



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**P-GLİKOPROTEİN GEN POLİMORFİZMİNİN PLASENTAL ARSENİK
DÜZEYİNE ETKİSİ**

Derya DOĞAN

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

**DANIŞMAN
Doç.Dr. Zeliha KAYAALTI**

2014 - ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Disiplinlerarası Adli Tıp Anabilim Dalı, Adli Kimya ve Adli Toksikoloji
Yüksek Lisans Programı**

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: / / 2014

Prof. Dr.
..... Üniversitesi Fakültesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr.
..... Üniversitesi
..... Fakültesi

Prof. Dr.
..... Üniversitesi
..... Fakültesi

Prof. Dr.

..... Üniversitesi

..... Fakültesi

Prof. Dr.

..... Üniversitesi

..... Fakültesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix

1. GİRİŞ

1.1. Genetik Polimorfizm	1
1.1.1. Polimorfizm Çeşitleri	2
1.1.2. SNP'lerin Protein Oluşumu Üzerine Etkileri	3
1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction: PCR)	3
1.3. RFLP (Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi: Restriction Fragment Length Polymorphism) Yöntemi	4
1.4. MDR1 Geni ve Ürünü P-glikoprotein	4
1.4.1 Yapısı	4
1.4.2. Yeri ve Görevleri	6
1.4.3. Substratları	8
1.4.4. MDR1 Polimorfizmleri	8
1.4.5. MDR1 Polimorfizmi ve Hastalık İlişkisi	9
1.5. Arsenik Kimyası	10
1.5.1. Arseniğin Kaynakları	11
1.5.1.1. Doğal Kaynakları	12
1.5.1.2. Antropojenik Kaynakları	13
1.5.2. İçme Sularında Arsenik	14
1.5.3. Arsenik Toksisitesi	15
1.5.4. İnsan Sağlığı Açısından Arsenik	16
1.5.4.1. Akut Toksik Etkiler	17
1.5.4.2. Kronik Toksik Etkiler ve Karsinojenite	18

1.5.5. Arsenik Absorbsiyon ve Metabolizması	19
1.6. Plasenta	21
1.6.1. Plasentanın Yapısı ve Gelişimi	21
1.6.2. Plasentanın Fonksiyonları	23
1.7. P-gp'in Plasentada Lokalizasyonu ve Ekspresyonu	24
1.8. Arsenik Maruziyetinin Anne, Plasenta ve Fetüs Üzerine Etkileri	26

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler	28
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	28
2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	29
2.2. Deney Protokolü	30
2.2.1. Metarnal Kan Örnekleri ve Plasenta Örneklerinin Toplanması	30
2.3. Yöntem	30
2.3.1. Plasenta Örneklerinin Analiz Ön İşlemleri	30
2.3.2. Plasenta Örneklerinin Arsenik Analiz İşlemleri	31
2.3.3. Maternal Kan Örneklerinin Genetik Analiz İşlemleri	32
2.3.3.1. Sıvı Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu	32
2.3.3.2. Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi	33
2.3.3.3. İzole Edilen Genomik DNA'ların PCR ile Çoğaltılması	35
2.3.3.4. MDR1 C1236T Gen Polimorfizimlerinin PCR Yöntemiyle Amplifiye Edilmesi	38
2.3.3.5. PCR ürünlerinin HaeIII Restriksiyon Enzimleri ile Kesim İşlemleri	39
2.3.3.5.1. MDR1 C1236T Gen Polimorfizminin HaeIII Restriksiyon Enzimi İle Amplifiye Edilen Bölgenin Kesimi	41
2.4. İstatistiksel Değerlendirmeler	42

3. BULGULAR

3.1. Plasenta Örneklerinin Genel Değerlendirilmesi	43
3.2. MDR1 C1236T Gen Polimorfizminin Genel Değerlendirmesi ve Hardy-Weinberg Dengesine Uygunluğunun Tespiti	43

3.3. MDR1 C1236T Polimorfizminin Plasenta Örneklerindeki Arsenik Düzeyleriyle Olan İlişkileri	45
3.4. Sigara İçiminin Plasenta Örneklerinde Arsenik Düzeylerine Etkisi	46
4. TARTIŞMA	48
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
ÖZET	54
SUMMARY	55
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	65

ÖNSÖZ

Arsenik; insan sağlığı açısından tehlikeli bir toksikolojik ajandır. Hamilelik döneminde arseniğin plasentadan geçişinde P-glikoprotein gibi taşıyıcı proteinler önemli rol oynamaktadır. Çalışmamızda; annelerin kan örneklerindeki MDR1 C1236T gen polimorfizmlerinin saptanması ve plasentalarındaki arsenik düzeyleri ölçülerek, gen polimorfizminin bu geçişteki etkisininin araştırılması hedeflenmiştir.

Bilgisini ve azmini örnek aldığım danışman hocam, Doç. Dr. Zeliha KAYAALTI'na;

Tezimin metal analizleri kısmında, genetik analizlerde ve laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen, güler yüzü ve sıcak davranışlarıyla hep yanımda olduğunu hissettiren Dr. Dilek AKYÜZLÜ'ye

Her zaman ve her konuda desteklerini esirgemeyen canım AİLEME;

Teřekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin
AAS	Atomik absorpsiyon spektrometre
AML	Akut miyeloid lösemi
As	Arsenik
ATP	Adenozin tri fosfat
ATSDR	ABD toksik maddeler ve hastalıklar araştırma bürosu (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)
Bp	Baz çifti
C	Sitozin
CD4 Hücresi	Yardımcı T hücreleri
DMA	Dimetil arsenik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EtBr	Etidium bromür
G	Guanin
IBD hastalığı	İltihaplı barsak hastalığı
MDR1	Çoklu ilaç rezistans protein 1 (multidrug resistance protein 1)
MMA	Monometil arsenik asit
mRNA	Mesajcı RNA (messenger RNA)
NIOS	The national institute of occupational safety and health (Ulusal meslek güvenliği ve sağlığı entitüsü)
PCR	Polimeraz zincir reaksiyon (Polymerase chain reaction)
RFLP	Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi
RNA	Ribonükleik asit
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi (Single nucleotid polymorphism)
T	Timin
TBE	Tris borat edta
UC hastalığı	Crohn hastalığı

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. ABC ailesindeki bazı taşıyıcı proteinlerin moleküler yapısı	5
Şekil 1.2. P-glikoprotein'in görevi	6
Şekil 1.3. Arsenik ve bazı bileşikleri	11
Şekil 1.4. Doğada arsenik döngüsü	12
Şekil 1.5. İçme sularının arsenikle kontaminasyonu	14
Şekil 1.6. Eller ve ayaklarda kronik arsenik maruziyetiyle oluşmuş lezyonlar	18
Şekil 1.7. İnorganik arseniğin insan metabolizmasındaki metabolik yolağı	20
Şekil 1.8. Gelişimin 3. haftasında plasenta	22
Şekil 1.9. Gebeliğin ikinci yarısında plasenta	23
Şekil 1.10. Plasentanın şematik yapısı	25
Şekil 2.1. Agaroz jel kuyucuklarına örneklerin yüklenmesi	34
Şekil 3.1. 418 bp'lik amplifikasyon ürününün HaeIII enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotid uzunlukları	41

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Önemli dokulardaki P-glikoprotein yeri ve görevi	7
Çizelge 2.1. PCR bileşenleri ile stoktaki ve reaksiyondaki konsantrasyonları	37
Çizelge 2.2. MDR1 C1236T Gen Polimorfizimlerinin Genel Özellikleri	38
Çizelge 2.3. HaeIII enzimi ile kesim işlemindeki bileşenler ve reaksiyondaki hacimleri	39
Çizelge 3.1. Anne Yaşı ve Plasenta arsenik düzeylerine ait tanımlayıcı istatistikler	43
Çizelge 3.2. Bireylerin MDR1 C1236T polimorfizimleri ile oluşan genotip frekansları.	44
Çizelge 3.3. Bireylerin MDR1 C1236T polimorfizimleri ile oluşan allel frekansları	44
Çizelge 3.4. MDR1 C1236T gen polimorfizminin Hardy-Weinberg Dengesi	45
Çizelge 3.5. Plasenta örneklerindeki arsenik düzeyleriyle MDR1 C1236T polimorfizminin genotipleri arasındaki ilişkisi.	45
Çizelge 3.6. Plasenta örneklerindeki arsenik düzeylerinin MDR C1236T polimorfizminin allelleri ile olan ilişkisi.	46
Çizelge 3.7. Sigara içiminin plasenta örneklerinde arsenik düzeylerine etkisi	47
Çizelge 4.1. MDR1 C1236T gen polimorfizminin çeşitli populasyonlardaki frekansları	49

GİRİŞ

1.1. Genetik Polimorfizm

DNA (Deoksiribonükleik asit) molekülü üzerinde bulunan ve herhangi bir ürünün sentezi için gerekli bilgiyi içeren spesifik nükleotid bölgesine gen adı verilir. İnsan DNA'sı yaklaşık 3×10^9 baz çiftinden oluşan, 23 çift kromozom içerisinde 30,000'den fazla gen bulunduran, heliks şeklinde yapıdır. İki insan arasındaki DNA'nın yaklaşık %99,9'u benzerdir ve insanlar arasındaki farklılıklar DNA zincirindeki küçük değişikliklerden kaynaklanmaktadır (Gonzalez, 1999).

Dünyadaki birçok bireyin kromozomlarında aynı yerde bulunan DNA dizileri birbirine benzerlik gösterir. Populasyonda iki farklı birey arasında DNA'nın yaklaşık 1000 bç uzunluğundaki herhangi bir kısmı ortalama sadece bir baz çifti değişimi içerir. Bir genin belli bir lokusta yer alan alternatif kopyalarından her birine allel denir. İntronlarda ve genler arasında sınırlandırılmış DNA dizilerinde değişim gösteren bazı alleller vardır. Kodlanan dizi farklılıkları, protein çeşitliliğine ve farklı fenotiplerin ortaya çıkmasına sebep olurlar (Strachan, 1999). Normal bir populasyonda bir karakter için iki veya daha fazla fenotip bulunuyorsa ve fenotiplerden her biri populasyonda %1'den daha fazla sıklıkta ise bu duruma "genetik polimorfizm", bulunma sıklığı %1'den daha azsa "genetik mutasyon" adı verilir. Polimorfizmler, zararsız ya da ılımlı mutasyonlar olarak tanımlanabilirler. (Gonzalez, 1999).

1.1.1. Polimorfizm Çeşitleri

Populasyon içerisindeki polimorfizmler oluş nedenlerine göre; tek nükleotid değişim, insersiyon ve delesyon olmak üzere üç başlık altında gruplandırılabilirler.

Tek Nükleotid Değişim (Single Nucleotide Polymorphism; SNP): DNA dizisinde her 2000-2500 bazda bir tek baz farklılığı gözlenir. Transisyon ve transversiyon tek nükleotid değişim polimorfizminin alt grublarıdır.

Transisyon; dizi içindeki bir pürin bazının (A, G) diğer bir pürin bazına veya bir pirimidin bazının (T, C) diğer bir pirimidin bazına dönüşmesine denir.



Transversiyon; dizi içindeki bir pürin bazının (A,G) bir pirimidin bazına (T,C) veya bir pirimidin bazının bir pürin bazına dönüşmesine denir.



İnsersiyon: DNA içerisine tek bir nükleotid ya da daha fazla nükleotidin eklenmesidir. Nükleotidlerin eklenmesi, genin normal uzunluğundan daha uzun olmasına neden olur. İnsersiyonla tek bir nükleotid eklense bile çerçeve kayması oluşarak tüm proteinin amino asit dizilimi değişebilir. Sonuçta, sentezlenecek olan proteinin tamamen yapısı bozulabilir.

Delesyonlar: DNA dizisi içerisinde tek bir nükleotidin ya da nükleotidlerin kırılıp ayrılması delesyon olarak tanımlanmaktadır. DNA üzerindeki bir delesyon, genin normal uzunluğundan daha kısa olmasına neden olur (Emir ve Özden, 2006).

1.1.2. SNP'lerin Protein Oluşumu Üzerine Etkileri

Tek nükleotid polimorfizmi; DNA üzerindeki bulunduğu nokta ve oluş şekline göre, proteinin yapı ve fonksiyonu üzerinde değişikliklere neden olabilmektedir:

- Kodlanan bölgede oluşan sessiz (silent) bir SNP, amino asit farklılığı oluşturmuyorsa, sentezlenen proteinin yapı ve fonksiyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmayacaktır.
- DNA üzerinde meydana gelen bir SNP, tesadüfen “Dur” kodonunu (TAA, TAG, TGA) oluşturuyorsa, SNP'nin bulunduğu noktadan itibaren protein sentezi duracak ve yarım kalan protein fonksiyonlarını tam olarak yerine getiremeyecektir.
- SNP, bir genin sentezi ile ilgili düzenlemeleri içeren promotor bölgede meydana geliyor ise; transkripsiyonla oluşan mRNA düzeyi ve stabilitesi ile gen ekspresyon düzeyi değişmesine neden olacaktır (Williams ve Hayward, 2001).

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

Polimerize zincir reaksiyonu, nükleik asitlerin in-vitro (hücre dışında) olarak bir tüp içerisinde çoğaltılmasını sağlayan yöntemdir. Bu yöntemle, bir organizmanın DNA'sında bilinen herhangi bir bölgenin çok hızlı ve başarılı bir şekilde klonlanması sağlanır (Kubista ve ark., 2006).

PCR analizi; moleküler biyoloji, insan genetiği, farmakoloji, toksikoloji, kriminoloji gibi bir çok bilim dalında;

- Farmakogenetik ve toksikogenetik çalışmalarda,

- Mutasyon ve polimorfizm çalışmalarında,
- Adli Tıp'ta,
- Genetik bozuklukların tanınmasında,
- Sekanslama amacıyla DNA hazırlanmasında,
- Enfeksiyon hastalıklarında etken mikroorganizmanın saptanmasında,
- Onkogenlerin belirlenmesinde,
- Prenatal tanı çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Butler, 2005).

1.3. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism: Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi) Yöntemi

Restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri, DNA fragmanlarını tanıyan ve bu dizilimlere yakın bölgelerden veya bu dizilimler içerisindeki spesifik yerlerden DNA'yı kesen enzimlerdir (Murray, 2000). Restriksiyon enzimleri gen dizilimlerinin belirlenmesinde ve polimorfizm çalışmalarında kullanılmaktadır.

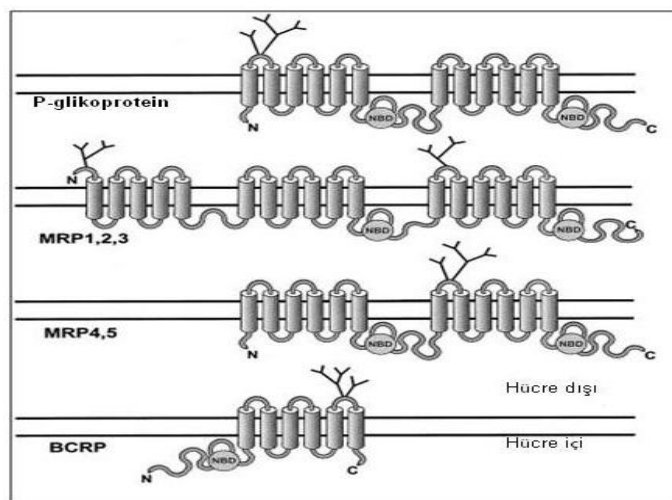
1.4. MDR1 (Multiple Drug Resistance; Çoklu İlaç Direnci) Geni ve Ürünü P-Glikoprotein

1.4.1. Yapısı

ABCB1 olarak da bilinen insan MDR1 (Multidrug Resistance, çoklu ilaç direnci) geni 7p21'de lokalizedir ve 29 ekzon içermektedir. Bu gen P-glikoprotein (P-gp) olarak bilinen 170 kDa'luk bir transmembran taşıyıcı protein kodlar. P-gp, ATP bağımlı olarak ksenobiyotiklerin (organizmanın doğal bileşenlerinden olmayan

maddelerin), metabolik artık ürünlerin ve pek çok ilacın hücre dışına pompalanmasında fonksiyon görür (Schwab ve ark., 2003; Sakaeda, 2005). P-gp, ortak yapısal ve işlevsel özellikler taşıyan, geniş bir protein ailesine aittir. Bu üst aileye ATP bağlama zinciri üst ailesi adı verilir (ABC; ATP-binding cassette). Günümüze kadar, 50'den fazla ABC taşıyıcı geni kimliklendirilmiş ve sınıflandırılmıştır. ABC taşıyıcıları ABCA'dan ABCG'ye kadar 7 alt ailede sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma sisteminde P-gp, ABCB1 olarak tanımlanır. MDR geni, ilk kez memeli hücresinde 1970 yılında keşfedilmiştir. MDR1 terimi, P-gp yerine de kullanılmaktadır (Sakaeda ve ark., 2002).

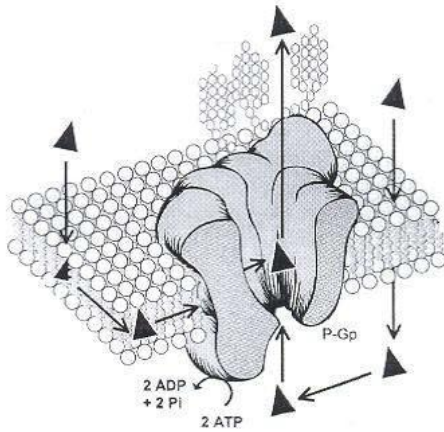
P-gp yapısı, 6 transmembran bölümü ve nükleotid bağlama sekansı içeren homolog iki yarıdan oluşur, 1280 aminoasite sahiptir. Molekülün N-terminalinin yarısının ekstrasellüler bölgesinde tek glikolizasyon bölgesi vardır. Çin hamsteri yumurtalık hücrelerine yapılan görüntü analizi ve elektron mikroskopisiyle yapılan yapı analize göre, insan P-glikoproteini yaklaşık olarak çapı 10 nm ve maksimum 8 nm olan bir silindirdir ve molekülün yarısı membranın içindedir (Fromm, 2002). Şekil 1.1.'de hücre zarında bulunan ABC ailesine ait bazı transport proteinlerle beraber P-gp yapısı görülmektedir.



Şekil 1.1. ABC ailesindeki bazı taşıyıcı proteinlerin moleküler yapısı (Shinkel ve ark., 2003).

1.4.2. Yeri ve Görevleri

P-gp, hücre içindeki substratlarını saptayan, hücre içi ve dışı bölgelerden ilaçları ve ksenobiyotikleri atabilen etkili bir efluks (dışa atım) pompası görevi görmektedir (Şekil 1.2.). Aynı zamanda hücre zarında sıkışan ilaç moleküllerini de etkileyebilir. Aktif efluks sistemi, toksik maddelerin ve ilaçların hücre dışına atılmasından sorumlu bir mekanizmadır ve bu mekanizma, ksenobiyotik metabolizması ve ilaç direnci için hayati önem taşır. Bu mekanizma sayesinde, toksik maddeler ve metabolitlerinin intrasellüler birikimi önlenmiş olur. (Schinkel, 1997)



Şekil 1.2. P-glikoprotein'in görevi (Marzolini ve ark., 2004).

P-gp'in, tümör hücrelerinde çeşitli kanser karşıtı elementlere karşı direnç gelişimindeki rolü nedeniyle önemi anlaşılmıştır, fakat P-gp sadece tümör hücrelerinde değil normal dokularda da bulunur.

İnsanlarda P-gp, böbrek üstü bezlerinde yüksek seviyede, akciğerlerde (solunum epiteli), mide, kalın barsak, ince barsak, rektum, karaciğer, pankreas, böbrek, prostat, idrar kesesi ve plasentada orta seviyede, beyinde, özafagus, yumurtalık, testis, dalak, timus, ilik, kalp, yumuşak kaslar ve deride düşük seviyede bulunur. Beyinde, testislerde ve plasentada bulunan kılcal endotelial hücrelerin varlığı beyne ve fetusa zehirli maddelerin alınmasını engelleyen bir bariyer olarak düşünülür. P-gp'in bu geniş doku dağılımı normal hücreli metabolizmada temel rol

oyun (Kaya ve ark., 2005). P-gp hemotopoetik kök hücrelerde, periferik kan hücrelerinde antijen üreten hücrelerde, T ve B lenfositlerde de bulunmuştur. P-gp doku dağılımı Çizelge 1.'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.1. Önemli dokulardaki P-glikoprotein yeri ve görevi (Fromm, 2002).

Doku	Yer	Görev
İnce barsak	Epitel hücreleri luminal zarı	Barsak kanalına ilaçların salınımı
Karaciğer	Hepatositlerin kanal içi zarı	Safraya ilaçların salınımı
Böbrek	Proksimal tüplerin Epitelyum hücrelerinin luminal zarı	Tüplere ilaçların salınımı
Merkezi Sinir Sistemi	Kan-beyin bariyerini oluşturan endotel hücrelerin luminal zarı	MSS'nin ksenobiyotiklerden korunması
Testis	Kan damarlarının kapillerindeki endotel hücreler	Kan-testis bariyeri
Plasenta	Trofoblast	Fetusun ksenobiyotiklerden korunması

P-gp'in, detoksifikasyon ve vücudun toksik ksenobiyotik ve metabolitlere karşı korunmasında fizyolojik rolü bulunur; bu bileşikler safra, idrar ve barsak boşluklarına salgılayarak, fetüs, testis, beyin gibi organlarda birikmelerine engel olur (Kartner ve ark. 1983). P-gp plasentanın epitel hücrelerinin (sinsitiotrofoblast) apikal yüzeyinde eksprese edilerek, kan-plasenta bariyerinin bir parçasını oluşturmaktadır. P-gp'in plasentadaki lokalizasyonu, potensiyel olarak zararlı ve terapatik bileşiklere fetal maruziyette, fetal toksisite ve ilaç substratlarına etkisinde anahtar rol oynadığını gösterir (Molsa ve ark. 2005).

1.4.3. Substratları

P-gp'in çok geniş substrat özgülüğü vardır ve yapısal olarak çok farklı bileşenleri taşır. Bu maddeler genelde hidrofobik ve amfipatiktir.

P-gp tarafından taşınan ilaç substratların bazıları; kanser kemotrapisinde kullanılan sitotoksik ilaçlar, alerjide ve enfeksiyonda, bağışıklık sisteminin bastırılması, hipertansiyon, nöroloji ve iltihaplanma için kullanılan çeşitli farmakolojik ajanlardır. Ayrıca bu taşıyıcı, kalp ilaçlarının, HIV proteaz engelleyicilerinin, vücudun bağışıklık sistemini yavaşlatan immunosupresanların, antibiyotiklerin ve antihistaminiklerin nakledilmesini sağlar. Aynı zamanda P-gp, sitokrom P450 3A4 gibi ilaç metabolizma enzimlerinin de substratıdır. CYP3A4 ile P-gp substratları arasındaki çakışma nedeniyle bazı detoksifikasyon süreçlerinde CYP3A4 ile P-glikoproteininin sinerjik etkisi görülebilir (Fromm, 2002). P-gp, yalnızca kanser hücrelerinde gözlenen çoklu ilaç direncine neden olmakla kalmayıp aynı zamanda pek çok ilacın (steroid hormonlar, immunosupresanlar, antimikrobiyal ajanlar, vb.) ve ksenobiyotiğin normal dokulardaki farmakokinetiklerini de belirlemektedir (Schwab ve ark., 2003).

1.4.4. MDR1 Polimorfizmleri

MDR1 geninde genetik polimorfizm ilk olarak kanserli hücrelerde yapılan çalışmalarla belirlenmiş daha sonra, tüm MDR1 kodlama bölgesi açığa çıkarılmıştır (Morzalini ve ark., 2004). Bugüne kadar MDR1 geninde 50'den fazla SNP tanımlanmıştır. MDR1 geninde var olan bu polimorfizmler P-gp aktivitesini ve ekspresyonunu etkileyerek fonksiyonu üzerinde önemli rol oynamaktadır (Tang ve ark., 2002).

MDR1 geninde yaygın olarak gözlenen ve literatürde en çok üzerinde durulan üç SNP; C3435T, G2677T/A ve C1236T'dir ve söz konusu SNP'ler yaygın bir haplotipin bileşenidirler. Bu polimorfizmlerden C3435T ve C1236T, aminoasit değişimine neden olmayan sessiz (silent; synonym) polimorfizmlerdir. C1236T polimorfizmi 12. ekzonun 1236 pozisyonunda gözlenir. Bu polimorfizm polipeptit dizisinin 412. sırasındaki GGC kodonunu GGT kodonuna değiştirir. Her iki kodonda glisin aminoasidini kodlar. Taşınan varyant T aleli P-gp'in transport aktivitesini etkileyerek polimorfizmdeki kişisel farklılıkların ortaya çıkmasına sebep olur. (Kimchi-Sarfaty ve ark., 2007b).

Sessiz mutasyonların gen fonksiyonu ve fenotip üzerinde gözle görülebilir bir değişime yol açmadığı düşünülürken, son zamanlardaki çalışmalar bu görüşün değişmesine sebep olmuştur. P-gp'in substrat özgüllüğü sessiz tek nükleotid değişimleri ve sinonimleri arasında farklılıklar göstermektedir (Kimchi-Sarfaty ve ark., 2007a). Sessiz tek nükleotid değişimlerinin, protein translasyon oranını etkileyerek protein katlanmaları ve aktivitelerini etkilediği düşünülmektedir. Böylece protein dizilimini değiştirmeden substratların farmokokinetiklerini etkilemekte ve hastalıkların gelişim ve seyrini değiştirebilmektedir (Komar, 2007b; Sauna ve ark., 2007).

1.4.5. MDR1 Polimorfizmi ve Hastalık İlişkisi

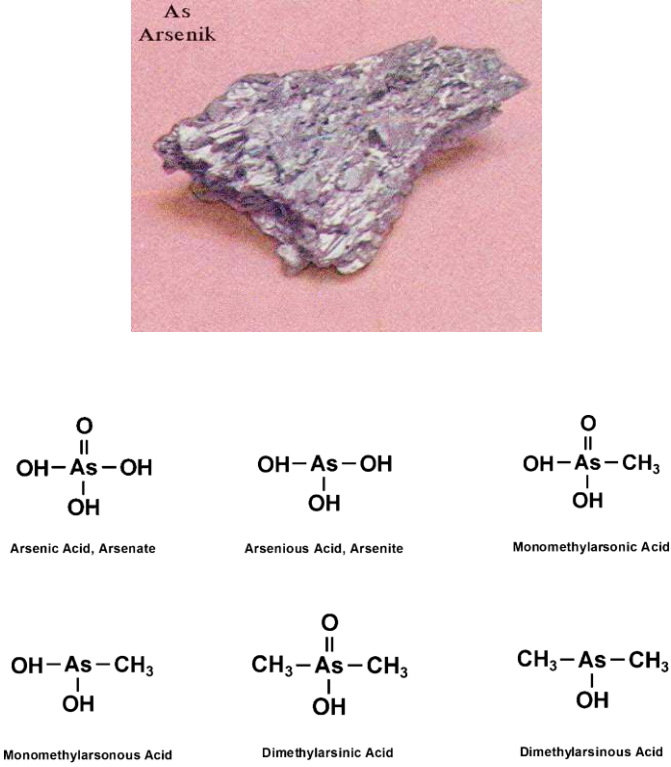
Daha önce belirtildiği gibi, MDR1 genindeki SNP'ler P-gp'in fizyolojik koruma rolünü değiştirebilir ve böylece hastalık riski etkilenmiş olur. Yakın zamanda, P-gp'in bu rolüyle ilgili yapılan birçok çalışma yayınlanmıştır. P-gp'in genetik bazlı veya sonradan edinilmiş değişimlerle aktivitesinin değişmesi, toksik maddelere maruziyeti artırabilir. Maruziyetin artmasına bağlı olarak, tümör oluşma riskinde artabileceği düşünülmektedir.

P-gp'in hangi kanserlerde ilaç direncinden sorumlu olduğunun ortaya konması için yapılmış çalışmaların çoğu hematopoetik kanserler üzerinedir. Lösemi, lenfoma ve multiple myelomada, başta düşük ekspresyon gözlenmekle birlikte özellikle kemoterapi sonrası ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Örneğin; P-gp ile AML (Akut miyeloid lösemi) hastalarında çok sayıda çalışma yapılmış olup AML hastalarının 1/3'ünde tanı anında, %50'sinde ise ilk nükste yüksek seviyelerde P-gp ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. AML hastalarında P-gp ekspresyon seviyesinin nüks ihtimali ile korele olduğu bildirilmiştir (Bebek N. ve ark. 2005).

1.5. Arsenik Kimyası

Arsenik yer kabuğunda geniş olarak yayılmıştır, çoğunlukla tortul kayalar ve toprakta iz miktarda (ortalama 1,5 mg/kg) bulunur (Plant ve ark., 2005). Atom numarası 33, atom ağırlığı 74,91'dir. Periyodik tablonun VA grubunda yer alan arsenik, fosfor ile antimon arasında olup, ikisinin arasında özellikler gösterir, yarı metal ya da metaloid olarak sınıflandırılmaktadır.

Arsenik elemental halde toksik değildir; ancak bileşikleri toksiktir. Doğada genellikle diğer madenlerle birlikte bulunur (Eduljee, 1985). Bazı elemental arsenik yatakları biliniyorsa da, arseniği, arsenit ve arsenat gibi filizleri şeklinde bulunduran mineraller daha yaygındır. En çok bulunan mineral arsenopirit; FeS_2FeAs_2 'dir. Tabiatta bulunan diğer önemli bileşikleri realgar, As_4S_4 , orpigmen; As_2S_3 ve arsenikli nikel sülfürdür; $NiAsS$.

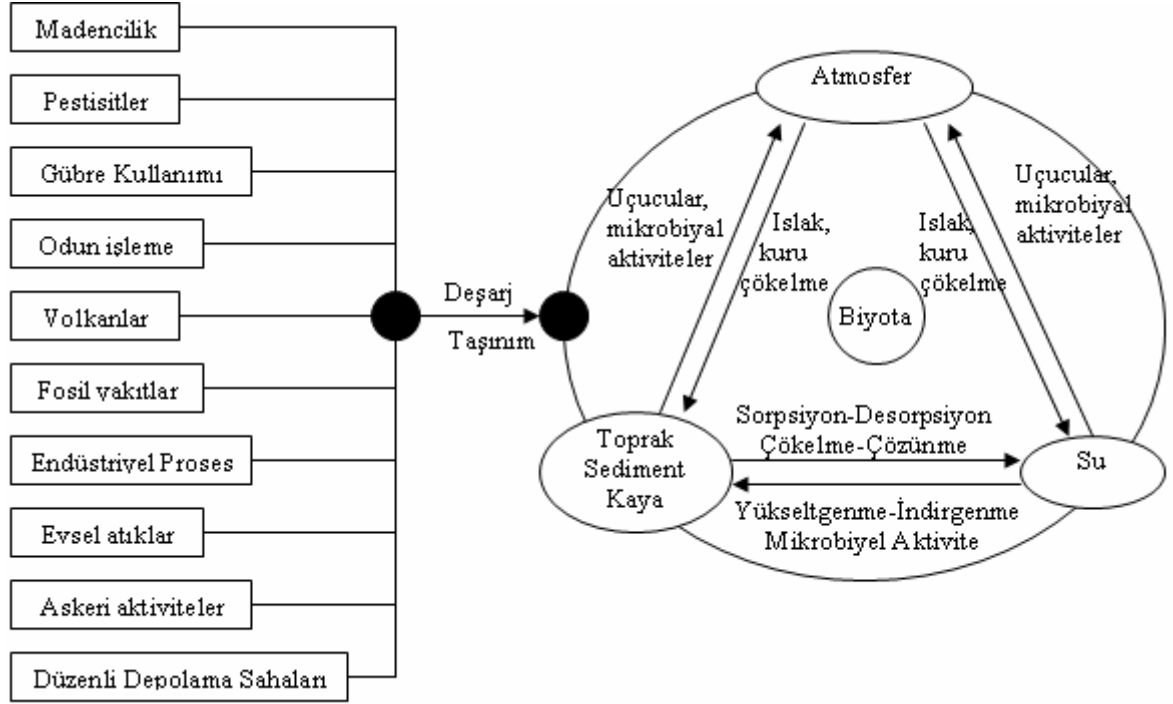


Şekil 1.3. Arsenik ve bazı bileşikleri (<http://www.johnbettsfineminerals.com/jhbnyc/gifs>)

Arseniğin kimyası pek çok forma sahip olması nedeniyle karmaşıktır. Doğada, +5 (arsenat), +3 (arsenit), 0 ve -3 oksidasyon basamaklarında bulunur. -3 ve 0 değerlikli arsenik doğada nadiren bulunur (Bissen ve Frimmel, 2003). Arsenik doğada kolay bir şekilde oksidasyon basamağı ve kimyasal formunu değiştirir. Arseniğin değerliğini ve türünü suyun pH değeri, redoks potansiyeli, sülfür, demir ve kalsiyum gibi iyonların varlığı ve mikrobiyal aktivite etkilemektedir.

1.5.1. Arseniğin Kaynakları

Yerkabuğunda en çok bulunan yirminci element olan arseniğin oluşumu, dağılımı ve kaynakları üzerinde özellikle son yıllarda daha çok durulmaya başlanmıştır. Doğadaki oluşumu ve döngüsü Şekil 2’de verilen arsenik doğada hem doğal hem antropojenik kaynaklı olarak bulunabilir.



Şekil 1.4. Doğada arsenik döngüsü (Wang ve Mulligan, 2006).

1.5.1.1. Doğal Kaynakları

Arsenik toprakta, bazı kaya türlerinde, özellikle kurşun ve bakır içeren mineral ve cevherlerde doğal olarak bulunur. Rüzgarın taşıdığı toz, yüzeysel akış ve yeraltına sızma sonucu havaya ve suya geçebilir (Chou ve Rosa, 2003).

Arseniğin doğal kaynakları arasında kaplıcalar, ılıcalar, volkanik kayalar, çöküntü kayaları (organik / inorganik killeri), başkalaşım kayaları, deniz suyu ve mineral çökeller yer alır. Ayrıca volkanik hareketler, kaya erozyonu ve orman yangınları da arseniğin doğal kaynakları arasındadır.

Doğada arseniğin en önemli kaynağı sülfür mineralleridir. Arsenik içeren en önemli mineraller arasında As_2S_3 (orpigmen), AsS (realgar), $FeAsS$, $FeAs_2$, $NiAs$,

CoAsS, Cu₁₂As₄S₁₃ ve Cu₃AsS₄ yer almaktadır (Bissen ve Frimmel, 2003). Sülfür mineralleri dışında arseniğin diğer bir önemli kaynağı ise arsenik içeren demir oksitlerdir.

1.5.1.2 Antropojenik Kaynakları

Arseniğin antropojenik kaynakları oldukça çeşitlidir. Arsenik içeren endüstriyel üretimler arasında ahşap, kereste koruma işlemleri, kozmetikler, boya işletmeleri, ilaç sanayi, herbisit sanayi, yarı iletken madde üretimi, dericilik, cam üretimi, tıbbi kullanımlar, kağıt ve kağıt hamuru üretimi ve çimento işletmeleri bulunmaktadır. Ayrıca bakır, nikel, altın madenciliği ve cevher tasfiye etme işlemleri, zirai uygulamalar, fosil yakıtların kullanımı, düzenli depolama sahası sızıntı suları da arseniğin antropojenik kaynakları arasındadır (EPA, 2001).

Arsenik oluşumuna neden olan en önemli insan aktiviteleri arasında zararlı bitki ve böcekleri yok eden tarım ilaçlarının kullanımı ve madencilik faaliyetleri gelmektedir.

Dünyada en çok kullanılan arsenik içeren pestisitler arasında kurşun arsenat (Pb₃(AsO₄)₂), kalsiyum arsenat (Ca₃(AsO₄)₂), magnezyum arsenat (Mg₃(AsO₄)₂), çinko arsenat (Zn₃(AsO₄)₂) ve çinko arsenit (Zn(AsO₂)₂) yer almaktadır (Wang ve Mulligan, 2006). Türkiye’de ise ruhsatı olan pestisitler arasından fumigantlar, nematositler ve toprak fumigantları grubunda yer alan alüminyum fosfit ve fungusitler grubunda yer alan bakır oksiklorit arsenik içeren aktif maddelere örnek olarak verilebilir (Yücer, 2008).

Geleneksel tedavi yöntemleri de maruziyet kaynaklarından biridir. Arseniğin de içinde bulunduğu ağır metaller, Çin ve Hindistan gibi geleneksel tedavi yöntemlerinin kullanılmaya devam ettiği ülkelerde büyük bir sağlık problemidir. Bu ülkelerde son zamanlarda akut promiolitik lösemi için arsenik trioksit kullanımı tavsiye edilen bir tedavi şekli olmuştur (Kamath ve ark., 2012).

1.5.2. İçme Sularında Arsenik

Arseniğin çevreye başlıca yayılma ve taşınma yolu sulardır. Arseniğin su aracılığıyla ekolojik sistemde dağılımı, canlı yapılarda birikimine neden olmaktadır. Genel popülasyonda toplam günlük arsenik alımı 0.200 mg/kg'dır (Mazumder ve ark., 1992). Özellikle yeraltı suyunun toprak ve kaya içerisinde geçerken arsenik gibi bazı bileşikler ve mineralleri çözmesinin bir sonucu olarak sularda arsenik bulunabilmektedir.



Şekil 1.5. İçmesularının arsenikle kontaminasyonu (<http://www.sistempark.net/aritma/html>)

Sulardaki arsenik düzeylerinin çeşitliliği arazinin coğrafi yapısına, artezyen ve kuyu sularının derinliklerine ve kirlenici kaynaklarının durumuna bağlıdır. Ortalama 100-300 m derinliğindeki artezyen sularındaki arsenik düzeyi 0,35 – 1,14 ppm arasında iken, yüzeysel kuyu sularında 0,00 – 0,30 ppm olarak bulunmuştur (Chen ve ark., 1988).

Yüzeysel ve içme sularında 0,5-1,0 mg/L arsenik bulunması insan zehirlenmelerine neden olmaktadır. Arsenik sülfid, minerallerinin çözülmesiyle, demir oksihidroksitlerin çözülmesiyle, yada jeotermal suyun yüzeyden akmasıyla yeraltısularına karışır (Chowdhury ve ark., 2001).

Doğal dengeyi bozan kirleniciler arasında yer alan arsenik, gerek doğada serbest halde bulunabilmesi ve gerekse canlı yapıda oluşturduğu değişik toksik etkileri nedeniyle insan ve hayvan sağlığı açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle içilebilir

sularda bulunan arsenik düzeylerine belirli sınırlandırmalar getirilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), içme ve kullanma sularında 10 µg/L (ppb)'ye kadar arsenik bulunabileceğini, 50 ppb'den daha yüksek miktarlarda arsenik içeren suların ise kesinlikle kullanılmaması gerektiğini bildirmiştir (WHO, 1990).

1.5.3. Arsenik Toksisitesi

Ağır metaller havada besinlerde toprakta ve suda giderek artan tehlikeli bir konsantrasyona ulaşmaktadırlar. ABD toksik maddeler ve hastalıklar araştırma bürosu (ATSDR) arseniği çevrede bulunan en tehlikeli 275 madde içinde 7 inci sıraya koymuştur. Maddeler, potansiyel insan maruziyeti toksisite ve var oluş sıklığına göre sıralanmıştır.

Dünyada birkaç milyon insan çevreden arsenik salınımına bağlı kronik arsenik maruziyetinden etkilenmektedir. NIOS (The national institute of occupational safety and health: Ulusal meslek güvenliği ve sağlığı entitüsü) verilerine göre 1980'li yıllarda 55 000 işçi yüksek seviyede arseniğe maruz kalmıştır (ATSDR 2000) .

Arseniğin organizmalardaki toksisitesi onun çeşidine ve konsantrasyonuna bağlıdır ve inorganik arsenik türleri (iAs) genellikle organik arsenik (orgAs) türlerinden daha toksiktir. As³ genellikle As⁵'ten daha toksiktir ve dimetilarsenik asit (DMAA³) ve monometil arsenik asit (MMAA³) ana bileşenlerden daha toksiktir.

Arsenik toksisitesini, iki yüzü aşkın enzimi inaktive ederek gösterir. Özellikle hücresel enerji yolları, DNA kopyalaması ve DNA onarımı ile ilgili enzimlerin aktivitesini durdurur. Arsenik ATP gibi yüksek enerjili bileşiklerde fosfatın yerine geçer. Serbest arsenik redoks çemberi boyunca reaktif oksijen üretir ve lipid peroksidasyon ve DNA hasarına sebep olan metabolik süreçleri etkinleştirir.

Arsenik, bulunabilen en toksik elementlerden bir tanesidir ve toksik etkisini organizmada bulunan proteinlerin tiol grubuna bağlanarak ve arsenik-protein kompleksi oluşturarak gösterir. İnorganik arsenik, prostat, yumurtalıklar, karaciğer, cilt, akciğer, mesane ve böbrek gibi organlarda kansere neden olabilen bir karsinojendir (Waalkes ve ark., 2007). Hatta birçok ülkenin içme sularındaki standart değerler yaklaşık 10 µg/L olması, kayda değer oranda (%0,1-%0,3) kanser riski ile ilişkilidir (NRC, 2001). Akut arsenik maruziyetinde insanlar için letal doz 125 mg'dır ve en yüksek arsenik konsantrasyonunun böbreklerde ve karaciğerde olduğu gösterilmiştir. Ufak dozda kronik maruziyette arsenik, sistein içeren proteinlerce zengin olan saç, tırnak ve ciltte birikir. Kronik birikme akciğerde olur. Plasentayı kolayca geçerek fetusta birikebilir.

Saç ve tırnak vücudun diğer dokularıyla kıyaslandığında arsenik konsantrasyonunun en yüksek olduğu bölgelerdir. Bunun nedeni bu bölgelerin trivalan arsenikle kolayca bağlanabilen sülfidril (SH) grupları içeren keratine zengin olmasıdır. Saç daha çok inorganik arsenik maruziyetinin ölçülmesinde kullanılır. Düşük dozda maruziyetin çok az belirleyici özelliği olmasına rağmen, insan saçında arsenik incelemesi, kronik arsenik maruziyeti gelişiminin incelenmesi ve tespiti için çok faydalı bir yöntem olmuştur. Tırnaklar günde yaklaşık 0,12 mm büyüdüğünden tek doz arseniğe maruziyetten 100 gün sonra bile tırnakta arsenik bulunabilir. Arseniğin anne sütüne geçerek bebek üzerinde ciddi toksik etki yapabileceği belirtilmektedir (Kazi, 2011).

1.5.4. İnsan Sağlığı Açısından Arsenik

Arsenik endüstriyel, zirai, eczacılık ve başka amaçlar için faydalı olmasına rağmen insanı da içeren çeşitli organizmalar üzerinde toksik bir etkisi vardır ve kanserojendir. Doğada doğal olarak da bulunabildiğinden dolayı arseniğe maruz kalmak insanlar açısından kaçınılmaz olmaktadır. Bu durum; havanın solunması, yiyecek/su tüketimi ve dermal adsorpsiyon olarak başlıca üç şekilde

gerçekleşmektedir. Arsenik vücuda alındıktan sonra cilt, solunum, kalp ve damar, bağışıklık, genital ve üriner sistemler, üreme, sindirim sistemi ve sinir sistemini de içeren çok farklı organları etkilemektedir (Abernathy, 2001).

Tarımda kullanılan ve arsenik içeren kimi pestisitlerin kullanımı son yıllarda yasaklanmış olmakla birlikte, gıda maddelerinin arsenik ile kontaminasyonunda önemli etkenlerdir.

Arseniğin bir sistemden diğer bir sisteme geçişi genellikle su ile olur. Havada bulunan arseniğin önemli bir kısmı endüstriyel kaynaklıdır. Genellikle arsenik trioksit formunda olup havada asılı partiküler tarzda bulunur ve akciğerler tarafından emilerek vücuda girer. Bu yolla vücuda giren arsenik ilk etapta kanda yoğunlaşır. Eritrositlere girerek hemoglobinin globulini ile birleşir. 24 saat içerisinde eritrositleri terk ederek karaciğer, böbrek, dalak gibi dokularda birikir. Başlıca idrar, gaita, ter ve süt ile atılır (Mertz, 1986).

Arsenikli zirai ilaçlarla ilaçlanmış bitkilerle beslenen ineklerin sütlerinde insan için zararlı olabilecek düzeyde arsenik bulunabilir (Klassen ve ark.,1986). Vücuda giren arseniğin, serum proteininin sülfidril (-SH) grupları ile birleşmesi sonucu hücre metabolizması inhibe edilir. Buna bağlı olarak kapiller geçiş bozulur ve dolaşım bozuklukları görülür (Mertz, 1986).

Arseniğin bir kısmı deride toplanır. Buradan derinin epitel katının dökülmesi (desquamasyon) ve ter ile uzaklaştırılır. Tırnaklarda transversal beyaz çizgiler oluşturur.

1.5.4.1 Akut Toksik Etkileri

İnsanlar tarafından yüksek dozda alınan arsenik (70–180 mg/kişi) öldürücü nitelikte olabilir. Zehirlenmede ilk önce ateş, anoreksi, karaciğer büyümesi gibi semptomlar görülür. Akut olaylarda ağız kuruluğu, ishal, yutkunma güçlüğü, kusma, abdominal

ađrı, dehidrasyon, kan basıncında dūşme, oliguri, albūminuri, ekstremitelerde sođuma, gōz kapađı ōdemi ve kollaps gōrūlūr. Mūkōz membranlarda irritasyon, vezikūl oluřumu ve nekroz dikkati çeker. Konvūlsiyon, bař ađrısı, řuur kaybı, gōrme sinirinde dejenerasyon, merkezi sinir sistemine bađlı diđer belirtilerdir (Cheville, 1983).

1.5.4.2 Kronik Toksik Etkileri ve Karsinojenite

Kronik olaylarda, karaciđer tahribatı karakteristiktir. Bařlangıçta sarılık gōrūlūr. Sonraki ařamalarda ise siroz ve asites oluřur. Karaciđer paraneşim hūcrelerinin etkilenmesi sonucu kanda karaciđer enzimlerinin seviyesi yūkselir. Ayrıca kronik zehirlenmelerde ekstremitelerde gangren ve artritiz gōzlenir. Arsenik içeren sularla oluřan kronik zehirlenmelerde ve mesleki maruziyetlerde deđiřik deri lezyonları gōrūlūr. Ayak tabanı ve avuç içinde oluřan simetrik verrukoz hiperkeratozis karakteristik bir bulgudur. Hyperpigmentasyon ve melanoziste yaygın olarak gōrūlūr. Son 20 yılda yapılan çalıřmalar, mesleki maruziyetler sonucu oluřan deri kanseri insidensinde artıř olduđunu gōstermiřtir (Klassen ve ark.,1986). İnsanlarda gıdalarla alınan arseniđin deri kanseri ve angiosarkom, solunum yolu ile alınan arseniđin ise akciđer kanseri oluřumunda rol aldıđı belirlenmiřtir.



şekil 1.6. Eller ve ayaklarda kronik arsenik maruziyetiyle oluşmuş lezyonlar (<http://www.saglikplus.com/arsenik-zehirlenmesi.html>).

1.5.5. Arseniğin Absorbsiyon ve Metabolizması

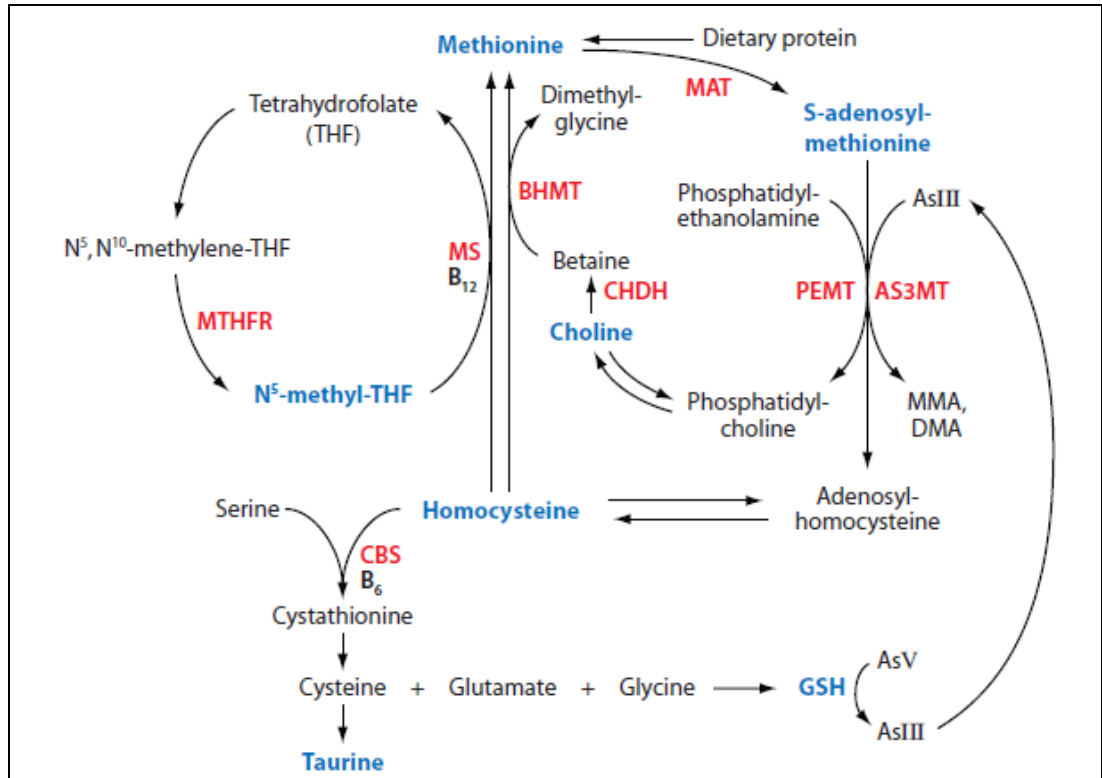
Arsenik absorbsiyonunun büyük bir kısmı ince bağırsakta proton (H^+) gerektiren elektrojenik bir süreçle gerçekleşebilir (Gonzalez ve ark., 1997). Bununla birlikte, Pankreatik bikarbonat salgısından dolayı ince bağırsaktaki pH seviyesi yaklaşık olarak 7 olmasına rağmen arsenik absorbsiyonu için en uygun pH 5' dir (Silver ve Misra, 1984). Oral ve inhalasyon yoluyla arsenik absorbsiyonunun hızı, çözünürlüğü düşük olan formlarda (kurşun arsenat, arsenik sülfat gibi) daha düşüktür. Ayrıca arsenat ve arsenit gibi bileşikler de iyi absorbe olurlar ve absorbe olduktan sonra arsenitler arsenatlara yükseltgenir ve metilasyona uğrarlar. Absorbsiyonun sonunda ise karaciğer, böbrek, dalak ve akciğer gibi organlarda birikir.

Kronik arsenik maruziyetinin sağlık üzerine etkileri arsenik metabolizmasındaki bireysel farklılıklar ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir (Han ve ark., 1998). Arsenik metabolizması ve metilasyon hızı türlere ve dokulara göre farklılık göstermektedir (ATSDR, 2007). Absorblanan arsenik, toksik olmayan monometil arsenik asit (MMA) ve dimetil arsenik asit (DMA) oluşturmak için karaciğerde biyometilasyona uğramaktadır (Aposhian, 1993). Oluşan maddelerin her ikisi de idrarda arseniğin ana metabolitlerini oluşturmaktadırlar. Arsenik atılımının ana yollarından biri idrardır ve bu nedenle toksikoloji ve tedavi araştırmalarında kullanılmaktadır. Buna ek olarak, inorganik arseniğinde idrardan doğrudan atılımı olabilir (Han ve ark., 1998).

Arsenik metabolizması hayvanlarda ve insanlarda çalışılmıştır. İki temel reaksiyon grubu vardır. Birincisi, dönüşüm (As^{+3} 'ü As^{+5} 'e ve tam tersi) reaksiyonları, ikincisi metilasyon (arseniti MMA ve DMA'ya dönüşümü) reaksiyonlarıdır. Toksik arsenik formu olan As^{3+} karaciğerde MMA ve DMA oluşturmak üzere enzimatik metilasyona uğrar. Buradan da büyük bir kısmı hızlı bir şekilde idrarla As^{3+} , As^{5+} , MMA ve DMA karışımı şeklinde ve daha az miktarda ise feçesle atılabilir. Ayrıca, bir kısmı da dokulara bağlanmış olarak kalabilir (ATSDR, 2007). İdrarda As^{+3} , As^{+5} , MMA ve DMA'nın oranları alınan kimyasala, maruziyet yoluna, maruziyet sonrası geçen süreye, doz miktarına ve maruziyete uğrayan canlı türüne göre

değişebilmektedir. Bununla birlikte, genellikle uzun dönem maruziyetlerde DMA (%60-70) temel metabolit olarak bilinmektedir, diğer daha az düzeylerdeki metabolitler sırasıyla MMA (%15-25), As^{3+} (%15) ve As^{+5} (%10)'dur. MMA organizma için genel bir risk faktörü olarak kabul edilir (Vahter, 2009).

İnorganik arsenik metabolizmasının temeli biyometilasyona dayanır (Şekil 1.7) ve iki elektronlu indirgeme tepkimesini bir metil grubunun eklenmesi takip eder. Bu metilasyon süreci, S-adenozilmetionin koenzimi yardımıyla karaciğerde gerçekleştirilmektedir. S-adenozilmetionin'den bir metil grubu As^{3+} 'e taşınır ve MMA ortaya çıkar, daha sonra MMA yeniden metillenerek DMA'yı oluşturur (Buchet ve Lauwerys, 1994). Arsenatın indirgenerek arsenite dönüşmesi glutatyon yardımıyla gerçekleşmektedir.



Şekil 1.7. İnorganik arseniğin insandaki metabolik yolağı. MAT, metiyonin adenosiltransferaz; AS3MT, arsenik-3-metiltransferaz; PEMT, fosfatidiletanolamin-N-metiltransferaz; CHDH, kolin dehidrogenaz; BHMT, betain homosistein metiltransferaz, THF, tetrahidrofolat; MTHFR, metilen tetrahidrofolat redüktaz, B₁₂, B₁₂ vitamini, MS, metiyoninsentaz, B₆, B₆ vitamini; CBS, sistationein β-sentaz (Vahter, 2009).

1.6. Plasenta

1.6.1. Plasentanın Yapısı ve Gelişimi

Plasenta, gebelik boyunca anne ve fetus arasında fizyolojik alış verişin gerçekleştiği bir organdır. Gebeliğin 4. gününde blastosist evresindeki embriyo, uterus boşluğu içerisinde bulunur. İmplantasyon blastosistin endometriuma yerleşme sürecidir. Blastosistin implante olmasından hemen sonra embriyo ve maternal endometrium, plasentayı oluşturmaya başlarlar.

İmplantasyon 4 aşamada incelenebilir:

1. Apozisyon (Stabil olmayan tutunma)
2. Adezyon (Stabil tutunma)
3. İnvazyon ((Endovasküler ve interstisyel(myometrium içlerine) invazyon))
4. Desidualizasyon (Endometrial stromanın desiduaya dönüşümü) (Gartner ve Hiatt, 1997).

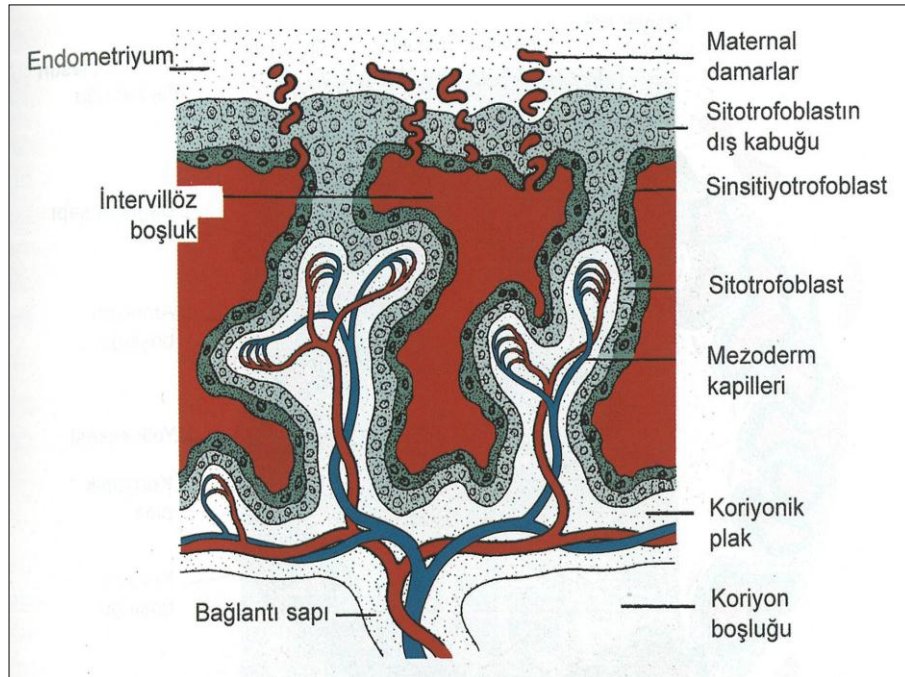
Trofoblastlar iki tabaka halinde farklılaşırlar;

1. Sitotrofoblastlar(Langhans hücreleri): Mitotik aktiviteye sahip tek çekirdekli hücrelerdir. Desmozomları vardır. Farklanarak sinsityotrofoblastları oluştururlar.

2. Sinsityotrofoblastlar: Mitotik aktiviteleri yoktur, çok çekirdekli dirler, serbest yüzlerinde mikrovilluslar yer alır. İyi gelişmiş golgi kompleksine, bolca granülsüz endoplazmik retikuluma, çok sayıda mitokondriye sahiptirler ve sitoplazmalarında çok sayıda lipid damlacığı ve pinositik vezikül bulunur.

Sinsityotrofoblastlar endometrium içine girer ve hızla ilerleyerek tüm embriyoyu çevrelerler. Sinsityotrofoblastlar stromanın derinliğine doğru ilerleyerek anneye ait kapiller damarların endotelini aşındırmaya başlarlar. Sinsityal lakunalar

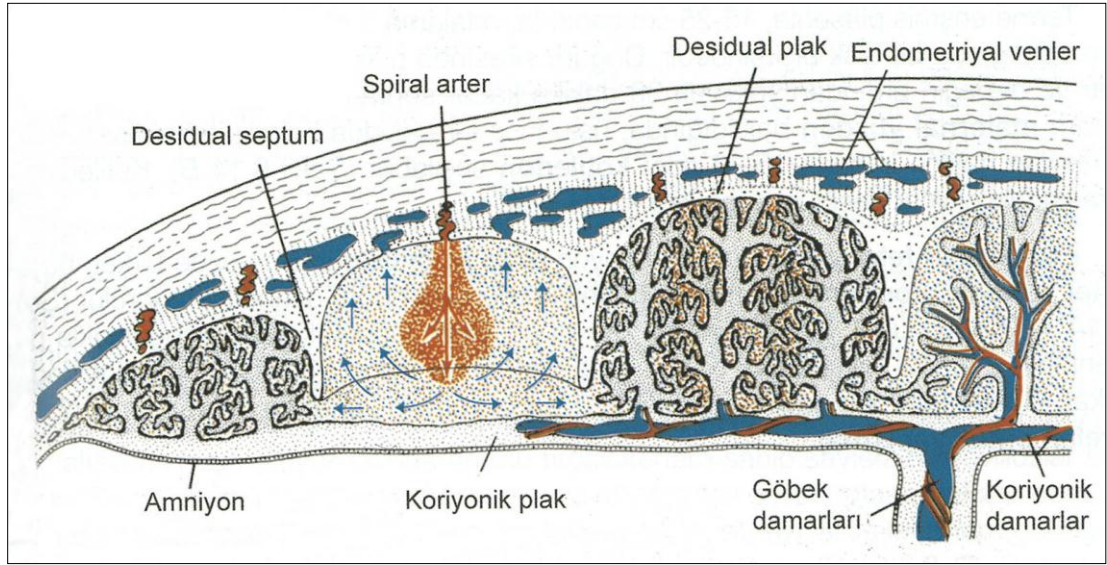
maternal desidua spiral arterlerle birleşir böylece anne kanı laküner sistem içine dolmaya başlar. Maternal kan dolaşımı trofoblastik sistem içinden geçmeye başlar ve böylece utero-plasental dolaşım başlamış olur. Koryon plağında desidua bazalise uzanan villuslara kök veya bağlayıcı villus denir. Kök villuslardan yanlara doğru dallanan villuslar ise serbest veya terminal villuslar olarak adlandırılırlar. Anne ile fötüs arasındaki madde alışverişi terminal villuslar aracılığıyla gerçekleşir. (Sadler, 1995). (Şekil 1.8)



Şekil 1.8. Gelişimin 3. haftasında plasenta (Sadler, 1995).

Plasenta fetal tarafta koriyon plağı maternal tarafta ise desidua plak ile sınırlanmıştır. Koriyonik ve desidua plakların arasındaki intervillöz boşluklar anne kanıyla doludur. 4. ve 5. aylarda desidua içinde ortaya çıkan desidua septumları intervillöz boşlukların içine doğru büyürler ama koriyon plağına kadar uzanmazlar. Septumların iç iskeleti maternal dokudan oluşmuştur ancak dış yüzeyleri

sinsityotrofoblast hücreleriyle örtülüdür. Septumların oluşmasıyla plasenta kotiledon adlı bölmelere ayrılmış olur. Desidual septumlar koriyon plağına kadar uzanmadığından komşu kotiledonlar içinde bulunan intervillöz boşluklar birbirleriyle ilişkidir (Benirschke ve ark. 2006). (Şekil 1.9)



Şekil 1.9. Gebeliğin ikinci yarısında plasenta (Sadler, 1995).

1.6.2. Plasentanın Fonksiyonları

Plasentanın temel görevi; gelişmekte olan fetüsün gereksinim duyduğu besin maddelerini anneden bebeğe aktarmak, fetüsün metabolizma sonucu ürettiği atık ürünleri annenin dolaşımına iletmek ve anne ile bebek arasında oksijen ve karbondioksit alışverişini sağlamaktır. Bazı maddeler plasentadan hiç değişime uğramadan geçerken bazıları geçiş sırasında metabolize olur. Bazıları ise hiç geçemezler veya glukoz ve oksijen gibi bazı ürünlerde geçiş sırasında plasenta tarafından kullanılırlar. Plasental kan dolaşımı fetüse oksijen sağlanması için

önemlidir. Oksijen, karbondioksit ve karbonmonoksit gibi gazların değişimi basit difüzyonla olur. Amino asitler, karbonhidratlar, serbest yağ asitleri ve vitaminlerin geçişi de plasenta aracılığıyla olur.

Hormon üretimi de plasentanın başlıca fonksiyonlarındanıdır. Plasenta dördüncü ayın sonunda gebeliğin devamı için gerekli progesteron üretimini yapar. Plasenta, progesterona ek olarak, artan miktarlarda öncelikle östriol olmak üzere östrojenik hormonları da doğum öncesinde maksimum düzeye ulaşacak şekilde gebeliğin sonuna kadar üretir. Bu yüksek düzey östrojen uterin büyümeyi stimüle eder ve meme dokusunu geliştirir. Sinsitiotrofoblastlar gonadotropin (human koryonik gonadotropin) üretir, bu hormon hipofiz ön lobundan üretilen lüteinleyici hormon ile benzer etkilidir. Bu hormonlar anne idrarı ile atılır ve gebeliğin erken safhalarında düzeyleri gebelik indikatörü olarak kullanılır. Plasentada üretilen bir başka hormon ise somatomammotropindir. Büyüme hormonu benzeri etkilidir fötusa anne kanındaki şekere öncelik vererek anneyi diabetojenik etkiler (Sadler, 1995).

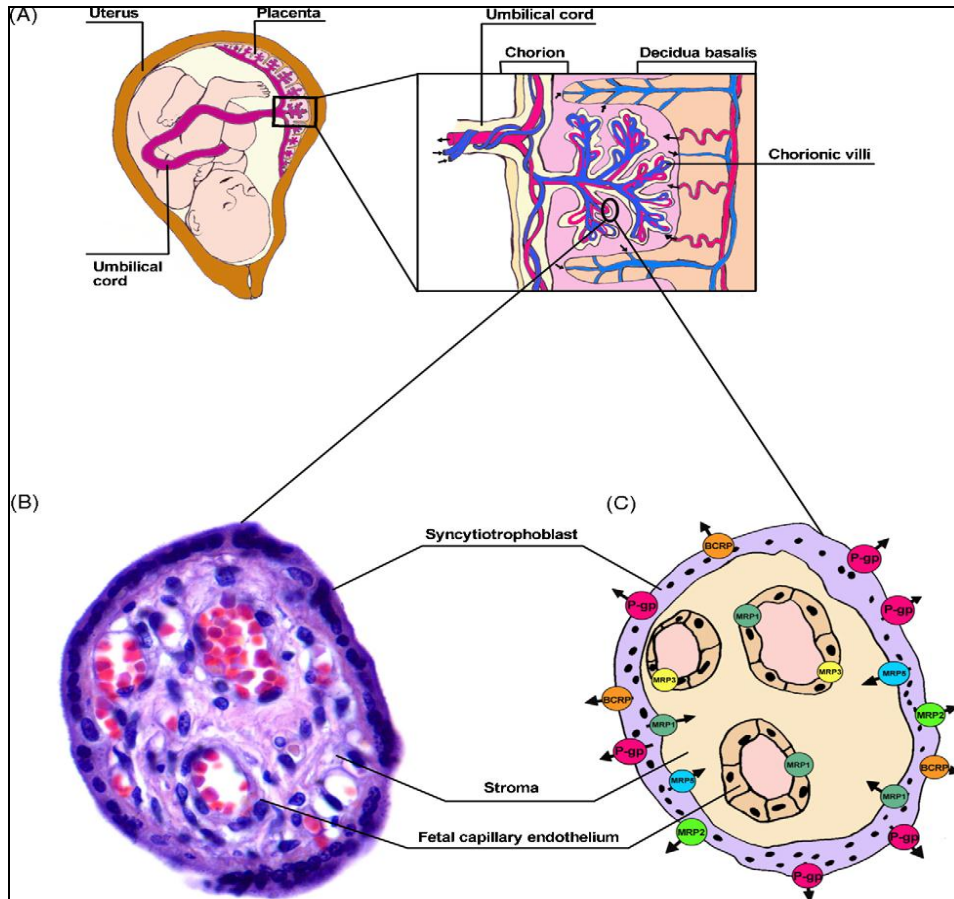
1.7. P-gp'in Plasentada Lokalizasyonu ve Ekspresyonu

Hamilelik döneminde fetüs plasentadan geçebilen birçok ksenobiyetiğe maruz kalır. Akut hastalıklar (enfeksiyonlar, gastrolojik rahatsızlıklar vs.), kronik hastalıklar (epilepsi, diyabet, astım, hipertansiyon vs.) veya tümörler gibi ciddi komplikasyonlar nedeniyle hamilelik esnasında farmakolojik tedavi zorunluluğu doğmaktadır (Garcia-Bournissen F. ve ark., 2003, Shiverick ve ark., 2003). Bununla beraber hamilelik döneminde gereksiz ve bilinçsiz ilaç kullanımlarında görülebilmektedir, ya da herhangi bir sebeple annenin maruz kaldığı toksikolojik etkilere fetüste maruz kalmaktadır.

Metarno-fetal yüzeyde bulunan metabolik enzimler ve efluks pompaları, ilaç ve ksenobiyotiklerin plasentadan fetüse geçişinin sınırlandırılması ve fetüsün korunmasıyla direk ilişkili yapılardır. Bu nedenle, son yıllarda P-gp gibi plasentada bulunan ABC efluks proteinlerine artan bir ilgi mevcuttur. P-gp, bu efluks taşıyıcı yapılardan ilk keşfedileni ve üzerinde en çok çalışma yapılmış olanlarından biridir. P-

gp'in plasentadaki fonksiyonel aktivitesini kanıtlayan ilk çalışma Nakamura ve arkadaşları (1997) tarafından yapılmıştır.

Plasenta, zararlı ekzojen maddelerle ilk karşılaşılan fetal organdır. Plasenta fetal (koryonik plak ve koryonik villuslar) ve maternal (desudia bazalis) olmak üzere iki dokudan meydana gelir. Trofoblastlar maternal kanla direk temas halindedir. P-gp plasentanın epitel hücrelerinin (sinsitiyotrofoblast) apikal yüzeyinde eksprese edilerek kan-plasenta bariyerinin bir parçasını oluşturmaktadır. Şekil 1.10.'da plasenta kesiti, fetal ve maternal organlar ile P-gp'in plasentadaki lokalizasyonu görülmektedir.



Şekil 1.10. Plasentanın şematik yapısı.

A. Gebelik döneminde, fetüsün göbek kordonu ile plasentaya bağlanmasını gösteren uterus kesiti. Detaylı şemada, kotilodon olarak adlandırılan plasentanın fonksiyonel ünitesi görülmekte. Plasentanın fetal parçası olan koryon, koryonik plak ve koryonik villuslardan

oluşur. Oksijen ve besinler anne kanından, koryonik villusların trofoblast tabakasına geçer, umbilikal ven (kırmızı) ile fetal kanın İçine ve fetüse getirilir, deoksijenize olmuş kan, iki mavi umbilikal arter ile fetustan iletilir.

B. Gebeliğin son üç ayında hemotoksin-eozinle boyanmış terminal villi kesiti.

C. Terminal vili bölgesinin şematik görüntüsü, sinsitiotrofoblastın membranındaki apikal mikrovilluslarda lokalize olmuş, P-gp ve diğer plasental efluks taşıyıcı proteinleri (Atkinson D.E., ve ark.,2003).

Genel kural olarak; anneye uygulanan kimyasal bir madde belirli derecelerde fetüse de geçer (Audus K.L., 1999, Pasifici G.M. ve ark., 1995). Bu maddelerin plasentadan geçişi, yağda çözünürlüğü, moleküler boyutu, iyonizasyon derecesi ve plazma proteinlerine bağlanması gibi faktörlere göre değişim gösterir. İyonize olmayan, lipid özellik gösteren ve moleküler ağırlığı 600 Da'ya kadar olan maddeler plasentadan pasif difüzyonla geçerler. İlaçlar ve xenobiyotik moleküller, substrat olarak monoamin, karnitin, nükleozit gibi besin ve organik iyon taşıyıcıları tarafından tanınmak suretiyle hücre içine girerler (Ganapathy ve ark., 2000, Russel F.G. ve ark., 1998)

1.8. Arsenik Maruziyetinin Anne, Plasenta ve Bebek Sağlığı Üzerine Etkileri

Arseniğin anne sağlığı üzerinde, enzim inhibisyonu, oksidatif stres, yanı sıra; bağışıklık, endokrin ve epigenetik etkileri bilinmektedir (Vahter, 2009).

Plasenta anne ve fetal dolaşımın temas alanını oluşturmakta, bir taraftan fetüs için gerekli maddeleri sağlarken diğer taraftan da aralarında metallerin de bulunduğu toksik maddelerin fetüse geçişini engellemektedir. Fakat arsenik, plasentaya geçtiğinde fetal büyüme bozukluklarına, fetüs ve bebek ölümlerinin artmasına sebep olmaktadır. Ayrıca, metallerin plasenta tarafından tutulması plasental fonksiyonların etkilenmesine neden olup, özellikle fetal büyüme ve gelişim için gerekli iz elementlerin taşınmasını engellemektedir (Osman ve ark., 2000).

Hayvanlarla yapılan çalışmalara göre; inorganik arsenik plasental bariyeri geçebilmekte ve hayvan embriyosunun nörepitelyumunda birikebilmektedir. Ayrıca, farelerde yapılmış çalışmada, gebelik ve emzirme dönemi boyunca arseniğe maruz kalan gebelerin yeni doğmuş fare beyinlerinde DMA ve anorganik arsenik bulunabilmektedir. (Jin ve ark., 2006). İnsanlarda plasentanın koruyuculuk faktörünün yanında gebelik ve emzirme sırasında, fetüs ve bebek kısmen artan arseniğe karşı metilasyon ile korunmaktadır. Fakat, erken yaşam dönemlerinde yaşanan maruziyet daha sonraki dönemlerde belirgin hale gelerek zararlı etkiler ortaya çıkabilir (Vahter, 2009).

Fetüsün ağır metallerin toksik etkilerine özel duyarlılığı, erişkinlerle vücut kitle indeksi farkları ve büyüdükçe toksik risk oranının artması; çevre kirliliğinden en çok etkilenen grubu oluşturmasında önemli rol oynar. Birçok çalışmada toksik metallerin doğum ağırlığı, doğum boyu ve baş çevresine negatif etkileri olduğu gösterildiği gibi çevre kirlenmesine neden olan toksik metallerin endokrin bozucu etkileri ile ilgili veriler de bulunmaktadır (Davey ve ark., 2008).

Toksik metallere maruziyetin ölçümü, gelişen fetüs bakımından önemlidir ve plasentada metal düzeylerinin belirlenmesinin çevresel metal maruziyeti yönünden iyi bir gösterge olduğu düşünülmektedir (Baglan, ve ark., 1974).

Çalışmamızda; doğum yapmış bayanlara ait kan örneklerinde MDR1 C1236T gen polimorfizmi belirlenerek plasenta dokusu örneklerindeki metal düzeyleri tespit edilecek, aralarında korelasyon olup olmadığı araştırılacaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Doku DNA izolasyon kiti	Qiagen
Restriksiyon Enzimi (BsgI)	Neb (New England Biolab)
Primerler	Alpha DNA, Montreal
Etanol	Merck
Agaroz	Prona
Trizma Base	Merck
Borik asit	Merck
EDTA	Merck
DTT	Sigma
Etidyum Bromür	Applichem
6X loading çözeltisi	Qiagen
Saf etanol	Scharlau, Dop
DNA's RNA's free water	Qiagen
Hot Star Taq DNA polimeraz	Qiagen
Fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1)	Applichem
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Applichem
Sodyum klorür (NaCl)	Merck
Proteinaz K	Merck
100 bp ladder	Fermentaz
Ammonyum dihidrojen fosfat	Merck
Triton X	Scharlau
HNO ₃ (%65'lik)	Merck

2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Laminar Flow kabin	Esco
Thermal Cycle PCR cihazı	Techne Tc 512
Jel Görüntüleme cihazı	Syngene
Yatay elektroforez cihazı	Scie-Plas
Güç Kaynağı	Bio-Rad
Su banyosu	Nüve Bm 402
Otoklav	Nüve
Soğutmalı santrifüj cihazı	Hettich
Mikrodalga fırın	Arçelik
Elektrikli hassas terazi	Schimadzu Libror
Vorteks karıştırıcı	Biosan
pH metre	Mettler Toledo
Laptop Cooler (-20°C)	Sigma
1.5 ml. ve 0.2 ml'lik ependorf steril tüpler	Axygen Genuine
pirojen free filtreli, pipet uçları (10 µl, 100 µl, 1000 µl.)	Finntip
Otomatik mikropipet	Ependorf, Thermo, Tipor-V
Etüv	Memmert
Santrifüj	Heraeus Sepatech Labofyge 200
Manyetik Karıştırıcı	Mirak
Ph metre	Seven Multi Mettler Toledo
Su Purifikasyon Sistem	Human Up 900
Mikrodalga fırın	Mars X Press
Hassas terazi	Mettler Toledo 4 Digit
Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi	Varian AA24OFS Fast Sequential
Zeeman Absorpsiyon Spektroskopisi	Varian AA240Z
Grafit Tüp Atomizer	Varian GTA 120
Grafit Komponent Tüpler	Varian GTA
Vial (2ml)	Pothtech Elkay
Hava Asetilen Tüpü	
Argon gaz tüpü	

2.2. Deney Protokolü

2.2.1. Maternal Kan Örnekleri ve Plasenta Örneklerinin Toplanması

Bu çalışmada kullanılan tüm örnekler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulları Araştırma Projesi Bilgi ve Taahhüt Formunda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmış Bilgilendirilme Onam Formları doldurularak çalışmaya katılmıştır (Etik Kurul Karar No: 33-730; Tarih: 11.07.2011). Çalışmada 112 örnek kullanılmıştır.

2.3. Yöntem

Çalışmamız iki bölümden oluşmaktadır. İlk bölümde bireylerin plasenta örneklerinin arsenik konsantrasyonları Atomik Absorbsiyon Spektrometre (AAS) cihazı ile ölçülmüş; ikinci bölümde ise MDR1 C1236T polimorfizmi genetik analizler ile belirlenmiş ve aralarında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır.

2.3.1. Plasenta Örneklerinin Analiz Ön İşlemleri

Toplanan plasentalar, aynı gün içerisinde homojeniteyi sağlamak amacıyla 6 farklı bölgesinden kesit alınarak % 0,1'lik Triton-X çözeltisinde yıkandı. Ardından bu plasenta parçacıkları distile sudan geçirilerek polipropilen idrar kaplarına konuldu ve analiz zamanına kadar -20 °C' de saklandı.

Daha sonra bu kaplardan alınan plasenta parçacıklarını kurutmak amacıyla etüv içerisinde 24 saat bekletildi. Ardından hassas terazide ortalama 1 gr tartılarak yüksek sıcaklığa dayanıklı mikrodalga teflon tüplerine konuldu. Plasenta dokularının üzerine 5 ml %65'lik nitrik asit (HNO₃) eklenerek, mikrodalga fırında yakma programı ile

yakıldı. Yakılan plasenta örnekleri 50 ml'lik döner kapaklı polipropilen tüplere aktarılıp, toplam hacim deiyonize su ile 10 ml'ye tamamlandı. Örneklerin analiz anına kadar kapaklı polipropilen tüplerin içinde, +4 °C'de saklandı.

2.3.2. Plasenta Örneklerinin Arsenik Analiz İşlemleri

Mikrodalga fırında asitle yakılan örneklerin arsenik düzeyleri Grafit Fırınlı Varian AA240Z Zeeman Atomik Absorpsiyon Spektrometre cihazı ile ölçülmüştür.

Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi Grafit Fırın Yöntemi ile numune sıcaklığı basamaklı olarak elektrik enerjisiyle artırılarak kurutma işlemi yapılır, ardından külleme işlemiyle numunedeki matriks uzaklaştırılır ve atomizasyonla element serbest atomlarına ayrılır. Metodun prensibi; yüksek sıcaklıkta gaz halinde bulunan element atomlarının elektromanyetik ışınları (genellikle görünür alan ve UV ışınlarıdır) absorblaması temeline dayanır.

Bir atomik absorpsiyon spektroskopisi şu kısımlardan oluşur:

- İstenilen dalga boyunda ışık verebilen bir ışık kaynağı,
- Atomlaştırma (Atomizasyon kısmı),
- Dalga boyu seçicisi (Monokromator),
- Elektrik sinyalleri alan kısım (Fotodedektör),
- Elektronik okuma sistemi.

2.3.3. Maternal Kan Örneklerinin Genetik Analiz İşlemleri

2.3.3.1. Sıvı Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Doğum yapan, 112 bayandan 2 ml venöz kan örneği EDTA'lı tüplere alındı. Tüm örnekler +4 °C'de saklandı.

Venöz kan örneklerindeki nükleer DNA'yı açığa çıkarabilmek amacıyla fenol-kloroform-izoamil-alkol ekstraksiyon yöntemi kullanıldı.

- 100 µl sıvı kan örneğinin üzerine 1000 µl TE konularak 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Alt faz 100 µl kalıncaya kadar üst faz atıldı. Bu işlem 3 defa tekrarlandı.
- Üzerine;
 - 45 µl NaCl (1 M),
 - 40 µl SDS (%20'lik)
 - 400 µl TE ve
 - 10 µl proteinaz K eklenerek kısaca vortekslendi.
- 56 °C'lik su banyosunda 1,5-2 saat inkübe edildi,
- Fenol-kloroform-izoamil alkol karışımından 500 µl ilave edildi ve kısaca vortekslendi.
- 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Alt faz hareket ettirilmeden üst faz yeni bir ependorf tüpe alındı ve alt faz atıldı.
- 1000 µl soğuk saf etil alkol ilave edildi.
- 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Alkol oluşan pelete zarar vermeden dikkatli bir şekilde atıldı.
- 500 µl %70'lik oda sıcaklığında etil alkol ilave edildi.
- 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Ependorf tüpün içerisinde bulunan tüm alkol dikkatlice atıldı.

- Tüpün dibinde kalan alkol de tamamen uçurulduktan sonra 100 µl DNase- RNase free su ilave edildi.

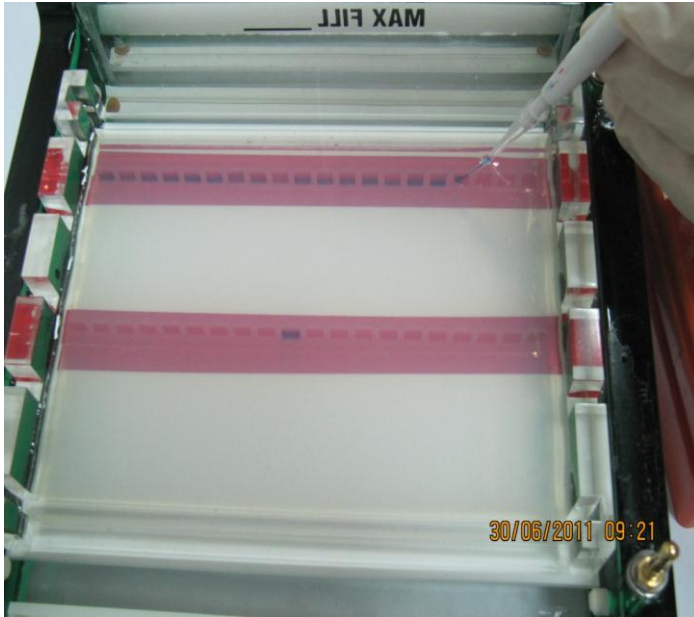
Tüm DNA örnekleri analizlere alınıncaya kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

2.3.2.2. Genomik DNA’nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi

Kan örneklerinden genomik DNA’nın izole edilip edilmediğinin analizi %1,0’lik agaroz jel elektroforezi ile belirlendi. Bunun için;

- 1,2 gr agaroz tartıldı ve 120 ml 1X TBE (Tris Borat EDTA) çözeltisi içerisinde çözüldü.
- Mikrodalga fırında ağzı alimünyum folyo ile kapatılıp üzerinde delikler açılarak maksimum ayarda kaynatıldı.
- Çözelti oda sıcaklığında 50–60 °C’ye düşünceye kadar bekletildi.
- Üzerine 10 µl EtBr (Etidyum Bromür) (10 mg/ml) eklendi ve hafifçe çözelti pembeleşip homojen karışım sağlanıncaya kadar erlen çalkalandı.
- Kalıbın bariyerleri takıldı ve jel tarakları yerleştirildikten sonra agar kalıba döküldü. Jel üzerinde hava kabarcıkları oluşmuş ise, jel katılaşmaya başlamadan hemen pipet ucu yardımı ile patlatıldı.
- Jelin katılaşması için oda sıcaklığında 30–45 dakika bekletildi.

- Taraklar ve bariyerler çıkarılarak kalıp elektroforez tankına yerleştirildi. Jel kuyucuklarının, yürüme tankının katot elektrot (-) tarafına yerleştirilmesine dikkat edildi.
- Jelin üzerini 2–3 mm kaplayacak miktarda tank içerisine 1X TBE çözeltisi eklendi.
- 15 cm uzunluğunda parafilm kesilerek buz kalıbı üzerine yerleştirildi.
- 1µl 6X Jel Loading Buffer ve 5 µl DNA örneği parafilm üzerine konuldu ve homojenizasyon için mikropipet yardımı ile yavaşça pipetaj yapıldı.
- Toplam 6 µl karışım dikkatli bir şekilde, jeli delmeden, jel kuyucuklarına yerleştirildi (Şekil 2.1)



Şekil 2.1. Agaroz jel kuyucuklarına örneklerin yüklenmesi

- Tank kapağı kapatıldı, anot ve katot uçlarının bağlantıları takıldı.
- Güç kaynağı 100 volt ve 70 ampere ayarlanarak, numuneler 45 dakika jel üzerinde yürütüldü.
- UV ışığında, Jel Görüntüleme cihazında sonuçlar değerlendirildi.

Çalışmada kullandığımız 112 kan örneğinin tamamı, DNA izolasyon işleminden sonra agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Her bir örneğin DNA'larının izole edildiği görüldü.

2.3.3.3. İzole Edilen Genomik DNA'ların PCR ile Çoğaltılması

PCR işlemi TECHNE TC 512 Thermal Cycle cihazı ile gerçekleştirildi ve aşağıda belirtilen işlemler uygulanarak hedeflenen DNA bölgesinin her biri 2³⁵ defa çoğaltıldı. Her PCR analizinde kontrol amacıyla, pozitif ve negatif örnekler de kullanıldı. PCR işleminde kontaminasyonu önlemek amacıyla;

- PCR ve DNA izolasyonları farklı ortamlarda yapıldı.
- Her analiz öncesi ve sonrasında kullanılacak çalışma ortamı ve otomatik pipetler alkol ile temizlendi.
- Steril tüpler ile filtreli pipet uçları kullanıldı.
- Amplifikasyon ve enzim kesim işlemleri hava sirkülasyonlu laminar kabin içerisinde yapıldı, işlem öncesi ve sonrasında en az 45 dakika UV ışık kaynağı çalıştırıldı,

- Analizler sırasında steril, pudrasız eldivenler kullanıldı ve sık sık eldivenler değiştirildi.

Amplifikasyon için Forward (F: direkt) ve Reverse (R: karşıt) primerleri kullanıldı. Primer çiftinden F primer DNA'nın bir ipliğine bağlanırken, R primer DNA'nın diğer ipliğine bağlanır. Primerlerin bağlanmasıyla hedeflenen bölgenin çoğaltılması başlatılmış olur.

Primerler HPSF (High Performance Salt Free) yöntemi ile Montreal'deki Alpha DNA firmasına sentezletirildi. Kullanılan primerler ve özellikleri çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Standart bir PCR reaksiyonun PCR Buffer, MgCl₂, dNTP karışımı, Hot Star Taq DNA Polimeraz, F Primer, R Primer ve DNA bileşenleri bulunmaktadır.

Çalışmada kullanılan 50 µl'lik PCR reaksiyonunun bileşenleri, bileşenlerin stok konsantrasyonları, reaksiyondaki miktarları ile reaksiyon karışımındaki final konsantrasyonlarına ait bilgiler aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 2.1. PCR bileşenleri ile stoktaki ve reaksiyondaki konsantrasyonları

Bileşen	Stok Konsantrasyon	Reaksiyona Konulan Miktar	50 µl'lik Reaksiyon Karışımındaki Final Konsantrasyon
10 X PCR Buffer	10X	5 µl	1X
MgCl ₂	25 mM	3	1.5 mM
dNTP karışımı	2mM	5	200 µM
F Primer	10 pmol/ µl	1 µl	10 pmol
R Primer	10 pmol/ µl	1 µl	10 pmol
Hot Star Taq DNA Polimeraz	5 U/ µl	0.25 µl	1.25 U
DNA			~200 ng
Steril H ₂ O		50 µl'ye tamamlayıncaya kadar	

PCR programı aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

+ 94 °C'de	10 dakika	
+ 94 °C'de	1 dakika (denatürasyon)	} 35 döngü
+ 60 °C'de	1 dakika (eşleşme)	
+ 72 °C'de	1 dakika (sentez)	

+ 72 °C'de 5 dakika

+ 4 °C'de ∞ dakika

PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütülünceye kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

2.3.3.4. MDR1 C1236T Gen Polimorfizimlerinin PCR Yöntemiyle Amplifiye Edilmesi

MDR1 C1236T, 7. kromozomda bulunan bir gen bölgesidir. Bu noktadaki, gen polimorfizmi tipik bireylerde nükleotid C iken, atipik bireylerde T'ye değişim göstermektedir (Çizelge 2.2).

Çizelge Hata! Belgede belirtilen stilde metne rastlanmadı..2. MDR1 C1236T Gen Polimorfizimlerinin Genel Özellikleri

	MDR1 C1236T
Rs numarası	rs1128503
Nükleotid değişimi	C→T
Aminoasit değişimi	GGC→GGT
Primer sekansları (5'-3')	F: 5'- AGCTATTCGAAGAGTGGGCA -3' R: 5'- GTCTAGCTCGCATGGGTCAT -3'
Uygun sıcaklık (°C)	37
Restriksiyon enzimi	<i>HaeIII</i>
Ürün boyutları (bp)	CC: 278, 105, 35 CT: 313, 278, 105, 35 TT: 313, 105

2.3.3.5. PCR Ürünlerinin *HaeIII* Restriksiyon Enzimi ile Kesim İşlemleri

PCR ürünün kesimi için reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon bileşenleri, bileşenlerin stok ve final konsantrasyonları aşağıdaki tabloda belirtildiği şekilde yapıldı.

Çizelge 2.3. *HaeIII* enzimi ile kesim işlemindeki bileşenler ve reaksiyondaki hacimleri

BİLEŞEN	Reaksiyon Karışımındaki Hacimler
NEB4 Buffer	2 µl
<i>HaeIII</i> Enzimi	0,5 µl
PCR ürünü	10 µl
dH ₂ O	10 µl

İnkübasyon; 37 °C’de gece boyunca (yaklaşık 16 saat) devam edildi ve sabah yükleme için etüvden çıkarıldı. Tüpler etüvden çıkarılmadan 30 dakika önce PCR ürünlerinin jelde yürütülmesi için %2’lik agaroz jeli hazırlandı. Bunun için;

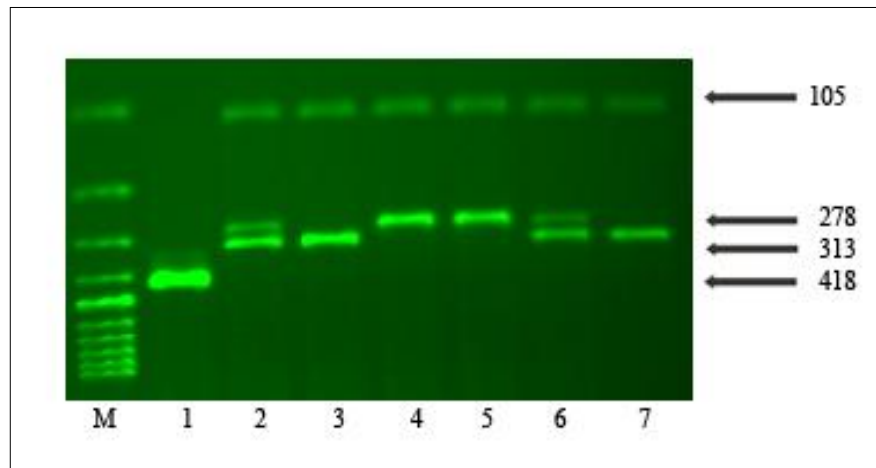
- 2,4 gr agaroz tartıldı ve 120 ml 1X TBE çözeltisi içerisinde çözüldü.
- Mikrodalga fırında ağzı alimünyum folyo ile kapatılıp üzerinde delikler açılarak maksimum ayarda kaynatıldı.
- Çözelti oda sıcaklığında 50–60 °C’ye düşünceye kadar bekletildi.

- Üzerine 10 µl EtBr (10 mg/ml) eklendi ve hafifçe çözelti pembeleşip homojen karışım sağlanıncaya kadar erlen çalkalandı.
- Kalıbın bariyerleri takıldı ve jel tarakları yerleştirildikten sonra agar kalıba döküldü. Jel üzerinde hava kabarcıkları oluşmuş ise, jel katılaşmaya başlamadan hemen pipet ucu yardımı ile patlatıldı.
- Jelin katılaşması için oda sıcaklığında 30–45 dakika bekletildi.
- Taraklar ve bariyerler çıkarılarak kalıp elektroforez tankına yerleştirildi. Jel kuyucuklarının, yürüme tankının katot elektrot (-) tarafına yerleştirilmesine dikkat edildi.
- Jelin üzerini 2–3 mm kaplayacak miktarda tank içerisine 1X TBE çözeltisi eklendi.
- 15 cm uzunluğunda parafilm kesilerek buz kalıbı üzerine yerleştirildi.
- Her 9 numuneden sonra 100 bp DNA ladder'ı kullanıldı. 1µl DNA ladder'ı, 1µl 6X Jel Loading Buffer ve 6 µl distile su karıştırılarak yükleme yapıldı.
- 7 µl PCR ürünü ve 1µl 6X Jel Loading Buffer, yani toplam 8 µl karışım dikkatli bir şekilde, jeli delmeden, jel kuyucuklarına yerleştirildi.
- Tank kapağı kapatıldı, anot ve katot uçlarının bağlantıları takıldı.
- Güç kaynağı 100 volt ve 70 ampere ayarlanarak, numuneler 70 dakika jel üzerinde yürütüldü.
- UV ışığında, Jel Görüntüleme cihazında sonuçlar değerlendirildi.

Çalışmada kullandığımız 112 kan örneğinin tamamı, agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Her bir örneğin spesifik bantları elde edildiği görüldü.

2.3.3.5.1. MDR1 C1236T Gen Polimorfizminin HaeIII Restriksiyon Enzimi ile Amplifiye Edilen Bölgenin Kesimi

MDR1 C1236T gen polimorfizm bölgesini kapsayacak şekilde çoğaltılan 418 bp'lik PCR ürünü, C→T tek nükleotid polimorfizmini belirlemek amacıyla; *HaeIII* enzimi ile 37 °C'de gece boyu inkübe edildi. Böylece, bu yürütme sonucunda *HaeIII* restriksiyon enzimi ile amplifiye edilen bölgenin kesimi sonucu MDR1 C1236T gen polimorfizminin genotipleri (CC-homozigot tipik, CT-heterozigot, TT-homozigot atipik) jel görüntüleme cihazı ile UV ışık altında fotoğraflanarak jelde görüntülendi. Sonuç olarak, CC genotipli homozigot tipik bireylerde *HaeIII* enzimi 418 bp'lik bölgeyi 278 bp ve 105 bp'lik olmak üzere iki oligonükleotid parçasına ayırmış olur. Bununla birlikte, TT genotipli homozigot atipik bireylerde *HaeIII* enzimi 418 bp'lik bölgeyi 313, 105, 35 bp'lik olmak üzere üç oligonükleotid parçasına ayırmış olur. Ayrıca, CT genotipli heterozigot tipik bireylerde ise *HaeIII* enzimi 418 bp'lik bölgeyi homozigot tipik ve homozigot atipikler gibi keser, böylece 313, 278, 105 ve 35 bp'lik olmak üzere dört oligonükleotid parçasına ayrılmış olur (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. 418 bp'lik amplifikasyon ürününün *HaeIII* enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotid uzunlukları (M=100 bp Ladder; 1 PCR ürünü 418 bp, 2 ve 6 heterozigot genotipli bireyler (CT) = 313 bp, 278 bp ve 105 bp, 3 ve 7 homozigot atipik genotipli

bireyler (TT) = 313, 105 ve 35 bp, 4 ve 5 homozigot tipik genotipli bireyler (CC) = 278, 105 ve 35 bp)

2.4. İstatistiksel Değerlendirmeler

Çalışma kapsamındaki örneklerin istatistiksel analizleri, “SPSS Version.16” paket programı kullanılarak yapıldı. Ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerlerden oluşan tanımlayıcı istatistikler hesaplandı. MDR 1 (C1236T) polimorfik gen ve alel frekansları hesaplamaları Hardy-Weinberg eşitliğinde Haldane exact testi ile yapıldı.

Örnekleme büyüklüğü göz önüne alındığında anlamlılık düzeylerinin belirlenebilmesi amacıyla parametrik özelliği taşıyan gruplarda “Student-T testi”, ikiden fazla grupların karşılaştırılmasında “Oneway Anova” testi kullanıldı. Ayrıca, kategorik veriler için ise X^2 , sayılı veriler için Pearson testi uygulandı. Minimum güven düzeyleri %95 ($p < 0,05$) olarak belirlendi.

3. BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen plasenta örnekleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalında doğum yapan yaşları 19-41 arasında değişen toplam 112 gönüllü anneden alınmıştır.

Çalışılan plasenta örneklerinde öncelikle arsenik düzeyleri ölçülmüş, devamında ise genetik polimorfizmleri yönünden istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, annelerin sigara kullanımı açısından da değerlendirilmiştir.

3.1. Plasenta Örneklerinin Genel Değerlendirilmesi

İncelenen plasenta örneklerine ait anne yaşı ve plasenta arsenik düzeylerinin ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerlerinden oluşan tanımlayıcı istatistikleri Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Anne Yaşı ve Plasenta arsenik düzeylerine ait tanımlayıcı istatistikler.

	Toplam(N)	Minimum	Maksimum	Ortalama±Standart sapma
Yaş	112	19	41	28,81±5,14
Plasenta As Düzeyi	112	11,03	137,67	62,35±30,42

3.2 MDR1 C1236T Gen Polimorfizminin Genel Değerlendirmesi ve Hardy-Weinberg Dengesine Uygunluğunun Tespiti

Annelerden alınan venöz kanlarda yapılan genetik çalışmada, bireyler MDR1 C1236T gen polimorfizmleri ile oluşan genotiplere göre gruplandırılmış ve toplam 112 bireye göre genotip ve alel frekansları hesaplanmıştır (Çizelge 3.2. ve Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.2. Bireylerin MDR1 C1236T polimorfizmleri ile oluşan genotip frekansları.

Polimorfizmler		Genotip Frekansı (n=112)	
		n	%
MDR1 C1236T	CC (Homozigot tipik)	34	30,3
	CT (Heterozigot)	58	51,8
	TT (Homozigot atipik)	20	17,9

Çizelge 3.3. Bireylerin MDR1 C1236T polimorfizmleri ile oluşan alel frekansları.

Polimorfizmler		Alel Frekansı (n=224)	
		n	%
MDR1 C1236T	C	126	56,2
	T	98	43,8

Çalıştığımız popülasyondaki bireylerin MDR1 C1236T gen polimorfizmi genotip frekansları, Hardy-Weinberg dengesine uygunluk göstermektedir ($p>0.05$) (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.4. MDR1 C1236T gen polimorfizminin Hardy-Weinberg Dengesi

MDR1 C1236T	Gözlenen	Beklenen	χ^2	p
CC	34	35,44	0,305	0,701
CT	58	55,12		
TT	20	21,44		
Toplam (n)	112	100		

p>0,05

3.3. MDR1 C1236T Polimorfizminin Plasenta Örneklerindeki Arsenik Düzeyleriyle Olan İlişkileri

Plasenta örneklerindeki arsenik düzeyleriyle MDR1 C1236T polimorfizminin genotipleri ile olan ilişkileri ‘Oneway Anova’ testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.5. ve Çizelge 3.6.).

Çizelge 3.5. Plasenta örneklerindeki arsenik düzeyleri ile MDR1 C1236T gen polimorfizmi arasındaki ilişki.

Plasenta		MDR1 C1236T Genotipleri				p
		CC	CT	TT	Toplam	
As (ppb)	N	34	58	20	112	0,702
	Ort.±S.S.	60,24±25.66	61,87±31,87	67,35±34,37	62,35±30,42	
	Min.	11,3	14,47	16,5	11,3	
	Maks.	110,88	126,47	137,67	137,67	

Çizelge 3.5’de görüldüğü üzere MDR1 CT ve TT genotiplerine sahip annelerin plasentalarındaki As düzeyinin, CC genotipli annelerin plasentasındaki As düzeyinden fazla olduğu tespit edilmiştir. Ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

Çizelge 3.6. Plasenta örneklerindeki arsenik düzeyleri ile MDR C1236T CC ve CT+TT genotipleri arasındaki ilişki.

As (ppb)		MDR C1236T Alelleri			
		CC	CT+TT	Toplam	p
Plasenta	n	34	78	112	0,629
	Ort.±S.S.	60,24±25.66	63,27±32,39	62,35±30,42	
	Min.	11,3	16,5	11,3	
	Maks.	110,88	137,67	137,67	

Çizelge 3.6’da sonuçlara göre, MDR1 C1236T CC ve CT+TT genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık mevcut değildir ($p>0,05$).

3.4. Sigara İçiminin Plasenta Örneklerindeki Arsenik Düzeylerine Etkisi

Sigara içiminin plasenta örneklerinde arsenik düzeylerine etkisi incelendi ve ‘Student T’ testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Sigara içiminin plasenta örneklerinde arsenik düzeylerine etkisi

Plasenta		Sigara İçimi			
		Sigara içmiyor	Sigara içiyor	Toplam	p
As (ppb)	N	94	18	112	0,741
	Ort.±S.S.	61,93±30,21	64,54 ±32,29	62,54±30,23	

Yukarıdaki çizelgede görüldüğü gibi, sigara içimi ile anne kanındaki arsenik düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamasına rağmen, sigara içen annelerin plasentasındaki arsenik düzeylerinin sigara içmeyenlere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($p>0,05$).

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda; toksik bir madde olan arseniğin, plasenta örneklerindeki düzeyine annenin genetik farklılığın etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Toplumumuzda MDR1 C1236T gen polimorfizmi ile ilgili çalışmalar, genel olarak polimorfizmlerin toplumumuzda dağılımı ve hastalıklarla bağlantısı ile ilgilidir (G.Gümüş Akay, 2008, Rüstemoğlu ve ark. 2011, Yusuf Baran, 2006). Ancak, literatürde MDR1 C1236T gen polimorfizminin, plasenta arsenik düzeylerine etkisi ile ilgili bir çalışmaya hem toplumumuzda hem de başka toplumlarda rastlanmamıştır.

Çalışmamızın ilk bölümünde, MDR1 C1236T allel frekansları ve genotipleri saptanarak, daha önceki çalışmalarda bulunan sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. MDR1 C1236T gen polimorfizminin çeşitli toplumlarda araştırıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmamızda bulduğumuz yüzde mutasyon frekanslarını da eklediğimiz çeşitli popülasyonlarda yapılmış çalışmalardan örnekler Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. MDR1 C1236T gen polimorfizminin çeşitli populasyonlardaki frekansları

Populasyon	N	MDR1 C1236T			Kaynak
		%			
		CC	CT	TT	
Çek	189	31,7	47,1	21,2	Pechandova ve ark., 2006
Fransız	223	33,0	49,0	18,0	Jeannesson ve ark., 2007
Alman	461	34,4	49,2	16,4	Cascorbi ve ark., 2001
Polonya	135	30,4	49,6	20,0	Wasilewska ve ark., 2007
Portekiz	100	27,0	55,0	18,0	Jeannesson ve ark., 2007
Rusya	59	24,0	56,0	20,0	Goreva ve ark., 2004
Çin	96	8,3	39,6	52,1	Chowbay ve ark.,2003
Hindistan	87	13,8	37,9	48,3	Chowbay ve ark.,2003
Japonya	154	11,0	46,8	42,2	Komoto ve ark.,2006
Malezya	92	12,0	44,6	43,5	Chowbay ve ark.,2003
Türk	100	20	51	29,0	Gümüş-Akay ve ark., 2008
Türk	112	30,3	51,8	17,9	Çalışmamız

Çizelgeye baktığımızda; Çek, Fransız, Alman ve Polonya populasyonlarındaki MDR1 C1236T gen polimorfizm frekansının bizim toplumumuz ile benzer olduğu, Portekiz ve Rusya populasyonlarındaki frekanslara yakın olduğu ancak Çin, Hindistan, Japonya ve Malezya populasyonlarındaki frekanslar ile oldukça farklı olduğu belirlenmiştir.

Gümüş-Akay ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptığı çalışma ile bizim çalışmamızdaki polimorfizm frekanslarında da genel anlamda bir benzerlik bulunmakla birlikte, tam benzerliğin bulunmayışının sebebi bizim çalışma grubumuzun tamamının bayanlar olması olabilir.

Çalışmamızın ikinci bölümünde, plasentalardaki arsenik düzeyi ölçülmüştür. plasentalardaki ortalama As düzeyi $62,54 \pm 30,23$ ppb olarak bulunmuştur. MDR1 C1236T genotipleri ile plaseenta arsenik düzeyleri karşılaştırıldığında; aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir ($p > 0,05$). Ortalama As düzeyleri CC genotipinde $60,24 \pm 25,66$ ppb, CT genotipinde $61,87 \pm 31,87$ ppb, TT genotipinde ise $67,35 \pm 34,37$ ppb olarak tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar; T aleli varlığında, P-gp ekspresyonunun azaldığını düşündürmektedir, çünkü P-gp; ATP hidrolizine bağımlı olarak çalışan ve efluks (dışa atım) pompası işlevi gören bir membran proteindir. P-gp, plasentanın epitel hücrelerinin (sinsitiyotrofoblast) apikal yüzeyinde eksprese edilerek kan-plasenta bariyerinin bir parçasını oluşturur. Yani T aleli, P-gp ekspresyonunu azalttığı için, plasentada arsenik konsantrasyonunun arttığı sonucu çıkarılabilir. Nitekim; Hemauer ve arkadaşları 2010 yılında yaptığı çalışmalarında; insan plasentasında 1236 CT ve TT genotiplerinin, wild-type 1236CC genotipi ile karşılaştırıldığında, düşük P-gp ekspresyonu ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır.

MDR1 polimorfizmleri ile P-gp ekspresyonunun bağlantısını ortaya çıkaran ilk kişi Hoffmeyer'dir (Fromm, 2002). Sessiz C3435T polimorfizmi ile beyaz ırkta yaptığı çalışmada; barsak P-glikoprotein seviyeleri ile bağlantılı olarak genotipleri karşılaştırmıştır. CC genotipine sahip bireylerin ince barsaklarında, TT genotipine göre yaklaşık olarak iki kat P-glikoprotein ekspresyonu tespit edilmiştir. Heterozigot denekler ise orta seviyede P-glikoprotein ekspresyonuna sahiptirler. Hoffmeyer'e zıt olarak, Nakamura, 3435TT genotipindeki Japon bireylerde, CT ve CC gruplarına göre daha fazla MDR1 mRNA seviyeleri rapor etmiştir. Buna benzer olarak, 3435 pozisyonundaki genotipe ilişkin bir P-glikoprotein açılım eğilimi, aynı zamanda 100 insan plasentasında gözlemlenmiştir. Tanabe, TT genotipine sahip hastalardan alınan insan plasentalarında, CT genotipli gruba göre; önemli derecede yüksek P-glikoprotein seviyeleri keşfetmiştir. MDR1 allelik değişkenler için bir terminoloji Kim tarafından ileri sürülmüştür (Fromm, 2002).

P-glikoprotein efluks pompasının, insan vücuduna giren ksenobiyotikleri sınırlayan doğal bir koruma işlevi olduğu için, ABCB1/MDR1 gen polimorfizminin

P-gp aktivitesi ve ekspresyon seviyesine etkisi hastalar ve hastalıklar içinde kritik önem taşımaktadır. Englund ve arkadaşları (2007), çalışmalarında aktif Crohn hastalarında (UC), kolonda düşük P-gp seviyesi gözlemlenmiştir. Benzer şekilde Potocnik ve arkadaşları, Sloven popülasyonu ile yaptığı çalışmada, 1236 TT ve 1236 CT genotiplerini UC hastalığı yönünden riskli olarak değerlendirmişlerdir. Illmer ve ark. (2002); Akut miyeloid lösemi (AML) hastalarında 1236 CC genotipinde barsaklarda en düşük P-gp ekspresyon seviyesini bulmuşlardır. Juva ve arkadaşları (2009), Kuzey Hindistan popülasyonunda; 1236T alelinin sıklığının, UC hastalığının görülmesi yönünden, kontrol grubuna göre fazla olduğunu, özellikle 29 yaş altında 1236C alelinin hastalık oluşumuna karşı koruyucu rolü olduğunu savunmuşlardır.

Fakat bu bulguların tersine, Yeni Zelanda'da Kafkas popülasyonu ile yapılan bir çalışma 1236 CT heterozigot genotipini, 1236 CC genotipine göre, UC hastalığı yönünden, daha riskli bulmuşlardır (Huebner ve Ark.,2009). Benzer şekilde; Osuga ve arkadaşları (2006), Japon popülasyonunda yaptıkları çalışmada C1236T polimorfizminin UC hastalığı riskini etkilemediği sonucuna varmışlardır. Goto ve arkadaşları (2002) ise; karaciğer transplantasyonlu hastalarda C1236T polimorfizmi ile P-gp ekspresyonu arasında kayda değer bir ilişki bulmamışlardır.

Bu çalışmaları beraber değerlendirdiğimizde; MDR1 C1236T polimorfizminin özellikle, P-gp lokalizasyon bölgelerindeki hastalıklarla ilişkili olabileceği ancak ilişki yönünün, hastalığın tipi ve çalışılan popülasyonların çeşitliliği gibi etkenlerle farklılaştığı sonucuna varılabilir. Bu nedenle MDR polimorfizmlerinin farklı popülasyonlarda analizi ve P-gp aktivitesinin bilinmeyenlerinin açığa çıkarılması önem arz etmektedir.

Çalışmamızdaki bir diğer konu; sigara içiminin plasenta arsenik düzeylerini etkileyip etkilemediğini araştırmaktır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre; sigara içimi açısından, plasenta arsenik düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına rağmen sigara içen gebelerin içmeyenlere göre plasentalarında arsenik düzeyleri yüksek çıkmıştır (sırasıyla; $64,54 \pm 32,29$ ppb, $61,93 \pm 30,21$ ppb, $p > 0,05$).

Sigaranın içinde arsenik bulunmasından dolayı ölçümün yüksek çıkması doğal görünmektedir. Nitekim; Yüksel ve arkadaşları (2009) Türk popülasyonu ile yaptığı çalışmada, sigara içimi ile saçta arsenik konsantrasyonları arasında anlamlı bir ilişki tespit etmişlerdir.

Ayrıca, arsenik maruziyeti ile fetüs arasındaki ilişkiyle ilgili literatürde, Jin ve arkadaşlarının (2006) fareler üzerinde yaptığı çalışmada gebelik döneminde arseniğe maruziyet sonucu yavrularda da yüksek arsenik seviyesine rastlanmıştır. Yine Lindgren ve arkadaşlarının (1984) hayvanlarla yaptığı çalışmada anorganik arseniğin plasental bariyeri geçtiğini ve seçici olarak gelişen hayvan embriyosunun nörepitelyumunda biriktiğini belirtmişlerdir. Rudge ve arkadaşlarının (2009) hamile kadınlarla yaptığı çalışmada ölçülen arsenik dahil toksik metallerin çoğunun plasenta bariyerini geçebildiğini göstermişlerdir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğinde doğum yapan toplam 112 gönüllü anneden plasenta ve venöz kan örnekleri alındı. Çalışılan plasenta örneklerinin öncelikle Grafit Fırınlı Atomik Absorbsiyon Spektrometresi (GFAAS) ile arsenik düzeyleri ölçüldü, anne venöz kan örneklerindeki MDR1 C1236T gen polimorfizmi belirlendi ve aralarında istatistiksel olarak ilişki olup olmadığı araştırıldı. Ayrıca, annelerin sigara kullanım bilgileri ile de tanımlayıcı istatistikler ve anlamlılık testleri yapıldı.

Sonuç olarak, genotiplere ve alellere göre plasenta arsenik düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamış ($p>0,05$) olmasına rağmen CC genotipli annelerin plasentalarındaki arsenik düzeyinin, TT genotipli annelere göre düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda; TT genotipli annelerin bebeklerinin, arsenik maruziyeti açısından daha riskli olduğu sonucu çıkarılabilir.

Annelerin sigara kullanımı ile plasenta arsenik düzeyleri arasındada anlamlı bir ilişki saptanmamış ($p>0,05$), ancak sigara içen annelerin plasentalarındaki arsenik düzeyi içmeyenlere göre yüksek bulunmuştur. Bu sonuca göre; sigara içen annelerin bebeklerinin daha fazla arseniğe maruz kaldığı söylenebilir.

İlerideki çalışmalarda daha büyük populasyonlarda çalışılması ve anne kanı, bebek kanı ve plasenta örneklerinin arsenik değerleri ile anne ve bebek genotiplerinin bir arada değerlendirilmesi önerilmektedir.

ÖZET

P-glikoprotein gen polimorfizminin plasental arsenik düzeyine etkisi

Bu çalışmada; yaygın görülen, sessiz MDR1 C1236T gen polimorfizminin, toksik bir metal olan arseniğin plasentadan geçişine etkisini belirlemek amaçlanmıştır.

Çalışmamızda doğum yapan 112 gönüllü annenin plasenta örneklerindeki arsenik konsantrasyonları Grafit Fırınlı Atomik Absorbsiyon Spektrometresi (GFAAS) ile ölçüldü. MDR1 C1236T polimorfizminin genetik analizleri, PCR-RFLP yöntemleri ile yapıldı ve aralarında ilişki olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirildi.

Çalışmamıza katılan bireylerin, MDR1 C1236T gen polimorfizmi ve plasenta arsenik düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamış olmasına rağmen ($p>0,05$); gen polimorfizmi bakımından homozigot tipik (CC) olan bireylerin plasentalarındaki arsenik miktarının, heterozigot (CT) ve homozigot atipik (TT) olan bireylerin plasentalarındaki arsenik miktarına göre düşük olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak; MDR1 C1236T gen polimorfizminin, plasentaya arsenik geçişini etkilediği gözlemlendi. Arsenik maruziyeti gözönüne alındığında; homozigot tipik (CC) bireylerin bebeklerinin maruziyete karşı daha avantajlı olduğu, başka bir deyişle; homozigot atipik (TT) bireylerin bebeklerinin maruziyete karşı daha riskli olduğu sonucuna ulaşıldı.

Annelerin sigara kullanımı ile plasenta arsenik düzeyleri arasındada istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0,05$), ancak sigara içen annelerin plasentalarındaki arsenik düzeyi içmeyenlere göre yüksek bulundu bu sonuca göre; sigara içen annelerin bebeklerinin arsenik maruziyeti bakımından daha riskli olduğu tespit edildi.

Anahtar Sözcükler: **Arsenik, Atomik absorbsiyon spektroskopisi, Gen polimorfizmi, MDR1, Plasenta.**

SUMMARY

Effect of P-glycoprotein gene polymorphism on placental arsenic level.

In this study, the effect of common (frequently seen), silent C1236T MDR1 gene polymorphism on passing/ transition of toxic metal arsenic through the placenta is aimed to be determined.

In our study, arsenic concentrations in the placenta samples of 112 volunteer mothers who gave birth was measured by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometer (GFAAS). MDR1 C1236T genetic polymorphism analysis was performed using PCR-RFLP and whether there is a relationship between them or not was statistically evaluated.

Although a statistically significant correlation was not found /determined between C1236T MDR1 gene polymorphism and arsenic levels in the placenta of the individuals who participated in our study ($p>0,05$); in terms of gene polymorphism, the amount of arsenic in placenta of the individuals with typical homozygous (CC), was found lower than the amount of arsenic in placenta of the individuals with heterozygous (CT) and homozygous atypical (TT).

Consequently, C1236T MDR1 gene polymorphism was observed to affect the passage/transition of arsenic into placenta. Considering arsenic exposure, it was reached that the babies of individuals with typical homozygous (CC) are observed to be more advantageous against exposure, in other words, the babies of atypical homozygous (TT) individuals are found to be more risky against exposure.

Besides, a statistically significant relationship was not detected between mother' smoking and arsenic level of placenta ($p>0,05$), but the arsenic levels in the placenta of smoking mothers was found to be higher than those of nonsmokers. According to these results, the babies of mothers who smoke was found to be more risky in terms of arsenic exposure.

Key words: Arsenic, Atomic Absorbtion spectroscopy, Gene polymorphism, MDR1, Placenta.

KAYNAKLAR

- ABERNATHY, C. (2001). United Nations synthesis report on arsenic in drinking water. Geneva: World Health Organization, Chapter 3: *Exposure and health effects*.
- ALEXANDROVA, R. (1998). Multidrug Resistance and P-glycoprotein. *Experimental pathology and parasitology*; **1**: 62-66.
- APOSHIAN, H.V. (1993). Enzymatic Methylation Of Arsenic Specie And Other Approaches To Arsenic Toxicity. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*; **37**: 397-419.
- ATKINSON, D.E., GREENWOOD, S.L., SIBLEY, C.P., GLAZIER, J.D., FAIRBAIRN, L.J. (2003). Role of MDR1 and MRP1 in trophoblast cells, elucidated using retroviral gene transfer. *Am J Physiol Cell Physiol*; **285(3)**: 584-91.
- ATSDR, (2000). Toxicological Profile for Arsenic. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; **2001**: 244-246.
- ATSDR, (2007b). Toxguide for Arsenic. Eriřim: (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxguides/2.pdf>)
- AUDUS, K.L. (1999). Controlling drug delivery across the placenta. *Eur J Pharm Sci*; **8(3)**: 161-5.
- BAGLAN, R.J., BRILL, A.B., SCHULERT, A., WILSON, D., LARSEN, K., DYER, N. (1974). Utility Of Placental Tissue As An İndicator Of trace Element Exposure To Adult And Fetus. *Environ Res*; **8**: 64-70.
- BEBEK, N., ÇINE, N., ÖNER, G.Ö., EŐKAZAN, E., ÖZBEK, U. (2005). Genotype and allele frequencies of MDR1 C3435>T polymorphism in Turkish population.
- BENIRSCHKE, K., KAUFMANN, P., BAERGEN, R.N. (2006). Pathology of the Human Placenta, 5th ed. *Springer*.

- BISSEN, M., FRIMMEL, F.H. (2003). Oxidation of arsenic and its removal in water treatment. Arsenic—a review: part II. *Acta Hydrochim Hydrobiol*; **31**: 97–107.
- BUCHET, J., PAUWELS, R. (1994). Assessment Of Exposure To Inorganic Arsenic Following Ingestion Of Marine Organisms By Volunteers. *Environ.Res.*; **66**: 44-51.
- BUTLER, J.M. (2005). Forensic DNA typing. Biology Technology and Genetics of STR Markers. USA: *Elsevier Press*, p.: 33-84.
- CASCORBI, I., GERLOFF, T., JOHNE, A. (2001). Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther.*; **69**: 169-74.
- CHEN, C.J., WU, M.M., LEE, S.S., WANG, J.D., CHENG, S.H., WU, H.Y. (1988). Arterogenicity and carcinogenicity of high-arsenic artesian well water. *Arteriosclerosis*; **8(5)**: 452-460
- CHEVILLE, N.F. (1983). Cell pathology. The Iowa State University, Ames, Iowa, USA.
- CHOU, H.S.J., ROSA, C.T.D. (2003). Case studies arsenic. *J. Hyg. Env. Health.*; **206**: 381–386.
- CHOWDHURY, U.K., RAHMAN, M.M., PAUL, K., BISWAS, B.K., BASU, G., CHANDA, C.R., SAHA, K.C., LODH, D., ROY, S., QUAMRUZZAMAN, M., & CHAKRABORTY, D. (2001). Groundwater arsenic contamination in West Bengal India and Bangladesh: case study on bioavailability of geogenic arsenic.
- DAVEY, J.C., NOMIKOS, A.P., WUNJIRANIRUN, M., SHERMAN, J.R., INGRAM, L., BATKI, C., LARIVIERE, J.P., HAMILTON, J.W. (2008). Arsenic as an endocrine disruptor: arsenic disrupts retinoic acid receptor- and thyroid hormone receptor-mediated gene regulation and thyroid hormone-mediated amphibian tail metamorphosis. *Environ. Health perspect.*; **116**: 165-172.

- EDULJEE, G., BADSHA, K., PRICE, L. (1985). Environmental monitoring and heavy metals in the vicinity of a chemical waste disposal facility 1. *Chemosphere*; **14(9)**: 1371-1382.
- ENGLUND G, JACOBSON A, RORSMAN F. (2007). Efflux transporters in ulcerative colitis: decreased expression of BCRP (ABCG2) and Pgp (ABCB1). *Inflamm. Bowel Dis.*; **13**: 291-7.
- EMIR, F., ÖZDEN, A. (2006). Genetik polimorfizm ve polimorfizm çalışmaları. *Güncel Gastroenteroloji*; **10(1)**: 24-28.
- EPA (2001). Risk Assessment Guidance for Superfund (RAGS) Volume I: Human Health Evaluation Manual (Part E, Supplemental Guidance for Dermal Risk Assessment, Interim) (Draft). EPA/540/R.99/005.
- FROMM, M.F. (2002). The influence of MDR1 polymorphisms on p-glycoprotein expression and function in humans. *Advanced Drug Delivery reviews*; **54**: 1295-1310
- GANAPATHY, V., PRASAD, P.D., GANAPATHY, M.E., LEIBACH, F.H. (2000). Placental transporters relevant to drug distribution across the maternal-fetal interface. *J.Pharmacol Exp Ther*; **294(2)**: 413-20.
- GARCIA-BOURNISSEN, F., FEIG, D.S., KOREN, G. (2003). Maternal-fetal transport of hypoglycaemic drugs. *Clin Pharmacokinet*; **42(4)**: 303-13.
- GARTNER, L.P., HIATT, J.L. (1997). W.B. Saunders Company, Philadelphia. *Color Textbook of Histology*.
- GONZALEZ, M.J., AGUILAR, M.V., MARTINEZ, M.C. (1997). Mechanisms Of Absorption Of As₂O₅ From Rat Small Intestine: The Effect Of Different Parameters. *J Trace Elem Med Bio.*; **11**: 239-47.

- GONZALEZ, F.J. (1999). Polymorphisms in xenobiotic metabolism. In Molecular and Applied Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes. *Life Sciences Pharmacogenetics*; **303**: 91-110.
- GOTO, M., MASUDA, S., SAITO, H.(2002). C3435T polymorphism in the MDR1 gene affects the enterocyte expression level of CYP3A4 rather than Pgp in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics*; **12**: 451-7.
- GÜMÜŞ AKAY, G., RÜSTEMOĞLU, A., KARADAĞ, A. (2008). Genotype and allele frequencies of MDR1 gene C1236T polymorphism in a Turkish population. *Genet Mol Res.*; **7**: 1193-9.
- HAN, B., JENG, W.L., CHEN, R.Y. (1998). Estimation Of Target Hazard Quotients And Potential Health Risks For Metals By Consumption Of Seafood In Taiwan. *Arch Environ Contam Toxicol*; **35**: 711–20.
- HEMAUER S.J., NANOVSKEYA T.N., ABDEL-RAHMAN S.Z. (2010). Modulation of human placental P-glycoprotein expression and activity by MDR1 gene polymorphisms. *Biochem. Pharmacol*; **79**: 921-5.
- HUEBNER, C., BROWNING, B.L, PETERMANN, I. (2009). Genetic analysis of MDR1 and inflammatory bowel disease reveals protective effect of heterozygous variants for ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.*; **15**: 1784-93.
- ILLMER, T., SCHULER, U.S., THIEDE, C. (2002). MDR1 Gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Res*; **62**: 4955-62.
- JAMROZIAK, K., BALCERCZAK, E., CALKA, K. (2009). Polymorphisms and haplotypes in the multidrug resistance 1 gene (MDR1/ABCB1) and risk of multiple myeloma. *Leuk Res.*; **33**: 332-5.

- JEANNESSON, E., SIEST, G., BASTIEN, B. (2009). Association of ABCB1 gene polymorphisms with plasma lipid and apolipoprotein concentrations in the Stanislas cohort. *Clin Chim Acta.*; **403**: 198-202.
- JUYAL G., MIDHA V., AMRE D. (2009). Associations between common variants in the MDR1 (ABCB1) gene and ulcerative colitis among North Indians. *Pharmacogenet Genomics*; **19**: 77-85.
- KAMATH, S.U., PEMIAH, B., SEKAR, R.K., KRISHNASWAMY, S., SETHURAMAN, S., KRISHNAN, U.M. (2012). Mercurybased traditional herbo-metallic preparations: a toxicological perspective. *Arch Toxicol.*; doi:10.1007/s00204-012-0826-2
- KARTNER, N., RIORDAN, J.R., LING, V. (1983). Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science*; **221**: 1285–1288.
- KAYA, P., GÜNDÜZ, U., ARPACI, F., URAL, A.U. , GURAN, S. (2005). Identification of Polymorphisms on the MDR 1 gene among Turkish population and thier effects on multidrug resistance in acute leukemia patients. *American Journal of Hematology*; **80**: 26 – 34.
- KAZI, T.G., BAIG, J.A., SHAH, A.Q., KANDHRO, G.A., KHAN, S., AFRIDI, H.I., KOLACHI, N.F., WADHWA, S.K., SHAH, F., BAIG, A.M. (2011). Determination of arsenic in scalp hair samples from exposed subjects using microwave assisted digestion with and without enrichment based on cloud point extraction by electrothermal atomic absorption spectrometry. *JAOAC Int.*; **94 (1)**: 293–299.
- KIMCHI- SARFATY, C., OH, J. M., KIM, I. W. (2007). A "Silent" Polymorphism In The Mdr1 Gene Changes Substrate Specificity. *Science*; **315 (5811)**: 525-528.

- KIMCHI- SARFATY, C., MARPLE, A.H., SHINAR, S., KIMCHI, A.M. (2007b). Ethnicity-related polymorphisms and haplotypes in the human ABCB1 gene. *Pharmacogenomics*; **8**: 29-39.
- KOMAR, A.A. (2007a). Silent SNPs: impact on gene function and phenotype. *Pharmacogenomics*; **8**: 1075-1080.
- KOMAR, A.A. (2007b). Genetics. SNPs, silent but not invisible. *Science*; **315**: 466-467.
- KLASSEN C.D., AMDUR, M.O., DOULL, J. (1986). Toxicology. 3th Ed. Macmillan Publishing Company, Newyork, USA.
- KUBISTA, M., ANDRADE, J.M., BENGTSSON, M., FOROOTAN, A., JONAK, J., LIND, K., SINDELKAI, R., SJÖBACK, R., SJÖGREENJ, B., STRÖMBOM, L., STAHLBERG, A., ZORIC, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.*; **27(2-3)**: 95-125.
- LEE, W., LOCHART, C., RICHARD, B. (2005). Cancer pharmacogenomics: Powerful tools in cancer chemotherapy and drug development. *The Oncologist*; **10**: 104-111.
- MARZOLINI, C., PAUS, E., BUCLIN, T., KIM, R.B. (2004). Polymorphisms in human MDR1 (P- glycoprotein): Recent advances and clinical relevance *Clin. Pharmacol Therapeutics*; **75(1)**: 13-33
- MAZUMDER, D.N., DAS GUPTA, J., CHAKRABORTYAK CHATTERJEE A. (1992). Environmental pollution and chronic arsenicosis in SouthCalcutta. *Bull. WHO*; **70(4)**: 481-485.
- MERTZ, W. (1986). Trace elements in human and animal nutrition. 5th Ed. Vol. II. *Academic press, Inc, USA*.
- MOLSA, M., HEIKKINEN, T., HAKKOLA, J. (2005). Functional role of P-glycoprotein in the human blood-placental barrier. *Clin Pharmacol Ther.*; **78**: 123-131.

- MURRAY, N.E. (2000). Type I Restriction Systems: Sophisticated Molecular Machines (a Legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*; 64: 412-434.
- NAKAMURA, Y., IKEDA, S., FURUKAWA, T., SUMIZAWA, T., TANI, A., AKIYAMA, S. (1997). Function of P-glycoprotein expressed in placenta and mole. *Biochem. Biophys Res Commun*; **235(3)**: 849–53.
- NRC (National Research Council), (2001). Arsenic in Drinking Water: Update, National Academy Press, Washington, DC.
- OSMAN, K., VAHTER, M. (2000). Toxic and Essential Elements In Placentas Of Swedish Women. *Clin Biochem.*; **33(2)**: 131-8.
- OSUGA, T., SAKAEDA, T., NAKAMURA, T. (2006). MDR1 C3435T polymorphism is predictive of later onset of ulcerative colitis in Japanese. *Biol. Pharm. Bull.*; **29**: 324-9.
- PACIFICI, G.M., NOTTOLI, R. (1995). Placental transfer of drugs administered to the mother. *Clin Pharmacokinet*; **28(3)**: 235–69.
- PECHANDOVA, K., BUZKOVA, H., SLANAR, O. (2006). Polymorphisms of the MDR1 gene in the Czech Population. *Folia Biol. (Praha)*; **52**: 184-9.
- PLANT, J.A., KINNIBURGH, D.G., SMEDLEY, P.L., FORDYCE, F.M., KLINCK, B.A . (2005). Arsenic and selenium. In: Lollar BS (ed) Treatise on geochemistry, Elsevier, London, *Environmental geochemistry*; **9**: 17–66
- RUSSEL, F.G., PEEREBOOM- STEGEMAN, J.H., NOORDHOEK, J., GRIBNAU, F.W., VAN DER, A.A. (1998). Mechanisms of drug transfer across the human placenta. *Pharm World Sci.*; **20(4)**: 139–48.
- SADLER, T.W. (1995). Seventh ed. Williams & Wilkins Baltimore. *Langman's Medical Embryology*

- SAKAEDA, T. (2005). MDR1 genotype-related pharmacogenetics: Fact or fiction? *Drug Metab.Pharmacokinet*; **20**: 391-414.
- SAKAEDA, T. , NAKAMURA, T. , OKUMURA, K. (2002). MDR 1 Genotype – Related Pharmacokinetics an Pharmacodynamics . *Biol. Pharm. Bull.*; **25(11)**: 1391-1400
- SAUNA, Z.E., KIMCHI- SARFATY, C., AMBUDKAR, S.V., GOTTESMAN, M.M., (2007). Silent polymorphisms speak: how they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer. *Cancer Res.*; **67**: 9609-9612.
- SCHINKEL, A.H. (1997). The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin. Cancer Biol.*; **8**: 161-170.
- SCHINKEL, A.H., JONKER, J.W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev.*; **55**: 3-29.
- SCHWAB, E.M., FROMM, M.F. (2003). Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; **43**: 285-307.
- SHIVERICK, K.T., SLIKKER, J.R.W., ROGERSON, S.J., MILLER, R.K. (2003). Drugs and the placenta—a workshop report. *Placenta*; **24(A)**: 55–9.
- SILVER, S., MISRA, T.K. (1984). Bacterial Transformations Of and Resistances To Heavy Metals. *Basic Life Sci.*; **28**: 23–46.
- SIPEKY, C., CSONGEI, V., JAROMI, L., SAFRANY, E., MAASZ, A., TAKACS, I., BERES, J., FODOR, L., SZABO, M., MELEGH B. (2011). Genetic variability and haplotype profile of MDR1 (ABCB1) in Roma and Hungarian population samples with a review of the literature. *Drug Metab Pharmacokinet*; **26**: 206–215

- STRACHAN, T., READ, A.P. (1999). *Human Molecular Genetics 2*, 2nd Edition, Bios.Scientific Publishers, Ltd., Oxford, UK.
- TANG, K., NGOÍ, S.M., GWEE, P.C. (2002). Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations. *Pharmacogenetic*; **12**: 437-450.
- TUNÇOK, Y. (2008). İçme Suyunda Ağır Metaller ve İnsan Sağlığına Etkileri. DEÜTF Farmakoloji Anabilim Dalı Klinik Toksikoloji B.D. ilaç ve Zehir Danışma Merkezi, İzmir. http://izmir.kalder.org/Yesim_Tuncok.pdf.
- VAHTER, M. (1999). Methylation of inorganic arsenic in different mammalian species and population groups. *Sci. Prog.*; **82**: 69–88.
- VAHTER, M. (2009). Effects of arsenic on maternal and fetal health. *Annu Rev.Nutr.*; **29**: 381-99.
- VURAL, H. (1993). Ağır metal iyonlarının gıdalarda oluşturduğu kirlilikler. *Çevre Dergisi*; **8**: 3-8.
- WAALKES, M., LIU, J., DIWAN, B. (2007). Transplacental arsenic carcinogenesis in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; **222**: 271–80.
- WANG, S., MULLIGAN, C.N. (2006). Occurrence of arsenic contamination in Canada: Sources, Behaviour and Distribution. *Sci. Tot. Env.*; **366**: 701721.
- WHO (1990). Arsenic. Environmental Health Criteria. 18. World Health Organization, Geneva, **p**: 1–174.
- WILLIAMS, S.J., HAYWARD, N.K. (2001). The impact of the human genome project on medical genetics. *Trends in Molecular Medicine*; **7(5)**: 187-231.

YUKSEL, B., MERGEN, G., SOYLEMEZOGLU, T. (2009). Assessment of arsenic levels in hair samples of residents in Ankara. *Toxicol lett.*; **189**: 222

YÜCER, M.M. (2008). Ruhsatlı Tarım İlaçları. İstanbul, *Hasat Yayıncılık*, s.: 355.

**KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KURULU
DEĞERLENDİRME FORMU**

DEĞERLENDİRME KURULUNUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Değerlendirme Kurulu
AÇIK ADRES	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/Ankara
TELEFON	0312 310 30 10/227
FAKS	0312 310 63 70
E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BASVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Metallerin toksikokinetiğinde rol oynayan enzim ve proteinlerin gen polimorfizminin anne biyolojik örnekleri, plasenta ve kordon kanında metal düzeylerine etkisi		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU			
	EUDRACT NUMARASI			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Tülin Söylemezoğlu		
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Toksikoloji		
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI			
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü		
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ			
	BASVURULAN DEĞERLENDİRME KOMİSYONUNUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Değerlendirme Kurulu		
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ			
UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/>	AKADEMİK AMAÇLI <input checked="" type="checkbox"/>		
ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
	FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
	FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
	FAZ 4	<input type="checkbox"/>		
	BE/BY	<input type="checkbox"/>		
	DiĞER	<input type="checkbox"/>	Diğer ise belirtiniz:	
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA	<input type="checkbox"/>	Belirtiniz:	
	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŐURÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	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"/>

DEĞERLENDİRİLEN DiĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama
		ARAŞTIRMA BÜTÇESİ
	SİĞORTA	<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"/>
	DiĞER	<input type="checkbox"/>

Hasan TUNA
A. Ü. Tıp Fakültesi
İdari Personel Bürosu Şefi

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:33-730	Tarih: 11 Temmuz 2011
	Prof.Dr.Tülin Söylemezoğlu'nun sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler; araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri ile bilgilendirilmiş gönüllü olur formu dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.	

DEĞERLENDİRME KURULU BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
DEĞERLENDİRME KURULU BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof.Dr.Mehmet MELLİ	
DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Katılım **		İmza
Prof.Dr.Mehmet Mellî	Tıbbi Farmakoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	M. Mellî
Prof.Dr.Cihan Yurdaydın	Gastroenteroloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ahmet Demirkazık	Tıbbi Onkoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Tanju Özçelikay	Eczacı-Farmakolog	Ankara Üniv. Ecz. Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Cem Atbaşoğlu	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Hakan Uncu	Genel Cerrahi	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLI
Prof.Dr.Nuhan Puralı	Biyofizik	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	YURTDIŞINDA
Prof.Dr.H.Serdar Öztürk	Tıbbi Biyokimya	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLI
Prof.Dr.H.Serap Sivri	Çocuk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Muhammed Özen	Avukat-Öğr.Üyesi	Ankara Üniv. Hukuk Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	TOPLANTIDA
Prof.Dr.Barın Çakır	Halk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Öğr.Gör.Dr. Volkan Kavas	Deontoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Gülsüm Aslan	Sağlık Mes. Dışı- Emekli	-----	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

Hasan TUNA
A.Ü. Tıp Fakültesi
İdari Personel Bürosu Şefi

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Derya

Soyadı: DOĞAN

Doğum Tarihi ve Yeri: 1980, UŞAK

Uyruğu: T.C.

Medeni Durumu: Evli

İletişim Adresi ve Telefonu: Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Hastanesi

Nükleer Tıp Bölümü, Demetevler, Yenimahalle/ANKARA

Tel:0(505) 757 5007

II- Eğitimi

1997 – 2003 Hacettepe Üniversitesi, Fen Fak., Biyoloji Bölümü (Lisans)

1994 – 1997 Fatih Fen Lisesi -ESKİŞEHİR

1991 – 1994 Besim Atalay Ortaokulu-UŞAK

1986 – 1991 Gazi Mustafa Kemal İlkokulu-UŞAK

Yabancı Dili: İngilizce

III- Mesleki Deneyimi

2011- Biyolog. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Hastanesi ANKARA