini sağlar
%70' lik alkol	Na <sup>+</sup> gibi tek değerlikli katyonlar ve tuzların çözünerek ortamdaki uzaklaşmasını sağlar

Sıvı kan örneklerinden nükleer DNA'yı açığa çıkarabilmek için fenol- kloroform- izoamil- alkol izolasyon yöntemi uygulanmıştır. Yöntemin basamakları;

1. Sıvı kan örneklerinden 100 µl alınarak 1,5 ml'lik ependorf tüplerine aktarılmıştır.
2. Tüpe 1000 µl Tris- EDTA (TE) konularak karışım 12000 rpm'de 1dakika santrifüj edilmiştir. Alt faz 100 µl kalıncaya kadar süpernatant (üst faz) atılmıştır. TE ile yıkama işlemi tüp dibinde kalan peletin uçuk pembe- beyaz bir renk alıncaya kadar (ortalama olarak 3 defa) gerçekleştirilmiştir.
3. Pelet üzerine;
  - 1M' lık NaCl'den 45µl,
  - %20' lik SDS'den 40 µl,
  - 400 µl TE'den ve
  - 10µl proteinaz K eklenerek kısaca vortekslenmiştir.
4. Karışımlar 56<sup>0</sup>C' lik su banyosunda 1,5- 2 saat inkübasyona bırakılmıştır.
5. Sırasıyla 25:24:1 oranında hazırlanmış fenol- kloroform- izoamil- alkol karışımından 500 µl ilave edilmiş ve karışım ayran rengi görünümünü alana kadar kısaca vortekslenmiştir.
6. 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılmıştır. Böylece fenol proteinleri çöktürürken, kloroformda fenolü kendisine bağlar ve pelet oluşur.
7. Alt faz hareket ettirilmeden süpernatant yeni bir ependorf tüpüne alınmıştır, tüpler üzerine numaralandırma yapılmıştır.
8. Tüplere 1000 µl soğuk saf etanol ilave edilerek 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
9. Tüplerde bulunan tüm alkol pelete zarar vermeden dikkatli bir şekilde atılmıştır.

10. %70'lik oda sıcaklığındaki etil alkolden 500 µl ilave edilerek, 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
11. Daha sonra tüm alkol dikkatli bir şekilde atılmıştır.
12. Tüpün dibinde kalan alkolün uçması için gece boyunca laminar kabin içerisinde bekletilmiştir.
13. Tüplerdeki alkol tamamen uçurulduktan sonra 100 µl DNA's- RNA's free su ilave edilmiş ve DNA örnekleri analiz zamanına kadar – 20<sup>0</sup>C'de muhafaza edilmiştir.

#### **2.1.4.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction: PCR)**

Belirli bir DNA bölgesinin in vitro koşullarda çoğaltılmasını sağlayan bu teknik, eser miktardaki biyolojik örneklerde dahi çalışılmasına olanak sağladığı için spesifik, hassas, ucuz ve uygulanabilirliği kolay olduğundan moleküler araştırmalarda büyük bir öneme sahiptir. PCR'ın başlıca bileşenleri; kalıp DNA, sentetik oligonükleotid primerler, dNTP'ler (A,G,C,T), tampon çözelti ve Taq DNA Polimeraz'dır (Kalyanasundaram ve ark., 2013). PCR başlıca üç aşamadan oluşmaktadır.

##### **1. Denatürasyon**

Çoğaltılacak olan çift sarmal haldeki DNA' nın denatüre edilerek tek sarmal haline getirildiği bu aşama, 90- 95<sup>0</sup>C' de 5- 15 dakikada yapılmaktadır.

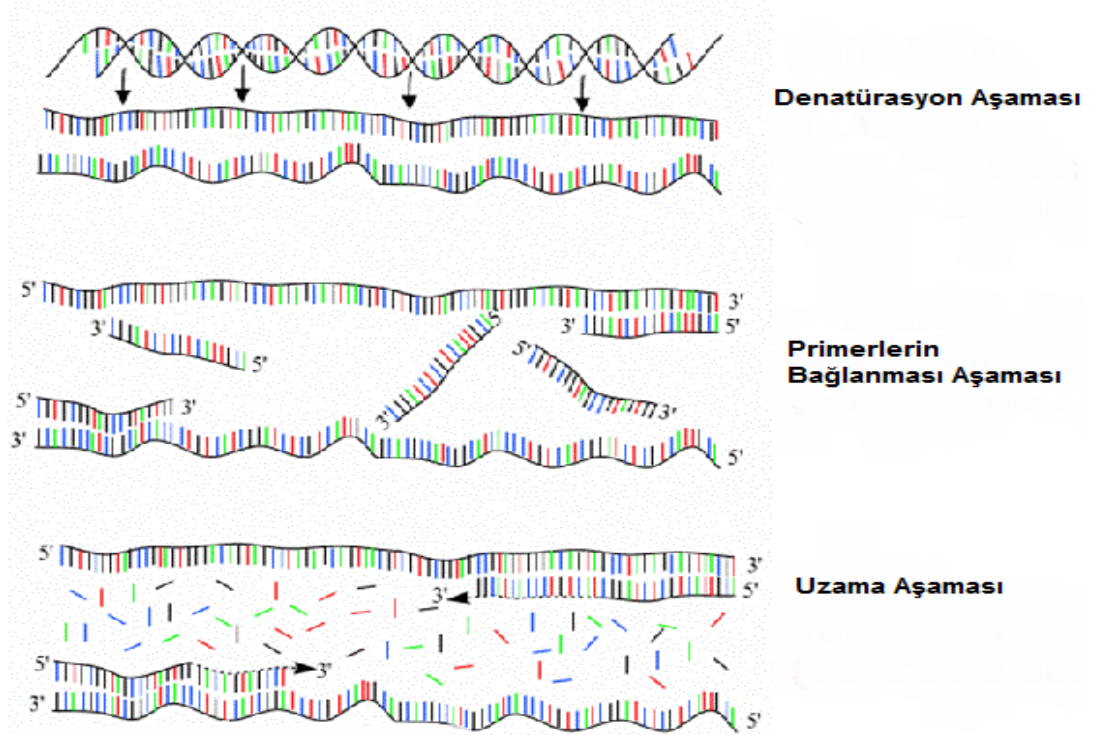
##### **2. Primerlerin Açılan DNA Zincirlerinde Hedef Bölgeye Bağlanması (Annealing)**

Cihazda sıcaklık primerlerin Tm değerine göre 50- 70<sup>0</sup>C arasında bir değere düşürülür. Primerler; 17- 30 nükleotid uzunluğunda, çoğaltılmak istenen DNA bölgesine spesifik ve DNA sentezini gerçekleştiren DNA polimeraz enziminin senteze başlaması için 3'- hidroksil gruba sahip sentetik oligonükleotitlerdir. İşlem

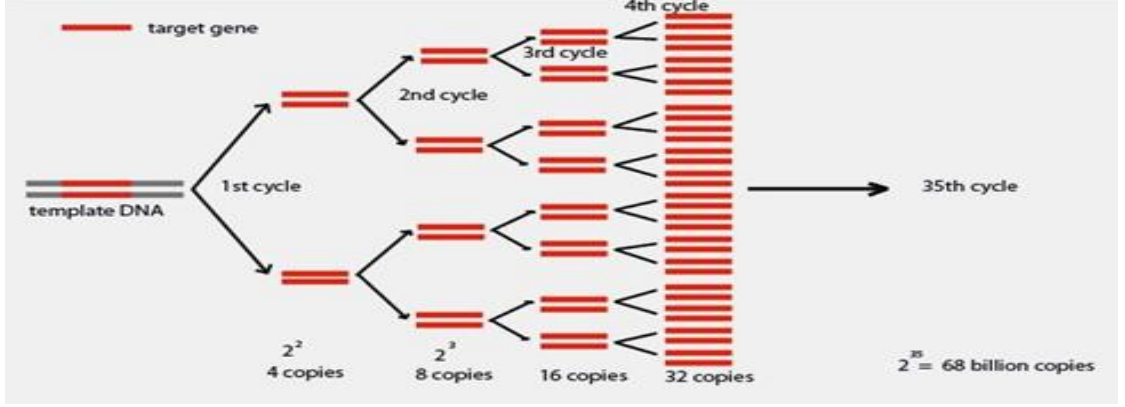
sırasında kendilerine özgü spesifik bölgeye bağlanırlar ve bu bölgeler DNA bölgesinin çoğalmaya başladığı noktadır. Bu aşama ise baz uzunluğuna göre 30- 60 saniye kadar sürmektedir.

### 3. Zincir Uzaması (Elongation)

Orijinal DNA zincirine komplementer iki yeni DNA zincirinin sentezinin yapıldığı aşamadır. Taq DNA polimeraz, primerlerin 3' hidroksil uçlarına bağlanır ve 5', 3' yönünde deoksiribonükleozid trifosfat'ları (dNTP) ekleyerek, istenilen DNA bölgesi çoğaltılır. Genellikle 70- 75<sup>0</sup>C derece arasında gerçekleştirilen bu işlem 2 dakika kadar sürmektedir (Kalyanasundaram ve ark., 2013).



**Şekil 2.3.** PCR'in aşamaları (<https://genotyping.files.wordpress.com/2007/03/pcr.gif> sitesinden düzenlenmiştir).



**Şekil 2.4.** PCR basamakları (<http://www.paulvanouse.com/dwpcr.html>).

Çalışmamızda, izole edilen DNA örneklerinden Glut1 gen polimorfizimlerini içeren gen bölgelerini çoğaltmak amacıyla TECHNE TC 512 Thermal Cycle cihazı kullanılmıştır. Gen bölgeleri cihaz ile  $2^{35}$  defa çoğaltılmıştır.

Çalışmada kullanılan PCR bileşenleri, bileşenlerin stok konsantrasyonu, reaksiyondaki miktarları ve reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonları Çizelge 2.4.'te belirtildiği şekildedir.



**Çizelge 2.4.** PCR bileşenleri ile stoktaki ve reaksiyondaki konsantrasyonları

PCR Bileşenleri	Stok konsantrasyon	Reaksiyona konulan miktar	25 µl'lik reaksiyon karışımındaki son konsantrasyon
10 X PCR Buffer	10X	2.5 µl	1X
dNTP karışımı	2mM	2 µl	200 µM
F Primer	10 pmol/ µl	0.5 µl	10 pmol/ µl
R Primer	10 pmol/ µl	0.5 µl	10 pmol/ µl
Hot Star Taq DNA Polimeraz	5 U/ µl	0.125 µl	1.25 U
DNA		5 µl	~200 ng
Steril H <sub>2</sub> O		17 µl	

#### 2.1.4.2.2.1. Primerler

DNA'da çoğaltılacak bölgeler için spesifik olan bir çift (Forward:F ve Reverse:R) primer kullanılmıştır. F ve R primerleri HPSF (High Performance Salt Free) yöntemi ile Montreal'deki Alpha DNA firmasına sentezlettirilmiştir.

**Çizelge 2.5.** Glut1 A2841T gen bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan F ve R primerlere ait özellikler.

Glut1	F Primer	R Primer
		5'GCTGAGAATGGCCTTCCCTCAAT3'
Uzunluk	23 bp	23 bp
GC içeriği	%52,17	%60,87
Erime Sıcaklığı T <sub>m</sub>	66,9 °C	68,2 °C
Primerler arası T <sub>m</sub> farkı	1,3 °C	

#### 2.1.4.2.2.2. PCR programı

Glut1 gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PCR programı Çizelge 2.6.'te verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 2.6.** Glut1 Gen bölgesinin amplikasyonunda kullanılan PCR programı.

Aşama	°C	Süre (dakika)	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	94	10	1
Denatürasyon	94	1	35
Bağlanma	60	1	
Uzama	72	1	
Son Uzama	72	5	
Bekleme	4	∞	-

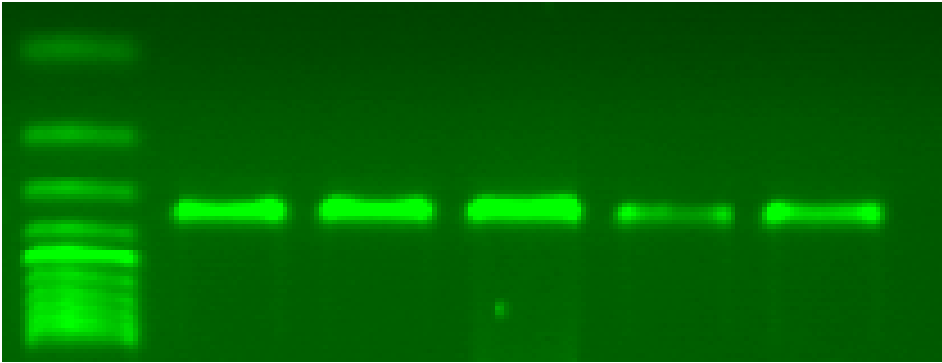
### 2.1.4.2.3. PCR Ürünleri İçin Agaroz Jel Elektroforezinin Hazırlanması

Sıvı kan örneklerinden genomik DNA'nın başarılı bir şekilde izole edilip edilmediğinin belirlenmesi için %1' lik agaroz jel elektroforezi ile görüntüleme yapılmıştır.

1. 1,2 gram agaroz tartılarak 120 ml 1x TBE çözeltisinde çözülmüş ve mikro dalga fırında ağzı alimünyum folyo ile kapatılıp üzerine delikler açılarak kaynatılmıştır.
2. Kaynatılan çözeltinin sıcaklığı 50 – 60<sup>0</sup>C'ye düşünceye kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir.
3. Çözeltiye 10 µl EtBr eklenir ve hafifçe çözelti pembeleşip homojen karışım sağlanıncaya kadar erlen çalkalanmıştır.
4. Karışım, jel tarakları ve bariyerleri yerleştirilen jel kaplarına dökülmüştür. Bu işlem sırasında karışım kalıba aktarılırken hava kabarcığının oluşmamasına özen gösterilmelidir, oluşmuş ise pipet ucu yardımı ile jel katılaşmadan kabarcıklar giderilmelidir.
5. Jelin katılaşması için oda sıcaklığında 30 – 45 dakika bekletilmiştir.
6. Jel katılaşınca taraklar ve bariyerler çıkartılmış ve kalıp elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jel kuyucuklarının, yürüme tankının katot elektrot (-) tarafına gelecek şekilde yerleştirilmesine dikkat edilmiştir.
7. Tank içine jelin üzerini 2- 3 mm kaplayıncaya kadar 1x TBE çözeltisinden ilave edilmiştir.
8. 15 cm uzunluğunda parafilm kesilerek buz kalıbı üzerine yerleştirilmiştir.

9. 1  $\mu$ l 6x Jel Loading Buffer ve 8  $\mu$ l PCR'da çoğaltılan DNA örneği parafilm üzerine konulmuştur ve mikropipet yardımıyla pipetaj yapılarak homojenizasyon sağlanmıştır.
10. Karışım jel kuyucuklarına yerleştirilmiştir. Ayrıca, PCR ürünlerinin boyutlarını karşılaştırmak için her jelle 100 bp DNA ladder yüklenmiştir.
11. Tankın kapağı kapatılarak, anot ve katot uçların bağlantıları takılmıştır.
12. Güç kaynağı 100 volt ve 70 ampere ayarlanarak, numuneler 1,5 saat jelle yürütülmüştür.
13. UV ışığı altında, jel görüntüleme cihazında sonuçlar değerlendirilmiştir.

Jel sonucunda elde edilen görüntülerde, PCR sonunda Glut1 geni için görülmesi beklenen fragman büyüklüğü 337 bp'dir (Şekil 2.5.).



**Şekil 2.5.** Glut1 genine ait 337bp'lik amplifikasyon ürünü.

#### **2.1.4.2.4. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi**

Çalışmada Glut1 A2841T polimorfizmini belirlemek için PCR sonucunda elde edilen 337 bp'lik PCR ürünleri, HpyCH4V restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan restriksiyon enzimi, kesim koşulu ve PCR

ürünlerinin söz konusu enzim ile kesilmesiyle elde edilen DNA fragmanlarının uzunlukları Çizelge 2.7.'da verilmiştir.

**Çizelge 2.7.** Glut1 gen polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan restriksiyon enzimi ve kesim ürünlerinin uzunlukları (bp).

Polimorfizm	Restriksiyon Enzimi	Kesim Ürünleri
Glut1 A2841T	HpyCH4V	A: 129+ 208 bp T: 337 bp

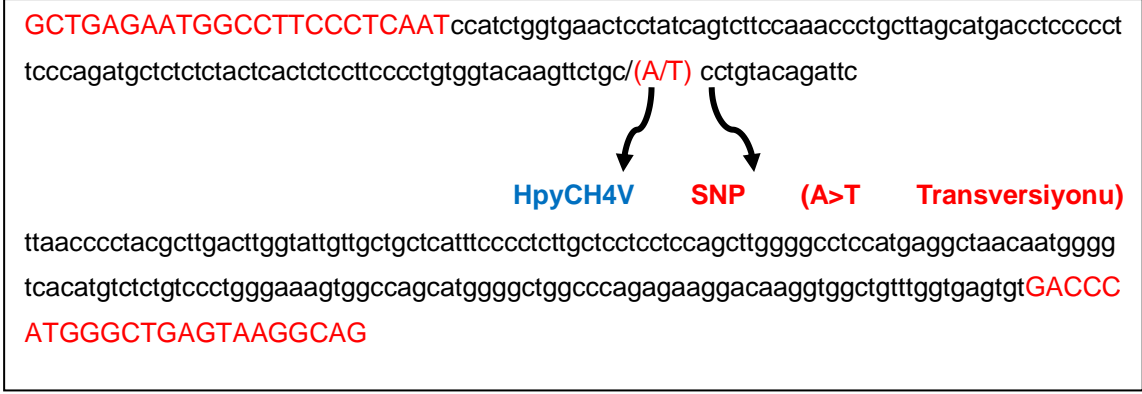
#### 2.1.4.2.4.1. HpyCH4V Restriksiyon Enzimi ile Kesim İşlemi

Glut1 A2841T polimorfizminin genotiplendirilmesi amacıyla, bir önceki aşamada çoğaltılan 337 bp' lik DNA dizisi, HpyCH4V restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Kesim işlemi için; 30 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. HpyCH4V restriksiyon enzimi, 5'.... TGC ↓ A...3' ve 3'...A ↓ CGT...5' dizilerini tanıyarak kesim yapar. Kesim işleminin gerçekleşmesi için gece boyunca 37°C'de inkübasyon yapılmış ve ürünler analiz işlemine kadar +4°C'de saklanmıştır.

HpyCH4V restriksiyon enzimin kesim koşulları:

- 17 µl Nükleaz Free H<sub>2</sub>O
- 2 µl 10X NEB Buffer
- 1 µl HpyCH4V
- 10 µl PCR ürünü olmak üzere,

her bir örnek için toplam hacim 30 µl'dir.

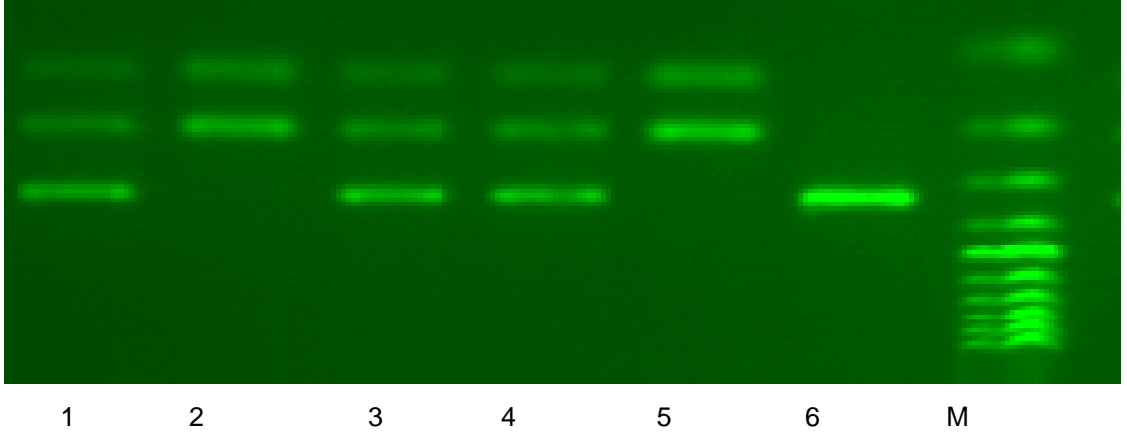


**Şekil 2.6.** Glut1 A2841T genotipleme için PCR ile amplifiye edilen 337bp'lik baz dizilimi, HpyCH4V primerleri ve tek nokta mutasyonu.

#### 2.1.4.2.5. Restriksiyon Enzimi ile İnkübasyondan Sonra Agaroz Jel Hazırlanması

HpyCH4V restriksiyon enzimi ile kesim sonucu oluşan oligonükleotidlerin analizleri için bölüm 2.1.4.2.3.' de anlatıldığı gibi %2' lik agaroz jel elektroforezi hazırlanarak, yürütme işlemi gerçekleştirilir. Sonuçlar UV ışığı altında EtBr ile görünür hale getirilir ve “ Syngene Jel Görüntüleme Sistemi” ile sonuçlar fotoğraflanmıştır.

Kesim sonucu elde edilen ürünler Şekil 2.7. verilmiştir. Bireyler homozigot tipik genotipine (AA) sahip ise HpyCH4V enzimi 337 bp'lik diziyi 5' ucundan TGC A dizisini tanıyarak keser ve PCR ürünü 129 ve 208 bp'lik iki oligonükleotide ayırır ve böylece jelde iki bant görülür. Bireyler homozigot atipik genotipe (TT) sahipse, HpyCH4V restriksiyon enzimi diziyi tanıyamaz ve kesim işlemini yapamaz. Bunun sonucunda da jelde 337 bp'lik tek bir bant görülür. Heterozigot genotipe (AT) bireylerde ise; bireylerin bir DNA ipliğinde A bulunduğundan HpyCH4V, o ipliği 2 parçaya böler ve diğer iplikte ise T bulunduğundan enzim kesim işlemini gerçekleştirmez ve tek iplik olarak kalır. Sonuç olarak heterozigot genotipe sahip bireylerde jelde 3 bant görülür.



**Şekil 2.7.** 337 bp'lik PCR ürününün HpyCH4V enzimi ile kesimi sonucunda oluşan oligonükleotidler ve uzunlukları. (M= 100bp Ladder; 1, 3 ve 4= AT genotipi: 129, 208 ve 337 bp; 2 ve 5= AA genotipi: 129 ve 208 bp; 6= TT genotipi: 337bp).

#### 2.1.4.2.6. İstatiksel Analizler

Çalışmada istatistiksel analizler SPSS V16 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Genlerin genotip ve alel frekansları çıkarılmış ve Hardy- Weinberg eşitliği ( $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ ) hesaplanmıştır. Elde edilen değişkenler bakımından iki grubun karşılaştırılması için “Student T” testi ve bağımsız iki grubun karşılaştırılmasında ise “Oneway ANOVA” varyans analizi kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistik olarak nitel değişkenlerde oran, nicel değişkenlerde ise ortalama± standart sapma ve minimum ile maksimum değerler verilmiştir.  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### 3. BULGULAR

Çalışmamız iki aşamada gerçekleşmiştir. İlk aşamada Kütahya- Emet' te gümüş fabrikasında çalışan ve Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesine başvuran, 100 erkek bireye ait idrar örneklerinden, atomik absorpsiyon spektrometrisiyle idrar arsenik düzeyleri belirlenmiştir. İkinci aşamada ise bireylerin kan numunelerinden idrar arsenik düzeyine etkisi olabilecek olan Glut1 gen polimorfizmi PCR (Polymerase Chain Reaction)- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemi ile belirlenmiştir.

#### 3.1. Arseniğe Maruz Kalan Bireylerde Glut1 A2841T Polimorfizminin Analiz Sonuçları

Glut1 A2841T polimorfizminin genotipleri, agaroz jelde UV ışık altında farklı uzunluktaki 3 banda göre belirlenmiştir. 208 bp ve 129 bp uzunluğunda bant veren örnekler AA; 337 bp uzunluğunda bant veren örnekler TT ve 337 bp, 208 bp ve 129 bp uzunluğunda bant veren örnekler ise AT olarak genotiplendirilmiştir.

Arseniğe maruz kalan bireylerde (n:100), Glut1 A2841T polimorfizminin genotip frekansları %59 homozigot tipik (AA), %36 heterozigot (AT) ve %5 homozigot atipik (TT) olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1.). Glut1 A2841T polimorfizmi ile oluşan alel frekansları (n: 200) ise A aleli (n: 154) için %77,0, T aleli (n: 46) içinse %23,0 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.2.).



**Çizelge 3.1.** Arseniğe maruz bireylerin Glut1 A2841T polimorfizmine ait genotip frekansları.

Glut1 Polimorfizmi	Genotip Frekansı (n:100)	
	N	%
AA (Homozigot tipik)	59	59
AT (Heterozigot)	36	36
TT (Homozigot atipik)	5	5

**Çizelge 3.2.** Arseniğe maruz bireylerin Glut1 A2841T gen polimorfizmi ile oluşan alel frekansları.

Alel (A/T)	Alel Frekansı (n:200)	
	N	%
A	154	77,0
T	46	23,0

Yapılan çalışmanın sonuçları istatistiksel verileri değerlendirildiğinde, çalıştığımız popülasyonun Glut1 A2841T gen polimorfizmine ait genotip ve alel frekanslarının Hardy- Weinberg dengesine uygun olduğu saptanmıştır ( $p>0,05$ ) (Çizelge 3.3.).

**Çizelge 3.3.** Çalıştığımız populasyonun Glut1 A2841T gen polimorfizmine ait alel ve genotip verilerinin Hardy- Weinberg dengesine uyumunun göstergesi.

Glut1 A2841T	Gözlenen	Beklenen	$\chi^2$	P
<b>AA (Homozigot tipik)</b>				
(n)	59	59,29		
<b>AT (Heterozigot)</b>			<b>0,027</b>	<b>p&gt;0,05</b>
(n)	36	35,42		
<b>TT (Homozigot atipik)</b>				
(n)	5	5,29		
<b>Toplam (n)</b>	<b>100</b>	<b>100</b>		

### 3.2. Arseniğe Maruz Kalan Bireylerde Glut1 A2841T Polimorfizm Sonuçları ile İdrar Arsenik Düzeylerinin Karşılaştırılması

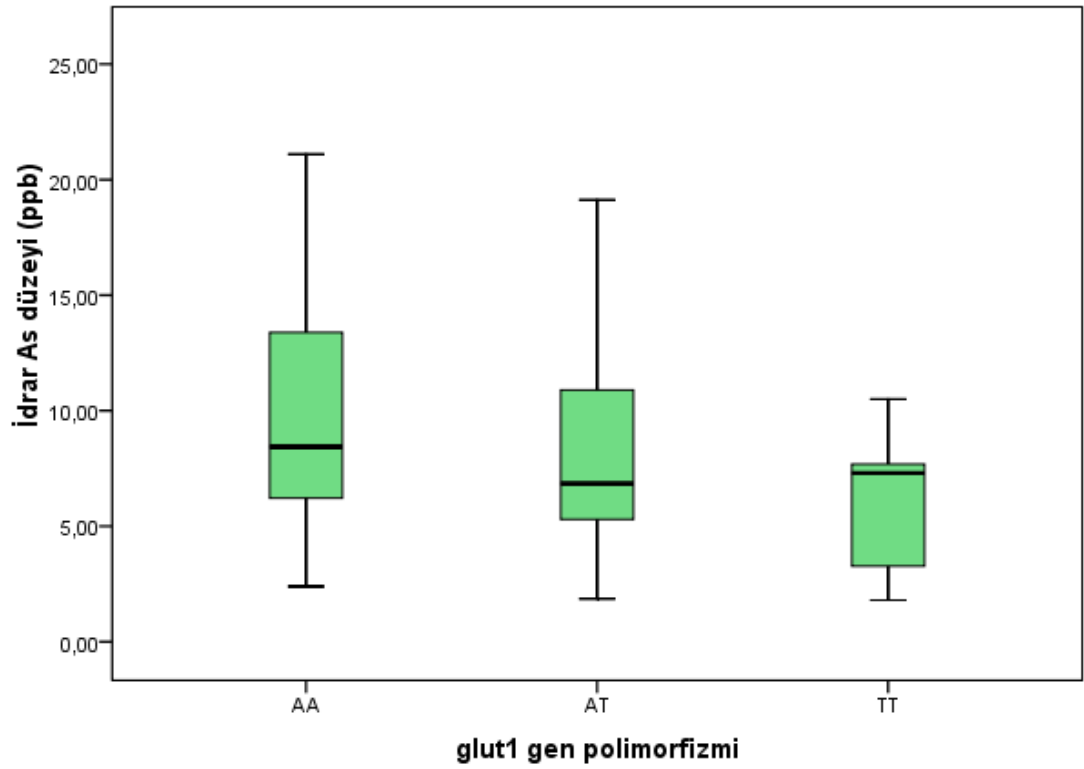
Glut1 A2841T polimorfizminin idrar arsenik düzeyi ile arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Oneway ANOVA ve Student T testi ile yapılmıştır (Çizelge 3.4. ve Çizelge 3.5.). Bireylerin ortalama yaşları  $33,85 \pm 7,79$ ; ortalama maruziyet süreleri ise  $3,65 \pm 2,01$  olarak saptanmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde Glut1 genotipleri ile idrar arsenik düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ( $p=0,047$ ) (Çizelge 3.4.). Bununla birlikte AA genotipli bireyler, AT ve TT genotipli bireylere göre daha yüksek idrar arsenik düzeyine sahiptir (Çizelge 3.5.).

**Çizelge 3.4.** Arseniğe maruz bireylerde Glut1 A2841T polimorfizmi sonucu AA, AT ve TT genotipleri ile idrar arsenik düzeylerinin istatistiksel değerlendirilmesi.

İdrar		Glut1 A2841T				p
		AA	AT	TT	Toplam	
As (ppb)	n	59	36	5	100	<b>0,047</b>
	Ort.±S.S.	12,52±10,31	8,62±4,61	6,11±3,53	10,79±8,66	
	Min.	2,39	1,86	1,80	1,80	
	Maks.	58,00	19,12	10,50	58,00	

**Çizelge 3.5.** İdrar arsenik düzeyi ile Glut1 A2841T polimorfizmi sonucunda oluşan AA ve AT+ TT genotipleri arasındaki ilişki

İdrar		Glut1 A2841T			p
		AA	AT+TT	Toplam	
As (ppb)	n	59	41	100	<b>0,016</b>
	Ort.±S.S.	12,51±10,31	8,31±4,53	10,79±8,66	
	Min.	2,39	1,80	1,80-58,00	
	Maks.	58,00	19,12		



**Şekil 3.1.** Glut1 A2841T gen polimorfizmi ve idrar arsenik düzeyi arasındaki ilişki.

#### 4. TARTIŞMA

Arsenik, Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (The International Agency for Research on Cancer; IARC) tarafından grup1 karsinojen olarak sınıflandırılmakta olup riski fark edilmiş olsa da günümüzde halen birçok kişi arseniğe maruz kalabilmektedir (IARC, 2011). Dünya genelinde özellikle arsenikli içme sularının kullanılması, bu su kaynaklarının olduğu bölgede yetişen besin kaynaklarının tüketilmesiyle arseniğe maruz kalınabilir. Buna ilaveten pestisit üretimi, döküm işçiliğinin yapıldığı fabrikalarda çalışan işçi gruplarında mesleki maruziyet görülebilmektedir. Ülkemizde de yapılan araştırmalar sonucunda özellikle jeolojik yapısı nedeniyle ve döküm işçiliğinin fazla olduğu Kütahya'da arsenik miktarı fazla bulunmuş ve insan sağlığı üzerine etkileri için birçok araştırma yapılmıştır. Elde edilen veriler sonucunda özellikle bölgede yaşayan halkta DNA hasarı, deride hiperpigmentasyon ve bazı durumlarda kanser gibi kronik arsenik zehirlenmesinin etkilerine rastlanmıştır (Nazmi, 2013).

Kronik arsenik maruziyeti sonucu deride keratozis, kanser, diyabet, siroz, anemi gibi çeşitli hastalıklar ortaya çıkabilmektedir. Örneğin; Bangladeş, Kore, Hint ve Meksika' da kronik olarak arsenik maruziyet ile diyabetin ilişkili olduğu saptanmıştır (Islam ve ark., 2012; Rhee, ve ark., 2013; Del Razo ve ark., 2011; Kim ve ark., 2013).

Son yıllardaki çalışmalarda, özellikle arsenik metabolizması ve atılımı üzerine yoğunlaşmıştır. Glukoz taşıyıcı 1 (Glut1) proteinin, arseniğin toksikokinetiğinde rol oynayan önemli proteinlerden biri olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar sonucu; eritrositlerde, epitelyum hücrelerinde, kan- beyin bariyeri ile böbreklerin tübül ve glomerular bölgelerinde Glut1'in bulunduğu saptanmıştır. Bu bölgelerde Glut1'in glükozun yanı sıra arsenit ve karaciğerde metillenen, metil arsenit bileşiklerini de taşıyan bir bazal membran proteini olduğu saptanmıştır (Liu ve ark., 2006; Rosen ve Liu, 2009; Calatayud, 2012).

Sıçanlarla yapılan çalışmalarda, ortamda arsenik ve bileşikleri olduğu zaman Glut1 ile glukoz alımının inhibe olduğu, arsenik ve bileşiklerinin alımının ise arttığı keşfedilmiştir. Bunun için ise birçok araştırma yapılmıştır. Substratın taşıyıcıya bağlanma sabiti olan  $K_m$  değerinin ne kadar az olur ise taşınma oranının o kadar arttığı göz önüne alındığında, mayalarda glukozun  $K_m$  değeri 3mM, metilarsenitin  $K_m$  değeri ise 1,2 mM olarak hesaplanmıştır. Buradan yola çıkarak, sıçanlarda ortamda metilarsenit ve glukoz bulunduğunda Glut1'in glukoz alımını inhibe ettiği ve metilarsenit alımına daha duyarlı hale geldiği saptanmıştır. İlaveten Glut1' in özellikle arseniti, daha toksik olan metilarsenite göre daha az hücre içine aldığı bulunmuştur (Liu ve ark., 2006; Jaing ve ark., 2010).

Glut1 üzerinde bu iki substrat (glukoz ve metilarsenit) için farklı bağlanma bölgelerinin veya farklı hücre içine alım yolaklarının olduğu ortaya atılmıştır. Birinci görüşe göre glukoz ile metilarsenit Glut1 üzerinde aynı bölgeye bağlanmakta ve aynı translokasyon yolağı ile hücre içine alınmaktadır.

Bir diğer görüşe göre de glukoz ve metilarsenit için Glut1 üzerinde farklı bağlanma bölgeleri ve translokasyon yolakları olduğu düşünülmektedir (Liu ve ark., 2006; Jaing ve ark., 2010). Glut1'in su taşıma kanalı olarak da görev aldığı bilinmekte ve bu taşıma sırasında glukoz alımının inhibe olduğu, su alımının ise arttığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Böylece, ikinci görüşünde desteklediği görüş olan; arsenit ve metilarsenitin de Glut1 üzerindeki su kanalları ile hücre içine alındığı öne sürülmüştür. Glut1 tarafından Glukoz ve metilarsenit alımının birbirini inhibe etmesi, sitokalsin B ve forskolin gibi glukoz alımını inhibe edici ajanların, metilarsenit alımını inhibe etmemesi ikinci görüşe uygun olmakta ve glukoz ile metilarsenitin farklı yolaklarla hücreye alındığı desteklenmektedir. Böylece, Glut1 üzerinde bu iki substrat için farklı bağlanma bölgelerinin veya farklı hücre içine alım yolaklarının olduğu vurgulanmıştır (Liu ve ark., 2006; Jaing ve ark., 2010).

Literatürde, Türkiye'de de Glut1 üzerine yapılan araştırmalar bulunmakta olup; çalışmalarda Glut1 ile plasentaya glukoz taşınımı arasındaki bağlantı, diyabetli

bireylerde glukoz alımına bağı olarak Glut ekspresyonu arasındaki ilişki, Glut1 eksiklik sendromu (Glut1 deficiency syndrome), Glut1'in rektal, malign mezotelya, pankreatik neoplazmlarla olan ilişkisini gösterebilmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Gökben ve ark., 2011; Korgun ve ark., 2009; Korgun ve ark., 2005; Haliloğlu ve ark., 2012; Üçer ve ark., 2013; Korgun ve ark., 2011; Baştürk ve ark., 2011; Copper ve ark., 2003).

Arseniğin toksisitesinde yaş, cinsiyet, maruziyet yolu, maruziyet süresi ve bunların yanı sıra genetik polimorfizmlerin arseniğin metabolizasyonunda, atılmasında ve arseniğin kronik etkilerinin ortaya çıkmasında veya kronik etkilerinin derecesinde büyük rol oynadığı saptanmıştır.

Toplumun en az %1'inde bulunan, genetik yapıdaki değişimler polimorfizm olarak adlandırılmaktadır. Spesifik bir bölgedeki baz veya bazlarda meydana gelen nokta mutasyonları sonucu, genetik bir lokusta farklı alel oluşumuna neden olan genetik polimorfizmlere en iyi örnek, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP)'dir. Bu SNP'ler DNA üzerinde buldukları yere göre proteinlerin veya enzimlerin yapı veya fonksiyonu üzerine etki ederek, onların işlev kaybına yol açabilmekte ve bazı hastalıklara neden olabilirler. Bazı SNP'ler DNA'nın promotor bölgesinde veya gen sentez bölgelerinde bulunabilmektedir. DNA'nın kodlanmayan bölgeleri olan ancak gen sentezini yapan RNA polimeraz II' nin sentezini yapacağı bölgeyi tanımasını ve bu bölgeden sentezini başlatmasını sağlayan DNA üzerindeki bölgeler, promotor bölge olarak adlandırılmaktadır. Bu bölgelerdeki polimorfizmler gen sentezinin etki ederek, proteinin veya enzimin üretilmesini engellemekte veya fonksiyonel bozukluklarına neden olabilecek deformasyonlara yol açabilirler.

Bazı polimorfizmlerin arseniğin toksikokinetiğindeki etkileri üzerine ve bu polimorfizmler sonucu hastalıkların görülme insidansı üzerine yapılan bazı çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan bir araştırmada, aynı oranda arseniğe maruz kalan bireylerin sadece %15- 20'sinde deri lezyonları olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmada, polimorfik farklılıklara bağı olarak bazı kişilerde arsenik metabolizasyonunda görevli olan enzim veya proteinlerin işlev kaybı olduğu

saptanmıştır. %15- 20 arasında yer alan bireylerin polimorfizme bağlı olarak arseniği vücutlarından yeterince atamadıkları ve derilerinde biriktirdikleri saptanmıştır (Bhattacharjee ve ark. 2013).

Glut1 gen bölgesindeki genetik farklılıkların arsenik ve glukoz alımına olan etkisi üzerine yapılan araştırmalarda; Ser<sup>66</sup>, Arg<sup>126</sup> and Thr<sup>310</sup> süstitüsyonlarının Glut1’de arsenik alımını artırırken, glukoz alımını inhibe ettiği gösterilmiştir (Jiang ve ark., 2010). Bunun yanı sıra, Glut1 gen bölgesinde bulunan 3 SNP (XbaI G>T, HpyCH4V A>T, and HaeIII T>C) ile diyabetik nefropatinin ilişkili olduğu saptanmıştır (Grabellus ve ark., 2010; Hodgkinson ve ark., 2005; Makni ve ark., 2008; Cui, ve ark., 2012). Yapılan bir çalışmada; Glut1 gen bölgesinin 5’ promotor bölgesinde yer alan A2841T polimorfizminin nefropatiyle olan ilişkisi incelenmiştir. HpyCH4V restirüksiyon enzimi kullanılarak yapılan çalışma sonucunda TT genotipine sahip bireylerin diyabetik nefropatiye daha yatkın oldukları saptanmıştır (Hodgkinson ve ark., 2005). Glut1 A2841T polimorfizmi ile hücrelerdeki glukoz düzeyi ve kanser gelişimi arasındaki ilişkiyi araştıran bir diğer çalışmada ise, HpyCH4V restirüksiyon enzimi ile PCR ürünleri kesilmiş ve polimorfik farklılığa bağlı olarak bazı bireylerin (AA genotipine sahip) glukozu daha fazla aldığı ve bu kişilerde kanser hücrelerinin çoğalmasının daha hızlı olduğu gösterilmiştir (Amann ve ark., 2011).

Glut1 polimorfizm çalışmaları göz önüne alındığında, Glut1 gen bölgesindeki polimorfizmlerin arsenik düzeyine etkisini gösterir bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Bizim çalışmamızda ise Glut1’in promotor bölgesinde bulunan, Glut1 A2841T polimorfizminin idrar arsenik düzeyine etkisi araştırılmıştır ve polimorfizmin idrar arsenik düzeyi üzerine etkisi olduğu saptanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 3.4. ve 3.5.’te verilmiş olup, Glut1 A2841T polimorfizmi ile arsenik düzeyi arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir (p=0,047). Glut1 A2841T genotipleri açısından değerlendirildiğinde, AA (homozigot tipik) (12,52±10,31 µg/L) genotipine sahip bireylerin, AT (heterozigot) (8,62±4,61 µg/L)

ve TT (homozigot atipik) ( $6,11 \pm 3,53$   $\mu\text{g/L}$ ) genotipine sahip bireylere göre idrarlarındaki arsenik düzeylerinin daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu da Glut1'in arseniğin idrarla atılımında önemli bir transmembran proteini olduğunu göstermektedir. Bulgularımız doğrultusunda; arseniğin taşınmasında ve idrarla atılımında büyük role sahip olan Glut1 A2841T polimorfizminde, AA genotipine sahip bireylerin AT ve TT genotipine sahip bireylere göre daha avantajlı olduğu görülmektedir.

A2841T polimorfizmi Glut1 geninin promotor bölgesinde yer alan bir SNP polimorfizmi olup, transkripsiyon faktörlerinin promotor bölgesine bağlanmasını bozarak gen ifadesini etkileyebileceği çalışmamızda gösterilmiştir. Benzer şekilde Glut1 A2841T polimorfizmi ile diyabetik nefropatinin ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada da T aleline sahip bireylerde A aleline sahip bireylere göre nefropatinin daha fazla olduğu görülmüştür (Hodgkinson ve ark., 2005). Bu durumda T aleline sahip bireylerde Glut1'in az sentezlenmesine bağlı olarak, kişilerde idrarla atılması gereken metabolitler böbrekten az süzülmemekte ve idrarla atılımı az olduğundan bu bireyler nefropatiye daha yatkın olmaktadır. Bizim çalışmamızda da elde ettiğimiz veriler doğrultusunda A aleline sahip bireylerin Glut1 sentezi başarılı bir şekilde gerçekleşmekte olduğu, buna bağlı olarak ta arsenik ve metilenmiş metabolitlerin böbrekten iyi bir şekilde süzülerek, idrarla atılımının daha fazla olduğu elde edilen verilerle birbirini desteklemektedir.

Bu çalışmada mesleki olarak arseniğe maruz kaldığı öngörülen bireylerde; arseniğin hücreye alınmasında ve idrarla atılmasında Glut1 genindeki polimorfizm ile bireylerdeki idrar arsenik düzeyi arasındaki ilişkiyi araştırmak ve polimorfizm sonuçlarından yola çıkarak toplumumuzun genetik haritasına katkı koyabilmek hedeflenmiştir. Sonuç olarak, bulgularımız arseniğin idrarla atılımında Glut1 A2841T polimorfizminin önemli bir role sahip olmasını göstermesi açısından ve sürekli olarak arseniğe maruz kalan Türk işçi popülasyonunda Glut1 polimorfizmi ile arsenik düzeyi arasındaki ilişkiyi gösteren literatürdeki ilk çalışma olması nedeniyle de önem taşımaktadır.



## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Glukoz taşınmasında önemli bir bazal transmembran proteini olan Glut1 proteini, aynı zamanda arsenit ve metilenmiş arsenit bileşiklerinde taşınmasında rol oynamaktadır (Liu ve ark., 2006; Rosen ve Liu, 2009; Calatayud ve ark., 2012). Çalışmamızda metal üretim işletmelerinde metallere maruz kalan 100 işçinin kan ve idrar örnekleri alınarak; idrar örneklerinden arsenik düzeyi ve kanlarından ise arseniğin toksikokinetiğinde rol oynayan Glut1 genindeki A2841T polimorfizmi araştırılarak, Glut1 gen polimorfizminin idrar arsenik düzeyine etkisi araştırılmıştır.

Çalışma grubunu oluşturan arseniğe maruz işçi grubunda (n:100) Glut1 A2841T polimorfizminin genotip frekansları %59 homozigot tipik (AA), % 36 heterozigot (AT) ve %5 homozigot atipik (TT) olarak belirlenmiştir. Bu genotiplere sahip bireylerin ortalama idrar arsenik düzeyleri  $10,79 \pm 8,66$  olarak tespit edilmiştir. Polimorfizm sonucu oluşan alel frekansları ise (n:200); A alel frekansı %77 (n:154), T alel frekansı ise %23 (n: 46) olarak belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi sonucu, Glut1 A2841T polimorfizmi ile idrar arsenik düzeyi arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ( $p=0,047$ ). AA genotipine sahip bireylerin, AT ve TT genotipine sahip bireylere göre idrar arsenik düzeylerinin daha yüksek konsantrasyonda olduğu belirlenmiştir. Bu da Glut1 A2841T polimorfizminin, idrar arsenik düzeyini etkilediğini göstermektedir.

Arsenik toksikokinetiğinin aydınlatılması amacıyla yapılan polimorfizm çalışmaları ve polimorfizmlerin biyolojik örneklerdeki arsenik düzeyine etkisinin araştırılması, arsenik mekanizmalarının aydınlatılmasında önemli katkılar sağlamaktadır. Ayrıca çalışmamızda da olduğu gibi Türk popülasyonu üzerinde yapılan bu gibi polimorfik çalışmalar sonucu Türk toplumunun genetik haritalanmasına katkı sağlanabilecektir.

Sonuç olarak, toksik metallerin biyolojik dokularda tespiti ile zehirlenmenin derecesi belirlenerek toksikasyonun çevresel mi, yoksa adli kovuşturmaya sebep olabilecek kaza veya kasıtlı zehirlenme vakası mı olduğunu belirlemek önemlidir. Ayrıca son günlerde gündemde olan “6331 Sayılı İş Sağlığı ve Güvenliği Kanunu” ile çalışanların iş ortamı açısından ve işçilerin sağlık ve güvenlik haklarını korumak amacıyla bu tip çalışmalar adli açıdan büyük önem taşımaktadır.

Günden güne artış gösteren arsenik maruziyetine bağlı hastalıklar ve kanser gelişiminin önüne geçmek amacıyla yapılan polimorfizm çalışmaları, bireylerin arseniğe karşı duyalılığının belirlenmesinde önem taşımaktadır. Çalışma grubumuzun da dahil olduğu arseniğe sürekli maruz kalan işçilerin, iş yerlerinde kişisel koruyucu malzemeler kullanması, çalışma ortamlarının havasının sürekli olarak kontrol edilmesi ve işçilerin düzenli sağlık kontrollerinden geçmeleri gerekmektedir. Kontroller sonucunda sürekli ağır metal maruziyetine bağlı olarak oluşabilecek hastalık ve kanser oluşumuna duyarlı bireyler tespit edilmesi dahilinde, genetik açıdan duyarlı bireyler arseniğe daha az maruz kalabilecekleri iş pozisyonlarında görev isteyebilme hakkına sahip olmaktadır. Bu talep kabul edilmediği takdirde işçiler hukuken haklarını arayabilmekte ve bu da adli açıdan önem taşımaktadır.

“6331 Sayılı İş Sağlığı ve Güvenliği Kanunu” gereğince önlemlerin uygun şekilde alınması sonucu ve gerekli sağlık kontrollerinin yapılması ile bireylerin arsenik maruziyetli hastalıklara ve kansere yakalanma riskleri azaltılarak, işçi sağlığı korunmuş olacaktır. Bunlara ilaveten, hastalanma insidanslarındaki azalma, tanı ve tedavi amaçlı yapılan harcamalar da azaltılacak ve ülke ekonomisine katkı da bulunulacaktır.

## ÖZET

### **Mesleki Olarak Arseniğe Maruz Kalan Bireylerdeki Glut1 Gen Polimorfizminin İdrar Arsenik Düzeylerine Etkisi**

Arseniğe kronik maruziyet sonucu arseniğin toksikokinetiğinde rol oynayan bazı enzimler ve proteinler, arsenik ilişkili hastalıklar ve kanserin gelişiminde büyük role sahiptir. Özellikle arseniğin vücutta birikmesini ve atılımını sağlayan proteinler ile enzimler kronik etkilerin ortaya çıkmasında önemli etkindir.

Çalışmamızda, iş yerlerinde sürekli metallere maruz kalan 100 erkek işçinin kan ve idrar örneklerindem yararlanılarak, Glut1 gen polimorfizminin, idrar arsenik düzeyine etkisini belirlemek hedeflenmiştir.

Çalışmada öncelikle 100 işçiye ait idrar örneklerinden, Zeeman zemin düzeltme sistemli Grafıt Fırını Atomik Absorpsiyon Spektroskopi'si (GFAAS) kullanılarak arsenik konsantrasyonları ölçümü gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada ise Glut1 A2841T tek nükleotit polimorfizmi Polimeraz Zincir Reaksiyonu- Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (PCR- RFLP) yöntemi ile belirlenerek, elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

İstatistiksel analizler sonucu, Gut1 A2841T polimorfizmi ile idrar arsenik düzeyi arasında anlamlı bir ilişki saptanmış olup, Glut1 A2841T normal genotiplerinin (AA) diğer genotiplere göre idrar arsenik düzeyleri daha yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Sonuç olarak, çalışmamızda Glut1 A2841T tek nükleotit polimorfizminin idrar arsenik düzeyine etki ettiği gösterilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Arsenik, Glut1, HpyCH4V, idrar, polimorfizm

## SUMMARY

### **Effect of Glut1 Gene Polymorphism on Urine Arsenic Levels of Individuals Occupationally Exposed to Arsenic**

Chronic arsenic exposure cause to many disease and cancer. Some proteins and enzymes, which have a role in toxicokinetic of arsenic, effect pathogenesis of arsenic exposure- related diseases and cancer. Specially proteins and enzymes which responsible to excretion and accumulation of arsenic, have a big role in chronic effect formation.

In this study, the aim was to determine the effect of polymorphism of gene Glut1 to urine arsenic level in 100 Turkish smelter workers.

In this study, firstly, arsenic concentration of urine samples of 100 workers were measured by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy (GFAAS) with Zeeman correction. In the second part of study, glut1 A2841T single nucleotide polymorphism was investigated by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method and the effects of these single nucleotide polymorphisms on urine arsenic levels were statistically analysed.

As a result of statistical analysis, there was a statistically significant association between glut1 A2841T polymorphism and urine arsenic level. It was detected that the glut1 A2841T wild type genotypes have higher urine arsenic level than other genotypes.

In conclusion, this study show that Glut1 A2841T single nucleotide polymorphism is associated with urine arsenic levels.

**Key words:** Arsenic, Glut1, HpyCH4V, polymorphism, urine

## KAYNAKLAR

- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (2007). Toxicological Profile for Arsenic.
- AGILENT TECHNOLOGIES INC. (2010). Analytical Methods for Graphite Tube Atomizers User's Guide. 7th edition. Australia.
- AGUSA, T., FUJIHARA, J., TAKESHITA, H., IWATA, H. (2011). Individual variations in inorganic arsenic metabolism associated with AS3MT genetic polymorphisms. *Int J Mol Sci.* 12(4): 2351- 2382.
- AMANN, T., KIROVSKI, G., BOSSERHOFF, A. K., HELLERBRAND, C., (2011). Analysis of a promoter polymorphism of The GLUT1 gene in patients with hepatocellular carcinoma. *Molecular Membrane Biology.* 28 (3):182– 186.
- APOSHIAN, HV., GURZAU, ES., LE, XC., GURZAU, A., HEALY, SM., LU, X., MA, M., YIP, L., ZAKHARYAN, RA., MAIORINO, RM., DART, RC., TIRCUS, MG., GONZALEZ-RAMIREZ, D., MORGAN, DL., AVRAM, D., APOSHIAN, MM. (2000). Occurrence of monomethylarsonous acid in urine of humans exposed to inorganic arsenic. *Chem Res Toxicol* 13(8): 693-697.
- APOSTOLI, P., BARTOLI, D., ALESSIO, L., BUCHET, JP. (1999.) Biological monitoring of occupational exposure to inorganic arsenic. *Occup Environ Med.* 56 (12): 825- 832.
- BAILEY, K. A., WU, M. C., WARD, W. O., SMEESTER, L., RAGER, J. E., VARGAS, G. G., DEL RAZO, L. M., DROBNÁ, Z., STÝBLO, M., FRY, R. C. (2013). arsenic and the epigenome: inter- individual differences in arsenic metabolism related to distinct patterns of DNA methylation. *J Biochem Mol Toxicol.* 27 (2): 106– 115.
- BAŞKAN, M. B., PALA, A. (2009). İçme sularında arsenik kirliliği: ülkemiz açısından bir değerlendirme. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi.* 15 (1): 69- 79.
- BAŞTÜRK, O., SINGH, R., KAYGUSUZ, E., BALCI, S., DURSUN, N., GÜLHACI, N., ADSAY, N. V., (2011). “Glut-1 expression in pancreatic neoplasia: implications in pathogenesis, diagnosis, and prognosis”. *Pancreas.* 40 (2): 187– 192.
- BISSEN, M. FRIMMEL, F. H. (2003). Arsenic- A review part I: Occurance, Toxicity, Speciation, Mobility. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 1, 9-18, part II. Oxidation of arsenic and Its Removal in Water Treatment. *Acta Hydrochim Hydrobiol.* 31: 97- 107.
- CALATAYUD, M., BARRIOS, J. A., VELEZ, D., DEVESA, V., (2012). In vitro study of transporters involved in intestinal absorption of inorganic arsenic. *Chem. Res. Toxicol.* 25: 446– 453.

- CHERNOVA, Y., ARITA, A., COSTA, M. (2012). Carcinogenic metals and the epigenome: understanding the effect of nickel, arsenic, and chromium. *metallomics*. 4 (7): 619–627.
- COPPER, R., SARIOĞLU, S., SÖKMEN, S., FÜZÜN, M., KÜPELİOĞLU, A., VALANTINE, H., GÖRKEN, I. B., AIRLEY, R., WEST, C., (2003). “Glucose Transporter- 1 (Glut-1): A Potential Marker of Prognosis in Rectal Carcinoma?”. *British Journal of Cancer*. 89: 870 – 876.
- CUI, W., DU, B., ZHOU, W., JIA, Y., SUN, G., SUN, J., ZHANG, D., YUAN, H., XU, F., LU, X., LUO, P., MIAO, L., (2012). “Relationship between five Glut1 gene single nucleotide polymorphisms and diabetic nephropathy: a systematic review and meta-analysis”. *Mol Biol Rep*. 39: 8551– 8558.
- ÇİZMECİOĞLU, B., YANTURALI, E. S., (2008). Arsenik. *İnsan Sağlığı ve Hastalıkları*. 4: 32- 35.
- DEL RAZO, L. M., GARCIA- VARGAS, G. G., VALENZUELA, O. L., CASTELLANOS, E. H., SANCHEZ- PENA, L. C., CURRIER, J. M., DROBNA, Z., LOOMIS, D., STYBLO, M., (2011). “Exposure to arsenic in drinking water is associated with increased prevalence of diabetes: A cross-sectional study in the Zimapán and Agunera Regions in Mexico”. *Environmental Health*. 10: 73.
- DEMİR, N., TURKSOY, V. A., KAYAALTI, Z., SOYLEMEZOĞLU T., SAVAŞ, I., (2014). The evaluation of arsenic and cadmium levels in biological samples of cases with lung cancer. *Tuber Toraks*. 62 (3): 191- 198.
- DROBNÁ, Z., WALTON, F.S., PAUL, D.S., XING, W., THOMAS, D.J., STYBLO, M. (2010). Metabolism of arsenic in human liver: The role of membrane transporters. *Arch Toxicol*. 84(1):3-16.
- DZIUBINSKA, E. M., WAWRZYCKA, D., WYSOCKI, R. (2012). Arsenic and antimony transporters in eukaryotes. *Int. J. Mol. Sci*. 13: 3527- 3548.
- 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.
- GÖKBEN, S., YILMAZ, S., KLEPPER, J., SERDAROĞLU, G., TEKGÜL, H., (2011). “Video/EEG recording of myoclonic absences in GLUT1 Deficiency Syndrome with a hot-spot R126C mutation in the SLC2A1 gene”. *Epilepsy & Behavior*. 21: 200– 202.
- GRABELLUS, F., SHEU S., BACHMANN H. S., LEHMANN, N., OTTERBACH, F., HEUSNER, T. A., ANTOCH, G., BOCKISCH, A., KIMMING, R., SCHMID, K. W., STAHL, A. R., (2010). “The XbaI G.T Polymorphism of the glucose transporter 1 gene modulates 18F-FDG uptake and tumor aggressiveness in breast cancer”. *The Journal of Nuclear Medicine*. 51 (8): 1191- 1197.

- GREGUS, Z., NÉMETI, B. (2002). Purine Nucleoside Phosphorylase as a Cytosolic Arsenate Reductase. *Toxicol Sci.* 70(1):13-19.
- GREGUS, Z., ROOS, G., GEERLINGS, P., NÉMETI, B. (2009). mechanism of thiol-supported arsenate reduction mediated by phosphorolyticaarsenolytic enzymes: II. enzymatic formation of arsenylated products susceptible for reduction to arsenite by thiols. *Toxicol Sci.* 10(2):282-292.
- GRIBBLE, M. O., HOWARD B. V., UMANS J. G., SHARA N. M., FRANCESCONI K. A., GOESSLER W., CRAINICEANU C. M., SILBERGELD E. K., GUALLAR E., NAVAS- ACIEN A (2012). Arsenic exposure, diabetes prevalence, and diabetes control in the strong heart study. *Am J Epidemiol.* 176 (10): 865- 874.
- HALILOĞLU, G., VEZİR, E., BAYDAR, L., ÖNOL, S., SİVRİ, S., COŞKUN, T., TOPÇU, M., (2012). “When do we need to perform a diagnostic lumbar puncture for neurometabolic diseases? positive yield and retrospective analysis from a tertiary center”. *The Turkish Journal of Pediatrics.* 54: 52- 58.
- HAYAKAWA, T., KOBAYASHI, Y., CUI, X., HIRANO, S. (2005). A new metabolic pathway of arsenite: Arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Arch Toxicol.* 79: 183-191.
- HODGKINSON, A. D., PAGE, T., MILLWARD, B. A., DEMAINE, A. G., (2005). Novel Polymorphism in the 5V Flanking Region of the Glucose Transporter (GLUT1) Gene is Strongly Associated with Diabetic Nephropathy in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications.* 19: 65– 69.
- HUGHES, M. F., BECK B. D., CHEN Y., LEWIS A. S., THOMAS D. J (2011). Arsenic Exposure and Toxicology: A Historical Perspective. *Toxicological Sciences.* 123 (2): 305- 332.
- HULLA, J.E. (2014). Metals. In : Hayes' Principles and Methods of Toxicology, Eds.: A. Wallace Hayes and Claire L. Kruger, New York: CRC Press, p.:825-872.
- IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Arsenic and Arsenic Compounds. Vol. 100c. Lyon, France: IARC; 2011.
- ISLAM, R., KHAN, I., HASSAN, S. N., MCEVOY, M., D’ESTE, C., ATTIA, J., PEEL, R., SULTANA, M., AKTER, S., MİLTON, A. H., (2012). “Association between Type 2 diabetes and chronic arsenic exposure in drinking water: a cross sectional study in bangladesh”. *Envorimental Health.* 11 (38).
- JIANG, X., MCDERMOTT, J. R., AJEES, A. A., ROSEN, B. P., LIU, Z., (2010). Trivalent arsenicals and glucose use different translocation pathways in mammalian glut1. *metallomics.* 2 (3): 211– 219.
- KALYANASUNDARAM, D., KIM, J.H., YEO, W. H., OH, K., LEE, K. H., KIM, M. H., RYEW, S. M., AHN, S. G., GAO, D., CANGELOSI G. A., CHUNG, J. H. (2013).

Rapid extraction and preservation of genomic DNA from human samples. *Anal Bioanal Chem.* 405 (6): 1977– 1983.

- KIM, N. H., KÜÇÜKSEZGİN, F., GÖNÜL, L. T., TAŞEL, D. (2014). N. H., MASON, C. C., NELSON, R. G., AFTON, S. E., ESSADER, A. S., MELDİN, J. E., LEVİNE, K. E., HOPPİN, J. A., LIN, C., KNOWLER, W. C., SANDLER, D. P., (2013). “Arsenic exposure and incidence of type 2 diabetes in Southwestern American Indians”. *American Journal of Epidemiology.* 177 (9): 962- 969.
- KORGUN, D. K., SARKICIOĞLU, B., S., ALTUNBAŞ, H., DEMİR, R., KORGUN, E.T., (2009). “Type-2 diabetes down-regulates glucose transporter proteins and genes of the human blood leukocytes”. *The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation.* 69 (3): 350– 358.
- KORGUN, E.T., ÖZENCİ, Ç. C., SEVAL, Y., DESOYE, G., DEMİR, R., (2005). “Do glucose transporters have other roles in addition to placental glucose transport during early pregnancy?”. *Histochem Cell Biol.*123: 621– 629.
- KUCUKSEZGIN, F., GONUL, L. T., TASEL, D., (2014). Total and inorganic arsenic levels in some marine organisms from Izmir Bay (Eastern Aegean Sea): A risk assessment. *Chemosphere.* 112: 311- 316.
- KURGUN, E. T., ACAR, N., SATI, L., KORGUN, D. K., OZEN, A., UNEK, G., USTUNEL, İ., DEMİR, R., (2011). “Expression of glucocorticoid receptor and glucose transporter-1 during placental development in the diabetic rat”. *Folia Histochemica et Cytobiologica.* 49 (2): 325- 334.
- LIU, J. VE WAALKERS, M. P., (2008). Liver is a Target of Arsenic Carcinogenesis. *Toxicological Sciences.* 105 (1): 24– 32.
- LIU, J., GOYER, R. A., WAALKERS, M. P., (2008). Toxic Effects of Metals. Klaassen C D, editor. “Casarett & Doull’s Toxicology The Basic Science of Poisons”. 7th ed. McGraw- Hill Medical Publishing Division: New York. 931- 939.
- LIU, Z., SANCHEZ, M. A., JIANG, X., BOLES, E., LANDFEAR, S. M., ROSEN, B. P., (2006) Mammalian glucose Permease Glut1 facilitates transport of arsenic trioxide and methylarsonous acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 351:424–430.
- LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S: L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., DARNELL, J. (2000). Uniporter- catalyzed transport. *Molecular Cell Biology.* 4th ed. Freeman, W. H. New York.
- MAKNI, K., JARRAYA, F., REBAI, M., MNIF, F., BOUDAWARA, M., HAMZA, N., REKIK, N., ABİD, M., HACHICHA, J., GRANIER, C., REBAI, A., AYADI, H., (2008). “Risk genotypes and haplotypes of the Glut1 gene for type 2 diabetic nephropathy in the Tunisian population”. *Annals of Human Biology.* 35 (5): 490– 498.



- ORUÇ, N., (2013). “Türkiye’de Arsenikli Su Problemi: Genel Değerlendirme”. T.C. Kütahya Valiliği Çevre ve Şehircilik İl Müdürlüğü. [http://www.cmo.org.tr/resimler/ekler/fd208eb5e2487af\\_ek.pdf?tipi=72&turu=X&sube=0](http://www.cmo.org.tr/resimler/ekler/fd208eb5e2487af_ek.pdf?tipi=72&turu=X&sube=0) . (Erişim Tarihi: 15.12.2014).
- ÖZYAZGAN, S. (2002). Toksikokinetik. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Zehirlenmeler Sempozyumu Dizisi. 32: 9- 19.
- REICH, E. S. (2011). Conflicting studies fuel arsenic debate. *Nature*. 478: 437- 478.
- RHEE, S. Y., HWANG, Y. C., WOO, J., CHIN, S. O., CHON, S., KİM, Y. S., (2013). “Arsenic exposure and prevalence of diabetes mellitus in Korean adults”. *J Korean Med Sci*. 28: 861- 868.
- ROBICHAUD, T., APPELYARD, A. N., HERBERT, R. B., HENDERSON, P. J. F., CARRUTHERS, A., (2011). Determinants of ligand binding affinity and cooperativity at the Glut1 endofacial site. *biochemistry*. 19; 50 (15): 3137– 3148.
- ROSEN, B. P. VE LIU, Z. (2009). Transport pathways for arsenic and selenium: A minireview. *Environ Int*. 35 (3): 512– 515.
- ROSEN, B. P. VE LIU, Z. (2009). Transport pathways for arsenic and selenium: A minireview. *Environ Int*. 35(3): 512– 515.
- ROSSMAN, T. G. (2003). Mechanism of arsenic carcinogenesis: An integrated approach. *Mutation Research*. 533: 37– 65.
- SEARS, M. E., KERR, K. J., BRAY, R. I., (2012). Arsenic, cadmium, lead and mercury in sweat: A systematic review. *journal of environmental and public health*. doi:10.1155/2012/184745.
- SILVA, R. S., MORI, R. C., SILVA, A. D., OKAMOTO, M. M., FREITAS, H. S., MACHADO, U. F. (2010). The Na<sup>+</sup>/ glucose cotransporters: from genes to therapy. *Braz J Med Biol Res*. 43 (11): 1019- 1026.
- SILVER, S. VE MISRA, T. K. (1984). Bacterial Transformations of and Resistances To Heavy Metals. *Basic Life Sci* 28: 23– 46.
- SINGH, R., SINGH S., PARIHAR P., SINGH V. P., PRASAD S. M. (2015). Arsenic Contamination, Consequences and Remediation Techniues: A Review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 112: 247– 270.
- STAMATELOS, S. K., BRINKERHOFF, C. J., ISUAPALLI, S. S., GEORGOPOULOS, P. G. (2011). Mathematical model of uptake and metabolism of arsenic (III) in human hepatocytes- Incorporation of cellular antioxidant response and threshold- dependent behavior. *Systems Biology*. 5: 16.

- SUMI, D. VE HIMENO, S. (2012). Role of arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase in arsenic metabolism and toxicity. *Biol. Pharm. Bull.* 35 (11): 1870– 1875.
- SUN, R. C., BOARD, P. G., BLACKBURN, A. (2011). Targeting metabolism with arsenic trioxide and dichloroacetate in breast cancer cells. *Sun et al. Molecular Cancer.* 10: 142.
- ŞANLI, Y., KAYA, S. (1984). Biyolojik materyalde arsenik aranması, Ankara Üni. Vet. Fak. Derg. 31 (1): 1-14.
- T.C. MİLLİ EĞİTİM BAKANLIĞI (2012). Kimya Teknolojisi Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi. Ankara.
- THOMAS, D.J. (2010). Arsenolysis and thiol-dependent arsenate reduction. *Toxicol Sci.* 117(2):249-252.
- TOKAR, E.J., BOYD, W.A., FREEDMAN, J.H., WAALKES M. P. (2013). Toxic Effects of Metals. In : Casarett and Doull's TOXICOLOGY/The Basic Science of Poisons, Ed.: C.D. Klaassen, United States: McGraw Hill Education. 986- 990.
- TÜRKSOY, V. A., KAYA, D., YILMAZ, H. Ö., SÖYLEMEZOĞLU, T. (2013). Metalürji işçilerin saç örneklerinden tespit edilen arsenik düzeyleri. *Türkiye Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi.* 70 (1): 15- 20.
- ÜÇER, Ö., DAĞLI, A. F., KILIÇARSLAN, A. ARTAŞ, G., (2013). “Value of Glut-1 and koc markers in the differential diagnosis of reactive mesothelial hyperplasia, malignant mesothelioma and pulmonary adenocarcinoma”. *Turk Patoloji Derg.* 29: 94-100.
- ÜNLÜ, M. İ., BİLEN, M., GÜRÜ, M. (2011). Kütahya- Emet bölgesi yer altı sularında bor ve arsenik kirliliğinin araştırılması. *Gazi Üniv. Müh. Mim. Fak. Der.* 26 (4): 753- 760.
- VAHTER, M (2009). Effects of arsenic on maternal and fetal health. *Annu. Rev. Nutr.* 29: 381- 399.
- VAHTER, M. (2000). Genetic polymorphism in the biotransformation of inorganic arsenic and its role in toxicity. *Toxicology Letters* 112- 113: 209– 217.
- VURAL, N. (1984). Toksikoloji. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Yayınları, p.:310.
- VURAL, N. (2005) Metalik Zehirler. In: Toksikoloji. 1st ed. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:73. 513-519.
- WANG, J. C. C., WANG, A., GAO, J., CAO, S., SAMAD, I., ZHANG, D., RITLAND, C., CUI, J. Z., MATSUBARA, J. A. (2012). Technical Brief: Isolation of total DNA from postmortem human eye tissues and quality comparison between iris and retina. *Molecular Vision.* 18: 3049- 3056.

WATANABE, T., HIRANO S. (2012). Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. *Arch Toxicol.* 87: 969–979.

WOOD, I. S., TRAYHURN, P., (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition.* 89: 3–9.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2011). Arsenic in drinking water.

YAĞMUR, F. VE HANCI, İ. H. (2002). Arsenik. *Sted.* 11 (7): 250- 251.

ZANGI, R. VE FILELLA, M. (2012). Transport routes of metalloids into and out of the cell: A review of the current knowledge. *Chemico-Biological Interactions.* 197: 47–57.

## EKLER

## ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Arsenik ve diğer toksik metallere maruz kalan bireylerde mitokondriyel ve nükleer DNA hasarının bazı gen polimorfizmleri ile ilişkisi			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVAN/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Zeliha Kayaaltı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Adki Kimya ve Toksikoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	<input type="checkbox"/>			
	Yüksek Doz Araştırması	<input type="checkbox"/>			
	Diğer ise belirtiniz: Prospektif Çalışma				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARAS I <input type="checkbox"/>	

2021/10/15



*Zeliha Kayaaltı*  
 Doç.Dr. Zeliha Kayaaltı  
 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
 Etik Kurul Başkanı

2021/10/15

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarîhi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU				Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
OLGU RAPOR FORMU				Türkçe <input 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		
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>		
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input type="checkbox"/>			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:06-242-13	Tarih: 08 Nisan 2013		
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri ile bilgilendirilmiş gönüllü olur formu incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına, toplantısına katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			
<b>ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU</b>				
ÇALIŞMA ESASI		Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu		
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof.Dr.Mehmet MELLİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlgili	Katılım *	İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>M. Mellî</i>
Prof.Dr.Cihan YURDAYDIN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>C. Yurdaydin</i>
Prof.Dr.Mehmet GÜREL	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>M. Gürel</i>
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY	Farmakoloji	A.Ü.Eczacılık Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>T. Özçelikay</i>
Prof.Dr.Nuhan PURALI	Biyo fizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>N. Puralı</i>
Prof.Dr.Cem ATBAŞOĞLU	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>C. Atbaşoğlu</i>
Prof.Dr.Serdar ÖZTÖRK	Biyo kimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>S. Öztörk</i>
Prof.Dr.Serap SIVRI	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>S. Sivri</i>
Prof.Dr.Zarife ŞENOCAK	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Z. Şenocak</i>
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>B. Çakır</i>
Doç.Dr.Güngör UTKAN	Tıbbi Onkoloji	A.Ü. 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 checked="" type="checkbox"/>	<i>G. Utkan</i>
Doç.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyo istatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>D. Öztuna</i>
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>N. Kutlay</i>
Yrd.Doç.Dr.Volkan KAVAS	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü. 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 checked="" type="checkbox"/>	<i>V. Kavas</i>
Gülüm ASLAN	Arkeoloji	-	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>G. Aslan</i>

## ÖZGEÇMİŞ

### I. Bireysel Bilgiler

**Adı:** Fezile

**Soyadı:** ÖZDEMİR

**Doğum yeri ve tarihi:** Lefkoşa, 1991

**Uyruğu:** K.K.T.C

### II. Eğitimi

**2009-2013-** Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (Lisans)

**2005-2009-** 20 Temmuz Fen Lisesi

**2002-2005-** Bayraktar Ortaokulu

**1997-2002-** Gönyeli İlkokulu

**Yabancı Dili:** İngilizce

### III. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Adli Toksikoloji Derneği

### IV. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler:

Kaya Akyüzlü D, Kayaaltı Z, Söylemez E, Bal C, **Özdemir F**, Tutkun E, Söylemezoğlu T. “Effect of Glutathione-S-Transferase Omega 2 N142D Gene Polymorphism on Urinary Mercury Levels in School-Aged Children”. 50th Congress of the European Societies of Toxicology, Edinburgh, İskoçya. **Toxicology Letters 2014; 229S:S89’da yayınlanmıştır. doi:10.1016/j.toxlet.2014.06.334. (ISI).**

Kayaaltı Z, Kaya Akyüzlü D, Söylemez E, Tutkun E, **Özdemir F**, Bal C, Söylemezoğlu T. “Glutathione-S-Transferase P1 Ile105Val Gene Polymorphism and Acute Elemental Mercury Exposure”. 50th Congress of the European Societies of Toxicology, Edinburgh, İskoçya. **Toxicology Letters 2014; 229S:S229’da yayınlanmıştır. doi:10.1016/j.toxlet.2014.06.768. (ISI).**

**V. Ulusal ve uluslar arası katılımlı bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:**

1. **Özdemir F**, Kayaaltı Z. “KKTC’de Olay Yeri İncelemesi”. Adli Bilimler Bahar Sempozyumu, Marmaris. **(SÖZLÜ SUNUM)**
2. **Özdemir F**, Kayaaltı Z, Kaya Akyüzlü D. “Adli Bilimlerdeki Dilsiz Tanıklar: Kıl Örneklerinin Adli Olaylardaki Önemi”. Adli Bilimler Bahar Sempozyumu, 2014, Marmaris.
3. Cantürk N, Parlakgörür M, **Özdemir F**. “Diyaliz Ünitesinde Tıbbi uygulama Hatası İddiası: Bir Olgu Sunumu”. Adli Bilimler Bahar Sempozyumu, 2014, Marmaris.
4. **Özdemir F**. “ Kuzey Kıbrıs Türk Toplumunu Liderlerinden Dr. Fazıl Küçük”, V. Ulusal Tıp Günleri, 2014, Kastamonu. **(SÖZLÜ SUNUM)**
5. **Özdemir F**. “KKTC’de Adli Bilimlere Genel Bakış”, 11. Uluslararası Anadolu Adli Bilimler Kongresi, 2014, Bayburt. **(SÖZLÜ SUNUM)**
6. **Özdemir F**, Kayaaltı Z. “Adli Olaylarda Alkol Düzeyini Etkileyen Faktörler ve Alkol Düzeyi Biyogöstergeleri”, 11. Uluslararası Anadolu Adli Bilimler Kongresi, 2014, Bayburt.
7. **Özdemir F**, “Mining Pollution in Turkish Republic of Northern Cyprus: an overview”. 1<sup>st</sup> International Congress and Workshop of Forensic Toxicology. 2014, Ankara. **(SÖZLÜ SUNUM)**
8. Akyüzlü D, **Özdemir F**, Kayaaltı Z. “Effect Of Chronic Arsenic Exposure and Glut1 Polymorphism In The Development of Diabetes Mellitus”, 1<sup>st</sup> International Congress and Workshop of Forensic Toxicology. 2014, Ankara.
9. Akyüzlü D, Kayaaltı Z, **Özdemir F**, Söylemezoğlu T. “MRP1 G1666A Gene Polymorphism is Associated with Urine Arsenic Level”, 1<sup>st</sup> International Congress and Workshop of Forensic Toxicology, 2014, Ankara.

**VI. Diğer Akademik Aktiviteler:****Katıldığı Bilimsel Kurslar, Sempozyumlar, Çalıştaylar**

1. “4. Birlikçilik Sempozyumu, Adli Toksikoloji, Prof. Dr. Tülin Söylemezoğlu Onuruna”, 2013, Ankara.
2. “Adli Antropoloji Kursu”, 2013, Ankara.
3. “4. Ulusal Tıp Günleri”, 2013, Ankara.
4. “Adli Bilimlerde Yeni Ufuklar Sempozyumu”, 2014, Ankara.
5. “Adli Psikoloji Günleri”, 2014, Ankara.
6. “Adli Bilimler Bahar Sempozyumu”, 2014, Marmaris.
7. “V. Ulusal Tıp Günleri”, 2014, Kastamonu.

**Katıldığı Bilimsel Kongreler**

1. “Uluslararası Katılımlı 10. Anadolu Adli Bilimler Kongresi”, 2013, Malatya.
2. “1. Çocuk ve Bilgi Güvenliği Kongresi”, 2013, Ankara.
3. “2. Ulusal Felaket Kurbanlarının Kimliklendirilmesi Kongresi”, 2014, Ankara.
4. “11. Uluslararası Anadolu Adli Bilimler Kongresi”, 2014, Bayburt.
5. “1st International Congress of Forensic Biology and Genetics”, 2014, Ankara.
6. “1st International Congress and Workshop of Forensic Toxicology.”, 2014, Ankara.

**VII. Diğer Bilgiler****Düzenlenen Sempozyum ve Kongreler**

- “1st International Congress of Forensic Toxicology”, 2014, Ankara.