



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



ANNE HFE, H63D GEN POLİMORFİZMİNİN PLASENTAL KURŞUN DÜZEYİNE ETKİSİ

Sinem IŞIK

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

**DANIŞMAN
Doç.Dr. Zeliha KAYAALTI**

2014- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANNE HFE, H63D GEN POLİMORFİZMİNİN
PLASENTAL KURŞUN DÜZEYİNE ETKİSİ**

Sinem IŞIK

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

**DANIŞMAN
Doç.Dr. Zeliha KAYAALTI**

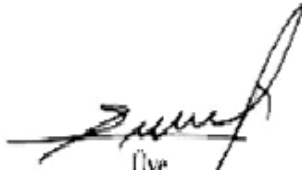
2014- ANKARA

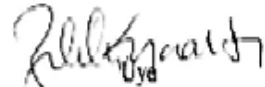
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı
Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Tezli Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

10.10.2014

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


Üye
Prof. Dr. Yalçın ÖZKAN
G.A.T.A.


Üye
Doç. Dr. Zeliha KAYAALTI
Ankara Ü.Adli Bilimler Ens.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Metaller	1
1.1.1. Demir Elementi	1
1.1.2. Demir Emilimi	5
1.1.3. Demir Toksisitesi	8
1.2. HFE Gen ve Yapısı	9
1.2.1. HFE Gen Mutasyonları	13
1.3. Kurşun	15
1.3.1. Kurşunun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	16
1.3.1.1. Kurşun ve Kimyasal Bileşikleri	17
1.3.1.1.1. İnorganik Kurşun	17
1.3.1.1.2. Organik Kurşun ve Kullanım Alanları	18
1.3.1.2. Kurşuna Maruziyet	19
1.3.1.2.1. Çevresel Maruziyet	20
1.3.1.2.2. Mesleki Maruziyet	22
1.3.2. Kurşunun Toksikokinetiği	23
1.3.3. Kurşunun Toksikodinamiği	25
1.4. Plasenta	27
1.4.1. Plasenta'nın yapısı ve gelişimi	27
1.4.2. Plasenta'nın fonksiyonları	29
1.5. Polimorfizm nedir?	29
1.5.1. Genetik polimorfizm ve çeşitleri	30
1.6. DNA İzolasyonu	33
1.6.1. Fenol-Kloroform İzolasyonu	33

1.7. Polimer Zincir Reaksiyonu (PCR)	34
1.7.1. PCR Bileşenleri	36
1.8. Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP)	37
1.8.1. RFLP Enzim Tipleri	39
1.9. Gen Ekspresyonu	39
1.10. Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi (AAS)	42
1.10.1. Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi (AAAS)	43
1.10.2. Elektrotermal Atomlaştırma	44
1.11. Hemakromatozis	44
1.11.1. Hemakromatozis'in Tarihçesi	44
1.11.2. Hemakromatozis Tipleri	45
1.11.3. Hemakromatozis de Moleküler Genetik	45
1.11.4. Hemakromatozis Tanı	46
1.11.5. Hemakromatoziste Klinik Bulgular	47
1.11.6. Demir Yüklemeyle Oluşabilecek Hastalıklar	48
1.11.7. Hemakromatozis Hastalığı'nın Tedavisi	48
2.GEREÇ VE YÖNTEM	50
2.1. Metal analizi	50
2.1.1. Gereçler	50
2.1.1.1. Numuneler	50
2.1.1.2. Hasta Rızası	50
2.1.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	50
2.1.1.4. Kullanılan Araç ve Gereçler	51
2.1.2. Yöntem	51
2.1.2.1. Örneklerin Alınması	52
2.1.2.2. Plasenta Örneklerinin Hazırlanması	52
2.1.2.3. Plasenta Örneklerinin Ön Analiz İşlemleri	52
2.1.2.4. Analiz İşlemi	52
2.1.2.5. Plasentada Kurşun Düzeyleri	53
2.1.2.6. Plasenta Örneklerinin Kurşun Analizi	53

2.2. HFE Gen Polimorfizmi	54
2.2.1. Gereçler	54
2.2.1.1. Kullanılan Kimyasallar	54
2.2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	54
2.2.2. Yöntem	56
2.2.2.1. Sıvı Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu	56
2.2.2.2. Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi	56
2.2.2.2.1. % 0,5' lik Agaroz Jel Hazırlanması	57
2.2.2.2.2. Agaroz Jel'e Yükleme İçin Örnek Hazırlanması ve Yürütme Koşulları	57
2.2.2.3. PCR	58
2.2.2.3.1. Primerler	59
2.2.2.3.2. PCR Bileşenleri ve PCR Programı	59
2.2.2.3.3. PCR Ürünü İçin Agaroz Jel Hazırlanması	60
2.2.2.4. PCR Ürünü'nün RFLP Yöntemi ile Kesimi	61
2.2.2.4.1. MboI Enzim Özellikleri	61
2.2.2.4.2. MboI Enzim ile Kesim İşlemi	62
2.2.2.4.3. MboI Enzimi ile İnkübasyondan Sonra Agaroz Jel Hazırlanması	62
2.3. İstatiksel Analiz	63
3.BULGULAR	64
3.1. Plasenta ve Biyolojik Örneklerin Değerlendirilmesi	64
3.2. HFE H63D Gen Polimorfizminin Genel Değerlendirilmesi ve Hardy-Weinberg Dengesine Uygunluğunun Tespiti	65
3.3. HFE H63D Gen Polimorfizminin Plasenta Örneklerindeki Kurşun Düzeyleriyle Olan İlişkileri	66
4.TARTIŞMA	68
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	73
ÖZET	76
SUMMARY	77

KAYNAKLAR	78
EK-1	84
EK-2	85
ÖZGEÇMİŞ	86

ÖNSÖZ

Son yıllarda gebe kadınlar üzerinde yapılan çalışmalar artmıştır. Çocuğun henüz anne karnındayken sağlık durumunun tespiti ile de çalışmalar hız kazanmıştır. Bu çalışmada da rastgele seçilmiş 93 anne ve plasental kurşun incelenmesi yapılacaktır. Anneden fõtusa geçen essential- nonessential elementlerin araştırılması ile anne-bebek ilişkisi de ortaya konulmuş olacaktır. Bu ilişki açıklanırken genotiplerin mutasyonlu olup olmadığı ve plasental kurşun ile bağlantısı incelenecektir.

Tezimin hazırlanmasında yol gösteren, bilimsel ve sosyal desteğini her zaman yanımda hissettiğim hocam Sayın Prof. Dr. Tülin SÖYLEMEZOĞLU'na,

Çalışmamın her aşamasında bana sunduğu kapsamlı bilgisinden yararlandığım ve çalışmam boyunca bana gösterdiği sevgi ve anlayış için Sayın Doç. Dr. Zeliha KAYAALTI'na,

Örneklerin analizleri için hazırlanmasında emeği geçen, Dr. Bio. Dilek AKYÜZLÜ'ye,

Yıllardır maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen annem Bakiye IŞIK, babam Mehmet IŞIK ve her zaman yanımda olan sevgili eşim Uğur ÜNAL'a

Yüksek lisansım sırasında tanıdığım ve çalışmam boyunca desteklerini hiç esirgemeyen sevgili dostlarım Gözde MASATÇIOĞLU ve Ferda Ceren ŞAHİN'e sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin
AAS	Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi
AAAS	Alevli Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi
ApoTf	Apotransferrin
ATP	Adenizin trifosfat
B2M	Beta 2 mikroglobin
bp	Baz çifti (base pair)
C	Sitozin
Cu	Bakır
Cd	Kadmiyum
DMT1	Divalent katyon taşıyıcı
dNTP	Deoksiribonükleozidtrifosfatlar
DPT	Ditiotreitol
DFO	Desferrioksomin
EDTA	Etilen-diamin-tetra-asetik asit
EtBr	Ethidium Bromür
Fe	Demir
Fe ⁺²	Ferröz demir
Fe ⁺³	Ferrik demir
G	Guanin
GFAAS	Grafit Fırınli Atomik Absorbsiyon Spektrometresi
GN	Gümüş Nitrat
Hb	Hemoglobin
HH	Hereditör Hemakromatozis
HNO ₃	Nitrik Asit
M	Molarite
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
Mg	Magnezyum

NaCl	Sodyumklorür
Pb	Kurşun
PCR	Polimeraz zincir reaksiyon (Polymerase chain reaction)
ppm	Milyonda Bir Ölçütü
ppb	Milyarda Bir Ölçütü
R primer	Reverse Primer (Aksi yönde olan primer)
RE	Restriksiyon Endonükleaz
RFLP	Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonükleik Asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SNP	Tek nükleotid poimorfizm (Single Nucleotid Polymorphism)
T	Timin
TE	Tris-Edta
TBE	Tris-Borikasit-Edta
Tf	Transferin
TfR	Transferrin reseptörü
Zn	Çinko
µg/ml	Mikrogram/mililitre
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Demirin vücutta döngüsü	2
Şekil 1.2. Demir metabolizmasında etkili basamaklar	6
Şekil 1.3. HFE geninin 6.Kromozomdaki lokasyonu	9
Şekil 1.4. HFE proteinin üç boyutlu yapısı	9
Şekil 1.5. C282Y Mutasyonu	13
Şekil 1.6. H63D Mutasyonu	14
Şekil 1.7. Kalıcı Villus	28
Şekil 1.8. Tek Nükleotid Polimorfizmi	31
Şekil 1.9. Delesyon ile aminoasit eklenmesinin şemasal gösterimi	32
Şekil 1.10. İnsersiyonla nükleotid eklenmesinin şemasal gösterimi	32
Şekil 1.11. Fenol-kloroform-izoamil alkol ile DNA izolasyonu	34
Şekil 1.12. PCR aşamaları	35
Şekil 1.13. PCR'ın annealing aşaması	36
Şekil 1.14. RFLP yöntemi	38
Şekil 1.15. Gen ekspresyonu	39
Şekil 1.16. DNA'nın replikasyonu	40
Şekil 1.17. DNA'nın translasyonu	41
Şekil 1.18. AAS'nin çalışma prensibi	43
Şekil 1.19. Herediter hemakromatoziste tanı algoritması	47
Şekil 2.1. Agaroz jel yüklemesi	58
Şekil 2.2. PCR cihazı	58
Şekil 2.3. 294 bp'lik amplifikasyon ürününün MboI enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotid uzunlukları	63

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Erişkin insanda demirin vücuttaki dağılımı	3
Çizelge 2.1. PCR bileşenleri ile stoktaki ve reaksiyondaki konsantrasyonları	59
Çizelge 2.2. PCR programı	60
Çizelge 2.3. MboI restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu	62
Çizelge 3.1. Anne yaşı ve plasenta kurşun düzeylerine ait tanımlayıcı istatistikler	64
Çizelge 3.2. Bireylerin HFE H63D polimorfizmi ile oluşan genotip frekansları	65
Çizelge 3.3. Bireylerin HFE H63D gen polimorfizmi ile oluşan alel frekansları	65
Çizelge 3.4. HFE H63D gen polimorfizminin Hardy-Weinberg dengesi	66
Çizelge 3.5. Plasenta örneklerindeki kurşun düzeyleri ile HFE H63D gen polimorfizmi arasındaki ilişki	66

1.GİRİŞ

1.1. Metaller

Metaller biyolojik proseslere katılmalarına göre essential ve noneessential olmak üzere iki grupta toplanır. Esansiyel metaller vücutta biyolojik olarak belli bir konsantrasyonda bulunması gerekir ve besin yoluyla alınması zorunludur. Bu elementler vücuda alınıp miktarlarını düzenleyen mekanizmaları vardır. Bakır (Cu), çinko (Zn) ve demir (Fe), vücutta hücrel fonksiyonları yerine getiren başlıca elementlerdendir. Örneğin bakır elementi, hayvanlarda ve insanlarda kırmızı kan hücrelerinin ve bir çok oksidasyon ve redüksiyon prosesinde yer almaktadır (Bigersson ve ark, 1988). Buna karşın nonessential elementler ise vücutta eser miktarda bulunsalar bile sağlık yönünden negatif etkiler göstermektedir.

Civa (Hg), kadmium (Cd), kurşun (Pb) gibi vücut için gerekli olmayan elementlerin vücutta olması hücrel fonksiyonları bozar (Clarkson T., 1993). Bazı elementlerin bir diğer elementlerle benzer metabolizma göstermesi, vücutta onun yerine geçmesi ve depolanması vücutta farklı fonksiyonlara, mutasyonlara sebep olabilir. Örneğin kurşunun kalsiyum ile benzer metabolizma göstermekte ve onunla yarışmaktadır. Kalsiyum organizma için gerekli bir element olmasına rağmen kurşunun bir çok toksik etkiye sebep olduğu bilinmektedir (Vural N., 1984).

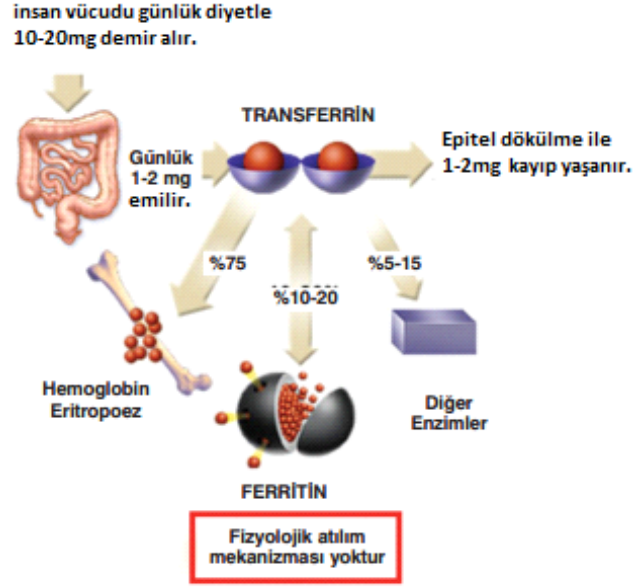
1.1.1. Demir Elementi

Demirin vücuttaki bazı reaksiyonları katalizlemesi, elektron alıp vermesi ile oksijen taşınması, enerji oluşturma gibi önemli görevleri olduğundan organizma için gerekli bir elementtir. Demirin biyolojik önemi bilinmesine rağmen yeni genler ve

proteinlerin bulunmasıyla beraber emilimi, depolanması, atılması ve moleküler döngüsü daha anlaşılır hale gelmiştir (Ganz, 2004).

Demir, birçok maddenin yapısında bulunması gereken elementdir. Kanda oksijen taşıyan hemoglobinin (Hb) yapısında demir bulundurması gerekir. Ayrıca miyoglobin, sitokrom, peroksidaz ve katalaz gibi maddeler için de demir önemli görevleri üstlenir. Demirin ana görevi Hb'nin ana parçası olan Hem'i oluşturmaktadır. Hb vücuttaki demirin %60-%70'ni bünyesinde barındırır (Ganz T., 2006; Ganz T., 2004).

Günlük ortalama demir miktarının (20-25 mg) duodenum ve jejunumdan yalnızca 1-2 mg kadarı emilebilir (Ganz, 2006). İnsan vücudundaki toplam demir miktarı; ağırlık, yaş, cinsiyet ve hemoglobin miktarına göre değişiklik gösterir (Şekil 1.1). Organizmadaki demirin %60-70 hemoglobinde ve eritrositlerde, %10'luk kısmı miyoglobin, sitokromlarda ve demir içeren enzimlerde, geri kalan %20-30'luk kısmı ise gerektiğinde kullanılmak üzere karaciğerde depolanır (Atanasiu ve ark., 2006). Gastrointestinal sistemden dökülen epitelial hücreler ve kanamalar dışında organizmadan demiri atan fizyolojik bir mekanizma yoktur (Fleming ve Bacon, 2005).



Şekil 1.1: Demirin vücutta dögüsü
 (<http://mcqanswer.blogspot.com/2010/05/iron-metabolism-in-human-body.html> sitesinden türkçeye uyarlanmıştır).

İnsanda toplam demir miktarı kişiden kişiye değişiklik gösterir. Ağırlık, hb konsantrasyonu, cinsiyet ve yaş kriterleri demirin vücuttaki konsantrasyonunu etkiler. Örneğin tam zamanlı doğmuş bir yenidoğanda 75 mg/kg demir bulunurken, bir yıl sonraki vücut demir konsantrasyonu 40-50 mg/kg düşer (Osiki ve ark., 1982). Cinsiyette bu çok fazla değişkenlik göstermemekle birlikte kadınlarda demir eksikliği yaygındır (Çizelge 1.1).

Hemoglobin, miyoglobin, sitokromlar ve demiri kofaktör olarak kullanan enzimler fonksiyon olarak demir bulundurlar. Fonksiyonel olarak bulunan demir, vücut total demir'in %70-90'nını oluşturur. Karaciğer, dalak, kemik iliği ve kasta ise geri kalan %10-30'luk kısmı demirin diğer şekilleri ferritin ve hemosiderin olarak depolanır (Beutler ve ark., 2006). Yaklaşık 3 mg demir ise transferine bağlı olarak plazmadan dolaşır halde bulunur (Brittenham ve ark., 2000).

Çizelge 1.1. Erişkin insanda demirin vücuttaki dağılımı (Brittenham ve ark., 2006)

Kompartmanlar	Demir konsantrasyonu	
	<i>Erkek</i>	<i>Kadın</i>
1-Fonksiyonel demir		
Hemoglobin	31mg/kg	28 mg/kg
Miyoglobin	5 mg/kg	4 mg/kg
Hem enzimleri	1 mg/kg	1 mg/kg
Non hem enzimleri	1 mg/kg	1 mg/kg
2-Transport demiri		
Transferrin	< 1 (0,2) mg/kg	< 1 (0,2) mg/kg
3-Depo demiri		
Ferritin	8 mg/kg	4 mg/kg
Hemosiderin	4 mg/kg	2 mg/kg
Toplam	50 mg/kg	40 mg/kg

İnsanlarda günlük, vücuttan 1-2 mg demir kaybolur. Bağırsak epitel hücreleri tarafından diyetle alınan demirin %10'u, bu kaybedilen demirin yerine kullanılmak üzere depolanmaktadır. Vücut ihtiyacına göre de yine bağırsak epitel hücreleri tarafından depolanmaktadır (Ganz, 2004; Pietrangelo, 2006).

Demirin, yaşlanan eritrositlerden ve diğer kaynaklardan geri dönüşümü sıkı bir mekanizma ile korunmaktadır. Yaşam süresi dolmuş eritrositlerin yıkıma uğraması ile yaklaşık 15-25 mg demir açığa çıkar. Açığa çıkan demir dolaşıma girer transferine bağlanır ve primer olarak kemik iliğine dağılır. Kemik iliğinin ihtiyacı olan demir kemikte depolanırken, fazlası tekrar hemoglobin yapısına girer (Gantz, 2006; Gantz, 2004; Pietrangelo, 2006). Böylece vücutta yaşam süresini doldurmuş hücrelerden kaynaklanan demir bile vücuttan dışarı atılmadan tekrar kullanılmış olur.

Demir, vücutta iki şekilde bulunur: doğal olarak bulunan organik hem demiri ve dışarıdan çeşitli yollarla alınan inorganik demir (non-hem demir). Hemoglobin ve miyoglobin molekülünün parçası olan demir hem demiri olarak adlandırılır. Bu demir sadece et ürünlerinde (kırmızı et ,balık ve tavuk eti) bulunur. Bu ürünlerdeki demirin %30-60'ını oluşturur. Geri kalanı ise non-hem demiridir. Non hem demir ile hem demirinin ayrımı önemlidir çünkü bunların mekanizmaları vücutta farklı şekilde gerçekleşmektedir. Hem demiri vücut ihtiyacına göre emilir ve emilimi non-hem demire göre daha kolaydır. Demir ihtiyacı olduğunda hem demirinin %35'i

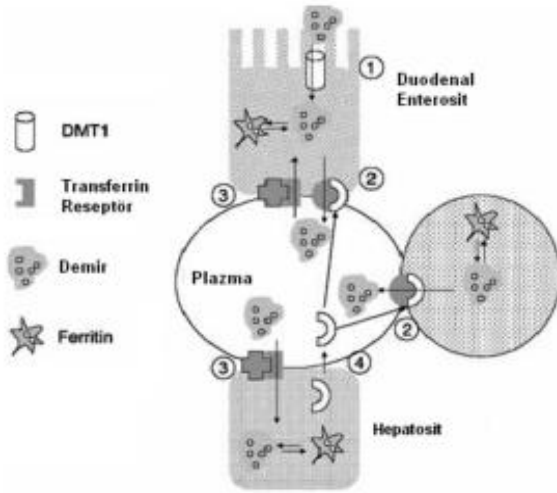
absorplanırken, ihtiyacın olmadığı durumlarda bu oran %15'lere düşebilir (Monsen, 1988). Diyetle alınan demirde genel anlamda hem grubu bulunmaz. Hem grubu içermeyen demirin emilim oranı çok düşüktür. Non-hem demirinin emilimini etkileyen 2 faktör, et ürünleri ve C vitaminidir. Eğer non-hem demiri içeren besinler et ile beraber alınırsa non-hem demirinin emilimi 2-4 kat artırmaktadır. Mekanizması tam olarak açıklanmasa da sindirim ürünlerinin rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca C vitamini içeren besinlerin alınmasında demir absorpsiyonunu %85 artırmaktadır (Hallberg ve Rossander, 1982).

Demir vücutta indirgendiğinde heme bağlanma özelliği kazanır. Diğer bir deyişle, ferröz demir, ferrik demire göre daha kolay emilir. Ferröz demir reaktif özelliğinden dolayı hasar oluşturabildiğinden demir, vücut fonksiyonlarını yerine getirecek miktarda alınmalıdır. Parenteral yoldan alınan demir dokularda fazlaca birikecek ve oksijen radikalleri oluşacaktır. İhtiyaç durumuna göre bu tarz dalgalanmalar olsa da demir alımı belli aralıkta tutulacaktır. Bu durum, demirin hücre içi ve dışı transportu, absorpsiyonu, depolanması veya ferrik demire geri dönüşümü ile sağlanır (Nemeth ve Ganz, 2006).

1.1.2 Demir Emilimi

Demirin plazmada transferrin ile taşınarak gereksinimi olan dokuya verilmesi, transferrinin demir metabolizmasındaki önemini artırır. Bunun nedeni, hücrelerin çoğu demiri plazmadan transferrin aracılığı ile alır. Her transferrin molekülü iki tane ferrik demiri güçlü şekilde bağlar. Makrofajlar fagosite ettikleri eritrositlerden demir alırlar (West ve Oates, 2008). Serbest demirin eritrosite geçme yeteneği yoktur. Transferrin ile hücre yüzeyine gelen demir, buradaki transferrin reseptörleri yoluyla hücre içine alınır. Transferrinin demiri bağlama kapasitesi tam dolduğunda plazmada serbest demir meydana gelir. Bu demir özellikle karaciğer ve kalp hücrelerine kolaylıkla girerek hücresel düzeyde hasar oluşturabilir (Chung ve Wessling-Resnick, 2003).

Demir, hücre içine aktif transportla taşınır (Şekil 1.2). Demirin aktif transportunda divalan metal taşıyıcı proteini (DMT-1) görev alır. DMT-1 duodenum hücreleri olan enterositlerde sentez edilir. Enterositlere ulaşan demir iki yol izler: enterositte ayrılarak vücudun içine taşınma veya ferritine bağlanma. Vücuda kazandırılan demir hızla transferrine bağlanır. Transferrin böylece demiri alyuvarlara aktarır. Diğer yandan, ferritine bağlanan demir enterositlerde kalır. Enterositin yaşam döngüsü tamamlandığında demir vücuttan arınmış olur.



Şekil 1.2. Demir metabolizmasında etkili basamaklar (<http://www.tkb.dergisi.org/>): 1. basamak: Divalan metal taşıyıcı proteini (DMT-1) ile aktif transport ve enterositlerde sentez; 2. basamak: Enterositlerden ayrılma; 3. basamak: Transferrine bağlama; 4. basamak: Vücuttan arınma

Demir, duodenum ve proksimal jejunumdan emilse de gerektiğinde incebağırsağın distal bölümünden de emilebilir. Duodenal kript hücreleri, insanlarda vücudun demir gereksinimini ve eritropoezin ihtiyacını algılama yeteneğine sahiptir. Algıladığı bu bilgiyle matür enterositler absorbtif enterositlere dönüşür. Absorbtif villuslarda bulunan enterositler, gastroduodenal bileşkeye yakın yere yerleşirler ve demir emiliminden sorumludur. Demir plazmaya ulaşmak için enterositin apikal ve bazolateral membranından geçer. Besinlerden edinilen demir burada transferrinin rolü olmadığı için transferrine bağlanmaz.

Direk olarak besinle alınan demir, mide içeriğinin düşük Ph'ya sahip olması nedeniyle demiri çok daha kolay çözer. Bunun yanısıra proton yönüyle ortam zenginleşir. Fırçamsı kenarda bulunan ferriredüktaz enzimi, ferrik iyonu ferröz iyonuna indirger ve DMT1 (metal transporter) ile hücre içine girişi sağlar (Fleming ve ark., 1997).

İntestinal yoldan demir alımını demir sensör proteinleri olan iron regulatör proteinler (IRP) ve iron responsive elementler (IRE) sistemleri tarafından düzenlenir. Bu düzenleme, sitoplazmada bulunan ve hücre içi demir alımını kontrol eden IRP ve demir proteinlerinin mRNA üzerindeki 30 nükleotidlik bölümü içeren bölgenin diğer bölgenin ilişkisiyle açıklanabilir. Duodenal enterositlerden ne kadar demir alınacağı apikal DMT1 düzeyine ve bazoleteral taraftan HFE (Hemokromatozis) ile sinyal alan bölgenin düzeyine bağlıdır. Kript HFE'si plazmadaki TfR1 ile fizyolojik olarak etkileşime girer ve organizmanın demir ihtiyacını bildirir. HFE β 2 mikroglobulinle etkileşime girer, demirle doymuş transerrin ile temas ederek kript hücresine demir alımını gerçekleştirir. HFE gen mutasyonu sonucu ise hemakromatozis hastalığı ortaya çıkmış olur (De Domenico ve ark., 2007; Goodnough ve ark., 2010).

Demir alımında en ufak artış vücudun enfeksiyona karşı direncini düşürür. Aşırı miktardaki demir bakterilerin çoğalma hızını artırır. Buradan hareketle, aşırı demir yüklemesi uygulanan hastalar patojenlere karşı daha savunmasızdır. Demir absorpsiyonu iki durumda değişkenlik gösterir: demire bağlı özellikler, kişiye bağlı özellikler. Demirin emilebilen formda alınması, diyetle alım miktarı, demirle birlikte alınan diğer besin öğeleri, ilaç kullanımı, emilimin demire bağlı olarak değiştiği durumlardır. Kişiyeye bağlı özellikler ise mideden geçiş, bağırsak işlevi, ameliyat olma ve mide-bağırsak sisteminde görülen çeşitli hastalıklardır. Bu hastalıklardan en önemlisi, demirin aşırı alımına bağlı olarak kalıtsal nedenlerle meydana gelen hematokromatozistir (Townsend ve Drakesmith, 2002).

1.1.3 Demir Toksisitesi

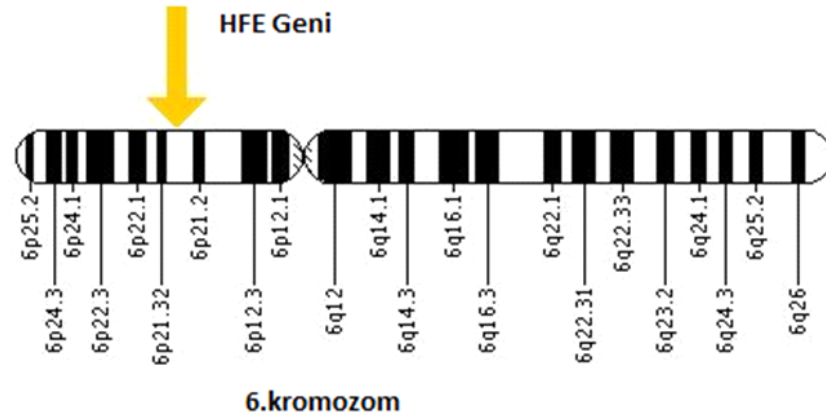
Demir, tüm hücrelerin fonksiyonlarına katılmaktadır ve hücrenin ihtiyacına göre elektron alıp vermektedir. Demir, ferrik demir (Fe^{+2}) ve ferröz demir (Fe^{+3}) halinde bulunabilir. Bu özellik demir içeren mitokondrial sitokrom enzimleri için önem taşımaktadır. Ferrik demirin ferröz demire indirgenmesi sırasında meydana gelen elektron aktarımı olumlu ve olumsuz sonuçlara yol açabilir. Aşırı miktarda demir alımı sonucunda, serbest dolaşan demir miktarında artış görülür. Bu serbest demir, serbest oksijen radikallerinin oluşumunu tetikler (Horvathova M ve ark. , 2010).

Serbest radikaller, dış orbitalinde eşleşmemiş elektron bulunduran yapılardır. Eşleşmemiş elektron taşımaları kimyasal yapıların reaktivitesini olağanüstü düzeyde arttırdığından, radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler ayrıca organik veya inorganik moleküller şeklinde de olabilirler. Ancak biyolojik sistemlerde en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen radikallerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri olarak bilinir. Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı dengededir ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır (Lee ve ark., 2006).

Yeterli miktarda detoksifiye edilemeyen serbest oksijen radikalleri oldukça zararlı olup toksik etki potansiyeline sahiptir. Serbest radikallerle olan bu ilişkisi nedeniyle, ideal durumda demirin serbest dolaşmaması gerekir. Transferrinle taşınan bağlı demir, ferritinle depolanır. Böylece, demir konsantrasyonu dengelenmiş olur (Waheed ve ark., 1997).

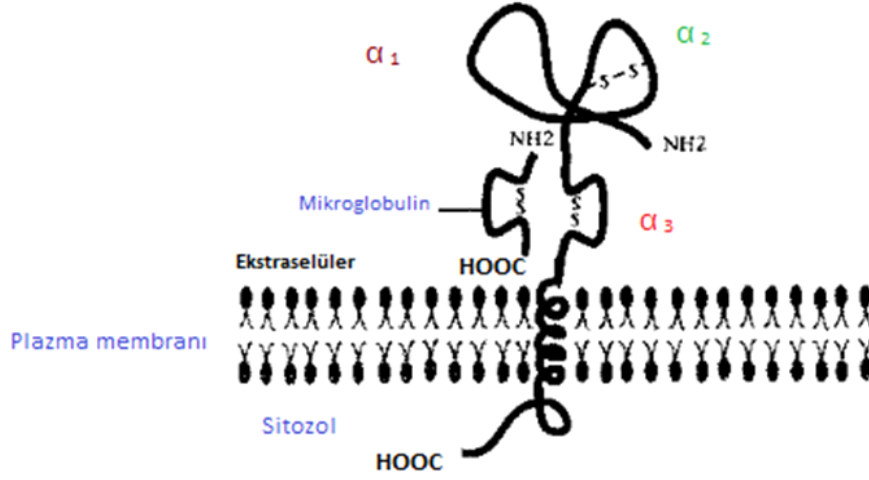
1.2. HFE (Hemokromatozis) Gen ve Yapısı

HFE (Hemokromatozis) geni ilk olarak 1996 yılında bulunmuş ve adına HLA-H denilmiştir. Daha sonra Feder ve arkadaşları geni klonlayarak yapısını ve rolünü anladıktan sonra adı HFE olarak değiştirilmiştir (Feder J ve ark., 1996; Brandhagen ve ark., 1999). HLA lokusunun bulunduğu bölgede, 6.kromozomun kısa kolunda (6p21.3) yer almaktadır (Şekil 1.3). Bu gen 6 ekzon, 5 intron ve 44356 baz çiftinden meydana gelir (Brissot ve ark., 2004).



Şekil 1.3. HFE Geninin 6. Kromozomdaki lokasyonu (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/HFE>)

HFE bazı organlarda bulunan bir transmembran proteinidir (Antonella ve ark., 1998). HFE proteini büyük bir hücre dışı, transmembran ve stoplazmik kısımlardan oluşmaktadır. Hücre dışı $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ unitelerinden oluşur (Şekil 1.4). Bunlardan $\alpha 1$ peptid bağlayan kısımdır, $\alpha 2$ ve $\alpha 3$ de ise disülfid bağları yer almaktadır (Waheed ve ark., 1997). HFE geni HLA proteinine benzerdir. HLA klas 1 proteininde bulunan $\alpha 3$ alt yapıda bulunan beta-2-mikroglobin ($\beta 2M$) ile ilişkiyi sağlamada rol alır. HFE proteini ise beta-2-mikroglobin ile etkileşime girer ve diferrik transferinden transferin reseptörü 1 aracılığı ile demir alış verişini düzenlemektedir (Mura ve ark., 1999).



Şekil 1.4. HFE proteininin üç boyutlu yapısı

HFE demir metabolizmasındaki görevini etrafında bulunan moleküllerle etkileşim içerisine girerek gerçekleştirmektedir. Etkileşim içerisine girdiği moleküller ise beta-2-mikroglobulin ($\beta 2M$) ve transferrin reseptörü 1 (TfR-1)'dir (Bothwell ve ark., 1995). HFE proteini duodenal kript hücresinin bazolateral yüzeyinde bulunmaktadır. Demir ise transferin molekülüne bağlıdır ve transferin reseptörü aracılığı ile kript hücresi içerisine alınır. Kript hücresi içerisinde demirin azalması durumunda bu hücreler farklılaşarak villus enterosit hücrelerine dönüşür. DMT-1 bağırsak lümeninden Fe^{+2} iyonlarının alınmasından sorumludur. Hücre içine alınan demirin bazolateral yüzeyden plazmaya verilmesini sağlayan ise ferroportin-1 proteinleri görev alır (Pietrangelo, 2003). DMT-1 ve ferroportin 1 proteinleri kript hücre içi demir azaldığında bu proteinler artırılır. Villus enterosit hücreleri tarafından alınan demir (Fe^{+2}) ise plazmada bulunan hephestin molekülü ile Fe^{+3} dönüştürülür. Ferrik durumda plazmaya verilen demir iyonu reseptörü ile karaciğer ve diğer başka organlara taşınmaktadır. TfR-1 ve TfR-2 reseptörleri tarafından alınan demir vücudun ihtiyacı karşılığında kullanılmak üzere hepatosit hücrelerinde ferritin olarak depolanmaktadır (Fleming ve Bacon, 2005).

Hemokromatozis hastaları kurşunun absorpsiyonu yönünden risk altındadır. Homozigot atipik hastalarda bu genin mutasyonu kurşunun daha fazla birikmesine

yol açar. Heterozigot hastalarda ise orta düzeyde kurşun kan düzeyi var olmaktadır. (Barton J ve ark., 1994).

Hemokromatoz gen taşıyıcıları ve kurşun absorpsiyonu ile ilgili iki mekanizmanın özeti:

1.Hemokromatozis hastalarda HFE geninin keşfedilmesiyle demir fazlalığının olduğu ortaya çıkmıştır. Görünüyor ki transferrin reseptörüne bağlı HFE geni, normal bireylerin bağırsağında demirin absorpsiyonunu ve bağlanma afinitesini azaltır (Gross CN ve ark., 1998). HFE geninin mutasyonu sonucunda fonksiyonel olarak azalma meydana gelir. Bu da bağırsaktaki transferrin reseptörüne bağlanmayı ve demir absorpsiyonunu artırır (Basclain KA ve ark., 1998).

2.Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, HFE geni eksik farelerde, duodenumda DMT-1 proteinin arttığı gözlemlenmiştir. Farelerdeki duodenumda mRNA da 7 kat artış olmuştur. Normal bireylerin duodenum biyopsisi ile kalıtsal hemokromatozis hastalarının duodenum biyopsisi karşılaştırıldığında, hasta bireylerin mRNA'sının 3 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Zoller H ve ark., 1999). HFE genin içerdiği metal taşıyıcı diğer proteinler bağırsaktaki DMT gibi, demir absorpsiyonunun dışında diğer metallerinde taşındığı bu bulgularla belirlenmiştir (Burt MJ ve ark., 1998).

Bağırsaklardaki kadmiyum ve kurşun konsantrasyonlarından yaklaşık 100 kat daha fazla demir konsantrasyonu, taşıyıcının bağlanma bölgesindeki demir ve toksik metaller arasındaki yarışmaya işaret eder (Berglund M ve ark., 1994). Ancak, hem kadmiyum hem de kurşunun DMT1'e bağlanan yapı olan iki değerlikli yapıda olmalarına karşın, Demir(III) çevrede en çok bulunan demir formudur ve Demir(II)'ye indirgenmesi gerekmektedir (Andrews NC. ve Levy JE., 1998). Eğer yeterince ferro demiri (iki değerlikli) mevcut değilse, kadmiyum ve kurşunun taşıyıcıya bağlanması olasıdır. İlginç bir biçimde, flebotomi yapılmış veya

yapılmamış kalıtsal hemakromatozlu (HH) bireylerin mukozal yüzeylerindeki ferrilerin ferrolara redüksiyonu kontrollere kıyasla artış gösterir. Bu nedenle hem demir redüksiyonunun hem de DMT1 ekspresyonunun hastalığın tedavi edilmeyen evresi süresince artış göstermesi mümkündür. Oysa flebotomi tedavisi ferri iyonunun redüksiyonunu artırmadan DMT1 ekspresyonunu artırır (Zoller Hve ark., 1999; Fleming RE ve ark., 1999). Bu durum kadmiyum ve belki kurşun için de bu toksik metallerin artan absorpsiyonu ile sonuçlanan flebotomiden öncesiyle kıyaslandığında, küçük bir avantaj sağlayacaktır.,

Çeşitli çalışmalar, HFE genindeki önemli mutasyonlar kurşun ve demirin absorpsiyonunu değiştirmiş ve ortaya çıkan sağlık sorunlarında yaşa bağımlı olduğunu göstermiştir. Örneğin Wright ve ark yaptığı çalışmada HFE mutasyonunun (H63D ya da C282Y) yetişkinlerde kan düzeylerini, kaval kemiği ve diz kapağı kemiklerindeki kurşun düzeylerinin diğer tip bireylere göre farklı olduğunu bulmuştur. Buna karşılık her iki HFE ve TF demir metabolizması gen varyantları Meksika çocuklarda artmış kan kurşun düzeyleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Wright RO ve ark., 2003).

Anneden fetusa demir transferi, anne dolaşımından fetal dolaşımdaki plasentaya taşınan ve sonraki transferde, demir alımını içeren düzenlenmiş bir prosestir. Anneden fetusa demir transferinin arkasındaki mekanizmalar açıklığa kavuşturulmaya çalışılsa da, hala çok iyi bilinmemektedir. Gebelik ilerledikçe, anneden fetusa geçen demir miktarı artar ve bu artış konsantrasyon farkına yöneliktir. Plasentanın sinsityotrofoblastik hücreleri maternal dolaşıma bitişik apikal yüzeyi ve fetal dolaşım sınırındaki bazolateral yüzeyi ile anne ve fetus arasında bariyer oluşturur. Proteinler, transferrin reseptör 1 (TfR1) ve HFE içeren sinsityotrofoblastların apikal membranında lokalizedir. Maternal dolaşımdaki diferrik transferin, sinsityotrofoblastın apikal yüzeyinde TfR1'e bağlanır ve bu kompleks endositozis tarafından içselleştirilir. TfR'den demirin ayrışımı endozomal kompartmanlarının asitlenmesine neden olur; muhtemelen DMT1 ile demir daha sonra sitoplazmaya salınır. Sinsityotrofoblastik hücrelerin bazal membranda lokalize

olması göstermiştir ki fetal dolaşımdaki demirin transferi ferroportin (FPN) ile gerçekleşir.

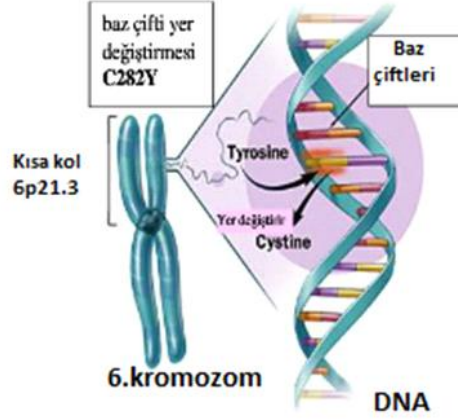
Demir daha önceden bahsedildiği gibi hücrel proseslerde önemli rol oynar fakat plazma demir transferrine bağlı olmadığından toksiktir. Bu non transferrine bağlı demir, hücrel oksidatif hasar ve nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde iddia edilen mekanizmada serbest radikal üreten proseslerde katalizör görevi yapar (Eaton and Qian 2002; Samson and Nelson 2000). HFE polimorfizminde aşırı demir yüklenmesi bu bağlı olmayan demiri artırır, demirin varlığı ise kurşunun oksidatif etkisini ortaya çıkarır.

1.2.1. HFE Gen Mutasyonları

HFE'nin 37 allel varyantı belirlenmiştir. Klinik olarak belirlenmiş ise 2 mutasyonu bulunmaktadır. 1999 yılında birde S65C mutasyonu belirlenmiş fakat hastalık üzerinde diğer iki mutasyona göre çok daha hafif etkisi olduğu için üzerinde durulan bir mutasyon olmamıştır (Limdi ve Crampton, 2004). Diğer mutasyonları olan V53M, V59M, H63H, Q127H, Q283P, E168Q, W169X, P168X'nın ise klinik etkisi bilinmemektedir (Camaschella, 2002). Bu mutasyonların 1 allelde oluşmasına heterozigot mutant, 2 allelde oluşmasına homozigot mutant olarak adlandırılır. Mutasyon yok ise buna da yabanıl tip denilmektedir (Brandhagen ve ark., 1999 ; Pietrangelo, 2003). En çok çalışılan mutasyonlardan birincisi olan C282Y mutasyonunda, 282. pozisyonunda ki sistein aminoasidi yerine trozin aminoasidinin geçmesidir (Şekil 1.5). İkinci mutasyon olan H63D ise, histidin aminoasidi yerine aspartat aminoasidinin geçmesidir (Meadows ve ark, 2002).

C282Y mutasyonu: Kuzey Avrupa kökenlilerde en sık rastalanan mutasyon olarak bilinir. Avrupa da bile kuzeyden güneye gidildikçe bu sıklık azalmaktadır. Avrupada

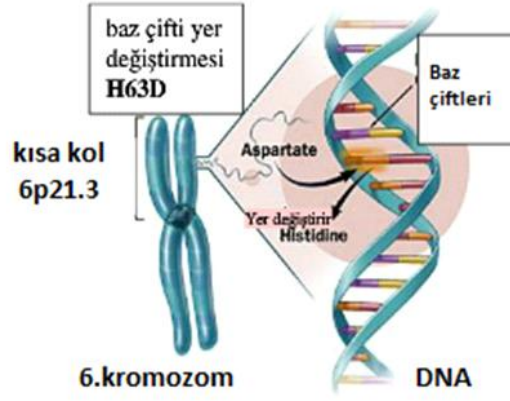
63 ayrı toplumdaki 10708 kişide HH'li hastalığın majör sebebi bu mutasyondur (Lucotte, 2001).



Şekil 1.5. C282Y Mutasyonu

HFE genin 845. nükleotidi olan Guanin (G) bazının Adenin (A) bazına transisyonu sonucu oluşur. Bunun sonucu olarak nokta mutasyonu oluşur ve $\alpha 3$ halkasındaki 282. pozisyonunda sistein aminoasidi yerine trozin aminoasidi geçer (Hash, 2001). Bu alanda disülfid bağının ortadan kalması ile bu olay gerçekleşir. Dolayısıyla bağın ortadan kalkması, HFE proteini ile beta-2-mikroglobin ($\beta 2M$)'nin ilişkisi kesilmiş olur ve bağlanma ortadan kalkar (Waheed ve ark., 1997). Bu mutasyonlu protein (C282Y), hücre yüzeyine afinitesi düşer, endoplazmik retikulumda ise daha hızlı yıkılan protein özelliği kazanmaktadır. Beta-2-mikroglobin ($\beta 2M$)'e bağlanamayan bu mutant protein normal görevi dışına çıkar ve demir emilimini fazlaca gerçekleştirir.

H36D Mutasyonu (Şekil 1.6): HFE'nin bir diğer mutasyonu olan H63D, 187. Nükleotid deki C bazının G bazına transversiyonu ile gerçekleşir. Nokta mutasyonu sonucunda ise histidin aminoasidi yerine aspartat aminoasidinin geçmesi ile olur (Brissot ve ark., 2004; Barut ve ark., 2003). Mutasyon $\alpha 1$ katmanında gerçekleşir (Brandhagen ve ark., 1999). Bu mutasyon C282Y mutasyonu gibi $\beta 2M$ 'ne bağlanmasını etkilemez, transferin resöptörünü diferrik transferine olan bağlanma afinitesini etkiler.



Şekil 1.6. H63D Mutasyonu

1.3. Kurşun

Ağır metal kelimesi son yirmi yılı aşkın süredir daha sık kullanılmaya başlanmıştır. Terim anlamı olarak birçok anlamlardan söz edilse de net bir tanımı bulunmamaktadır. Bazıları ağır metalleri yoğunlukla bazıları atom ağırlığına göre tanımlama yaparlar (Phipps, 1981).

Kurşun, antik çağlardan beri bilinen yedi metalden birisidir. Yapılan arkeolojik araştırmalar sonucu kurşunun tarihi ise yaklaşık 7000 yıl öncesine dayanmaktadır. Fakat çalışmaların kimin yaptığı hala bilinmemektedir (Lesser, 1988). M.Ö 2000 yıllarında Fenikeliler, İspanya da kurşun madenleri işletmiş, Mısırlılar ve İbraniler tarafından kullanılmaya başlanmıştır. En yoğun olarak yararlanan devlet ise Romalılar olmuştur. Romalılar, pişirme kaplarında, boru yapımında, çömlek gibi malzemelerde metallik kurşun kullanılmaktaydı (Hernberg, 2000). Hatta kapların kurşun ile kaplanmasıyla onun içerisinde kaynatılan asidik şarabın sonucu kurşun asetat oluşur ki buda şekeri henüz keşfetmemiş Romalılar için tatlandırıcı olmuştur. Mezarlarda yapılan arkeoloji çalışmalarında, aristokratların ve kölelerin kemiklerinde yoğun şekilde kurşun bulunmuştur (Mackie ve ark,1975). Osmanlı döneminde yaklaşık 5000 yıllık tarihli bilinen en eski kurşun eşya Truva

harabelerinde bulunmuştur. Osmanlı topraklarında bulunan Truvaya yakınlığı ile bilinen bugünkü Balya ilçesinde, bir maden işletmeciliğinin olduğu bilinmektedir (Gidlow, 2004). Fatih döneminde ise Osmanlının fetihleri askeri ve siyasi başarılar sağladığı gibi maden rezervlerini de artırmıştır. Kurşun böylece top, gülle, mermi, çivi gibi harp malzemelerinin yanı sıra cami, medrese, kubbe ve mimari yapılarda kullanılarak güncel hayata geçmiştir.

Ekotoksistelerde ya da potansiyel toksisite de yarattığı kontaminasyonlardan dolayı yarı metal, metal ya da ağır metal olarak adlandırılır (Atkins and Jones, 1997). Arsenik, kadminyum, kurşun, civa gibi ağır metaller oluşturduğu bileşikler, oksitlenmeleri ve yarattığı toksik etkileri incelendiği gibi çevreye, hayvanlara ve insanlara verdiği zararlarda bir okadar incelenmesi şart olan konulardandır.

Kurşun, çevresel ve biyolojik sistemlerin her evresinde bulunabilen toksik bir elementdir. Sanayinin kurulması ve çoğalmasıyla beraber çevreye yayılan metaller artmaktadır (Yüksel L, 1996). Kurşun, civa gibi bu ağır metaller su, rüzgar ve insan faktörleriyle beraber taşınırlar ki buda hem çevresel kirlilik hemde sağlık sorunları oluşturmaktadır (Asubiojo ve ark., 1991).

Kurşun, doğada en çok bulunan düşük erime noktasına sahip ağır ve gri renkli bir metaldir. Genellikle bir ya da birden fazla elementle alaşım halinde bulunur. Kolayca şekil alır (ATSDR, 2005).

1.3.1. Kurşunun Fiziksel Ve Kimyasal Özellikleri

Kurşun cevherleri yer altından kazma, patlatma, kırma ve öğütme aşamalarından geçirilerek çıkarılır. Küçük bir miktarı ise radyoaktif elementlerin bozunması ile hem doğal olarak hemde sentetik olarak üretilir. Kurşunun yer kabuğunda bulunma sıklığı 12,5 g/t dur. Kurşunun en çok rastlanılan cevherleri, sülfür minerali galen (PbS) ve

onun oksitlenmiş ürünleri olan serüsit (PbCO_3) ve anglezittir (PbSO_4). En önemli olanı ise galendir.

Kurşun (Pb), 82 atom numaralı ve mavi-gümüş renklidir. Atom kütlesi 207,19 olup

doğada kütle numaraları 208, 207, 206 ve 204 olarak dört izotopu bulunmaktadır.

Erime noktası $327,43^\circ\text{C}$ ve kaynama noktası ise 1740°C 'dir. Kurşunun kararlı

bileşikleri olan kurşun tetraetil veya tetrametil de kurşun karbon atomuna bağlı

olduğundan kaynama noktaları 110°C ve 200°C ye kadar düşer (ATSDR,2005).

Erime noktası düşük olduğu için yumuşaktır. Kokusuz bir elementtir. 20°C 'deki

yoğunluğu $11,34 \text{ g/cm}^3$ dür. Kütle numarasının büyük olması ve kristal yapısının

yüzey merkezli kübik yapıda olması nedeniyle yoğunluğu diğer metallere göre

yüksektir (U.S. DHHS, 2003; 2). Metalik kurşun nitrik asit ve sülfirik asitte

çözülebilirken, organik solventlerde çözülmezler. Suda çok yavaş çözünürler. Ancak

kurşun tuzları olan kurşun nitrat ve kurşun asetat suda çözülür. Kurşunun +2

değerlikle, borat, karbonat, siyanat, sülfat, sülfid, iyodat, kromat yaptığı

bileşiklerinde ise suda çok daha kolay çözünür (Hazza ve ark. , 2004).

Kurşunun son katmanında 4 adet bağ yapabilecek elektron olmasına rağmen 0, +2 ve

+4 değerlik alır. Kurşun 0 değerliği ile diğer metallerle alaşım oluşturur, çünkü o

değerlikte ki kurşunun korozyona dayanıklılığı yüksektir.

1.3.1.1. Kurşun ve Kimyasal Bileşikleri

1.3.1.1.1. İnorganik Kurşun

Kurşun, akü sanayisi başta olmak üzere, seramik sanayisinde, askeri mühimmatlarda,

pigment üretiminde, kimyasal ve alaşımlarda, boru - kablo kaplamalarında ve

endüstri alanlarında kullanılmaktadır (May, 2011). Bugün yaklaşık 200 iş türünde

kurşun zehirlenmesi olabileceği bilinmektedir. Meslek türlerine bakıldığında da

kurşunun nerelerde kullanıldığı yön verebilir. Kurşun madeninin çıkarılması işlenmesi ve dökümü, kurşun levha, sac, tel ve kablo yapımı, lastik üreticileri, matbaacılar, plastik ve cam üreticileri, akü üreticileri, hurda geri dönüşüm işleri, tesisatçılar kurşun kullanmaktadır (Nordin, 1994).

Saf metal olarak; Kurşun levha ve borular, tel ve kablolar, yapı kaplamalarında, X ışınları ve radyoaktif maddelerden korunma ekranları, reaksiyon kapları ve depolama tankları yapımında kullanılmaktadır. İnorganik bileşik olarak ise aşağıda verilmiştir (Tunçbilek, 1998).

KURŞUN SÜLFÜR (PbS): Seramiklerde, ayna kaplamalarda, roketlerde kullanılır.

KURŞUN SÜLFAT (PbSO₄): Fotoğrafçılık, taş baskı sanatı, çinko ile galvanik bataryalarda kullanılır.

KURŞUN SİLİKAT (PbSiO₃): Seramik sanayiinde toprak kapların sırlanmasında kullanılır.

KURŞUN KARBONAT (PbCO₃): Katalizör olarak, taş baskı sanatında foto iletken olarak ve bazı boyalarda kullanılır.

KURŞUN KLORÜR (PbCl₂): Amyant kaplama ve fren balatalarında katalizör ve alev geciktirici olarak kullanılır.

KURŞUN FLORÜR (PbF₂): Sigortalar, elektronik ışık sistemler, kolay eriyen camlarda kullanılmaktadır.

KURŞUN İYODÜR (PbI₂): Amyant fren balatalarında, termoelektrik materyallerde, foto-grafik emülsiyonlarda kullanılmaktadır.

KURŞUN NİTRAT (Pb(NO₃)₂): Kibrit ve patlayıcı imaltında, naylonda sıcaklık stabilizatörü olarak kullanılmaktadır.

KURŞUN OKSİT(PbO): Metal dizi harfleri, lehimcilik, akümülatör yapımı ve bazı boyalarda

KURŞUN TETRAOKDİT (Pb₃O₄): Aküler ve boyalarda yükseltgen olarak alçılar, yağlar, vernikler, kauçuk renklendirilmesi, çimentolarda kullanılmaktadır (U.S.DHHS, 2003).

1.3.1.1.2. Organik Kurşun ve Kullanım Alanları

Kurşun alkileri; Benzine katılan kurşun tetra-etil ve kurşun tetra-metil ve plastik yapımında kullanılan kurşun stearattır.

TETRA-METİL KURŞUN ($Pb(CH_3)_4$) VE TETRA-ETİL KURŞUN ($Pb(C_2H_5)_4$): Benzinde vuruntuyu önlemek için kullanılan bu kurşun yasaklanmıştır. Sadece hava taşıtlarında, yarış arabalarında ve karayoluna çıkmayan taşıtlarda kullanılır.

Özel kokulu sıvı maddeler olan kurşun alkilerin kaynama noktaları düşük olduğu için kolaylıkla buharlaşırlar (kurşun tetra - etil 200 °C, - metil 100 °C). Alaşım olarak ise kurşun –antimon akümülatör yapımında kullanılır (U.S.DHHS, 2003).

1.3.1.2. Kurşuna Maruziyet

Kurşunun hem çevresel hem de mesleksi olmak üzere iki türlü maruziyeti vardır. Son yıllarda, kurşun maruziyeti günden güne azalsa da yetişkinlerin kurşun zehirlenmeleri genelde meslekten kaynaklanan olaylardır. Çevresel kaynaklı kurşun maruziyetinin vücuda alınma oranı vücut ortamına ve maruz kalınan kurşunun nitelikleri ile alakalıdır. Bu nitelikler arasında kurşun bileşiğinin cinsi çok önemlidir. Atmosferde kurşun genelde kurşun sülfat ve kurşun karbonat şeklinde bulunur. Bu bileşiklerin sudaki çözünürlüğü çok az olduğu için yer altı ve yer üstü sularında kurşun çok daha az bulunur. Sadece kurşun bileşiğinin formu değil, kurşunun hangi bölgeden absorplandığı, absorplanan kurşunun tane büyüklüğü ve o bölgenin asitliği de maruziyetin kuvvetliliğinin belirler. Her kişinin fizyolojik olarak farklılık göstermesi de kurşunun bazı vücutta daha çok çözünmesi ve daha yüksek oranda kana karışmasını da etkiler.

Sanayide çok kullanılan kurşun 600-800°C’de buhar formu oluşur. Buhar içinde erimiş kurşun metalinin partikül boyutları mikron düzeyindedir. Bu boyuttaki kurşun partikülleri solunum yoluyla, çok az bir kısmı sindirim kanalıyla, organik kurşun

bileşikleri ise deri yoluyla vücuda alınır. Solunum yoluyla alınan kurşunun vücutta %40'ı absorbe olurken, sindirim kanalıyla alınan kurşunun ise %15 civarı absorbe olur. Vücutta bulunan toplam kurşunun yaklaşık %2'sini kandaki kurşun oluştururken %90'a yakını eritrositlerde toplanır ve en fazla kemiklerde olmak üzere yumuşak dokularda ve parankimal organlarda depolanır (Bellinger, 2004).

1.3.1.2.1. Çevresel Maruziyet

Havada birçok miktarda partiküller bulunmaktadır. Bu partiküllerin yaklaşık %2'sini insan sağlığı yönünden toksik etkiler gösteren eser elementlerden oluşmaktadır. Kurşun ise bu eser elementlerden bir tanesidir. Havada bulunan kurşunun %15-80'i solunum sistemi ile vücuda alınır. İnsan dokularında birikmesi ve sinerjik etki yaratmasından dolayı sağlık açısından önem oluşturmaktadır. Sadece solunum yoluyla değil, içme sularında, yediğimiz yiyeceklerde ve çevredeki birçok olaylar nedeniyle bu eser miktardaki elementler vücudumuza alınır.

Sanayileşme, çevresel atıkların yanması ya da suya karışması, fosil yakıtların yanması, endüstriyel işlemler, metal içerikli ürünlerin yakılması ve atıkların çevreye yayılması atmosferde kirlilik oluşturan başlıca sebeplerdendir. Atmosferdeki kurşunun yaklaşık %80'i yakıtlara ilave edilen alkil kurşunun yanması sonucu açığa çıkmaktadır. 20.yüzyılın en büyük halk sağlığı tehdidi kurşunun benzinlere ilavesidir. İlk olarak Alman kimyager tarafından keşfedilmiş, çok daha sonra Amerikalı Midgley tarafından geliştirilerek kurşunu etilenle birleştirmiş ve motor vuruntusunu azalttığını gözlemlemiştir. Bu keşiften sonra ise potansiyel tehlikelerinin varlığını belirten bir uyarı yayınlanmıştır (Kovarık, 2005). Atmosferdeki kurşunun ana kaynağı 1930'lu yıllarda boyalar iken 1950'li yıllarda ise kurşunlu benzinler olmuştur. Fakat kurşunun yasaklandığı gelişmiş ülkelerde maruziyetin azalmasıyla kurşun düzeyide önemli ölçüde azalmıştır. Amerikada kullanımı yasaklanmadan önce 1970'li yıllarda 94,6 milyon kilo kurşunun araçların egzozlarından havaya

yayıldığının fakat yasaklamadan sonra bu miktar 2,2 milyona düşmüştür. Geri kalmış ya da gelişmekte olan ülkelerde ve ülkemizde ise hala kurşunlu benzinin kullanımı çevresel açıdan kurşunun hala incelenmesini gerektirir (Roberts, 1999).

Sadece havada oluşturan kirlilikler insan sağlığını etkilemez. İçme suları, kontamine olmuş sebze-meyve ve yiyeceklerin saklandığı çanak ve çömlekler, alkol ve sigara gibi birçok nedenden dolayı kurşuna maruz kalınabilir (Goyer ve Clarkson, 2001). Kurşuna maruziyette en az öneme sahip olanlar ise tıp alanında kullanılan ilaçlar ve insanların kullandığı kozmetik maddeler yer almaktadır (WHO, 1995).

Geçmişde kan kurşun düzeylerinin mevsimlerinde çok etkisi olduğu gözlenmiştir. Yaz aylarında ise pik yaptığı belirtilmiştir. Bunların nedeni kurşunlu benzin satışları, trafik yoğunluğu, havadaki kurşun konsantrasyonu olarak düşünülmüş fakat mevsimsel kurşun değişikliği üzerinde daha az durulan konu olmuştur (Hayes ve ark., 1994).

Toprak, atmosfer ve yiyecek kaplarından dolayı kontamine olan sebze ve yiyeceklerin yenmesi çevresel maruziyetlerin en önemlilerindendir. Araba egzozlarına daha çok maruz kalan, yoğun trafiğin olduğu ve karayollarının kenarlarında yetişen sebze ve meyvelerin kurşun konsantrasyonu çok daha fazladır. Dolayısıyla sebze ve meyvelerin nerde yetiştiği önemlidir (Goyer ve Clarkson, 2001), (WHO, 2005).

1960'lı yıllara kadar tarım alanında kurşun arsenit ve kurşun arsenat herbisit, insektisit ve rodentisit olarak kullanılmıştır. Fakat 1980 yılların başlarında meyve bahçelerinde kullanılan bu insektisitler yasaklanmıştır (EPA, 2002). Kurşun hava, su ve güneş ışığıyla beraber farklı formlara dönüşebilirler. Fakat elemental kurşun farklı formlara dönüşmezler. Kurşun ile kirlenmiş olan toprak, rüzgar ya da yağmur etkileriyle bitkilere oradan da hayvanlara geçerek birikmeye başlar (ATSDR, 2005). Kurşuna maruziyet yollarından bir diğeri sigaradır. Sigaranın yapımında kullanılan tütün bitkisinin gelişimi sırasında insektisid olarak kullanılan kurşun arsenatdır.

Yağmur ile bitkinin kirlenmesi ya da havadaki kurşun partiküllerinin bitkinin yüzeyi ile teması sonucu kurşun konsantrasyonu artar ve sigara içenlerde bu maruziyet görülür (Clark ve ark, 1985).

1.3.1.2.2. Mesleki Maruziyet

Birçok meslek dalında kurşuna maruz kalınabilir. Otomobil tamircileri, rafineri ve benzin istasyonlarında çalışanlar, akü imalatındaki, matbaacılar, boyacılar, madenciler, metal işçileri, seramikçiler, trafik polisleri kurşun maruziyeti açısından risk altındadırlar. Burada kurşun buharı ve kurşun tozları ile maruziyet sağlanır. Çoğunlukla havadan solunum sistemi ile alınırken, ağız yoluyla ya da sindirim sistemiyle de kurşun absorbe olabilir. Çalışma sırasında hava ile solunan kurşun insanları direk etkilerken, kurşun tozlarının kişi üzerinde evlere taşınmasıyla da diğer kişiler etkilenir (Metintaş ve Sarıboyacı, 1995).

Günümüzde kurşunun en çok kullanıldığı alan akümülatör üretimi ve tamiridir. Akü imalatı, dökümhanede çalışanlar, pigment üretiminde ve kurşunlu kimyasal işçilerinde devamlı yüksek maruziyet söz konusudur. Trafikte görevli olan polisler, poligon eğitimcileri, gazete ve dergi basım işlerinde çalışanlar, boyacılar ise orta sıklıkta yüksek maruziyet altındadırlar. En az maruziyeti ise poligon katılımcıları, otomobil tamircileri, kablo üretim işçileri, lehim işçileri maruz kalırlar.

Kurşun zehirlenmesinin en önemli tanısı kurşunun kandaki konsantrasyonunun belirlenmesidir. ABD İş Güvenliği ve Sağlık İdaresi (OSHA) tarafından, kurşunun kullanıldığı iş yerlerinde maruz kalan kişilerin kan kurşun düzeyinin 40 µg/dL ve üzerinde ise kurşun zehirlenmesi olarak nitelendiriliyorlar.

1.3.2. Kurşunun Toksikokinetiği

Kurşun vücuda üç yolla alınır ve en etkili yolu solunum yolu ile absorpsiyondur. İnorganik kurşun bileşikleri solunum ve sindirim yoluyla, organik bileşikleri solunum, sindirim ve deri yoluyla vücuda alınır.

Kurşun toprakta, madencilik yapılan bölgelerde, endüstriyel alanlara yakın yerlerde ve tehlikeli atık atılan bölgelerde bulunur. Endüstriyel alanlarda kurşun oksit, kirlenmiş şehir havasında ise halojenür, oksir, fosfat ve sülfat bileşikleri olarak bulunmaktadır. Havada partikül ve aerosol şeklinde bulunan kurşun vücuda solunum yoluyla alınır. Bu partiküllerin boyutu oldukça önem taşır çünkü büyük partiküller hava kanallarından geçemeyeceği için direk ağız yoluyla vücuda absorplanır. Depo edilen miktar bireyden bireye farklılık göstereceği gibi, yaş ile de orantılıdır. Ayrıca solunum yollarının geometrisine ve soluk hızıyla da bağlantılıdır (James ve ark., 1994).

Yapılan araştırmalar gösteriyor ki, yerden 1,5 m yükseklikte kurşun düzeyinin daha yüksek seviyede bulunan kurşun konsantrasyonuna göre en az 2 kat fazla kurşun bulunduğu ve buda erişkinlere göre çocukların daha fazla maruz kalmasına sebep olduğu ortaya konmuştur (Lin-Fu, 1973).

Solunum sistemi ile kurşunun vücuda alınmasının maruziyeti çok daha büyüktür çünkü solunum sistemi yüzeyinin geniş olması, daha fazla ve daha hızlı şekilde kurşunun vücuda absorplanmasını kolaylaştırır. Çok az miktardaki kurşun bile bu yolla alındığında akut zehirlenmeleri açıklar (Goyer ve Clarkson, 2001).

Solunum yoluyla vücuda alınan kurşunun bileşiği olan kurşun dioksit partiküllerinin yaklaşık %35-45'i alveollerden absorbe olur. Yapılan çalışmalara bakıldığında ise solunum yoluyla absorbe olan kurşunun yaklaşık %40'ı emilirken, alt solunum yollarına ulaşan kurşunun %95'i kan ve lenf dolaşımına geçtiği görülmüştür.

Kurşunun bir diğer maruziyet yolu sindirim sistemi ile olur. Kurşunun sindirim yolu ile vücuda alınması yetişkinlerde yiyecek ve içeceklerden olurken, çocuklar ve bebekler oynadıkları oyuncaklardan, toz, toprak ve boya parçalarının ağıza götürülmesiyle gerçekleşir. Erişkinler üzerine yapılan çalışmalarda kurşunun gastrointestinal yolla vücuda alınırken yaklaşık %10-15'i bu yoldan emilir. Absorplanan kurşunun yaklaşık %5'i vücutta tutulur. Çocuklarda ise bağıraklardan emilen kurşunun yetişkinlere göre çok daha fazla olduğu ve %40-50'nin absorplandığı ve %30'larda vücutta tutulduğu gözlenmiştir (Grandjean, 1992). Bu durumun sebebi ise çocuklarda gelişmekte olan sinir sisteminin toksinlere karşı daha hassas olmasıdır (Jones., 2009).

Anorganik kurşunun gastrointestinal yoldan absorpsiyonu en önce onikiparmak bağırsağında başlar. Daha sonra vücutta çeşitli yerlere dağılır. Vücuda giriş yapan kurşun farklı formlara dönüşmeden, en fazla böbreklerde ve karaciğerde bulunur. Kalsiyumca zengin olan kemiklerde ve dişlerde depolanır (Wielopolskive ve ark., 1986). Yetişkinlerde vücuttaki toplam kurşunun %94'ü, çocuklarda ise %73'ü kemiklerde depolanır (Barry, 1975). Yetişkinlere göre kurşun, çocukların yumuşak dokularında daha fazla birikir. Birikmenin yanı sıra kurşunun vücutta kalma süresi ve dolayısıyla nerede bulunduğu da çok önemlidir. Yumuşak dokulardaki kurşunun yarı ömrü 2 ay olmasına rağmen, kemikte bulunan kurşunun ise yarı ömrü 25-30 yıldır (Phillip ve Gerson, 1994).

Solunum yolu ile vücuda alınan kurşunun yaklaşık %30-40'ı kan dolaşımına girmektedir. Gastrointestinal kanaldan emilim ise beslenme durumuna ve yaşa bağlı olmak üzere değişkendir. Bağırsaklarda demir emiliminin engellendiği durumlarda, demir ile yarışacak olan bir başka element kurşundur ve vücuda kurşun alınmış olur (Ziegler, 1978). Yetişkin ve çocuklara diyetle fazlaca kalsiyum verilmesi kurşun absorpsiyonunu azaltırken, Fe, Zn, P ve C vitaminince eksik olan beslenme alışkanlıkları da kurşun absorpsiyonunu artırır (Barltrop ve Khoo, 1975).

Kurşunun absorplanmasındaki bir diğer yol deri yoluyla olur. Deri yoluyla maruziyet en azdır. Çoğunlukla organik kurşun bileşiklerinin maruziyetine rastlansa da son yıllarda inorganik kurşun bileşiklerine de rastlanmaktadır. Deri üzerine bulaşan kurşun bileşiklerinde yıkanmazsa deri yoluyla kana geçebilir. Bununla beraber ele bulaşan kurşun yiyecekler yoluyla da kana geçebilir (Chisolm ve Harrison 1956).

Herhangi bir yolla absorplanan kurşunun tamamına yakını eritrositler de 30-35 gün boyunca bağlı bulunur. Sonraki 4-6 hafta sonunda karaciğer, renal korteks, beyin, akciğer gibi yumuşak dokularda birikir. Kandaki bu dağılımdan sonra kurşunun yarı ömrü nedeniyle 6 haftadan sonra akut maruziyetler için kan doğru sonuç vermeyecektir (Silbergerd ve ark, 1988).

1.3.3. Kurşun Toksikodinamiği

Kurşun, vücutta eser miktarda bulunsa bile endokrin sistemi, sinir, renal, hematopoietik, iskelet sistemi, periferik sinir sistemi, merkezi sinir sistemi, kemik, diş gibi birçok organları etkilemektedir. Bireyin yaşı, maruz kalınan miktar, kurşunun formu ve kurşunun vücuda alındığı yolda kurşun toksisitesinde etkiler. Dolayısıyla maruziyet insandan insana değişebilir. Fakat çocuklar üzerindeki maruziyet çok daha açık gözlemlenebildiği için üzerinde daha çok durulan konu olmuştur. İnsanların en çok etkilendiği kurşunlu benzinin yaşamdan kaldırılması, boyaların yenilenmesi, musluk sularında kullanılan kurşunlu boruların değiştirilmesi de kurşunun insanlar üzerindeki maruziyetide azalmış olur (Goyer, 1997).

Besin yoluyla alınmış vücut için gerekli olan esansiyel elementler (kalsiyum, çinko, bakır) kurşunun fazlaca absorpsiyonuna ve toksisitesine neden olur. Six ve Goyer'in yaptığı çalışmada ratlar üzerinde kalsiyum elementinin eksikliği sonucu kan ve dokularda kurşun absorpsiyonunun arttığı gözlemlenmiştir (Six ve Goyer, 1970). Yine Six ve Goyer'in deneysel hayvanlar ve insanlar üzerinde yaptığı çalışma da demir eksikliği sonucu sindirim kanalında kurşunun arttığı gözlemlenmiştir (Six ve

Goyer, 1972). Bu durum ise ferritine bağlanmak için kurşun ve demirin yarıştığını gösterir.

Kurşun, birçok sistemde enzimleri inhibe etmekte ve fizyolojik sistemleride etkilemektedir. Klinik önemi ise sinir sistemi, kalp, endokrin ve diğer organlara kronik etkileridir. Akut zehirlenmeler genelde gastrointestinal toksisite, kronik olarak ise kan ve sinir sisteminde hasarlar oluştururlar. Çocuklar, yetişkin insanlara göre maruziyetten daha çok etkilenirler (Goyer ve ark., 1995). Akut formda çocuklarda ensefalopati görüldüğü gibi kurşunun vücutta yüksek konsantrasyonlarıda nefropati, nöropati, kafa içi basınç artması, konvülsiyon ve ölümlere kadar kötü sonuçlar doğurabilir (Grandjean, 1992 ; Yapici ve ark., 2006).

Kurşun merkezi ve periferik sinir sistemini etkilemektedir. Kurşunun etkisiyle, nöroelektrofizyolojik testler sonucunda periferik sinirlerin ileti hızlarının azaldığı gözlemlenmiştir. Çocuklarda merkezi sinir sistemi çok hassastır ve maruziyet sonucu ensefalopati oluşur ve felç ile sonuçlanabilir. Vücutta biriken kurşun, ileriki yaşlarda IQ azlığına, zeka kaybına, davranış bozukluğuna ve işitme azlığı gibi sonuçlar doğurabilir (Grandjean, 1992 ;WHO, 1992 ; WHO, 1995).

Kurşun maruziyeti, kan basıncının artmasına (sistolik ve diastolik) ve hipertansiyona neden olabilir. Kan basıncının artması kardiyovasküler hastalıklar için önem arz etsede sigara, alkol ve diğer etkilerle birleşince düşük miktarda kurşun da bile maruziyet artar. Dünyada ise tüm kardiyovasküler hastalıkların sadece %2'sinin kurşun kaynaklı olduğu belirtilmektedir (Skerfving ve Bergdahl, 2007).

İskelet sisteminde kurşun maruziyeti özellikle kemikler için çok önem arz eder. Kurşunun yarılanma ömrü çok uzun olduğu için uzun yıllar kemikte toplanır. Kemikteki kalsiyum yerine geçebilen kurşun, paratroid hormonu dahil kalsiyum metabolizmasındaki rol oynayan hormonları etkiler. Hormonların etkilenmesi sonucu plazmadaki 1,25-(OH)3D3 düzeyini de değiştirmiş olur (Goyer ve ark., 1994; Pounds ve ark., 1991). Yumuşak dokudaki kurşunun yarılanma ömrü kemikte olan kurşunun

yarı ömrü gibi çok uzun değildir. Yumuşak dokudaki kurşun 2 ay kadar bir süre yarılanma ömrüne sahipken, kemikte 20-30 yıllık bir yarı ömrü vardır. Çocuklarda ise kurşun yumuşak dokuda insanlara göre daha fazla birikir (Phillip ve Gerson, 1994).

1.4. PLASENTA

1.4.1. Plasenta'nın Yapısı ve Gelişimi

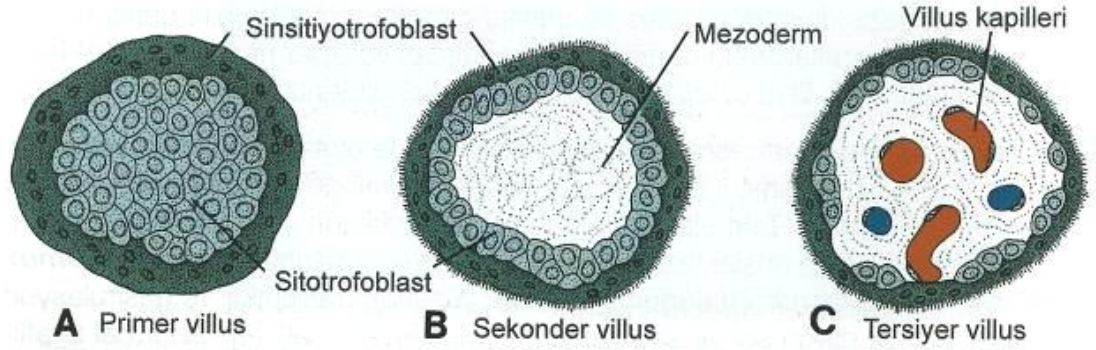
Plasenta fötomaternal bir organdır. Hamilelik sırasın da anne ve fötus arasında fizyolojik alış verişi sağlar. Blastosistin implante olmasından hemen sonra plasenta oluşmaya başlar. Gebeliğin dördüncü gününde, embryo uterus boşluğu içerisinde bulunur. Bu boşlukta 1-2 gün kadar serbest kalır ve blastosist zona pellusidandan ayrılır. Böylece trofoektodermin epitelyal uzantıları ile uterus lümeni epiteli karşı karşıya gelir. İmplantasyon 4 şekilde incelenebilir.

- Apozisyon (Stabil olmayan tutunma)
- Adezyon (Stabil tutunma)
- İnvazyon (Myometrium içlerine invazyon)
- Desidualizasyon (Endometrial stromanın desiduaya dönüşümü) (Gartner ve Hiatt, 1997).

Trofoblastlar iki tabaka halinde farklılaşır:

- a. Sitotrofoblastlar (Langhans hücreleri): Desmozomları olan tek çekirdekli hücrelerdir. Mitotik aktiviteye sahiptir. Farklanarak sinsitiyotrofoblastları oluşturur.
- b. Sinsitiyotrofoblastlar: Çok çekirdekli lerdir. Serbest yüzeylerinde mikrovilluslar yer alır. Çok sayıda mitokondriye, golgi kompleksine ve sitoplazmalarında lipid damlacıkları bulunur.

Sinsitiyotrofblastlar endometrium içine girer ve ilerleyerek embriyoyu çevrelerler. Sinsitiyotrofblastlar stromanın derinliğine doğru ilerleyerek kapiller damarların endotelini aşındırırlar. Sinsityal lakunalar maternal desidual spiral arterlerle birleşir ve anneye ait kapiller damarların endotelini aşındırmaya başlar. Maternal kan dolaşımı trofoblastik sistem içinden geçmeye başlar. Bununla beraber utero plasental dolaşım başlamış olur. Gelişimin 13.günüde villöz yapılar ortaya çıkar ve primer villuslar oluşur, 16.günden itibaren de mezodermal hücreleri desiduaya doğru ilerleyerek sekonder villuslar oluşur. Artık 20 günden sonra ise mezodermal hücreler kan damarları ve kan hücrelerine farklı olarak villöz kapiler sistemi oluşturur (Şekil 1.7) (Janqueire ve Carneiro, 2005).



Şekil 1.7: Kalıcı villus (Janqueire ve Carneiro, 2005)

Plasenta; hamilelik döneminde oluşan özel bir organdır. Amniyotik sıvı ve fetüs membranlarıyla büyüme ve fötüs gelişimini destekler (Kayaaltı ve ark., 2011). Plasenta besin absorpsiyonu, gaz transferi, atıkların atılması ve hormon sentezi gibi görevleri vardır.

Plasenta 20cm çapında, 3cm kalınlığında ve 500 gr ağırlığında diskoid hormondur. Plasenta terimini ilk olarak 1559'da R.Columbus tarafından kullanılmıştır. Genetik olarak 2 farklı dokudan oluşur (Fetal ve maternal). Sınıflandırmasında Grosser'in plasenta tiplerinden yararlanır. İnsan plasentasını ise bu 3 tipten hemokorial plasenta tipine girer. Anne kanı direkt olarak trofoblastla temas halinde olur. Anneden fetüse plasenta aracılığıyla madde geçişlerinde lipofilik, hidrofillik, iyonizasyon, moleküler büyüklük ve küçüklük, polarite önemlidir. Plasenta membranından kolay geçebilen

maddeler dolaşım-sınırlı, yavaş geebilenler ise membran-sınırlı olarak taşınır (Van der Aa ve ark., 1998).

1.4.2. Plasentanın Fonksiyonları

Maternal ve fetal kan dolaşımı arasında metabolik reaksiyonlar plasentanın fonksiyonudur. Plasentada oksijen, karbondioksit ve karbonmonoksit gibi gazlar basit difüzyonla olur. Fetus maternal dolaşımdan 20-30 ml oksijeni dakikada bir alır. Oksijen önemlidir çünkü fetusa ulaşan oksijen miktarı doğuma bağlı ancak difüzyondan bağımsızdır. Aminoasitler, karbohidratlar, yağ asitleri ve vitaminler hamileliğin ilerlemesine doğru emilimleri artar. Fetüse pasif bağışıklık olanağı yaratan anneye ait antikorların geçişini sağlar. Endokrin organı gibi faaliyet gösterir. Protein ve steroid yapıda ki hormonlar üretim görevi de verilmiştir. Placenta'nın endokrin fonksiyonu, villüslerin en dış tabakası tarafından gerçekleştirilir. Bu hücreler ise gebeliğin erken dönemlerinde salgılamaya başlar.

Plasentada üretilen bir başka hormon ise somatomammotropindir. Büyüme hormonu benzeri etkilidir fütusa anne kanındaki şekere öncelik vererek anneyi diabetojenik etkiler (Sadler 1995).

1.5. Polimorfizm Nedir ?

Gen, hücrenin kromozomlarında bulunan, canlı bireylerin kalıtsal karakterlerini taşıyıp ortaya çıkışını sağlayan ve nesilden nesile aktaran kalıtım faktörleridir. İnsan genomu yaklaşık 3×10^9 baz çiftinden oluşmaktadır ve genetik bilgiyi taşıyan yaklaşık 35,000 gen 46 kromozom içerisinde bulunmaktadır.

İnsan DNA'sının yaklaşık %99.5'u iki insan arasında aynıdır ve insanlardaki genetik eşitlilik DNA zincirindeki küçük farklılıklardan kaynaklanmaktadır. DNA

nükleolid diziliminde veya dizinimdeki değişiklikler mutasyon olarak tarif edilir ve mutasyonlar başlıca üç kategoriye ayrılır:

- a-**Hücrede kromozom sayısını etkileyen mutasyonlar (genom mutasyonu),
- b-**Tek başına kromozomun yapısını etkileyen mutasyonlar (kromozom mutasyonu),
- c-** Genleri etkileyen mutasyonlar (gen mutasyonları).

DNA sekanslarındaki gen mutasyonları tek nükleik asit değişimlerinden binlerce baz çiftini etkileyecek değişimlere kadar uzanır. DNA sekanslarındaki bu değişimler yüksek çözünürlüklü genetik analizlerle görülemeyecek kadar küçüktür ve özel teknikler gerektirir. Genlerdeki nükleotid değişimleri gen ekspresyonunun tamamen kaybına, varyant protein ekspresyonuna veya tamamen normal fenotipik değişikliklere neden olabilir. DNA'daki baz çiftlerinin yer değiştirmesi (substitusyonu) başlıca iki mekanizma ile oluşabilir:

- DNA'nın normal replikasyonu sırasında oluşan hatalar,
- DNA hasarının tamirinin yapılamamasından oluşan hatalar.

Bazı mutasyonlar spontan olarak bazıları ise fiziksel veya kimyasal mutajenler aracılığı ile oluşur. Bir genin özgün bir kromozom bölgesinde (lokus) veya DNA dizisinin birkaç alternatif formundan her birine “**allel**” denir. İnsanlar her otozomal lokusunda biri anneden diğeri babadan gelen iki allel bulundurur. Farklı genom lokuslarındaki alleller de çok çeşitli mutasyonlar bulunmaktadır.

1.5.1. Genetik Polimorfizmi Ve Çeşitleri

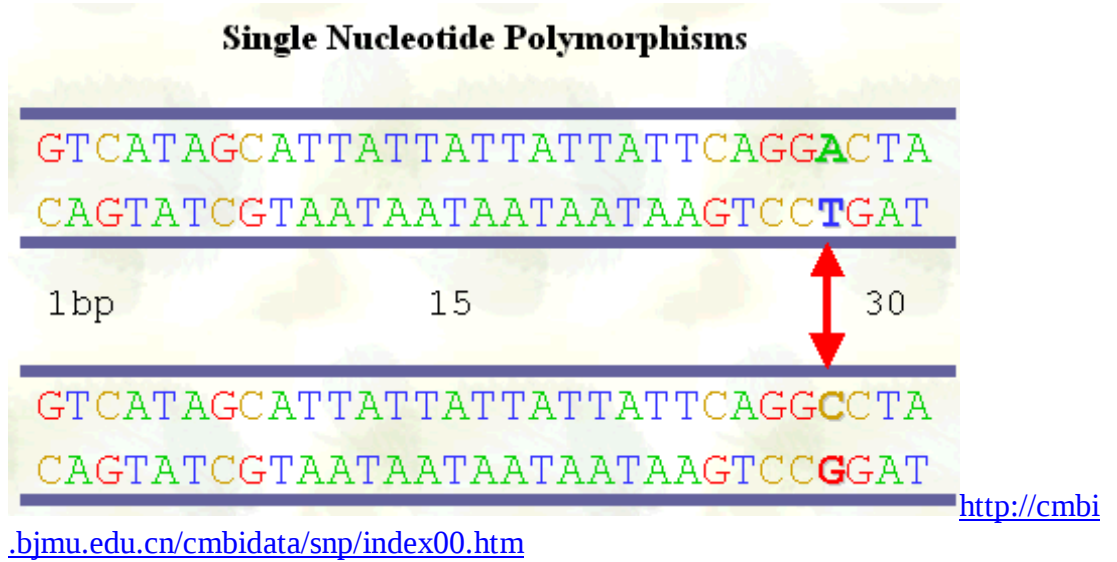
Bir popülasyonda veya popülasyonlar arasında, bir genin allelleri ya da bir kromozomun homologlarıyla birleşen çeşitli fenotipik formların varlığı yani bir lokusta bir allel den fazlasının bulunması olgusudur. Diğer bir deyişle: bir popülasyondaki bir lokusta bulunan allellerin, en az % 5'nin farklılık göstermesidir. Allellerin genel popülasyondaki kromozomların %1'inden fazlasında bulunması “**genetik polimorfizmi**” oluşturur. Allellik sıklığı %1'den küçük ise buna “**nadir varyantlar**” denir. Genlerin regülatuar (düzenleyici) bölgelerinde bulunan

polimorfik alleller genlerin transkripsiyonel regülasyonunu etkileyerek fenotipik değişikliklere neden olabilir.

Populasyon içerisindeki polimorfizmlerin bazı oluş nedenleri vardır. Bunlar:

•**Tek Nükleotid Değişimi (Single Nucleotide Polymorphism (SNP)):**

DNA dizisinde her 2000-2500 bazda bir tek baz farklılık gözlenir. Bu da aynı tür içerisinde genom farklılığının bir göstergesidir. SNP'ler genetik bir lokusta farklı alleller oluşturacak biçimde spesifik bir bölgedeki bir baz veya bazlardan meydana gelen nokta mutasyonlarının neden olduğu polimorfizmlerdir (Şekil 1.8). SNP, insan genomundaki en basit ve en yaygın genetik polimorfizm çeşididir (Öktem S. ve ark, 2001). Tek nükleotid değişim polimorfizminin bazı alt grupları vardır.



Şekil 1.8. Tek Nükleotid Polimorfizmi

•**Transisyon:** Dizi içindeki bir pürin bazının (A, G) diğer bir pürin bazına veya bir pirimidin bazının (T, C) diğer bir pirimidin bazına dönüşmesine transisyon denir.

A,G -----> G,A

C,T-----> T,C

•**Transversiyon:** Dizi içindeki bir pürin bazının (A, G) bir pirimidin bazına (T, C) veya bir pirimidin bazının bir pürin bazına dönüşmesine transversiyon denir.

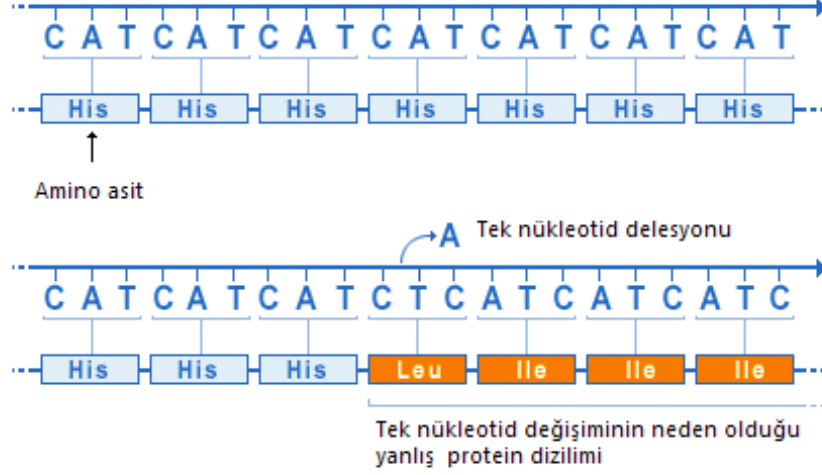
A,G----->T,C

T,C----->G,A

• **Delesyonlar:** DNA dizisi içerisinde nükleotidlerin kırılıp-ayrılması, genin normal uzunluğundan daha kısa olmasına neden olur. Eğer bu gen, protein kodlayan yapısal

bir gense, proteinin aminoasit dizisinde azalma olur ve proteinde fonksiyon bozukluğu görülür (Şekil 1.9).

CGT-----> CT

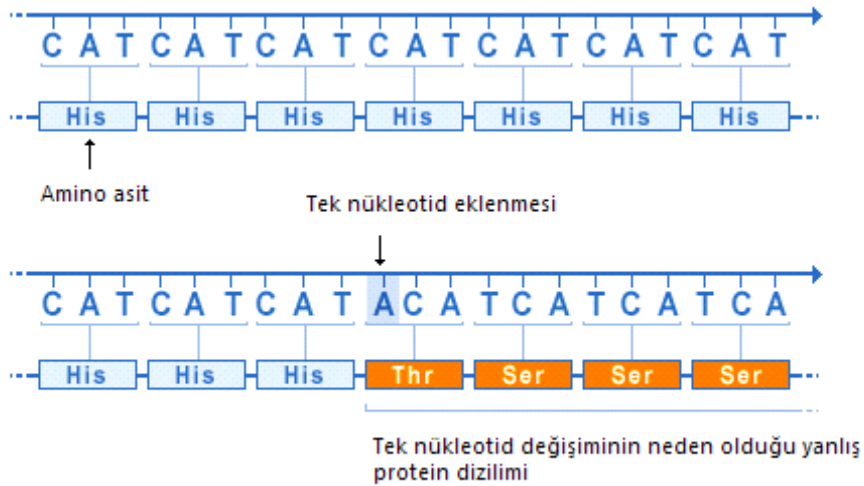


<http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/mutationtypes?show=deletion>

Şekil 1.9. Delesyon ile amino asit eklenmesinin şemasal gösterimi

•**İnserisyon:** DNA içerisine nükleotidlerin eklenmesi, genin normal uzunluğundan daha uzun olmasına neden olur. Bu protein kodlayan bir gen ise,proteinin aminoasit dizisinde artma olur (Şekil 1.10).

CGT----->CGGT



<http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/mutationtypes?show=insertion>

Şekil 1.10. İnserisyonla nükleotid eklenmesinin şemasal gösterimi

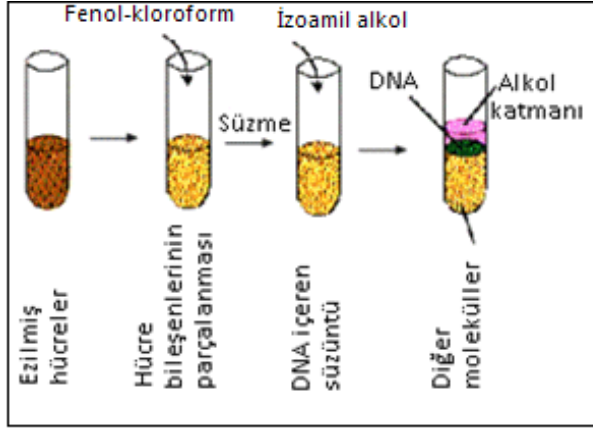
1.6. DNA İzolasyonu

Genetik araştırmaların ilk prosesi Dna'nın saflaştırılma işlemidir. Bu DNA'nın elde edilmesi için hücre zarının eritilmesi, proteinin parçalanması, proteinlerin ortamdan uzaklaştırılması ve DNA'nın çöktürülerek saflaştırılması gerekmektedir. Bazı kimyasal maddelerle ve enzimlerle DNA'nın ortaya çıkarılma işlemine DNA izolasyonu denir.

Hücre zarı lipid yapısındadır ve bazı anyonik deterjanlar ile bu işlem gerçekleştirilir. Proteinler ise Proteinkinaz K ya da çeşitli proteaz enzimler ile parçalanmaktadır (Bailes ve ark., 2007). Parçalanmış proteinleri bazı denatüre edici maddelerle uzaklaştırılır. Fenol ile bu işlem sağlansa da zararlı etkileri nedeniyle doymuş sodyum klorür çözeltisi ile çöktürülür (Lahiri ve ark., 1992). DNA'nın izolasyonu için farklı yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntem seçimi ise çalışılacak biyolojik örnekler göre seçilir.

1.6.1. Fenol-Kloroform İzolasyonu

DNA ekstraksiyonu için kullanılan yöntemlerin en başında gelir. DNA ve içeriklerinin serbest kalabilmesi için kimyasal bazı maddelerle bozulma gerçekleşir. Hücreler, deterjan (SDS), proteinaz K ve DDT (ditiotritol) gibi kimyasalların arkaya eklenmesi ile aşamaya başlanır. SDS ve Proteinaz K, hücre zarını parçalar. DNA'dan histon proteinlerini açığa çıkarır. Proteinaz K ise bu histon proteinlerini hidrolize eder. Fenol kloroform saflaştırma yöntemi diferansiyel çözünürlük prensibine göre çalışılır. Lizat üzerine oranlara göre hazırlanan fenol-kloroform-izoamil alkol konur. Fenol organik bir çözücü olduğundan nükleik asitleri çözmez ve sulu fazda DNA çözünmüş halde kalır (Şekil 1.11). Fenol fazında ise polisakkaritler, lipitler çözünür ve fenol proteini bağlar. Proteinler denatüre olur ve fenolün ara fazında toplanır. Kloroform, sulu faz ile organik faz arasındaki bağları stabilize eder ve fenolü bağlar. İzoamil alkol ise fenol fazı ile sulu fazın daha net olmasına yardımcı olur. (Baechtel, 1989.)



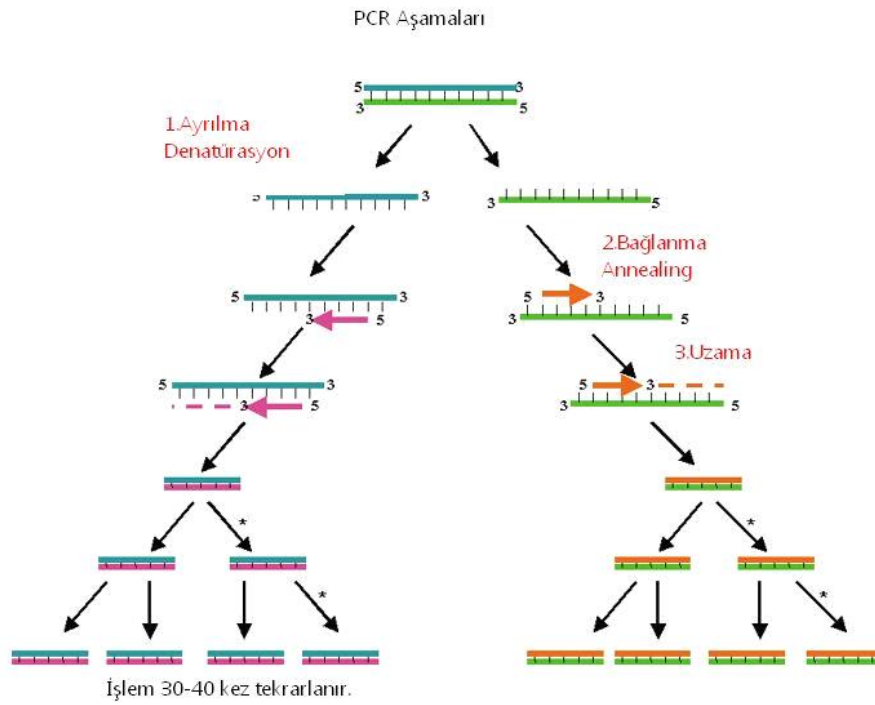
Şekil 1.11. Fenol-kloroform-izoamil alkol ile DNA izolasyonu

1.7. Polimer Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi 1985'te ABD'nin Kalifornia eyaletinin Emeryville kentindeki Cetus Corporation firmasında çalışan klinik araştırmacılarından Kary B. Mullis tarafından bulunmuştur (Kubista ve ark., 2006) . PCR; ilk defa, aynı yıl R. Saiki, K. Mullis ve arkadaşları tarafından orak hücre anemisinin tanısının konulmasında uygulamaya sokulmuştur. 1993 yılında bu çalışma Kary Mullis'e Nobel ödülünü kazandırmıştır.

PCR, DNA parçasının kopyalanması ve çoğaltılmasına ilişkin yöntemdir (Saiki ve ark, 1985; Mullis, 1990). PCR yöntemi gen ve genom çalışmalarının çoğalmasını sağlamıştır (Şekil 1.12). PCR yöntemi herhangi bir organizmadan gen izole etmek için kullanılmaktadır (Watson ve ark., 1992)

PCR tekniği üç aşamada gerçekleşmektedir;

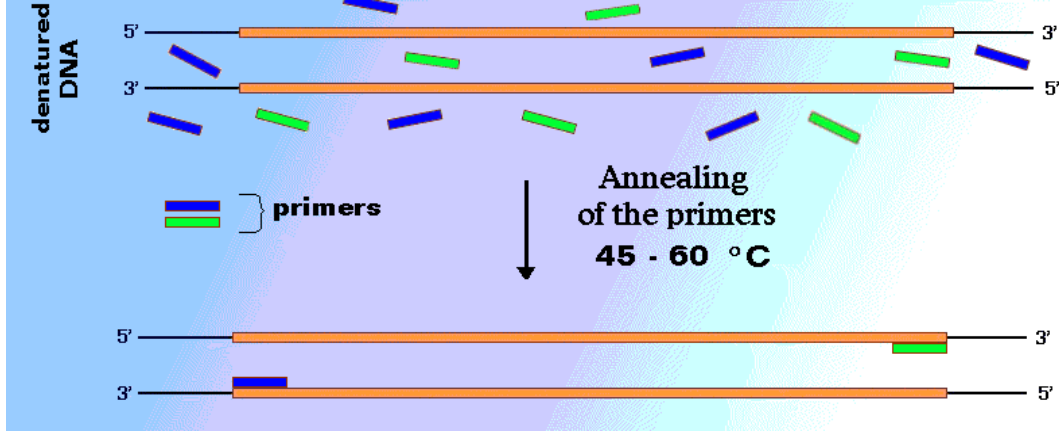


<http://www.oculist.net/downaton502/prof/ebook/duanes/pages/v8/v8c040b.html>

Şekil 1.12. PCR aşamaları

a.Denatürasyon : DNA zincirinin açılması olayıdır. DNA 90-95 $^{\circ}\text{C}$ 'de 1-2 dk tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirinden ayrılırlar. DNA zincirini ayırmak için bazı durumlarda 5-15 dk ısıtma işlemi yapılabilir.

b.Primerlerin açılan zincirlere yapışması (Annealing) : Sıcaklığın 50-70 $^{\circ}\text{C}$ 'ye düşürülmesi ile tek zincirli primerle DNA arasında hidrojen bağları oluşur. Kararlı bir yapı oluşturup kararlı bağlar oluşuncada açılan DNA zincirlerinin kendi dizisine karşılık gelen bazlar o bölgeye yapışır (Şekil 1.13). Bu işlem zincir uzunluğuna göre yaklaşık 1 dk içerisinde gerçekleşir (Innis ve Gelfand, 1990).



<http://www.cryst.bbk.ac.uk/pps97/assignments/projects/borek/Domina/page3a.html>

Şekil 1.13. PCR'in annealing aşaması

c.Primer uzaması (Elongation): DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polymerase) ile zincirin uzatılmasıdır. Taq enzim 72⁰C 'de daha iyi çalıştığı için proses bu sıcaklıkta gerçekleştirilir (Erlich ve ark., 1991). Bu döngü yaklaşık 30-40 defa tekrarlanarak milyarlarca DNA dizisi oluşturulur. Her döngü yaklaşık 5 dk da gerçekleştirilir. Teoride özgül DNA parçası; devir sayısı (n) ve başlangıçtaki hedef sayısına (t) bağlı olarak yaklaşık $tx2^n$ sayısına ulaşır.

1.7.1. PCR Bileşenleri

PCR döngüsünün gerçekleşmesi için 5 ana madde vardır. Kalıp DNA örneği; oligonükleotid primer; deoksinükleotit trifosfatlar (dNTP); Taq DNA polimeraz enzimi ve tampon solüsyonlardan oluşur (Wilson, 1997).

a.Kalip DNA: PCR'da çoğaltılacak baz dizisine sahip genetik materyaldir. Kan, tükürük, kıl, tüy, tırnak, doku vb örneklerden DNA elde edilerek çoğaltılabilir. Önemli olan DNA'nın saflaştırılma işleminde DNA'nın fonksiyonel özelliğinin kaybetmemesi gerekir.

b.Primerler (Oligonükleotidler): İşaretlenmiş 18-25 nükleotitden oluşmuş, çoğaltılacak her bir bölge için başlatıcı primerler kullanılır. Bu primerler DNA zincirinin belli bir bölümünün sonu ile komplementer olmalıdır. Primerler hedef DNA için özel olarak seçilmiş (Forward:F ve Reverse:R), başka kontaminant DNA ile çapraz reaksiyon vermezler (Percing HD, 1991).

c.Polimeraz enzimi: Taq DNA polimeraz enzimi 1987 yılında *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen sıcaklığa dayanıklı bir enzimdir. Sıcaklığa dayanıklı ilk enzim olarak bilinen Taq DNA polimeraz enzimi diğer enzimlere göre daha kullanışlıdır, çünkü her denatürasyonda tekrar tekrar ilave edilmesine gerek duyulmaz. Taq DNA polimeraz enzimi, yüksek sıcaklıkta dNTP'leri tanıyarak ayırabilme ve saniyede yaklaşık 100 dNTP'yi diziye katar ve zincir sonunda Adenin nükleotiti ekler ve zincirden ayrılır.

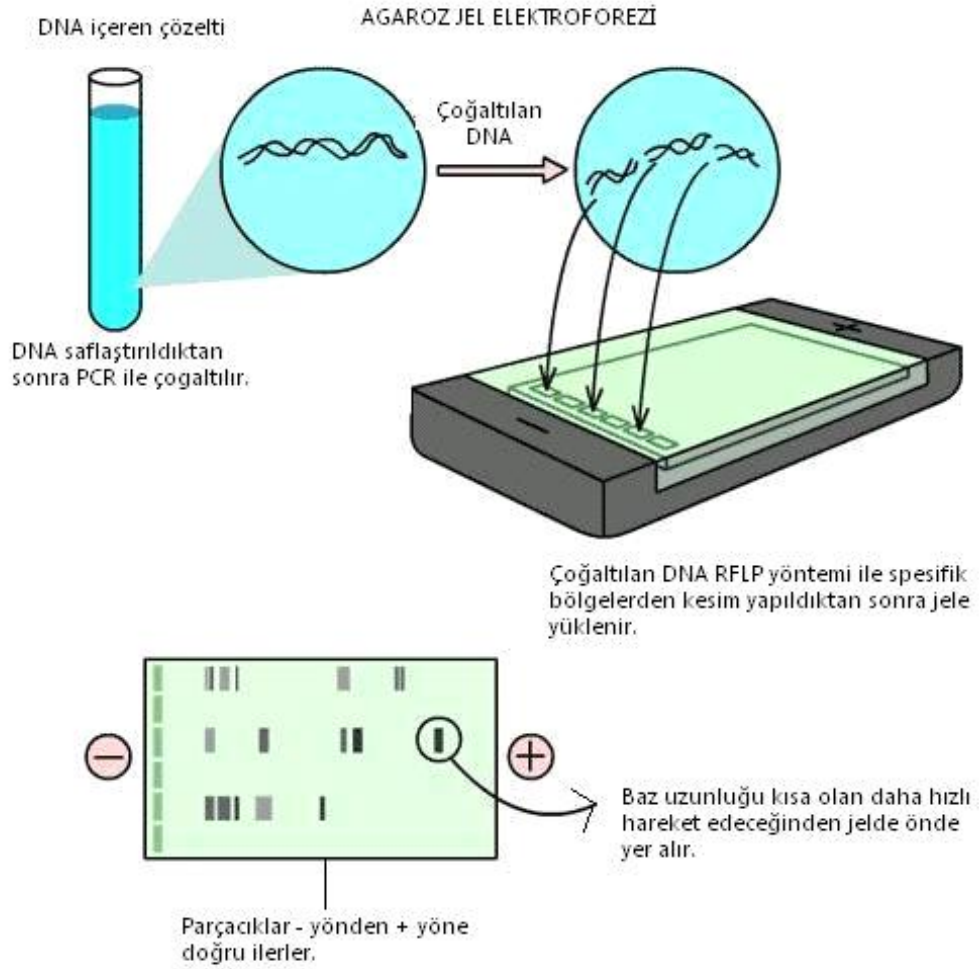
d.Deoksinükleotid- Trifosfat (dNTPs): A, T, G ve C bazları nötralize edilmiş ve derişimi belirlenmiş şekilde kullanılırsa reaksiyonun güvenilirliği artmaktadır.

e.Tampon solüsyonlar: Bu solüsyon içerisinde Tris, Mg, KCl, deterjan ve tuzlar bulunmaktadır. NaCl ve KCl tuzlarının derişimleri çok önemlidir. Fazlaca eklenen tuzlar Taq DNA polimeraz enziminin aktivitesini düşürür.

1.8. RFLP Yöntemi (Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi)

İlk olarak restriksiyon enzimleri 1970'lerde Daniel Nathans, Werner Arber ve Hamilton Smith tarafından bulunmuştur ve bu enzimlerin keşfi ile nobel ödülünü almıştır (Roberts RJ,2005). Bu gelişme tıpta birçok dalda DNA teknolojisini geliştirmiştir ve bunun sayesinde *E.coli* bakterisi ile insülinin büyük miktarlarda üretilmesi sağlanmıştır. 3000'den fazla enzim bulunmuş ve 500 e yakını ticari olarak bulunabilir (Murray N., 2000).

Restriksiyon endonükleazlar (RE), çift iplikli DNA'yı istenilen bölgeden kesen enzimlerdir. Bu enzimler DNA dizilimindeki bölgeleri tanırlar ve simetri DNA zincirlerini keserler (Şekil 1.14). DNA parçacıkları agaroz jelde yürütüldükten sonra ethidium bromide (EtBr) veya gümüş nitrat (GN) ile boyanarak gözlemlenir.



<http://www.drzeydanli.com.tr/images/image/Elektroforez%20.JPG>

Şekil 1.14. RFLP Yöntemi

RFLP yöntemi kesim işlemi yapıldıktan sonra bantta ilerlemesine ve uzunluğuna göre polimorfizm, nokta mutasyonları, insersiyon ve delesyon gibi bilgiler bulunabilir (Dowling ve ark., 1996).

1.8.1. RFLP Enzim Tipleri

Bugüne kadar 3 tip enzim ile karşılaşmıştır. Tip 1, 2 ve 3 olarak adlandırılan enzimler istenilen bölge özelliklerine göre seçilir ve kesme işlemi yapılır (Boyer

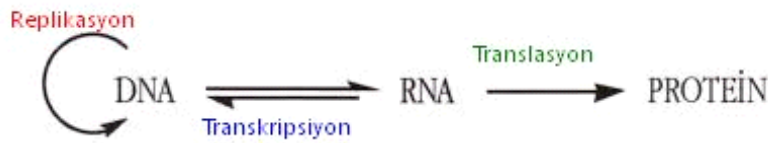
1.9. Gen Ekspresyonu

HW 1971). Tip 2 kesme işleminde en çok kullanılan enzimdir (Williams RJ 2003).

TİP 1 : İlk keşfedilen enzimlerdendir. Algılanan bölgeden 1000 çift baz uzaklığındaki bölgeden kesim yapar. ATP (Adenizin trifosfat) ve Mg gibi enzim kofaktörleri enzim aktivitesinde önemli rol oynar.

Tip 2 : Referans baz dizisinde belirlenen bölgeden ve yakınlarından kesen enzimdir. Restriksiyon enzimi nükleaz aktivitesi gösterirken enerji ihtiyacı istemez. Genel olarakda moleküler genetik uygulamalarında kullanılır. Tip 2 enzimleri tanıma dizilerinden iki kopyası ile eşleştikten sonra DNA'yı keserler (Primroseve ark., 1994).

Tip 3 : Enzimler referans baz dizisinin 20-25 baz çifti uzağından keser. Bu enzimler hedef bölgeyi bilmelerine rağmen farklı bölgeden de kesim yapabilmektedir. DNA metilasyonu ve restriksiyonu için kofaktörlerine ihtiyaç duyarlar (Dryden DT., 2001).

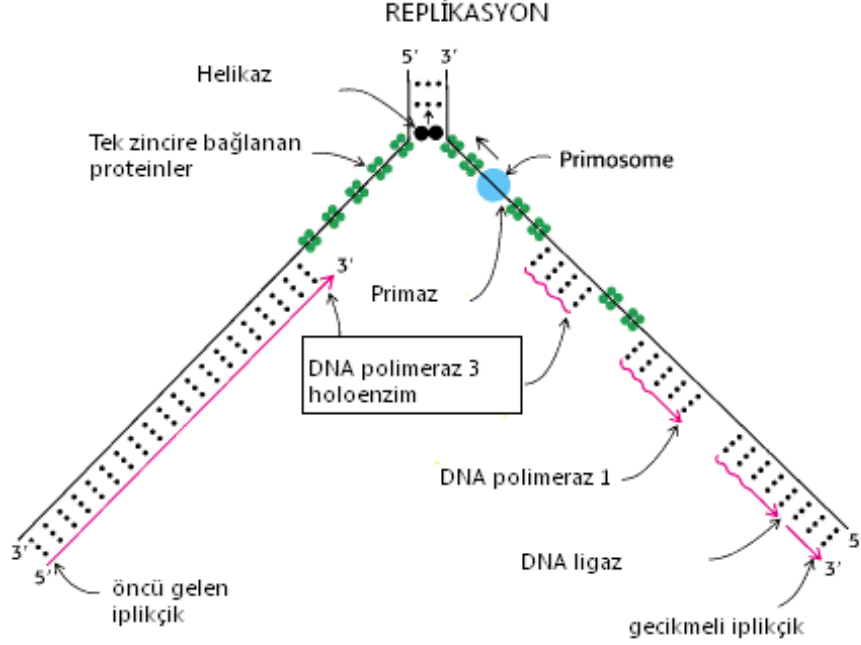


Şekil 1.15. Gen ekspresyonu

- **Replikasyon:**

Replikasyon, genetik bilgilerin diğer nesillere aktarılması için DNA'nın kendini kopyalamasıdır. Genetik materyalin tamamen benzeri moleküllerin oluşmasıdır. DNA helikaz, primaz, DNA polimeraz ve bazı tek zincire bağlanan proteinler

replikasyonda rol oynayan 4 temel maddedir. DNA zinciri birbirine antiparaleldir ve 5' yönünden 3' yönüne doğru gerçekleşir (Şekil 1.16).

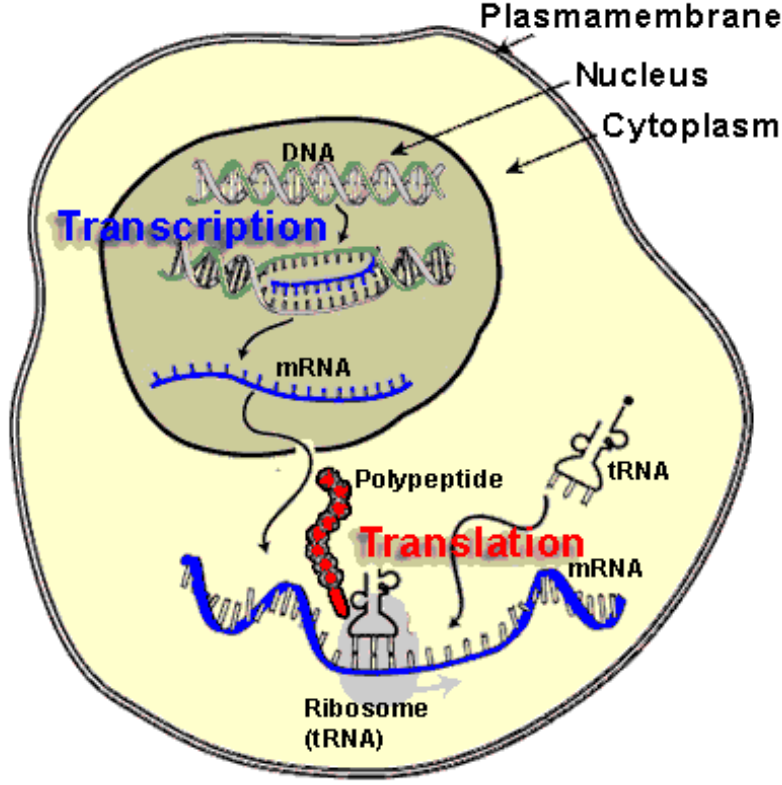


Şekil 1.16. DNA'nın replikasyonu

- **Transkripsiyon:**

DNA'nın nükleotit dizisinin RNA polimeraz enzimi tarafından RNA şeklinde kopyalanması olayıdır. DNA'dan RNA'ya genetik bilginin aktarılmasıdır. Transkripsiyon, hücre içi genetik bilgi akışının ilk basamağı olduğu için önemlidir. Transkripsiyon sonucu mRNA molekülü sentezlenir ve mRNA'daki her üçlü kodon, ayrıca peptit zincirine girecek aminoasiti taşıyan tRNA'nın antikodonuna eşleniktir. RNA molekülü, DNA'nın kalıp kolunun dizilişini bütünleyici ribonükleotidlerin ATP, GTP, CTP ve UTP'tan pirofosfatlar ayrılması ile 5' 3' yönünde sentezlenir. Transkripsiyon sonunda oluşan RNA'lar primer RNA olarak adlandırılırlar. Oluşan bu RNA'lar hemen kullanılamazlar ve RNA processing süreci ile olgun RNA'lar meydana gelir.

- **Translasyon** : Transkripsiyonla RNA'ya kopyalanan genetik bilginin bir protein veya polipeptit zincirine çevrilmesidir (Şekil 1.17). Protein sentezinde, mRNA, tRNA ve ribozomlar bu süreçte rol oynamaktadır.



Şekil 1.17. DNA'nın translasyonu

Proteindeki aminoasit sırasını mRNA' lar bir kod halinde taşır. Her aminoasit için en az bir tane tRNA bulunmaktadır. tRNA üzerinde **antikodon** denilen ve mRNA'daki kodonları tamamlayıcı üçer bazlık nükleotid dizileri vardır.

Transkripsiyonu yapılacak genin belirlenmesi ile bu genin önündeki 250 nükleotid uzunluğundaki transkripsiyonun başladığı bölge promotor bölge olarak adlandırılır. Transkripsiyonu gerçekleştiren RNA Polimeraz II enzimi, enzim aktivitesini gerçekleştirebilmesi için bu promotor bölgeye bağlanması gerekir.

1.10. Atomik Absorpsiyon Spektrometresi (AAS)

Atomik absorpsiyon spektroskopisi gaz haline geçmiş atomların ışık tarafından absorpsiyonunun ölçülmesine dayanır. Atomlar temel enerji düzeyinden ışığın absorpsiyonu ile kararsız uyarılmış enerji düzeyine geçiş yaparlar. Atomik absorpsiyon spektroskopisi diğer analiz yöntemleri gibi çözeltilerdeki element konsantrasyonunu belirlemekte kullanılır. Sulu çözeltiler, seyreltilmiş organik çözeltiler ya da seyreltilmiş örneklerin element analizi için atomik absorpsiyon spektrometresi kullanımı uygundur. Burada nicel analiz Beer-Lambert yasasına bağlıdır. Absorbans, A, ortama gelen ışığın şiddeti, I_0 , ortamdan çıkan ışığın şiddeti, I, oranının logaritmasıdır. Absorbans, araştırılan elementin derişimiyle orantılıdır (Skoog,1997).

$$A = \log I_0/I = k.c.d$$

A : Absorbans

I_0 : Ortama giren ışığın şiddeti

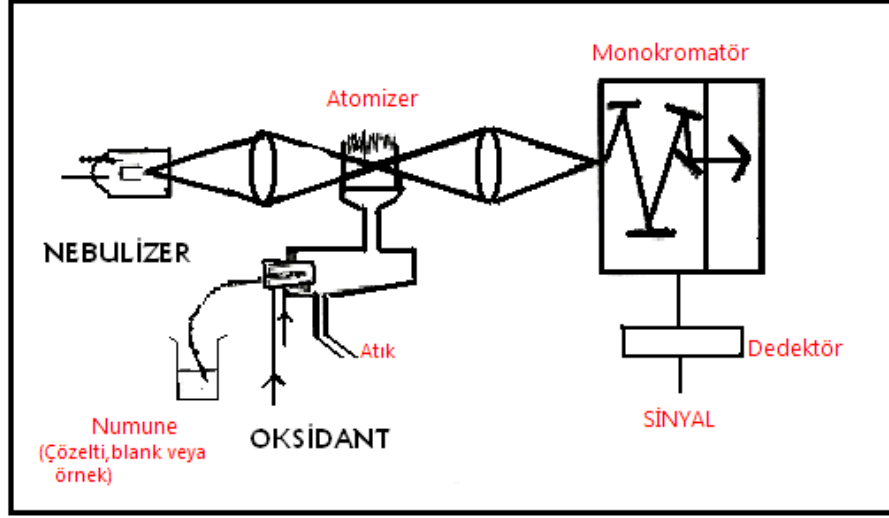
I : Çıkan ışığın şiddeti

k : Absorpsiyon katsayısı

d: Absorpsiyon tabakasının kalınlığı

c: Absorplanan maddenin konsantrasyonu

Atomik türlerin spektroskopik tayininde ilk basamak element iyonlarının ve tek atomların buharlaştırılıp, parçalanır ve gaz haline ulaştırılır. Metodun güvenebilirliği ve kesinliği atomlaştırma basamağına bağlıdır (Skoog West Holler, 1999).



Şekil 1.18. AAS'nin çalışma prensibi (Skoog, 1997)

Atomik absorpsiyon bileşenleri, ışımayı yapacak bir ışın kaynağı, çözeltinin atomik buhar haline gelmesini sağlayan atomlaştırıcı, çalışılan dalgaboyunu diğer dalgaboylarından ayıran monokromatör ve sinyalleri okuyan bir dedektördür (Skoog,1997). Alevli atomlaştırma, elektrotermal teknikler (grafir fırın), hidrit ve yarı-alev teknikleri atomlaştırma tekniklerindendir.

1.10.1. Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi (AAAS)

Alevli atomik spektrometresi serbest analit atomlarının oluşturulmasıyla belli bir dalga boyu üreten ışık kaynağı altında uyarılması ile analiz yapılmaktadır. En çok kullanılan yöntem alevli hücre tipidir. Nebulizer çözeltiyi emerek spray odasına gönderir ve aerosol haline gelen çözelti aleve gönderilir. Alevde yüksek sıcaklıklarda buharlaştırılır ve oyuk katot lambasındaki ışık ile atomlar uyarılarak absorplanan ışık miktarı tayin edilir (Zeev B. Alfassi, 1994). Alevli atomlaştırıcılarda ölçümler genelde ppm düzeyinde yapılır.

1.10.2. Elektrotermal Atomlaştırma

Alevli atomik absorpsiyon tekniği basit ve tekrarlanabilir bir metottur. İyi sonuçlar elde edilir. Fırın teknikleri, alevliye göre daha küçük konsantrasyonlarda ölçüm yapar ve ppb seviyesindedir. Grafit Fırın metodunun tayini, yüksek sıcaklıkta gaz halinde bulunan element atomlarının elektromanyetik ışınları absorblaması temeline dayanır. Alev yerine bir argon yatağında bulunan elektrikle ısıtılan grafit tüp yer alır. Az miktardaki örnek grafit tüpe yerleştirilmesiyle yüksek sıcaklıklara ulaşması, kurutma ve küllenme basamağı ile matris bileşenlerinden diğer bileşenlerden uzaklaştırmasıdır. Grafit tüp ile tüm bileşenler atomlaşır ve gaz fazına geçen serbest atomların varlığıyla absorpsiyon ölçülür.

1.11. Hemakromatozis

1.11.1. Hemakromatozis'in Tarihçesi

İlk kez 19. yüzyılda Bronz diabet olarak tanımlanan herediter Hemokromatozis, Armand Trousseau tarafından tanımlanmıştır. Van Recklinghausen 1889 yılında bu hastalığa demirin neden olduğunu düşünerek 'HEMOKROMATOZİS' tanımını kullanmıştır. 1935'te İngiliz fizikçi Sheldon hastalığın ailesel bir hastalık olduğunu ve kliniğin organlarda artmış demir depolanması sonucu meydana geldiğini belirtmiştir. Simon ve arkadaşları 1976 yılında hemokromatozis geninin 6. kromozomda HLA-A lokusu ile sıkı ilişkide olduğunu ve hastalığın genetik orijinli olduğunu saptamıştır. Daha sonra 1996 yılında Niderau ve arkadaşları hastalığın, HFE genindeki mutasyon sonucu ortaya çıktığını bildirmişlerdir (Özdemir S, 2007). Herediter Hemokromatozis (HH); demir metabolizma bozukluğunun prototipidir, çeşitli parankimal organlarda progresif demir birikimine bağlı, otozomal resesif geçişli bir demir metabolizma hastalığıdır. Hemokromatozis hastalığı primer (herediter) ya da sekonder hemokromatozis olarak sınıflandırılabilir. Herediter

hemokromatozis otozomal resesif geçişli, barsaktan demir emiliminin arttığı, altta yatan herhangi bir ikincil hastalık bulunmayan formudur. Sekonder hemokromatozis ise özellikle inefektif eritropoez gibi hematolojik bir hastalık nedeniyle kan transfüzyonu sonucu görülen formudur. Herediter Hemokromatozis kompleks, patogeneğinde genetik ve çevresel faktörlerin rol aldığı kalıtsal bir hastalıktır (Bacon ve ark., 1999). HH, aşırı demir emilimi, transferrin, ferritin ve diğer demir bağlayıcı proteinlerin saturasyonu ve vital organlarda demir birikimi ile karakterize bir grup bozukluğu içermektedir. Serbest demir, reaktif oksijen türlerinin üretimini katalize ettiğinden, toksik bir maddedir. Bu nedenle hemokromatozis, karaciğer yetmezliği, kardiyomiyopati, endokrin bezlerin yıkımı ve eklem hasarına yol açabilmektedir. Günümüzde HH den sorumlu spesifik genler belirlenmiştir. En sık görülen formu olan Tip 1 HH, HFE genindeki mutasyonlar sonucu meydana gelen otozomal resesif bir bozukluktur. HH lu hastaların çoğu HFE genindeki C282Y mutasyonu için homozigottur. HFE dışındaki başka bazı genlerin de mutasyona uğradığında hepsidin ekspresyonunda azalmaya ve klinik olarak herediter hemokromatozise yol açtığı bilinmektedir.

1.11.2. Hemokromatozis Tipleri

4 farklı Hemokromatozis tipleri vardır.

- a. Tip1, Klasik Hemokromatozis
- b. Tip2, Juvenil Hemokromatozis
- c. Tip3, Hemokromatozis: 7q22 ‘de lokalize TFR2 geni mutasyonları sonucu görülür ve otozomal resesiftir.
- d. Tip4 Hemokromatozis: Ferroportin’e (Demir atıcısı) bağlı bir bozukluktur.

1.11.3. Hemakromatozis Moleküler Genetik

1996 yılında HH den sorumlu olan HFE gen mutasyonunun saptanması ile hastalığın tanınmasında büyük ilerleme kaydedilmiştir. Herediter Hemokromatozis’de HFE

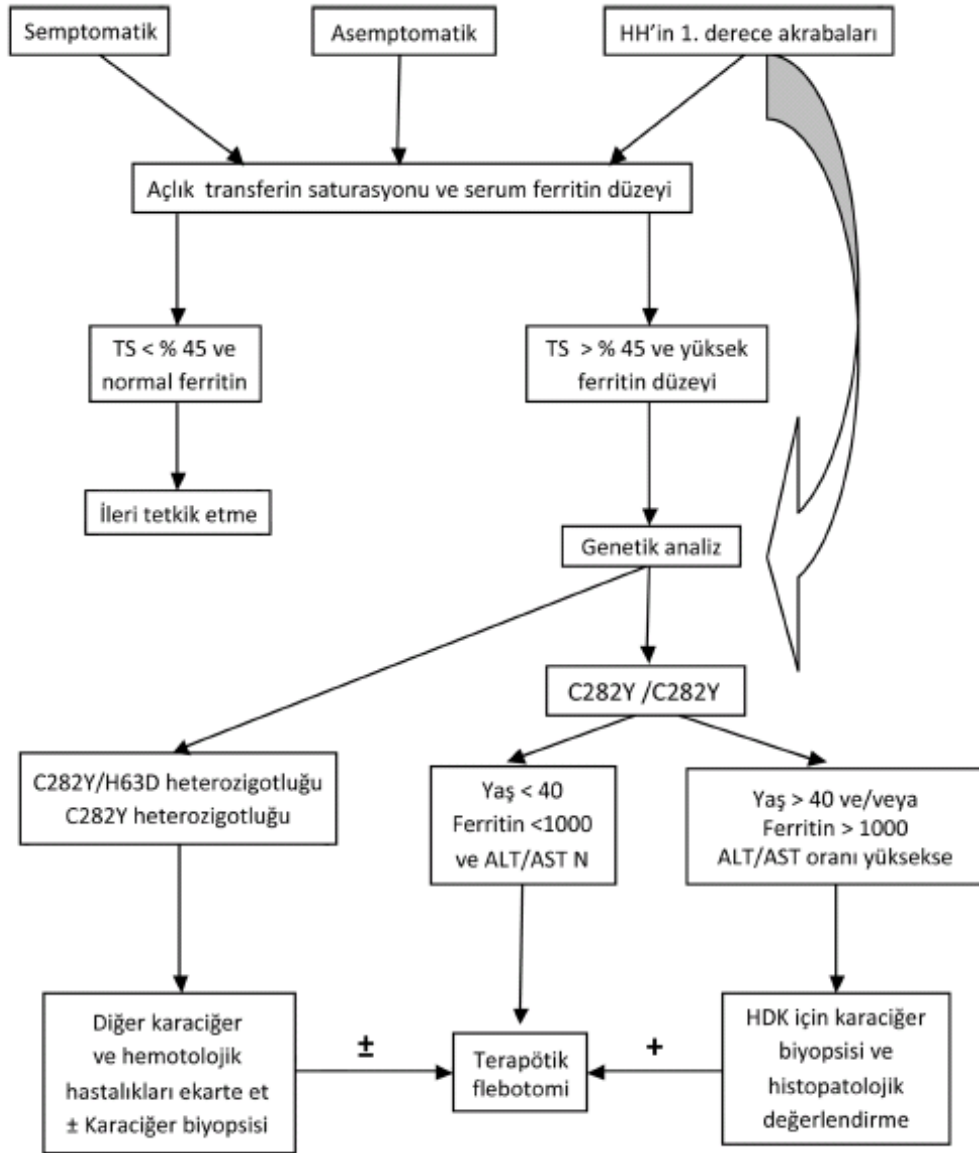
geninde iki önemli mutasyon tanımlanmıştır, birincisi C282Y mutasyonu (845 G-A) 282. kodonda olan sistein aminoasidi yerine tyrozin aminoasidi, ikincisi ise H63D mutasyonu (187 C-G) 63. Kodonda olan histidin aminoasidi yerine aspartat aminoasidi geçmesi sonucu görülür. İkinci mutasyonun biyolojik etkisi C282Y mutasyonu kadar güçlü değildir (Feder ve ark., 1996). Herediter Hemokromatozis sadece HFE gen mutasyonu ile karakterize değildir. Son zamanlarda hepsidin, hemojuvelin, ferroportin, DMT1, TFR2 proteinlerini kodlayan genlerdeki bozuklukların da demir birikimine neden oldukları gösterilmiştir. Bunlar da hemokromatozisin non-HFE ilişkili formları olarak gruplandırılmaktadır.

1.11.4. Hemakromatozis de Tanı

Günümüzde tanı birinci basamak olarak biyokimyasal (transferin saturasyonu ve serum ferritin düzeyi) ve ikinci basamakta genetik (HFE ve diğer genlerin moleküler testleri) testlere dayanmaktadır (Şekil 1.19). Böylece karaciğer biyopsisi ihtiyacında azalma görülmektedir. Transferin saturasyonu vücut demir birikimini göstermede en duyarlı tetkiktir ve çalışmalarda belirlenen eşik değer %45 olarak belirtilmiştir (Camaschella ve ark., 2000). Yapılan bir çalışmada 1990-1995 yılları arasında yeni tanınan hastaların %62'si bu yolla dikkati çekerek tanıya ulaşılmıştır. Kalan hastaların %14'ü aile üyelerinin taramasıyla tespit edilmiştir (Bacon ve ark., 1997). Ferritin ve serum demir parametrelerinde açlık ölçümleri gerekmektedir. Çünkü normal bireylerin yaklaşık %50'sinde yemek sonrasında artmış demir düzeyleri görülebilmektedir. Serum ferritin düzeyleri için kadınlarda >200 µg/L ve erkeklerde >300 µg/L patolojik olarak kabul edilmektedir. Ferritin düzeyi karaciğerdeki harabiyet için de tahmin ettirici olabilir ve >1000 µg/L eşik değeri karaciğer fibrozisinin varlığını düşündürebilir.

Ancak ferritin akut faz reaktanı olarak da yükselebildiğinden ve genç HH'li hastalarda henüz yükselmemiş olabileceğinden sensitivitesi düşüktür. Tip 4 HH'in bazı mutasyonlarında retikuloendotelyal sistem organlarında aşırı demir birikimi ve

yüksek ferritin düzeyi görülürken serum demir ve transferinsatürasyonunun normal olabileceği akılda tutulmalıdır.



Şekil 1.19. Hereditör Hemokromatozisin Tanı Algoritması

1.11.5. Hemakromatozis'de Klinik Bulgular

Demirin barsaktan uygunsuz emiliminin artması sonucunda demir parankimal organlarda karaciğer, pankreas, dalak, kalp ve diğer organlarda birikerek bu organlarda hasarlanmaya ve fonksiyon bozukluğuna neden olur. HH sıklıkla 40-60 yaş arası her iki cinsi eşit oranda etkilese de, semptomatik hastalık erkeklerde

bayanlara göre 10 kat fazla görülebilmektedir (Sheldon, 1935). En çok görülen semptomlar halsizlik, yorgunluk olmakla birlikte karın ağrısı, karaciğer fonksiyon test bozukluğu, HCC, kardiyomiyopati, kardiyak iletim bozuklukları, hipogonadizm, libido azalması, hipotiroidi ve artralji gibi semptomlar da görülebilir. Hepatomegali, semptomatik olan hastaların %95'inde karın ağrısı ve karaciğer hassasiyeti ise hastaların %56' sında görülebilir. Sirotik hastaların %30'unda HCC gelişebilir, bu nedenle hızlı karaciğer büyümesi, karın ağrısı ve asit açısından sıkı takip edilmelidir (Niedera ve ark., 1996).

1.11.6. Demir Yüklemeyle Oluşabilecek Hastalıklar

- Herediter Hemokromatozis
 - A.C282Y homozigotluğu
 - B.C282Y / H63D heterozigotluğu
 - C.Jüvenil hemokromatozis
 - D.Otozomal dominant hemokromatozis
 - E.Diğer HFE gen mutasyonları
- Sekonder Demir Yüklenmesi
 - A.Hematolojik nedenler
- Diyetle bağlı demir yüklenmesi
- Karaciğer hastalıkları
- İdyopatik nedenler

1.11.7. Hemakromatozis Hastalığının Tedavisi

Tedavideki amaç vücuttaki fazla demiri atmaktır. Hemokromatozis tedavisi 2 şekilde yapılmaktadır.

1-) Flebotomi ile demirin uzaklaştırılması sağlanır. Haftada 1-2 kez Htc değeri %35'in altına düşenceye kadar devam edilir. Tedavi edilen Hemokromatozis hastalarında 5 yıllık yaşam süresi %65, 10 yıllık yaşam süresi ise %30'dur. Bir kez

yapılan flebotomi ile vucuttan yaklaşık 500 ml kan ve 250 mg demir uzaklaştırılmış olur. Yani vucuttan 1 gr demir atılması için 4 kez flebotomi yapılması gerekir. Her 1-2 gr demir uzaklaştırıldığında serum ferritin düzeyleri 2-3 ayda bir kontrol edilmelidir. Her kan almada hematokrit değerinde 10 birimlik ya da başlangıcın %20'si kadar düşme olacak şekilde flebotomiye devam edilmesi gerekir (Tavill, 2001).

2-) Şelasyon tedavisi: Talasemili hastalarda, 10-15 ünite kan transfüzyonu sonucunda, Ferritin 1000 µg/L ise şelasyon tedavisi uygulanır. Bu tedaviye en uygun olarak Desferrioksamin (DFO; Desferal) ile şelasyon uygulanır. Desferal 6 dişli demir şelatördür. Demirin 6 koordinasyon alanını bağlar ve stabil demir şelatör kompleksi meydana gelir.

Çalışmamızda; doğum yapmış bayanlara ait kan örneklerinde HFE H63D gen polimorfizmi (rs1799945) belirlenerek plasenta dokusu örneklerindeki kurşun düzeyi tespit edilecek, aralarındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilecektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Metal Analizi

2.1.1. Gereçler

2.1.1.1. Numuneler

Tez çalışması için Ankara Üniversitesi Cebeci Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum anabilimdalı'nda doğum yapan ve bilinen bir metal maruziyeti olmayan 93 sağlıklı kadından alınan kan ve plesanta örnekleri kullanılmıştır. Annelerin tamamında bilinen bir hastalık bulunmamakta ve sigar kullanmamaktadırlar. Anne kan örneklerinden DNA izole edilmiş ve HFE gen polimorfizmleri belirlenmiş, plesanta örneklerinin ise kurşun düzeyi analiz edilmiştir.

2.1.1.2. Hasta Rızası

Bu çalışmada kullanılan tüm örnekler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulları Araştırma Projesi Bilgi ve Taahhüt Formunda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmış Bilgilendirilme Onam Formları doldurularak çalışmaya katılmıştır (Etik Kurul Karar No: 33-730; Tarih: 11.07.2011). Çalışmada 93 örnek kullanılmıştır.

2.1.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Pb Standart Çözeltisi AA Standart Etanol pour SCP SCIENCE

- Nitrik asit Merck

2.1.1.4. Kullanılan Araç ve Gereçler

- Atomik Absorpsiyon Spektrometresi VarianAA240Z Zeeman (GFAAS)
- Grafit Tüp Atomlaştırıcı Varian GTA 120
- Grafit Tüpleri Varian GTA
- Hassas Terazî Mettler Toledo 4 digit
- Mikrodalga Fırın Mars Xpress
- Su Pürifikasyon Sistemi Human UP 900 Scholar-UV
- Santrifuj Heraeus Sepatech Labofyge 200
- Otomatik Pipetler
- Ephendorf
- Etüv Memmert
- Cam Malzemeler
- Polipropilen, Kapaklı Tüpler (15, 25 ml'lik)
- Hava - Asetilen Tüpü
- Argon Tüpü
- Manyetik Karıştırıcı MIRAK
- Sample Cup 2 ml Vial Pothtech Elkay

2.1.2. Yöntem

Toplanan anne kanlarından elde edilen genomik DNA'lar PCR-RFLP yöntemi ile HFE H63D tek nokta mutasyonları bulundu. Anne plesenta dokularında ise kurşun nicel tayini GFAAS yöntemi ile yapıldı. Kurşun düzeylerinin HFE ile ilişkisinin olup olmadığı araştırıldı.

2.1.2.1. Örneklerin Alınması

Kan örnekleri Ankara Üniversitesi Cebeci Tıp Fakültesi Kadın Doğum bölümünden 93 yeni doğum yapmış kadından alındı. Venöz yolla alınan 2 ml'lik kanlar EDTA'lı tüplere alındı ve +4°C'de saklandı. Toplanan plasentalar ise metal analizi yapmak için polietilen kaplara konularak -20°C de saklandı.

2.1.2.2. Placenta Örneklerinin Hazırlanması

Polietilen kaplara konulan plasentalar dondurucudan alınıp oda sıcaklığında bekletildi. Plasentalar cam tabla üzerine konuldu ve tabla ile beraber 75°C'ye ayarlanmış etüvde 24 saat kurutularak ağırlığı sabitlenmesi için bekletildi.

2.1.2.3. PLACENTA ÖRNEKLERİNİN ÖN ANALİZ İŞLEMLERİ

Sabit tartıma gelen placenta örnekleri hassas terazi ile tekrar ağırlığı incelenerek kuru ağırlıkları belirlendi ve teflon tüplere konuldu. Placenta örneklerinin üzerine 5 ml %65'lik HNO₃ eklenerek Cem Mars Xpress mikrodalga fırında asitle yakma işlemi 200 °C ve 800 W'da 20 dakika boyunca yapılır. Yakılan placenta örnekleri toplam deiyonize su ile beraber 25ml ye tamamlanarak, seyreltme işlemi yapıldı ve 50ml'lik polipropilen tüplere alındı. Analiz sürecine kadar +4 °C'de bekletildi.

2.1.2.4. Analiz İşlemi

Placenta örnekleri ön analiz sürecini geçtikten sonra kurşun düzeylerini belirlemek için Atomik absorpsiyon cihazı ile tayin edilmiştir. Grafit fırın tekniği kullanılmıştır. Numuneler cihaza yüklendikten sonra Argon yakıcı gazı ile miktar tayini yapılmıştır.

2.1.2.5. Plasentadaki Kurşun Düzeyleri

Kurşun düzeylerinin belirlenmesi için Varian AA240Z Zeeman atomik absorpsiyon cihazı kullanılmıştır. Önce kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Bunun için 1000ppm’lik kurşun stok çözeltisinden 15ppb konsantrasyonundan ana stok hazırlanmıştır. Hazırlanan stoklardan da 5ppb, 10 ppb ve 15 ppb konsantrasyonları hazırlanarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Kurşun analizi için 217,0 nm dalga boyu ayarlandı. Sıcaklık değeri ise 2150⁰C’de toplandı. Atomlaştırıcı olarak Argon gazı kullanıldı. Hazırlanan standartlar için piklerin düzeylerinin düzgün çıkması için her standarda 5 ml %65 saflıkta HNO₃ çözeltisi eklendi. Her bir standart için 3’er kere ölçüm yapıldı. Kalibrasyon her 20 örnekte tekrarlandı. Kalibrasyon hesabı konsantrasyon hesabı ile yapıldı.

2.1.2.6. Placenta Örneklerinin Kurşun Analizi

Hazırlanan standartlara piklerin düzgün çıkması için 5 ml %65 saflıkta HNO₃ eklendi. Kalibrasyon eğrisi için her bir standart çözelti için 3 kez ölçüm yapıldı. Kurşun analizi için dalga boyu 283,3 nm olarak ayarlandı. Absorbans verisi 2150⁰C’de toplandı. Piklerin ölçümü pik yüksekliği ile kalibrasyon hesabı ise konsantrasyon modu ile yapıldı. Kalibrasyon 20 örnekte bir tekrarlandı. Örnekler için ise 3 kez ölçüm yapıldı. Atomlaştırıcı olarak grafit fırın ve ortam gazı olarak Argon kullanıldı.

2.2. HFE Gen Polimorfizmi

2.2.1. Gereçler

2.2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

•	Doku DNA izolasyon kiti	Qiagen
•	Restriksiyon Enzimi (<i>Msp</i> I)	Neb(New England Biolab)
•	Primerler	Alpha DNA, Montreal
•	Etanol	Merck
•	Agaroz	Prona
•	Trizma Base	Merck
•	Borik asit	Merck
•	EDTA	Merck
•	DTT	Sigma
•	Etidyum Bromür	Applichem
•	6X loading çözeltisi	Qiagen
•	Saf etanol	Scharlau, Dop
•	DNA's RNA's free water	Qiagen
•	Hot Star Taq DNA polimera	Qiagen
•	Fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1)	Applichem
•	Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Applichem
•	Sodyum klorür (NaCl)	Merck
•	Proteinaz K	Merck
•	100 bp ladder	Fermentaz
•	Triton X	Scharlau

2.2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

•	Laminar Flow kabin	Esco
•	Thermal Cycle PCR cihazı	Techne Tc 512
•	Jel Görüntüleme cihazı	Syngene
•	Yatay elektroforez cihazı	Scie-Plas
•	Güç Kaynağı	Bio-Rad
•	Su banyosu	Nüve Bm 402
•	Otoklav	Nüve
•	Soğutmalı santrifüj cihazı	Hettich
•	Mikrodalga fırın	Arçelik
•	Elektrikli hassas terazi	Schimadzu Libror
•	Vorteks karıştırıcı	Biosan
•	pH metre	Mettler Toledo
•	Laptop Cooler (–20°C)	Sigma
•	1.5 ml ve 0.2 ml’lik ependorf steril tüpler (10 l, 100 l, 1000 l.)	Axygen Genuine
•	pirojen free filtreli, pipet uçları	Finntip
•	Otomatik mikropipet	Hassas terazi
•	Ependorf, Thermo, Tipor-V	Etüv
•	Memmert	Mettler Toledo 4 Digit
•	Santrifüj	Heraeus Sepatech
	Labofyge 200	
•	Manyetik Karıştırıcı	Mirak
•	Ph metre	Seven Multi Mettler
	Toledo	
•	Su Purifikasyon Sistem	Human Up 900
•	Mikrodalga fırın	Mars X Press

2.2.2. Yöntem

2.2.2.1. Sıvı Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

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

- Kan örneğinden 200 l alındı ve 1,5 ml'lik ependorf tüp içerisine konuldu.
- Kan örneğinin üzerine 1000 l. TE konularak 12000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra alt faz 100 l kalıncaya kadar üst fazdan alınarak atıldı ve işlem 3 defa tekrarlandı.
- Pelet üzerine; 45 l NaCl (1 M), 40 l SDS (%10'luk), 100 l TE ve 5-10 l proteinaz K kimyasalları eklenerek vortekslendi.
- 1.5-2 saat 56⁰C'lik su banyosunda inkübe edildi.
- Fenol-kloroform-izoamil alkol karışımından 500 l ilave edildi ve vortekslendi.
- 2 dakika 2500 rpm'de santrifüj edildi.
- Üst faz alınırken alt fazın karıştırılmamasına dikkat edildi ve yeni bir ependorf tüpüne üst faz konuldu.
- 1000 l soğuk saf etil alkol ilave edildi.
- 10 dakika 10000 rpm'de santrifüj edildi.
- Alkol oluşan pelete zarar vermeden dikkatli bir şekilde atıldı.
- Oda sıcaklığında %70'lik etil alkolden 500 l edildi.
- 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra yukarıda toplanan alkol atıldı.
- Tüpün dibinde kalan alkol de tamamen uçurulduktan sonra 100 l DNase-RNase free su ilave edildi.

Tüm DNA örnekleri analizlere alınıncaya kadar -20 ⁰C'de muhafaza edildi.

2.2.2.2.Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi

Kan örneklerinden genomik DNA'nın izole edildiğini gözlemlemek için %2,5'lik agaroz jel elektroforezi ile bulundu.

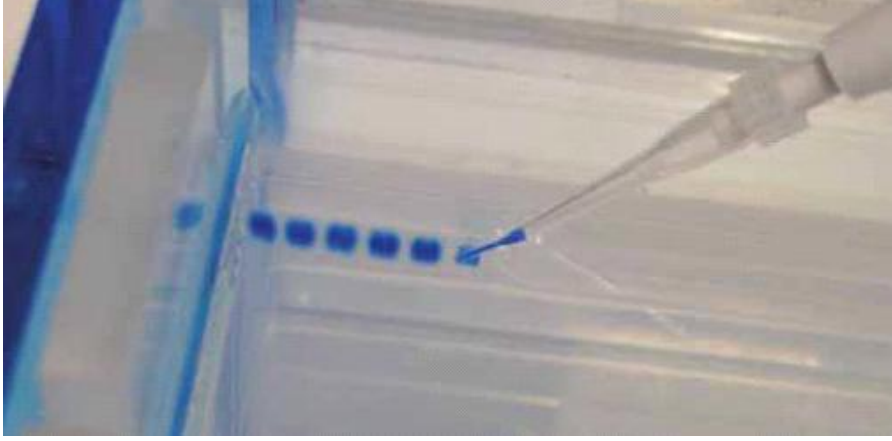
2.2.2.2.1.% 0,5'lik Agaroz Jel Hazırlanması

- 0.6 gr agaroz tartıldı ve 120 ml 1X TBE çözeltisi içerisinde çözüldü.
- Bir behere alınan bu çözelti ağzı alimünyum folyo ile kapatıldıktan sonra mikrodalga fırına alındı ve en yüksek seviyede kaynatıldı.
- Çözelti oda sıcaklığında 50–60 °C'ye düşünceye kadar bekletildi.
- Üzerine 10 l EtBr (10 mg/ml) eklendi ve çözelti rengi pembeleşinceye kadar çalkalandı.
- Kalıbın bariyerleri takıldı ve jel tarakları yerleştirildikten sonra agaroz jel kalıba döküldü. Jel kalıba dökülürken hava oluşan küçük hava kabarcıkları ise pipet ucu yardımıyla patlatıldı.
- Jelin katılaşması için oda sıcaklığında 30–45 dakika bekletildi.
- Taraklar ve bariyerler çıkarılarak kalıp elektroforez tankına yerleştirildi. Jel kuyucuklarının, yürüme tankının katot elektrot (-) tarafına yerleştirilmesine dikkat edildi.
- Jelin üzerini 2–3 mm kaplayacak miktarda tank içerisine 1X TBE çözeltisi eklendi.

2.2.2.2.2. Agaroz Jel'e Yüklemek İçin Örnek Hazırlanması ve Yürütme Koşulları

- 15 cm uzunluğunda parafilm kesilerek buz kalıbı üzerine yerleştirildi.
- 11 6X Jel Loading Buffer ve 5 l DNA örneği parafilm üzerine konuldu ve homojenizasyon için mikropipet yardımı ile yavaşça karıştırıldı.

- Toplam 6 l karışım dikkatli bir şekilde, jeli delmeden, jel kuyucuklarına Şekil 2.1’de gösterildiği gibi yerleştirildi



Şekil 2.1. Agaroz jel yükleme

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

2.2.2.3. PCR

TECHNE TC 512 Thermal Cycle cihazı ile PCR işlemi gerçekleştirildi (Şekil 2.2). İşlem sonrasında hedeflenen DNA bölgesi 2^{35} kez çoğaltıldı.



Şekil 2.2. PCR Cihazı

Her PCR analizinde kontrol amacıyla, pozitif ve negatif örnekler de kullanıldı. PCR işleminde kontaminasyonu önlemek amacıyla;

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

2.2.2.3.1 Primerler

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

2.2.2.3.2. PCR Bileşenleri ve PCR Programı

Standart bir PCR reaksiyonun da PCR Buffer, $MgCl_2$, dNTP karışımı, Hot Star Taq DNA Polimeraz, F Primer, R Primer ve DNA bileşenleri bulunmaktadır. Bileşenlerin konsantrasyonları, reaksiyona konulan miktarları ve final reaksiyon konsantrasyonları çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. PCR bileşenleri ile stoktaki ve reaksiyondaki konsantrasyonları

BİLEŞEN	STOK KONSANTRASYON	REAKSİYONA KONULAN MİKTAR	50 µl'lik Reaksiyon Karışımındaki Final Konsantrasyon
10 X PCR Buffer	10X	5 µl	1X
MgCl ₂	25 mM	3	1,5 mM
dNTP karışımı	2mM	5	200 µM
F Primer	20 pmol/ µl	1 µl	20 pmol
R Primer	20 pmol/ µl	1 µl	20 pmol
Hot Star Taq DNA Polimeraz	5 U/ µl	0,25 µl	1,25 U
DNA	-	-	~200 ng
Steril H ₂ O	-	Toplam 50 µl oluncaya kadar	-

PCR programı aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

Çizelge 2.2. PCR programı

SICAKLIK	ZAMAN (dk)
94 ⁰ C	5
94 ⁰ C	1 (denatürasyon)*
60 ⁰ C	1 (eşleşme)*
72 ⁰ C	1 (sentez)*
72 ⁰ C	5
4 ⁰ C	

*Bu üç işlem toplam 35 döngü yapıldı.

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

2.2.2.3.3. PCR Ürünü İçin Agaroz Jel Hazırlanması

PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. Bunun için 2.4 gr. agaroz tartılarak 120 ml 1XTBE içerisinde çözüldü ve bölüm 2.2.2.2.1'de yapıldığı şekilde işleme devam edildi. 7 µl PCR ürünü ile 1µl 6X Jel Loading Buffer karıştırılarak jel kuyucuklarına yüklendi. Her 6 numuneden sonra 100 bp DNA ladder'ı kullanıldı. 1µl DNA ladder'ı, 1µl 6X Jel Loading Buffer ve 6 µl distile su karıştırılarak yükleme yapıldı. Jel, 100 Volt ve 70 Amperde 1 saat yürütüldükten sonra sonuçlar UV ışığında, jel görüntüleme sistemi ile değerlendirildi.

2.2.2.4. PCR Ürününün RFLP Yöntemi ile Kesimi

Çalışmamızda, HFE H36D Tek Nükleotid Polimorfizmini belirlemek için amplifikasyon sonucunda oluşan PCR ürünü, MboI Restriksiyon enzimi ile kesildi. PCR ürününün RFLP yöntemi ile kesim işleminde negatif ve pozitif örnekler de kontrol amacıyla analizlere alındı.

2.2.2.4.1. MboI Enzim Özellikleri

Çalışma da Moraxella bovis bakterisinden elde edilen MboI restriksiyon enzimi kullanıldı.



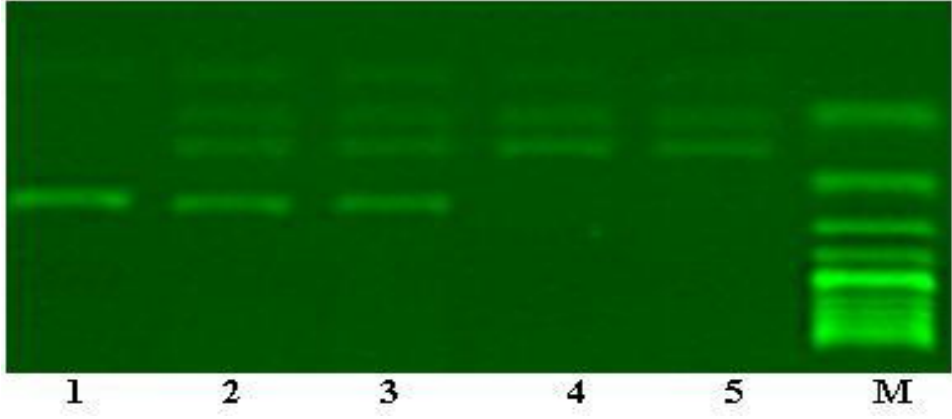
MboI enzimi 5 ucundan GATC 3 ucundan CTAG dizisini tanıyarak kesim işlemini gerçekleştirir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. MboI Restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu

BİLEŞEN	30 µl. lik Reaksiyon Karışımındaki Hacimleri
NEB4 Buffer	2 µl
<u>Bovine Seum Albumin (BSA)</u>	0,2 µl
MboI Enzim	1 µl
PCR ürünü	10 µl
dH ₂ O	30 µl'ye tamamlayıncaya kadar

2.2.2.4.2. MboI Enzim ile Kesim İşlemi

HFE H63D gen polimorfizm bölgesini kapsayacak şekilde çoğaltılan 294 bp'lik PCR ürünü, H63D tek nükleotid polimorfizmini belirlemek amacıyla; *MboI* enzimi ile 37 °C'de gece boyu inkübe edildi. Böylece, bu yürütme sonucunda *MboI* restriksiyon enzimi ile amplifiye edilen bölgenin kesimi sonucu HFE H63D gen polimorfizminin genotipleri (HH-homozigot tipik, HD-heterozigot, DD-homozigot atipik) jel görüntüleme cihazı ile UV ışık altında fotoğraflanarak jelde görüntülendi. Sonuç olarak, HH genotipli homozigot tipik bireylerde *MboI* enzimi 294 bp'lik bölgeyi 138, 99 ve 57 bp'lik olmak üzere üç oligonükleotid parçasına ayırmış olur. Bununla birlikte, DD genotipli homozigot atipik bireylerde *MboI* enzimi 294 bp'lik bölgeyi 237 ve 57 bp'lik olmak üzere iki oligonükleotid parçasına ayırmış olur. Ayrıca, HD genotipli heterozigot tipik bireylerde ise *MboI* enzimi 294 bp'lik bölgeyi homozigot tipik ve homozigot atipikler gibi keser, böylece 237, 138, 99 ve 57bp'lik olmak üzere dört oligonükleotid parçasına ayrılmış olur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. 294 bp’lık amplifikasyon ürününün MboI enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotid uzunlukları (M=100 bp Ladder; Lane 1, homozigot atipik (DD) 237,57bp, Lane 2 ve 3, heterozigot (HD) 237, 138, 99, 57bp, Lane 4 ve 5, homozigot tipik (HH) 138, 99, 57 bp

2.3. İstatiksel Analiz

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

Örneklem büyüklüğü göz önüne alındığında anlamlılık düzeylerinin belirlenebilmesi amacıyla parametrik özelliği taşıyan gruplarda “Student-T testi” kullanıldı. Ayrıca, kategorik veriler için ise X², sayılı veriler için Pearson testi uygulandı. Minimum güven düzeyleri %95 ($p < 0,05$) olarak belirlendi.

3. BULGULAR

Çalışmamızda anne plasenta ve kordon kanı örnekleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalında doğum yapan 93 gönüllü annelerden alınmıştır. Çalışılan bu örneklerden önce kanda kurşun düzeyleri ölçülmüş, daha sonra ise HFE gen polimorfizm ile ilişkisi için genetik yönden DNA incelemesi yapılmıştır.

3.1. Plasenta ve Biyolojik Örneklerin Değerlendirilmesi

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

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

	Toplam(N)	Minimum	Maksimum	Ortalama±Standart sapma
Yaş	93	18	40	29,53±4,80
Plasenta As Düzeyi (ppb)	93	3,51	25,21	8,80±3,75

3.2. HFE H63D Gen Polimorfizminin Genel Değerlendirmesi ve Hardy-Weinberg Dengesine Uygunluğunun Tespiti

Annelerden alınan venöz kanlarda yapılan genetik çalışmada, bireyler HFE H63D gen polimorfizmleri ile oluşan genotiplere göre gruplandırılmış ve toplam 93 bireye göre genotip ve alel frekansları hesaplanmıştır (Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3).

Çizelge 3.2. Bireylerin HFE H63D polimorfizmleri ile oluşan genotip frekansları.

Polimorfizmler		Genotip Frekansı (n=93)	
		n	%
HFE H63D	HH (Homozigot tipik)	70	75,3
	HD (Heterozigot)	22	23,6
	DD (Homozigot atipik)	1	1,1

Çizelge 3.3. Bireylerin HFE H63D gen polimorfizmi ile oluşan alel frekansları.

		Alel Frekansı (n=186)	
		n	%
Polimorfizmler			
HFE H63D	H	162	87,1
	D	24	12,9

Çalıştığımız popülasyondaki bireylerin HFE H63D gen polimorfizmi genotip frekansları, Hardy-Weinberg dengesine uygunluk göstermektedir ($p>0.05$) (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.4. HFE H63D gen polimorfizminin Hardy-Weinberg Dengesi

HFE H63D	Gözlenen	Beklenen	χ^2	P
HH	70	70,55	0,26	p>0,05
HD	22	20,90		
DD	1	1,55		
Toplam (n)	93	100		

3.3. HFE H63D Gen Polimorfizminin Plasenta Örneklerindeki Kurşun Düzeyleriyle Olan İlişkileri

Çalışmaya katılan kadınlara ait kan örneklerinden yapılan HFE H63D Gen polimorfizm varyantlarından homozigot atipik (D63D) genotipe sahip sadece bir örnek bulunmaktadır. İstatistiksel analizlerin yapılabilmesi açısından atipik örnek (D63D) ile heterozigot genotipe sahip bireyler (H63D) birleştirilmiştir. İstatistiksel analizler H63H (n=70) ve H63D+D63D (n=23) grupları arasında yapılmıştır. Plasenta örneklerindeki kurşun düzeyleri ile HFE H63D gen polimorfizminin genotipleri ile olan ilişkileri ‘Student T’ testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6).

Çizelge 3.5. Plasenta örneklerindeki kurşun düzeyleri ile HFE H63D gen polimorfizmi arasındaki ilişki.

Plasenta		HFE H63D			P
		HH	HD+DD	Toplam	
Pb (ppb)	N	70	23	93	0,001
	Ort.±S.S.	7,97±2,84	11,32±4,96	8,80±3,75	
	Min.	3,51	4,69	3,51	
	Maks.	17,42	25,21	25,21	

Çizelge 3.5’e göre, plasenta örneklerindeki kurşun düzeyleri ile HFE H63D gen polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmiştir (p<0,01). HFE homozigot tipik (H63H) genotipe sahip bireylerin plasenta örneklerindeki Pb düzeyi ortalama 7,97±2,84 ppb iken, heterozigot+homozigot atipik (H63D+D63D)

genotiplerine sahip bireylerin Pb düzeyi ortalama $11,32 \pm 4,96$ ppb olarak belirlenmiştir.

4. TARTIŞMA

Son yıllarda kurşunun çevresel ve mesleki risklerinden dolayı araştırılması oldukça önem kazanmıştır. Kurşunun ciddi olumsuz sağlık etkilerinden dolayı araştırmacılar, kurşun metabolizmasındaki genetik faktörlerin de kurşun birikimi üzerine etkilerini araştırmaya yönelmişlerdir.

Ankara Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilimdalı'nda doğum yapmış ve belirli bir metal maruziyetine matuz kalmayan 93 anne üzerinde yapılan bu çalışmada plasental kurşun düzeyleri ile maternal HFE gen polimorfizmi arasındaki ilişki araştırılmıştır. Anne kanından elde edilen DNA istenilen bölgeye göre kesim yapılarak HFE H63D polimorfizmi incelenmiştir. Buna göre 70 bireyde homozigot tipik (HH), 22 bireyde heterozigot (HD) ve 1 bireyde homozigot atipik (DD) genotipleri bulunmuştur. HD+DD'li annelerin plasentalarındaki kurşun konsantrasyonu $11,32 \pm 4,96$ ppb iken, HH'li bireylerde kurşun $7,97 \pm 2,84$ ppb olarak bulunmuştur. Polimorfik bireylerin plasenta kurşun düzeylerinin, homozigot tipik bireylere göre istatistiksel olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Türkiye'de HFE gen sıklıklarını belirlemek için sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır (Bozkaya ve ark., 2004). Farklı ülkelerde bu gen bölgesi ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Papazoglou ve arkadaşlarının 2003 yılında 264 erişkin Yunan'lı üzerinde gerçekleştirdiği HFE gen polimorfizmi çalışmalarında C282Y polimorfizmine hiç rastlanmamıştır. Bireylerin %16,2'sinde heterozigot H63D ve %0,75'inde ise homozigot H63D polimorfizmi olduğu saptanmıştır (Papazoglu ve ark., 2003).

Türkiye de kalıtsal hemokromatozis hastalığı ile HFE gen polimorfizmi arasında ilişki olup olmadığı ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. HFE C282Y ve H63D gen polimorfizimleri sekans yöntemi ile belirlenmiştir. Hemokromatozis hastaları üzerinde yapılan analiz sonucuna göre, hastaların tamamının H63D heterozigot genotipe sahip olduğu tespit edilmiştir (Simsek ve ark., 2005).

Choi ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptığı çalışma da 240 Koreli bireyde PCR-RFLP yöntemiyle C282Y ve H63D polimorfizm sıklıkları analiz edilmiştir. Araştırma da C282Y polimorfizmi bulunmazken, %7,5 seviyelerinde heterozigot H63D polimorfizmi olduğu tespit edilmiştir (Choi ve ark., 2002).

Al-Saleh ve arkadaşları 2011 yılında yaptığı çalışmada 1579 sağlıklı kadının plasenta dokusu, kordon kanı ve anne kanında kurşun, civa ve kadmiyum düzeylerini araştırmıştır. Katılımcıların yaşam stilleri, yaş, doğum ağırlığı, sigara içip-içmediği ile ilgili kriterler göz önünde bulundurularak veriler alınmıştır. Anne kanındaki kurşun seviyesi $2,897 \pm 1,851$ µg/dl; kordon kanında, $2,551 \pm 2,592$ µg/dl plasenta da ise $0,579 \pm 2,176$ µg/dl olarak bulunmuştur. Buna göre kurşun seviyesi ortalama değerlerine bakıldığında en çok anne kanında bulunmuştur (Al-Saleh ve ark, 2011). Bu çalışmadaki plasental kurşun düzeyi ise ortalama $0,880 \pm 0,375$ µg/dl olup, Al-Saleh ve arkadaşlarının Suudi Arabistan populasyonundaki bulduğu değerin üzerindedir.

Bradman ve arkadaşları 2001 yılında bazı etnik kökenlerdeki 319 çocukta kurşun düzeylerini ve ferritin seviyelerini araştırmış ve etnik gruplar arasında kurşun düzeyleri bakımından farklılık bulmuşlardır. 14 çocukta 10 µg/dl' den fazla bulunurken, Siyah ırk ve Asyalılar'ın kan kurşun ve ferritin seviyelerinin Hint ve Beyaz çocuklardan çok daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Çocuklardaki yaş farklılıkları ferritin ve kurşun seviyeleri ile ilişki bulunmamıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda demir eksikliği bulunan çocuklarda düşük ferritin ve yüksek kurşun düzeyleri olduğu bulunmuştur (Bradman ve ark., 2001). Bu çalışmada da demir eksikliği olan bireylerin kurşun toksisitesi açısından daha riskli olduğu gösterilmiştir.

Lewendan ve arkadaşları 2001 yılında Amerika'da davranışsal ve gelişim problemleri olan çocuklarda kan kurşun düzeylerini incelemiştir. Problemlili popülasyondaki 36 çocuğun kan kurşun seviyelerinin, normal popülasyondaki 139 çocuğun kan kurşun düzeylerine göre çok daha yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır. Davranışsal ve gelişim problemi olan çocuklardaki kan kurşun düzeyi ortalaması 40,7 µg/l iken

kontrol grubunda 29,2 µg/l olarak bulunmuştur (Lewendon ve ark., 2001). Bu çalışma, kan kurşun düzeyi yüksekliğinin çocuklarda zeka ve gelişimsel bozukluklara neden olduğunu göstermesi açısından önemlidir.

HFE geninin keşfi ile Hemakromatozis hastalarında demirin vücut içerisindeki potansiyel riskleri ortaya konulmuştur (Berglund ve ark., 1995). HFE geni ile demir ilişkisinin yanı sıra, bağırsaktaki kadmium ve kurşunun demire göre 1000 kat daha konsantrasyonda olduğu bulunmuştur. Buda demir ile toksik metallerin arasındaki yarışmanın varlığının açıkça belirtisidir (Vahter ve ark., 1991).

Baleria ve arkadaşları 2011 yılında yaptığı çalışmada anne ve cenindeki demir metabolizmasının düzenini araştırmışlardır. Hamilelik boyunca çocuğun demir seviyesini annedeki demir metabolizması ile sağlamıştır. Anne ve fetus'un Hfe, hepsidin ve diyetle alınan demiri Placentaldaki demir transferinde rol oynadığı saptanmıştır. Annenin karaciğerindeki demir seviyesi diyetle alınan demire ve HFE genotipine bağlıdır. Anne diyetle demir seviyesini arttırdığında cenindeki toplam demir seviyesinde artmış olur. Fakat HFE geni susturulmuş, annelerin ceninlerinde zamanla karaciğerdeki demir seviyesinin ve beraberinde plasentadaki Tfr1, Dmt1 ve Fpn' de arttığını görmüştür (Baleseria ve ark., 2012).

Hopkins ve arkadaşları 2008 yılında 422 meksikalı çocuk toplumunda HFE gen polimorfizmi, transferrin geni ve kan kurşun düzeylerini araştırmıştır. Toplumda demir eksikliği ve kurşun absorpsiyonu ile ilgili bir hipotez ortaya koymuş ve kan düzeylerinde kurşunun yüksek olacağı tahmininde bulunmuş. Kan kurşun düzeyleri 24, 30, 36, 42 ve 48. haftalarda ölçüm yapılmış ve HFE, Tf ve Hfe+Tf genotiplerini araştırmışlardır. Sonuç olarak, %17,7 , % 3,3 ve %18,9 H63D, C282Y ve TF P570S varyasyonları bulunmuştur. %1'i hem C282Y hemde TF P570S, %3 'ü ise hem H63D hemde TF P570S olduğu saptanmıştır. Kurşun değerleri bütün bu varyasyonlarda %10'nun üzerinde bulunmuştur. Bunun sonucunda demir metabolizmasının genetik varyasyonlarının kurşunun absorpsiyonunu artırdığı görülmüştür (Hopkins ve ark., 2008).

Vücut kurşun absorpsiyonu, demir yükü ile ters orantılıdır. Bu yüzden hemakromatozis geni ile kurşunun arasındaki ilişki kaçınılmazdır. Wright 2004 yılında vücut kurşun yükünün toplumda HFE ile ilişkili H63D ve C282Y varyasyonlarının ilişkisini incelemiştir. 2280 kişi erkekde DNA materyali analizi PCR/RFLP yöntem ile belirlenmiştir. 730 kişi de H63D ve C282Y genotipleri belirlenmiş, 35 kişide hiç genotip belirlenememiştir. Çalışma sonucunda C282Y türünde yabani-tipde %87,1, heterozigot %12,2, homozigot %0,7 olarak bulunmuştur. H63D türünde ise yabani tip %74,9, heterozigot %22,6, homozigot ise %2,5 olarak bulunmuştur. Çalışmada yaşlı erkek gruplarındaki HFE varyasyonlarının olduğu kişilerde kemik kurşun ve kan kurşun konsantrasyonlarında düşüş olması bekleniyordu. Bu varyasyonlar ise gastrointestinal kurşun emiliminin azalmasına neden olan HFE varyant taşıyıcıları arasındaki demir yükünün artması olarak nitelendirildi (Wright ve ark., 2004).

Akkenson ve ark. 2000 yılında yaptığı çalışma da yine bizim çalışmamıza benzer olarak HH'li toplumda demir ve kadminyum-kurşun absorpsiyonunu incelemiştir. Test, sigara içmeyen HH'li hastalarda flebotami ile kan örnekleme paralel olan demir, kurşun ve kadminyum incelenmesi yapılmıştır. HH artmış serum ferritin ve transferrin doygunluğu ile bilindiği için HFE polimorfizmi bulunmuştur. 21 kişinin 17'sinde homozigot C282Y polimorfizmi, 1 kişide homozigot H63D polimorfizmi bulunmuştur. Yüksek hemoglobin ve transferin doygunluğu olan HH'li hastalar, flebotomi grup ile karşılaştırılmış ve flebotomili grubun tedaviden dolayı serum ferritin değeri daha düşük bulunmuştur. Sağlıklı kontrol grubunda ise kandaki kadminyum ve kurşun düzeyleri aynı bulunmuş, fakat HH'li hastalarda kan kadminyum konsantrasyonu önemli derecede yüksek bulunmuştur. Flebotomi olmayan 3 kişide ise kan kurşun ve kadminyum değeri, kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur (Akkenson ve ark., 2000).

Barton ve arkadaşları HH'li hastalarda demir eksikliğine bağlı olarak kurşun absorpsiyonunda artış olduğunu öne sürmüştür. Homozigot 44 kişi, heterozigot 19 kişi, normal kontrol grubu 33 kişi, demir fazlalığı olan 8 kişi de kan kurşun seviyelerine AAS yöntemi ile bakılmıştır. HH'li homozigot hastalar, normal kontrol

grubuna göre kurşun düzeyleri ($5,6 \pm 0,6 \mu\text{g/dl}$) daha fazla bulunmuştur. Heterozigot HH ise homozigot ve normal kontrol grubun arasında çıkmıştır ($4,1 \pm 0,5 \mu\text{g/dl}$). Normal kontrol grubunda aşırı demir yükünde ise önemli bir farklılık gözlemlenmemiştir (Barton ve ark., 1994).

Yapılan çalışmalara göre Avrupa popülasyonlarında C282Y ve H63D polimorfizmlerinin birlikte bulunduğu heterozigot ve homozigot H63D polimorfizminin %2 seviyelerinde, heterozigot H63D polimorfizminin ise % 15-22 oranlarında olduğu belirtilmiştir (Barut ve ark., 2003).

Feder ve arkadaşlarının yaptığı ilk çalışmaya göre, 178 hastanın tipik hemokromatozis fenotipinde %83'nün C282Y polimorfizminin olduğu, %4'nün ise C282Y/H63D polimorfizminin bileşik heterozigot olduğu saptanmıştır (Feder J ve ark., 1996; Stephen ve Bruce, 2003; Limdi ve Crampton, 2004).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Metaller biyolojik proseslere katılmalarına göre essential ve noneessential olmak üzere iki grupta toplanır. Bakır (Cu), çinko (Zn) ve demir (Fe), vücutta hücrel fonksiyonları yerine getiren başlıca elementlerdendir. Demirin vücuttaki bazı reaksiyonları katalizlemesi, elektron alıp vermesi ile oksijen taşınması, enerji oluşturmaları gibi önemli görevleri olduğundan organizma için gerekli bir elementtir. Bunun yanı sıra nonessential elementler ise vücutta eser miktarda bulunması bile sağlık problemlerinin oluşması için yeterlidir. Civa (Hg), kadmium (Cd), kurşun (Pb) gibi vücut için gerekli olmayan elementlerin vücutta olması hücrel fonksiyonları bozar. Bazı elementlerin diğer elementlerle benzer özellik göstermesi, döngüde onun yerine geçebilmesi ve depolanması nedeniyle mutasyonlara sebep olmaktadır. Örneğin demir elementinin +2 değerlikteki formu ile kurşun benzer özellik göstermekte ve buda organizmada birbiri ile yarışa girmesine sebep olmaktadır.

Türkiye de kalıtsal hemokromatozis hastalığı ile HFE gen arasında ilişki olup olmadığı ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Literatürde yapılan çoğu çalışmadan farklı olarak HFE gen polimorfizmlerinin kurşun ile ilişkisi bu çalışmada aktarılmıştır. Çünkü HFE geni vücuttaki demirin bağlanmasında görev alırken, mutasyon sonucunda kurşun ile demirin yarış halinde olmasında kurşun-HFE gen ikilisinin araştırılması gerektiğini ortaya koymuştur.

Çalışmamızda, yeni doğum yapmış 93 gönüllü annenin genotipleri araştırılmış ve sonuç olarak,

1. %75,3 Homozigot tipik (HH)
2. %23,6 Heterozigot (HD)
3. %1,1 Homozigot atipik (DD) olarak bulunmuştur.

Annelerdeki polimorfizm allel frekansları ;

1. H allel n=162
2. D allel n=24

Annelerden alınan plasenta örneklerinde ise kurşun konsantrasyonu

1. HH'li (n=70) bireylerde Pb konsantrasyonu $Pb = 7,97 \pm 2,84$ ppb

2. HD+DD (n=23) bireylerde Pb konsantrasyonu $Pb = 11,32 \pm 4,96$ ppb

Genotip ve alel frekansları Hardy-Weinberg eşitliğine göre uygun bulunmuştur.

Çalışmadan elde edilen bilgilere göre, heterozigot ve homozigot atipik bireylerde plasental kurşun konsantrasyonları homozigot tipik bireylere göre daha fazla bulunmuştur. HFE H63D polimorfizmi ile demirin bağlanma affinitesi azalırken plasentada kurşunun konsantrasyonu artmıştır.

Hamilelik sırasında anneden fôtusa demir transferi anne dolaşımından fetal dolaşıma plasenta aracılığı ile gerçekleşmektedir. Annelerde HFE geni mutasyonlu ise anneden plasentaya gereksinim duyulan demir transfer edilmeyecektir. Demir ve kurşun arasındaki yarışmadan dolayı da demiri eksik olan plasenta ve fôtus da kurşun toksisitesine karşı daha riskli olacaktır. İlerideki çalışmalarda, plasenta kurşun düzeyleri yanı sıra, anne ve kordon kanındaki kurşun düzeyleri de çalışılarak aralarındaki ilişkinin HFE gen polimorfizmi açısından yorumlanması ve aydınlatılması faydalı olacaktır.

Bu çalışmanın sonucu olarak, anne adayları HFE gen polimorfizmlerine baktırabilir, kanlarındaki kurşun ve demir düzeylerini ölçtürebilirler. Bu sonuçlara göre, polimorfik ve demir düzeyi düşük olan annelerin kurşun düzeyleri de yüksek olabileceğinden, bebek sağlığı ve kendi sağlıkları açısından bir takım önlemler alabileceklerdir. Bu da tedavinin şekli ve dozunun değiştirilmesini etkileyecektir. Bu bireylerin demir eksikliklerini, farklı yollardan ve belki de yüksek dozlarda demir alarak tamamlayabilmeleri önerilmektedir.

Ayrıca anneler kurşuna maruz bir işte çalışıyorlarsa ve HFE genleri de polimorfik ise, demir eksikliği yaşayabilecekleri ve kurşuna daha hassas olabileceklerinden, en azından gebelik süresi boyunca maruziyete daha uzak bir birimde görevlendirilerek önlemler alınabilir. Sigara kullanmamaya ve sigara kullanılan ortamlarda bulunmamaya özellikle dikkat etmeleri önerilebilir.

Kurşunun vücutta birikmesi ve depolanması, okuma güçlüğü, hiperaktivite ve davranış sorunları, öğrenme hafif mental retardasyon, düşük zeka (IQ) ve dikkat dağınıklığı dahil olmak üzere çocuklarda nörogelişimsel toksisiteye neden olur. Kurşun maruziyeti kişiden kişiye değişkenlik gösterse de maruziyet en çok çocukları etkilemektedir. Çocukların maruziyeti aslında anne karnında başladığı açıkça görülmüştür.

ÖZET

Hemakromatozis (HFE) geni bir transmembran proteinidir. Bu gen $\beta 2$ mikroglobulinle etkileşime girer ve transferin reseptörüne (TR) bağlanarak intestinal demir emiliminin düzenlenmesinde görev almaktadır. HFE geni ayrıca plasentanın sinsitotrofoblast hücrelerinde sentezlenmektedir. Bu şekilde anne-fötüs arasındaki demir geçişi sağlanabilmektedir. HFE geninde birçok polimorfizmden söz edilmektedir. Bunlardan en çok karşılaşılanı H63D ve C282Y polimorfizmleridir.

Çalışmada yeni doğum yapmış 93 annenin kan örneği ve plasenta örnekleri kullanılmıştır. Annelerin kan örneklerindeki H63D gen polimorfizmi belirlenerek plasenta kurşun düzeyleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışma grubumuzdaki 93 annenin H63D tek nükleotid gen polimorfizmi frekansı, %75,3 homozigot tipik (HH), %23,6 heterozigot (HD) ve %1,1 homozigot atipik (DD) olarak belirlenmiştir. HH genotipine sahip 70 annenin plasentalarındaki kurşun düzeyi $7,97 \pm 2,84$ ppb iken, HD+DD genotipine sahip 23 annenin plasentalarındaki kurşun düzeyi $11,32 \pm 4,96$ ppb olarak tespit edilmiştir. HFE geni polimorfik olan annelerin plasentalarındaki kurşun düzeyindeki bu yüksekliğin, fetusları da kurşun toksisitesine karşı daha riskli duruma getireceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler : HFE gen polimorfizmi, kurşun, maternal kan, plasenta

SUMMARY

Hemachromatosis (HFE) gene is a transmembrane protein. This gene interacts with $\beta 2$ microglobulin and plays role in regulation of absorbing intestinal iron by linking up transiron receptor (TR). Hfe gene is also expressed cells sinsitotrofoblast in the placenta. Iron transport is provide between mother and fetus in this way. It is mentioned many polymorphism in HFE gene. The most seen polymorphism are H63D and C282Y.

In this study, new given birth 93 mother's placenta and blood samples were used. H63D gene polymorphism of mother's blood samples was determined and the relationship between placental lead levels have investigated. In our study group of 93 mothers frequency of H63D single nucleotides polymorphism, it is determined that 75,3% homozygote typical (HH), 26,3% heterozygote (HD), 1,1% homozygote atypical(DD). While 70 mothers with HH have level of $7,97 \pm 2,84$ ppb placental lead, 23 mothers with HD+DD have level of $11,32 \pm 4,96$ ppb placental lead. Mothers who have polymorphic hfe gene have high level of lead in their placenta, thinking of this high level, fetus will be more risky situation face to lead toxicity.

Key words: HFE gene polimorfizm, lead, maternal blood, placenta

KAYNAKLAR

- AKESSON, A., STAL, P., VAHTER, M. (2000). Phlebotomy increases cadmium uptake in hemochromatosis. *Enviromental health perspectives*. **108**(4) : 289-291.
- AL-SALEH, I., SHINWARI, N., MASHHOUR, A., EL DIN MOHAMED, G., RABAH., A. (2011). Heavy metals (lead, cadmium and mercury) in maternal, cord blood and placenta of healty women. *International Journal of Hygiene and Enviromental Health*. **214**: 79-101.
- ANDREWS, N.C., LEVY, J.E. (1998). Iron is hot: an update on the pathology of hemochromatosis. *Blood* 92:1845-1851.
- BACON, B.R., POWELL, L.W., ADAMS, P.C. (1999) . Molecular medicine and hemochromatosis at the crossroads. *Gastroenterology* ;**116**:193-207.
- BACON, B.R., SADIQ, S.A. (1997) . Hereditary hemochromatosis: Presentation and diagnosis in the 1990s. *Am J Gastroenterol*. **92**:784-9.
- BAILES, S.M., DEVERS, J.J., KIRBY, J.D., RHOADS, D.D. (2007). An inexpensive, simple protocol for dna isolation from blood for high-throughput genotyping by polymerase chain reaction or restriction endonuclease digestion. *Poultry Sci*. **86**, 102–106.
- BALESERIA, S., HANIF, R., SALAMA, M., RAJA, K., BAYELE, H., McARDLE, H., SRAI, K.S. (2012). Fetal iron levels are regulated by maternal and fetal Hfe genotype and dietary iron. *Haematologica*. **97**(5): 661-669.
- BARTON, J.C., PATTON, M.A., EDWARDS, C.Q., GRİFFEN, L.M., KUSHNER, J.P., MEEKS, R.G., LEGGETT, R.W. (1994). Blood lead concentrations in hereditary hemochromatosis. *J Lab Clin Med* **124**:193-198.
- BASCLAIN, K.A., SHILKIN, K.B., WITHERS, G., REED, W.D., JEFFREY, G.P. (1998). Cellular expresssion and regulation of iron transport and storage proteins in genetic haemochromatosis. *J Gastroenterol Hepatol* **13**:624-634.
- BEUTLER, E., LICHTMAN, M.A., KIPPS, T.J., SELIGSOHN, U., KAUSHANSKY, K., PRCHAL, J.T. (2006). Williams Hematology, 7 nd Ed.New York: *McGraw-Hill*.511-553
- BERGLUND, M., AKESSON, A., NERMELL, B., VAHTER, M. (1994). Intestinal absorption of dietary cadmium in women depends on body iron stores and fiber intake. *Environ Health Perspect* 102:1058-1066.

- BIGERSSON, B., STERNER, O., ZIMERSON, E. (1988). Chemie und Gesundheit Eine Verst 2ndliche Einföhrung in die Toxikologie. VCHVerlagsgesellschaft. 3-527-26455-8.
- BOYER, H.W.. (1971). DNA restriction and modification mechanisms in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **25**: 153–76.
- BRADMAN, A., ESKENAZI, B., SUTTON, P., ATHANASOULIS, M., GOLDMAN, L. (2001). Iron deficiency associated with higher blood lead in children living in contaminated enviroments. *Children's healt articles.* **10**: 1079-1089.
- BRITTENHAM, G., HOFFMAN R., BENZ E., SHATTIL S., FURIE B., COHEN H., SILBERSTEIN, L., McGLAVE, P. (2000). Disorders of iron metabolism: iron deficiency and overload. In *Hematology, Basic Principles And Practice 3 nd Ed.* New York Copyright. 397-428.
- BURT, M.J., GEORGE, P.M., UPTON, J.D., COLLETT, J.A., FRAMPTON, C.M., CHAPMAN, T.M., WALMSLEY, T.A., CHAPMAN, B.A. (1998). The significance of haemochromatosis gene mutations in the general population: implications for screening. *Gut* **43**:830-836.
- CAMASCHELLA, C., DE GOBBI, M., ROETTO, A. (2000) Hereditar hemochromatosis: Progress and perspectives. *Rev Clin Exp Hematol.* **4**:302-21.
- CLARKSON, T.W. (1993). Molecular and ionic mimicry of toxic metals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, **33**:545-71.
- DE DOMENICO, I., WARD, D.M., KAPLAN, J. (2007). Hecpidin regulation: ironing out the details. *J Clin Invest* **117**;2:1755-8.
- DOWLING, T.E., MORITZ, C., PALMER, J.D., RIESEBERG, L.H. (1996). Nucleic acids III: analysis of fragment and restriction sites. *Molecular Systematics*, **88** (9): 249-320.
- DRYDEN, D.T., MURRAY, N.E., RAO, D.N. (2001). Nucleoside triphosphate dependent restriction enzyonmes. *Nucleic Acids Res.* **29** (18): 3728–41
- EATON, J.W., QIAN, M. (2002). Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radic Biol Med* **32**:833–840.
- ERLICH, H.A., GELFAND, D.H. and SNINSKY, J.J. (1991). Recent advences in polymerase chain reaction. *Science.* **252**:1643-1650.
- FLEMING, M.D., TRENOR, C.C., SU, M.A. (1997). Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet.* **16**(4):383-6.

- FEDER, J.N., GNIRKE, A., THOMAS, W. (1996) . A novel MHC class-1 like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nat Genet.***13**(4): 399-408.
- FLEMING, R.E., BACON, B.R. (2005). Orchestration of Iron Homeostasis. *NEngl J. Med.* **352**:1741-4.
- FLEMING, R.E., MIGAS, M.C., ZHOU, X.Y., JIANG, J.X., BRITTON, R.S., BRUNT, E.M., TOMATSU, S., WAHEED, A., BACON, B.R., SLY, W.S. (1999). Mechanism of increased iron absorption in murine model of hereditary hemochromatosis: increased duodenal expression of the iron transporter DMT1. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:3143-3148.
- GANZ, T. (2004). Hepcidin in iron metabolism. *Current Opinion in Hematology.* **11**(4):2514.
- GANZ, T. (2006). Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* **507**:29-35.
- GOODNOUGH, L.T., NEMETH, E., GANZ, T. (2010). Detection, evaluation, and management of iron-restricted erythropoiesis. *Blood* **116**:4754-61.
- GOYER, R.A. (1997). Toxic and essential metal interactions. *Ann. Rev. Nutr.*, **17**:37-50.
- GOYER, R.A., CHERIAN, M.G., JONES, M.M. (1995). Role of chelating agents for prevention, intervention, and treatment of exposures to toxic metals. *Environ. Health Perspect.*, **103**:1048–52.
- GOYER, R.A., EPSTEIN, S., BHATTACHARYYA, M., KORACH, K.S., POUNDS, J. (1994). Environmental Risk Factors for Osteoporosis. *Environmental Health Perspectives.* **102**(4):390-394.
- GRANDJEAN, P. (1992). Health significance of metals- lead. *Maxcy-Rosenau-Last Public Health and Preventive Medicine.*Ed. Last JM, Wallace RB. **13**: 389-391.
- GROSS, C.N., IRRINKI, A., FEDER, J.N., ENNS, C.A. (1998). Co-trafficking of HFE, a nonclassical major histocompatibility complex class protein, with the transferrin receptor implies a role in intracellular iron regulation. *J Biol Chem* **273**:22068-22074.
- HALLBERG, L., ROSSANDER, L. (1982). Effect of Different Drinks on the Absorption of Nonheme Iron from Composite Meals. *Human Nutr Appl Nutr.* **36A**:116-123.
- HOPKINS, M., S ETTINGER, A., HERNANDEZ AVILA, M., SCHWARTZ, J., TELLEZ-ROJO, M.M., LAMADRID FIGUEROA, H., BELLINGER, D., HU, H., O.WRIGHT, R. (2008). Variants in iron metabolism genes predict higher blood lead levels in young children. *Children's health.* **116**:1261–1266.

- HORVATHOVA, M., PONKA, P., DIVOKY, V. (2010). Molecular basis of hereditary iron homeostasis defects. *Hematology*. **15**(2):96-111.
- INNIS, M.A. and GELFAND, D.H.. (1990). Optimization of PCR protocols A guide to methods and applications. *Academic Press*. 3-12.
- KAYAALTI, Z., TEKIN, D., ALIYEV, V., YALÇIN, S., KURTAY, G., SÖYLEMEZOĞLU, T. (2011). Effects of the Interleukin-6 (IL-6) Polymorphism on Metal and Trace Element Levels in Placental Tissues. *Science of the Total Environment (Elsevier Inc)*, **409**(2011):4929-4933.
- KUBISTA, MANDRADE, J.M., BENGTSSON, M., FOROOTAN, A., JONÁK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJÖBACK, R., SJÖGREEN, B., STRÖMBOM, L., STÅHLBERG, A., ZORIC, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects MeD*. **27**(2-3):95-125.
- LAHIRI, D.K., BYE, S., NURNBERGER, J.I., HODES, M.E., CRISP M. (1992). A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. *J Biochem Bioph Met*. **25**, 193–205.
- LEWENDON, G., KINRA, S., NELDER, R., CRONIN, T. (2001). Should children with developmental and behavioural problems be routinely screened for lead? *Arch Dis child*. **85**:286-288.
- MONSEN, E.R. (1988). Iron nutrition and absorption: Dietary factors which impact iron bioavailability. *J Am Diet Assoc* **88**:786-790.
- MURRAY, N.E. (2000). Type I restriction systems: sophisticated molecular machines a legacy of Bertani and Weigle. *Microbiol Mol Biol Rev*. **64**(2):412-434.
- NIEDERAU, C., FISCHER, R., PURSCHEL, A. (1996) . Long term survival in patients with hereditary haemochromatosis. *Gastroenterology*. **110**:1107.
- OSKI, F.A., NAIMAN, J.L. (1982). Hematologic problems in the newborn. Third edition. *Major problems in clinical pediatrics*. **4**(1):1-360.
- ÖZDEMİR, S. (2007) . Metabolik Karaciğer Hastalıkları. İstanbul Cerrah Paşa Tıp Fakültesi
- PAPAZOĞLOU D, EXIARA T, SPELETAS M, PANAGOPOULOS I, MALTEZOS E (2003). Prevalence of hemochromatosis gene (HFE) mutations in Greece. *Acta Haematol*. **109**(3):137-40.
- PERCING, H.D. (1991) polymerase Chain reaction: Trenches to benches. *J Clin Microbial*. **29**: 1281-1285.

- PHILLIP, A.T., GERSON, B. (1994). Lead poisoning – Part I. Incidence, etiology, and toxicokinetics. *Clin. Lab. Med.* **14**:423-444.
- PIETRANGELO, A. (2006). Hereditary Hemochromatosis. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1763** (7): 700–710.
- POUNDS, J.G., LONG, G.J., ROSEN, J.F. (1991). Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environ Health Perspect.* **91**:17-32
- PRIMROSE, S.B., OLD, R.W. (1994). Principles of gene manipulation: an introduction to genetic engineering. *Oxford: Blackwell Scientific.*
- ROBERTS, R.J. (2005). How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- SAMSON, F.E., NELSON, S.R. (2000). The aging brain, metals and oxygen free radicals. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **46**:699–707.
- SHELDON, J.H. (1935) . Haemochromatosis. London, Oxford University Press.
- SIX, K.M., GOYER, R.A. (1970). Experimental enhancement of lead toxicity by low dietary calcium. *J Lab Clin Med* **76**:933-942.
- SKERFVING, S., BERGDAHL, I.A., NORDBERG, G.F., FOWLER, B.A., NORDBERG, M., FRIBERG, L. (2007). Handbook on the Toxicology of Metals, 3rd ed . Academic Press, Inc., USA, SWEEDEN,. Chapter:31
- SKOOG, D.A., HOLLER, F.J., NIEMAN, T.A. (1997). Enstrümental Analiz İlkeleri, 5th. Ed., Bilim Yay. Skoog West Holler, Analitik Kimya C.II, Bilim Yay. 1999.
- WATSON, J.D., GILMAN, M., WITKOWSKI, J. and ZOLLER, M. (1992). The polymerase chain reaction In: Recombinant DNA. *Second Edition. New York.* 79-98.
- WEST, A.R, OATES, P.S. (2008). Mechanisms of heme iron absorption: current questions and controversies. *World J Gastroenterol.* **14**:4101-10.
- WILSON, I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3741-3751.
- WILLIAMS, R.J.. (2003). Restriction endonucleases: classification, properties, and applications. *Mol. Biotechnol.* **23**:20-25.

- WRIGHT, R.O., TSAIH, S.W., SCHWARTZ, J., WRIGHT, R.J., HU, H. (2003) Association between iron deficiency and blood lead level in a longitudinal analysis of children followed in an urban primary care clinic. *J Pediatr* **142**:9-14.
- WRIGHT, R., K.SILVERMAN, E., SCHWARTZ, J., TSAIH S., SENTER, J., SPARROW, D., WEISS, S., ARO, A., HU, H. (2004). Association between hemochromatosis genotype and lead exposure among elderly men:the normative aging study. *Enviromental medicine*. **6**:740-750.
- WHO. (1995) Environmental Health Criteria 165- InorganicLead. Geneva.
- WHO. (1992) Major poisoning episodes from environmental chemicals. Geneva 3-15.
- VAHTER, M., BERGLUND, M., LIND, B., JORHEM, L., SLORACH, S., FRIBERG, L. (1991). Personal monitoring of lead and cadmium exposure-a Swedish study with special reference to methodological aspects. *Scand J Work Environ Health* **17**:65-74.
- VAN DER AA, E.M., COPIUS PEEREBOOM-STEGEMAN, J.H.J., NOORDHOEK, J., 1 GRIBNAU, F.W.J., RUSSEL, F.G.M. (1998). Mechanisms of Drug Transfer Across the Human Placenta. *Pharm World Sci.*, **20**(4):139-148.
- VURAL, N. (1984). Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:56, Ankara. s.: 28-29, 47, 315-324.
- YAPICI, G., CAN, G., KIZILER, A.R., AYDEMİR, B., TIMUR, I.H. (2006). Childhood lead and cadmium exposure in a coal mining area in Yatagan, Turkey. *Children's Enviromental Health in Central Asia, Almaata, Kazakistan*. 216-217.
- ZEEV, B. (1994) . Determination of Trace Elements, VCH
- ZOLLER, H., PIETRANGELO, A., VOGEL, W., WEISS, O. (1999). Duodenal metaltransporter DMT-1, NRAMP-2 expression in patients with hereditary haemochromatosis. *Lancet* **353**:2120-2123.

**KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KURULU
DEĞERLENDİRME FORMU**

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

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Metallerin toksikokinetiğinde rol oynayan enzim ve proteinlerin gen polimorfizminin anne biyolojik örnekleri, plasenta ve kordon kanında metal düzeylerine etkisi		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU			
	EUDRACT NUMARASI			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Tülin Söylemezoğlu		
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Toksikoloji		
	KOORDİNATORUN UNVANI/ADI/SOYADI			
	KOORDİNATORUN UZMANLIK ALANI			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü		
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ			
	BAŞVURULAN DEĞERLENDİRME KOMİSYONUNUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Değerlendirme Kurulu		
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ			
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☒	
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1 ☐	FAZ 2 ☐	FAZ 3 ☐
		FAZ 4 ☐	BE/BY ☐	DİĞER ☐
	İLAC DIŞI ARAŞTIRMA ☐	DİĞER ise belirtiniz:		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐ ULUSLARARASI ☐	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	SİGORTA	☐	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER	☐	

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

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

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof.Dr.Mehmet Melli	Tıbbi Farmakoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	M. Melli
Prof.Dr.Cihan Yurdaydın	Gastroenteroloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	C. Yurdaydın
Prof.Dr.Ahmet Demirkazık	Tıbbi Onkoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	A. Demirkazık
Prof.Dr.Tanju Özçelikay	Eczacı-Farmakolog	Ankara Üniv. Ecz. Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	T. Özçelikay
Prof.Dr.Cem Atbaşoğlu	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐	C. Atbaşoğlu
Prof.Dr.Hakan Uncu	Genel Cerrahi	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	H. Uncu
Prof.Dr.Nuhan Puralı	Biyofizik	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	N. Puralı
Prof.Dr.H.Serdar Öztürk	Tıbbi Biyokimya	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	H. Öztürk
Prof.Dr.H.Serap Sivri	Çocuk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	H. Sivri
Prof.Dr.Muharrem Özen	Avukat-Öğr.Üyesi	Ankara Üniv. Hukuk Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	M. Özen
Prof.Dr.Banu Çakır	Halk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	B. Çakır
Öğr.Gör.Dr.Volkan Kavas	Deontoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	V. Kavas
Gülsüm Aslan	Sağlık Mes. Dışı- Emekli	-----	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	G. Aslan

* :Araştırma ile ilişki
 ** :Toplantıda Bulunma

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

ASLI GİBİDİR

ÖZGEÇMİŞ

1-Bireysel Bilgiler

Adı : Sinem
Soyadı : ÜNAL
Doğum yeri ve tarihi : ANKARA – 22.06.1988
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu : Evli
İletişim adresi ve telefonu : 15.cad no: 9/9 Basınevleri / ANKARA 05445034607

II- Eğitim

2011 – Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü, Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Yüksek Lisans
2006 - 2010 Muğla Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü
2001 - 2005 İncirli Lisesi

III – Mesleki Deneyim

06/2007 – 08/2007 DSİ / TAKK Laboratuvar (staj)
11 / 2011- 04/2013 Pınar Kimya Ürün Danışmanı
05/2013 – 02/2014 Stenkim Yapı Kimyasalları Kalite Kontrol Uzmanı
04/2014 - Atlas CRO Site Coordinator