



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**ARSENİĞE MARUZ KALAN BİREYLERDE LENFOSİT
DNA HASARININ XRCC1 VE XRCC3 GEN
POLİMORFİZMLERİ İLE İLİŞKİSİ**

Esmâ SÖYLEMEZ

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Zeliha KAYAALTI**

2014-1 YILI

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ARSENİĞE MARUZ KALAN BİREYLERDE LENFOSİT
DNA HASARININ XRCC1 VE XRCC3 GEN
POLİMORFİZMLERİ İLE İLİŞKİSİ**

Esmâ SÖYLEMEZ

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Zeliha KAYAALTI**

2014-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı
Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Doktora Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

02.06.2014

Jüri Başkanı
Prof. Dr. İ.Hamit HANCI
Ank.Ü. Tıp Fakültesi



Üye
Prof. Dr. Ahmet SAYAL
G.AT.A.



Üye
Prof. Dr. Sinan SÜZEN
Ank.Ü. Eczacılık Fakültesi



Üye
Prof. Dr. Yalçın ÖZKAN
G.AT.A.



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

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÖNSÖZ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	xii
ÇİZELGELER	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Arsenik	1
1.1.1. Tarihçe	2
1.1.2. Bileşikleri	5
1.1.2.1. Arsenik Bileşiklerinin Organik ve İnorganik Formları	6
1.1.3. Kullanım Alanları	7
1.1.4. Kaynaklar	7
1.1.4.1. Doğal Kaynaklar	8
1.1.4.2. Antropojenik Kaynaklar	9
1.1.5. Maruziyet	10
1.1.6. Arsenik Maruziyeti ve Kanser	13
1.1.7. Absorbsiyon	16
1.1.8. Metabolizma	16
1.1.9. Atılım	17
1.1.9. Toksisitesi	18
1.1.10. Akut Arsenik Zehirlenmesi	19
1.1.11. Kronik Arsenik Zehirlenmesi	19
1.1.12. Zehirlenme Tedavisi	20
1.2. DNA	20

1.2.1. DNA ve Yapısı	20
1.2.2. DNA Hasarı	22
1.2.3. DNA Hasarına Neden Olan Etkenler	23
1.2.4. DNA Onarım Mekanizmaları ve Önemi	24
1.2.4.1. Hasarın Doğrudan Onarımı	26
1.2.4.2. Eksizyon Onarımı	27
1.2.4.2.1. Baz Eksizyon Onarımı	27
1.2.4.2.2. Nükleotid Eksizyon Onarımı	29
1.2.4.3. Yanlış Eşleşme Eksizyon Onarım Mekanizması(MismatchRepair)	31
1.2.4.4. Rekombinasyon Onarımı	32
1.2.4.5. SOS (Transdimer Sentezi) Onarımı	32
1.2.4.6. DNA Çift-Zincir Kırığı Onarımı	32
1.3. Dna Hasarının Belirlenmesi	34
1.3.1. Comet Assay	34
1.3.1.2. Tarihçesi	35
1.3.1.3. Comet Assay Basamakları	37
1.3.1.3.1. Mikroskop Lamının Hazırlanması	38
1.3.1.3.2. Hücresel Materyalin Hazırlanması	39
1.3.1.3.3. Yayma	39
1.3.1.3.4. Lizis	39
1.3.1.3.5. Alkali ortamda DNA Süperkoil Yapısının Açılması	40
1.3.1.3.6. Elektroforez	40
1.3.1.3.7. Nötralizasyon	40
1.3.1.3.8. Fiksasyon	40
1.3.1.3.9. DNA'nın Boyanması ve “Comet” lerin Görüntülenmesi	40

1.3.1.3.10. Comet Sayımı ve DNA Hasarının Belirlenmesi	41
1.3.1.4. Comet Tekniğini Etkileyen Faktörler	42
1.3.1.5. Comet Tekniğinin Avantajları	42
1.3.1.6. Comet Assay Kullanım Alanları	43
1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	44
1.4.1. DNA Zincirinin Açılması (Denaturation):	44
1.4.2. Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması (Annealing)	44
1.4.3. Primer Uzaması (PrimerExtesion)	45
1.4.4. Agaroz Jel elektroforezi	48
1.4.5. PCR'ın Temel Bileşenleri	49
1.5. RFLP (Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi: Restriction Fragment Length Polymorphism) Yöntem	49
1.6. XRCC1 (X-ray repaircross-complemeting gen 1)	50
1.7. XRCC3 Geni (X-Ray Repair Cross-Complementing Gene 3)	53
1.8. Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi	54
1.8.1. Grafit Fırınlı Atomik Absorbsiyon Spektrometrisi	56
2.GEREÇ VE YÖNTEM	
2.1. Gereçler	57
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	57
2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	58
2.1.3. Çözeltiler	60
2.1.3.1. PBS Çözeltisi	60
2.1.3.2. Lizing Çözeltisi	60
2.1.3.3. Elektroforez Çözeltisi	61
2.1.3.4. Nötralizasyon Çözeltisi	61
2.1.3.5. Etidium Bromür Çözeltisi	61

2.1.3.6. Düşük Erime Noktalı Agar (LMA)	61
2.1.3.7. Normal Erime Noktalı Agar (NMA)	61
2.1.4. Deney Protokolü	62
2.1.4. 1. Sıvı Kan Örneklerinin Toplanması	62
2.1.5. Yöntem	62
2.1.5.1. CometAssay ile Lenfosit DNA Hasarının Belirlenmesi	62
2.1.5.1.1. Lenfosit izolasyonu	63
2.1.5.1.2. Preparatların Hazırlanması	64
2.1.5.1.3. Lamaların Jelle Kaplanması	64
2.1.5.1.4. Lizis	64
2.1.5.1.5. Elektroforez	65
2.1.5.1.6. Nötralizasyon	65
2.1.5.1.7. Fiksasyon	65
2.1.5.1.8. Boyama	65
2.1.5.1.9. Görüntüleme	66
2.1.5.1.10. Sayım ve Hesaplama	66
2.1.5.2. XRCC1 (Arg399Gln) ve XRCC3 (Thr241Met) Genotiplerinin Belirlenmesi	67
2.1.5.2.1. Sıvı Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu	67
2.1.5.2.2. Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi	68
2.1.5.2.3. %0.5'lik Agaroz Jel Hazırlanması	68
2.1.5.2.4. Agaroz Jele Yükleme İçin Örnek Hazırlanması ve Yürütme Koşulları	69
2.1.5.2.5. PCR	70
2.1.5.2.6. Primer Listesi	70
2.1.5.2.7. PCR Bileşenleri ve PCR Programı	71

2.1.5.2.8. PCR Ürünlerinin Jele Uygulanması ve Elektroforez	75
2.1.5.2.9. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi (RFLP)	75
2.1.5.2.10. Kullanılan Kesim Koşulları	75
2.1.5.2.11. Kesim Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezine Uygulanması ve Genotip Tayini	77
2.1.5.3. Örneklerin Arsenik Analiz İşlemleri	77
2.1.5.3.1. Örneklerin Analize Hazırlanması	77
2.1.5.3.2. Örneklerdeki Arsenik Düzeyinin Belirlenmesi	78
3.BULGULAR	
3.1. Ölçülen Parametrelerin Tanımlayıcı İstatistikleri	83
3.2. Comet Parametreleri ve Kan Arsenik Düzeyleri Arasındaki Korelasyon	84
3.3. Sigara İçimi, Kan Arsenik Düzeyi ve DNA Hasarı Arasındaki İlişki	85
3.4. Arseniğe Maruz Kalan Bireylerde XRCC1 Arg399Gln (G→A) Polimorfizm Analiz Sonuçları	89
3.5. Arseniğe Maruz Kalan Bireylerde Comet Yöntemi Sonuçları ile XRCC1 Arg399Gln Polimorfizm Sonuçlarının Karşılaştırılması	93
3.6. Arseniğe Maruz Kalan Bireylerde XRCC3 Thr241Met (C→T) Polimorfizm Analiz Sonuçları	97
3.7. Arseniğe Maruz Kalan Bireylerde Comet Yöntemi Sonuçları ile XRCC3 Thr241Met Polimorfizm Sonuçlarının Karşılaştırılması	101
3.8. Homozigot Tipik Bireyler İle HomozigotAtipik Bireylerin Kan Arsenik Düzeyi ve Comet Parametreleri Arasındaki İlişki	105
4. TARTIŞMA	109
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	117
ÖZET	120
SUMMARY	121
KAYNAKLAR	122
EKLER	148
ÖZGEÇMİŞ	150

ÖNSÖZ

DNA onarım enzimlerinin gen varyantları ile DNA hasarı arasındaki ilişkinin araştırılması metal toksisite mekanizmalarının aydınlatılması yönünden önem taşımaktadır. Bu çalışma, ülkemizde yaşayan bireylerin ve metalle ilgili işyerlerinde çalışanların arseniğe maruz kaldıklarında görülebilecek genetik hasarların, toplumumuz bireylerindeki genetik polimorfizmlerle ilişkisinin belirlenmesi ve bireysel duyarlıkların saptanması amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesine başvuran 25-65 yaş arası 175 işçi çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen bireylerin periferik lenfosit DNA hasarı, alkali comet yöntemi ile kan As düzeyi Grafit Fırınli Atomik Absorbsiyon Spektroskopisiyle belirlenmiş olup çalışmanın son bölümünde bireysel duyarlılıkla ilgili olarak X-ray repair cross complementing group 1 (XRCC1) Arg399Gln ve X-ray cross-complementing group 3 (XRCC3) Thr241Met gen polimorfizmleri PCR-RFLP tekniği ile analiz edilmiştir.

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca bana cesaret veren, yol gösteren, ilgisini ve desteğini benden esirgemeyen, anabilim dalının her türlü olanaklarını sunan değerli hocam, Ankara Üniversitesi Emekli Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Tülin SÖYLEMEZOĞLU'na,

Kendisiyle tanışmış olmaktan büyük onur duyduğum, hayatımın önemli dönüm noktalarından birini oluşturan, bilgisini, çalışma azmini ve sabrını örnek aldığım yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca beni yetiştiren, bana cesaret veren, yol gösteren, ilgisini ve desteğini benden hiç bir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam, Sayın Doç.Dr. Zeliha KAYAALTI'na,

Laboratuvar çalışmalarında yardımını, zamanını, desteğini esirgemeyen, sabrı ve anlayışı için arkadaşım Dr.Dilek KAYA AKYÜZLÜ'ye,

Tezim için gerekli olan biyolojik materyallerin toplanması aşamasındaki yardımlarından dolayı, Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesinden Sayın Dr. Engin TUTKUN'a,

Bu zorlu yolda her zaman yanımda olan sabırları, anlayış ve sonsuz destekleri için sevgili aileme,

Teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

As	Arsenik
AsV	Arsenat
As III	Arsenit
MMA	Metilasyonla Monometilarsonik Asit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DMA	Dimetil Arsinik Asit
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizm (Single Nucleotid Polymorphism)
A	Adenin
C	Sitozin
T	Timin
G	Guanin
U	Urasil
RNA	Ribonükleik asit
AP	Apürinidik/Apirimidinik
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
dNTP	Deoksiribonükleozidtrifosfat
RNA	Ribonükleik Asit
RFLP	Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
RE	Restriksiyon Endonükleaz
F primer	Forward Primer
R primer	Reverse Primer
Bp	Baz çifti (base pair)
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
BER	Baz Kesip-Çıkarma Onarımı (Base Excision Repair)
NER	Nükleotid Kesip-Çıkarma Onarımı (Nucleotide Excision Repair)

MMR	Yanlış Eşleşme Onarımı (Mismatched Repair)
XRCC1	X-ray Cross-complementing Group 1
XRCC3	X-ray Cross-complementing Group 3
GGR	Genel Genom Onarımı (Global Genome Repair)
TCR	Transkripsiyona Bağlı Onarım (Transcription Coupled Repair)
HR	Homolog Rekombinasyon (Homologous Recombination)
NHEJ	Serbest Uçların Homolog Olmayan Şekilde Bağlanması (Non-Homologous End-Joining)
SCGE	Tek Hücre Jel Elektrophorezi (Single Cell Gel Electrophoresis)
TI	Tail Intensity
CL	Comet Length
TL	Tail Length
WHO	World Health Organization
HMA	Yüksek Erime Noktalı Agar
PBS	Phosphate Buffer Saline
LMA	Düşük Erime Noktalı Agar
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TE	Tris-EDTA
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik asit
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
NaOH	Sodyumhidroksit
NaCl	Sodyum klorür
DMSO	Dimetil Sulfoxide
mM	Milimolar
M	Molarite
µl	Mikrolitre

g	Gram
$\mu\text{g/ml}$	Miligram/mililitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
AAS	Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi
ppb	Milyarda Bir Ölçütü
ppm	Milyonda Bir Ölçütü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Arsenikle zehirlenme cinayet vakalarında tarih boyunca kullanılmıştır	3
Şekil 1.2. Bazı arsenik bileşiklerinin kimyasal yapıları	6
Şekil 1.3. Doğada arsenik döngüsü	8
Şekil 1.4. İçme sularının arsenikle kontaminasyonu insan sağlığını tehdit etmesi	11
Şekil 1.5. Arseniğin sebep olduğu deri lezyonları	14
Şekil 1.6. Arsenik metabolizmasının şematik gösterimi	17
Şekil 1.7. Hücrede DNA'nın yapısı	21
Şekil 1.8. DNA Hasarı	22
Şekil 1.9. DNA tamir mekanizmaları ve yaşlanma ve kanser arasındaki ilişki.	25
Şekil 1.10. DNA'da hasar oluşturan ajanlar, hasar tipleri ve tamir mekanizmaları	26
Şekil 1.11. Pürin/Pirimidinbaz kayıpları sonucu AP bölgelerinin oluşumu.	28
Şekil 1.12. Baz kesip çıkarma onarımı (BER)	29
Şekil 1.13. Nükleotit kesip çıkarma onarımı (NER)	30
Şekil 1.14. NER mekanizmasında bozukluklar sonrası oluşan hastalıklar	31
Şekil 1.15. Replikasyon sonrası onarımı	33
Şekil 1.16. Serbest uçların homolog olmayan bağlanması (NHEJ)	34
Şekil 1.17. Comet Assay Basamakları	38
Şekil 1.18. Comet Assay Görsel Değerlendirme	41
Şekil 1.19. PCR programı	46
Şekil 1.20. PCR yöntemi: 1. Döngü	46
Şekil 1.21. PCR yöntemi: 2. Döngü	47
Şekil 1.22. PCR yöntemi: 3. Döngü	47
Şekil 1.23. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) basamakları	48
Şekil 1.24. XRCC1 geni	50
Şekil 1.25. XRCC1 proteinin yapısı	51

Şekil 1.26. XRCC1 proteini ve gen yapısı. a) XRCC1 etkileri ve BER etkileşim bileşenleri ile bölgeleri. b) genin yapısı ve sıklıkla çalışılan SNP'ler.	52
Şekil 1.27. XRCC3 geni	53
Şekil 1.28. XRCC3 protein yapısı	53
Şekil 1.29. Atomik absorpsiyon spektroskopisinin şematik gösterimi	55
Şekil 2.1. Comet Assay aşamaları	63
Şekil 2.2. Comet Görüntüsü	66
Şekil 2.3. BAB Bs Otomatik Analiz Sistemi	66
Şekil 2.4. Agaroze jel kuyucuklarına örneklerin yüklenmesi	69
Şekil 2.5. XRCC1 Arg399Gln genotipleme için PCR ile çoğaltılan 403 dizilimi, bp'lık baz XRCC1-F ve XRCC1-R primerleri ve tek nokta mutasyonu	74
Şekil 2.6. XRCC3 Thr241Met genotipleme için PCR ile çoğaltılan 456 dizilimi, bp'lık baz XRCC3-F ve XRCC3-R primerleri ve tek nokta mutasyonu	74
Şekil 2.7. Tam Kanda Arsenik Analizine Ait Örnek Kalibrasyon Grafiği	80
Şekil 2.8. Grafit Fırınlı Atomik Absorpsiyon Spektrometre Cihazında Arsenik Metalinin Analizi için Tam Kanda Uygulanan Metot	81
Şekil 3.1. DNA hasarı parametreleri (CL, TI, TL) ile arseniğe maruz kalan bireylerin sigara içimiacısından değerlendirilmesi. I-) sigara içen ve içmeyen bireyler ile CL; II-) sigara içen ve içmeyen bireyler ile TI; III-)sigara içen ve içmeyen bireyler ile TL; IV-) sigara içen ve içmeyen bireyler ile kan As düzeyi	87
Şekil 3.2. 403 bp'lık amplifikasyon ürününün MspI enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotid uzunlukları. (M=100 bp Ladder; 1= 403 bp'lık PCR ürünü; 2= Gln/Gln genotip: 403 bp; ve 3 ve 6 = Arg/Gln genotip: 133 bp, 270 bp, 403 bp; 4ve 5= Arg/Arg genotip: 133 bp, 270 bp).	89
Şekil 3.3. MspI restriksiyon enziminin tanıma bölgesi ve kesim ürünlerinin şematik gösterimi.	90
Şekil 3.4. Arseniğe maruz kalan bireylerde XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile CL, TI, TLcomet parametrelerinin değerlendirilmesi. I -) XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile CL; II-) XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile TI; III-) XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile TL; IV-) XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile kan As düzeyi	95

Şekil 3.5. 456 bp'lık amplifikasyon ürününün NlaIII enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotid uzunlukları. (M=100 bp Ladder; 7= 456 bp'lık PCR ürünü; 1,5 ve 6 = Thr/Met genotip: 105 bp, 141 bp, 210 bp, 315 bp; 2-3 = Thr/Thr genotip: 141 bp, 315 bp; 4=Met/Met genotip: 105 bp, 141 bp, 210 bp) 98

Şekil 3.6. NlaIII restriksiyon enziminin tanıma bölgesi ve kesim ürünlerinin şematik gösterimi. 99

Şekil 3.7. Arseniğe maruz kalan bireylerde XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile CL,TI, TL comet parametrelerinin değerlendirilmesi I-) XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile CL ; II-) XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile TI ; III-) XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile TL ; IV-) XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile kan As düzeyi 103

Şekil 3.8. Homozigot Tipik Bireyler İle HomozigotAtipik Bireylerin Kan Arsenik Düzeyi ve Comet Parametrelerinin değerlendirilmesi. I-) XRCCC1/XRCC3 ile CL; II-) XRCCC1/XRCC3 ile TI; III-) XRCCC1/XRCC3 ile TL; IV-) XRCCC1/XRCC3 ile kan As düzeyi 107

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Arseniğin genel özellikleri	1
Çizelge 1.2. Arsenik toksikolojisinde bazı tarihi olayların zaman çizelgesi	4
Çizelge 1.3. Arsenik bileşikleri	5
Çizelge 1.4. Arseniğin organik ve inorganik formları	7
Çizelge 1.5. Arsenik maruziyeti ve hastalıklarla ilişkisi	12
Çizelge 1.6. Dünyada arsenik maruziyeti	15
Çizelge 1.7. SCGE yöntemiyle farklı pH'larda tayin edilebilen DNA hasar tipleri	37
Çizelge 1.8. Standart bir PCR'da bulunması gereken bileşenler ve miktarları	49
Çizelge 2.1. Amplifikasyonda kullanılan XRCC1 primerleri ve özellikleri	71
Çizelge 2.2. Amplifikasyonda kullanılan XRCC3 primerleri ve özellikleri	71
Çizelge 2.3. PCR bileşenleri ile stoktaki ve reaksiyondaki konsantrasyonları	72
Çizelge 2.4. XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met genotipleme için PCR	73
Çizelge 2.5. Mikrodalga fırına ait tam kan yakma programı	77
Çizelge 2.6. Sıvı Kan Örneklerinden Arsenik Analizine ait Grafit Fırın Sıcaklık Programı.	79
Çizelge 3.1. Arseniğe maruz kalan bireylerden toplanan kan örneklerinde cometparametreleri, kan arsenik düzeyleri, bireylerin yaşlarının ve çalışma sürelerinin ortalama, standart sapma.	84
Çizelge 3.2. Comet parametreleri, kan As düzeyleri ve maruziyet süreleri arasındaki korelasyon.	85
Çizelge 3.3. Sigara içen ve sigara içmeyen bireylerde ortalama kan arsenik düzeyi ve DNA hasarının (TI, CL, TL) karşılaştırılması.	86
Çizelge 3.4. Arseniğe maruz kalan bireylerde XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile oluşan genotip ve alel frekansları.	91
Çizelge 3.5. Çalıştığımız populasyonun XRCC3 genotipinin Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti.	92
Çizelge 3.6. Arseniğe maruz kalan bireylerde XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile CL, TI, TL comet parametrelerinin istatistiksel değerler.	94

Çizelge 3.7. Arseniğe maruz kalan bireylerde XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile oluşan genotip ve alel frekansları.	100
Çizelge 3.8. Çalıştığımız populasyonun XRCC3 genotipinin Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti.	101
Çizelge 3.9. Arseniğe maruz kalan bireylerde XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile CL, TI, TL comet parametrelerinin istatistiksel değerleri.	102
Çizelge 3.10. Homozigot Tipik Bireyler İle Homozigot Atipik Bireylerin Kan Arsenik Düzeyi ve Comet Parametreleri Arasındaki İlişki.	106

1.GİRİŞ

1.1 Arsenik

Arsenik (As), toprakta, suda ve yiyeceklerde çok çeşitli kimyasal formlarda yaygın olarak bulunan, periyodik tablonun VA grubunda, atom numarası 33, atom ağırlığı 74,91 olan metaloid özellik gösteren bir elementtir. Arseniğin bazı özellikleri metallere benzemekle birlikte, element olarak genellikle ametaller olarak sınıflandırılır. Arseniğin genel özellikleri çizelge 1.1’de özetlenmiştir (Carapella, 1992).

Simge	As
Periyodik tabloda yeri	VA grubunda
Atom numarası	33
Kütle numarası	74.992
Erime Noktası (C)	817
Kaynama Noktası	613
Buharlaştırma Isısı:	7.75
Yoğunluk:	5.72gr/cm ³
Kaynaştırma (Füzyon) Isısı	6.62
Elektriksel iletkenlik	0.029
Özgül Isı Kapasitesi	0.082
Fiziksel hali	Katı
Renk	Gri
Koku	Kokusuz

Çizelge 1.1. Arseniğin genel özellikleri

1.1.1. Tarihçe

As, M.S. 1250 yılında Albertus Magnus tarafından izole edildiğinden beri tıp, elektronik, metalürji ve tarım gibi çeşitli alanlarda kullanılmıştır. Arsenik bileşiklerinin toksisitesi hakkında ilk bilgiler asya medeniyetlerine aittir. Özellikle arsenit sülfid (realgar) genellikle hem tedavi yönteminde hem de zehir olarak kullanılmıştır. Lewin (1929) ‘ e göre bu bilgi Helenik Akdeniz dünyasına Büyük İskender’in fetihleri sonrasında ulaştı. Daha sonra Avrupa tarihinde arsenik yakın zamana kadar ilaç ve cinayet amaçlı kullanılmaya devam etti. (Saad ve Hassanien, 2001; Herman 2012).

Orta çağda arsenik etkili bir cinayet ve intihar aracı olarak ün kazanmıştı. Arsenik, gücü ve gizliliği nedeniyle “zehirlerin kralı” ya da “kralların zehiri” olarak adlandırılmıştır. Ortaçağda ve rönesansta yönetici sınıf üyelerini değiştirmek amacıyla kullanılmış, Medici ve Borgia ailesi hasımlarını kökten yok etmek için bu zehri kullanmıştır (Michael ve ark., 2013; Hughes, ve ark. 2011; Cullen, 2008). Napolyon Bonapart da arsenik zehirlenmesiyle ölmüştür. 1821 Şubat’ında Napolyon’un sağlığı hızla bozulmaya başlamış, 5 Mayıs 1821 de kronik arsenik zehirlenmesinden ölmüştür (Kintz, 2007; Herman 2012). Daha sonra saçlarından yapılan analiz ile kanıtlanmıştır. Napolyon'un son günlerinde ışığa karşı aşırı hassasiyeti, saç dökülmesi, uykusuzluk ve sinir rahatsızlıkları araştırmaya göre imparatorun şarabına azar azar konan arseniğin etkileriydi.

1850’lerin ortalarına kadar arsenik çeşitli nedenlerle popüler bir zehir olmaya devam etti. Arsenik kolaylıkla kullanılabilirdi, arsenik trioksitin (As_2O_3) kokusuz, tatsız ve renksizdi. Bu yüzden yiyeceklerde ve içeceklerde fark edilmiyordu.



Şekil 1.1. Arsenikle zehirlenme cinayet vakalarında tarih boyunca kullanılmıştır (Bartrip, P., 1992).

1800’lü yıllarda As pigmentolarak kullanılmıştır (Paris yeşili ya da bakır aseto arsenit). Özellikle bu pigmentin, duvar kağıtlarında kullanımı bu zaman diliminde yaygın hastalık ve ölümlere yol açmıştır (Schindlin, 2005). As bileşikleri özellikle cilde, göze, solunum yollarına iritan etki gösterdiğinden savaş gazı olarak da I. Dünya Savaşında kullanılmıştır. Bunun yanı sıra inorganik arsenik 1800’lü yılların sonu ve 1900’lerin başında yiyeceklere koruyucu olarak katılmıştır (Bartrip, 1992; Yağmur ve Hancı, 2002; Sardaş, 2009).

Günümüzde bilinen en eski çevresel arsenik maruziyeti MÖ 3359 ve 3105 tarihleri arasında ölen “Ötzi” adında Troylean Neolitik bir mumyanın saç analiziyle bulgulanmıştır (Oeggel, 2009; Herman 2012).

Analitik toksikolojide zehirlenmenin kimyasal olarak tanımlanabilmesi ve diğer ilaçların da zehirlenme etkeni olarak kullanılması ile arsenikle zehirlenmeler azalmıştır (Yağmur ve Hancı, 2002; Sharma ve Sohn, 2009).

1786	Fowler solüsyonu %1 potasyum arsenit.
1836	Arsenik tespiti için Marsh testi geliştirildi.
1842	Çevrede dimetil arsenik asit tespit edildi.
1867	ABD’de insektisit amaçlı Paris yeşili kullanıldı.
1887	Hutchison arseniğin insanda deri karsinojeni olduğunu ileri sürdü.
1910	Salvarsan kemoteropik ajan olarak kullanıldı.
1940	İngiliz anti levizit merhemi geliştirdi.
1942	ABD’de içme sularında 50 µg /l geçici standart belirlendi.
1968	Tseng ve ark. Tayvanlılarda yaygın deri kanseri bulgularını yayınladılar.
1975	EPA içme sularında 50 µg /l standardı kabul etti.
1993	WHO içme sularındaki standardı 10 µg /l olarak belirledi.
1995	Dimetilarсенik asit 4 fare organlarında tümör promoter olduğu tespit edildi.
1998	Dimetilarсенik asit sıçan mesanesinde tam bir karsinojen olduğu belirlendi .
2000	FDA lösemi kemoterapisinde arsenik trioksidi onayladı.
2001	EPA ABD’de içme sularının standartını 10 µg /l düşürdü.
2001	İnorganik arsenik erişkin farelerde transplasental maruziyyette tam bir karsinojen.
2002	Arsenik metil transferaz sıçan karaciğer stoplazmasında izole edildi.
2010	İnorganik arsenik erişkin sıçanlarda yaşamları boyunca maruz kalmalarında tam bir karsinojen

Çizelge 1.2. Arsenik toksikolojisinde bazı tarihi olayların zaman çizelgesi (Hughes ve ark., 2011).

1.1.2. Bileşikleri

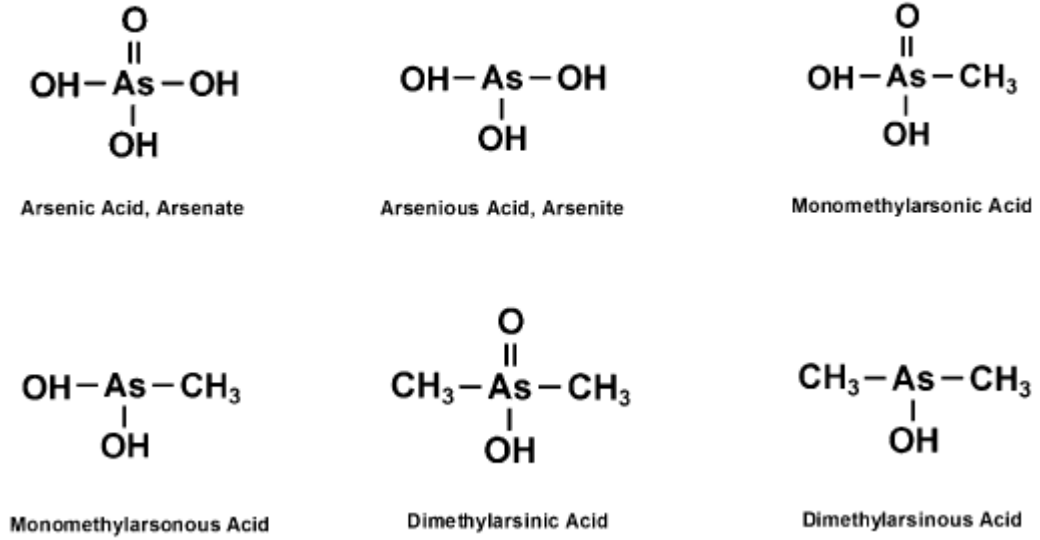
Arsenik; arsenat (AsV), arsenit (As III), Arsenik (0) ve arsin (-III) olarak 4 oksidasyon halinde bulunur (Çizelge 1.3). -3 ve 0 değerlikli arsenik doğada nadiren bulunur.

Trivalent oxidation state	Pentavalent oxidation state
Arsenite	Arsenate
Arsenic trioxide	Arsenic pentoxide
Monomethylarsonous acid	Monomethylarsonic acid
Dimethylarsinous acid	Dimethylarsinic acid
	Trimethylarsine oxide
	Arsanilic acid
	Arsenobetaine

Çizelge1.3.Arsenik bileşikleri (Hughes ve ark., 2011).

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. Toprakta arseniğin özellikle (+5) değerlikli bileşikleri bulunur (Bissen ve Frimmel, 2003).

As element halde toksik olmayıp bileşikleri önemli derecede toksik özellik göstermektedir. Bazı toksik As bileşikleri ve kimyasal yapıları şekil 1.2’ de verilmiştir.



Şekil 1.2. Bazı arsenik bileşiklerinin kimyasal yapıları (Hughes ve ark., 2011).

Arsenik, doğada başlıca sülfür filizleri halinde (FeAsS , As_2S_3 : orpiment, As_2S_2 : realgar gibi) bulunur. Sülfür filizlerinin kavrulmasından elde edilen As_2S_3 endüstride diğer arsenik bileşiklerinin çıkış maddesi olarak kullanılır (Sharma ve Sohn, 2009; Sardaş S., 2009; Basu ve ark., 2001; Watanabe ve Hirano, 2012).

1.1.2.1 Arsenik Bileşiklerinin Organik ve İnorganik Formları

Arsenik bileşikleri, inorganik formda 3 değerlikli meta arsenit ve 5 değerlikli arsenat şeklinde organik formda monometil ve dimetil türevleri şeklinde bulunabilirler (Rosmann, 2003). İnorganik formdan organik forma dönüşüm bir seri indirgenme, oksidasyon ve metilasyon basamakları ile gerçekleşmektedir (Bhattacharjee ve ark., 2013). Arseniğin organik ve inorganik formları çizelge 1.4'te verilmiştir.

İnorganik formları	Organik formları
Arsenik trioksit (Rodentisit)	Monometilarsonat
Sodyum arsenit (insektisit)	Dimetilarsinat (Herbisit)
Bakır aseto arsenit (insektisit)	Arsenobetain
Arsenik triklorür (insektisit)	Difenilklor Arsin (kimyasal savaş gazı)
Arsenik pentoksit	Betaklorvinilklor Arsin (lewisit) (kimyasal savaş gazı)
Arsenik asit	
Kurşun arsenat (insektisit)	
Potasyum asit arsenat (deri ve kâğıt endüstrisinde)	

Çizelge 1.4. Arseniğin organik ve inorganik formları (Hughes ve ark., 2011).

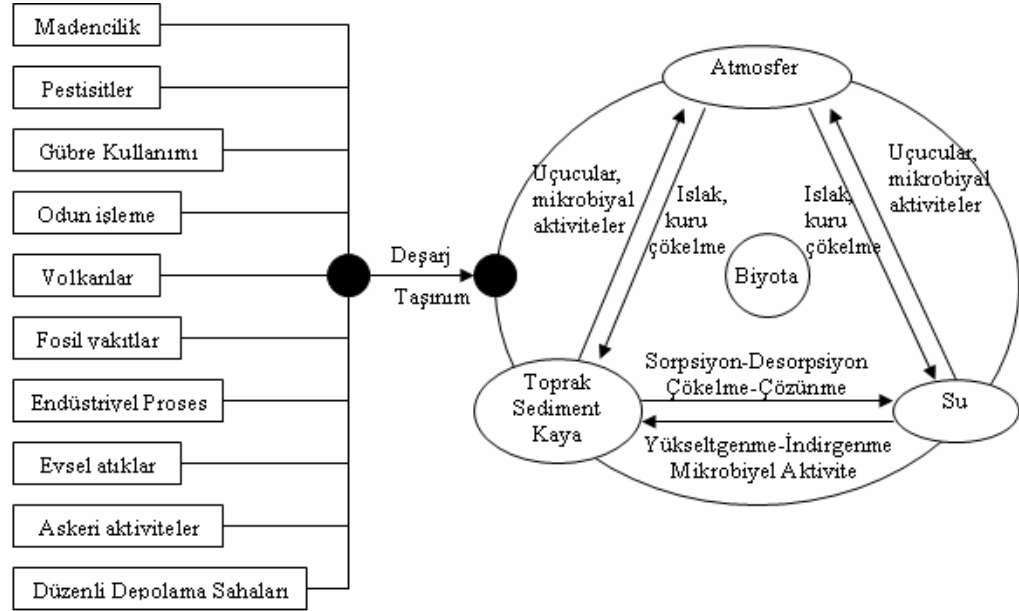
1.1.3. Kullanım Alanları

As bileşikleri tarımda pestisit amaçlı kullanılır. As_2O_3 rodendisit; bakır arsenit, Paris yeşili: bakır aseto arsenit, sodyum arsenit, kalsiyum arsenit gibi (+3) ve kurşun arsenat, sodyum arsenat, kalsiyum arsenat gibi (+5) değerlikli anorganik As bileşikleri insektisit olarak uygulanmaktadır. Kakodilatlar [dimetil arsinik asit tuzu: $[(CH_3)_2AsO]^{2-}$] herbisit olarak kullanılan organik As bileşikleridir. Sanayide alanında da kullanılmaktadır ve bunlar, potasyum asit arsenat (KH_2AsO_4 : Macquers tuzu) deri ve kâğıt endüstrisinde, seramik, cam, boya, cila, emaye, vernik ve lastik endüstrisinde de kullanılmaktadır (Vural N., 1996).

1.1.4. Kaynaklar

Arsenik yer kabuğunda 20., suda 14. ve insan vücudunda 12. sırada yer alan oluşumu, dağılımı, kaynakları ve toksisitesi üzerine birçok çalışma yapılan metaloid elementtir. Doğadaki oluşumu ve döngüsü şekil 1.3'te verilmiştir. Arseniğin çevreye başlıca yayılma ve taşınma yolu sulardır. Arseniğin su aracılığıyla ekolojik sistemde

dağılımı, canlı yapılarda birikimine neden olmaktadır. Arsenik doğada hem doğal hem antropojenik kaynaklı olarak bulunabilir (Wang ve Mulligan, 2006).



Şekil 1.3. Doğada arsenik döngüsü (Wang ve Mulligan, 2006).

1.1.4.1. Doğal Kaynaklar

Arsenik toprakta, bazı kaya türlerinde ve 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 çökeltiler yer alır. Ayrıca volkanik hareketler, kaya erozyonu ve orman yangınları da arseniğin doğal kaynakları arasındadır.

Arsenik, yaklaşık 245'ten fazla mineralin bileşiminde yer almaktadır. Bu mineraller genellikle sülfür, bakır, nikel, kurşun, kobalt ve diğer mineralleri içeren

madenlerdir. Doğada arseniğin en önemli kaynağı sülfür mineralleridir. As_2S_3 (orpigmen), AsS (realgar), $FeAsS$, $FeAs_2$, $NiAs$, $CoAsS$, $Cu_{12}As_4S_{13}$ ve Cu_3AsS_4 arseniğin en önemli mineral yataklarıdır (Bissen ve Frimmel, 2003).

Sülfür mineralleri dışında arseniğin diğer bir önemli kaynağı ise arsenik içeren demir oksitlerdir.

1.1.4.2. Antropojenik Kaynaklar

Arseniğin pek çok insan faktörlü kaynakları olmakla birlikte başlıcaları Metalurji endüstrisi, cam ve seramik endüstrisi, boya ve pestisit imalat endüstrisi, petrol rafinerileri, ilaç sanayi, herbisit sanayii, yarı iletken madde üretimi, dericilik, diğer organik ve inorganik kimyasal endüstrileri dir. 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.

Arsenik oluşumuna neden olan en önemli insan aktiviteleri arasında zararlı bitki ve böcekleri yok eden tarım ilaçlarının kullanımı ve madencilik faaliyetleri gelmektedir (Tchounwou ve ark., 2003; Bakar ve Baba, 2009; Bissen ve Frimmel, 2003;EPA, 2001).

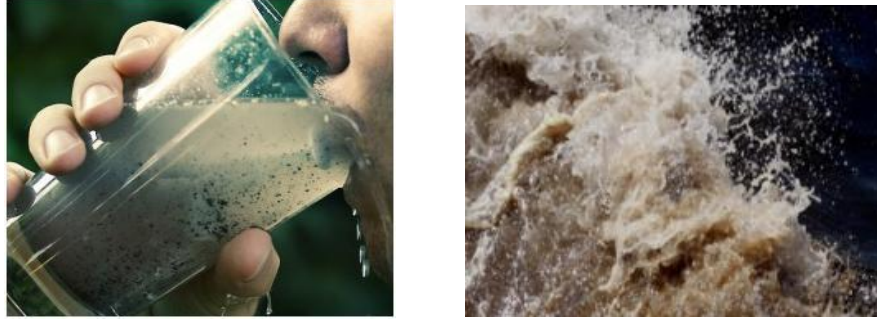
Dünyada en çok kullanılan arsenik içeren pestisitler arasında kurşun arsenat ($Pb_3(AsO_4)_2$), kalsiyum arsenat ($Ca_3(AsO_4)_2$), magnezyum arsenat ($Mg_3(AsO_4)_2$), çinko arsenat ($Zn_3(AsO_4)_2$) ve çinko arsenit ($Zn(AsO_2)_2$) yer almaktadır (Wang ve Mulligan, 2006). Türkiye’de ise ruhsatı olan 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).

1.1.5. Maruziyet

Arsenik gibi sürekli maruz kalınan toksik kimyasallar insan sağlığında önemli derecede tehdit unsuru olmaya devam etmektedir. (Naujokasveark., 2013). As, doğada serbest halde bulunabilmesi ve canlılarda oluşturduğu değişik toksik etkileri nedeniyle insan ve hayvan sağlığı açısından önem taşımaktadır. Arsenik, solunum yoluyla, yiyecek ve su tüketimi ile ağız yoluyla ve dermal yollarla vücuda absorbe olduğundan arseniğe maruziyet insanlar için kaçınılmaz olmaktadır. Genel popülasyonda toplam günlük arsenik alımı 0.200 mg/kg' dır (Mazumder ve ark. 1992). İçme sularında 0,5-1,0 mg/L arsenik bulunması insan zehirlenmelerine neden olmaktadır. Dünya sağlık örgütü (WHO) dünyada 200 milyondan daha fazla insanın içme sularında belirlediği 10 µg/L (ppb) sınırın üzerindeki konsantrasyonlarda arseniğe kronik olarak maruz kaldığını tahmin etmektedir (WHO 2008; Naujokas ve ark. 2013). WHO, içme ve kullanma sularında 10 µg/L' ye kadar arsenik bulunabileceğini, 50 ppb'den daha yüksek miktarlarda arsenik içeren suların ise kesinlikle kullanılmaması gerektiğini bildirmiştir (WHO, 1990). WHO'nun yapmış olduğu bu düzenleme Japonya, Laos, Moğolistan, Namibya, Suriye, Amerika Birleşik Devletleri (ABD), AB ülkeleri tarafından kabul edilmiştir. Sağlıklı içme suyu temin edemeyen Hindistan ve Bangladeş gibi ülkelerde 10 µg/L sınır değerinin uygulanmasının mümkün olamayacağı ifade edilmektedir (Viraraghavan ve ark. 2005).

Ülkemizde 2005 yılına kadar arsenik ile ilgili uygulanan düzenlemeler Türk Standartları Enstitüsü tarafından yapılmış ve TS 266'da maksimum arsenik konsantrasyonu 50 µg/L olarak belirtilmiştir (Alpaslan ve ark.,2010). 17 Şubat 2005 tarihinde 25730 sayılı "İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik" kapsamında T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından yapılan değişiklikle 50 µg/L'den 10 µg/L'ye düşürülmüştür (Cakmakci, ve ark, 2009; Cansız ve ark., 2011) Yönetmelik ile yapılan değişiklik 2008 yılından beri uygulanmaktadır. İçme suyunda arseniğe maruziyet, Arjantin Bangladeş, Şili Çin, Gana Hindistan, Meksika, ABD, Vietnam gibi dünyanın pekçok yerinde rapor edilmiştir (Çizelge 1.4), (Naujokasve ark., 2013).

İçme sularında bulunan arsenik ile öldürücü etkisi yüksek olan iç organ kanserleri arasındaki ilişki Tayvan, Şili, Banglades ve Arjantin’de rapor edilmiştir (Kitchin ve Conolly, 2010).



Şekil 1.4. İçme sularının arsenikle kontaminasyonu insan sağlığını tehdit etmesi.
(<http://www.sistempark.net/aritma/sularda-arsenik.html>)

Pek çok çalışma, kronik As maruziyetinin, deri(Yu et al. 2006; Tseng 1977; Smith ve ark., 2000), akciğer (Heck et al. 2009; Marshall et al. 2007; Smith et al. 2009), mesane (Bates et al. 2004; Yuan et al. 2010), karaciğer(Chenand Ahsan 2004; Chiu et al. 2004; Liaw et al. 2008; Liu and Waalkes 2008), kanserine sebep olduğu gösterilmiştir. Bu kanserlerin yanısıra As maruziyeti kalp-damar hastalıkları(Chen Y et al. 2011; Gong and O’Bryant 2012; Yuan et al. 2007; Abhyankar et al. 2012; Abir et al. 2012), Diyabet (Chen et al. 2007; Del Razo et al. 2011; Islam et al. 2012; Jovanovic et al. 2012), sinir sistemi bozuklukları (Hamadani et al. 2011; Wasserman et al. 2004, 2007; Dong and Su 2009, Gong et al. 2011; Parvez et al. 2011, Vahidnia et al. 2007) , kronik öksürük (Smith ve ark., 2006) ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (Çizelge 1.5).

Hedef	Hastalık	Kaynaklar
Deri	Deri lezyonları Deri kanseri	Argos ve ark., 2011; Haque ve ark., 2003; Smith ve ark., 2000; Tseng 1977 2007; Yu ve ark., 2006
Gelişimsel süreç	Artan bebek ölümü Düşük kilolu doğumlar anne lökosit ve kordon kanında tümör promoter bölgelerinde değişen DNA metilasyonu çocuklardan örolojik bozukluklar genç yaşta maruziyet yetişkin dönemde kanser riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir.	Milton ve ark., 2005; Rahman ve ark., 2010 Rahman ve ark., 2009 Intarasunanont et al. 2012; Kile et al. 2012 Dong and Su 2009; Hamadani et al. 2011; Wasserman et al. 2004, 2007 Bates et al. 2004; Chen CL et al. 2010b; Liaw et al. 2008; Marshall et al. 2007; Su et al. 2011; Yuan et al. 2010
Sinir sistemi	Çocuk ve yetişkinlerde zeka geriliği Motor fonksiyonların bozulması Nöropati	Hamadani et al. 2011; Wasserman et al. 2004, 2007; Dong and Su 2009 Gong et al. 2011; Parvez et al. 2011 Vahidnia et al. 2007
Solunum sistemi	Akciğer tüberkülozundan artan ölümler bronşit akciğer kanseri	Smith et al. 2011 Smith et al. 2006 Heck et al. 2009; Marshall et al. 2007; Smith et al. 2009
Kardiyovasküler sistem	Koroner ve iskemik kalp hastalığı Akut miyokard infarktüsü Hipertansiyon	Chen Y et al. 2011; Gong and O'Bryant 2012 Yuan et al. 2007 Abhyankar et al. 2012; Abir et al. 2012
Karaciğer,böbrek mesane	Karaciğer kanseri Böbrek kanseri Mesane ve diğer üriner kanserler	Chen and Ahsan 2004; Chiu et al. 2004; Liaw et al. 2008; Liu and Waalkes 2008 Bates et al. 2004; Yuan et al. 2010 Chen et al. 2010b; Chiou et al. 2001; Gibb et al. 2011; Marshall et al. 2007
Bağışıklık sistemi	Gen ekspresyonu ve sitokin ekspresyonunda bozukluklar İltihap Bulaşıcı hastalıklardan artan bebek ölümleri	Ahmed et al 2011; Andrew et al. 2008; Kile et al. 2012 Ahmed et al. 2011 Rahman et al. 2010b; Spivey 2011
Endokrin sistem	Diyabet Hamilelerde glikoz toleransın bozulması	Chen et al. 2007; Del Razo et al. 2011; Islam et al. 2012; Jovanovic et al. 2012 Ettinger et al. 2009

Çizelge 1.5. Arsenik maruziyeti ve hastalıklarla ilişkisi (Naujokas ve ark, 2013).

İnsanlarda, kronik arsenik maruziyetine en hassas hedef organ deridir. Bunun sebebi Arseniğin keratideki sülfidril gruplarına bağlanması ve saç, deri ile tırnakların keratin matriksinde depolanması gösterilmiştir. Deride yağmur damlası şeklinde pigmentasyon, avuç içi ve ayak tabanında görülen hiperkeratoz ile hipo- ve hiper-pigmentasyon şeklinde görülen deri lezyonları arsenik toksisitesinin ayırıcı özelliği olarak kabul edilmektedir (Bhattacharjee ve ark. 2013).

Arseniğe maruziyet, standartın üzerindeki konsantrasyonlarda içme sularının tüketilmesinin yanı sıra arsenikle kirlenmiş yeraltı sularıyla yetişen tahılların tüketilmesi veya mesleki maruziyet gibi ikincil yollarla da maruz kalılabilmektedir (Bhattacharjee ve ark. 2013).

1.1.6. Arsenik Maruziyeti ve Kanseri

Arsenik karsinojen olan toksik bir ağır metaldir. Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı, arseniği kanseri oluşturma özelliği ispatlanmış kimyasallar sınıfında (Grup 1) göstermektedir. Deri (Yu et al. 2006; Tseng 1977; Smith ve ark., 2000), akciğer (Heck et al. 2009; Marshall et al. 2007; Smith et al. 2009), mesane (Bates et al. 2004; Yuan et al. 2010), karaciğer (Chen and Ahsan 2004; Chiu et al. 2004; Liaw et al. 2008; Liu and Waalkes 2008), kanserine sebep olurken akciğer kanseri en yaygın görülen kanseri türüdür. (IARC 2012; National Toxicology Program 2011) bunun yanı sıra kronik arsenik maruziyeti ile akciğer kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir (IARC 2012).

Arseniğin deri lezyonlarına sebep olduğu Bangladeş, Hindistan ve Şile’de yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Argos ve ark., 2011; Haque ve ark., 2003; Smith ve ark., 2000). Deri kanseri de çok uzun zamandır arseniğin kronik maruziyeti ile ilişkilendirilmiştir (ATSDR 2007; Yu et al. 2006; Tseng 1977; Smith ve ark., 2000). Dünyada içme sularındaki arseniğin konsatrasyonu çizelge 1.6’da gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Arseniğin sebep olduğu deri lezyonları (<http://www.saglikplus.com/arsenikzehirlenmesi.html>).

Ülkeler	Tahmin edilen maruz popülasyon(milyon)	İçme sularında arsenik consantrasyonu (µg/L)	Kaynaklar
Arjantin	2	< 1 - 7,550	Bates ve ark. 2004; Moore ve ark. 2004; Steinmaus ve ark. 2010
Bangladeş	35-77	< 10 - > 2,500	Kinniburgh ve Smedley 2001
Şili	0,4	600 - 800	Ferreccio ve ark. 2000; Smith ve ark. 1998, 2000
Çin	0,5-2	< 50 - 4,400	Yu ve ark. 2007
Gana	<0,1	< 2 - 175	Asante ve ark. 2007; Smedley 1996
Hindistan	>1	< 10 - > 800	Acharyya et al. 1999
Meksika	0,4	5 - 43	Calderón ve ark. 2001; Camacho ve ark. 2011; Meza ve ark. 2004, 2005
ABD	>3	< 1 - > 3,100	Anning ve ark. 2012; Ayotte ve ark. 2003; Burgess ve ark. 2007; Nielsen ve ark. 2010; NRDC 2000; Peters 2008; Sanders ve ark. 2012; Thundiyil ve ark.. 2007; Xue ve ark. 2010
Vietnam	>3	< 0.1 - 810	Winkel ve ark. 2011

Çizelge 1.6. Dünyada arsenik maruziyeti (Naujokas ve ark. 2013)

1.1.7. Absorbsiyon

Kokusuz ve renksiz olan arsenik gastrointestinal, solunum ve parenteral yollardan absorbe olur. İnorganik arseniğin gastrointestinal absorpsiyonu çözünürlüğüne bağlıdır. İnorganik arseniklerin trivalan ve pentavalan bileşiklerinin büyük bir kısmı suda çözünebilir ve bu yüzden gastrointestinal absorpsiyon hızı çok yüksek olabilir. En fazla absorpsiyon ince barsaktan olur. Arseniktrioksit fazla çözünmediğinden çok iyi absorbe olmaz. Solunum yoluyla alınan arsenik %80 sistemik absorpsiyonla sonuçlanır. Ayrıca ciltle de emilir. Arsin ve etilarsin pulmoner keseciklerden kolayca difüze olabilir. Sütte bulunan bir protein olan kazeinin alımı absorpsiyonu düşürür. Solunum yolu ile maruz kalınan arsenik, akciğer ve gastrointestinal yolla emilir. Büyük arsenik parçaları üst solunum bölgesinde toplanır; burada siliyer hareketlerle gastrointestinal bölgeye taşınır, olay % 80 sistemik absorpsiyonla sonuçlanır. İnorganik arseniğin çözünmüş formu sindirildiğinde kolayca absorbe olur. İnsanlarda ve deney hayvanlarında tek doz arsenit veya arsenatın gastrointestinal sistemde %80-90'nının absorblandığı bilinmektedir (Yağmur ve Hancı 2002; Şanlı ve Kaya, 1984)

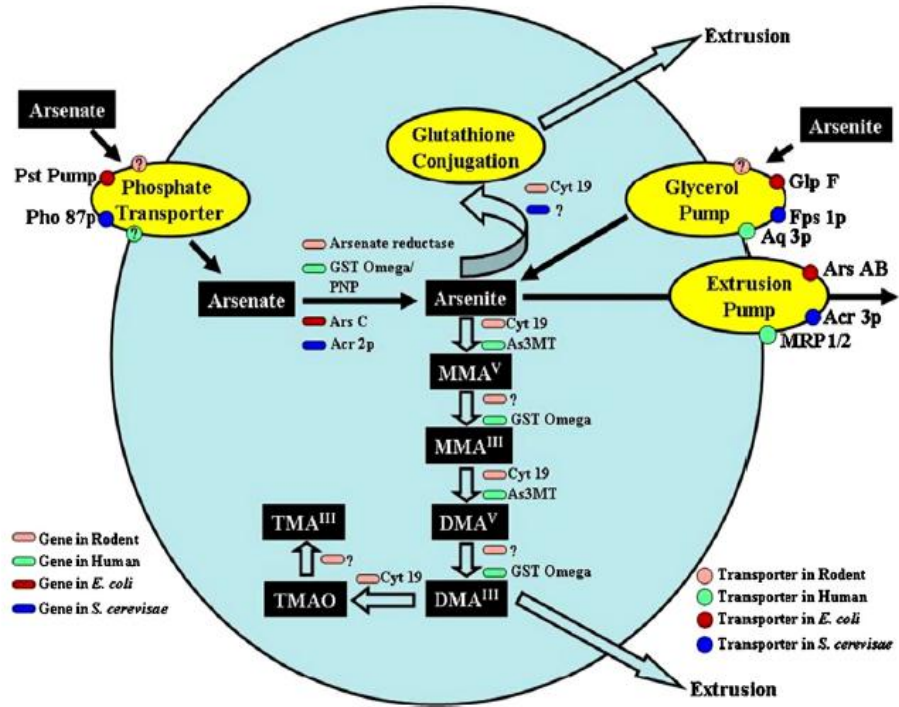
1.1.8. Metabolizma

Arsenik bileşikleri, hem inorganik (3 değerlikli meta arsenit ve 5 değerlikli arsenat) hem de organik (monometil ve dimetil türevleri) şekillerde bulunabilirler. Genel olarak As^{+3} bileşikleri, As^{+5} 'ten daha toksiktirler. İnorganik formdan organik forma dönüşüm bir seri indirgenme, oksidasyon ve metilasyon basamakları ile gerçekleşmektedir (şekil.1.6) (Bhattacharjee ve ark. 2013; Aposhian ve ark. 1997; Rosmann, 2003).

Arseniğin inorganik formdan organik forma dönüşmesinde metilasyon önemli bir basamaktır. İnorganik arseniğin metilasyonla monometilarsonik asit (MMA) ve dimetilarsinik aside (DMA) dönüştüğü gösterilmiştir. İnorganik arsenatın DMA'ya

metilasyonu pentavalan arseniğin trivalan arseniğe dönüşüp metil grubunun eklenmesini içerir. Oksidatif metilasyonun, S-adenozilmetiyonin (SAM) ile trivalan arseniğe metil grubu transferi ile gerçekleşir (Aposhian ve ark. 1997; Yamamoto ve ark. 1995; Ghosh ve ark. 2008).

Pentavalan arseniğin trivalan arseniğe dönüşmesinde S-adenozilmetiyonin'e (SAM) metil grubu sağlanması ve pentavalan arseniğin indirgenmesi için ortamda glutatyon bulunmasına gereksinim vardır. İnorganik arsenik ile kıyaslandığında, metilasyona uğramış metabolitlerinin daha az reaktif, akut toksik ve sitotoksik olduğu görülmektedir.



Şekil 1.6. Arsenik metabolizmasının şematik gösterimi (Bhattacharjee ve ark. 2013)

1.1.9. Atılım

Karaciğer arsenik metilasyonunun başladığı ilk doku olması sebebiyle inorganik arseniğe maruziyette DMA ilk olarak karaciğerde görülür. Oral olarak alınan arsenik karaciğerden hızla geçmesine rağmen, metilasyon, subkutan veya

intravenöz alımdan daha etkili olur. Arseniğin başlıca atılım yolu böbreklerdir. MMA ve DMA idrarda arseniğin ana metabolitlerini oluşturmaktadırlar. Kanda arsenik globulinle birleşir. Organizmada böbrek, karaciğer, kalp, beyin gibi bütün yumuşak dokulara dağılır. Özellikle keratine zengin dokulara (saç, tırnak, deri) ilgisi fazladır. Saç ve kılda toplanan As, yavaş bir şekilde idrarla atılır. Bu nedenle As ile ölümlerde saç, kıl ve tırnak en önemli analiz numunesidir. As organizmada tiyol (-SH) grubu ihtiva eden enzimleri inhibe ederek toksik etkisini gösterir (Vahter, 2009; Vural N, 1996; Han ve ark., 1998).

1.1.9. Toksisitesi

As bileşikleri önemli derecede toksik özellik göstermekle birlikte bileşiklerin özelliklerine göre toksik ve öldürücü dozları değişkendir. İnorganik arsenik türleri genellikle organik arsenik türlerinden daha toksiktir. (Ng, 2005). As₃ genellikle As₅ den daha toksiktir ve dimetil arsenik asit (DMAA₃) ve monometil arsenik asit (MMAA₃) ana bileşenlerinden daha toksiktir.

Inorganik arsenik bileşiklerinin ağız yoluyla 100 mg'dan fazla alınması önemli derecede toksik etki göstirirken; suda eriyen arsenik trioksit (sodyum arsenit) 200 mg'dan fazla alındığı takdirde öldürücü olmaktadır. 50 mikrogram/ litre ve daha yoğun arsenikli içme sularının tüketilmesi kanser gelişme riskinin arttığını göstermektedir.

Arsenik toksisitesini iki yüzü aşkın enzimi inaktive ederek gösterir. Özellikle hücresel enerji yolakları, 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 (Cobo ve Castineira, 1997).

Arsenik, toksik etkisini organizmada bulunan proteinlerin tiol grubuna bağlanarak ve arsenik-protein kompleksi oluşturarak gösterir. İnorganik arsenik, prostat, yumurtalıklar (Waalkes ve ark., 2007), karaciğer, cilt, akciğer, mesane ve

böbrek gibi organlarda kansere neden olabilen bir karsinojendir. Hatta birçok ülkenin içme sularındaki standart değerin yaklaşık 10 µg/L olması, kayda değer oranda (%0,1-%0,3) kanser riski ile ilişkilidir (NRC, 2001; IARC, 2004). Akut arsenik maruziyetinde insanlar için letal doz 125 mg'dır ve en yüksek arsenik konsantrasyonunun böbreklerde ve karaciğerde olduğu gösterilmiştir.

1.1.10. Akut Arsenik Zehirlenmesi

İnsanlar tarafından yüksek dozda alınan arsenik (70–180 mg/kişi) öldürücü nitelikte olabilir. Yüksek miktarda arsenik, tat almada bozulma, kusma, diyare, şiddetli karın ağrısı gibi gastrointestinal iritasyon belirtileri, kardiyovasküler sistem ve sinir sistemi belirtileri ortaya çıkmakta ve ölüme neden olabilmektedir. Zehirlenmenin derecesine göre deride kızarma görülebilir (Cheville, 1983).

1.1.11. Kronik Arsenik Zehirlenmesi

Arsenik gibi sürekli maruz kalınan toksik kimyasallar insan sağlığını önemli derecede tehdit etmektedir (Marisa ve ark. 2013). Kronik maruziyette arsenik bileşiklerinin diagnozu zordur. Kronik maruziyet belirtilerinin ortaya çıkması 10 yıl alırken bazı kanser tiplerinin gelişmesi 20 yıl alır. Öncelikli hedef organlar deridir. Yıllar içinde motor ve duyu nöronlarında periferik nöropatiler gelişebilir (Gong ve ark. 2011; Parvez ve ark. 2011, Vahidnia ve ark. 2007).

Arsenik içeren sularla oluşan kronik zehirlenmelerde ve mesleki maruziyetlerde değişik deri lezyonları görülür. Derideki etkileri ayak tabanı ve avuç içinde oluşan simetrik verrukoz hiperkeratozis karakteristik bir bulgudur. Hiperpigmentasyon ve melanoziste yaygın olarak görülür. Son 20 yılda yapılan çalışmalar, mesleki maruziyetler sonucu oluşan deri kanseri insidensinde artış olduğunu göstermiştir (Klassen ve ark., 1986). Karaciğer hasarı arsenik kronik maruziyetin bir diğer belirtisidir. Sarılıkla başlar ve siroz şeklinde gelişir (Bhattacharjee ve ark., 2013; Yu et al. 2006; Chen and Ahsan 2004; Chiu et al. 2004; Liaw et al. 2008; Liu and Waalkes 2008).

1.1.12. Zehirlenme Tedavisi

Akut zehirlenme tedavisi semptomatiktir. Sıvı hacmi replasmanı ve kan basıncının desteklenmesi dikkat edilmesi gereken noktalardır. Semptomlar giderilene kadar Dimerkaprol verilir. Bunu takiben oral penisilamin tedavisi yapılır.

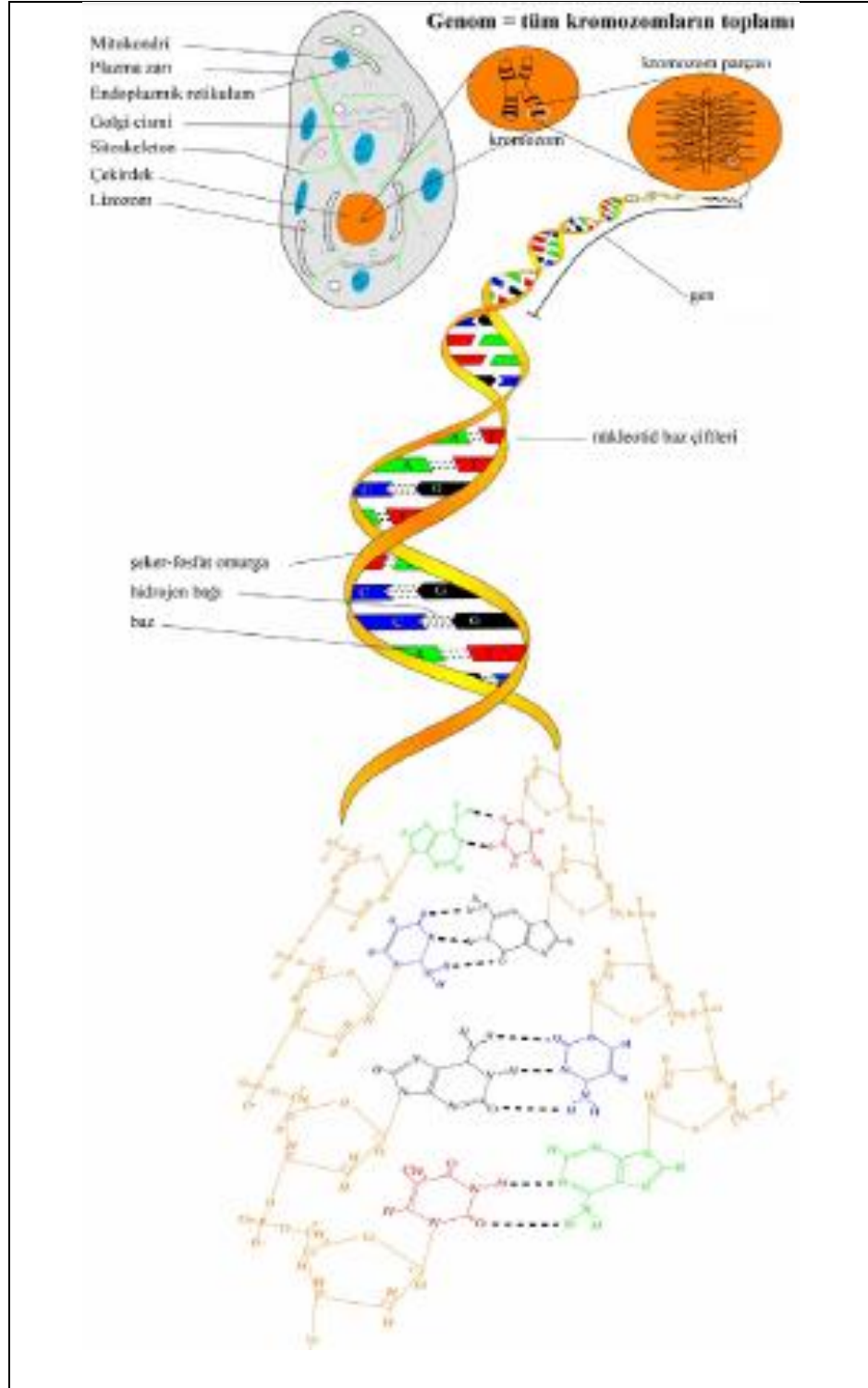
Kronik zehirlenmede dimerkaprol veya penisillamin tedavisi uygulanır.

1.2. DNA

1.2.1. DNA ve Yapısı

DNA genetik bilgiyi taşıdığı nükleotidlerin sekansında şifrelenmiş olarak saklayan, fosforik asit ve deoksiriboz ünitelerinin oluşturduğu iki paralel zincirin pürin ve pirimidin bazlarınca çapraz olarak bağlanması ile ortaya çıkan sağ yönlü sarmal yapıya sahip bir makromoleküldür. (Yıldırım ve ark. 2007) DNA ve RNA'nın yapı taşı nükleotitlerdir. Nükleotitler azotlu baz (karbon ve azot atomlarının halkası), pentoz (halkasal formda beş karbonlu şeker ve fosfat olmak üzere 3 karakteristik bileşene sahiptir şekil.1.7'de gösterilmiştir.

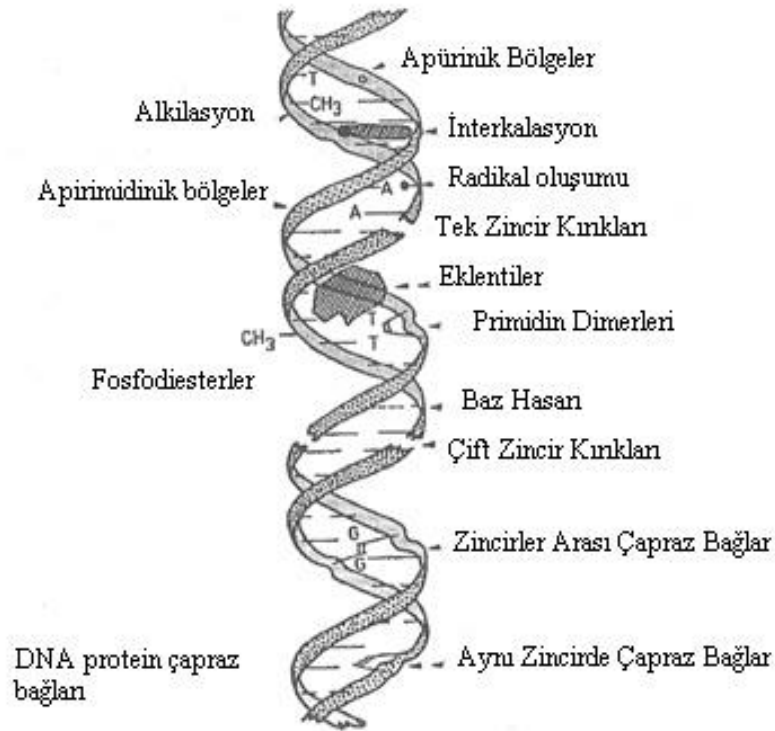
İnsan genomunda yaşam için gerekli proteinlerin sentezi ile ilgili bilgiler yer almaktadır. Ancak genomun yalnızca %3'ü protein kodlayan genler yani ekzonlar, geri kalan %97'sini ise intronlar ile görevi bilinmeyen veya tespit edilememiş DNA oluşturur (Passarge ve ark. 1997; Collins F. 1997; Devrim ve Kaya 2004).



Şekil 1.7. Hücrede DNA'nın yapısı (www.evrenvebilim.com sitesinden alınmıştır).

1.2.2. DNA Hasarı

İnsan genomunda eksojen veya endojen kaynaklı pek çok sebepten dolayı hata ve hasarlar oluşabilir. Farklı DNA hasarlarına neden olan ultraviyole, X-ışınları, kimyasal bileşikler gibi çevresel ajanlar, insan genomik DNA'sının bütünlüğünü sürekli tehdit etmektedir. Çift ve tek zincir kırıkları, insersiyon ve delesyonlar, abazik alanlar ve DNA-protein çapraz bağ oluşması DNA hasarlarına örnek olarak verilebilir (Şekil.1.8) DNA hasarı sadece dış faktörlerden kaynaklanmaz. DNA replikasyonu ve rekombinasyonu gibi olaylar sırasında, hücre metabolizmasının yan ürünü olarak üretilen serbest radikaller gibi endojen ajanlar da DNA hasarına neden olmaktadır. DNA onarımı, hücre ölümünü, mutasyonu, replikasyon hatalarını, DNA hasarının devamlılığını ve genomik kararsızlığı azaltan bütünüşlemlerde devreye girmektedir. Bu işlemlerdeki herhangi bir anormallik kanser, yaşlanma ve birçok genetik hastalığa yol açabilmektedir (Burçak ve Andican, 2004; Onur ve ark. 2009).



Şekil 1.8. DNA Hasarı (<http://www.science.marshall.edu/murraye/DNADamageinFishBloodCells.html> adresinden ulaşılarak düzenlendi).

1.2.3. DNA Hasarına Neden Olan Etkenler

Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler "DNA hasarı" olarak adlandırılır.

A. Endojen (spontan) Etkenler

1. Yanlış eşleşmeler, insersiyon/delesyonlar
2. Kimyasal değişiklikler: deaminasyon, metilasyon
3. Baz kayıpları: depurinasyon/depirimidinasyon
4. Oksidatif Hasar: 100.000 /hücre/gün
5. Replikasyon hataları

Deaminasyon bir bazın onarılamaması durumunda nokta mutasyonları görülebilir. DNA'dan her gün yaklaşık 5000 purin bazı (adenin ve guanin) glikozil bağları hidrolize olduğu için kaybolur. Bu olaya depurinasyon adı verilir. Benzer şekilde DNA dizisinde sitozinin urasile deaminasyonu günde yaklaşık 100 baz çiftini etkiler. Endojen etkenlerle oluşan hasar onarılmaz ise somatik mutasyonlar ortaya çıkar.

B. Ekzojen (çevresel) Etkenler

1. Kimyasal ajanlar: aflotoksin, benzopren, kemoterapi ilaçları, alkilleyici ajanlar, vinil klorid, mustard gazları v.b.
2. Fiziksel ajanlar: UV radyasyon, iyonize radyasyon v.b.

Benzopren karsinojen olmadığı halde hücre içinde okside olduğunda karsinojenik hale gelir. Ardından, DNA'da guanin gruplarına bağlanarak G-C bağlantısının arasına girer ve heliks yapısında bozulmalara neden olur. Ultraviyole ışığının neden olduğu hasarlar (siklobütan ve 6-4 ışın ürünü pirimidin dimerleri) daha çok deri kanseri riski ile bağlantılıdır. Mutajenik olan UV ışını, pirimidinlerin

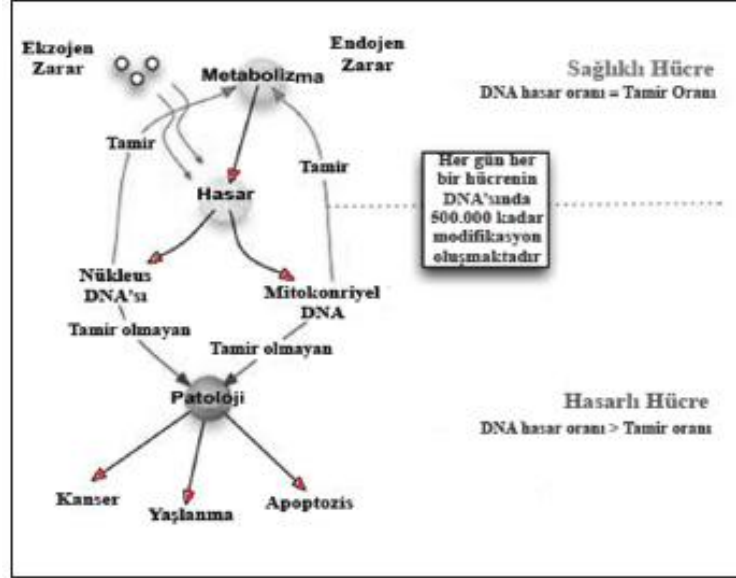
kovalent olarak bağlandığı dimer formlarının oluşmasına neden olur. TT dimer en sık oluşandır. Timin dimerleri, DNA konformasyonunu ve DNA polimerazın aktivitesini bozarak replikasyonu durdurur. Sisplatin vealkilleyici ajanlar gibi kemoterapötik ilaçlar DNA’da çift zincir kırıklarına ve zincir içi çapraz bağların oluşumuna neden olmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu 100’den fazla oksidatif DNA hasarı tanımlanmıştır. Bu hasarların biyolojik önemi henüz açıklık kazanmamakla birlikte 8-hidroksideoksiguanin’in (8-OH-Gua) mutasyona neden olduğu bilinmektedir. Bu yapı adeninle baz çifti oluşturabilme yeteneğine sahip olduğu için oldukça mutajeniktir ve replikasyon sırasında adeninle baz çifti oluşturur. G:C yerine insan kanserlerinde en çok görülen mutasyon olan T:A transversiyonuna yol açar.

DNA hasarı hücrede, hasarla başa çıkabilecek veya bunu gerçekleştiremiyorsa programlı hücre ölümünü sağlayacak birçok hücresel olayı tetikler. Hücre, DNA hasarlarına karşı farklı metabolik yollar ile cevap verir. Ağır DNA hasarları hücrenin apoptoz yolunu aktive ederek hücreyi ölüme götürür ya da hasar DNA onarım mekanizmaları ile onarılabilir. Dinamik bir yapıya sahip olan DNA molekülü, onarılabilen tek biyomolekül olması bakımından önemlidir. DNA hasarı replikasyon sırasında onarılamazsa mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa neden olur. DNA’da birçok özgün değişimi içine alan genomik kararsızlık, pek çok hastalığın yanı sıra hem kanserin hem de yaşlanmanın önemli bir belirtisidir (Kulaksız ve Sancar, 2007; Onur ve ark. 2009; Sancar ve ark. 2004).

1.2.4. DNA Onarım Mekanizmaları ve Önemi

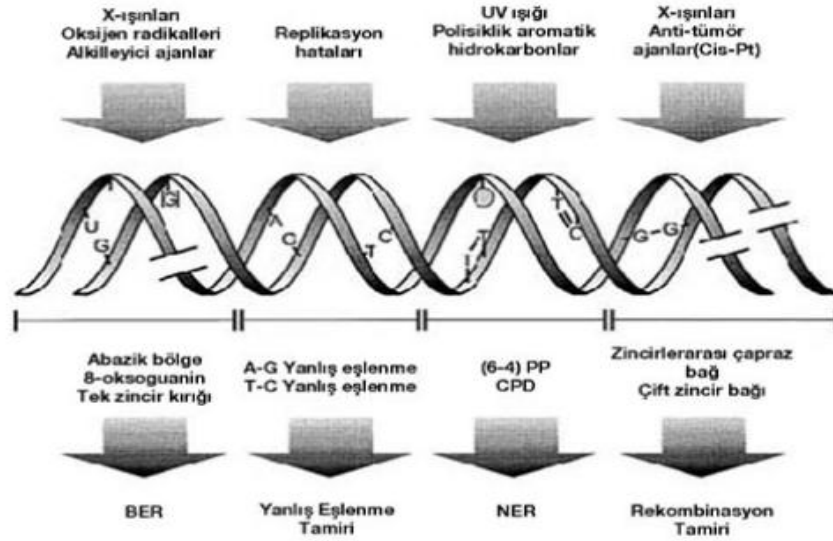
İnsan genomunda eksojen veya endojen kaynaklı pek çok sebepten dolayı hata ve hasarlar oluşabilir. Ancak en tehlikeli olanı reaktif oksijen türevleri (ROT) ile iyonize radyasyondur. DNA hasarlarına neden olan etkenler genom kararsızlığına sebep olmakta ve bu hasarlar onarılmaz ise hatalı protein üretimine, mutasyonlara, yaşlanmaya ve nihayetinde çeşitli hastalıklara ve kanser oluşumuna neden olur şekil

(1.9). DNA hasarının onarımında rol oynayan genler vardır. Bu genlerin kodladığı proteinler veya enzimler polimorfiktir (Beldüz ve ark. 2007).



Şekil 1.9. DNA tamir mekanizmaları ve yaşlanma ve kanser arasındaki ilişki
(http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_repair sitesinden derlenmiştir)

DNA hasarının onarım mekanizmaları, ; hasarın doğrudan onarımı, Eksizyon onarımı, rekombinasyon onarım, SOS onarımı ve çift zincir kırıkları onarımı şeklinde gerçekleşmektedir. DNA'da hasar oluşturan çeşitli ajanlar, sebep oldukları DNA hasar tipleri ve onarım mekanizmaları şekil.1.10'da gösterilmiştir.



Şekil 1.10. DNA’da hasar oluşturan ajanlar, hasar tipleri ve tamir mekanizmaları(Hoeijmakers, 2001).

1.2.4.1. Hasarın Doğrudan Onarımı

Hasarın doğrudan onarımı fotoreaktivasyon, O-6-metilguanin onarımı ve basit tek zincir kırıklarının ligasyonu yollarıyla gerçekleşir. Fotoreaktivasyon, ilk olarak belirlenen onarım tipidir. Gün ışığının enzimleri harekete geçirmesiyle oluşan timin dimerlerinin enzimatik olarak kesilmesidir. Fotoreaktivasyonla aktive edilen enzim veya fotodiyaliz, dimer bölgesine bağlanır, UV ışığı absorblar, pirimidin dimerini bir arada tutan bağı kırarak timin dimerlerini monomerlere parçalar, pirimidinler orijinal şekline dönüşür ve enzim bölgeden ayrılır. Fotoreaktivasyon ile tamir hemen hemen her canlıda olmakla birlikte insanı da içeren plesantali memelilerde bulunmaz(Beldüzve ark., 2007)O6-metilguanin alkilleyici ajanların varlığında oluşur ve yüksek oranda mutajeniktir. Onarım DNA-metiltransferaz ile gerçekleşir. Bu protein O6-metilguaninin metil grubunu kendi sistein birimlerine aktarır. Metil grubu bu proteini metilleyerek inaktif duruma getirir. Tamir eylemiyle birlikte inaktif olan bu enzim kendi geninin ve tamir işlevine karışan diğer birkaç enzimin genlerinin ifadenlenmesini artırır (Sancar ve ark., 2004; Lieberman, 2008). Basit tek zincir kırıklarının ligasyonu ise, X-ray ya da peroksidler gibi bazı ajanlar DNA zincirinde basit kırıklara neden olabilmektedir. Bir zincirde meydana gelen basit kırıklar DNA ligaz enzimi ile hemen onarılmaktadır. Enzim enerji gerektiren

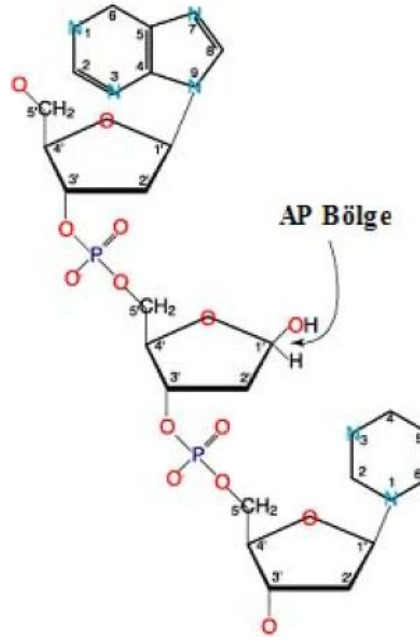
bir reaksiyon ile 5' fosfat grubu ile 3' OH grubu arasındaki fosfodiester bağı oluşturarak onarımı gerçekleştirir (Onur ve ark. 2009).

1.2.4.2. Eksizyon Onarımı

Eksizyon onarım mekanizmasında DNA'daki hasarlı bazın oligonükleotid parçaları çıkarılıp bu bölgenin doğru bazlarla doldurulması ve oluşan çentiğin ligasyonla kapatılması esasına dayanır.

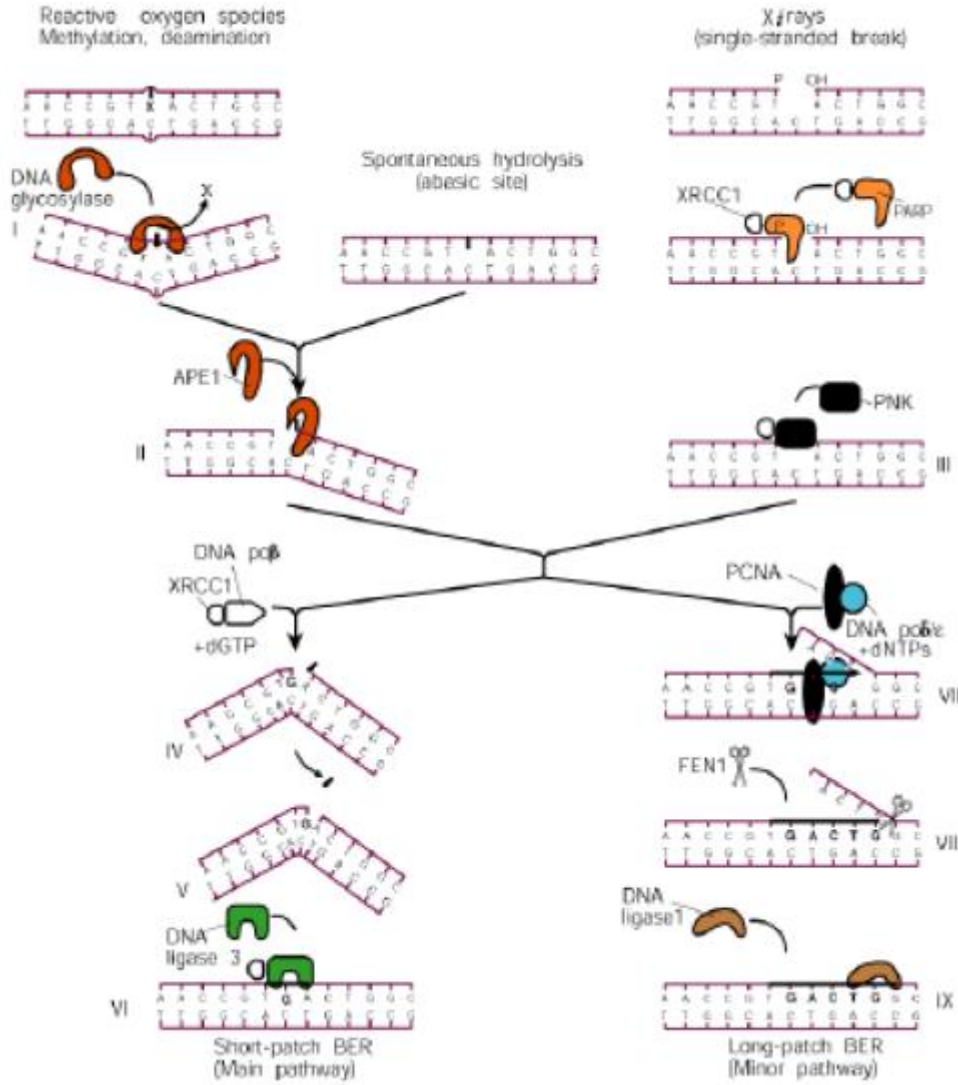
1.2.4.2.1. Baz Eksizyon Onarımı

DNA bazlarının spontan hidrolizi ve onları kimyasal yolla değiştiren etkenler nedeniyle oluşan azotlu bazların hasarının onarılmasıdır. Yapısal bozukluğu olan baz, DNA glikosilaz enzimi aracılığıyla tanınır. Bu enzim bazın N-glikozidik bağı kırarak bazı şekerden ayırır ve baz DNA'dan ayrılır. Oluşan bazsız bölge (şeker+ fosfat) apuritik veya aprimidinik (AP bölgesi) olarak adlandırılır (şekil.1.11) Hasarlı DNA'ya AP bölgesinin 5' ucuna doğru AP endonükleaz tarafından çentik atılır ve AP bölgesine komşu bir 3'-OH ucu oluşturulur. Daha sonra AP bölgesinin kesilip çıkarılarak (excision) uzaklaştırılır ve DNA polimeraz tarafından 3'-OH ucu uzatılır (Beldüz ve ark., 2007).



Şekil 1.11. Pürin/Pirimidin baz kayıpları sonucu AP bölgelerinin oluşumu (Bütüner ve Kantarcı, 2006).

DNA N-glikozilaz, DNA sarmalı üzerinde hatalı eşleşmeden kaynaklanan bükülmüş yapıyı tanır, baz ve deoksiriboz arasındaki N-glikozidik bağı hidroliz ederler. Ayrıca glikozilazlar bazların yüksek afinite gösterdiği bağlanma bölgelerine sahiptirler. Bu iki etken birleşince yanlış eşleşen bazın DNA çift sarmalından çıkarılması kolaylaşır (Şekil 1.12),(Bütüner ve Kantarcı., 2006).

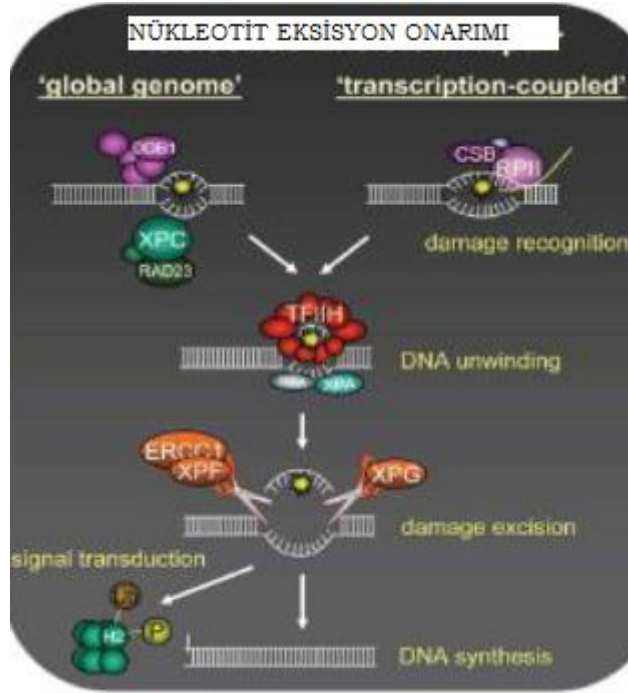


Şekil 1.12. Baz kesip çıkarma onarımı (BER) (Beldüz ve ark. 2007)

1.2.4.2.2. Nükleotid Eksizyon Onarımı

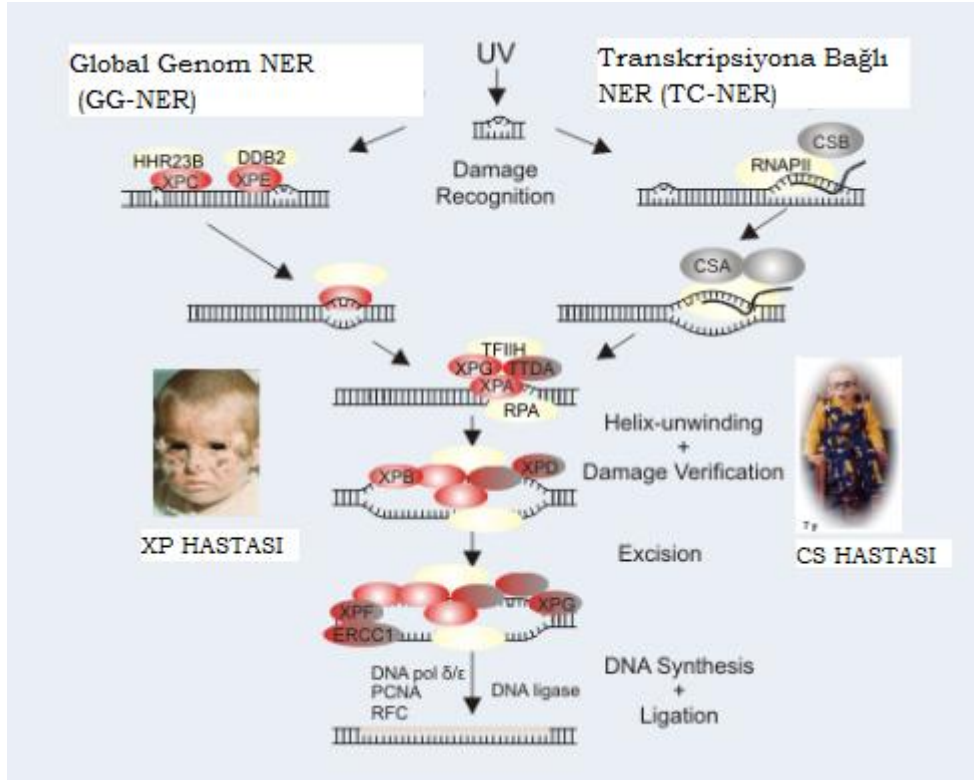
Nükleotid-kesip çıkarma onarım (NER) en az 20 proteinin görev aldığı bir kesme ve yapıştırma mekanizmasıdır. NER onarım yolu UV tarafından uyarılan pirimidin dimerlerini ve sisplatin, 4-nitrokuinolin oksit gibi etkenlerle reaksiyon sonucu DNA'da oluşan büyük lezyonları onarır. NER mekanizması, hasarın tanınmasıyla birlikte protein kompleksi hasarlı bölgeye bağlanır ve ~24-32 nükleotid uzunluğunda bir fragment içinde bırakacak şekilde lezyonun her iki tarafından hasarlı zincir kesilir (incision). Daha sonra hasarı içeren oligonükleotidin uzaklaştırılır (degradasyon) son olarak DNA sarmalı üzerinde meydana gelen

boşluğun DNA polimeraz tarafından doldurulması (polimerizasyon) işlemiyle tamamlanır (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. Nükleotit kesip çıkarma onarımı (NER) (<http://www.intechopen.com/books/dna-repair-on-the-pathways-to-fixing-dna-damage-and-errors/nucleotide-excision-repair-in-s-cerevisiae> sitesinden ulaşılarak derlenmiştir.)

Kalıtsal sendromları (Xerodermapigmentosum/XP, Cockaynesyndrome/CS, Trichothiodystrophy/TTD) olan bireylerde NER mekanizmasında bozukluklar saptanmıştır (şekil.1.14) Bu bireylerde güneşe duyarlılık, bazı dokularda erken yaşlanma, nörolojik bozukluklar ve genellikle UV kaynaklı cilt kanseri insidensinde artış gözlenir.



Şekil 1.14. NER mekanizmasında bozukluklar sonrası oluşan hastalıklar (<http://www.uni-koeln.de/inter-fak/cecad/schumacher/> sitesinden derlenmiştir.).

1.2.4.3. Yanlış Eşleşme Eksizyon Onarım Mekanizması (MismatchRepair)

Polimerizasyon esnasında hatalı bir nükleotit yerleştirildiğinde enzim kompleksinin hatayı tanıma ve hatayı keserek değiştirme ve onu geri döndürme potansiyeline sahiptir. Yanlış eşleşme onarım mekanizmasında değişiklik ve yanlış eşleşme tanınmalı, doğru olmayan nükleotitler uzaklaştırılmalı ve doğru nükleotitlerle yer değiştirme gerçekleşmelidir. Diğer onarım sistemlerinden farklı olarak onarım sistemi, hangi zincirin doğru (kalıp zincir) ve hangisinin yanlış (yeni sentezlenmiş zincir) olduğunu ayırt etmelidir. Bu ayırım adenin metilaz enzimi ile gerçekleştirilir. Enzim, DNA çift zincirindeki 5'-...GATC...-3'3'-...CTAG...-5' dizisini substrat olarak tanır ve bu dizideki adeninleri metiller. Daha sonraki replikasyon döngüsünü takiben, yeni sentezlenmiş zincir bir süre metillenmemiş olarak kalır. Onarım enzimi bu sürede yanlış eşleşmiş zinciri tanır ve bağlanır.

1.2.4.4. Rekombinasyon Onarımı

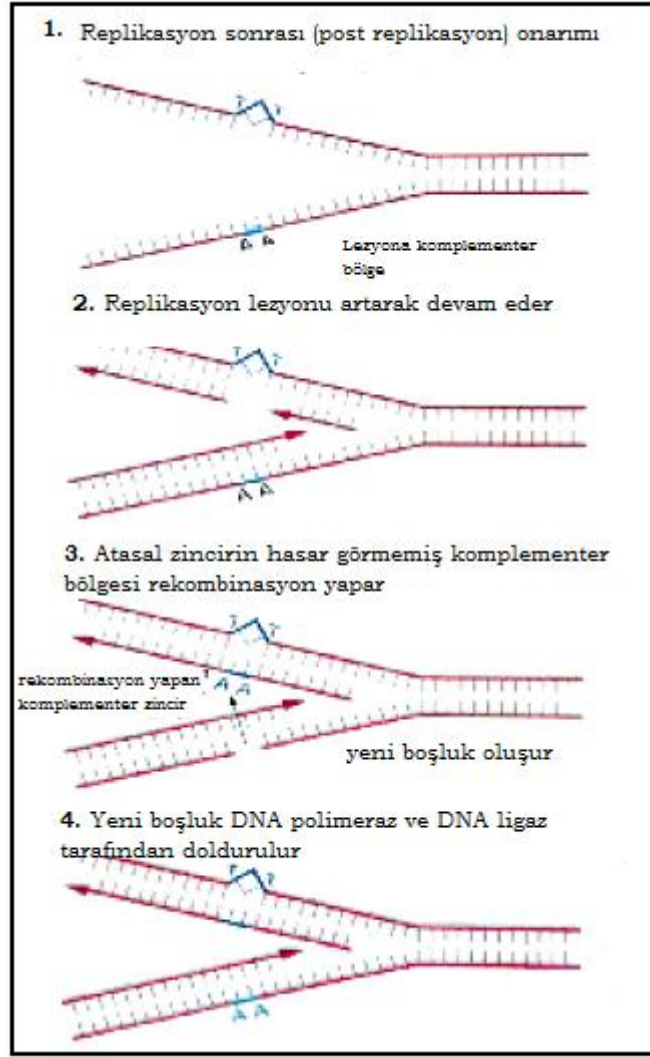
DNA'ların zarar görmüş parçasının değiştirilmesinde kalıp olarak kullanılacak tamamlayıcı ipliğin bulunmadığı durumda kullanılan, ve replikasyondan sonra aktif olan bir onarım mekanizmasıdır. Timin dimeri gibi bir lezyonu içeren DNA replike olurken DNA polimeraz önce lezyonda duraklar ve yeni sentezlenen zincir boyunca bir boşluk bırakarak lezyonun üzerinden atlar. Bu boşluğa bir yanıt olarak RecA proteini rekombinasyonel bir değiş tokuş işlemi ile başlangıçta hasarsız komplementer dizide bulunan bir segmenti bu boşluğa sokup onu tamamlar (Onur ve ark. 2009).

1.2.4.5. SOS (Transdimer Sentezi) Onarımı

Sos onarımı, DNA hasarlarını onarmanın bir başka yolu olup tahrip olmuş DNA parçasının karşısındaki zincirin büyümesini sağlayan bir bypass sistemini kullanır. DNA polimeraz zeta pirimidin dimerlerini geçmek için pirimidin dimerleri karşısına rastgele bazlar koyarak onarımı sağlar. Bu onarımda, mutasyonun var olmasına yada mutasyonlu kalmasını göze alan bir sistem işler. SOS onarım sistemi ultraviyole ışığı veya başka mutajenik ajanlarla uyarılır ve recA gen ürününün (RecA) çalışmasına bağlıdır. RecA proteazı birçok genin çalışmasını sağlar (Beldüz ve ark. 2007).

1.2.4.6. DNA Çift-Zincir Kırığı Onarımı

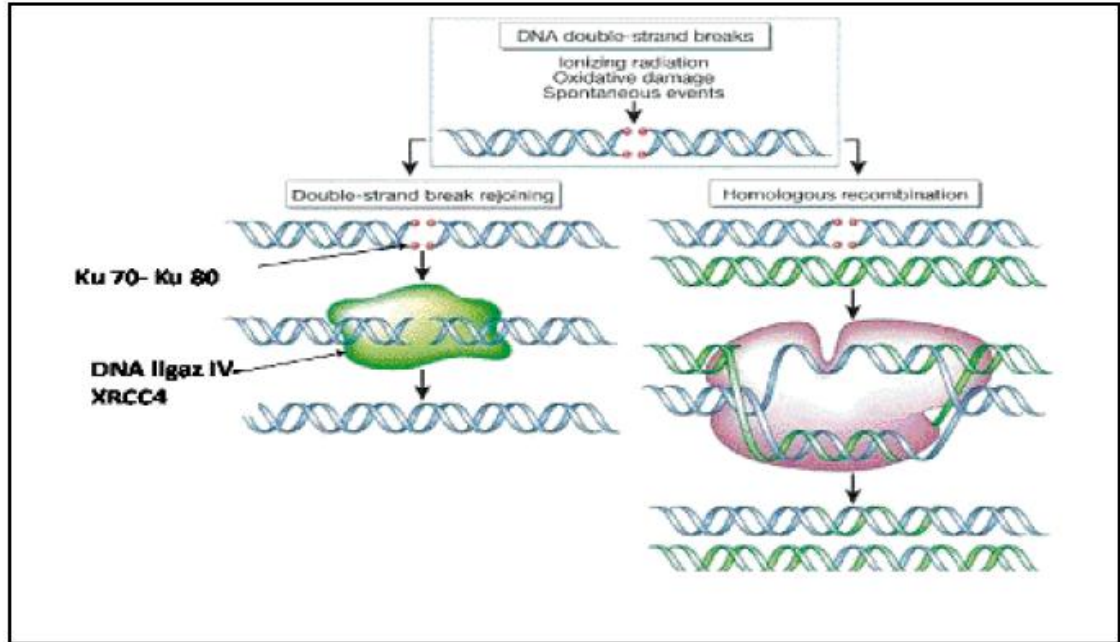
DNA çift zincir kırığına iyonize radyasyon, topoizomera inhibitörleri (etoposide, adriamycin), V(D)J rekombinasyonu sebep olur. DNA çift zincir kırıkları (DSBs), DNA hasarının en yıkıcı şeklidir. Onarılmazsa kromozomların kırılmasına ve hücre ölümüne varan sonuçlar doğurabilir. Yanlış onarılsa kromozom translokasyonuna ve kansere sebep olur. DSBs'ye neden olan en önemli eksojen ajan iyonize radyasyondur (Bütüner ve Kantarcı 2006).



Şekil 1.15. Replikasyon sonrası onarım: DNA replikasyonunun timin dimeri gibi bir lezyonun üzerinden atlaması durumunda oluşan replikasyon sonrası onarımı. Rekombinasyon işlemi yoluyla, hatasız komplementer zincir atasal zincirden alınarak lezyonun karşısındaki boşluğa yerleştirilir. Oluşan yeni boşluk DNA polimeraz ve ligaz tarafından doldurulur (Beldüz ve ark., 2007).

Diğer DNA onarım mekanizmaları belirli bir zincir içindeki hasarla ilgili işlev görmektedir. Oysa iyonize radyasyona maruz kalmış bir hücre DNA'sında çift zincir kırıkları gerçekleşmektedir. Bu tür olgularda DNA onarımının özelleşmiş bir formu olan DNA çift-zincir kırık onarım yolu aktive olur. Bu yol, homolog rekombinasyonel DNA tamiri (HR: homologous recombination), ve serbest uçların homolog olmayan şekilde bağlanması (NHEJ: Non-Homologous End-Joining) ile gerçekleşir. HR, DNA çift zincir kırıklarının, hasarsız homolog DNA'yı dikkate

olarak RAD52 aracılığı ile onarımıdır. NHEJ ise, Ku 70-Ku 80 (DNA-bağımlı protein kinaz katalitik Subunit) kompleksleri DNA kırık uçlarına bağlanırlar. DNA bağımlı protein kinaz aktive olarak diğer proteinlerin hasar bölgesine gelmelerini sağlar. Bu protein komplekslerinin formasyonu DNA ligaz IV-XRCC4 kompleksinin kırık uçları bağlamasını sağlar ve onarım tamamlanır (Şekil 1.16), (Kanaar ve ark. 1998; Rai ve ark. 2007).



Şekil 1.16. Serbest uçların homolog olmayan bağlanması (NHEJ)
(<http://www.hindawi.com/journals/jna/2010/592980/fig13/> sitesinden derlenmiştir).

1.3. DNA Hasarının Belirlenmesi

1.3.1. Comet Assay

Comet assay olarak bilinen Tek hücreli jel elektroforezi, kimyasal ve fiziksel etmenlerin canlılar üzerinde yol açtığı genotoksik ve sitotoksik etkilerin sebep olduğu DNA hasarını saptamak ve miktarını belirlemek için uygulanan genotoksisite testlerinden biridir. Comet assay oksidatif stres, toksik ağır metaller, kimyasal ajanlar, ilaçlar ve ultraviole gibi çeşitli genotoksik ajanların sebep olduğu DNA'nın tek veya çift zincir kırıklarını belirlemenin yanı sıra hızlı, hassas, güvenilir ve ucuz olması özellikleri yaygın bir kullanıma sahip olmasını sağlamıştır (Singh ve ark.1988; McKelvey-Martin ve ark. 1993; M. Valverde, ve ark. 2001; Poli ve ark. 1999).

Comet assay yönteminin temel prensibi; kimyasal ve fiziksel nedenlerle oluşan genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreleri üzerindeki etkilerini, hücrelerin DNA'larını tek tek inceleyerek tespit etmektir. Genel olarak, canlı dokulardan izole edilen çekirdek içindeki DNA, ince bir agaroz jel içine fiks edilir ve elektroforetik ortamda yürütülür. Eğer çeşitli genotoksik ajanlarla hasarlanan DNA'lar tamir mekanizmaları ile tamir edilememiş, tek veya çift DNA zincirlerinde kırılmalar oluşmuş ise; kırılan farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip kırılmış DNA molekülleri elektroforetik ortamda farklı hızlarda göç ederler. DNA molekülleri ethidium bromid gibi DNA spesifik boyalarla boyanıp floresan mikroskop altında incelendiğinde hasarın derecesine göre DNA'lar dairesel formdan kuyruklu yıldıza benzer forma kadar çeşitli derecelerde görüntüler oluşturdıklarından yönteme İngilizce “kuyruklu yıldız” anlamına gelen “Comet Assay” adı verilmiştir (Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010; Raiaguru et al. 2003).

1.3.1.2.Tarihçesi

Yöntem ilk kez 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından spesifik hücrelerde DNA hasarını belirlemek amacıyla uygulanmıştır. Rydberg ve Johanson'un kullandıkları yöntem, DNA'nın ayrılmasına izin veren hafif alkali şartlar altında lam üzerindeki agaroz'da gömülmüş olan hücreleri "lize" ederek hücreleri proteinlerden ayırmışlardır. Daha sonra nötralize edip akridin oranı ile DNA'yı boyamışlar ve kırmızı flörosana yeşilin oranını hesaplamışlardır. Kırmızı flörosan tek sarmalı, yeşil flörosan ise çift sarmalı göstermiştir. Fakat bu teknik çok yaygın kullanılmamıştır (Rydberg ve Johanson, 1978; Fairbairn ve ark. 1995; Cotelleva Ferard, 1999).

Ostling ve Johanson 1984 yılında hücre düzeyinde DNA hasar tespitinin hassasiyetini artırmak üzere 'Tek Hücre Jel Elektrophorez Tekniğı' geliştirmişlerdir. Ostling ve Johanson mikroskop lamı üzerinde, ince bir tabaka agar jeline süspanse edilen az sayıda hücreyi yoğun tuz ve deterjan içeren lizis çözeltisinde bekletip nötral pH şartlarda kısa bir süre elektrophoreze tabi tutmuşlardır. Mikroskop altında hasarlı DNA ların kuyruklu yıldız görünümünde olmasından dolayı comet yöntemi adını almıştır.

Ostling ve Johanson'un uyguladıkları teknik, nötral şartlarda gerçekleştiğinden DNA çift sarmal kırılmaları tespitini sağlarken tek sarmal kırılmaları tespit edememiştir. Genotoksik ajanların pek çoğu DNA çift sarmalına oranla DNA tek sarmalında daha çok hasara sebep olmaktadır. Bunun yanı sıra nötral şartlarda proteinler tam olarak uzaklaşmamaktadır. Bu sebeple yöntem 1988 yılında Singh ve arkadaşları tarafından modifiye edilmiştir. (Ostling, ve Johanson.1984; Tice ve ark., 2000). Daha sonra yapılan çalışmalarda elektrophorezde kırık içeren DNA'ların çekirdekten anoda doğru göç ile oluşan kuyruğun sebebinin alkali şartlarda iplikçiklerin gevşemesi olduğunu gösterilmiştir (Klaude ve ark. 1996; Collins ve ark. 1997).

Günümüzde birçok comet assay versiyonu vardır. Kullanılan tüm versiyonlar fiziksel ve kimyasal ajanların tetiklediği DNA hasarını alkali (pH >13) elektrophorez

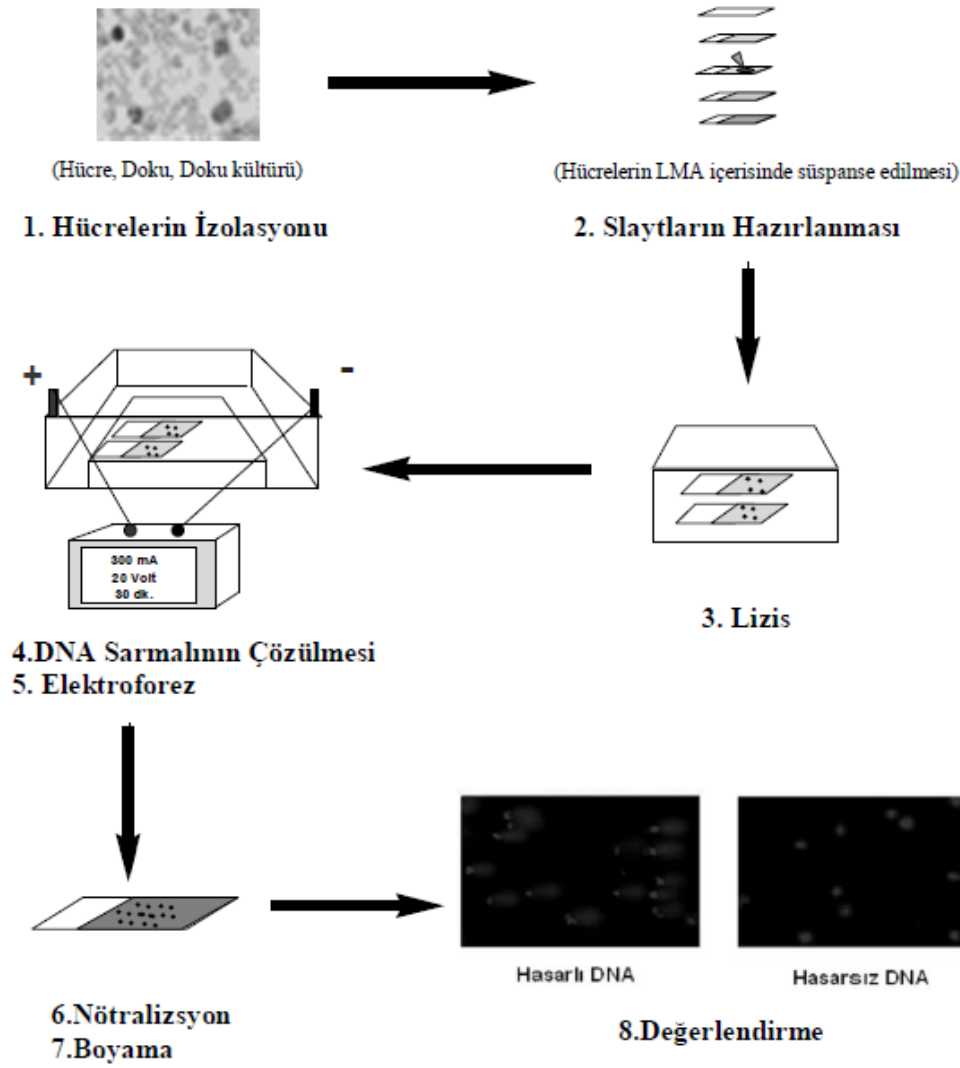
ile belirleyen, Singh ve ark. 1988 yılında yayınladığı versiyonu temel alır. Bu versiyon, uygulanan daha güçlü lizis şartları ile proteinlerin % 95'inden fazlasını yok edebilmektedir. Alkali elektroforez uygulaması ile çift zincir kırıklarının yanısıra tek zincir kırıkları ve alkali labil bölgeleri, onarımı tamamlanmamış DNA bölgeleri basit ve hasas bir şekilde belirlenmesi sağlanmıştır (Tice ve ark., 2000; Hoffmann ve ark. 2005; M. Valverde ve ark. 2009; Yeni ve ark. 2010).

Çizelge 1.7. SCGE Yöntemiyle Farklı pH'larda Tayin Edilebilen DNA Hasar Tipleri

pH:7-8	pH: 10-12	pH>13
Çift sarmal kırıkları	Çift sarmal kırıkları	Çift sarmal kırıkları
Çapraz bağlar	Tek sarmal kırıkları	Tek sarmal kırıkları
	Eksizyon tamir bölgeleri	Eksizyon tamir bölgeleri
	Çapraz bağlar	Çapraz bağlar
		Alkali ortamda açığa çıkan hasarlar

1.3.1.3. Comet Assay Basamakları

1. Mikroskop lamalarının hazırlanması
2. Hücrelerin izolasyonu
3. Yayma
4. Lizis
5. Alkali ortamda DNA süperkoil yapısının açılması (Alkali unwinding)
6. Elektroforez
7. Nötralizasyon
8. Fiksasyon
9. DNA'nın boyanması ve "comet" lerin görüntülenmesi
10. Comet sayımı ve DNA hasarının belirlenmesi (Tice ve ark.,2000)



Şekil 1.17. Comet Assay Basamakları

1.3.1.3.1. Mikroskop Laminin Hazırlanması

Comet lamaları için pekçok farklı teknik kullanılmıştır. Zamanla lamaların ve kullanılan jellerin stabilitesi sağlanmıştır. Mikroskop lamalarının hazırlanmasındaki en önemli amaç; çalışma tamamlanıncaya kadar jelin deforme olmamasını sağlamak ve cometlerin görüntülenmesi, sayımı ve hasar belirlenmesi sırasında temiz, net bir görüntü elde etmektir. Deneyden bir gün önce normal erime noktalı agaroz jele mikroskop lamaları batırılıp oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Bu işleme ön kaplama denir.

1.3.1.3.2. Hücresel Materyalin Hazırlanması

Test sonuçlarının doğruluğunu ve güvenilirliğini etkileyen önemli aşamalardan biri olan hücre materyalinin hazırlanması, hücrelerin hassas bir şekilde itinayla çalışılmasını gerektirir. Kültüre edilmiş hücreler, tam kan örnekleri (polimorf lökositler, mononükleer hücre fonksiyonları), primer insan fibroblastları doku örnekleri materyal olarak kullanılabilir ve bunların her birinin hazırlanması spesifiktir.

1.3.1.3.3. Yayma

Hücre materyalin hazırlanması sırasında izole edilen hücreler, düşük erime noktalı agaroz ile muamele edilerek ön kaplama yapılmış ve numaralandırılmış olan lamaların üzerine yayılır. Böylece iki jel tabakası arasında gömülü hücreleri içeren sandviç benzeri bir sistem oluşturulur. Bir sonraki aşamaya için jelin donması sağlanır.

1.3.1.3.4. Lizis

Lizis solüsyonu hücre ve çekirdek zarını eriterek DNA sarmallarının agaroz içinde serbest kalmasını sağlar. Bu amaçla izole edilen hücreler lam üzerinde agaroz jele gömülüp slaytlar yüksek yoğunlukta tuz ve deterjan içeren taze hazırlanmış soğuk lizis solüsyonunda (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 ve 10% dimethyl sulfoxide (DMSO), pH 10 yaklaşık 1 saat süre ile inkübe edilir (Singh ve ark., 1998; Ostling ve Johanson, 1984; Tice ve ark., 2000; Giovannelli ve ark., 2003; Horoz ve ark., 2006; Yeni ve ark., 2010; Dinçer ve Kankaya, 2010).

1.3.1.3.5. Alkali ortamda DNA Süperkoil Yapısının Açılması

Singh ve ark. (1988) tarafından geliştirilen alkali çözelti (1 mM EDTA ve 300 mM sodyum hidroksit, pH 13.0) comet yöntemi çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu aşama Singh ve ark. (1988) elektroforez çözeltisinde 20 dakika inkübasyonuna dayanan protokolü temel alır. Bu inkübasyon ile DNA sarmal yapının açılıp DNA zincirlerinin birbirinden ayrılması ve yüksek yoğunluklu tuzlu lizis solüsyonun DNA ile bir elektrotmuş gibi mücadele ettiği tabakadaki agardan ayrılmasını sağlamaktır. (Tice ve ark. 2000; Yeni ve ark. 2010).

1.3.1.3.6. Elektroforez

Alkali şartlar altında geliştirdiği Singh ve ark. (1988) geliştirdiği 25 V ve 300 mA, ve 20 dk DNA elektroforeze tabi tutulur. Anoda doğru hareket eden DNA parçaları bir kuyruklu yıldız görüntüsü verir (Tice ve ark., 2000; Dinçer ve Kankaya, 2010).

1.3.1.3.7. Nötralizasyon

Elektroforezden sonra jeldeki alkali durumu lamlardan uzaklaştırmak için Tris tamponuyla (40 mM Tris, pH 7.5) hazırlanan çözeltiye muamele edilir. Her biri için 5'er dakika bu işlem uygulanır (Tice ve ark., 2000).

1.3.1.3.8. Fiksasyon

Nötralizasyon aşamasından sonra her biri 5 dakika olmak üzere sırayla %50, %75 ve % 100'lük alkolle yıkanır.

1.3.1.3.9. DNA'nın Boyanması ve "Comet" lerin Görüntülenmesi

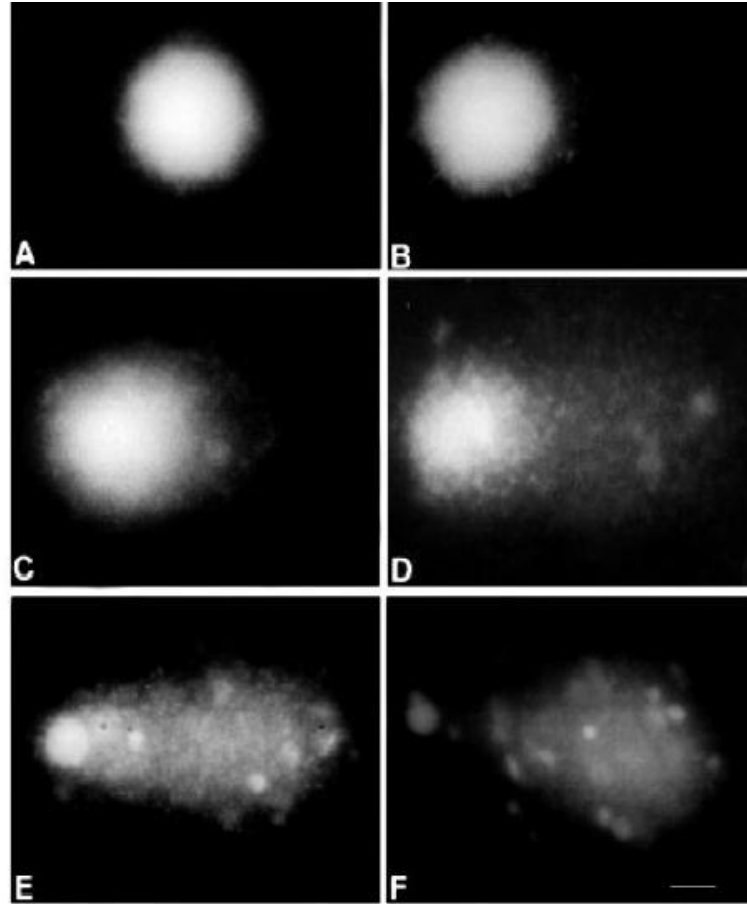
Cometlerin görüntülenmesi için yaygınlıkla kullanılan floresan boya etidyum bromürdür. Boyama sonrasında floresan mikroskopunda seçilen uygun büyütme ile

anoda doğru göç eden DNA fragmanları kuyruklu yıldız şeklinde görüntülenir. Hasarsız DNA ise spot şeklinde görülür.

1.3.1.3.10. Comet Sayımı ve DNA Hasarının Belirlenmesi

Comet'lerin sayılması iki farklı şekilde gerçekleştirilir.

Görsel Analiz: Farklı derecelerdeki hasarı gösteren “comet”leri insan gözü kolaylıkla ayırt eder. Görsel değerlendirmeye göre “comet”ler DNA göç uzunluğuna göre 5 kategoride tanımlanır (0-4). Sınıflandırma “comet”lerin görünümüne göre şekil.1.18’deki gibi gerçekleştirilir.



Şekil 1.18. Comet Assay Görsel Değerlendirme; A, Hasarsız, Kategori 0; B, Kategori 1; C, Kategori 2; D Kategori 3; Kategori 4 E Çok Hasarlı, F Apoptik Hücre

Parlak başlı objeler ve görünmeyen kuyruklar 0 kategorisine girer (kuyruksuz spot şeklindeki görüntüler), çok küçük başlı cometler ve uzun dağınık kuyruklar 4. Kategoriye girer, 0-4 kategorileri arasında yer alan “comet”ler kolaylıkla ayırt edilebilecek şekilde 1, 2 ve 3 kategorilerinde yer alır. Sayma işlemi için her lamda 100 comet seçilir ve herbirine içinde bulundukları kategoriye göre bir değer verilir (0,1,2,3 veya 4). Her bir kategorideki “comet” sayısı belirlenerek spesifik formüller ile DNA hasarı belirlenir.

Bilgisayarlı Görüntü Analizi Mikroskop üzerine monte edilen kapalı sistem dijital kamera bağlantısı ile otomatik olarak karakteristik “comet”lerin görüntüleri analiz edilir. Bu analizlerin yapılabilmesi için yazılım programları kullanılır. Programlar comet başını kuyruktan ayırt edebilecek ve kuyruk uzunluğu, baş ve kuyruktaki floresans yüzdesi, kuyruk momenti gibi çeşitli parametreleri belirleyebilecek özelliktedir (Dinçer ve Kankaya, 2010).

1.3.1.4.Comet Tekniğini Etkileyen Faktörler

Comet assay tekniğinin tüm işlem basamakları azami dikkat ve özenle uygulanması, şartların stabil olması sonuçların güvenilirliği açısından kaçınılmazdır. Örneğin elektroforez şartları (süre,uygulanan voltaj, pH konsantrasyonu),lysing solüsyon şartları (tuz konsatrasyonu süre ve pH), ortamın ışık düzeyi metodun hassasiyetini etkilemektedir. Bu sebeple deneylerde koşullar standart tutulmalıdır (Dinçer ve Kankaya, 2010).

1.3.1.5. Comet Tekniğinin Avantajları

Tek hücre düzeyinde bilgi edinilebilir.

Az sayıda hücre gerektirir.

Kolay uygulanabilir.

Hassas, güvenilir ve hızlı bir yöntemdir.

Diğer genotosisite yöntemlerinden daha ekonomiktir.

Değişik hücre ve doku gruplarına uygulanabilir (M. Valverde ve ark 2009; R. R. Tice ve ark.2000; Darragh G ve ark 2009).

1.3.1.6. Comet Assay Kullanım Alanları

Tanımlanmış genotoksik ve mutagenik ajanların farklı hücre tipleri ve farklı dokulardaki spesifik aktiviteleri (hücreye spesifik metabolik aktivasyon ve in vitro DNA onarımı, toksikokinetikler ve bir maddenin farklı yollarla vücuda verilmesini takiben doz-toksik yanıt ilişkisi) genotoksik etkisi henüz tam olarak tanımlanmamış olan araştırma kimyasallarının toksik etkileri ve doz toksisite ilişkisini belirlemek içingenotoksisite araştırmalarında; beslenme, yaşlanma, egzersiz gibi biyolojik süreçlerin izlenmesinde, çevresel değişikliklerin canlı sistemlerdeki etkisinin belirlenmesinde, hipoksi, ozon ve kemoterapi etkilerinin değerlendirilmesinde, sperm kalitesinin belirlenmesi gibi biyolojik izleme çalışmalarında; enzimatik ve enzimatik olmayan çeşitli antioksidanlar farklı mekanizmalarla oksidatif hasarı önlediğinden ve sınırladığından antioksidan çalışmalarında; DNA onarım aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu alanların yanı sıra klinik araştırmalarda kullanılmaktadır.“Comet Assay” çeşitli hastalıkların patolojik mekanizmalarının aydınlatılmasına önemli katkı sağlamıştır. Bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısında, kansere duyarlılığın belirlenmesinde, kanser tedavisinin takibinde, diabetes mellitus, katarakt, romatoid artrit-sistemik lupus eritematozus, polikistik over sendromu ve Alzheimer gibi hastalıklarda artmış DNA hasarı “Comet Assay” ile gösterilmiş, post menopozal kadınlarda hormon replasman tedavisi bu yöntemle incelenmiştir tüm bunlar klinik araştırmalarda kullanımın önemini göstermiştir. (Dusinska ve Collins, 2008; Dinçer ve Kankaya, 2010).

1.4. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), belli bir DNA dizisini in vitro koşullarda özgün olarak çoğaltabilen bir tekniktir. PCR, kompleks bir karışımda kısa süreli sıcaklık muamelesiyle çift zincirli yapının ayrılmasını takiben kısa oligonukleotid primerlerden DNA sentezinin yapıldığı çok safhalı döngülerle özgül bir DNA parçasının çoğaltılması esasına dayanır.

PCR reaksiyonu 1984 yılında Kary Mullis tarafından keşfedilmiştir. Bu keşif genlerin analizine tamamen yeni bir yaklaşım getirmiştir ve moleküler genetik alanında bir devrim yaratmıştır. Mullis PCR'ı keşfetmesi ve geliştirmesi sebebiyle ile 1993 yılında kimya dalında Nobel ve Japon Ödülünü kazanmıştır. (Bartlett ve Stirling, 2003) .

PCR, basit, spesifik ve hassas bir tekniktir (Saiki ve ark, 1985; Mullis, 1990; Joshi ve ark.,2010). PCR tekniği, eser miktarda biyolojik örneklerde çalışılabilmesi, kısa sürede sonuç alınması, ucuz, uygulanabilirliğin kolay olması sebebiyle moleküler biyoloji alanında yaygın bir kullanım alanına sahiptir (Siebert, 1998).

Pcr 3 ana aşamada gerçekleşmektedir.

1.4.1. DNA Zincirinin Açılması (Denaturation)

Kalıp DNA (template DNA), yüksek sıcaklıkta (90-97 °C'de) çift sarmalın iki ipliği, iplikler arasındaki tüm hidrojen bağları kırıldığında birbirlerinden ayrılır ve tek zincir haline gelir (Watson ve ark. 1992; Hadidi ve ark. 1995).

1.4.2. Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması (Annealing)

Komplementer bir kalıp zincir ile baz çiftleri oluşturan ve kalıp zincirin kopyasını oluşturmak için nükleotidlerin eklenmesinde başlangıç noktası olan nükleik asit

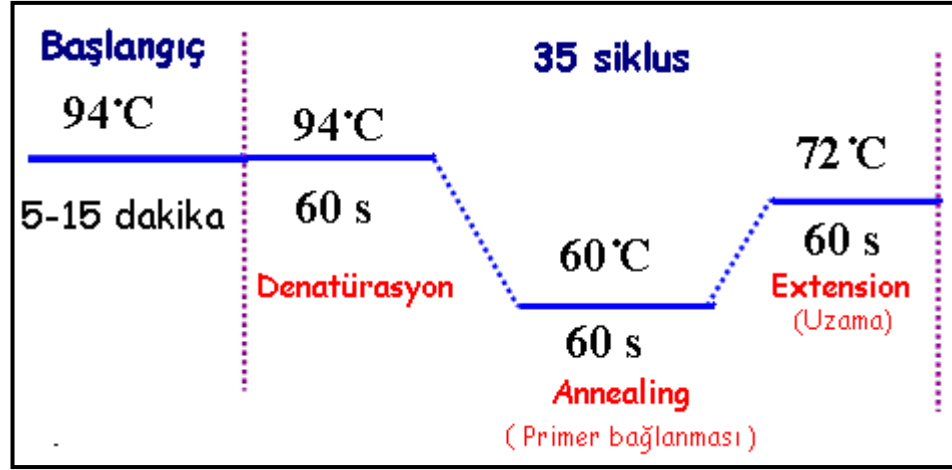
dizileridir. Bunun yanısıra primerler, DNA polimeraz enziminin DNA sentezini gerçekleştirmesi için gerekli 3'-hidroksil grubunu sağlar.

Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması aşaması, primerlerin kalıp DNA iplikleri üzerinde kendilerine komplementer olan dizilerle eşleşmesidir. Bunun için reaksiyon sıcaklığı 37-65 °C'dir. Bu işlem, üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniyede gerçekleşmektedir (Innis ve Gelfand 1990).

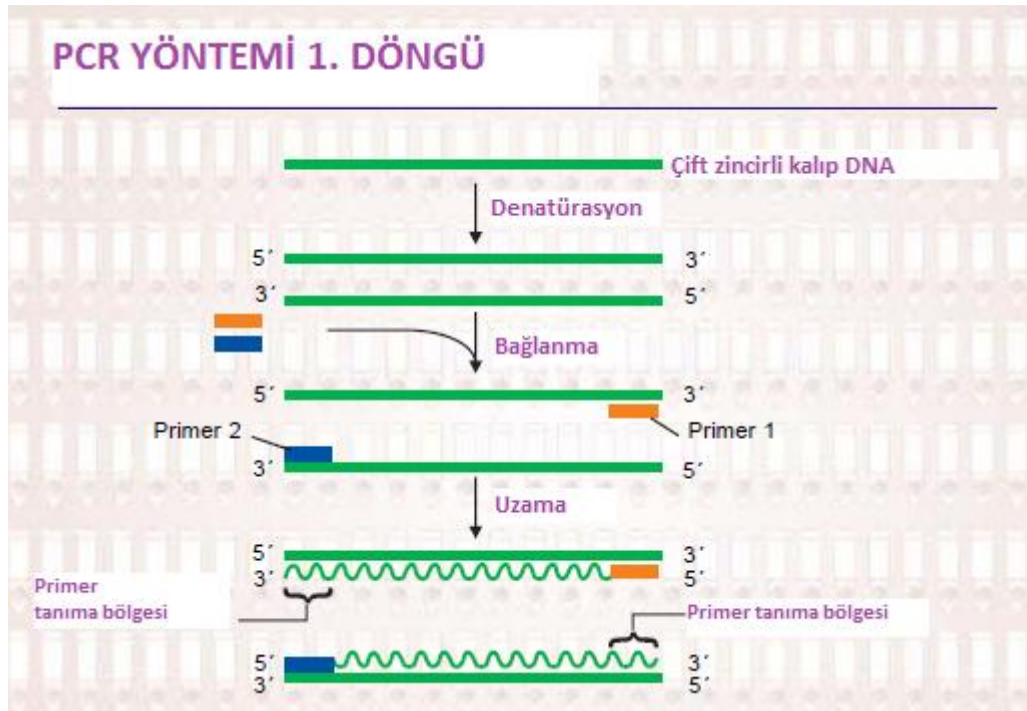
1.4.3. Primer Uzaması (Primer Extension)

DNA zincirleri üzerine yapışan primerlerin DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polymerase) ile uzatılmasıdır. Taq DNA polimeraz kaplıca sularında yaşayan *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilen yüksek sıcaklıklarda uzun süre kararlı olan bir enzimdir. PCR ile DNA sentezinde kullanılan enzim PCR 'ın Primer Uzaması aşamasında 72 °C sıcaklıkta daha iyi çalıştığı için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır (Erich ve ark. 1991).

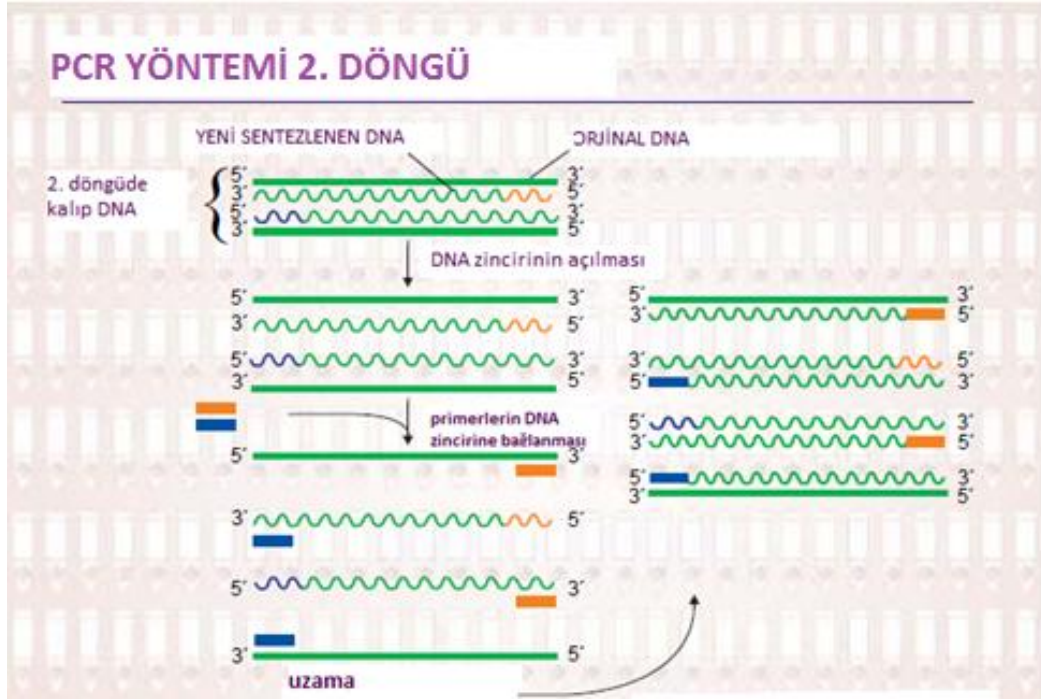
PCR sonucunda elde edilen ürün, çoğaltılması hedeflenen DNA parçası ile iki primerin toplam uzunluğu kadardır (Hadidi ve ark., 1995). Üç basamaktan (denaturation, annealing, primer extension) oluşan işlem, bir PCR döngüsünü temsil eder. Her döngünün sonunda DNA miktarı iki katına çıkar. Bir PCR reaksiyonu genellikle 30-35 döngüden oluşur. Bu nedenle her döngü sonunda DNA miktarı geometrik olarak artar (2, 4, 8, 16, 32, 64...). PCR sonucunda elde edilen DNA parçacıkları agaroz veya poliakrilamid jellerde yürütüldükten sonra, ethidiumbromide (EtBr) veya gümüş nitrat (GN) ile boyanarak gözlemlenir (Hadidi ve ark., 1995).



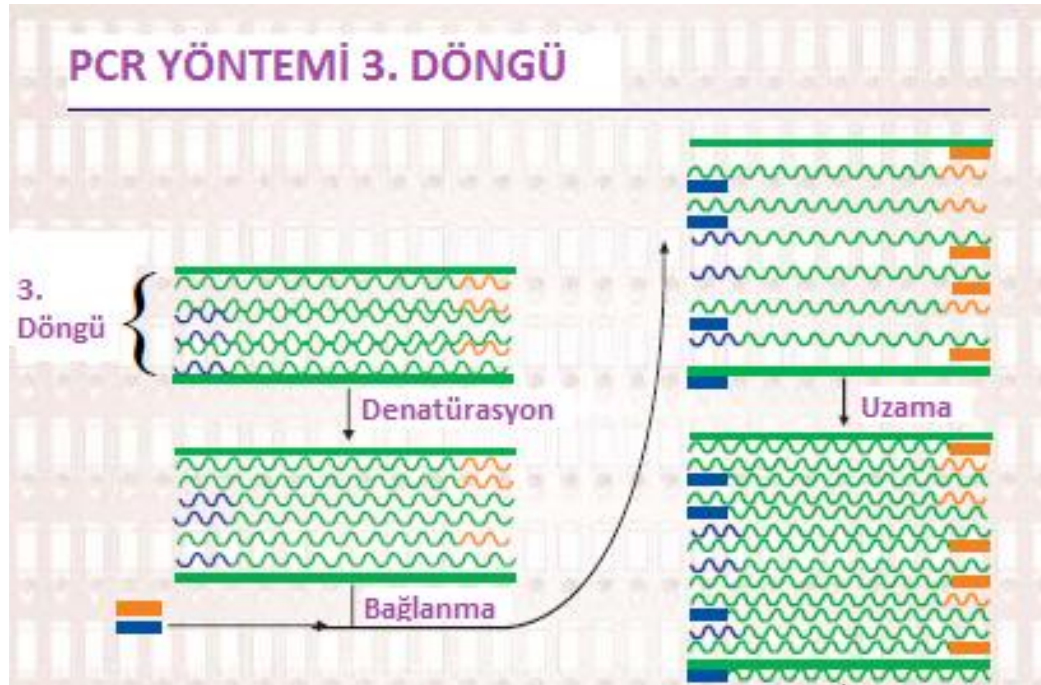
Şekil.1.19. PCR programı (<http://www.biochem.arizona.edu/miesfeld/teaching/Bioc471-2/pages/Lecture12/Lecture12.html> sitesinden ulaşılarak düzenlenmiştir.)



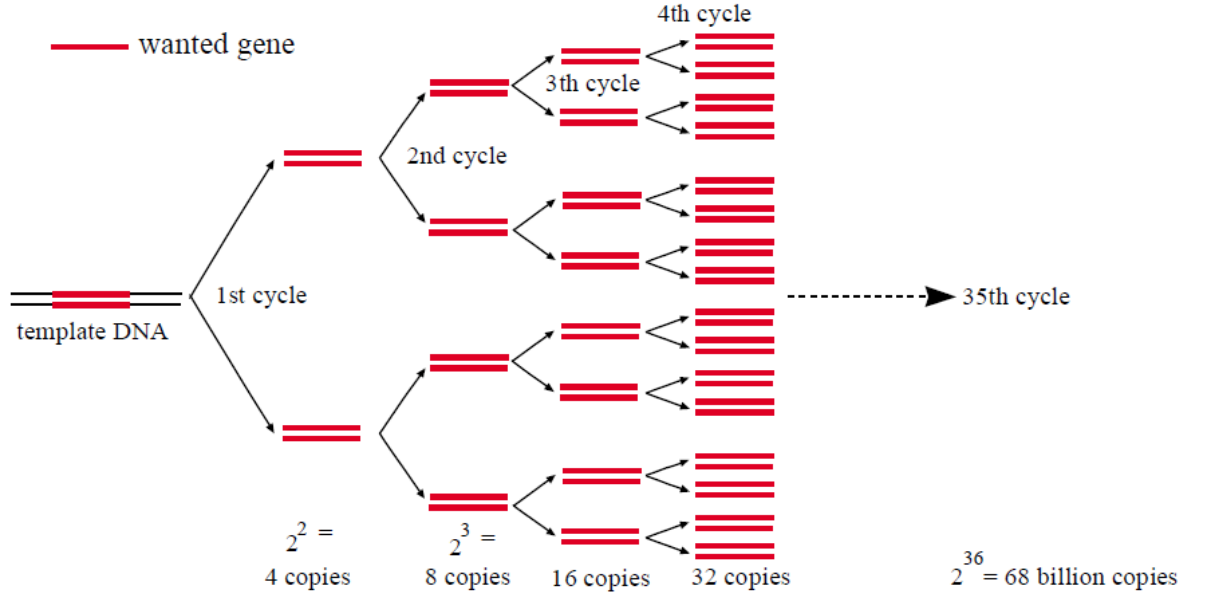
Şekil.1.20. PCR yöntemi: 1. Döngü (<http://refer.biovip.com/doc-view-8241.html> sayfasından ulaşılarak düzenlenmiştir).



Şekil.1.21. PCR yöntemi: 2. Döngü (<http://refer.biovip.com/doc-view-8241.html> sayfasından ulaşılarak düzenlenmiştir).



Şekil.1.22. PCR yöntemi: 3. Döngü (<http://refer.biovip.com/doc-view-8241.html> sayfasından ulaşılarak düzenlenmiştir).



Şekil.1.23. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) basamakları (http://openwetware.org/wiki/CH391L/S12/PCR_and_advanced_PCR_techniques sitesinden düzenlenmiştir).

1.4.4. Agaroz Jel elektroforezi

Agaroz, Kırmızı bir alg türü olan agar agar'dan izole edilen ortalama molekül ağırlığı 12000 olan doğrusal bir polisakkarittir. Yüksek sıcaklıkta suda çözünmesi ve soğutulduğunda bu polimerde çapraz bağların oluşması sonucu jel yapısı oluşur. Bu durum geri dönüşümlüdür. Agaroz orta büyüklükte ve büyük DNA moleküllerini elektroforezle ayırmak için en yaygın destek ortamıdır.

Agaroz jeller genellikle floresan bir boya olan etidyum bromür ile boyanır ve UV ışığı altında DNA parçaları görüntülenir.

1.4.5. PCR'ın Temel Bileşenleri

PCR'ın temel bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, deoksिनुकлеотит trifosfatlar dNTP karışımı, tampo ve MgCl₂'dür (Çizelge 1.8).

Çizelge 1.8. Standart bir PCR'da bulunması gereken bileşenler ve miktarları

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

1.5. RFLP (Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi: Restriction Fragment Length Polymorphism) Yöntem

DNA'nın enzimatik kesimi restriksiyon endonükleaz (RE) enzimlerinin kullanımı ile yapılır. 1950'li yılların başlarında varlıkları saptanan restriksiyon endonükleazları, çift iplikli sarmal DNA'da belirli nükleotid dizilerini tanıyarak DNA'nın her iki ipliğinde bu dizileri taşıyan yerlerden DNA'yı kesen enzimlerdir. Bakterilerde bulunan bu enzimler DNA'da özgün kısa dizileri tanır ve kesme işlemini, enzime göre değişmek üzere, tanıma yerinde veya bu yeri dışında başka

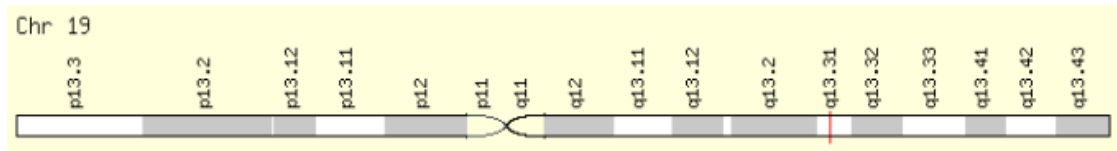
özel bir dizide gerçekleştirirler kesim sonucunda küt veya yapışkan uçlu DNA fragmentleri oluşur. DNA'nın bu enzimlerle kesilmesinden sonra agaroz jel elektroforezine tabi tutulmasıyla oluşan DNA bantlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe *Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi* (RFLP) adı verilir.

Restriksiyon enzimleri başlıca, TipI, TipII ve TipIII olmak üzere 3 tiptir. Bu enzimlerin tümü spesifik bir DNA dizisini tanır ancak TipII restriksiyon enzimleri DNA'yı tanıma bölgesinin içinden keserler. TipI ve TipIII enzimleri ise DNA'yı tanıma bölgelerinin dışından keserler. TipII restriksiyon endonükleaz, kesme işleminde en sık kullanılan ve en önemli olanıdır. TipII restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgeleri 4-8 baz dizisi uzunluğunda olabilir.

Restriksiyon enzimleri ve bunlarca kesilen fragmentler, DNA molekülünün fiziksel olarak haritalanmasında, bir popülasyondaki polimorfizmin analizinde, DNA moleküllerinin yeniden düzenlenmesinde, moleküler problemlerin hazırlanmasında, mutant üretiminde ve DNA'daki modifikasyonların tespitinde kullanılır (Dowling ve ark., 1996).

1.6. XRCC1 (X-Ray Repair Cross-Complementing Gene 1)

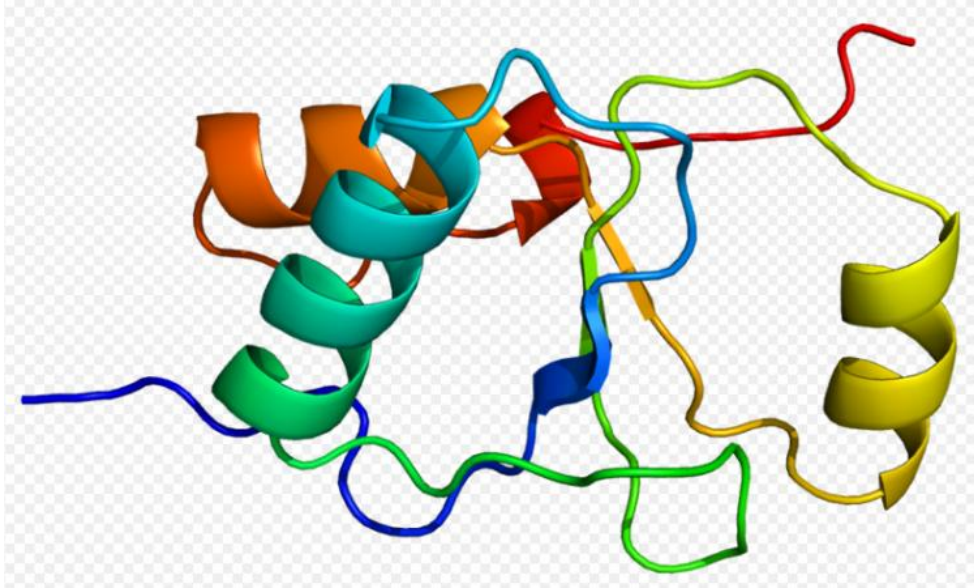
X-ray repaircross-complementing gen 1 (XRCC1) kromozom 19q13.2'de lokalizeolan ve 633aminoasitlik bir proteini kodlayan gendir. Bu protein BER ve tek zincir kırıklarında etken bir rolü vardır. XRCC1 geni 17 eksondan oluşup yaklaşık 31.9 kb uzunluğundadır (Şekil 1.24).



Şekil 1.24. XRCC1 geni

[(<http://genome.ucsc.edu/>), (<http://www.genecards.org/>) adreslerinden ulaşılarak derlendi]

DNA tamir genlerinden olan XRCC1 geni, serbest oksijen radikallerinin, iyonize radyasyonun, UV ve alkilleyicimutajenlerin yaptığı baz değişimi sonucu oluşan BER ve DNA tek zincir kırılmalarının onarılmasında rol alan proteini kodlar.

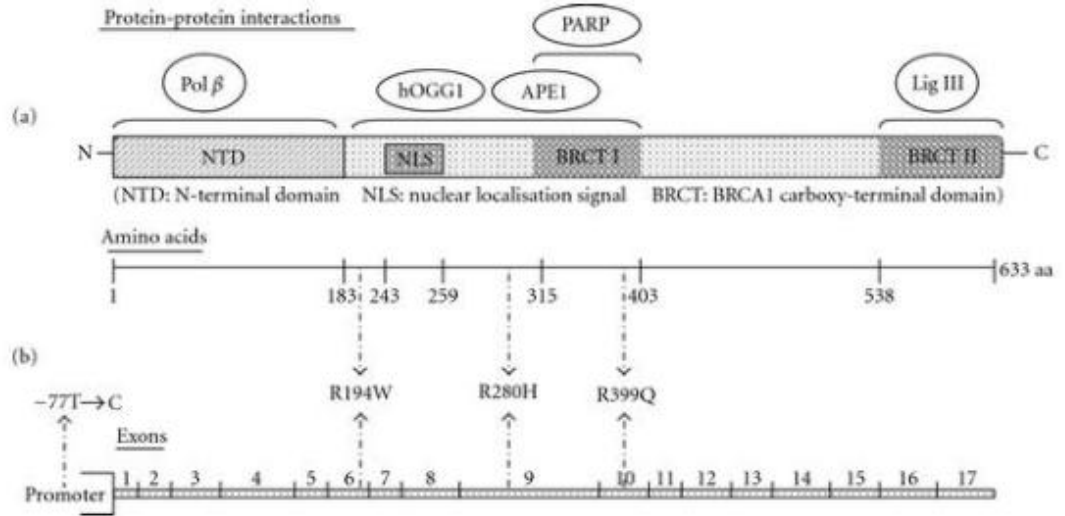


Şekil 1.25. XRCC1 proteinin yapısı

(<http://en.wikipedia.org/wiki/XRCC1> adresinden ulaşılarak düzenlendi.)

XRCC1 proteini fiziksel olarak ligaz III ve poli (ADP-riboz) polimeraz ile ilişkiye girerek, tek zincir kırıkları ve bazeksizyon tamirinde ve sisplatin-teşvikli hasarlarda (çift zincir kırıklarını içeren) homolog olmayan uç doldurma yolağı ile addüktlerin çıkarılmasında rol oynar.

XRCC1 sıklıkla çalışılan 3 tane DNA polimorfizmi vardır. Bunlar XRCC1 geninde kodon 194“Arjinin/Triptofan (Arg/Trp)”, kodon 280“Arjinin/Histidin (Arg/His)” ve kodon 399“Arjinin/Glutamin (Arg/Gln)”de tespit edilen polimorfizmlerdir.



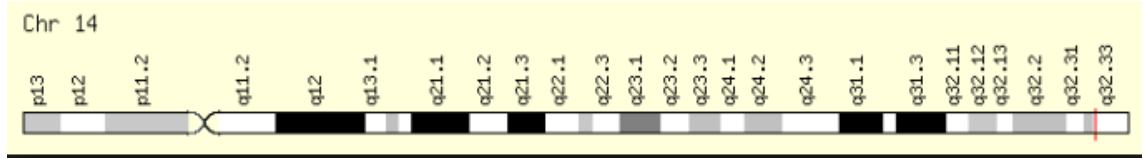
Şekil 1.26. XRCC1 proteini ve gen yapısı. a) XRCC1 etkileri ve BER bileşenleri ile etkileşim bölgeleri. b) genin yapısı ve sıklıkla çalışılan SNP'ler (Sterpone ve Cozzi, 2010).

XRCC1 geni ekson 10, kodon 399'da 28152. Pozisyonda Guanin_AdeninG→A dönüşümünün sonucu oluşan ve protein yapısında arjinin glutamin (Arg→Gln) aminoasit değişimine neden olan bir polimorfizmdir. Arg399Gln polimorfizminde, poly-ADP-ribozpolimeraz (PARP) bağlanma bölgesindeki bazdeğişiminden dolayı, genin kodladığı proteinde fonksiyonel değişime uğramaktadır. Bu değişimler korunan protein bölgelerinde BER kapasitesini değiştirebilir, DNA hasarı artırabilir (Cappelli ve ark. 1997; Sterpone ve Cozzi, 2010; Ladiges, 2006; Thompson ve West, 2000; Shall ve De Murcia, 2000; Caldecott ve ark. 1996, Kubota ve ark. 1996).

Arg399Gln varyantı kolorektal, baş ve boyun göğüs akciğer gastrik yemek borusu kanserleriyle daha sıklıkla çalışılmış ve ilişkilendirilmiştir (Deligezer ve Dalay, 2004; Ito ve ark. 2004; Duarte ve ark. 2005; Karahalil ve ark. 2006, Batar ve ark. 2009; Karkucak ve ark. 2012).

1.7. XRCC3 Geni (X-Ray Repair Cross-Complementing Gene 3)

XRCC3 geni (X-Ray Repair Cross-Complementing Gene 3) 1kromozom14q32.3'te lokalizeolan ve346 aminoasitli bir gendir. XRCC3 geni9 ekzondan oluşup yaklaşık 17kb uzunluğundadır (Şekil.1.27).



Şekil 1.27. XRCC3 geni (<http://www.genecards.org/>, <http://genome.ucsc.edu/> adreslerinden ulaşarak derlenmiştir)

XRCC3 proteini DNA çift zincir kırıkları ve çapraz bağların onarımında görevli olup homolog onarım yolağında görevli Rad51 protein ailesinin bir üyesidir



Şekil 1.28. XRCC3 protein yapısı (<http://www.genecards.org/>, <http://genome.ucsc.edu/> adreslerinden ulaşarak derlenmiştir)

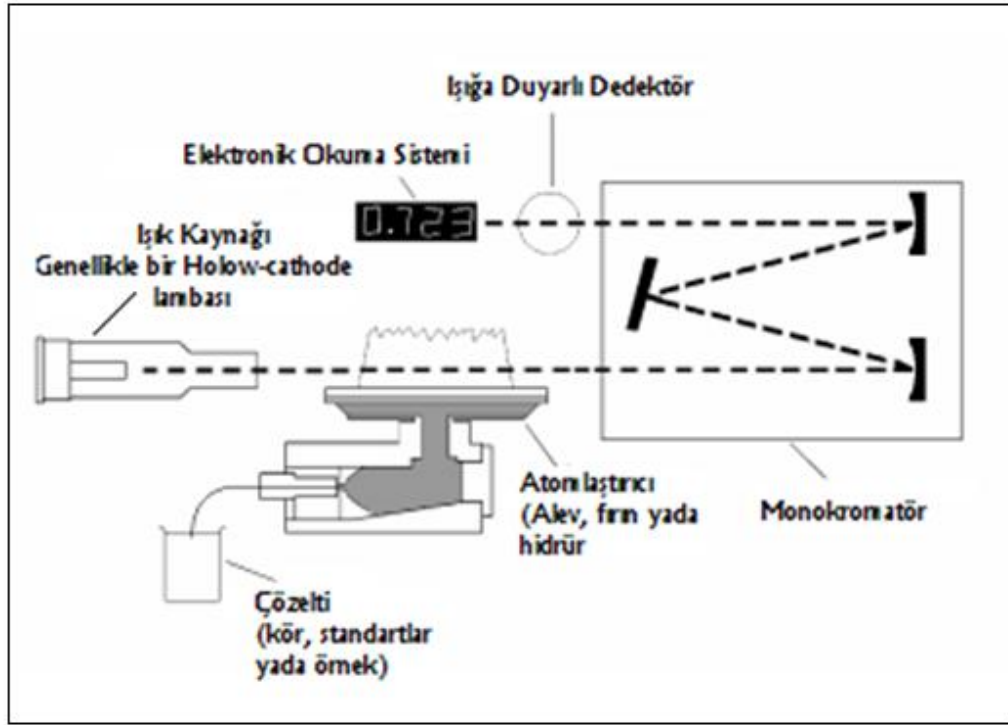
XRCC3, kimyasal ajanlar ve iyonize radyasyona karşı, kromozomal bütünlük ve hücre direncini sağlayan önemli proteinlerdendir. XRCC3 çift zincir kırıkları, çapraz bağları ve HR (homologous recombination) onarımını da içeren bir DNA onarım genidir (Duarte ve ark. 2005; Matullo ve ark. 2001).

XRCC3 geninde pek çok tek nükleotid polimorfizmi vardır. Ancak en önemli ve sıklıkla çalışılan polimorfizmi 7.ekzonda meydana gelen Thr241Met polimorfizmidir. Bu polimorfizm 241. Kodonda sitozinin timine değişmesi sonucu, treonin aminoasidinin yerini metioninin almasıyla gerçekleşir(Bănescu ve ark.2013). XRCC3 Thr241Met polimorfizmi göğüs, akciğer, deri, gastrik kanseri gibi pek çok kanser türü ile ilişkilendirilmiştir.Bazı çalışmalar bu polimorfizm ile yüksek kanser riski ile ilişkilendirirken, farklı sonuçlar gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Bastos et al., 2009; Bhatla et al., 2008; Hamano et al.,2008; Hamdy et al., 2011; He et al., 2012; Improtta et al., 2008; Lee et al., 2007; Romanowicz-Makowska et al., 2011; Seedhouse et al., 2004;Voso et al., 2007;Winsey et al., 2000; Zhao et al., 2012; Zhu et al., 2012).

1.8. Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi

Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi (AAS), bir örnekteki belirli metallerin kantitatif analizinde kullanılan bir tekniktir (Sperling ve ark.,1999). AAS çalışma prensibi, toprak, su, biyolojik materyaller gibi örneklerden elde edilen çözeltilerdeki elementin temel durumdaki atomlarının monokromatik ışınları Lambert-Beer Yasasına göre absorblamasına dayanır. Beer yasasına göre kimyasal bir madde tarafından absorbe olan ışık, analizi yapılan kimyasal maddenin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Erxleben, 2009).

Atomik absorbsiyon spektrofotometresinin bileşenleri, ışık kaynağı, atomlaştırıcıhücre, monokromatör ve detektördür(Koplik, 2012). Atomik absorbsiyon spektrofotometresinin ışık kaynağından gönderilen ışık gaz fazında aleve püskürtülmüş olan örnek tarafından absorbe edilir. Alevden geçen ışığın anlık yoğunluğunun absorbsiyonu ölçülerek analit belirlenir (Şekil 1.29).



Şekil 1.29. Atomik absorpsiyon spektroskopisinin şematik gösterimi (Varian Australia Pty Ltd (A.C.N. 004 559 540) 1997).

Bir örnekteki atomik maddelerin belirlenmesi için, atomlaştırılması gerekmektedir. Daha sonra elementlerin uyarılması için uygun dalga boyundaki ışık gönderilir. En son olarak dedektörde geçen ışık okunur. Atomlaştırıcı ve çevreden kaynaklanan emisyon etkisinin azaltılması için spektrometre, atomlaştırıcı ve dedektör arasında bulunur.

Atomlaştırıcı olarak genellikle alev (Alkameda ve ark., 1982) ve grafit fırın (L'vov, 1996) kullanılır.

1.8.1. Grafit Fırınlı Atomik Absorbsiyon Spektrometrisi

Grafit fırınlı atomik absorbsiyon spektrometrisi (GFAAS), numunenin tamamını çok kısa bir zamanda atom haline getirilir. Bunun sonucu, hem optik yol üzerindeki atomların sayısı, hem de optik yol üzerinde kalma süreleri arttırılır (birkaç saniye), böylece metodun hassaslığı artmaktadır.

Grafit fırın atomik absorpsiyon spektrometresi çok düşük miktarlardaki metal elementlerinin belirlenmesinde önemli bir yöntemdir. Bu yöntemle atomların oluşumu alev sayesinde değil, yanma başlığı yerine yerleştirilen grafit fırın atomizer içinde elektriksel olarak sağlanır. Alevli atomik absorpsiyon spektrometre yöntemine göre 1000 kat daha hassas bir yöntemdir, çok daha az miktarda numune ihtiyacı vardır ve numune hazırlama çok daha basittir. Grafit fırında atom oluşturma yöntemi üç basamakta meydana gelir. Kurutma, bu aşamada fırın içindeki numunenin çözücüsü uzaklaştırılır; Küllendirme, organik moleküller veya inorganik maddeler uzaklaştırılır; Atomlaştırma, bu aşamada serbest atomlar oluşturulur. Atomlaştırma aşamasında dik bir pik şeklinde absorpsiyon sinyali üretilir. Pik yüksekliği veya alanı analizi yapılan elementin miktarı ile doğru orantılıdır. Atomizasyon bu üç aşamada belli bir program dahilinde gerçekleşir. Bu program her element için ne kadar süre ile hangi sıcaklığı çıkılacağını içerir. Atomlaştırma aşamasında çıkılan sıcaklık her element için farklı olmakla beraber ortalama 2000 °C civarındadır. Atomlaşma grafit bir tüp içerisinde meydana gelir. Numune bu grafit tüp içine enjekte edilir. Tüpe yüksek akım uygulanarak ısıtılır, inert argon gazı grafit bölmeden geçirilir ve tüpü oksidasyondan korur. Soğutma su ile sağlanır. GFAAS’de 0,1–10 µL numune kullanılmakta ve grafit tüp içine cihaz tarafından bırakılmaktadır ve ppb düzeyinde sonuçlar elde edilmektedir (Clesceri, 1998).

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

PBS	Sigma-Aldrich
Histopaque (lenfosit ayırma çözeltisi)	Sigma-Aldrich
Na ₂ EDTA	Merck
Sodyum laurilsarkosinat	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
NaCl (Applichem)	Sigma-Aldrich
Asetik asid	Merck
LMA	Prona
NMA	Biotechnology Grade
HMA	Sigma-Aldrich
Trizma Base	Merck
NaOH	Sigma-Aldrich
DMSO	Merck
Triton X-100	Merck
Agaroz	Prona
Etidyum Bromür	Applichem

Etanol	Sigma-Aldrich
Restriksiyon enzimi (Nla III), (Msp I)Neb	New EnglandBiolab
PrimerlerAlpha DNA,	Montreal
Agaroz	Prona
Etidyum bromür	Applichem
6X loading çözeltisi	Qiagen
DNA'sRNA'sfreewater	Bome
Hot Star Taq DNA polimeraz	Qiagen
Fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1)	Applichem
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Applichem
Proteinaz K	Merck
100 bpladder	Fermentas
As Standart Çözeltisi	AA Standart Etanol pour SCP
Nitrik asit	Merck
Ortofosforik asit	Merck
Ultra Saf Deiyonize Su	

2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Floresan Mikroskop	Olympus BX50
Yatay elektroforez cihazı	Scie-Plas
Güç Kaynağı	Bio-Rad

Otoklav	Nüve
Santrifüj cihazı	Hettich
Vorteks karıştırıcı	Biosan
Otomatik mikropipet	Ependorf, Thermo
Manyetik Karıştırıcı	Mirak
Ph metre	Seven Multi MettlerToledo
Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi	Varian AA24OFS FastSequential
ZeemanAbsorpsiyon Spektroskopisi	Varian AA240Z
Grafit Tüp Atomlaştırıcı	Varian GTA 120
Grafit Komponent Tüpler	Varian GTA
Sample Cup 2 ml Vial	PothtechElkay
Mikrodalga Fırın	CEM Mars Xpres
Su Pürifikasyon Sistemi	Human UP 900 Scholar-UV
Etüv	Memmert
As Oyuk Katod Lambası	Varian
Polipropilen, Kapaklı Tüpler (50 ml' lik)	
Vial (2ml)	PothtechElkay
Hava Asetilen Tüpü	
Argon gaz tüpü	
Laminar Flow kabin	Esco

Thermal Cycle PCR cihazı	Techne Tc 512
Jel Görüntüleme cihazı	Syngene
Güç Kaynağı	Bio-Rad
Su banyosu	Nüve Bm 402
Soğutmalı santrifüj cihazı	Hettich
Mikrodalga fırın	Arçelik
Elektrikli hassas terazi	Schimadzu Libror
Laptop Cooler (-20°C)	Sigma
Hassas terazi	MettlerToledo 4 Digit
1.5 ml. ve 0.2 ml'lik ependorf steril tüpler	Axygen Genuine
pirojen free filtreli, pipet uçları	Finntip
(10 μl , 100 μl , 1000 μl .)	

2.1.3. Çözeltiler

2.1.3.1. PBS Çözeltisi

140 mMNaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1 mM NaH₂PO₄ ile hazırlandı.

2.1.3.2. Lizing Çözeltisi

2,5 M NaCl, 10 mMTris, 100 mM Na₂EDTA distile suda karıştırıcı yardımı ile çözüldükten sonra pH:10'a ayarlandı. Karışıma % 1 sodyum laurilsarkosinat ilave edilerek manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında saklandı. Kullanılacağı gün taze olarak %1 triton ve % 10 DMSO ilave edildi ve +4 ⁰C' de soğutuldu.

2.1.3.3. Elektroforez Çözeltisi

1mM Na₂EDTA ve 300 mMNaOHdistile suda karıştırıcı yardımı ile çözülerek pH> 13'e ayarlandı ve +4 °C'de saklandı.

2.1.3.4. Nötralizasyon Çözeltisi

0,4 M Trizmabasedistile suda manyetik karıştırıcı yardımı ile çözülerek Ph: 7.5'a ayarlandı ve +4 °C'de saklandı.

2.1.3.5. Etidium Bromür Çözeltisi

200 µg /ml stok çözeltiden 100 ml hazırlandı. Çözelti şişesi karanlıkta ve oda sıcaklığında saklandı. Bu stok çözeltiden boyama esnasında 20 µg/ml hazırlanarak her bir lama 60 µL damlatılarak kullanıldı.

2.1.3.6. Düşük Erime Noktalı Agar (LMA)

% 0,63'lük çözeltisi PBS ile çözülerek hazırlandı ve +4°C'de saklandı. Deney esnasında mikrodalga fırında çözöldü ve 37°C' ye getirilerek kullanıldı.

2.1.3.7. Normal Erime Noktalı Agar (NMA)

Yüksek erime noktalı agar (HMA): %1' lik çözeltisi PBS ile çözülerek hazırlandı. Çözelti sıcak iken lamalar bu çözeltinin içine daldırılarak agar ile kaplanıp oda sıcaklığında kurutuldu.

2.1.4. Deney Protokolü

2.1.4.1. Sıvı Kan Örneklerinin Toplanması

Çalışmaya Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesine başvuran 25-65 yaş arası 175 birey dahil edildi. Bireylerden 2 ayrı tüpte kan örnekleri alınmıştır. Comet analizi için heparinli vakumlu tüplere ; polimorfizm ve metal analizi için EDTA tüplere 4.5 ml kan alındı ve tüplerin üzerleri etiketlenerek comet analizi için kanlar taze çalışılıp, polimorfizm ve metal analizi için ise +4 °C’de muhafaza edildi.

Bu çalışma; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurulunun 8 Nisan 2013 tarih ve 06-242-13 sayılı kararı ve izni ile yürütülmüştür.

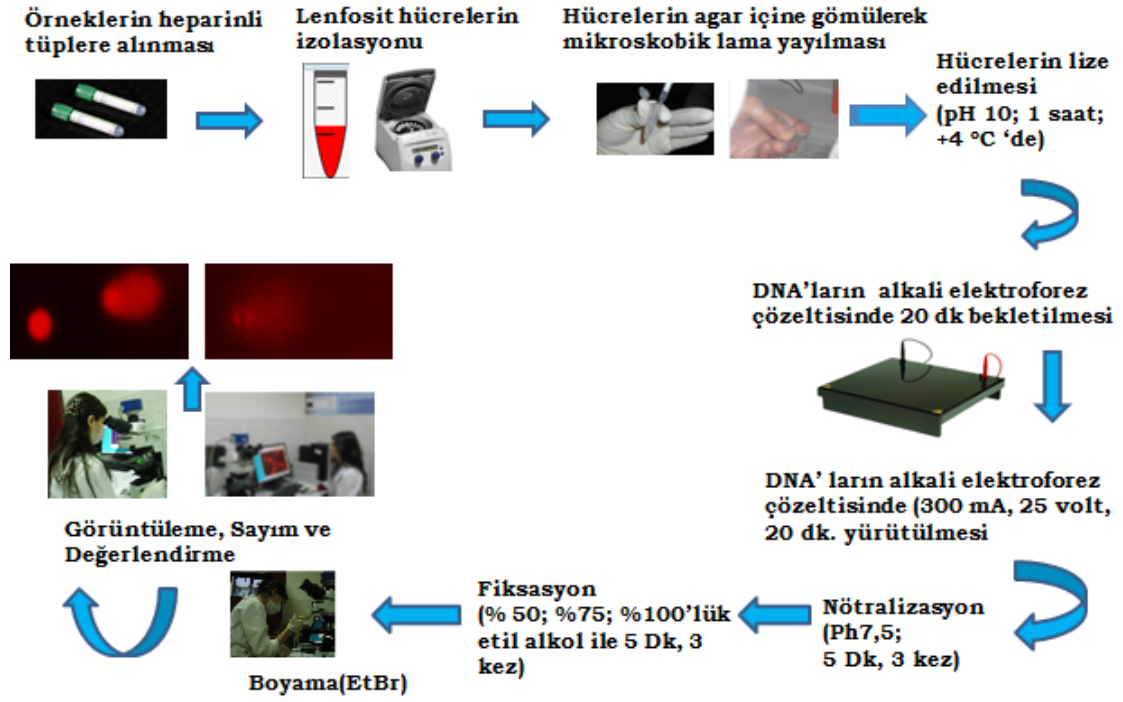
2.1.5. Yöntem

Bu çalışma ile ülkemizde yaşayan bireylerin ve metalle ilgili işyerlerinde çalışanların metallere maruz kaldıklarında görülebilecek genetik hasarların, toplumumuz bireylerindeki genetik polimorfizmlerle ilişkisinin belirlenmesi ve bireysel duyarlıkların saptanması amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmamıza 25-65 yaş arası metalle ilgili işyerlerinde çalışan işçileri denek grubu olarak seçilmiştir.

Çalışmamız üç bölümden oluşmaktadır. İlk bölümde meslek hastalıkları hastanesi başvuran 175 bireyin arsenik düzeyleri belirlenmiş ikinci aşamada comet analizi ile DNA hasar derecesi belirlenmiş, son bölümde ise hasarı belirlenmiş kan örneklerinin XRCCC1 ve XRCCC3 gen polimorfizmlerinin bu hasarlar yönünden etkisi araştırılarak karşılaştırma yapılmıştır.

2.1.5.1. Comet Assay ile Lenfosit DNA Hasarının Belirlenmesi

Heparinli tüplere alınan kanlardan izole edilen lenfositlerin DNA hasar derecesini belirlemek için Comet assay uygulandı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Comet assay aşamaları

2.1.5.1.1. Lenfosit izolasyonu

Periferik beyaz kan hücrelerinden kolay elde edilebilmesi ve vücuttaki oksidatif stres düzeyini iyi yansıtabilmesi nedeniyle, genotoksisite çalışmalarında en çok lenfositler kullanılmaktadır.

1. Steril ependorf tüplere 1'er mL PBS konuldu.
2. Heparinli tüplerden alınan 100 µl taze kan PBS üzerine eklenip vorteksleme işlemi gerçekleşti.
3. 100 µl histopaque ependorf tüpün dibine dikkatlice eklenerek tabakalanması sağlandı.
4. Ependorf tüpler 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi
5. Santrifüj sonrasında mikropipet kullanılarak pembe kısmın üzerindeki tabakada ayrılmış olan lenfositlerden 50 µl alındı.

2.1.5.1.2. Preparatların Hazırlanması

1. % 1'lik normal erime dereceli agaroz ve % 1'lik yüksek erime dereceli agaroz PBS solüsyonu kullanılarak hazırlandı.
- 2.Çözelti mikro dalga fırında çözüldü.
- 3.Rodajlı lamalar hazırlanan çözeltiye batırılıp çıkarılarak tek yüzünün kaplanması sağlandı
4. Üzerleri kaplanan lamalar oda sıcaklığında bir gece kurumaya bırakıldı.

2.1.5.1.3. Lamaların Jelle Kaplanması

Hücrelerin gömülmesi ve elektroforetik göçe hazırlık amacıyla,

1. Steril bir eppendorf tüpte 100µl LMA (37°C) içine 50 µl hücre eklendi.
2. Pipetaj yapılarak dikkatli ve hassas bir şekilde homojen karışımları sağlandı.
3. Mikropipet yardımıyla lam üzerine nazikçe damlatıldı lamelle kapatılarak yayma işlemi gerçekleştirildi.
4. Buz üzerinde 5-10 dakika katılaşması sağlandıktan sonra lamellerlamaların üzerinden agarozu kaldırmadan yavaşça çekildi velizing çözeltisine aktarıldı.

2.1.5.1.4. Lizis

1. Lizis solüsyonuna %1'lik triton X ve %10 DMSO kullanmadan hemen önce ilave edilerek taze solüsyon elde edildi.
2. Preparatların üzeri bu solüsyon ile kaplanarak buzdolabına kaldırıldı. 1 saat 20 dklizis solüsyonunda bekletildi.

2.1.5.1.5. Elektroforez

DNA kırıklarını görünür hale getirmek için elektroforetik yürütme işlemi uygulandı.

1. Taze hazırlanmış elektroforez tamponu, kullanılmadan önce buzdolabında soğutuldu.
2. Çözelti elektroforez tankına aktarıldı.
3. Lamlar artı kutba ve birbirlerine mümkün olduğunca yakın olacak şekilde elektroforez tankına yerleştirildi.
4. Tampon içinde lamlar DNA unwinding (çift sarmal DNA'nın tek sarmala dönüşmesi) için 20 dakika bekletildi.
5. Bu esnada direk ışıktan kaçınmak amacıyla tankın kapağı kapalı tutulup alüminyum folyo ile kaplandı.
6. Güç kaynağı 300 mA, 25 volta ayarlanarak 20 dakika süreyle elektroforetik yürütme işlemi gerçekleştirildi.

2.1.5.1.6. Nötralizasyon

Oluşan kimyasal reaksiyonu stabilize etmek ve fazla tuz ve deterjanı uzaklaştırmak amacıyla yapılır. Bir penset yardımıyla tanktan çıkarılan lamlar, pH'ı 7.5 olan 4°C'deki nötralizasyon tamponunda 5'er dakika süreyle 3 kez yıkandı.

2.1.5.1.7. Fiksasyon

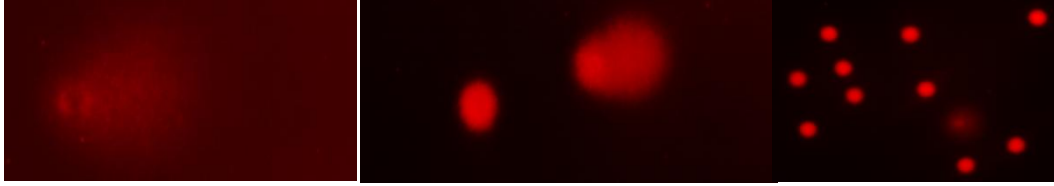
Lamlar sırasıyla % 50, % 75, % 100'lük alkollerde 5'er dakika bekletildi.

2.1.5.1.8. Boyama

Stok çözeltiden 20 µg/ml çözelti hazırlandı ve her bir lama 60 µL damlatılarak kullanıldı.

2.1.5.1.9. Görüntüleme

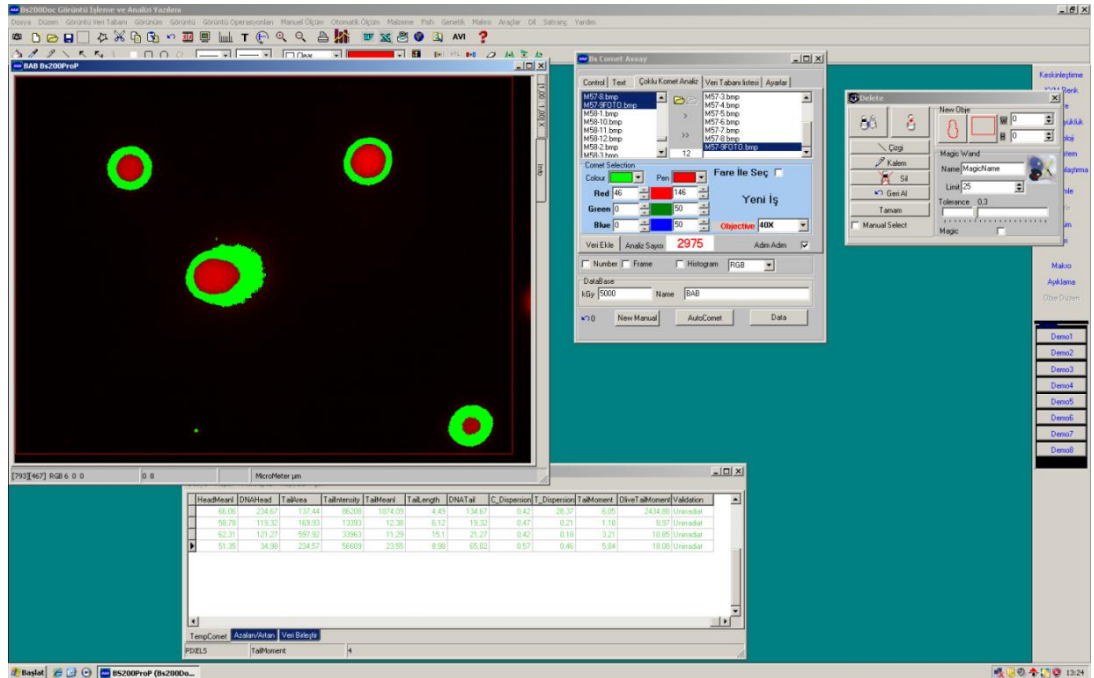
Boyanan preparatlar floresan mikroskopta incelendi ve elde edilen örnek görüntüler şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Comet Görüntüsü

2.1.5.1.10. Sayım ve Hesaplama

Her bir denek için rastgele seçilen 100 comet örneğinin baş ve kuyruk kısmı ince hatlarla belirlendi. Seçilen cometler BABBs otomatik analiz sistem ile değerlendirildi. Lenfosit DNA’ları BABBs otomatik analiz sisteminin 4 parametresine, cometlength (CL), taillength (TL), tailintensity (TI), DNA tail (DNAt), tail moment (TM) göre hasar derecesi belirlendi.



Şekil 2.3. BAB Bs Otomatik Analiz Sistemi

2.1.5.2. XRCC1 (Arg399Gln) ve XRCC3 (Thr241Met) Genotiplerinin Belirlenmesi

2.1.5.2.1. Sıvı Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Sıvı kan örneklerindeki nDNA'yı açığa çıkarabilmek amacıyla fenolkloroform- izoamil-alkol ekstraksiyon yöntemi kullanıldı.

1. 200 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.

2. Üzerine;

45 µl NaCl (1 M),

40 µl SDS (%20'lik),

400 µl TE ve

7 µl proteinaz K eklenerek kısaca vortekslendi.

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

4. Fenol-kloroform-izoamil alkol karışımından 500 µl ilave edildi ve kısaca vortekslendi

5. 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.

6. Alt faz hareket ettirilmeden üst faz yeni bir ependorf tüpe alındı ve alt faz atıldı.

7. 1000 µl soğuk saf etil alkol ilave edildi.

8. 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

9. Alkol oluşan pelete zarar vermeden dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.

10. 500 µl %70'lik oda sıcaklığında etil alkol ilave edildi.

11. 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

12. Ependorf tüpün içerisinde bulunan tüm alkol dikkatlice uzaklaştırıldı.

13. Tüpün dibinde kalan alkol de tamamen uçurulduktan sonra 150 µlDNase-RNasefree su ilave edildi.

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

2.1.5.2.2. Genomik DNA’nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi

Kan örneklerinden genomik DNA’nın izole edilip edilmediğinin analizi %0.5’lik agaroz jel elektroforezi ile belirlendi.

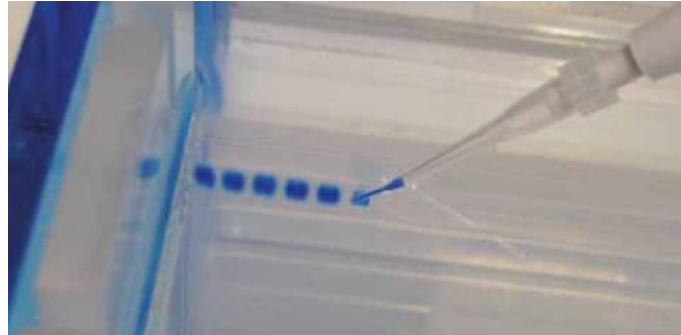
2.1.5.2.3. %0.5’lik Agaroz Jel Hazırlanması

1. 0.6 gr agaroz tartıldı ve 120 ml 1X TBE çözeltisi içerisinde çözüldü.
2. Mikrodalga fırında agarla hazırlanan çözelti kaynatıldı.
3. Çözeltinin oda sıcaklığında 50–60 0C’ye düşmesi sağlandı..
4. Üzerine 10 µl EtBr (10 mg/ml) eklendi ve hafifçe çözelti pembeleşip homojen karışım sağlanıncaya kadar erlen çalkalandı.
5. 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.
6. Jelin katılaşması için oda sıcaklığında 30–45 dakika bekletildi.
7. Taraklar ve bariyerler çıkarılarak kalıp elektroforez tankına yerleştirildi. Jel kuyucuklarının, yürüme tankının katot elektrot (-) tarafına yerleştirilmesine dikkat edildi.

8. Jelin üzerini 2–3 mm kaplayacak miktarda tank içerisine 1X TBE çözeltisi eklendi.

2.1.5.2.4. Agaroz Jele Yüklemek İçin Örnek Hazırlanması ve Yürütme Koşulları

1. 15 cm uzunluğunda parafilm kesilerek buz kalıbı üzerine yerleştirildi.
2. 1µl 6X Jel LoadingBuffer ve 5 µl DNA örneği parafilm üzerine konuldu ve homojenizasyon için mikropipet yardımı ile yavaşça karıştırıldı.
3. Toplam 6 µl karışım dikkatli bir şekilde jel kuyucuklarına yerleştirildi.
4. Güç kaynağı 100 V ve 70 mA ayarlanarak, numuneler 45 dakika jel üzerinde yürütüldü.
5. UV ışığında, jel görüntüleme cihazında sonuçlar değerlendirildi.



Şekil 2.4. Agaroz jel kuyucuklarına örneklerin yüklenmesi

PCR işlemi sırasında olası kontaminasyonu önlemek amacıyla;

- ✓ DNA izolasyonları ve PCR farklı ortamlarda yapıldı,

- ✓ Her analiz öncesi ve sonrasında çalışma ortamı, otomatik pipetler ve kullanılan araçlar %70'lik alkol ile temizlendi,
- ✓ Steril eppendorf tüpler ile filtreli pipet uçları kullanıldı,
- ✓ Amplifikasyon ve enzim kesim işlemleri hava sirkülasyonu olan laminar kabin içerisinde yapıldı, işlem öncesi ve sonrasında en az 45 dakika süre ile UV sterilizasyonu yapıldı,
- ✓ Analizler sırasında steril ve pudrasız eldivenler kullanıldı, çalışma sırasında eldivenler sık sık yenileri ile değiştirildi.

2.1.5.2.5. PCR

DNA örneklerinde XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met genotiplmeleri için ilk önce tek nokta mutasyonunu içeren gen dizilimleri PCR yöntemi ile çoğaltıldı. PCR işlemi TECHNE TC 512 ThermalCycle cihazı ile gerçekleştirildi ve hedeflenen DNA bölgesinin her biri 2³⁵ defa çoğaltıldı.

2.1.5.2.6. Primer Listesi

Amplifikasyon için Forward (F: direkt) ve Reverse (R: karşıt) primerleri kullanıldı. Primerler HPSF (High Performance Salt Free) yöntemi ile Montreal'deki Alpha DNA firmasına sentezlettirildi. Kullanılan primerler ve özellikleri çizelge 2.1' ve 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Amplifikasyonda kullanılan XRCC1 primerleri ve özellikleri

ÖZELLİKLER	F PRİMER	R PRİMER
XRCC1	5'-TCTCCCTTGGTCTCCAACCT-3'	5'-AGTAGTCTGCTGGCTCTGG-3'
Uzunluk	20 bp	20 bp
GC içeriği	%55	%55
Erime Sıcaklığı (T _m)	61.0 °C	55.6 °C
Primerler arası T _m farkı	5.4 °C	

Çizelge 2.2. Amplifikasyonda kullanılan XRCC3 primerleri ve özellikleri

ÖZELLİKLER	F PRİMER	R PRİMER
XRCC3	5'-GGTCGAGTGACAGTCCAAAC-3'	5'-TGCAACGGCTGAGGGTCTT-3'
Uzunluk	20 bp	20 bp
GC içeriği	%55	%55
Erime Sıcaklığı (T _m)	58.1 °C	64.3 °C
Primerler arası T _m farkı	6.2 °C	

2.1.5.2.7. PCR Bileşenleri ve PCR Programı

Standart bir PCR reaksiyonunda PCR Buffer, dNTP karışımı, Hot Star Taq DNA Polimeraz, F Primer, R Primer ve DNA bileşenleri bulunmaktadır. Çalışmada kullanılan PCR reaksiyonunun bileşenleri, bileşenlerin stok konsantrasyonları, reaksiyondaki miktarları ile reaksiyon karışımındaki final konsantrasyonlarına ait bilgiler çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. PCR bileşenleri ile stoktaki ve reaksiyondaki konsantrasyonları

Bileşen	Stok konsantrasyon	Reaksiyona konulan miktar	25 µl'lik reaksiyon karışımındaki final konsantrasyon
10 X PCR Buffer	10X	2.5 µl	1X
dNTP karışımı	2mM	2 µl	200 µM
F Primer	10 pmol/ µl	0.5 µl	10 pmol/ µl
R Primer	10 pmol/ µl	0.5 µl	10 pmol/ µl
Hot Star Taq DNA Polimeraz	5 U/ µl	0.125 µl	1.25 U
DNA		5 µl	~200 ng
Steril H₂O		17 µl	

PCR programı aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

- + 94 °C'de 10 dakika
 - + 94 °C'de 1 dakika
 - + 60 °C'de 1 dakika
 - + 72 °C'de 1 dakika
 - + 72 °C'de 5 dakika
 - + 4 °C'de ∞ dakika
- } 35 döngü

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

XRCC1 (Arg399Gln) ve XRCC3 (Thr241Met) için PCR programı çizelge 2.3'de belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

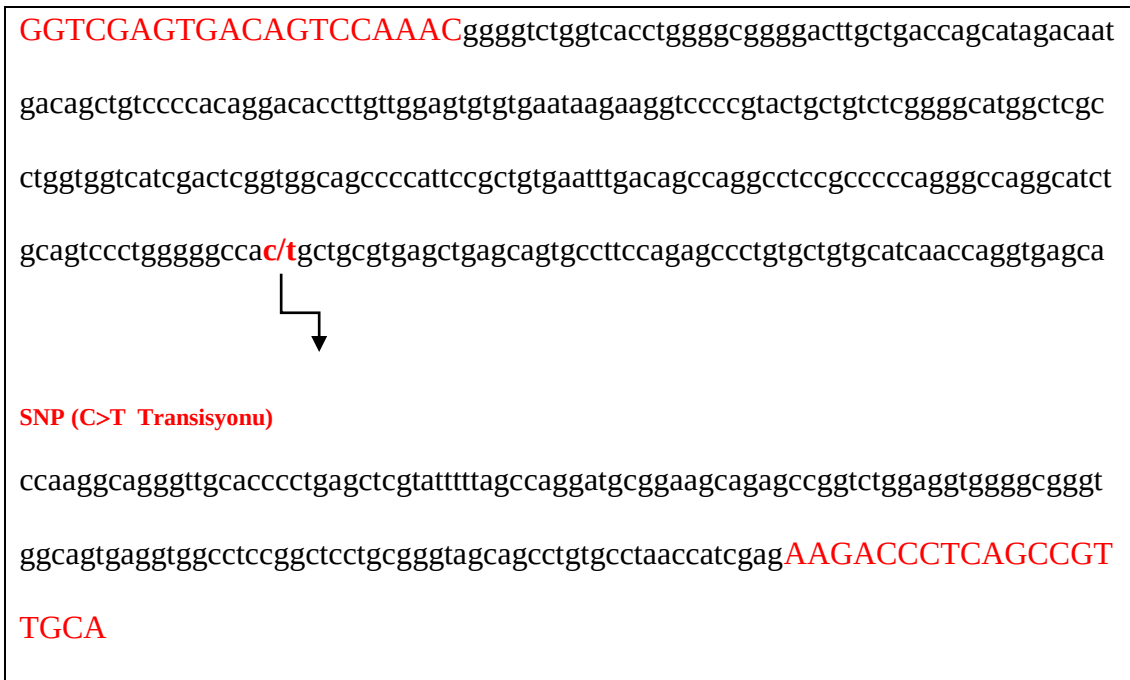
Çizelge 2.4. XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met genotipleme için PCR şartları

Şartlar	°C	Süre (dakika)
Başlangıç denatürasyonu	94 °C	10
Denatürasyon	94 °C	1
Bağlanma	60 °C	1
Uzama	72 °C	1
Son uzama	72 °C	5
	4 °C	∞dakika
Siklus sayısı	35 döngü	

PCR sonucunda XRCC1 geni için 403bp'lik, XRCC3 geni için ise 456 bp'lik PCR ürünleri elde edildi. Bu ürünlerin baz dizilimi, XRCC1 Arg/Gln ve XRCC3 Thr/Met aminoasit değişimine neden olan tek nokta mutasyonlarının yeri ve primer dizilimleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil.2.5), (Şekil.2.6).



Şekil.2.5. XRCC1 Arg399Gln genotiplemesi için PCR ile çoğaltılan 403 bp'likbaz dizilimi, XRCC1-F ve XRCC1-R primerleri ve tek nokta mutasyonu



Şekil 2.6. XRCC3 Thr241Met genotiplemesi için PCR ile çoğaltılan 456 bp'likbaz dizilimi, XRCC3-F ve XRCC3-R primerleri ve tek nokta mutasyonu.

2.1.5.2.8. PCR Ürünlerinin Jele Uygulanması ve Elektroforez

PCR işlemi bitiminde, polimorfizmin yer aldığı istenilen dizinin amplifikasyonunun doğru olarak gerçekleştiğini kontrol etmek amacıyla 8 µl PCR ürünü ile 1 µl 6X Jel Loading Buffer karıştırılarak % 2'lik normal agaroz jele yüklendi. Bunun için 2.4 gr. agaroz tartılarak 120 ml 1XTBE içerisinde çözüldü ve bölüm 2.1.4.2.2' de yapıldığı şekilde işleme devam edildi. 100 bp DNA ladder kullanıldı ve 1 µl DNA ladder, 1 µl 6X Jel Loading Buffer ve 6 µl distile su karıştırılarak yükleme yapıldı. Jel 100 Volt ve 70 Amperde 1 saat elektroforeze tabi tutuldu ve PCR ürünleri UV ışığında, jel görüntüleme sistemi ile değerlendirildi.

2.1.5.2.9. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi (RFLP)

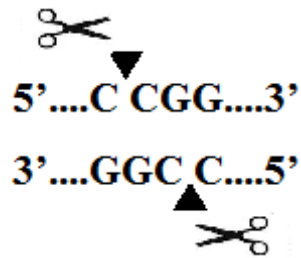
PCR sonucu amplifiye edilen polimorfik gen bölgeleri bu bölgelere spesifik restriksiyon endonükleazlar ile muamele edilerek kesildi. XRCC1 (Arg399Gln) PCR ürünlerinde 25487. bazdaki G→A transisyonu MspI enzimi için, XRCC3 (Thr241Met) PCR ürünlerinde 18067. bazdaki C→T transisyonu ise NlaIII enzimi için restriksiyon bölgesini oluşturur. Böylece RFLP yöntemi ile Arg399Gln ve Thr241Met değişimleri belirlenmiştir. PCR ürününün RFLP yöntemi ile kesim işlemi negatif ve pozitif örnekler de kontrol amacıyla analizlere alındı.

2.1.5.2.10. Kullanılan Kesim Koşulları

- XRCC1(Arg399Gln) gen bölgesi için kesim koşulları:
 15 µl Nükleaz Free H₂O
 2 µl 10X Buffer
 0.25 µl MspI
 10 µl PCR ürünü

olmak üzere her bir örnek için toplam hacim 27,25 μ l'dir. Enzim kesimi için 37 $^{\circ}$ C'de bir gece inkübe edildi.

MspI enziminin tanıma bölgesi:



- XRCC3 (Thr241Met) gen bölgesi için kesim koşulları:

10 μ l NükleazFree H₂O

2 μ l NEB4 Buffer

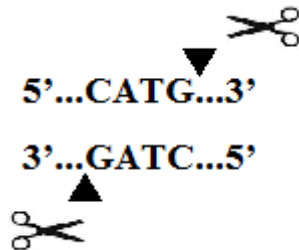
0.2 μ l BSA

0.5 μ l Nla III

10 μ l PCR ürünü

olmak üzere toplam hacim her bir örnek için 22.7 μ l'dir. Enzim kesimi için 37 $^{\circ}$ C'de bir gece inkübe edildi.

NlaIII enzimi tanıma bölgesi:



2.1.5.2.11. Kesim Ürünlerinin Agaroza Jel Elektroforezine Uygulanması ve Genotip Tayini

XRCC1 (Arg399Gln) ve XRCC3 (Thr241Met) genotiplemesi için çoğaltılan PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilmesiyle elde edilen ürünler 6X yükleme boyası ile (8 µl kesim ürünü 1 µl boya ile karıştırıldı) bölüm 2.1.4.2.3.3'te anlatıldığı şekilde % 2'lik jele yüklendi ve elektroforeze tabi tutuldu. Sonuçlar UV ışığında, jel görüntüleme sistemi ile değerlendirildi.

2.1.5.3. Örneklerin Arsenik Analiz İşlemleri

2.1.5.3.1. Örneklerin Analize Hazırlanması

Çalışmaya dahil edilen bireylerden 10 ml venözkan polimorfizm çalışması ve metal analizi için EDTA'lı vakumlu tüplere, alındı. Alınan kan örnekleri analiz zamanına kadar +4 °C' de saklandı. Kan örneklerinden ayrı ayrı 1'er ml çekilerek yüksek sıcaklığa dayanıklı mikrodalga teflon tüplerine konuldu. Bir sonraki aşamada üzerine 5 ml %65'lik nitrik asit (HNO₃) eklenerek, 1600W'da 20 dakika boyunca mikrodalga fırında yakma işlemi yapıldı. Yakma işlemine ait mikrodalga fırın programı çizelge 2.5.'te gösterilmiştir. Yakılan doku örnekleri 15 ml'lik döner kapaklı polipropilen tüplere aktarılıp, toplam hacim deiyonize su ile 10 ml'ye tamamlandı.

Örnekler analize kadar kapaklı polipropilen tüplerin içinde +4 °C' de saklandı.

Max. Güç (Watt)	Güç %	Zaman (dak.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme (dak.)
1600	100	20:00	200	5:00

Çizelge 2.5. Mikrodalga fırına ait tam kan yakma programı.

2.1.5.3.2. Örneklerdeki Arsenik Düzeyinin Belirlenmesi

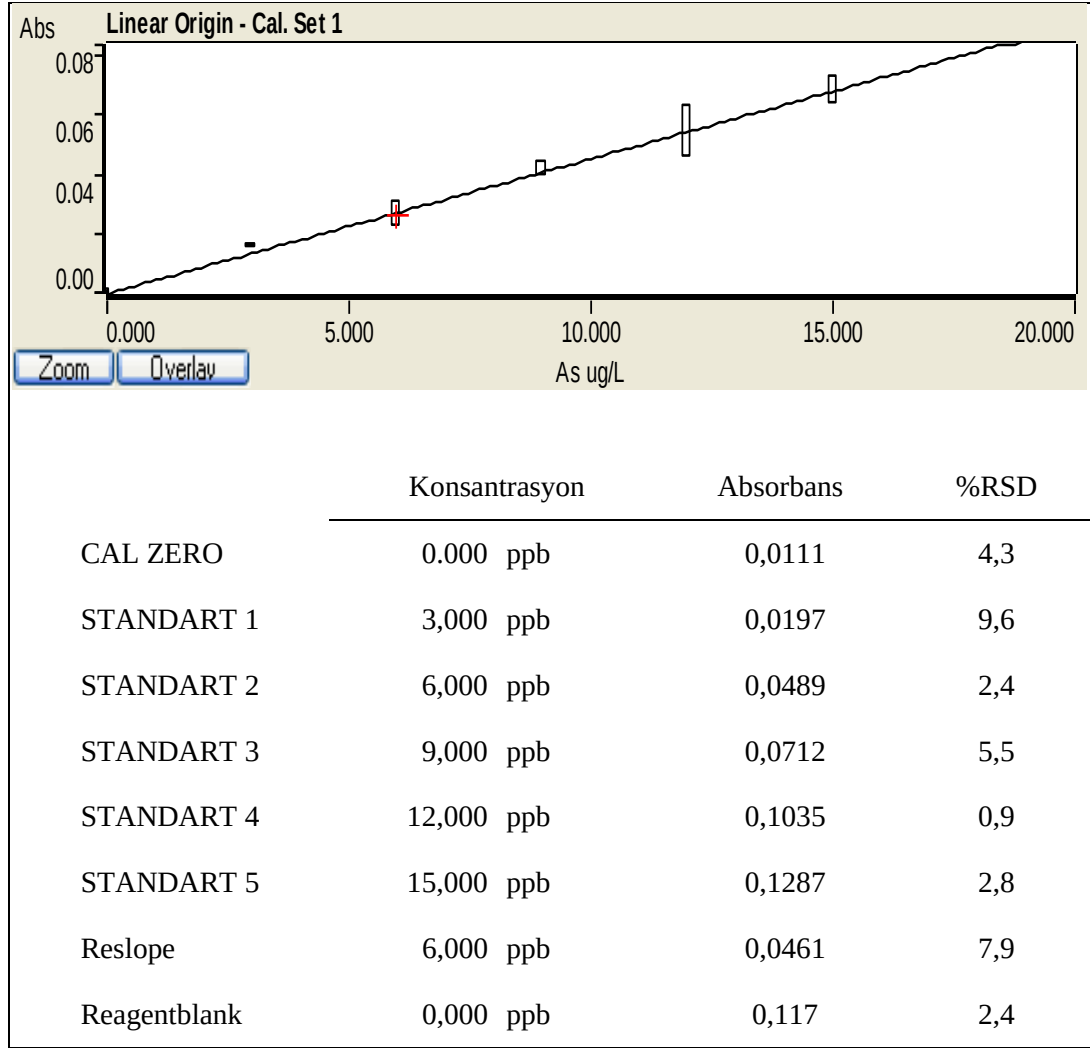
Kandaki As düzeyini belirlemek amacıyla, Varian AA240Z Zeeman Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi cihazı kullanıldı. 1000 ppm'lik arsenik stok solüsyonundan kalibrasyon eğrisini oluşturmak üzere 15 ppb konsantrasyonunda ana standart hazırlanarak, 3 ppb, 6 ppb, 9 ppb, 12 ppb ve 15 ppb konsantrasyonları ile 5 noktalı kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Hazırlanan standartlara ve ultra saf suya kontaminasyonun önlenmesi ve keskin bir pik elde edilebilmesinin sağlanması için %65 saflıkta nitrik asit eklendi.

Kalibrasyon eğrisi için her bir standart çözelti için 3 kez ölçüm yapıldı. Arsenik analizi için dalga boyu 193,7 nm olarak ayarlandı. Ölçüm kalibrasyon eğrisi için konsantrasyon, biyolojik örnekler için ise pik yüksekliği ile yapıldı. Kalibrasyon 50 örnekte bir tekrarlandı. Örnekler için ise üçer kez ölçüm yapıldı. Atomlaştırıcı olarak grafit fırın ve ortam gazı olarak Argon kullanıldı.

Sıvı Kan Örneklerinden Arsenik Analizine ait Grafit Fırın Sıcaklık Programı çizelge 2.7 'de örnek kalibrasyon grafiği şekil 2.7. 'te verilmiş ve cihaza ait metod ayrıntıları çizelge 2.8'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.7. Sıvı Kan Örneklerinden Arsenik Analizine ait Grafıt Fırın Sıcaklık Programı

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



Şekil 2.7. Tam Kanda Arsenik Analizine Ait Örnek Kalibrasyon Grafiği

Şekil 2.8. Grafit Fırınlı Atomik Absorpsiyon Spektrometre Cihazında Arsenik Metalinin Analizi için Tam Kanda Uygulanan Metot

Element –matriks	: As – sıvı kan
Enstrüman	: Zeeman
Konsantrasyon birimi	: $\mu\text{g} / \text{L}$
Enstrüman modu	: Absorbans
Örnekleme	: Otonormal
Kalibrasyon modu	: Konsantrasyon
Ölçüm modu	: Pik yüksekliği
Standart tekrarı	: 3
Örnek tekrarı	: 3
Eğri çizimi	: 7 noktalı
Konsantrasyon ondalık aralığı	: 2 basamak
Dalga boyu	: 193,7 nm
Slit genişliği	: 0.5 nm
Gain	: % 64
Akım	: 12 mA
Background	: BC on
Standart 1	: 3 $\mu\text{g} / \text{L}$
Standart 2	: 6 $\mu\text{g} / \text{L}$
Standart 3	: 9 $\mu\text{g} / \text{L}$
Standart 4	: 12 $\mu\text{g} / \text{L}$
Standart 5	: 15 $\mu\text{g} / \text{L}$
Eğri düzeltmesi standardı	: Standart 2 (6 ppb)

Reslope alt limit	: % 75
Reslope üst limit	: % 125
Rekalibrasyon	: 50 örnekte bir
Kalibrasyon algoritması	: LinearOrigin
Total enjeksiyon hacmi	: 25µl
Ana standart konsantrasyonu	: 15 µg /L

3. BULGULAR

Bu çalışmada iş yerlerinde metal maruziyeti bilinen bireylerdeki kan arsenik düzeyleri ölçülmüş ve comet yöntemi ile lenfositlerindeki DNA hasarı belirlenerek, XRCC1 ve XRCC3 gen polimorfizmlerinin işçilerdeki arsenik düzeyleri ile DNA hasarlarına etkisi araştırılmıştır. Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesine başvuran 175 gümüş fabrikası işçisinin kan örnekleriyle analizler yapılmıştır. İşçilerin yaş, çalışma yılları ve sigara kullanımları bilgileri ile istatistiksel karşılaştırmalar yapılarak değerlendirilmiştir.

İstatistiksel analizlerde SPSS V16 kullanılmıştır. Ölçümle elde edilen değişkenler bakımından bağımsız iki grubun karşılaştırılmasında “Student t” testi kullanılmıştır. Comet parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişkinin olup olmadığının araştırılması için Pearson’ın Korelasyonu” kullanılmıştır. DNA hasarı ve XRCC1, XRCC3 gen polimorfizmleri arasındaki ilişki Mann Whitney U Testi ile değerlendirilmiştir. Tanımlayıcı istatistik olarak değişkenlerde ortalama±standart sapma verilmiştir. $p<0.05$ ve $p<0.01$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.1. Ölçülen Parametrelerin Tanımlayıcı İstatistikleri

Arseniğe maruz kalan bireylerden toplanan kan örneklerinde comet parametreleri, kan arsenik düzeyleri, bireylerin yaşlarının ve çalışma sürelerinin ortalama, standart sapma değerleri hesaplanarak çizelge 3.1.’ de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Arseniğe maruz kalan bireylerden toplanan kan örneklerinde cometparametreleri, kan arsenik düzeyleri, bireylerin yaşlarının ve çalışma sürelerinin ortalama, standart sapma.

Parametre	n	Ortalama±Standart sapma
Tail Intensity	175	463341,27±2,09
Comet Lenght	175	27,71±2,78
Tail Lenght	175	5,58±1,29
As (µg/dl)	175	17,15±11,30
Yaş (yıl)	175	32,60±7,60
Çalışma Süresi (yıl)	175	3,30±1,95

3.2. Comet Parametreleri ve Kan Arsenik Düzeyleri Arasındaki Korelasyon

Comet parametrelerinin birbirleri ile ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi sonucunda, comet parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitifkorelasyon olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$). Bunun yanısıra comet parametreleri ve kandaki arsenik düzeyleri arasındaki istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir CL, TI ($p<0.001$), TL ($p<0.05$). Ancak maruziyet süreleri ile DNA hasar parametreleri ve kan As düzeyi arasındaki korelasyonda istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmemiştir($p>0.05$).Comet

parametreleri, kan As düzeyleri ve maruziyet süreleri arasındaki korelasyon çizelge.3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Comet parametreleri, kan As düzeyleri ve maruziyet süreleri arasındaki korelasyon.

		Maruziyet yılı	Comet Length	Tail Intensity	Tail Lenght	As
Maruziyet yılı	r	1,000	0,044	0,059	0,011	0,007
	p	0,566	0,439	0,884	0,143	0,007
Comet Length	r	0,044	1,000	0,675**	0,728**	0,373**
	p	0,566		0,000	0,000	0,000
Tail Intensity	r	0,059	0,675**	1,000	,609**	0,340**
	p	0,439	0,000		0,000	0,000
Tail Lenght	r	0,011	0,728**	0,609**	1,000	0,180*
	p	0,884	0,000	0,000		0,017
As	r	0,007	0,373**	0,340**	0,180*	1,000
	p	0,922	0,000	0,000	0,017	0,038

*p<0,05; **p<0.01

3.3. Sigara İçimi, Kan Arsenik Düzeyi ve DNA Hasarı Arasındaki İlişki

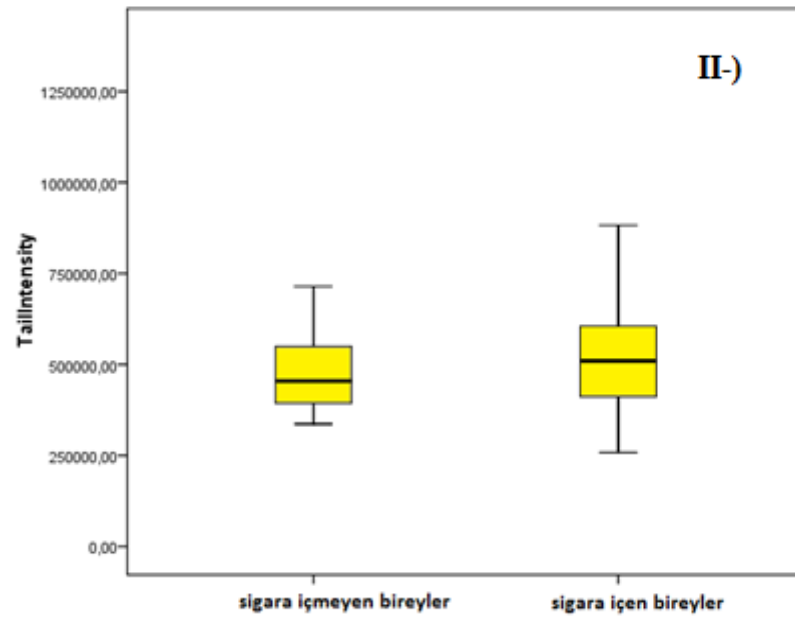
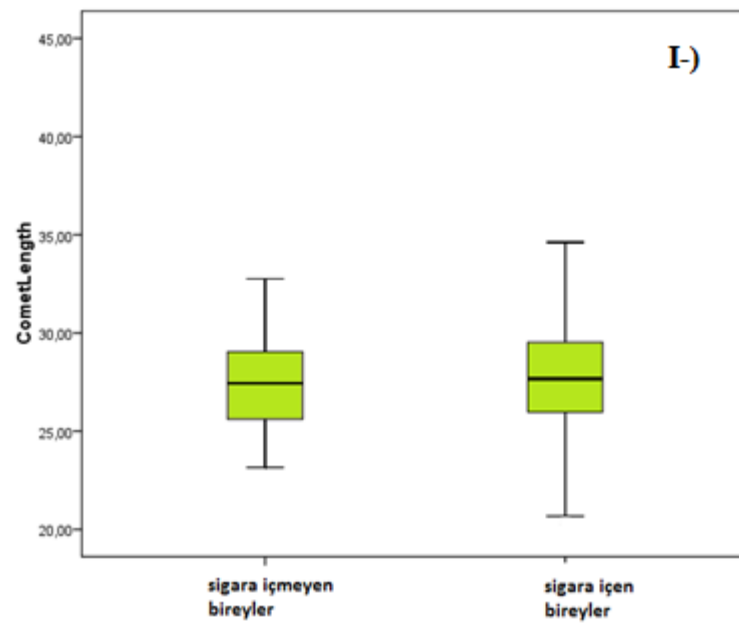
Sigara içen ve sigara içmeyen bireyler arasında kan Asve DNA hasarı parametreleri değerlendirilmiş, sigara içen grupta kan As düzeyleri ve DNA hasar dereceleri (TI, CL, TL parametrelerinde) sigara içmeyen gruba göre yüksek olduğu belirlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilememiştir (p>0.05) (çizelge

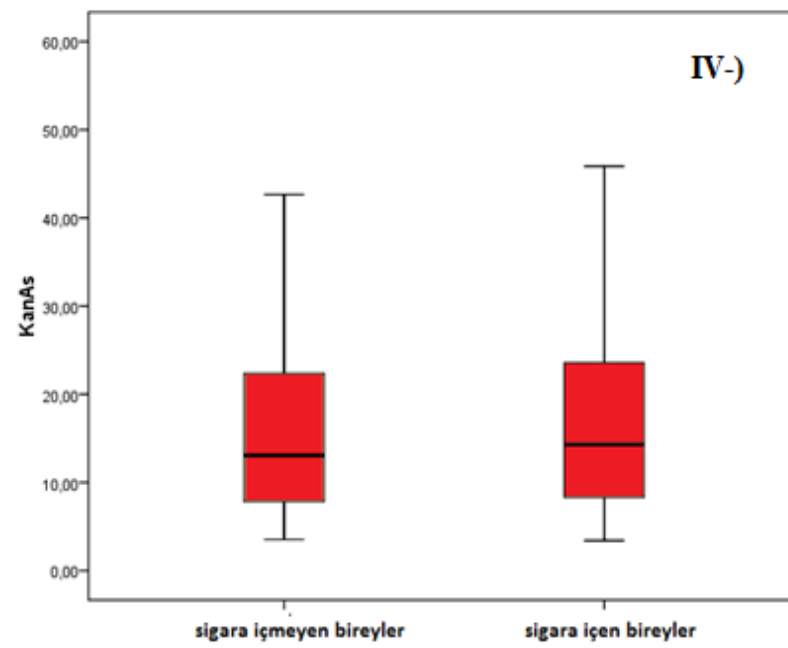
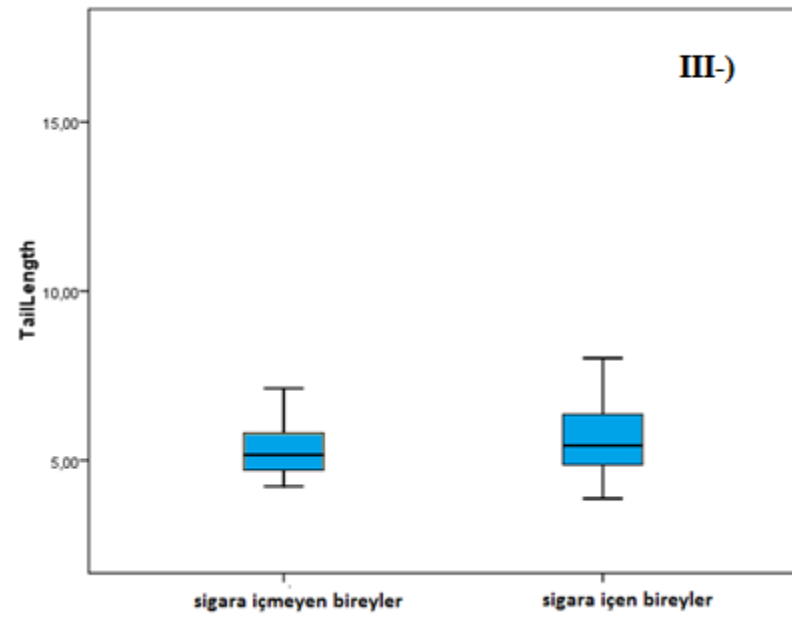
3.3). DNA hasar parametreleri ve kan As düzeylerinin sigara içimi açısından değerlendirilmesi çizelge 3.3’de ve şekil 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Sigara içen ve sigara içmeyen bireylerde ortalama kan arsenik düzeyi ve DNA hasarının (TI, CL, TL) karşılaştırılması.

Sigara İçme Alışkanlığı	n (=175)	CL Ortalama±Standart sapma	TI Ortalama±Standart sapma	TL Ortalama±Standart sapma	Kan As Düzeyi
Sigara İçen Grup	115	27,80±2,97	476575,19±2,20	5,72±2,20	17,55±11,90
Sigara İçmeyen Grup	60	27,52±2,38	437976,26±1,84	5,2960±1,84	16,4008±10,09
P		p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Şekil 3.1. DNA hasarı parametreleri (CL,TI, TL) ile arseniğe maruz kalan bireylerin sigara içimiacısından değerlendirilmesi. I-) sigara içen ve içmeyen bireyler ile CL; II-) sigara içen ve içmeyen bireyler ile TI; III-)sigara içen ve içmeyen bireyler ile TL; IV-) sigara içen ve içmeyen bireyler ile kan As düzeyi .

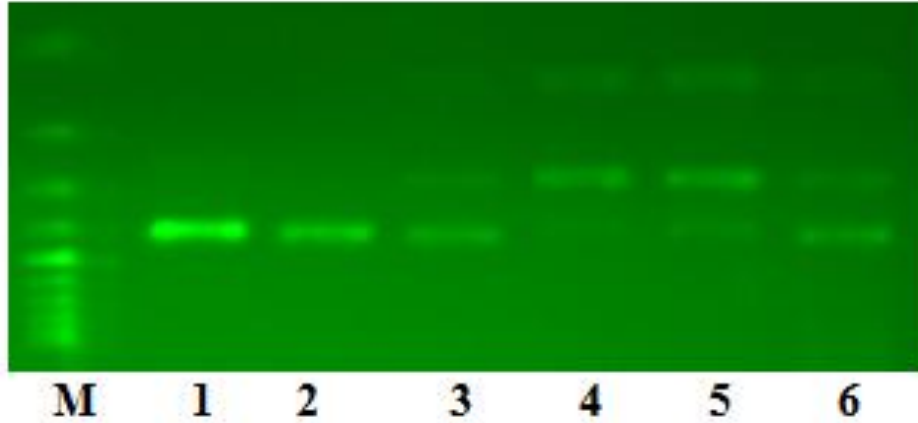




3.4. Arseniğe Maruz Kalan Bireylerde XRCC1 Arg399Gln (G→A) Polimorfizm Analiz Sonuçları

Çalışmada kullanılan 175 örneğin tamamı, DNA izolasyon işleminden sonra agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Her bir örneğin DNA'larının izole edildiği görüldü. DNA örneklerinin XRCC1 enzimini kodlayan, ekzon 10'daki 403 bp'lik bölgesi PCR yöntemi ile amplifiye edildi.

PCR ürünü RFLP tekniği ile G→A polimorfizmini belirlemek amacıyla *MspI* enzimi ile 37 °C'de 1,5–2 saat inkübe edildi. *MspI* enzimi 403 bp'lik bölgesi PCR ürününü 5'...C↓CGG ...3' ve 3'...GGC↑C...5' bölgelerinden tanıyarak keser. Bu sonuçlar jel görüntüleme cihazında UV ışık altında fotoğraflanarak değerlendirilmiştir (Şekil.3.2).



Şekil 3.2. 403 bp'lik amplifikasyon ürününün *MspI* enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotid uzunlukları. (M=100 bp Ladder; 1= 403 bp'lik PCR ürünü; 2= Gln/Gln genotip: 403 bp; ve 3 ve 6 = Arg/Gln genotip: 133 bp, 270 bp, 403 bp; 4ve 5= Arg/Arg genotip: 133 bp, 270 bp).

Bireyler homozigot tipik genotipli: Arg/Arg ‘GG’ ise;

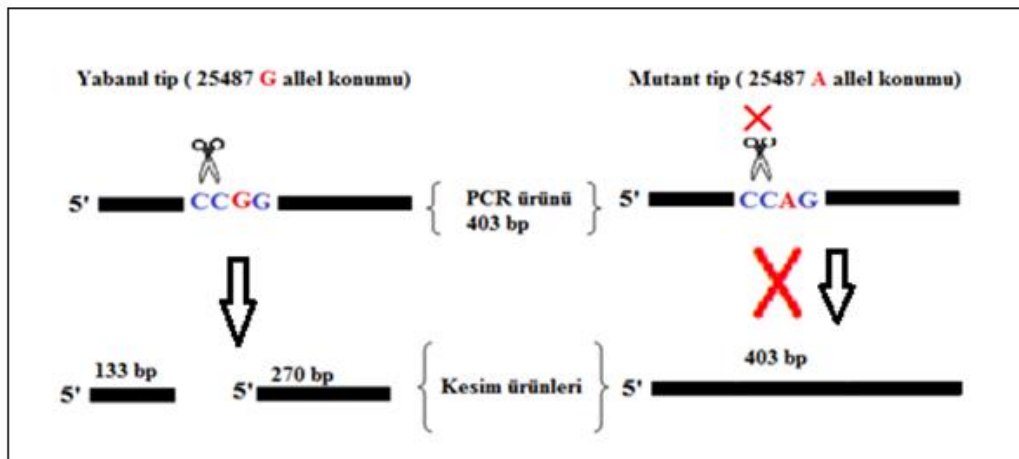
MspI enzimi 403 bp’lik bölgeyi 5’ ucundan CCGG dizisini tanıyıp keser. Böylece 403 bp’lik amplifikasyon ürünü; 133 bp ve 270 bp’lik iki oligonükleotid parçasına ayrılmış olur ve iki bant gözlenir.

Bireyler homozigot atipik genotipli: Gln/Gln ‘AA’ ise;

MspI enzimi CCAG dizisine bağlanamaz ve bu bölgedeki kesim işlemini gerçekleştiremez ve 403 bp’lik oligonükleotid parçası gözlenir.

Bireyler heterozigot genotipli: Arg/Gln ‘GA’ ise;

Bireylerin SNP’nin olduğu tek DNA ipliğinde “G”, diğer DNA ipliğinde “A” olduğundan; MspI enzimi ile kesim sonucunda; bir DNA ipliği, GG genotipli bireylerde olduğu gibi, 133 bp ve 270 bp olarak iki oligonükleotide ayrılır. Diğer DNA ipliğinde ise AA genotipli bireylerde olduğu gibi, kesim işlemi gerçekleştiremez ve heterozigot genotiplilerin oligonükleotid bantları 133 bp, 270 bp ve 403 bp olarak üç bant şeklinde gözlenir. XRCC1 Arg399Gln kesim ürünleri şekil 3.3’te şematize edilerek gösterilmiştir.



Şekil.3.3. MspI restriksiyon enziminin tanıma bölgesi ve kesim ürünlerinin şematik gösterimi.

Çalışmamız sonucunda;

Arseniğe maruz kalan bireylerde (n:175), XRCC1 Arg399Gln polimorfizminin; %49,7'si homozigot tipik (Arg/Arg), %39,4'ü heterozigot (Arg/Gln) ve %10,9'u homozigot atipik (Gln/Gln) genotip olarak belirlenmiştir. XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile oluşan alel frekansları ise (n:350); Arg alel frekansı; %69,4 (n:243), Gln alel frekansı ise % 30,6 (n:107) olarak belirlenmiştir (Çizelge.3.4).

Çizelge 3.4. Arseniğe maruz kalan bireylerde XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile oluşan genotip ve alel frekansları

XRCC1 Polimorfizm	Genotip Frekansı (n:175)	
	N	%
Arg/Arg (Homozigot tipik)	87	49,7
Arg/Gln (Heterozigot)	69	39,4
Gln/Gln (Homozigot atipik)	19	10,9
Alel (Arg/Gln)	Alel Frekansı (n:350)	
	n	%
Arg	243	69,4
Gln	107	30,6

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda çalıştığımız populasyonun XRCC1 Arg399Gln genotipininin Hardy Weinberg eşitliğinde olduğu tespit edilmiştir ($\chi^2 = 0.874$; $p=0,373$) (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Çalıştığımız populasyonun XRCC1 genotipinin Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti.

	Arg/Arg (Homozigot tipik) (n)	Arg/Gln (Heterozigot) (n)	Gln/Gln (Homozigot atipik) (n)	Toplam (n)
Gözlenen	87	69	19	175
Beklenen	84,36	74,29	16,36	175
$\chi^2 = 0.874$				
$P > 0.05$				

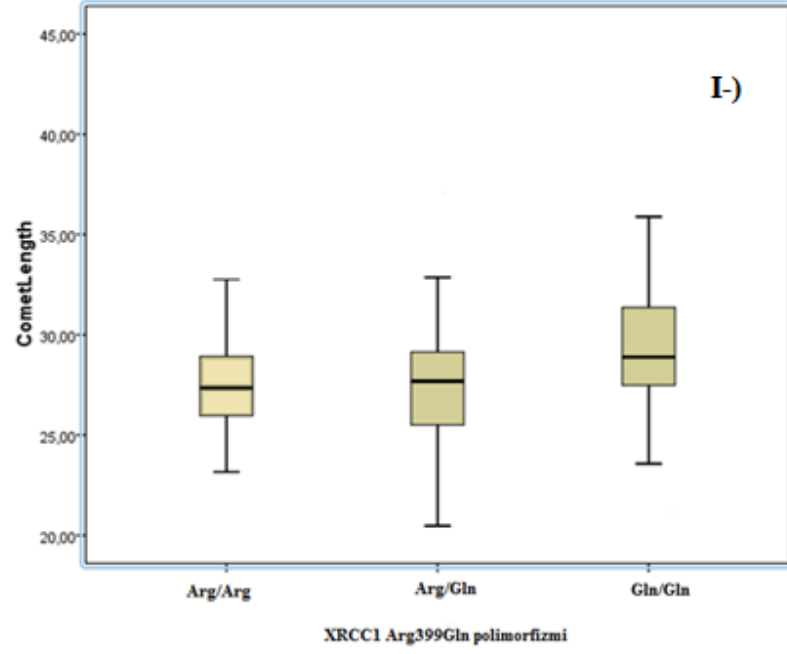
3.5. Arseniğe Maruz Kalan Bireylerde Comet Yöntemi Sonuçları ile XRCC1 Arg399Gln Polimorfizm Sonuçlarının Karşılaştırılması

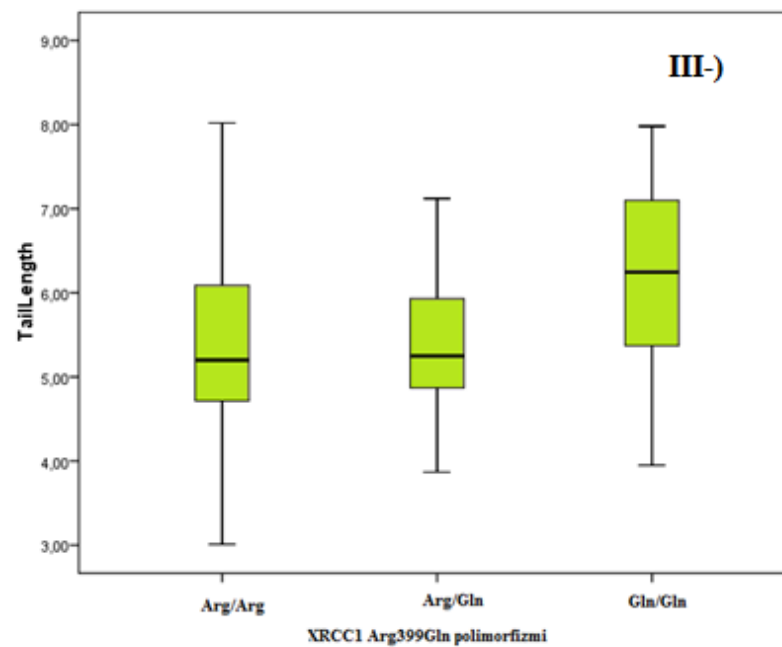
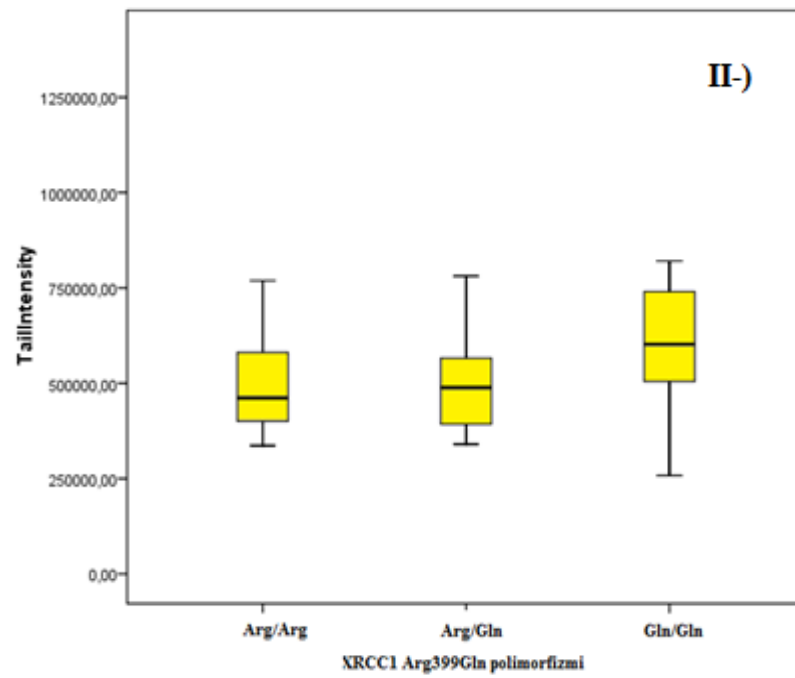
Arseniğe maruz kalan bireylerde, XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile comet parametreleri arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir ($p<0.01$). XRCC1 Arg399Gln homozigot atipik (Gln/Gln) ile heterozigot (Arg/Gln) genotipe sahip bireylerde, homozigot tipik (Arg/Arg) bireylere göre lenfosit DNA hasarının yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge.3.6).XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile CL,TI, TLcomet parametrelerinin değerlendirilmesi şekil 3.4'te gösterilmiştir.

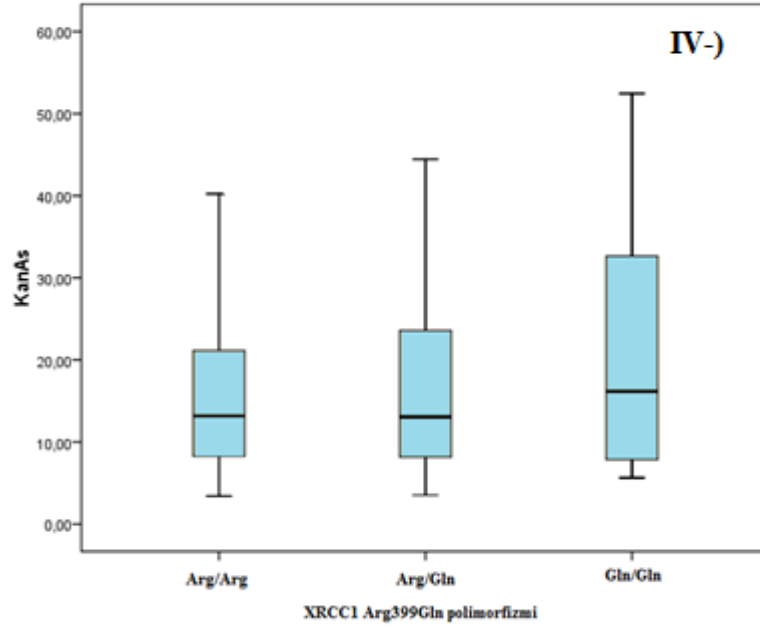
Çizelge 3.6. Arseniğe maruz kalan bireylerde XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile CL,TI, TLcomet parametrelerinin istatistiksel değerler

Comet Parametreleri	XRCC1	n	Ortalama±Standart Sapma	Minumum Değerler	Maksimum Değerler	P
CL	Arg/Arg	87	27,42±2,18	20,25	32,76	0,007
	Arg/Gln	69	27,55±2,73	20,48	36,28	
	Gln/Gln	19	29,59±4,44	20,68	40,49	
TI	Arg/Arg	87	443369,12±1,96	30109,03	769000,13	0,009
	Arg/Gln	69	450640,90±1,99	33086,31	882390,31	
	Gln/Gln	19	600915,11±2,54	33575,19	1266752,41	
TL	Arg/Arg	87	5,41±0,91	3,01	17,00	0,000
	Arg/Gln	69	5,46±0,85043	3,87	8,16	
	Gln/Gln	19	6,78±2,73	3,95	17,00	

Şekil 3.4. Arseniğe maruz kalan bireylerde XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile CL, TI, TLcomet parametrelerinin değerlendirilmesi. I -) XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile CL; II-) XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile TI; III-) XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile TL; IV-) XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile kan As düzeyi

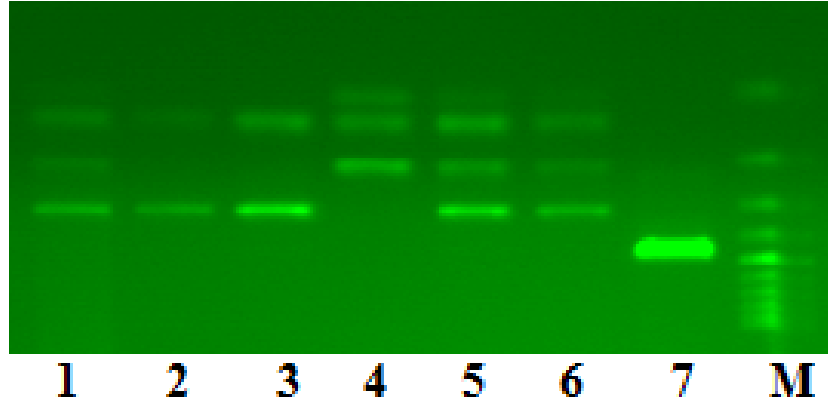






3.6. Arseniğe Maruz Kalan Bireylerde XRCC3 Thr241Met (C→T) Polimorfizm Analiz Sonuçları

DNA örneklerinin XRCC3 enzimini kodlayan, ekzon 7'deki 456 bp'lik bölgesi PCR yöntemi ile amplifiye edilmiştir. PCR ürünleri RFLP tekniği ile C→T polimorfizmini belirlemek amacıyla NlaIII enzimi kullanılarak kesilmiştir. XRCC3 Thr241Met genotiplemesi için NlaIII enzimi 5' ...CATG↓ ...3' ve 3'...↑GTAC...5' bölgelerinden amplifiye edilmiş DNA dizisini tanıyarak keser. Bu sonuçlar jel görüntüleme cihazında UV ışık altında fotoğraflanarak değerlendirilmiştir (Şekil.3.5.).



Şekil 3.5. 456 bp’lik amplifikasyon ürününün NlaIII enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotid uzunlukları. (M=100 bp Ladder; 7= 456 bp’ lik PCR ürünü; 1,5 ve 6 = Thr/Met genotip: 105 bp, 141 bp, 210 bp, 315 bp; 2-3 =Thr/Thr genotip: 141 bp, 315 bp; 4=Met/Met genotip: 105 bp, 141 bp, 210 bp)

Bireyler homozigot tipik genotipli: Thr/Thr ‘CC’ ise,

NlaIII enzimi 456 bp’lik bölgeyi 5’ ucundan CATG dizisini tanıyarak keser. Bunun sonucu olarak da 456 bp’lik amplifikasyon ürünü; 141 bp ve 315 bp’lik iki oligonükleotid parçasına ayrılmış olur ve iki bant gözlenir.

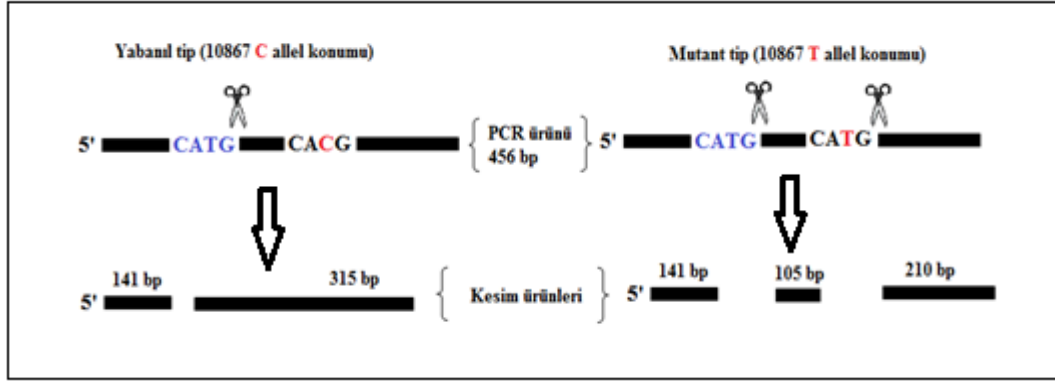
Homozigot atipik genotipli: Met/Met ‘TT’ ise;

CATG dizisine bağlanarak kesim işlemini gerçekleştirir ve 105 bp, 141 bp ve 210 bp’lik üç oligonükleotid parçası gözlenir.

Bireyler heterozigot genotipli: Thr/Met ‘CT’) ise;

Bireylerin SNP’nin olduğu tek DNA ipliğinde“C”, diğer DNA ipliğinde “T” olduğundan; Nla III enzimi ile kesim sonucunda; bir DNA ipliği, CC genotipli bireylerde olduğu gibi, 141 bp ve 315 bp olarak iki oligonükleotide ayrılır. Diğer DNA ipliğinde ise TT genotipli bireylerde olduğu gibi 105 bp, 141 bp ve 210 bp’lik üç oligonükleotide ayrılır ve heterozigot genotiplilerin oligonükleotid bantları 105

bp, 141 bp, 210 bp ve 315 bp olarak dört bant şeklinde gözlenir. XRCC3 Thr241Met kesim ürünleri şekil 3.6’da şematize edilerek gösterilmiştir.



Şekil 3.6. NlaIII restriksiyon enziminin tanıma bölgesi ve kesim ürünlerinin şematik gösterimi.

Çalışmamız sonucunda;

Çalışmamız sonucunda; arseniğe maruz kalan bireylerde (n:175), XRCC3 Thr241Met polimorfizminin; %30,3’ü homozigot tipik (Thr/Thr), %49,1’i heterozigot (Thr/Met) ve %20,6’sı homozigot atipik genotip (Met/Met) olarak belirlenmiştir. XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile oluşan alel frekansları ise (n:350); C alel frekansı; % 54,9 (n:192), T alel frekansı ise % 45,1 (n:158) olarak belirlenmiştir (Çizelge.3.7).

Çizelge.3.7. Arseniğe maruz kalan bireylerde XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile oluşan genotip ve alel frekansları

XRCC3 Polimorfizm	Genotip Frekansı (n:175)	
	N	%
Thr/Thr (Homozigot tipik)	53	30,3
Thr/Met (Heterozigot)	86	49,1
Met/Met (Homozigot atipik)	36	20,6

Alel (Thr/Met)	Alel Frekansı (n:350)	
	n	%
Thr	192	54,9
Met	158	45,1

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda çalıştığımız XRCC3 Thr241Met genotipininin Hardy Weinberg eşitliğinde olduğu tespit edilmiştir ($\chi^2 = 0.011$; $p=0.120$) (Çizelge 3.5).

XRCC3 geninin 241. kodonunda sahip oldukları genotipler Hardy-Weinberg eşitliğinde olup gösterdikleri genotip dağılımı çizelge 3.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8. Çalıştığımız populasyonun XRCC3 genotipinin Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti

	Thr/Thr (Homozigot tipik) (n)	Thr/Met (Heterozigot) (n)	Met/Met (Homozigot atipik) (n)	Toplam (n)
Gözlenen	53	86	36	175
Beklenen	52.66	86.67	35.66	175
$\chi^2 = 0.011$				
$P > 0.05$				

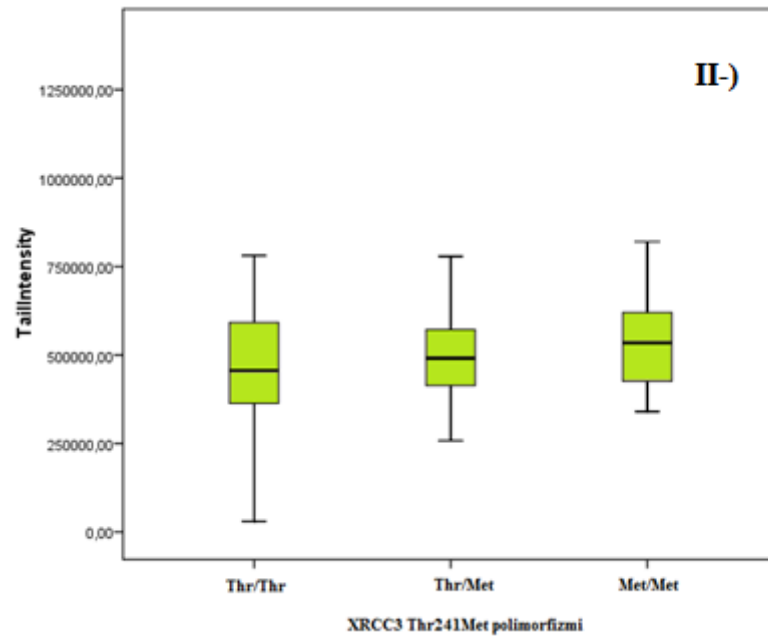
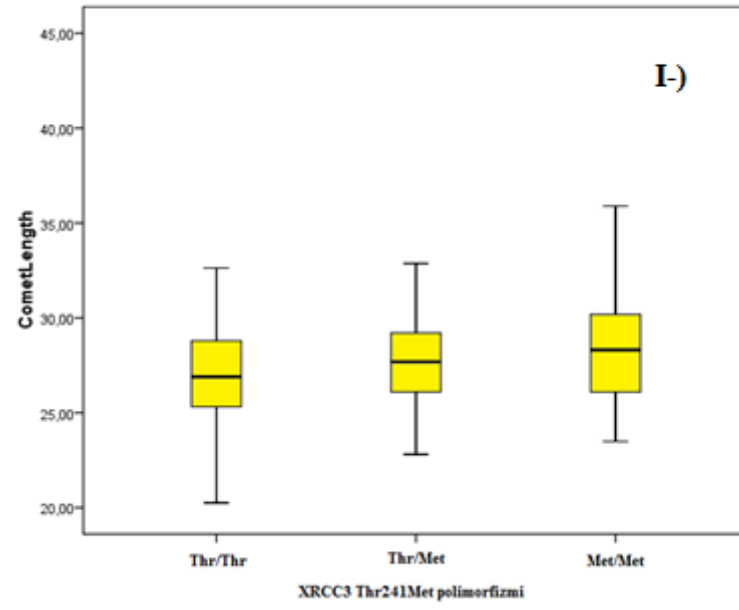
3.7. Arseniğe Maruz Kalan Bireylerde Comet Yöntemi Sonuçları ile XRCC3 Thr241Met Polimorfizm Sonuçlarının Karşılaştırılması

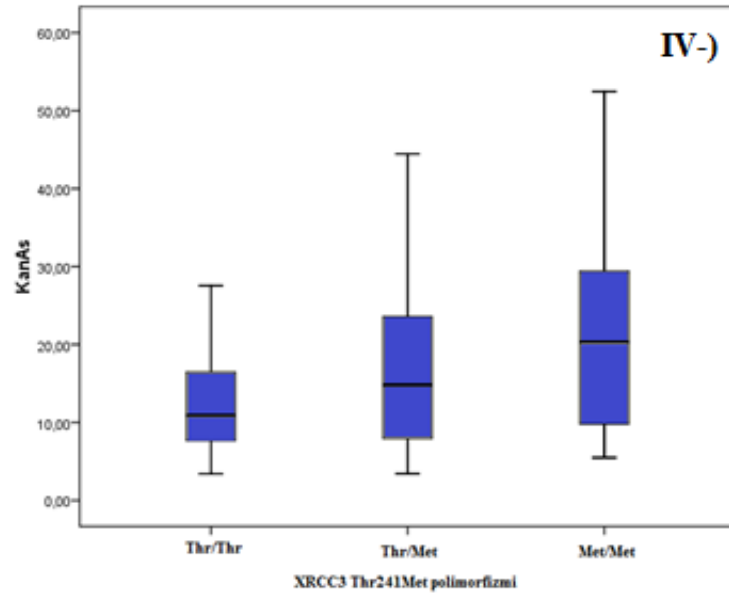
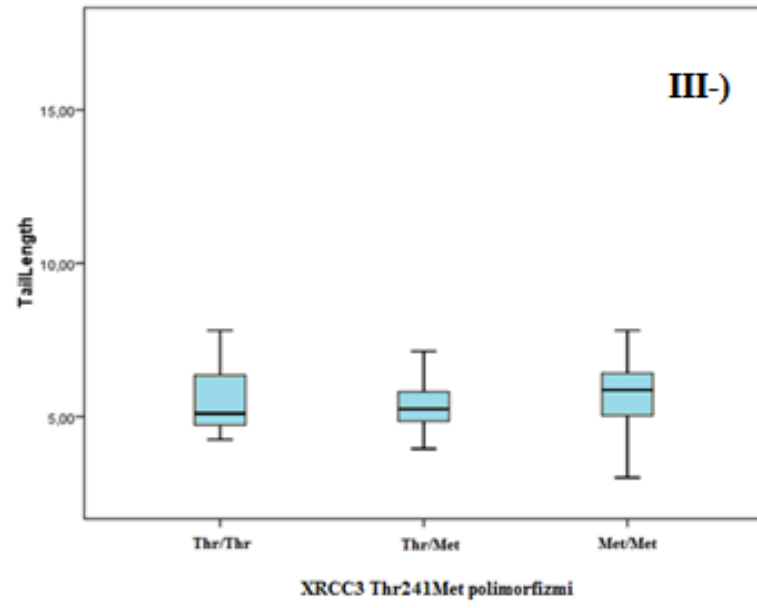
Arseniğe maruz kalan bireylerde, XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile TI parametresi ile arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p < 0.05$). XRCC3 Thr241Met homozigot atipik (Met/Met) birey ile heterozigot (Thr/Met) genotipe sahip bireylerde, homozigot tipik (Thr/Thr) bireylere göre, lenfosit DNA hasar göstergesi CL, TL ve TI parametrelerinde oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunun yanısıra kan As düzeyinin XRCC3 Thr241Met homozigot atipik (Met/Met) birey ile heterozigot (Thr/Met) genotipe sahip bireylerde daha yüksek olduğu gösterilmiştir. (Şekil.3.7), (Çizelge.3.9).

Çizelge 3.9. Arseniğe maruz kalan bireylerde XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile CL, TI, TL comet parametrelerinin istatistiksel değerleri

Comet Parametreleri	XRCC3	n	Ortalama±Standart Sapma	Minimum Değerler	Maksimum Değerler	P
CL	Thr/Thr	53	27,06±2,62	26,34	27,79	0,069
	Thr/Met	86	27,80±2,58	27,25	28,35	
	Met/Met	36	28,42±3,31	27,31	29,54	
TI	Thr/Thr	53	415431,08±2,31	351639,56	479222,61	0,024
	Thr/Met	86	461816,11±1,94	420150,55	503481,66	
	Met/Met	36	537519,17±1,89	473591,18	601447,15	
TL	Thr/Thr	53	5,52±,98	5,25	5,79	0,100
	Thr/Met	86	5,44±,87	5,26	5,63	
	Met/Met	36	5,98±2,17	5,24	6,71	
Kan As	Thr/Thr	53	13,47±8,61	11,10	15,85	0,004
	Thr/Met	86	17,63±11,40	15,18	20,07	
	Met/Met	36	21,44±13,00	17,04	25,84	

Şekil 3.7. Arseniğe maruz kalan bireylerde XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile CL, TI, TL comet parametrelerinin değerlendirilmesi I-) XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile CL ; II-) XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile TI ; III-) XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile TL ; IV-) XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile kan As düzeyi





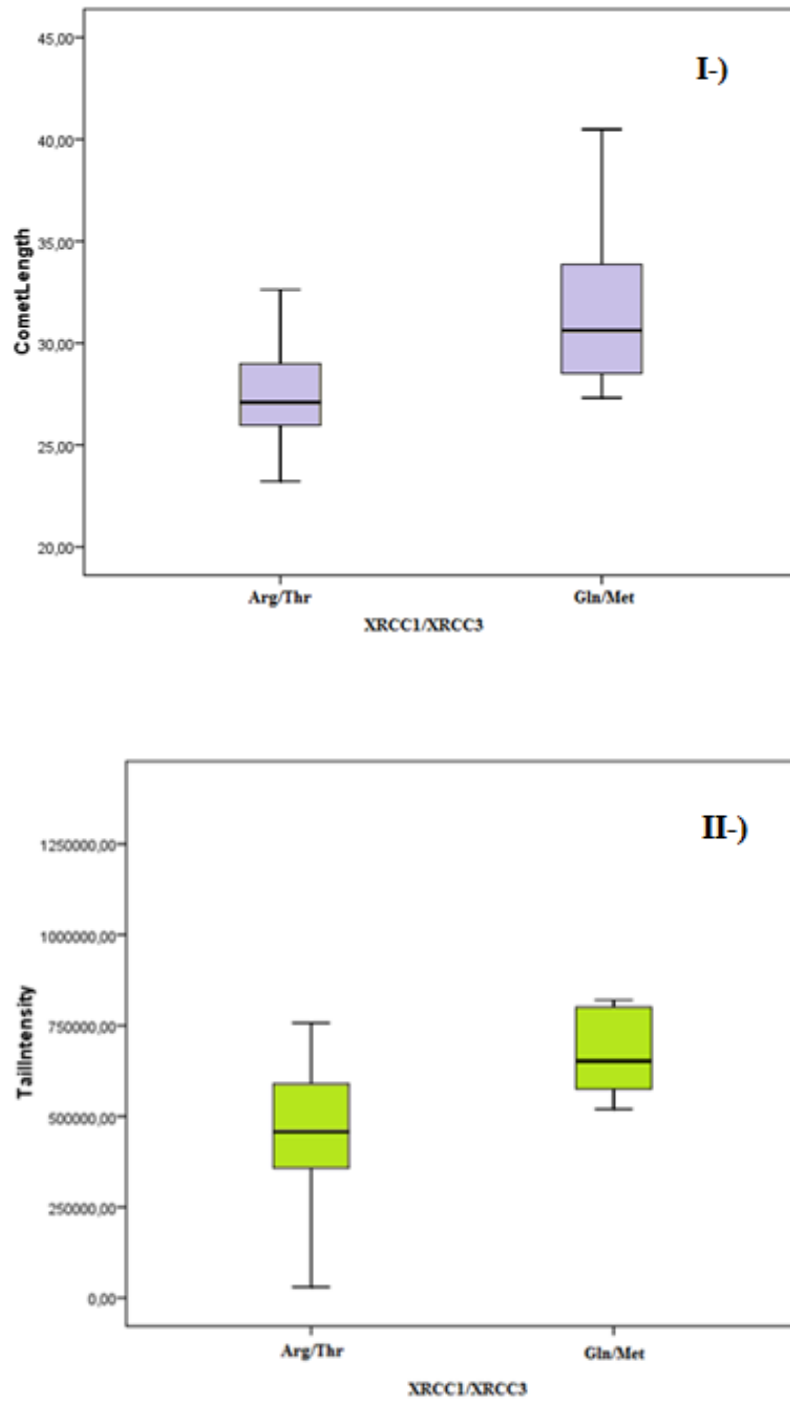
3.8. Homozigot Tipik Bireyler ile HomozigotAtipik Bireylerin Kan Arsenik Düzeyi ve Comet Parametreleri Arasındaki İlişki

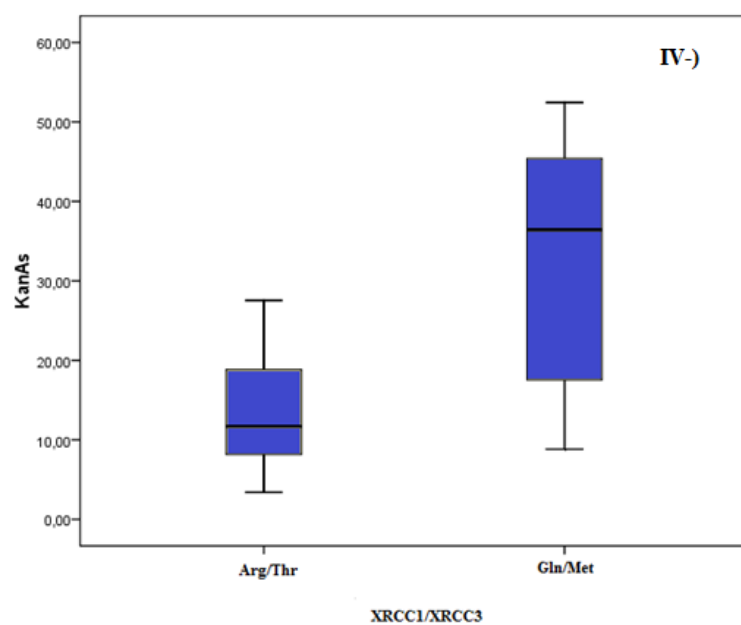
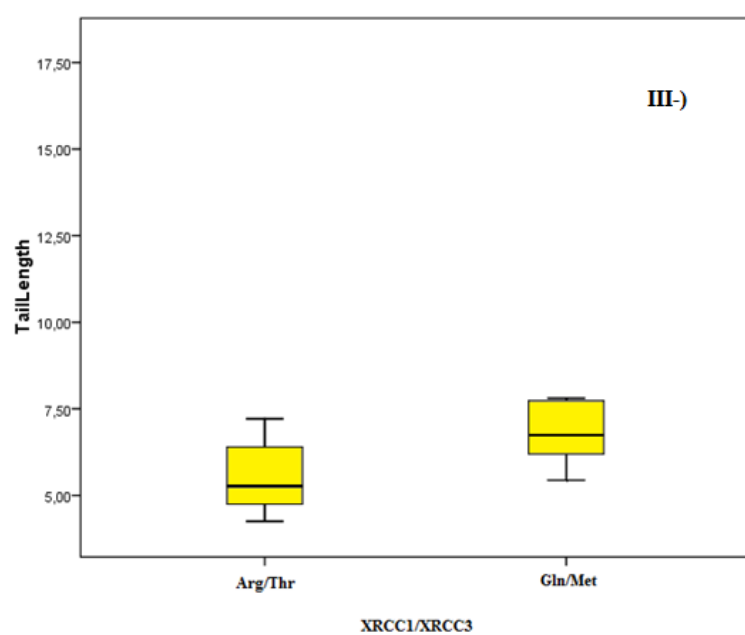
XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met genotiplerinin kombinasyonu DNA hasar parametreleri açısından incelenmiş ve sonuçlar çizelge 3.12’de verilmiştir. Arseniğe maruz kalan bireyler sahip oldukları XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met genotiplerine göre DNA hasar parametreleri ile değerlendirildiğinde Gln/Met genotip kombinasyonuna sahip bireylerin Arg/Thr genotipine sahip bireylere göreDNA hasarı yüksek olup, CL, TI ve TL comet parametreleri, kan As düzeyiile istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p<0.01$) (Çizelge 10.10). Homozigot tipik bireyler ile homozigot atipik bireylerin kan arsenik düzeyi ve comet parametrelerinin değerlendirilmesi şekil.3.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.10. Homozigot Tipik Bireyler ile HomozigotAtipik Bireylerin Kan Arsenik Düzeyi ve Comet Parametreleri Arasındaki İlişki

Parametreler	XRCC1/XRCC3	N	Median	Minimum	Maximum	p
CL	Arg/Thr	28	27,10	20,25	32,63	0,004
	Gln/Met	8	30,63	27,32	40,49	
TI	Arg/Thr	28	457357,07	30109,03	757434,60	0,003
	Gln/Met	8	652409,35	519881,72	1266752,41	
TL	Arg/Thr	28	5,27	4,25	7,21	0,005
	Gln/Met	8	6,74	5,44	17,00	
Kan As Düzeyi	Arg/Thr	28	11,71	3,40	42,71	0,007
	Gln/Met	8	36,42	8,82	52,44	

Şekil 3.8. Homozigot Tipik Bireyler İle HomozigotAtipik Bireylerin Kan Arsenik Düzeyi ve Comet Parametrelerinin değerlendirilmesi. I-) XRCCC1/XRCCC3 ile CL; II-) XRCCC1/XRCCC3 ile TI; III-) XRCCC1/XRCCC3 ile TL; IV-) XRCCC1/XRCCC3 ile kan As düzeyi





4.TARTIŞMA

Arsenik doğal ortamda havada suda toprakta ve antropojenik kaynaklarda organik ve inorganik formlarda bulunan bir metaloitir. İnorganik formları 3 değerli meta arsenit (As^{3+}) ve 5 değerli (As^{5+}) arsenattır. Arsenit'in (As^{3+}), arsenata (As^{5+}) göre daha toksik olduğu bilinmektedir. İnorganik arsenik bileşikleri Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı, arseniği kanser oluşturma özelliği ispatlanmış kimyasallar sınıfında (Grup 1) göstermektedir. (IARC 1980; IARC 1987;IARC 2002). Arseniğin karsinojiteye sebep olduğu bilinmekle birlikte metabolizması henüz açıklanamamıştır. Arsenik riski farkedilmiş olmasına rağmen dünyada milyonlarca insan hala yüksek düzeyde inorganik arseniğe maruz kalmaktadır.

Dünyanın pek çok yerinde özellikle Asya ülkelerinde içme sularındaki yüksek arsenik konsantrasyonu ciddi problemlere sebep olmaktadır. Dünya sağlık örgütü içme sularındaki arsenik konsantrasyon sınırını 10 $\mu g/L$ bildirmiştir. Arsenik kirliliğinin en fazla olduğu bölgelerde ise içme sularındaki sınır 50 mg/l belirlenmiştir. 50 ppb'den daha yüksek miktarlarda arsenik içeren suların ise kesinlikle kullanılmaması gerektiğini bildirmiştir (WHO, 1990). Pek çok Asya ülkesi bu sınırın çok üzerinde kalmaktadır. Batı Bengal ve Hindistanda arsenik düzeyi 3400 mg/l (Chen ve ark.,1999), Çin'de ise 44000 mg/l (Sun ve ark., 1999; Smith ve ark., 2000) ulaşmıştır. Buna paralel olarak da hastalık ve kanser riski Bangladeş, Çin, Hindistan, Tayland ve Tayvan (Smith ve ark., 2000), Şile, Arjantin, Amerika (Welch ve ark., 1999; Calderon ve ark., 1999; Hopenhayn-Rich ve ark., 1999; Mazumder ve ark., 1999) ve birçok Avrupa ülkesinde (Hopenhayn-Rich ve ark., 1999) artış göstermiştir. Türkiye'de ise 2005 yılına kadar içme sularındaki sınır 50 $\mu g/L$ kabul edilmiş daha sonra 10 $\mu g/L$ 'ye düşürülmüş ve 2008 yılından beri bu sınır uygulanmaya başlanmıştır (Cakmakci, ve ark. 2009; Cansız ve ark. 2011).

Arsenik madencilik, enerji üretimi için yakılan arsenik ile kontamine kömürün, sanayi yarı iletken maddeler cam üretimi, pestisit üretimi ile ilgili işyerlerinde mesleki maruziyete sebep olmaktadır. Maruziyet inhalasyon yoluyla (Chan ve Huff. 1997; Enterline ve ark. 1995; Kessel ve ark. 2002, Palus ve ark. 2005).

Kronik toksik metal maruziyeti birçok hastalığın gelişiminde rol oynamaktadır. Metaller; inflamasyon yanıtını artırır, hücrel antioksidan mekanizmaları inhibe eder, lipid peroksidasyona neden olup DNA onarımını inhibe ederek gen ekspresyonunda ve hücrel döngülerde patolojik etkilere neden olurlar. Bu nedenle metallere maruziyet karsinojen sürecin başlamasıyla sonuçlanır (Iarmarcovai ve ark. 2005). Krom, kadmiyum, kurşun, kobalt ve demir gibi metaller serbest oksijen radikallerinin salınmasına neden olarak oksidatif DNA hasarına neden olurlar (Kasprzak 1995). Arsenik de doğrudan glutatyon gibi tiol taşıyan antioksidanlara bağlanarak ve hidrojen peroksid oluşumuna yol açarak oksidatif strese neden olur (Valko ve ark. 2005, Jomova ve ark. 2011). DNA’da görülen değişikliklerin çoğu onarılmazsa genetik kararsızlığa, mutasyona ve hücre ölümüne neden olabilir. DNA onarım mekanizmaları, DNA’nın bütünlüğünün korunması ve kanser oluşumunun önlenmesi için önemlidir (Kiyohara ve Yoshimasu 2007).

Epidomiyolojik veriler insan kronik arsenik maruziyetinde inorganik arsenik bileşiklerinin insanlarda karaciğer zedelenmesi periferik nöropati, akciğer deri mesane , akciğer karaciğer kanserleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Leonard ve Lauwerys, 1980; Axelson 1980 ; Moralesve ark., 2000; Kessel ve ark., 2002.; Chenand Ahsan 2004; Chiu et al. 2004; Liaw et al. 2008; Liu and Waalkes 2008; Hamadani et al. 2011; Wasserman et al. 2004, 2007; Dong and Su 2009, Gong et al. 2011; Parvez et al. 2011, Vahidnia et al. 2007; Bates et al. 2004; Yuan et al. 2010; Heck et al. 2009; Marshall et al. 2007; Smith et al. 2009; Yu et al. 2006; Tseng 1977; Smith ve ark., 2000).

Comet assay kimyasal ve fiziksel etmenlerin canlılar üzerinde yol açtığı genotoksik ve sitotoksik etkilerin sebep olduğu DNA hasarını saptamak ve hasarın düzeyini belirlemek için uygulanan genotoksisite testlerinden biridir. Yöntem oksidatif stres, toksik ağır metaller, kimyasal ajanlar, ilaçlar ve ultraviyole gibi çeşitli genotoksik ajanların DNA’da oluşturduğu tek veya çift zincir kırıklarını belirleyen ve sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Comet yöntemi Singh ve ark. 1988 yılında yayınladığı versiyonu temel alır. Alkali şartlarda uygulanan yöntem çift zincir

kırıkları, tek zincir kırıkları, alkali bölgeleri, onarımı tamamlanmamış DNA bölgelerini basit ve hassas bir şekilde belirlediği gösterilmiştir. (Tice ve ark. 2000; Hoffmann ve ark. 2005; M. Valverde ve ark. 2009; Yeni ve ark. 2010).

Genomda meydana gelen DNA hasarlarının onarımında sorumlu genler vardır. Bu genlerin kodladığı proteinler veya enzimler polimorfiktir. Genlerin polimorfik olması pek çok kanser türüne yakalanma riskini etkilemektedir. DNA’da görülen değişikliklerin çoğu onarılmazsa genetik kararsızlığa, mutasyona ve hücre ölümüne neden olabilir. DNA onarım mekanizmaları, DNA’nın bütünlüğünün korunması ve kanser oluşumunun önlenmesi için önemlidir (Kiyohara ve Yoshimasu 2007). DNA onarım genlerinden olan XRCC1 (Arg399Gln) özellikle, serbest oksijen radikallerinin, iyonize radyasyonun, UV ve alkilleyici mutajenlerin neden olduğu baz değişim sonucu oluşan DNA tek zincir kırılmalarının onarılmasında rol alan proteinleri kodlar. XRCC3 (Thr241Met) ise çift zincir kırıkları, çapraz bağların onarımında önemli rol alan gendir (Hu ve ark., 2001; Shen ve ark., 1998; Yamada ve ark., 2004). XRCC1 ve XRCC3 genleri en çok çalışılan genlerden olup pek çok kanser oluşumunda etkin olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Duarte ve ark. 2005; Sangrajang ve ark. 2005; Araujo ve ark. 2002; Naccarati ve ark. 2007; Shen ve ark. 2005).

Çalışmamızda, ülkemizde yaşayan ve metalle ilgili işyerlerinde çalışan bireylerin metallerle maruz kaldıklarında görülebilecek genetik hasarların, toplumumuz bireylerindeki genetik polimorfizmlerle ilişkisinin belirlenmesi ve bireysel duyarlıkların saptanması amaçlanmıştır. Bu amaçla 25-65 yaş arası Meslek Hastalıkları Hastanesi’ne başvuran 175 bireyin kan arsenik düzeyleri belirlenmiş, arseniğin DNA hasar ile ilişkisi araştırılmıştır. DNA hasar derecesi comet assay yöntemi ile belirlenmiştir. PCR-RFLP metodu ile de XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met gen polimorfizmlerini ve elde edilen sonuçların DNA hasarı, kan arsenik düzeyleri ile ilişkisini incelenmiştir.

Metallerin hücre, doku ve organizmalar düzeyinde lenfosit DNA hasarına neden olmaları ile ilgili birçok çalışma bulunmakla birlikte (Danadevi ve ark. 2003,

Danadevi ve ark. 2004, Palus ve ark. 2003, Mateuca ve ark. 2005, Goulart ve ark. 2005, Iarmarcovai ve ark. 2005), arsenik maruziyetinde nükleer DNA hasarları ile XRCC1, XRCC3 genlerindeki polimorfizmlerin etkisinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

Çeşitli kimyasal ve toksik maddelere maruz kalan, farklı meslek gruplarına mensup bireylerle yapılan çalışmalarda mesleki maruziyet DNA hasar ilişkisini araştıran pek çok çalışma bulunmaktadır (Kayaaltı ve ark., 2012 a-b; Soylemez ve ark., 2013 a-b; Bacaksız ve ark., 2013; Zhu ve ark., 2001; Palu ve ark., 2005; Grower ve ark., 2003; Bacaksız ve ark., 2012; Soylemezoğlu ve ark., 2013) yapılan çalışmalar mesleki maruziyetle DNA hasar derecesinin yükseldiğini göstermiştir. Kayaaltı ve arkadaşları mesleki metal maruziyet ve DNA hasar ilişkisini incelemiştir. Çalışma için işyerinde kurşuna maruz kalan 61 bireyin kan örnekleri toplanmıştır. Çalışmanın sonucunda kandaki kurşun düzeyi ile DNA hasar derecesinin yükseldiğini göstermiştir (Kayaaltı ve ark. 2013).

Arseniğin genotoksik etkileri, kromozomal anomaliler, kardeş kromatit değişimleri, DNA zincir kırılmaları, oksidatif DNA hasarına sebep olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir (Barrett ve ark. 1989; Tinwell ve ark. 1991; Gosebatt ve ark. 1997; Basu ve ark. 2001; Kawser Ahmed ve ark. 2011).

Çalışmamızın ilk bölümünde metale maruz kalmış işçilerde kan arsenik düzeyi ile DNA hasar derecesini incelenmiş, bu çalışma için metalle ilgili işyerlerinde çalışan 175 işçinin kan örnekleri toplanmış, kandaki arsenik düzeyi ve Comet assay ile DNA hasar dereceleri belirlenmiştir. Comet parametreleri ve kandaki arsenik düzeyleri arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir CL, TI ($p<0.001$), TL ($p<0.05$). Çalışmamızın sonuçları, literatürdeki diğer çalışmalar ile uygunluk göstermektedir.

Sardaş 2009, yeraltı sularında arsenik sorunu yaşayan bölgelerden biri olan Kütahya ili Emet ilçesi İğde Köyü'nde uzun süredir kuyu suyunu içme suyu olarak tükettiği bilinen bireyler üzerinde arsenik maruziyetini çalışmıştır. Bu çalışma için

Kuyu suyunu tüketen 30 birey ve bu bireylere yaş ve sosyoekonomik durumu eşdeğer olan ve arsenik maruziyeti olmayan 20 kontrolün kan ve saç örnekleri alınmış genotoksik hasarının biyogöstergesi olan comet assay ve kardeş kromatid değişimi ile incelenmişlerdir. Çalışmada arseniğe maruz kalan kişiler kontrol grubuna göre comet hasarları anlamlı derecede yüksek ($p<0.001$) bulunmuş, maruz kalan bireylerin kardeş kromatid değişimi (SCE) sonuçları ile kontrol grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak bir ilişki tespit edilememiştir. Çalışmanın diğer kısmı ise içme suyu, saç ve kandaki arsenik düzeyleri belirlenmiş ve dünya sağlık örgütünün belirlediği sınır değerlerle karşılaştırma yapılmıştır. Dünya sağlık örgütü tarafından belirlenen maksimum Arsenik değeri içme suyunda 0.01 mg/l, saçta 0.01–1 mg/kg ve kanda 2–23µg/l iken; alınan örneklerden saptanandegerler sırasıyla 1.70mg/l, 89 (39–169)mg/kg, 115 (114–264) ug/l şeklindedir (Sardaş 2009).

Çalışmamıza dahil ettiğimiz 175 bireyin yaş ortalaması 32,6 ve kan arsenik düzeylerinin ortalaması ise $17,15\pm 11,30$ ‘dur. Tespit edilen kan arsenik düzeyi WHO’nun belirlediği sınırlar dahilinde olup kronik maruziyet için ortalama değerin üzerindedir.

Palu ve arkadaşları mesleki arsenik maruziyetinin DNA hasarı ile ilişkisini araştırmış ve bu çalışma için Polonyada 3 bakır izabe tesisinde çalışan 75 erkek işçi ve 83 kontrol erkek bireylerin kan numuneleri toplanmıştır. Comet yöntemi ile DNA hasar derecesi tespit edilmiş ve işçilerin kontrol grubuna oranla DNA hasarının yüksek olduğu belirlenmiştir (Palu ve ark., 2005).

Soyleman ve arkadaşları arseniğe mesleki maruz kalan bireylerde kan arsenik düzeyi ile lenfosit DNA hasarı arasındaki ilişkiyi araştırmış. Çalışmaya mesleki maruziyeti bilinen 120 bireyi dahil etmiş ve DNA hasarını comet yöntemiyle belirlemiştir. Sonuç olarak kan arsenik düzeyindeki artışın lenfosit DNA hasarını derecesinin yükselttiğini göstermişlerdir (Soyleman ve ark., 2013)

Kan arsenik düzeyi ile DNA hasarını belirlemenin yanı sıra sigara içen ve sigara içmeyen bireyler arasında kan arsenik ve DNA hasarı parametreleri de çalışma

kapsamında araştırılmıştır. Sigara içen gruptaki kan arsenik düzeyi ve DNA hasar dereceleri (TI, CL, TL parametrelerinde) sigara içmeyen gruba göre yüksek olduğu gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır ($p>0.05$).

Yapılan çalışmalarda sigara içiminin DNA hasarına sebep olduğu konusunda farklı görüşler bulunmaktadır. Pek çok çalışma sigaranın DNA hasarına sebep olduğunu bildirirken (Soylemez ve ark. 2011; Kayaaltı ve ark. 2013; Faust ve ark 2004); sigaranın DNA hasarını etkilemediğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Stabbert ve ark. 2003; De Marini 2004; Giovannelli ve ark. 2002).

DNA onarım enzimlerini kodlayan genlerde görülen bir kaç tane yaygın polimorfizm bulunmaktadır. Bu polimorfizmlerden bazılarının, DNA onarım enzimlerinde telafisi zor yapısal farklılıklar oluşturduğu ve onarım kapasitesini değiştirdiği ve DNA onarım genlerindeki polimorfizmler ile farklı kanser tiplerine bireysel yatkınlık arasında bağlantı olduğu bildirilmiştir (Nacarati ve ark. 2006).

XRCC1 (Arg399Gln) gen polimorfizmi baz kesme çıkarma ve tek zincir kırıklarının onarımında etkinken (Caldecott ve ark. 1996, Kubota ve ark. 1996, Cappelli ve ark. 1997); XRCC3 (Thr241Met) gen polimorfizminin çift zincir kırıklarının onarımında etkin olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Tebbs ve ark. 1995).

Toplumumuzda XRCC1, XRCC3 genlerindeki polimorfizmleri ile ilgili yapılan araştırmalarda toplum genetiği (Kocabaş ve Karahalil 2006), çeşitli kanser türlerine duyarlık (Deligezer ve Dalay 2004, Karahalil ve ark. 2006, Batar ve ark. 2009; Karkucak ve ark., 2012) ve göz hastalıkları (Güven ve ark. 2007, Unal ve ark. 2007) ile ilgili çalışmalar olduğu görülmektedir.

Erdal ve arkadaşları akrabalık ilişkisi olmayan 75 sağlıklı Türk bireyde XRCC1 genindeki kodon 194 Arjinin_Triptofan (Arg_Trp) ve kodon 399 Arjinin_Glutamin (Arg_Gln) değişimine bağlı tanımlanan polimorfizmleri çalışmış ve diğer toplumlarla karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak XRCC1 geni 194.

kodonundaki Arg ve Trp alellerinin frekans sırası ile 0.94, 0.06; XRCC1 geni 399. kodonundaki Arg ve Gln alellerinin frekansı ise sırası ile 0.65, 0.35 olarak saptanmıştır. XRCC1 geni Arg194Trp fonksiyonel polimorfizmi bakımından; Amerika (beyaz), Kolombiya orijinli bireylerle yakın benzer gen frekanslarına; Tayvan, Amerika (siyah) ve Çin orijinli bireylerden farklı gen frekanslarına sahip olduğu gözlenmiştir. XRCC1 geni Arg399Gln fonksiyonel polimorfizmi bakımından ise İtalya, Finlandiya, Amerika (beyaz), Kolombiya, Kafkas orijinli bireylerle yakın benzer gen frekanslarına; Tayvan, Amerika (siyah), Kolombiya, Kafkas, Afrika-Amerika, Asya ve Çin orijinli bireylerden farklı gen frekanslarına sahip olduğunu göstermişlerdir (Erdal ve ark. 2004).

Çalışmamızda, Erdal ve arkadaşlarının Türk toplumunda yaptıkları çalışma ile XRCC1 geni 399. kodonundaki Arg ve Gln alellerinin frekansı ise sırası ile 0.65, 0.35 bulunurken bizim çalışmamızda 175 örneğin Arg ve Gln alellerinin frekansı %'de 69,4 ve 30,6 şeklindedir. Her iki çalışmada birbirine yakın frekans sonuçları belirlenmiştir.

Bu çalışmada As'e maruz kalan bireylerde, XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile DNA hasar parametreleri arasındaki ilişki incelenmiştir. As'e maruz kalan bireylerde, XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile comet parametreleri arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.01$). XRCC1 Arg399Gln homozigot atipik (Gln/Gln) ile heterozigot (Arg/Gln) genotipe sahip bireylerde, homozigot tipik (Arg/Arg) bireylere göre lenfosit DNA hasarının yüksek olduğu belirlenmiştir.

Areseniğemaruz kalan bireylerde, XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile DNA hasar parametreleri arasında ilişki ise XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile comet parametresi arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki bulunmuştur. ($p < 0.05$). XRCC3 Thr241Met homozigot atipik (Met/Met) birey ile heterozigot (Thr/Met) genotipe sahip bireylerde, homozigot tipik (Thr/Thr) bireylere göre, lenfosit DNA hasar göstergesi parametrelerinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir.

XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met genotiplerinin kombinasyonu DNA hasar parametreleri açısından incelendiğinde Arseniğe maruz kalan bireyler sahip oldukları XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met genotiplerine göre DNA hasar parametrelerinin Gln/Met genotip kombinasyonuna sahip bireylerin Arg/Thr genotipine sahip bireylere göre DNA hasarı yüksek olup, CL, TI ve TL comet parametreleri, kan As düzeyi ile istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p < 0.01$).

Sonuç olarak, mesleki arsenik maruziyetinin önemli derecede DNA hasarına sebep olduğu söylenebilir. DNA onarım enzimlerinin gen varyantları ile DNA hasarı arasındaki ilişkinin araştırılması metal toksisite mekanizmalarının aydınlatılması yönünden önem taşımaktadır. Çalışmamızdaki XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met gen polimorfizmlerinin As toksik metalinin sebep olduğu DNA hasar derecesini artırdığı gösterilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda iş yerlerinde metal maruziyeti bilinen bireylerin kan arsenik düzeyleri ve comet yöntemi ile lenfosit DNA hasarı belirlenmiştir. Ayrıca XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met gen polimorfizmleri ile bu hasarlara bireysel duyarlılık yönünden etkisi araştırılarak karşılaştırma yapılmıştır. Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesine başvuran 25-65 yaş arası 175 işçinin kan örnekleriyle analizler yapılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen bireylerin kan As düzeyleri ile DNA hasar derecesini gösteren comet parametreleri arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir CL, TI ($p<0.001$), TL ($p<0.05$). Ancak As'e maruziyet süreleri ile DNA hasar parametreleri ve kan As düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Arseniğe maruz kalan bireylerde, XRCC1 Arg399Gln polimorfizminin; %49,7'si homozigot tipik (Arg/Arg), %39,4'ü heterozigot (Arg/Gln) ve %10,9'u homozigotatipik (Gln/Gln) genotip olarak belirlenmiştir. XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile oluşan alel frekansları ise (n:350); Argalel frekansı; % 69,4 (n:243), Glnalel frekansı ise % 30,6 (n:107) olarak belirlenmiştir.

Arseniğe maruz kalan bireylerde, XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile comet parametreleri arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir ($p<0.01$). XRCC1 Arg399Gln homozigot atipik (Gln/Gln) ile heterozigot (Arg/Gln) genotipe sahip bireylerde, homozigot tipik (Arg/Arg) bireylere göre lenfosit DNA hasarının yüksek olduğu belirlenmiştir.

XRCC3 Thr241Met polimorfizminin ise; %30,3'ü homozigot tipik (Thr/Thr), %49,1'i heterozigot (Thr/Met) ve %20,6'sı homozigot atipik genotip (Met/Met) olarak belirlenmiştir. XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile oluşan alel frekansları ise (n:350); C alel frekansı; % 54,9 (n:192), T alel frekansı ise % 45,1 (n:158) olarak belirlenmiştir. Areseniğe maruz kalan bireylerde, XRCC3 Thr241Metpolimorfizmi ile TI parametresi ile arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p<0.05$). XRCC3 Thr241Methomozigot atipik (Met/Met) birey ile

heterozigot (Thr/Met) genotipe sahip bireylerde, homozigot tipik (Thr/Thr) bireylere göre, lenfosit DNA hasar göstergesi CL, TL ve TI parametrelerinde oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir.

XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met genotiplerinin kombinasyonu araştırılmıştır. As'e maruz kalan bireyler sahip oldukları XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met genotiplerine göre DNA hasar parametreleri ile değerlendirildiğinde her iki gen polimorfizmi de homozigot atipik olan bireylerin (Gln/Metgenotip kombinasyonuna sahip), her iki geni de homozigot tipik olan bireylere (Arg/Thr genotip kombinasyonuna sahip) göre DNA hasarı yüksek olup, CL, TI ve TL comet parametreleri, kan As düzeyi ile istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki gözlenmiştir ($p<0.01$). İncelediğimiz XRCC1 ve XRCC3 genetik varyasyonlarının DNA hasar parametrelerini etkilediği sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak, mesleki arsenik maruziyetinin önemli derecede DNA hasarına sebep olduğu söylenebilir. XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met polimorfizmlerinin arseniğin neden olduğu baz hasarları ve DNA kırıklarına karşı azalan onarım kapasitesi ile ilişkili olabileceğine ve bireysel duyarlılıkta önemli bir rol oynadığına dikkat çekmektedir.

Çalışmamızda DNA onarım enzimlerinin gen varyantları ile DNA hasarı arasındaki ilişkinin araştırılması metal toksisite mekanizmalarının aydınlatılması yönünden önem taşımaktadır. Çalışmamızdaki As toksik metalin sebep olduğu DNA hasar derecesinin XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met gen polimorfizmlerinin etkilediği gösterilmiştir. Yaptığımız çalışma arseniğe maruz kalan bireylerde DNA hasarının XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi inceleyen ilk bilimsel çalışma olması bakımından önemlidir.

Yaptığımız çalışma ile elde edilen sonuçlardan yola çıkarak arseniğe maruz kalan iş yerlerinde çalışan bireylerin sağlık kontrollerine gereken hassasiyet gösterilmeli, kontroller sırasında maruzieti fazla olan bireylerde XRCC1 ve XRCC3 gen bölgeleri analiz edilmeli. Duyarlı bireylerin maruziyetin daha az olacağı birimlerde çalıştırılmalı.

Çalışma ortamlarında mesleki maruziyeti azaltabilecek hatta ortadan kaldıracabilecek koruma önlemlerinin alınması sağlanmalıdır. Bunun için iş yeri sahiplerinin alet ekipman bakımından gerekli hassasiyeti göstermeli. Özellikle maske, ortam havalandırılması önem teşkil etmektedir. Havadaki As konsantrasyonu minimum dereceye düşürülmelidir.

İş yerlerinde çalışanların ise çalışma ortamlarında nasıl bulunmaları gerektiği, kullanacakları malzemelerin gerekliliğini ve önemini içeren eğitimler verilmeli. Maruziyeti en aza indireyecek çalışma ortamları sağlanmalıdır.

ÖZET

Arseniğe Maruz Kalan Bireylerde Lenfosit DNA Hasarının XRCC1 ve XRCC3 Gen Polimorfizmleri ile İlişkisi

Bu çalışmanın amacı, arseniğe maruz kalan bireylerde lenfosit DNA hasarının XRCC1 ve XRCC3 gen polimorfizmleri ile ilişkisini araştırmaktır.

Çalışmada, arseniğe maruz kalan 175 bireyin periferik lenfosit DNA hasarı, alkali comet yöntemi Comet Length (CL), Tail Intensity(TI), Tail Length (TL) parametrelerine göre değerlendirilerek tespit edilmiştir. Kan arsenik (As) düzeyi Grafit Fırınlı Atomik Absorbsiyon Spektroskopisiyle (GFAAS) belirlenmiş ve bireysel duyarlılıkla ilgili olarak X-ray repair cross complementing group 1 (XRCC1) Arg399Gln ve X-ray cross-complementing group 3 (XRCC3) Thr241Met gen polimorfizmleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu- Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (PCR-RFLP) tekniği ile analiz edilmiştir. Kan As düzeyleri ile DNA hasar derecesini gösteren comet parametreleri arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki olduğu belirlenmiştir CL ve TI için $p<0,001$; TL için $p<0,05$.

Arseniğe maruz kalan işçilerde, XRCC1 Arg399Gln homozigot atipik (Gln/Gln) ile heterozigot (Arg/Gln) genotipe sahip bireylerde, homozigot tipik (Arg/Arg) bireylere göre lenfosit DNA hasarının yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,01$). XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile comet parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p<0,05$). XRCC3 Thr241Met homozigot atipik (Met/Met) birey ile heterozigot (Thr/Met) genotipe sahip bireylerde, homozigot tipik (Thr/Thr) bireylere göre, lenfosit DNA hasarının yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda artan kan As düzeyinin lenfosit DNA hasarına sebep olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met polimorfizm varyant genotiplerinin, baz hasarı ve zincir kırıklarını indükleyen arsenik maruziyetine karşı DNA onarım kapasitesindeki azalma ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Arsenik, XRCC1, XRCC3, polimorfizm, metal, lenfosit DNA hasarı.

SUMMARY

The Association of Lymphocyte DNA Damage with XRCC1 and XRCC3 Gene Polymorphisms in Individuals Exposed to Arsenic

The aim of this study was to investigate the association of lymphocyte DNA damage with XRCC1 and XRCC3 gene polymorphisms in individuals exposed to arsenic.

In this study, DNA damages of the peripheral blood lymphocytes were evaluated according to the alkaline comet assay parameters including Comet Length (CL), Tail Intensity (TI), Tail Length (TL) in 175 individuals exposed to arsenic. Blood As level was detected by graphite furnace atomic absorption spectroscopy (GFAAS) and X-ray repair cross complementing group 1 (XRCC1) Arg399Gln and X-ray cross-complementing group 3 (XRCC3) Thr241Met gene polymorphisms were analyzed by Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) technique to detect individual susceptibility. A statistically significant association was found between blood As level and comet parameters CL, TI ($p < 0.001$), TL ($p < 0.05$).

Lymphocyte DNA damages were found significantly higher in individuals exposed to arsenic with XRCC1 Arg399Gln homozygous atypical (Gln/Gln) genotype and heterozygote (Arg/Gln) genotype than those with homozygous typical (Arg/Arg) genotype ($p < 0.01$). There was a statistically significant association between XRCC3 Thr241Met polymorphism and comet parameters ($p < 0.05$). It was detected that lymphocyte DNA damages were significantly higher in individuals with XRCC3 Thr241Met homozygous atypical (Met/Met) and heterozygote (Thr/Met) genotypes than those with homozygous typical (Thr/Thr) genotype.

Our study showed that increased blood As level caused DNA damages. Furthermore, it was suggested that variant genotypes of XRCC1 Arg399Gln polymorphism and XRCC3 Thr241Met polymorphism may be associated with decreased DNA repair capacity against As exposure induced base damage and strand breaks.

KeyWords: Arsenic, XRCC1, XRCC3, polymorphism, metal, lymphocyte DNA damage

KAYNAKLAR

- ABDEL, RSZ., ZEİN RA., (2000). The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NNK. *CancerLetters*. **159**(1):63-71.
- ABHYANKAR LN, JONES MR, GUALLAR E, NAVAS-ACIEN A. (2012). Arsenic exposure and hypertension: a systematic review. *Environ Health Perspect***120**:494–500.
- ABIR T, RAHMAN B, D’ESTE C, FAROOQ A, MILTON AH. (2012). The association between chronic arsenic exposure and hypertension: a meta-analysis. *J Toxicol*.**19**:87-93
- AHMAN L. CORNS W, BRYCE D.W.,STOCKWELL P.B (2000). Determination of mercury, selenium, bismuth, arsenic and antimony in human hair by microwave digestion atomic fluorescence spectrometry.*Talanta* **52**: 833–843
- AHMED MD. K., MD. MAMUN H., HOSSAIN M. A., ARIF M., PARVIN E., AKTER M.S, KHAN MS. (2011). Monirul Islam Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. *Chemosphere*.**84**:143–149
- AHMED S, AHSAN KB, KIPPLER M, MILY A, WAGATSUMA Y, HOQUE AM. (2012). In utero arsenic exposure is associated with impaired thymic function in newborns possibly via oxidative stress and apoptosis. *Toxicol Sci*.**129**(2):305–314.
- AHMED S, KHODA SM, REKHA RS, GARDNER RM, AMEER SS, MOORE S. (2011). Arsenic-associated oxidative stress, inflammation, and immune disruption in human placenta and cord blood. *Environ Health Perspect*.**119**:258–264.
- AKBULUT NE, TUNCER AM. (2011). Accumulation of heavy metals with water quality parameters in Kızılırmak River Basin (Delice River) in Turkey.*Environ Monit Assess*.**173**(1-4):387-95.

- ALKEMADE C. T. J., HOLLANDER T., SNELLEMAN W. ZEEGERS P. J. T. (1982). Metal Vapours in Flames, Pergamon Press, Oxford. And Biophysical Research Communications. **123**: 291–298.
- ANDERSON D, YU, T-W, MCGREGOR DB. (1998). Comet assay responses as indicators of carcinogenic exposure. *Mutagen*. **13**:539 –555.
- ANDREW AS, JEWELL DA, MASON RA, WHITFIELD ML, MOORE JH, KARAGAS MR. (2008). Drinking-water arsenic exposure modulates gene expression in human lymphocytes from a U.S. population. *Environ Health Perspect*. **116**:524–531.
- ANNING DW, PAUL AP, MCKINNEY TS, HUNTINGTON JM, BEXFIELD LM, THIROS SA. (2012). Predicted Nitrate and Arsenic Concentrations in Basin-Fill Aquifers of the Southwestern United States. Available: <http://pubs.usgs.gov/sir/2012/5065/>
- ARAUJO, F.D., PIERCE, A.J., STARK, J.M., JASIN, M. (2002). Variant XRCC3 implicated in cancer is functional in homology-directed repair of double-strand breaks. *Oncogene*. **21**:4176–80.
- ARGOS M, KALRA T, PIERCE BL, CHEN Y, PARVEZ F, ISLAM T. (2011). A prospective study of arsenic exposure from drinking water and incidence of skin lesions in Bangladesh. *Am J Epidemiol*. **174**(2):185–194.
- ASANTE KA, AGUSA T, SUBRAMANIAN A, ANSA-ASARE OD, BINEY CA, TANABE S. (2007). Contamination status of arsenic and other trace elements in drinking water and residents from Tarkwa, a historic mining township in Ghana. *Chemosphere* **66**(8):1513–1522.
- AXELSON O.(1980). Arsenic compounds and cancer. In: V. Vainio (eds). Occupational Cancer and Carcinogenesis. Hemisphere Publishing Corporation, Washington, D.C. 1229–1235.
- AYOTTE JD, MONTGOMERY DL, FLANAGAN SM, ROBINSON KW. (2003). Arsenic in groundwater in eastern New England: occurrence, controls, and human health implications. *Environ Sci Technol*. **37**(10):2075–2083

- BABA A, TAYFUR G. (2011). Groundwatercontamination and its effect on health in Turkey. *Environ Monit Assess. Dec.* **183**(1-4):77-94.
- BACAKSIZ A.,KAYAALTI Z., SOYLEMEZ E., TUTKUN E., SÖYLEMEZOĞLU T. (2012). Lymphocyte DNA damage in Turkish asphalt workers detected by the comet assay.48th Congress of the European Societies of Toxicology. **211**: 153
- BAKAR, C., BABA A. (2009). Metaller ve İnsan Sağlığı: Yirminci Yüzyıldan Bugüne ve Geleceğe Miras Kalan Çevre Sağlığı Sorunu, Tıbbi Jeoloji Çalıştayı, Ürgüp Bld., Kültür Merkezi, Ürgüp/ Nevşehir
- BARRETT JC, LAMB PW, WANG TC, LEE TC. (1989). Mechanism of arsenic İnduced cell transformation. *BiolTrace Elem Res.***21**:421–429.
- BARTRİP, P. (1992). A pennruth of arsenic for ratpoison: theArsenicAct, 1851 and the prevention of secret poisoning.*Med Hist.***36**(1): 53–69.
- BASTOS, H.N. (2009). Association of polymorphisms in genes of thehomologousrecombinationDNA repairpathwayandthyroid cancer risk. *Thyroid.* **19**(10),1067–1075.
- BASU, A ., SOMA A, GHOSHAL S., MONDAL L, CHAUBEY, R.C , BHILWADE H,N, RAHMAND M,M., GIRI A.K. (2005). Assessment of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of individuals susceptible to arsenic induced toxicity in West Bengal, India. *Toxicology Letters.***159**:100–112
- BASU, A., MAHATA, J., GUPTA, S., GIRI, A.K. (2001). Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic—a review. *Mutat. Res.***488**: 171–194.
- BATAR B, GÜVEN M, BARIŞ S, CELKAN T, YİLDİZ I. (2009). DNA repair gene XPD and XRCC1 polymorphisms and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia.*Leuk Res.***33**(6):759-63.
- BATES MN, REY OA, BIGGS ML, HOPENHAYN C, MOORE LE, KALMAN D. (2004). Case-control study of bladder cancer and exposure to arsenic in Argentina. *Am J Epidemiol.***159**(4):381–389.

- BELDÜZ AO., HATİPOĞLU R., OZKAN H. (2007). DNA replikasyonu ve onarımı. *Moleküler biyoloji kitabı*.3: 93-142
- BHATLA, D. (2008). DNA repair polymorphisms and outcome of chemotherapy for acute myelogenous leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Leukemia*. 22(2), 265–272.
- BHATTACHARJEE P, BANERJEE M, GİRİ AK. (2013). Role of genomic instability in arsenic-induced carcinogenicity. A review. *Environ Int*.53:29-40.
- BHATTACHARJEE, P., BANERJEE, M., GİRİ, A.K. (2013). Role of genomic instability in arsenic-induced carcinogenicity. A review, *Environ Int*. 53:29-40
- BISSEN, M., FRIMMEL, F.H. (2003). Arsenic–A review part I: occurrence, toxicity, speciation, mobility. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 1, 9-18., part II. Oxidation of arsenic and its removal in water treatment, *Acta Hydrochim Hydrobiol*.31:97–107
- BURÇAK, G., ANDİCAN, G. (2004). Oksidatif dna hasari ve yaşlanma. *Cerrahpaşa tıp.derg*.35:4
- BURGESS JL, MEZA MM, JOSYULA AB, POPLIN GS, KOPPLIN MJ, MCCLELLEN HE. (2007). Environmental arsenic exposure and urinary 8-OHdG in Arizona and Sonora. *Clin Toxicol*.45(5),490–498.
- BÜTÜNER B. ve KANTARCI G.(2006). Mutasyon , Dna Hasari ,Onarım Mekanizmaları Ve Kanslerle İlişkisi .*Ankara Ecz. Fak. Derg*.35 (2): 149-170,
- CALDECOTT KW, AOUFUCHİ S, JOHNSON P, SHALL S. (1996). XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res*.24:4387–4394.
- CALDERÓN J, NAVARRO ME, JIMENEZ-CAPDEVILLE ME, SANTOS-DIAZ MA, GOLDEN A, RODRIGUEZ-LEYVA I. (2001). Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environ Res*.85(2):69–76.

- CALDERON RL, HUDGENS E, LE X CH, SCHREINMACHERS D, THOMAS DJ. (1999). Excretion of arsenic in urine as a function of exposure to arsenic in drinking water. *Environ Health Perspect.* **107**:663–667.
- CAMACHO LM, GUTIÉRREZ M, ALARCÓN-HERRERA MT, VILLALBA MDE L, DENG S. (2011). Occurrence and treatment of arsenic in groundwater and soil in northern Mexico and southwestern USA. *Chemosphere.* **83**(3):211–225.
- CAPPELLI E, TAYLOR R, CEVASCO M, ABBONDANDOLO A, CALDECOTT K, FROSINA G. (1997). Involvement of XRCC1 and DNA ligase III gene products in DNA base excision repair. *J Biol Chem.* **272**:23970–23975.
- CARAPELLA, SC. (1992). Arsenic and arsenic alloys. In: Kroschwitz JI, Howe-Grant M, eds. Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. New York, NY. *John Wiley and Sons.* **3**: 624-633.
- CHAN PC, HUFF J. (1997). Arsenic carcinogenesis in animals and in humans: Mechanistic, experimental and epidemiological evidence. *Environ Carcino Ecotox Rev.* **15**:83–122.
- CHARLOT T., KUMARA R., RANJIT K. THIRUMARAN, SM. (2006). Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, APEX1, XRCC3 and NBS1, and the risk for lung cancer in never- and ever-smokers. *Elsevier Ireland Ltd.* **54**(3): 285-292.
- CHEN CJ, HSU LI, TSENG CH, HSUEH YM, CHIOU HY. (1999). Emerging epidemics of arseniasis in Asia. In: Chappell WR, Abernathy CO, Calderon RL, editors. Arsenic exposure and health effects. 1st edition. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo: *Elsevier Science.* 113–121.
- CHEN CJ, WANG SL, CHIOU JM, TSENG CH, CHIOU HY, HSUEH YM. (2007). Arsenic and diabetes and hypertension in human populations: a review. *Toxicol Applied Pharmacol.* **222**(3):298–304.
- CHEN CL, CHIOU HY, HSU LI, HSUEH YM, WU MM, WANG YH. (2010). Arsenic in drinking water and risk of urinary tract cancer: a follow-up study from northeastern Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **19**(1):101–110.

- CHEN Y, AHSAN H. (2004). Cancer burden from arsenic in drinking water in Bangladesh. *Am J Public Health*.**94**(5):741–744.
- CHEN Y, GRAZIANO JH, PARVEZ F, LIU M, SLAVKOVICH V, KALRA T. (2011). Arsenic exposure from drinking water and mortality from cardiovascular disease in Bangladesh: prospective cohort study. *BMJ***342**: 2431
- CHEVILLE, N.F. (1983). Celi pathology. The Iowa State University, Ames, Iowa, USA.
- CHIOU HY, CHIOU ST, HSU YH, CHOU YL, TSENG CH, WEI ML. (2001). Incidence of transitional cell carcinoma and arsenic in drinking water: a follow-up study of 8,102 residents in an arseniasis-endemic area in northeastern Taiwan. *Am J Epidemiol* **153**(5):411–418.
- CHIU HF, HO SC, WANG LY, WU TN, YANG CY. (2004). Does arsenic exposure increase the risk for liver cancer? *J Toxicol Environ Health A* **67**(19):1491–1500.
- CHOU, H.S.J., ROSA, C.T.D.(2003). Case studiesarsenic. *J. Hyg. Env. Health*.**206**: 381–386.
- CHOWDHURY, U.K., RAHMAN, M.M.,MANDAL, B.K., PAUL, K., LODH, D., BISWAS, B.K., BASU, G.K., CHANDA, C.R., SAHA, K.C., MUKHERJEE, S.C., ROY, S., DAS, R., KAIES, I., BARUA, A.K., PALIT, S.K.,QUAMRUZZAMAN, Q., CHAKRABORTI, D. (2001). Groundwater arsenic contamination and human suffering in West Bengal, India and Bangladesh. *Environ. Sci.* **8**:393–415.
- BĂNESCU C, TÎLÎNCA M, BENEDEK EL, DEMIAN S, MACARIE I. (2013). XRCC3 Thr241Met polymorphismand risk of acutemyeloidleukemia in a Romanianpopulation. *Gene*. **526**: 478–483.
- COLLINS A.R., DOBSON V.L., DUINSKA M., KENNEDY G., TTINA R. (1997). Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, *Mutation Research*. **375**(2), 183-193.
- COLLINS AR, MA AG, DUTHIE SJ. (1995). The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res.* **336**: 69–77.

- COLLINS, A.R., DOBSON, V.L., DUSINSKA, M., KENNEDY, G., STETINA, R. (1997). The comet assay: what can it really tell us? *Mutat. Res.***375**:183–193.
- COTELLE S. AND FERARD J. F., (1999). Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. *Environmental and Molecular Mutagenesis***34**:246-255.
- CULLEN, W. R. (2008). Is arsenic an aphrodisiac? The sociochemistry of an element. *royal society of chemistry, cambridge, u.k.***13**:978
- DANADEVİ K, ROZATİ,R., BANU,B.S., RAO,P.H. AND GROVER,P. (2003) DNA damage in workers exposed to lead using comet assay. *Toxicology*.**187**: 183–193.
- DANADEVİ,K., ROZATİ,R., BANU,B.S. AND GROVER,P. (2004) Genotoxic evaluation of welders occupationally exposed to chromium and nickel using the Comet and micronucleus assays. *Mutagenesis*.**19**:35–41.
- DARRAGH, G., GEORGE M., HOWARD, C., KURT, S. (2009). Modelling the comet assay. *Biochemical Society Transactions*. **37**: (914–917)
- DEL RAZO L, GARCÍA-VARGAS G, VALENZUELA O, CASTELLANOS E, SÁNCHEZ-PEÑA L, CURRIER J. (2011). Exposure to arsenic in drinking water is associated with increased prevalence of diabetes: a cross-sectional study in the Zimapan and Lagunera regions in Mexico. *Environ Health*.**10**(1):73–84.
- DELİGEZER U, DALAY N. (2004). Association of the XRCC1 gene polymorphisms with cancer risk in Turkish breast cancer patients. *Exp Mol Med*.**36**(6):572-5.
- DEVİRİM K., KAYA N. (2004). Genetik polimorfizm ve mikrosatellitler . *Kafkas üniv. vet fak. Derg.***10**(2):2015-220.
- DİKİLİTAŞ, M., KOÇYİĞİT, A. (2010). Canlılarda “tek hücre jel elektroforez” yöntemi ile dna hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi. *HR.Ü.Z.F. Dergisi*.**14**: 77- 89
- DİNÇER, Y., KANKAYA, S. (2010). DNA Hasarının Belirlenmesinde Comet Assay.*Türkiye Klinikleri*.**30**:1365-73.
- DONG J, SU SY.(2009). The association between arsenic and children’s intelligence: a meta-analysis. *Biol Trace Elem Res*.**129**(103):88–93.

- DOWLING, T.E., MORITZ, C., PALMER, J.D., AND RIESEBERG, L.H. (1996). Nucleic acids III: analysis of fragments and restriction sites. *Molecular Systematics*. 249-320.
- DUARTE, M.C., COLOMBO, J., ROSSIT, A.R., CAETANO, A., BORIM, A.A., WORNATH, D., SILVA, A.E. (2005). Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3, interaction with environmental exposure and risk of chronic gastritis and gastric cancer. *World J Gastroenterol*.**11**(42):6593-6600.
- DUSÍNSKA, M., COLLINS, A.R. (2008). The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*.**23**(3):191-205.
- ENTERLINE PE, DAY R, MARSH GM. (1995). Cancer related to exposure to arsenic at a copper smelter. *Occup Environ Med*.**52**: 28–32.
- 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.
- ETTINGER AS, ZOTA AR, AMARASIRIWARDENA CJ, HOPKINS MR, SCHWARTZ J, HU H. (2009). Maternal arsenic exposure and impaired glucose tolerance during pregnancy. *Environ Health Perspect*.**117**:1059–1064.
- FAIRBAIRN DW, OLIVE PL, O'NEILL KL. (1995). The Comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*.**339**:37–59.
- FAUST F, KASSIEF, KNASMULLER S. (2004). The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res*.**566**:209–229.
- FERRECCIO C, GONZALEZ C, MILOSAVJLEVIC V, MARSHALL G, SANCHI AM, SMITH AH. (2000). Lung cancer and arsenic concentrations in drinking water in Chile. *Epidemiology* **11**(6):673–679.
- GHOSH P., BANERJEE M., ASHOK K. GIRI , RAY K. (2008). Toxicogenomics of arsenic: Classical ideas and recent advances. *Mutation Research***659**:293–301.

- GIBB H, HAVER C, GAYLOR D, RAMASAMY S, LEE JS, LOBDELL D. (2011). Utility of recent studies to assess the National Research Council 2001 estimates of cancer risk from ingested arsenic. *Environ Health Perspect.***119**:284–290.
- GIOVANNELLI L, SAEVA C, MASALA G, TESTA G, SALVINI S, PITOZZI V, RIBOLI E, DOLARA P, PALLI D. (2002). Nutritional and lifestyle determinants of DNA oxidative damage: a study in a Mediterranean population. *Carcinogenesis*. **23**: 1483–1489.
- GIOVANNELLI L., PITOZZI V., RIOLO S., DOLARA P. (2003).”Measurement of DNA breaks and oxidative damage in polymorphonuclear and mononuclear. *General and applied toxicology*.**4**:1832.
- GONG G, HARGRAVE KA, HOBSON V, SPALLHOLZ J, BOYLAN M, LEFFORGE D. (2011). Low-level groundwater arsenic exposure impacts cognition: a project FRONTIER study. *J Environ Health*.**74**(2):16–22.
- GONG G, O'BRYANT SE. (2012). Low-level arsenic exposure, AS3MT gene polymorphism and cardiovascular diseases in rural Texas counties. *Environ Res*.**113**:52–57.
- GOSEBATT ME, VEGA L, SALAZAR AM, MONTERO R, GUZMAN P, BLAS J. (1997). Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutat Res*.**386**(3):219–228.
- GOULART M., BATOREU,M.C., RODRIGUES,A.S., LAÍRES,A. AND RUEFF,J. (2005) Lipoperoxydation products and thiol antioxidants in chromium exposed workers. *Mutagenesis*.**20**: 311–315.
- GROVER, P., DANADEVI, K., MAHBOOB, M., ROZATI, R., SALEHA, B., RAHMAN, M.F. (2003). Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing comet assay. *Mutagenesis*.**18**:201–205.
- GÜVEN M, UNAL M, BATAR B, EROĞLU E, DEVAROĞLU K, TAMÇELİK N, UÇAR D, SARICI A. (2007). Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XPD and risk of primary open angle glaucoma (POAG). *Mol Vis*.**13**:12-7.

- H.V. APOSHIAN, A. ARROYO, M.E. CEBRIAN, L.M. DEL RAZO, K.M. HURLBUT, R.C. DART, D. GONZALEZ-RAMIREZ, H. KREPPPEL, H. SPEISKY, A. SMITH, M.E. (1997) Gonsebatt, P. Ostrosky-Wegman, M.M. Aposhian, DMPS-arsenic challenge test. I. Increased urinary excretion of monomethylarsonic acid in humans given dimercaptopropanesulfonate, *J. Pharmacol. Exp Ther.* **282**: 192–200.
- HAMADANI JD, TOFAIL F, NERMELL B, GARDNER R, SHIRAJI S, BOTTAI M. (2011). Critical windows of exposure for arsenic-associated impairment of cognitive function in pre-school girls and boys: a population-based cohort study. *Int J Epidemiol* **40**(6):1593–1604.
- HAMANO, T., MATSUI, H., OHTAKE, N., NAKATA, S., SUZUKI, K. (2008). Polymorphisms of DNA repair genes, XRCC1 and XRCC3, and susceptibility to familial prostate cancer in a Japanese population. *Asia Pac. J. Clin. Oncol.* **4**:21–26.
- HAMDY, M.S., EL-HADDAD, A.M., BAHAA EL-DIN, N.M., MAKHLOUF, M.M., ABDEL-HAMID, S.M. (2011). RAD51 and XRCC3 gene polymorphisms and the risk of developing acute myeloid leukemia. *J. Investig. Med.* **59** (7): 1124–1130.
- HAN B, JENG WL, CHEN RY, VE ARK. (1998) Estimation Of Target Hazard Quotients And Potential Health Risks For Metals By Consumption Of Seafood In Taiwan. *Arch Environ Contam Toxicol* **35**:711–720.
- HAQUE R, MAZUMDER DN, SAMANTA S, GHOSH N, KALMAN D, SMITH MM. (2003). Arsenic in drinking water and skin lesions: dose-response data from West Bengal, India. *Epidemiology* **14**(2):174–182.
- HE, X.F. (2012). Association between the XRCC3 polymorphisms and breast cancer risk: meta-analysis based on case-control studies. *Mol. Biol. Rep.* **39** (5):5125–5134.
- HECK JE, ANDREW AS, ONEGA T, RIGAS JR, JACKSON BP, KARAGAS MR. (2009). Lung cancer in a U.S. population with low to moderate arsenic exposure. *Environ Health Perspect.* **117**:1718–1723.

- HERMANN M. BOLT. (2012). ARSENIC: An ancient toxicant of continuous public health impact, from Ice man Ötzi until now. *Arch Toxicol* **86**:825–830
- HOFFMANN H, HOGE J, SPEIT, G. (2005). The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. *Mutagenesis*. **20**:455-466.
- HOPENHAYN-RICH C., HERTZ-PICCIOTTO I., BROWNING S., FERRECCIO C, PERALTA C. (1999). Reproductive and developmental effects associated with chronic arsenic exposure. In: Chappell WR, Abernathy CO, Calderon RL, editors. *Arsenic exposure and health effects*. 1st edition. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo: *Elsevier Science*. 151–164.
- HOROZ M., BOLUKBAS, C., BOLUKBAS, F., KOCYIGIT, A., ASLAN M., KOYLUA.O., GUMUS M., CELIK H., KOKSAL M. (2006). “Assessment of peripheral DNA damage by alkaline comet assay in maintenance hemodialysis subjects with hepatitis C infection. *Mutat Res*. **596**(1-2):137-142.
- HU JJ, SMITH TR, MILLER MS, MOHRENWEISER HW, GOLDEN A, CASE LD. (2001). Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis*. **22**(6):917-22.
- HUBAUX R, BECKER-SANTOS DD, ENFIELD KS, ROWBOTHAM D, LAM S, LAM WL, MARTÍNEZ VD. (2013). Molecular features in arsenic-induced lung tumors. *Mol Cancer*. **12**:20.
- HUGHES MICHAEL F. , BARBARA D. BECK, YU CHEN, ARI S. LEWIS, AND DAVID J. THOMAS. (2011). Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicological Sciences*. **123**(2): 305–332
- HUIHUA LI, TAM CAM HA , BEE CHOOTAİ. (2009) XRCC1 gene polymorphisms and breast cancer risk in different populations: A meta-analysis. *The Breast*. **18**:183–191

- IARMARCOVAÏ G, SARI-MINODIER I, CHASPOUL F, BOTTA C, DE MÉO M, ORSIÈRE T, BERGÉ-LEFRANC JL, GALLICE P, BOTTA A. (2005). Risk assessment of welders using analysis of eight metals by ICP-MS in blood and urine and DNA damage evaluation by the comet and micronucleus assays; influence of XRCC1 and XRCC3 polymorphisms. *Mutagenesis*.**20**(6):425-32.
- IMPROTA, G. (2008). Polymorphisms of the DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 and risk of lung and colorectal cancer: a case-control study in a Southern Italian population. *Anticancer Res.* **28** (5B):2941–2946
- INTARASUNANONT P, NAVASUMRIT P, WORAPRASIT S, CHAISATRA K, SUKWA, MAHIDOL C. (2012). Effects of arsenic exposure on DNA methylation in cord blood samples from newborn babies and in a human lymphoblast cell line. *Environ Health* **11**(1):31
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). (1980). Monographs on the Evaluation of the some metals and metallic compounds. Lyon: WHO. **23**:39–141.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). (1987). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans—arsenic. Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC monographs. Lyon, France: IARC, suppl. **7**:100–106.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). (2002). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans—some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. Lyon: WHO, vol. 84.
- ISLAM MRD, KHAN IP, HASSAN SMD, MCEVOY MM, D'ESTE CP, ATTIA JP. (2012). Association between type 2 diabetes and chronic arsenic exposure in drinking water: a cross sectional study in Bangladesh. *Environ Health*. **11**(1):38

- ITO H, MATSUO K, HAMAJİMA N, MİTSUDOMİ T, SUGİURA T, SAİTO T, YASUE T, LEE KM, KANG D, YOO KY, SATO S, UEDA R, TAJİMA K. (2004). Gene-environment interactions between the smoking habit and polymorphisms in the DNA repair genes, APE1 Asp148Glu and XRCC1 Arg399Gln, in Japanese lung cancer risk. *Carcinogenesis*.**25**(8):1395-401
- JOMOVA K, JENİSOVA Z, FESZTEROVA M, BAROS S, LİSKA J, HUDECOVA D, RHODES CJ, VALKO M. (2011). Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J Appl Toxicol*. **31**(2):95-107.
- JOVANOVIĆ D, RASIĆ-MILUTINOVIĆ Z, PAUNOVIĆ K, JAKOVLJEVIĆ B, PLAVSIC S, MILOSEVIĆ J. (2013). Low levels of arsenic in drinking water and type 2 diabetes in Middle Banat region, Serbia. *Int J Hyg Environ Health*.**216**(1):50-55
- KANAAR, R.,HOEIJMAKERS, J.H.J., VAN GENT, D., C. (1998). Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair.*Trends in Cell Biology*.**8**:483-489
- KARAHALİL B, KOCABAS NA, OZÇELİK T. (2006). DNA repair gene polymorphisms and bladder cancer susceptibility in a Turkish population.*Anticancer Res*. **26**(6C):4955-8.
- KARKUCAK M., YAKUT T., EVRENSE T, DELİGONUL A., GULTEN T., OCAKOGLU G., KURT E., KANAT O., CUBUKCU E., SEHİTOGLU I. CANHOROZ M. (2012). *XRCC1* Gene Polymorphisms and Risk of Lung Cancer in Turkish Patients. *Int J Hum Genet*, **12**(2): 113-117
- KASPRZAK K.S., (1995). Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis. *Cancer Invest*. **13**: 411–430.
- KAYAALTI Z., SÖYLEMEZ E., BACAKSIZ A., DURAL E., YILMAZ H., SÖYLEMEZOĞLU T. (2012). Determination of lymphocyte DNA damage by use of comet assay in painters.48th Congress of the European Societies of Toxicology.**211**:8-9

- KAYAALTI Z., YAVUZ I., SOYLEMEZ E., BACAKSIZ A., TUTKUN E., SAYAL A., SOYLEMEZOGLU T. (2013). Evaluation of DNA Damage Using Three Comet Assay Parameters in Workers Occupationally Exposed to Lead. *Archives Of Environmental And Occupational Health*.
- KESSEL M., LIU SX., XU A., SANTELLA R., TOM K. H. (2002). Arsenic induces oxidative DNA damage in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* **235**: 301–308.
- KILE ML, BACCARELLI A, HOFFMAN E, TARANTINI L, QUAMRUZZAMAN Q, RAHMAN M. (2012). Prenatal arsenic exposure and DNA methylation in maternal and umbilical cord blood leukocytes. *Environ Health Perspect* **120**:1061–1066.
- KINNIBURGH D, SMEDLEY P. (2001). Arsenic Contamination of Groundwater in Bangladesh. British Geological Survey and Department of Public Health Engineering.
- KINTZ P, GINET M, MERQUES N, CIRIMELE V. (2007). Arsenic speciation of two specimens of Napoleon's hair. *Forensic sci int* **170**(2–3):204–206.
- KIYOHARA C, YOSHIMASU K. (2007). Genetic polymorphisms in the nucleotide excision repair pathway and lung cancer risk: A meta-analysis. *Int J Med Sci*. **4**:59-71.
- KLASSEN, C.D., AMDUR, M.O., DOULL, J. (1986). *Toxicology*. 3th Ed. Macmillan Publishing Company, New York, USA.
- KLAUDE M., ERIKSSON, S., NYGREN J., AHNSTRÖM, G. (1996). Mutation Research-DNA Repair. *Mutation Research/DNA repair*. **363**(2): 89-96.
- KOCABAŞ NA, KARAHALİL B. (2006) XRCC1 Arg399Gln genetic polymorphism in a Turkish population. *Int J Toxicol*. **25**(5):419-22.
- KUBOTA Y, NASH RA, KLUNGLAND A, SCHAR P, BARNES DE, LINDAHL T. (1996) Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *Embo J*. **15**:6662–6670.

- KULAKSIZ G, SANCAR A. (2007). Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanser. *Türk Biyokimya Dergisi*. **32**:104-11.
- KURTULMUS, S., AYDIN K.A. (2007). Dental Döküm Alasimlarının Genotoksisite, mutajenisite ve karsinojenisitesi. *SÜ Dishek Fak Derg.* **16**:73-78.
- LADIGES, W.C. (2006). Mouse models of XRCC1 DNA repair polymorphisms and cancer. *Oncogene*. **25**(11):1612-1619.
- LEE, S.A. (2007). Genetic polymorphism of XRCC3 Thr241Met and breast cancer risk: case-control study in Korean women and meta-analysis of 12 studies. *Breast Cancer Res. Treat.* **103** (1):71–76.
- LEONARD A, LAUWERYS RR. (1980). Carcinogenicity, teratogenicity, and mutagenicity of arsenic. *Mutat Res* **75**:49–62.
- LIAW J, MARSHALL G, YUAN Y, FERRECCIO C, STEINMAUS C, SMITH AH. (2008). Increased childhood liver cancer mortality and arsenic in drinking water in northern Chile. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**(8):1982–1987.
- LIEBERMAN, H. B. (2008). DNA Damage Repair and Response Proteins as Targets for Cancer Therapy. *Current Medicinal Chemistry*. **15**:360-367.
- LIU J, WAALKES MP. (2008). Liver is a target of arsenic carcinogenesis. *Toxicol Sci* **105**(1):24–32.
- L'VOV B. V., Forty years of electrothermal atomic absorption spectrometry. (1997). Advances and problems in theory, *Spectrochim. Acta B* **52**:1239-1245.
- MARSHALL G, FERRECCIO C, YUAN Y, BATES MN, STEINMAUS C, SELVIN S. (2007). Fifty-year study of lung and bladder cancer mortality in Chile related to arsenic in drinking water. *J Natl Cancer Inst* **99**(12):920–928.
- MATEUCA, R., AKA, P.V., DE BOECK, M., HAUSPIE, R., KIRSH-VOLDERS, M. AND LISON, D. (2005). Influence of hOGG1, XRCC1 and XRCC3 genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts. *Toxicol. Lett.* **156**:277–288.

- MATULLO, G., PALLI, D., PELUSO, M., GUARRERA, S., CARTURAN, S., CELENTANO, E., KROGH, V., MUNNIA, A., TUMINO, R., POLIDORO, S., PIAZZA, A., VINEIS, P. (2001). XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and 32P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis*. **22**: 1437–1445.
- MAZUMDER DN, DAS GUPTA J, CHAKRABORTYAK, CHATTERJEE A, DAS D, CHAKRABORTY D (1992). Environmental pollution and chronic arsenicosis in South Calcutta. *Bull WHO* **70**(4):481–485.
- MAZUMDER DNG, DE BK, SANTRA A, DASGUPTA J, GHOSH N, ROY BK. (1999). Chronic arsenic toxicity: epidemiology, natural history and treatment. In: Chappell WR, Abernathy CO, Calderon RL, editors. *Arsenic exposure and health effects*. 1st edition. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo: Elsevier Science. 335–347.
- MEZA MM, KOPPLIN MJ, BURGESS JL, GANDOLFI AJ. (2004). Arsenic drinking water exposure and urinary excretion among adults in the Yaqui Valley, Sonora, Mexico. *Environ Res* **96**(2):119–126.
- MEZA MM, YU L, RODRIGUEZ YY, GUILD M, THOMPSON D, GANDOLFI AJ. (2005). Developmentally restricted genetic determinants of human arsenic metabolism: association between urinary methylated arsenic and CYT19 polymorphisms in children. *Environ Health Perspect* **113**:775–781.
- MICHAEL F. HUGHES,, BARBARA D. BECK, YU CHEN, ARI S. LEWIS, AND DAVID J. THOMAS. (2011). Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicological sciences* **123**(2): 305–332
- MILTON AH, SMITH W, RAHMAN B, HASAN Z, KULSUM U, DEAR K. (2005). Chronic arsenic exposure and adverse pregnancy outcomes in Bangladesh. *Epidemiology* **16**(1):82–86.

- MOHRENWEISER HW, CARRANO AV, FERTITTA A, PERRY B, THOMPSON LH, TUCKER JD, WEBER C.A. (1989). Three DNA repair genes, ERCC1, ERCC2, and XRCC1, have been regionally mapped on human chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet.* **52**(1-2):11-4.
- MOON K, GUALLAR E, NAVAS-ACIEN A. (2012). Arsenic exposure and cardiovascular disease: an updated systematic review. *Curr Atheroscler Rep.* **14**(6):542-55.
- MOORE LE, WIENCKE JK, BATES MN, ZHENG S, REY OA, SMITH AH. (2004). Investigation of genetic polymorphisms and smoking in a bladder cancer case-control study in Argentina. *Cancer Lett* **211**(2):199-207.
- MORALES KH, RYAN L, KUO TL, WU MM, CHEN CJ. (2000). Risk of internal cancers from arsenic in drinking water. *Environ Health Perspect* **108**(7):655-661.
- NACCARATI A, PARDINI B, HEMMINKI K, VODICKA P. (2007). Sporadic colorectal cancer and individual susceptibility: a review of the association studies investigating the role of DNA repair genetic polymorphisms. *Mutat Res* **635**:118-145.
- NACCARATI A, SOUCEK P, STETINA R, HAUFROID V, KUMAR R, VODICKOVA L, TRTKOVA K, DUSINSKA M, HEMMINKI K, VODICKA P. (2006). Genetic polymorphisms and possible gene-gene interactions in metabolic and DNA repair genes: effects on DNA damage. *Mutat Res.* **593**(1-2): 22-31.
- NAUJOKAS M F., ANDERSON B, AHSAN H., APOSHIAN V., GRAZIANO J.H., THOMPSON C., WILLIAM A. S. (2013). The Broad Scope of Health Effects from Chronic Arsenic Exposure: Review Update on a Worldwide Public Health Problem. *Environmental Health Perspectives.* **121**:295-301.
- NIELSEN MG, LOMBARD PJ, SCHALK LK. (2010). Assessment of arsenic concentrations in domestic well water, by town, in Maine, 2005-09: U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2010-5199. Available: <http://pubs.usgs.gov/sir/2010/5199/>.
- NRC (National Research Council), Arsenic in Drinking Water: 2001 Update, National Academy Press, Washington, DC.

- NRDC (National Resources Defense Council). (2000). Arsenic and old laws: a scientific and public health analysis of arsenic occurrence in drinking water, its health effects, and EPA's outdated arsenic tap water standard. Available: <http://www.nrdc.org/water/drinking/arsenic/aolinx.asp>
- OEGGL K. (2009). The significance of the Tyrolean Iceman for the archeobotany of Central Europe. *Veget Hist Archeobot* **18**:1–11.
- ONUR, E., TUĞRUL, B., BOZYİĞİT, F. (2009). DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları. *Türk Klinik Biyokimya Derg.* **7**: 61-70.
- OSTLING O., JOHANSON K.J. (1984) "Microelectrophoretic Study Of Radiation Induced DNA Damage In Individual Mammalian Cells" *Biochemical Research* **538**:71–80.
- OSTLING, O., JOHANSON, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**: 291-298.
- PALUS J., RYDZYŃSKI, K., DZIUBALTOWSKA, E., WYSZYŃSKA, K., NATARAJAN, A.T. NILSSON, R. (2003) Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat. Res.*, **540**:19–28.
- PALUS, J., LEWŃSKA D., DZIUBALTOWSKA E., STEPŃIK M., BECK J., KONRAD R., NILSSON R. (2005) DNA Damage in Leukocytes of Workers Occupationally Exposed to Arsenic in Copper Smelters. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **46**:81-87
- PARVEZ F, WASSERMAN GA, FACTOR-LITVAK P, LIU X, SLAVKOVICH V, SIDDIQUE AB. (2011). Arsenic exposure and motor function among children in Bangladesh. *Environ Health Perspect* **119**:1665–1670.
- PETERS SC. (2008). Arsenic in groundwaters in the Northern Appalachian Mountain belt: a review of patterns and processes. *J Contam Hydrol* **99**(1–4):8–21.
- POLI P, BUSCHINI A, SPAGGIARI A, RIZZOLI V, CARLO-STELLA C, ROSSI C. (1999). DNA damage by tobacco smoke and some antitubercular drugs evaluated using the Comet assay. *Toxicol Lett*. **108**: 267-276.

- RAHMAN A, VAHTER M, EKSTROM EC, PERSSON LA. (2010). Arsenic exposure in pregnancy increases the risk of lower respiratory tract infection and diarrhea during infancy in Bangladesh. *Environ Health Perspect***119**:719–724.
- RAHMAN A, VAHTER M, SMITH AH, NERMELL B, YUNUS M, EL ARIFEEN S. (2009). Arsenic exposure during pregnancy and size at birth: a prospective cohort study in Bangladesh. *Am J Epidemiol***169**(3):304–312.
- RAI, R., PENG, G., LI, K., LIN, S.Y. (2007). DNA damage response: the players, the network and the role in tumor suppression. *Cancer Genomics Proteomics***4**(2):99-106.
- ROJAS E, LOPEZ MC, VALVERDE M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromat B***722**:225–254.
- ROMANOWICZ MAKOWSKA, H. (2011). Single nucleotide polymorphisms in the homologous recombination repair genes and breast cancer risk in Polishwomen. *TohokuJ. Exp. Med.***224** (3):201–208.
- RYDBERG, B., JOHANSON, K. J. (1978). in DNA Repair Mechanism (Hanawalt, P. C., andFriedberg, E. C., Eds), Academic Press, New York.465-468
- SAAD A, HASSANIEN MA. (2001). Assessment of arsenic level in the hair of the nonoccupational egyptian population: pilot study. *Environ int.***27**(6):471-8.
- SANCAR, A., LINDSEY-BOLTZ, L. A., UNSAL-KAÇMAZ, K., LINN, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian dna repair and the dna damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.***73**:39–85.
- SANDERS AP, MESSIER KP, SHEHEE M, RUDO K, SERRE ML, FRY RC. (2012). Arsenic in North Carolina: public health implications. *Environ Int***38**(1):10–16.
- SANGRAJRANG S, SCHMEZER P, BURKHOLDER I. (2007). The XRCC3 Thr241Met polymorphism and breast cancer risk: a case-control study in a Thai population. *Biomarkers***12**: 523-532.

- ŞANLI, Y., KAYA S. (1984). Biyolojik materyalde arsenik aranması, *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.***31**(1): 1-14.
- SARDAŞ, S. (2009). Arsenik maruziyetinde risk değerlendirmesi tıbbi jeoloji çalıştayı, Ürgüp Bld., Kültür Merkezi, Ürgüp/ NEVŞEHİR.
- SCHWERDTLE, T., WALTER, I., MACKI, I., HARTWIG, A. (2003). Induction of oxidative DNA damage by arsenite and its trivalent and pentavalent methylated metabolites in cultured human cells and isolated DNA. *Carcinogenesis***24**:967–974.
- SEEDHOUSE, C., FAULKNER, R., ASHRAF, N., DAS-GUPTA, E., RUSSELL, N., (2004). Polymorphisms in genes involved in homologous recombination repair interact to increase the risk of developing acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.***10**(8), 2675–2680.
- SHALL, S., DE MURCIA, G. (2000). Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res.* **460**(1):1-15.
- SHARMA VIRENDER, K., SOHN, M. (2009). Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation, *Environment International***35**: 743-759.
- SHEN MR, JONES IM, MOHRENWEISER H. (1998). Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res.***58**(4):604-8.
- SHEN, J., GAMMON, M.D., TERRY, M.B., WANG, L., WANG, Q., ZHANG, F., TEITELBAUM, S.L., ENG, S.M., SAGIV, S.K., GAUDET, M.M., NEUGUT, A.I., SANTELLA, R.M. (2005). Polymorphisms in XRCC1 modify the association between polycyclic aromatic hydrocarbon–DNA adducts, cigarette smoking, dietary antioxidants, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **14** (2):336–342.
- SINGH N.P., MCCOY M.T., TICE R.R., SCHNEIDER E.L. (1988). “A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells” *Exp. Cell Res.***175**: 184-191.

- SKOOG D., HOLLER J. (2007).Crouch, S. *Principles of Instrumental Analysis*, 6th ed. Thomson Books/Cole. 238.
- SMEDLEY P. (1996). Arsenic in rural groundwater in Ghana. *J African Earth Sci.***22**:459–470.
- SMITH AH, ARROYO AP, MAZUMDER DN, KOSNETT MJ, HERNANDEZ AL, BEERIS M, SMITH M, MOORE L.(2000). Arsenic-induced skin lesions among Atacameno people in Northern Chile despite good nutrition and centuries of exposure. *Environ Health Perspect.***108**:617–620.
- SMITH AH, GOYCOLEA M, HAQUE R, BIGGS ML. (1998). Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of Northern Chile due to arsenic in drinking water. *Am J Epidemiol.***147**(7):660–669.
- SMITH AH, MARSHALL G, YUAN Y, FERRECCIO C, LIAW J, VON EHRENSTEIN O. (2006). Increased mortality from lung cancer and bronchiectasis in young adults after exposure to arsenic in utero and in early childhood. *Environ Health Perspect***114**:1293–1296.
- SMITH AH, MARSHALL G, YUAN Y, LIAW J, FERRECCIO C, STEINMAUS C. (2011). Evidence from Chile that arsenic in drinking water may increase mortality from pulmonary tuberculosis. *Am J Epidemiol.***173**(4):414–420.
- SMITH AH, STEINMAUS CM. (2009). Health effects of arsenic and chromium in drinking water: recent human findings. *Annu Rev Public Health.***30**:107–122
- SMITH TR, LEVINE EA, PERRIER ND, MILLER MS, FREIMANIS RI, LOHMAN K, CASE LD, XU J, MOHRENWEISER HW, HU JJ. (2003). DNA-repair genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers.***12**(11):1200-4.
- SOYLEMEZ E, KAYAALTI Z, ALIYEV V, SOYLEMEZOGLU T. (2012). Effect of cigarette smoking on DNA damage according to nine comet assay parameters in female and male groups. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası.* **65** (1): 39-45.

- SÖYLEMEZ E, KAYAALTI Z, KAYA AKYÜZLÜ D, TUTKUN E, SÖYLEMEZOĞLU T. (2013). "Evaluation of Genotoxic Effect of Arsenic in Silver Mining Plate Workers using Alkaline Comet Assay". 49th Congress of the European Societies of Toxicology. **221**:127
- SÖYLEMEZ E, KAYAALTI Z, KAYA AKYÜZLÜ D, TUTKUN E, SÖYLEMEZOĞLU T. (2013). "Determination of Lymphocyte DNA Damage using The Comet Assay in Sandbalsting Workers Exposed to Crystalline Silica Dust". 49th Congress of the European Societies of Toxicology. **221**:126.
- SÖYLEMEZOĞLU T., KAYAALTI Z., SÖYLEMEZ E., BACAŞIZ A., TUTKUN E. (2011). Evaluation of DNA damage by comet assay in metal exposed Turkish population. 47th Congress of the European Societies of Toxicology, **205**: 196.
- SPERLING M.B.; WELZ B. (1999). Atomic Absorption Spectrometry. Weinheim: Wiley-VCH.
- SPIVEY A.(2011). Arsenic and infectious disease: a potential factor in morbidity among Bangladeshi children [Science Selection]. *Environ Health Perspect***119**:A218.
- STEINMAUS C, YUAN Y, KALMAN D, REY OA, SKIBOLA CF, DAUPHINE D. (2010). Individual differences in arsenic metabolism and lung cancer in a case-control study in Cordoba, Argentina. *Toxicol Appl Pharmacol***247**(2):138–145.
- STERPONE, S., COZZI, R. (2010). Influence of XRCC1 Genetic Polymorphisms on Ionizing Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *J Nucleic Acids*.780369.
- SU CC, LU JL, TSAI KY, LIAN IE B. (2011). Reduction in arsenic intake from water has different impacts on lung cancer and bladder cancer in an arseniasis endemic area in Taiwan. *Cancer Causes Control* **22**(1):101–108.
- SUN GF, DAI GJ, LI FJ, YAMAUCHI H, YOSHIDA T, AIKAWA H. (1999). The presentsituation of chronicarsenism andresearch in China. In: Chappell WR, Abernathy CO, Calderon RL, editors. Arsenicexposureand healtheffects, 1st edition. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo: Elsevier Science. 123–125.

- TCHOUNWOU, P.B., PATLOLLA, A.K., CENTENO, J.A. (2003). invited reviews: carcinogenic and systemic health effects associated with arsenic exposure-a critical Review., *Toxicologic Pathology*. **31**:6.
- TEBBS RS, ZHAO Y, TUCKER JD, SCHEERER JB, SÍCÍLIANO MJ, HWANG M, LIU N, LEGERSKI RJ, THOMPSON LH. (1995) Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**:6354–6358.
- THOMPSON, L.H., WEST, M.G. (2000). XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mutat.Res.* **459**(1):1-18.
- THUNDIYIL JG, YUAN Y, SMITH AH, STEINMAUS C. (2007). Seasonal variation of arsenic concentration in wells in Nevada. *Environ Res.* **104**(3):367–373.
- TICE, R.R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, JC., SASAKI, Y.F. (2000). Singlecellgel/cometassay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol. Mutagen.* **35**(3):206-221.
- TINWELL H, STEPHENS SC, ASHBY J. (1991). Arsenic as the probable active species in the human carcinogenicity of arsenic: mouse micronucleus assays on Na and K arsenite, orpiment, and Fowler's solution. *Environ Health Perspect.* **95**:205–210.
- TSENG CH. (2007). Arsenic methylation, urinary arsenic metabolites and human diseases: current perspective. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog. Ecotoxicol Rev.* **25**(1):1–22.
- TSENG WP. (1977). Effects and dose–response relationships of skin cancer and blackfoot disease with arsenic. *Environ Health Perspect.* **19**:109–119.
- TUZEN M. (2009). Toxic and essential trace elemental contents in fish species from the Black Sea, Turkey. *Food Chem Toxicol.* **47**(8):1785-90.
- UNAL M, GÜVEN M, BATAR B, OZAYDİN A, SARICI A, DEVRANOĞLU K. (2007) Polymorphisms of DNA repair genes XPD and XRCC1 and risk of cataract development. *Exp Eye Res.* **85**(3):328-34.

- VAHIDNIA A, VAN DER VOET GB, DE WOLFF FA. (2007). Arsenic neurotoxicity—a review. *Hum Exp Toxicol*.**26**(10):823–832.
- VALKO M, MORRIS H, CRONIN MT. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*.**12**(10):1161-208.
- VALVERDE, M., ROJAS, E. (2009). Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutat Res*.**681**(1):93-109.
- VARIAN BASIC ATOMIC ABSORPTION THEORY AUSTRALIA PTY LTD (A.C.N. 004 559 540)1997.
- VODIČKA P, KUMAR R, STETINA R, ET AL. SANYAL S, SOUCEK P, HAUFROID V, DUSINSKA M, KURICOVA M, ZAMECNIKOVA M, MUSAK L, BUCHANCOVA J, NORPPA H, HIRVONEN A, VODICKOVA L, NACCARATI A, MATOUSU Z, HEMMINKI KÇ. (2004) Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA. *Carcinogenesis*.**25**:757–763.
- VOSO, M.T. (2007). Increased risk of acute myeloid leukaemia due to polymorphisms in detoxification and DNA repair enzymes. *Ann. Oncol*. **18**(9):1523–1528.
- VURAL, N.(1996). Toksikoloji. Ankara: *Ankara Üniversitesi Basımevi*.**73**:338-342
- WANG, S., MULLIGAN, C.N.(2006). Occurrence of arsenic contamination in Canada: Sources, Behaviour and Distribution. *Sci. Tot. Env*. **366**: 701-721.
- WASSERMAN GA, LIU X, PARVEZ F, AHSAN H, FACTOR-LITVAK P, KLINE J.(2007). Water arsenic exposure and intellectual function in 6-year-old children in Araihaazar, Bangladesh. *Environ Health Perspect*.**115**:285–289.
- WASSERMAN GA, LIU X, PARVEZ F, AHSAN H, FACTOR-LITVAK P, VAN GEEN A. (2004). Water arsenic exposure and children's intellectual function in Araihaazar, Bangladesh. *Environ Health Perspect*. **112**:1329–1333.
- WHO (1990). Arsenic. Environmental Health Criteria. 18. World Health Organization, Genova.1–174.

- WINKEL LH, PHAM TK, VI ML, STENGEL C, AMINI M, NGUYEN TH. (2011). Arsenic pollution of groundwater in Vietnam exacerbated by deep aquifer exploitation for more than a century. *Proc Natl Acad Sci USA***108**(4):1246–1251.
- WINSEY, S.L. (2000). A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res.***60** (20):5612–5616.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2006). International Agency for research on cancer report of the advisory group to plan Volume 100: A Review of human carcinogens. Lyon, 6–8 September.
- XUE J, ZARTARIAN V, WANG SW, LIU SV, GEORGOPOULOS P. (2010). Probabilistic modeling of dietary arsenic exposure and dose and evaluation with 2003–2004 NHANES data. *Environ Health Perspect.***118**:345–350.
- YAĞMUR, F., HANCI, İ.H. (2002). Arsenik, *Sted.***11**(7): 250-251.
- YAMADA, N.A., HINZ, J.M., KOPF, V.L., SEGALLE, K.D., THOMPSON, L.H. (2004). XRCC3 ATPase activity is required for normal XRCC3-Rad51C complex dynamics and homologous recombination. *J Biol Chem.* **279**(22):23250-23254.
- YENİ, D., FİDAN, A.F., GÜNDOĞAN, M. (2010). Spermatozoon'da Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE) ile DNA Hasarı Tespiti. *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.***24**:167- 173.
- YU G, SUN D, ZHENG Y. (2007). Health effects of exposure to natural arsenic in groundwater and coal in China: an overview of occurrence. *Environ Health Perspect.***115**(4):636–642.
- YU HS, LIAO WT, CHAI CY. (2006). Arsenic carcinogenesis in the skin. *J Biomed Sci.***13**(5):657–666.
- YUAN Y, MARSHALL G, FERRECCIO C, STEINMAUS C, LIAW J, BATES M. (2010). Kidney cancer mortality: fifty-year latency patterns related to arsenic exposure. *Epidemiology.***21**(1):103–108.

- YUAN Y, MARSHALL G, FERRECCIO C, STEINMAUS C, SELVIN S, LIAW J. (2007). Acute myocardial infarction mortality in comparison with lung and bladder cancer mortality in arsenic-exposed region II of Chile from 1950 to 2000. *Am J Epidemiol.* **166**(12):1381–1391.
- YÜCER, M.M. (2008). Ruhsatlı tarım ilaçları. Hasat Yayıncılık, İstanbul, 355
- ZHAO, Y., DENG, X., WANG, Z., WANG, Q., LIU, Y. (2012). Genetic polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 and risk of colorectal cancer in Chinese population. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **13** (2), 665–669.
- ZHU, C.Q., LAM, T.H., JIANG, C.Q. (2001). Lymphocyte DNA damage in bus manufacturing workers. *Mutat. Res.* **491**:173-181.
- ZHU, X. (2012). DNA repair gene XRCC3 T241M polymorphism and bladder cancer risk in a Chinese population. *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* **16** (6):640–643.

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

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

[Signature]
 Başvuru Kabul Kararı
 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
 Akademik İşleri
 Akademik Etiler Şubesi

[Stamp]
 ANKARA ÜNİVERSİTESİ
 TIP FAKÜLTESİ
 KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

2023
 2023
 2023

2023
 2023
 2023

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Esmâ

Soyadı: SÖYLEMEZ

Doğum Tarihi ve Yeri: 1986, ANKARA

Uyruğu: T.C.

Medeni Durumu: Bekar

II- Eğitimi

2009-2011 A.Ü. Adli Bilimler Enstitüsü, Disiplinlerarası Adli Tıp Adli Kimya ve Adli Toksikoloji (Yüksek Lisans; Tez Konu: Sigara Kullananlarda Kan Kadmiyum Düzeyi Ve Lenfosit Dna Hasarının Belirlenmesi)

2004 – 2008 Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Fak. Biyoloji Bölümü

2000 – 2003 Abidinpaşa Lisesi-ANKARA

1997 – 2000 Ortatepe İlköğretim Ortaokulu-ANKARA

1992 – 1997 Şehitlik İlköğretim İlkokulu-ANKARA

Yabancı Dili: İngilizce

III-Mesleki Deneyimi

2008-2012 Ankara Üniversitesi, Adli Bilimler Enstitüsü, Proje Araştırma Sorumlusu, Comet Assay Uzmanı

2012--- Uzman Biyolog, (Araştırmacı) Gıda Tarım Ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne bağlı Orta Karadeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma İstasyonu Müdürlüğü, Tokat

IV- Bilimsel İlgi Alanları

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

Zeliha Kayaaltı, Esmâ Söylemez, Serap Yalçın, Tülin Söylemezoğlu. Searching of Standard Comet Assay Parameters for Detecting Lymphocyte DNA Damages Using Fourteen Different Test Conditions. *JOURNAL OF ADVANCES IN BIOLOGY*. 2013. Vol 3, No.3

Bacaksız A., Kayaaltı Z., **Söylemez E.**, Tutkun E., Söylemezoglu T. Lymphocyte DNA Damage in Turkish Asphalt Workers Detected by the Comet Assay. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL HEALTH RESEARCH*. 2013. **(SCI-expanded)** (Kabul edildi, Basım aşamasında)

Kayaaltı Z., Yavuz I., **Söylemez E.**, Bacaksız A., Tutkun E., Sayal A., Söylemezoglu T. Evaluation of DNA Damage Using Three Comet Assay Parameters in Workers Occupationally Exposed to Lead. *ARCHIVES OF ENVIRONMENTAL and OCCUPATIONAL HEALTH*. 2013. **(SCI-expanded)** (Kabul edildi, Basım aşamasında)

Kayaaltı Z., Kaya D., Bacaksız A., **Söylemez E.**, Söylemezoglu T. An association between polymorphism of the NADH/NADPH oxidase p22phox (phagocyte oxidase) subunit and aging in Turkish population. *AGING CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESEARCH*. 2013. (Kabul edildi, Basım aşamasında).

Uluslararası Kongreler

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında(Proceedings) basılan bildiriler :

Kayaaltı Z., Tekin D., Yalçın S., Aliyev V., **Söylemez E.**, Kurtay G., Söylemezoğlu T. (2010). Effect of IL-6 -174 G/C polymorphism on toxic metal and trace element levels in placenta. XII International Congress of Toxicology, 17 July 2010, Barcelona, Spain. **Poster özeti Toxicology Letters, 196 (Suppl 1): 161- 162’de yayınlanmıştır. doi:10.1016/j.toxlet.2010.03.555 (ISI).**

Kayaaltı Z., **Söylemez E.**, Yalçın S., Söylemezoğlu T. (2011). Validation of comet assay for detecting DNA damage in whole blood samples. 47th Congress of the European Societies of Toxicology, 28 August 2011, Paris, France. **Poster özeti Toxicology Letters, 205(Suppl 1):S204’te yayınlanmıştır. doi:10.1016/j.toxlet.2011.05.702. (ISI).**

Kayaaltı Z., **Söylemez E.**, Aliyev V., Söylemezoğlu T. (2011). The achievement of comet assay through analyzing relationship between fish consumption and dental amalgam fillings in detection of Hg toxicity. 47th Congress of the European Societies of Toxicology, 28 August 2011, Paris, France. **Poster özeti Toxicology Letters, 205 (Suppl 1): S296’da yayınlanmıştır. doi:10.1016/j.toxlet.2011.05.1000. (ISI).**

Söylemezoğlu T., Kayaaltı Z., **Söylemez E.**, Bacaksız A., Tutkun E. (2011). Evaluation of DNA damage by comet assay in metal exposed Turkish population. 47th Congress of the European Societies of Toxicology, 28 August 2011, Paris, France. **Poster özeti Toxicology Letters, 205 (Suppl 1): S196’de yayınlanmıştır. doi:10.1016/j.toxlet.2011.05.677. (ISI).**

Aliyev V.,Kayaaltı Z., **Söylemez E.**, Söylemezoğlu T. (2011). The determination of cadmium and mercury in blood of smokers and non-smokers. 47th Congress of the European Societies of Toxicology, 28 August 2011, Paris, France. **Poster özet** **Toxicology Letters, 205 (Suppl 1): S191’de yayınlanmıştır.**doi:10.1016/j.toxlet.2011.05.662. (ISI).

Söylemezoğlu T.,**Söylemez E.**,Kayaaltı Z., Aliyev V. (2011). The effect of cigarette smoking according to eight comet assay parameters. 47th Congress of the European Societies of Toxicology, 28 August 2011, Paris, France. **Poster özet** **Toxicology Letters, 205 (Suppl 1): S135’te yayınlanmıştır.**doi:10.1016/j.toxlet.2011.05.482. (ISI).

Söylemezoğlu T.,Kayaaltı Z.,Kaya D., Bacaksız A., **Söylemez E.** (2012).NADH/NADPH Oxidase p22 phox C242T Polymorphism and its relationship with aging.3rd European Congress on Preventive, Regenerative and Anti-aging Medicine, 29-31May, 2012, İstanbul, Turkey.

Kayaaltı Z.,**Söylemez E.**, Bacaksız A., Dural E., Yılmaz H., Söylemezoğlu T.(2012). Determination of lymphocyte DNA damage by use of comet assay in painters.48th Congress of the European Societies of Toxicology, 17 June 2012, Stockholm,Sweden. **Poster özet** **Toxicology Letters, 211S (Suppl 1): S8-S9’da yayınlanmıştır.** doi:10.1016/j.toxlet.2012.03.202. (ISI).

Bacaksız A.,Kayaaltı Z., Tutkun E., **Soylemez E.**, Güvendik G., Söylemezoğlu T.(2012). Polymorphisms of DNA repair genes and DNA damage in workers exposed to organic solvents. 48th Congress of the European Societies of Toxicology, 17 June 2012, Stockholm, Sweden. **Poster özet** **Toxicology Letters, 211S (Suppl 1): S24’te yayınlanmıştır.** doi:10.1016/j.toxlet.2012.03.259. (ISI).

Bacaksız A.,Kayaaltı Z., **Soylemez E.**, Tutkun E., Söylemezoğlu T. (2012).Lymphocyte DNA damage in Turkish asphalt workers detected by the comet assay.48th Congress of the European Societies of Toxicology, 17 June 2012,

Stockholm, Sweden. **Poster özet**i **Toxicology Letters**, 211S (Suppl 1): S153'te yayınlanmıştır. doi:10.1016/j.toxlet.2012.03.702. (ISI).

Söylemezoğlu T., **Soylemez E.**, Kayaaltı Z., Bacaksız A., Yılmaz H. (2012). DNA damage in workers occupationally exposed to arsenic. 48th Congress of the European Societies of Toxicology, 17 June 2012, Stockholm, Sweden. **Poster özet**i **Toxicology Letters**, 211S (Suppl 1): S24'te yayınlanmıştır. doi:10.1016/j.toxlet.2012.03.260. (ISI).

Söylemezoğlu T., **Soylemez E.**, Kayaaltı Z., Aliyev V. (2012). The effect of blood cadmium levels in smokers to lymphocyte DNA damage. 48th Congress of the European Societies of Toxicology, 17 June 2012, Stockholm, Sweden. **Poster özet**i **Toxicology Letters**, 211S (Suppl 1): S153-S154'te yayınlanmıştır. doi:10.1016/j.toxlet.2012.03.703. (ISI).

Sayal A., Yavuz I, Kayaaltı Z., Bacaksız A., **Söylemez E**, Söylemezoğlu T. (2012). DNA damage evaluation using comet assay in workers occupationally exposed to lead. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, 17-20 July 2012, Sendai, Japan. **Poster özet**i **The Journal of Toxicological Sciences Vol 37 Supplement II: pp S385** 'de yayınlanmıştır.

Kaya Akyüzlü D, Kayaaltı Z, **Söylemez E**, Türksoy VA, Söylemezoğlu T. "Genetic Variations of MT2A Gene are Associated with Arsenic Levels in Biological Samples of Individuals Occupationally Exposed to Arsenic". 49th Congress of the European Societies of Toxicology, 1-4 Eylül 2013, Interlaken, İsviçre. **Toxicology Letters 2013; 221S:S178**'de yayınlanmıştır. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.05.397. (ISI).

Kaya Akyüzlü D, Kayaaltı Z, **Söylemez E**, Işık S, Söylemezoğlu T. "Maternal hemochromatosis gene H63D single-nucleotide polymorphism and placental lead levels". 49th Congress of the European Societies of Toxicology, 1-4 Eylül 2013, Interlaken, İsviçre. **Toxicology Letters 2013; 221S:S178-179**'da yayınlanmıştır. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.05.398. (ISI).

Söylemezoğlu T, Kayaaltı Z, Kaya Akyüzlü D, **Söylemez E**, Sert S. “Association between Delta-aminolevulinic Acid Dehydratase Polymorphism and Placental Lead Levels”. 49th Congress of the European Societies of Toxicology, 1-4 Eylül 2013, Interlaken, İsviçre. **Toxicology Letters 2013; 221S:S166-167’de yayınlanmıştır. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.05.360. (ISI).**

Söylemezoğlu T, Kayaaltı Z, Kaya Akyüzlü D, **Söylemez E**, Koca D. “Effect of maternal vitamin D receptor FokI single-nucleotide polymorphism on the placental lead level”. 49th Congress of the European Societies of Toxicology, 1-4 Eylül 2013, Interlaken, İsviçre. **Toxicology Letters 2013; 221S:S175’te yayınlanmıştır. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.05.388. (ISI).**

Bacaksız A, Kayaaltı Z, Kaya Akyüzlü D, **Söylemez E**, Karabıyıkoglu G, Taslak H, Söylemezoğlu T. “XRCC1 Arg399Gln and XRCC3 Thr241Met polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease”. 49th Congress of the European Societies of Toxicology, 1-4 Eylül 2013, Interlaken, İsviçre. **Toxicology Letters 2013; 221S:197’de yayınlanmıştır. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.05.456. (ISI).**

Söylemez E, Kayaaltı Z, Kaya Akyüzlü D, Tutkun E, Söylemezoğlu T. “The 4977 bp and 7436 bp Mitochondrial DNA Deletions in Workers with Acute Exposed to Iridium-192”. 49th Congress of the European Societies of Toxicology, 1-4 Eylül 2013, Interlaken, İsviçre. **Toxicology Letters 2013; 221S:S127’de yayınlanmıştır. doi:10.1016/j.toxlet.2013.05.233. (ISI).**

Söylemez E, Kayaaltı Z, Kaya Akyüzlü D, Tutkun E, Söylemezoğlu T. “Determination of Lymphocyte DNA Damage using The Comet Assay in Sandbalsting Workers Exposed to Crystalline Silica Dust”. 49th Congress of the European Societies of Toxicology, 1-4 Eylül 2013, Interlaken, İsviçre. **Toxicology Letters 2013; 221S:S126’da yayınlanmıştır. doi:10.1016/j.toxlet.2013.05.231. (ISI).**

Söylemez E, Kayaaltı Z, Kaya Akyüzlü D, Tutkun E, Söylemezoğlu T. “Evaluation of Genotoxic Effect of Arsenic in Silver Mining Plate Workers using Alkaline Comet Assay”. 49th Congress of the European Societies of Toxicology, 1-4 Eylül 2013, Interlaken, İsviçre. **Toxicology Letters 2013; 221S:S127’de yayınlanmıştır. doi:10.1016/j.toxlet.2013.05.232. (ISI).**

Söylemez E, Kayaaltı Z, Söylemezoğlu T. Searching of Standart Comet Assay Parameters for Detecting Lymphocyte DNA Damage Using Fourteen Different Test Conditions.49th Congress of the European Societies of Toxicology, 1-4 Eylül 2013, Interlaken, İsviçre. **Toxicology Letters 2013; 221S:S127’de yayınlanmıştır. doi:10.1016/j.toxlet.2013.05.232. (ISI).**

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

Söylemez E, Kayaaltı Z, Aliyev V, Söylemezoglu T: Effect of cigarette smoking on DNA damage according to nine comet assay parameters in female and male groups. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2012;65 (1) 39-45. DOI: 10.1501/Tıpfak_0000000805.

Ulusal Kongreler

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

A. Bacaksız, Z. Kayaaltı, **E. Söylemez**, E. Tutkun, T. Söylemezoğlu. Metallerle Maruz Kalan Bireylerde Lenfosit DNA Hasarının Belirlenmesi. 16. Klinik Toksikoloji Derneği Kongresi 18-20 Mayıs, 2011, Kayseri, Türkiye (SÖZLÜ SUNUM).

Esma Söylemez, Zeliha Kayaaltı, Tülin Söylemezoğlu. Adli Olaylarda Toksik Madde Düzeylerinin Değerlendirilmesinde Gen Polimorfizmlerinin Önemi. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim, 2011, Antalya, Türkiye. P:0320. (POSTER).

Zeliha Kayaaltı, **Esma Söylemez**, Dilek Kaya, Engin Tutkun, Tülin Söylemezoğlu. Evalution of DNA Damage Using Comet Assay on Iridium-192 Acute Exposure. 8. Uluslararası Katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresi, 15-18 Kasım 2012, Antalya, Türkiye. P46:P6.(POSTER).

Esma Söylemez, Zeliha Kayaaltı, Dilek Kaya, Tülin Söylemezoğlu. Association Between Autism and Arsenic, Lead, Cadmium and Manganese Levels in Hair and Urine: A Case Report. 8. Uluslararası Katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresi, 15-18 Kasım 2012, Antalya, Türkiye. P75:P94.(POSTER).

Esma Söylemez, Zeliha Kayaaltı, Dilek (Kaya) Akyüzlü, Tülin Söylemezoğlu. Ksenobiyotik Metabolizmasındaki Gen Polimorfizmlerinin Önemi. II. Toksikoloji Sempozyumu "Toksikolojide Güncel Konular", 3-4 Mayıs 2013, Eskişehir, Türkiye, P16, S:11.(POSTER).

Esma Söylemez, Zeliha Kayaaltı, Dilek (Kaya) Akyüzlü, Tülin Söylemezoğlu.Çevre Kirletici Olarak Arsenik, 3. Ulusal Toprak ve Su Kaynakları Kongresi. 22-24 Ekim 2013, Tokat, Türkiye, S:708-714.(POSTER).

Zeliha Kayaaltı, Dilek (Kaya) Akyüzlü, **Esma Söylemez**, Tülin Söylemezoğlu.Toprak ve Su Kirliliğine Neden Olan Ağır Metaller ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri, 3. Ulusal Toprak ve Su Kaynakları Kongresi. 22-24 Ekim 2013, Tokat, Türkiye, S: 665-668.(POSTER).

Zeliha Kayaaltı, Dilek (Kaya) Akyüzlü, **Esma Söylemez**, Tülin Söylemezoğlu.Organik Fosforlu İnsektisitler ve Çevre Üzerine Etkileri. 3. Ulusal Toprak ve Su Kaynakları Kongresi. 22-24 Ekim 2013, Tokat, Türkiye, S:729-730.(POSTER).

Esma SÖYLEMEZ, Zeliha KAYAALTI, Yalçın KAYA, Bülent BAŞARAN. Bakır İçeren Fungisitlerin Çevre ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. 3. Ulusal Toprak ve Su Kaynakları Kongresi. 22-24 Ekim 2013, Tokat, Türkiye, S: 685-690.(POSTER).

Esma SÖYLEMEZ, Zeliha KAYAALTI. Adli Bilimlerde DNA Analizleri. X. Adli Bilimler Sempozyumu 13-16 Kasım 2013 -ANKARA. PB 84: S:146

Esma SÖYLEMEZ, Zeliha KAYAALTI, Dilek (Kaya) Akyüzlü. Kimliklendirmede Genetik Materyal: Nükleer DNA-Mitokondriyal DNA. Adli Bilimciler Bahar Sempozyumu.8-11 Mayıs 2014, Marmaris, Türkiye.P:16

Projeler

Allojenik periferik kan kaynaklı kök hücre vericilerinde rekombinan insan granülosit koloni stimüle edici faktörün genotoksosite üzerine etkisi. (Ankara Üniversitesi, Bilimsel Araştırma projesi, Araştırmacı, 2013) .

Metallerin toksikokinetiğinde rol oynayan bazı enzim ve proteinlerin gen polimorfizminin anne kanı, plasenta ve kordon kanında kurşun düzeylerine etkisi. Ankara Üniversitesi, Bilimsel Araştırma projesi, Araştırmacı, 2013.

Aterosklerotik kardiyovasküler hastalığı olan bireylerin bazı metal düzeyleri ile mitokondrial ve nükleer DNA hasarı arasındaki ilişkinin araştırılması, 09B5150001 numaralı Ankara Üniversitesi, Bilimsel Araştırma projesi, Araştırmacı, 2009. (2012 yılında tamamlandı; Bütçesi:44000 TL)

V- Srtifikalar Katıldığı Programlar ve Kurslar

- 2014- Ali Bilimlerde Yeni Ufuklar Sempozyumu-Ankara.
- 2014- Ulusal Akademik Ar-Ge Proje Destek Programları Tanıtımı ve Proje Önerisi Hazırlama Eğitimi Programı -Antalya
- 2013- Toksikoloji Çalışmalarında Analitik Validasyon- Eskişehir.
- 2013- II. Toksikoloji Sempozyumu,Toksikolojide Güncel Konular – Eskişehir.
- 2013- 4. Bilirkişilik Sempozyumu Adli Toksikoloji -Ankara.
- 2013- XII International Congress of Toxicology. Interlaken-İsviçre.
- 2013-Ulusal Toprak ve Su Kaynakları Kongresi- Tokat.
- 2012-Strategic Action Plan for Improving Access to Opioid Medication-Konferansı- Ankara.
- 2011- Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği- XII.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi-Antalya.
- 2011-The Workshop of DNA Genotyping on Identification of Biological Evidence- Taipei/Tayvan.
- 2010- Hacettepe Üniversitesi- Türkiye’de Adli toksikolojinin Bugünü ve Geleceği Kursu- Ankara.
- 2008- ICR Uluslararası Belgelendirme Hizmetleri Tic.Ltd.Şti . ISO 17025 Laboratuar Teknik Yeterlilik Eğitimi.
- 2007- World Food Safety. ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi.
- 2007- SDÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü- Su Ürünleri Fak (Göller yöresi, İçanadolu Göller, ve Sorunları Kongresi)-Isparta.

VI- ÇALIŞTIĞI KONULAR

- PCR ile amplifikasyon.
- Elektroforez teknikleri (Agarose, SDS-PAGE jel, polyacrilamide jel).
- Biyolojik örneklerin ön serolojik analizlerinin yapılması.
- Biyolojik örneklerden DNA ekstraksiyonunun yapılması (organik, chelex, qiagen kitleri, EZ1, M48).
- Biyolojik örneklerden ekstrakte edilen DNA'ların amplifikasyonunun yapılması (PCR ve RFLP ile sekans teknikleri).
- Genetik Toksikoloji.
- Comet Assay çalışmaları.
- DNA mutasyon ve polimorfizm çalışmaları.
- Genetik polimorfizm ve hastalıklarla ilişkisi.
- Genetik polimorfizmin, doku ve organlardaki metal düzeylerine etkisi.
- Mitokondriyal DNA delesyonları.