

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KURŞUN MARUZİYETİNİN VE ŞELASYON TEDAVİSİNİN
TOKSİSİTEYİ ETKİLEYEN BAZI PARAMETRELER ÜZERİNE
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Ecz. Aslı DİNÇER

**Farmasötik Toksikoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2023

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KURŞUN MARUZİYETİNİN VE ŞELASYON TEDAVİSİNİN
TOKSİSİTEYİ ETKİLEYEN BAZI PARAMETRELER ÜZERİNE
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Ecz. Aslı DİNÇER

**Farmasötik Toksikoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU**

**ANKARA
2023**

ONAY SAYFASI**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ****KURŞUN MARUZİYETİNİN VE ŞELASYON TEDAVİSİNİN TOKSİSİTEYİ
ETKİLEYEN BAZI PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ****Öğrenci: Uzm. Ecz. Aslı DİNÇER****Danışman: Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU**

Bu tez çalışması 06/01/2023 tarihinde jürimiz tarafından “Farmasötik Toksikoloji
Doktora Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Ayşe Nurşen BAŞARAN*
(Başkent Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Yalçın DUYDU*
(Ankara Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç. Dr. Gözde GİRGİN*
(Hacettepe Üniversitesi)

ONAY

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

20 Ocak 2023

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

O Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾

O Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾

O Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

06 /01/2023

Aslı DİNÇER

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Uzm. Ecz. Aslı DİNÇER

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca heyecanıma ortak olan, değerli bilgileriyle bana yol gösteren, çalışmalarımnda beni cesaretlendiren sevgili danışman hocam Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU'na,

Doktora eğitimime başlamak üzere beni teşvik eden ve her zaman örnek aldığım değerli hocam Prof. Dr. Belma KOÇER GÜMÜŞEL'e,

Toksikoloji eğitimimde bana katkı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. HİLAL ÖZGÜNEŞ'e,

Eğitimimim her aşamasında bana katkıda bulunan Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine,

Değerli tecrübelerini ve bilgilerini benimle paylaşan Prof. Dr. Ayşe ERCAN'a,

Dr. Ecz. Serdar ÇETİNKAYA'ya, Uzm. Dr. Türkan Nadir ÖZİŞ'e,

Deneylerimizi büyük bir özveri ile birlikte yürüttüğümüz sevgili arkadaşım Uzm. Ecz. Tuğçe ÇETİN'e,

Tüm eğitim ve öğretim hayatım boyunca her koşulda sonsuz desteklerini sunan sevgili anneme, babama ve kız kardeşime,

Son olarakta, sevgili eşim Emre ve oğlum Ali Cumhur DİNÇER'e tüm zamanlardaki anlayışları ve destekleri için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu doktora tezini, ilham olmak üzere bu yıl ilkokul hayatına merhaba diyen biricik oğluma ithaf ederim.

ÖZET

Dincer, A. Kurşun Maruziyetinin ve Şelasyon Tedavisinin Toksisiteyi Etkileyen Bazı Parametreler Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2023. Kurşun (Pb), ülkemiz ve dünya endüstrisinde yaygın olarak kullanılan ve önemli toksik etkileri bulunan bir ağır metaldir. Pb maruziyetinde kullanılan önemli şelasyon ajanlarından birisi sodyum kalsiyum EDTA'dır. Bu tez çalışmasında, Pb toksisitesini gösteren bazı parametreler ve esansiyel element düzeyleri üzerine uygulanan şelasyon tedavisinin etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Pb maruziyeti olan 42 işçiden şelasyon tedavisi öncesinde ve sonrasında kan ve idrar numuneleri toplanmıştır. Esansiyel elementler, oksidatif stres parametreleri (malondialdehit (MDA), protein karbonil (CO), 8-hidroksi-deoksi-guanozin (8-OHdG)) düzeyleri, antioksidan enzimlerin (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx)) aktiviteleri, glutatyon (GSH) düzeyleri, ALAD enzimi aktivitesi ve polimorfizmi çalışılmıştır. Pb'ye bağlı indüklenmesi olası apoptozun şelasyon tedavisi ile değişimi de kaspaz-8 düzeyleri ölçülerek değerlendirilmiştir. Pb'ye maruz kalan işçilerde uygulanan şelasyon tedavisinin kalsiyum, bakır, mangan ve selenyum düzeylerinde anlamlı azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, artan oksidatif stres parametrelerinin ve kaspaz-8 düzeylerinin şelasyon tedavisi sonrası genel olarak azaldığı, bununla birlikte antioksidan enzim aktivitelerinde artış, ALAD düzeylerinde de anlamlı bir yükselme olduğu belirlenmiştir. Çalışma grubunda, 36 işçide ALAD₁₋₁, 5 işçide ALAD₁₋₂, 1 işçide ALAD₂₋₂ izozimi belirlenmiştir. Sonuç olarak, Pb maruziyetine bağlı olarak oluşan oksidatif hasar ve apoptozun geri çevrilmesinde şelasyon tedavisinin etkili olduğu bulunmuştur. Esansiyel element düzeylerindeki azalmaya karşı gıda takviyesi kullanılabileceği değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: kurşun, şelasyon, esansiyel element, oksidatif stres, ALAD, polimorfizm

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje no: TSA-2017-14407.

ABSTRACT

Dincer, A. Evaluation of the Effect of Lead Exposure and Chelation Therapy on the Factors Affecting the Toxicity. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Thesis of Doctorate of Science in Pharmaceutical Toxicology, Ankara, 2023. Lead (Pb) is a heavy metal with substantial toxic properties which is broadly used across industries in Turkey and around the world. Sodium calcium EDTA is an important chelation agent used in the treatment. In this dissertation study, we assessed effects of the chelation therapy used on certain Pb toxicity-indicating parameters and on essential element levels. Blood and urine samples were collected from 42 workers with Pb exposure before and after chelation therapy, and the essential element levels, oxidative stress parameters (malondialdehyde (MDA), protein carbonyl (CO), 9-hydroxy-deoxy-guanosine (8-OHdG)) levels, activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx)), glutathione (GSH) levels, ALAD enzyme activity and polymorphism were evaluated. Also, caspase-8 levels were measured to assess the modification of apoptosis –possibly induced by Pb– by chelation therapy. The chelation therapy used resulted in significant reduction of calcium, copper, manganese and selenium levels in workers exposed to Pb. Also, the oxidative stress parameters and caspase 8 levels that were elevated after chelation therapy generally receded, but we observed increased antioxidant enzyme activity and a significant elevation of ALAD levels. In the aforementioned study group, ALAD₁₋₁ in 36 workers, ALAD₁₋₂ in 5 workers, and ALAD₂₋₂ isozymes in 1 worker were found. In conclusion, chelation therapy was effective in reversing apoptosis and oxidative damage caused by Pb exposure. We consider that supplements can be used to address the reduction in essential element levels.

Key words: lead, chelation, essential element, oxidative stress, ALAD, polymorphism

This thesis is supported by Hacettepe University Scientific Projects Coordination Unit Fund. Project no: TSA-2017-14407.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xvii
TABLOLAR	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kurşunun Genel Özellikleri ve Tarihçesi	3
2.1.1. Kurşunun Fizikokimyasal Özellikleri	3
2.1.2. Kurşuna Maruziyet Yolları	5
2.1.3. Kurşunun Toksikokinetik Özellikleri	10
2.1.4. Kurşunun Toksisite Mekanizması	14
2.2. Kurşun Maruziyetinin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri	15
2.2.1. Kurşunun Hematolojik Sistem Üzerindeki Toksik Etkileri	18
2.2.2. Kurşun Toksisitesi ve ALAD Enzimi Polimorfizmi	21
2.2.3. Kurşunun Nörolojik ve Nörotoksik Etkileri	24
2.2.4. Kurşunun Renal Sistem Üzerindeki Toksik Etkileri	26
2.2.5. Kurşunun Gastrointestinal Sistem Üzerindeki Toksik Etkileri	27
2.2.6. Kurşunun İmmün Sistem Üzerindeki Toksik Etkileri	27
2.2.7. Kurşunun Üreme Sistemi Üzerindeki Toksik Etkileri	29
2.2.8. Kurşunun Kardiyovasküler Sistem Üzerindeki Toksik Etkileri	31
2.2.9. Kurşun ve Karsinojenite	34
2.3. Kurşun Maruziyeti ile Oksidatif Stres İlişkisi	35
2.4. Kurşun Zehirlenmesinde Uygulanan Tedavi Yaklaşımları	39
2.5. Kurşun Maruziyetinin ve Şelasyon Tedavisinin (CaNa ₂ EDTA) Esansiyel Elementler Üzerine Etkisi	41

3. GEREÇ VE YÖNTEM	47
3.1. Kullanılan Kimyasallar Maddeler	47
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	48
3.3. Hazırlanan Çözeltiler	50
3.3.1. Esansiyel Element Düzeylerinin Tayininde Kullanılan Standartların Hazırlanması	50
3.3.2. İnsan Aminolevulinat Delta Dehidrataz (ALAD) Miktar Analizinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	51
3.3.3. ALAD Enzim Polimorfizmi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	52
3.3.4. Plazmada Bulunan Glutasyon Miktar Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	54
3.3.5. Plazmada Bulunan Glutasyon Peroksidaz Miktar Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	55
3.3.6. Katalaz Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler	56
3.3.7. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler	56
3.3.8. Malondialdehit Düzeylerinin Tayininde Kullanılan Çözeltiler	56
3.3.9. Protein Karbonil (CO) Düzeylerinin Tayininde Kullanılan Çözeltiler	57
3.3.10. 8-hidroksi-deoksiguanozin (8-OhdG) Düzeylerinin Tayininde Kullanılan Çözeltiler	58
3.3.11. Kaspaz-8 Düzeylerinin Tayininde Kullanılan Çözeltiler	59
3.3.12. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler	60
3.4. Çalışma Grubunun Seçimi ve Demografik Özellikleri	60
3.5. Kan ve İdrar Örneklerinin Toplanması ve Saklanması	61
3.6. Esansiyel Element Düzeylerinin Ölçülmesi	62
3.7. Aminolevulinat Delta Dehidrataz (ALAD) Enzim Düzeylerinin Ölçülmesi	63
3.8. ALAD Enzim Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi ile Analizi	65
3.9. Plazma Glutasyon (GSH) Düzeylerinin Ölçülmesi	70
3.10. Plazma Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Düzeylerinin Ölçülmesi	71
3.11. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçülmesi	73
3.12. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Ölçülmesi	73
3.13. Plazma Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Ölçülmesi	74

3.14. Plazma Protein Karbonil (CO) Düzeylerinin Tayini	75
3.15. Deoksiguanozin (8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, 8-OHdG) Düzeylerinin Tayini	77
3.16. Kaspaz-8 Düzeylerinin Tayini	78
3.17. Protein Miktar Tayini	82
3.18. Çalışma Grubunun Klinik Parametrelerinin Değerlendirilmesi	83
3.19. İstatiksel Analiz	83
4. BULGULAR	84
4.1. Hastalara ait Demografik Bulgular	84
4.2. İşçilerin Kurşun Düzeyleri	86
4.3. İşçilerin Esansiyel Element Düzeyleri	87
4.4. Aminolevulinat Delta Dehidrataz (ALAD) Enzim Düzeyleri	93
4.5. Aminolevulinat Delta Dehidrataz (ALAD) Enzim Gen Polimorfizminin Değerlendirilmesi	94
4.6. Glutasyon (GSH) Düzeyleri	96
4.7. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesi	97
4.8. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi	98
4.9. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi	100
4.10. Malondialdehit (MDA) Düzeyleri	101
4.11. Protein Karbonil (CO) Düzeyleri	102
4.12. 8-Hidroksi Deoksi Guanozin (8-OHdG) Düzeyleri	103
4.13. Kaspaz 8 Düzeyleri	104
4.14. Ölçülen Oksidatif Stres Parametreleri Arasındaki İlişkiye Ait Korelasyon Bulguları	105
5. TARTIŞMA	107
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	115
7. KAYNAKLAR	117
8. EKLER	
EK-1. Tez Çalışması Orijinallik Raporu Ekran Görüntüsü	
EK-2. Turnitin Dijital Makbuz	
EK-3. Tez Çalışması ile İlgili Yayın ve Bildiriler	
EK-4. Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kararı	

9. ÖZGEÇMİŞ



SİMGELER ve KISALTMALAR

8-OHdG	8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin
8-OHGua	C8-hidroksiguanin
AAS	Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi
ACCLPP	Çocukluk Çağında Kurşun Zehirlenmesini Önleme Danışma Komitesi
ALA	δ-aminolevulinik asit
ALA sentaz	δ-aminolevulinat sentaz
ALAD	δ-aminolevulinik asit dehidrataz
ALT	Alanin aminotransferaz
APOE	Apolipoprotein E
AST	Aspartat Aminotransferaz
BAL	2,3-dimerkaptopropanol
BUN	Kan Üre Azotu
Ca	Kalsiyum
Ca⁺²	Kalsiyum iyonu
CaNa₂EDTA	Kalsiyum disodyum etilen diamin tetra asetik asit
CAT	Katalaz
Cd	Kadmiyum
CDC	Hastalık Kontrol Merkezi
CO	Protein Karbonil
CoA	Koenzim A
CPOX	Koproporfirinojen Oksidaz
Cu	Bakır
CuSO₄	Bakır Sülfat
DALY	Yeti kaybına (sakatlığa) Uyarlanmış Yaşam Yılları
DISC1- DBZ	Parçalanmış-Şizofreni-1- Bağlayıcı Çinko Parmağı
DMSA	Mezo-2,3-Dimerkaptosüksinik Asit
DMT1	İki Değerlikli Metal Taşıyıcı 1
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksinükleosid Trifosfat

DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
Egr-1	Erken Büyüme Faktörü 1
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi
eNOS	Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
Fe	Demir
FECH	Ferroşelataz
G6PD	Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
GCLs	Glutamat-Sistein Ligazlar
G-CSF	Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
GFR	Glomerüler Filtrasyon Hızı
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GSH	Glutasyon
GSR	Glutasyon Redüktaz
GSS	Glutasyon Sentetaz
GSTs	Glutasyon S-Transferazlar
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HCT	Hematokrit
HFE	Hemokromatoz
Hg	Cıva
HGB	Hemoglobin
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
HMOX1	Hem Oksijenaz-1
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
ICD10	Uluslararası Hastalık Sınıflandırması
IFN	İnterferon
IHME	Sağlık Ölçümleri ve Değerlendirme Enstitüsü
IL	İnterlökin
IQ	Zeka Katsayı Puanı
K₂HPO₄	Dipotasyum hidrojen fosfat
MDA	Malondialdehit

MDC	Majör Histo-Uyumluluk Kompleksi
Mg	Magnezyum
Mn	Mangan
MT	Metallotiyonein
Na	Sodyum
Na/K Tartarat	Sodyum/Potasyum Tartarat
Na₂CO₃	Sodyum Karbonat
NaOH	Sodyum hidroksit
NIOSH	Ulusal Mesleki Güvenlik ve Sağlık Enstitüsü
nNOS	Nöral Nitrik Oksit Sentaz
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
O₂⁻	Süperoksit Anyonu
OH	Hidroksil Radikali
P	Fosfor
Pb	Kurşun
Pb⁺²	Kurşun iyonu
Pb₃O₄	Kurşun Tetraoksit
PbB	Kan Kurşun Seviyesi
PbCrO₄	Kurşun Kromat
PBG	Porfobilinojen
PBG sentaz	Porfobilinojen Sentaz
PbS	Kurşun Sülfür
PbSO₄	Kurşun Sülfat
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PECAM-1	Platelet Endotelial Hücre Adezyon Molekülü 1
PK	Proteinaz K
PLT	Trombosit
PSEN1/2	Presenilin 1/2
RBC	Kırmızı Kan Hücreleri
ROS	Reaktif Oksijen Bileşikleri

Se	Selenyum
SH	Sülfidril
SOD	Süperoksit Dismutaz
Sp1	Spesifiklik Proteini 1
SS	Standart Sapma
TBARS	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler
TFIIIA	Transkripsiyon Faktörü IIIA
T_H	T-yardımcı hücreler
T_R	T-düzenleyici hücreler
TWA	8 saatlik belirlenen referans süre için ölçülen veya hesaplanan zaman ağırlıklı ortalama
U-ALB	albümin
U-NAG	N-asetil- β -d-glukozaminidaz
VDR	Vitamin D reseptörü
WBC	Beyaz Kan Hücresi Sayısı
Zn	Çinko
ZNF804A	Zn-parmak proteini 804A
δ-ALA	δ -aminolevülinat

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Kurşunun toksikokinetiği.	10
2.2. Burton çizgisi, Pb toksisitesinin oral belirtisi.	17
2.3. Demir-porfirin bileşiği olan “hem”in kimyasal yapısı.	18
2.4. “Hem” biyosentez yolağı.	19
2.5. Kurşunun “hem” biyosentezi üzerine bilinen ve şüpheli etkileşimleri.	20
2.6. δ -aminolevulinik asit dehidrataz (ALAD; porfobilinojen sentaz) enziminin kristal yapısı.	23
2.7. Kurşunun indüklediği hipertansiyon ve kardiyovasküler komplikasyonların patogeneğinde oksidatif stresin katılabileceği potansiyel mekanizmalar.	32
2.8. Kurşunun etki mekanizmasına ve moleküler hedeflerine genel bakış.	36
2.9. EDTA kalsiyum disodyum USP; sodyum kalsiyum etilen diamin.	40
2.10. Kurşunun ALAD yapısında yer alan Zn ile yer değiştirmesi.	43
3.1. Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.	51
3.2. Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.	54
3.3. Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.	55
3.4. Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.	57
3.5. Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.	57
3.6. Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.	58
3.7. Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.	59
3.8. Çalışmamızda 31-42 numaralı işçilere ait DNA örnekleri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerine ait Jel Elektroforez görüntüsü.	69
3.9. HpaII restriksiyon enziminin kesim bölgesi.	70
3.10. Anti-insan kaspaz-8 kaplama antikoru ile kaplanmış mikro kuyucuklar.	79
3.11. İlk inkübasyon basamağı.	79
3.12. İkinci inkübasyon basamağı.	80
3.13. Üçüncü inkübasyon basamağı.	80
3.14. Reaksiyon substratının oluşumu.	81
4.1. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Mg düzeyleri (ppm) (n=42); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	88
4.2. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Ca düzeyleri (ppm), ($p<0,05$) (n=42); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	89

4.3.	İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Zn düzeyleri (ppm), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	90
4.4.	İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Cu düzeyleri (ppm), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	91
4.5.	İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Mn düzeyleri (ppb), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	92
4.6.	İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Se düzeyleri (ppb), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	93
4.7.	İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen ALAD enzim düzeyleri (ng/mL), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	94
4.8.	G177C ALAD Polimorfizm için agaroz jel elektroforezi.	96
4.9.	İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen GSH düzeyleri (Umol/L) ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	97
4.10.	Şelasyon tedavisi öncesinde ve sonrasında plazma GPx (IU/mL) aktivitesi ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	98
4.11.	İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma SOD (IU/mg protein) aktivitesi, ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	99
4.12.	İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma CAT aktivitesi (IU/mg protein), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	100
4.13.	İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma MDA düzeyleri (nmol/mL), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	101
4.14.	İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma insan Protein Karbonil (CO) düzeyleri (ng/mL) ($p<0,05$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra ($n=42$).	102
4.15.	İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma 8-OHdG düzeyleri (ng/mL), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	103
4.16.	İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma Kaspaz-8 düzeyleri (ng/mL), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	104

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Kurşunun genel fizikokimyasal özellikleri.	4
2.2. Kurşun zehirlenmesinin çocuklarda ve yetişkinlerde belirtileri ve semptomları.	16
3.1. PCR bileşenleri ile stoktaki ve reaksiyondaki konsantrasyonları.	53
3.2. Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi (AAS) Metod Bilgileri.	63
3.3. Standart PCR yöntemi için sıcaklık döngüleri.	68
3.4. Polimorfizm çalışması için hazırlanan reaksiyon ortamı.	70
4.1. Kurşun maruziyeti işçilerin çalışma alanları ve çalışma süreleri.	85
4.2. İşçilerin karakteristik özellikleri.	86
4.3. İşçilere ait şelasyon tedavisi uygulaması öncesi ve sonrası klinik veriler.	86
4.4. İşçilerin şelasyon tedavisi uygulaması öncesi ve sonrası kan ($\mu\text{g/L}$) ve idrar ($\mu\text{g/dL}$) kurşun düzeyleri.	87
4.5. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Mg düzeyleri (ppm) (n=42); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	88
4.6. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Ca düzeyleri (ppm), ($p<0,05$) (n=42); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	89
4.7. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Zn düzeyleri (ppm), ($p<0,05$) (n=42); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	90
4.8. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Cu düzeyleri (ppm), ($p<0,05$) (n=42); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	91
4.9. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Mn düzeyleri (ppb), ($p<0,05$) (n=42); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	92
4.10. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Se düzeyleri (ppb), ($p<0,05$) (n=42); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	93
4.11. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen ALAD enzim düzeyleri (ng/mL), ($p<0,05$) (n=42); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	94
4.12. Çalışmada yer alan kurşun maruziyeti olan işçilerin ALAD Genotipleri (n=42).	95

4.13.	İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen GSH düzeyleri (Umol/L), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	97
4.14.	İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen GPx (IU/mL) aktivitesi ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	98
4.15.	İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma SOD (IU/mg protein) aktivitesi, ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	99
4.16.	İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma CAT aktivitesi (IU/mg protein), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	100
4.17.	İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma MDA düzeyleri (nmol/mL), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	101
4.18.	İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma insan Protein Karbonil (CO) düzeyleri (ng/mL), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	102
4.19.	İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma 8-OHdG düzeyleri (ng/mL), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	103
4.20.	İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma Kaspaz 8 düzeyleri (ng/mL), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.	104
4.21.	Tez kapsamında ölçülen oksidatif stres parametrelerinin korelasyonları.	106

1. GİRİŞ

Dünyada sanayileşmenin ve kentleşmenin artması sonucu hava, su ve toprağın kirlenmesi sonucunda farklı maruziyet yolları ile ağır metallere maruz kalılabilmektedir. Toksisitesi iyi bilinen bir ağır metal olan kurşun (Pb), kağıt endüstrisi, petrokimya, klor-alkali üretimi, gübre sanayi, demir-çelik sanayi, enerji üretimi (termik) gibi temel endüstrilerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çevresel ve mesleki maruziyet özellikle Pb'nin benzin, boya, pil, akü üretiminde kullanılmasına ve madenlerde döküm işlemi sonucu oluşan emisyonu bağlı olarak gerçekleşmektedir. Ülkemizde en sık görülen mesleki zehirlenmeler, kronik Pb maruziyeti ile ortaya çıkmaktadır (1).

Kurşun sinir sistemi, renal sistem, immün sistem, hematolojik sistem ve üreme sistemi başta olmak üzere birçok organ üzerinde toksik etkileri olan bir ağır metaldir (2). Pb'nin kritik toksisite mekanizmalarından biri "hem" biyosentez yolağında başta δ -aminolevulinik asit dehidrataz (ALAD) olmak üzere temel enzimleri inhibe etmesidir (3, 4). ALAD enzimi polimorfik bir enzimdir, Pb'ye maruz kalan işçilerde genotipe bağlı olarak kan Pb düzeylerinin farklılık gösterebildiği yapılan araştırmalarda bildirilmiş ve genetik polimorfizm ile Pb maruziyeti arasındaki ilişkiye dikkat çekilmiştir (5, 6). Pb'nin önemli toksik etki mekanizmalarından bir diğeri de serbest radikal artışına bağlı olarak gelişen oksidatif stres olup, bu durum antioksidan enzimlerin aktivitesinin azalmasına, lipid ve protein gibi önemli makromoleküllerde oksidatif hasara neden olmakta, dokularda ve hücresel bileşenlerde yapısal ve fonksiyonel değişiklikleri tetiklemektedir (7). Ayrıca Pb'nin indüklediği oksidatif DNA (Deoksiribo nükleik asit) hasarı da reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna bağlanmaktadır (8). Pb'nin oksidatif strese neden olma ve antioksidan savunmanın çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenlerini etkileme gücü birçok epidemiyolojik çalışma ve hayvan çalışması ile gösterilmiştir. Kurşuna bağlı önerilen diğer bir sitotoksikite mekanizması da kurşunun apoptotik hücre ölümünü indüklemesidir (7).

Sodyum kalsiyum etilen diamin tetraasetik asit (kalsiyum disodyum EDTA) 50 yılı aşkın süredir Pb zehirlenmesi için uygulanan tedavinin temelini oluşturan şelatör bir ajan olarak intravenöz olarak kullanılmaktadır ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Temel İlaçlar Model Listesi'nde yer almaktadır. Pb'nin sodyum kalsiyum

EDTA ile şelasyonu; antidotun merkezinde yer alan kalsiyum iyonunun (Ca^{+2}) bir kurşun iyonu (Pb^{+2}) ile yer değiştirmesi şeklinde olur. Ca kompleksi, Pb kompleksinden çok daha az stabildir. Oluşan Pb şelatı, glomerüler filtrasyonla atılır (9). Sodyum kalsiyum EDTA, Pb dışında Ca, çinko (Zn), demir (Fe), selenyum (Se) gibi esansiyel elementleri de bağlar ve esansiyel element düzeylerinde kayıplara da yol ağabildiğini ifade eden şalışmalar bulunmaktadır (10).

Bu tez şalışmasında, Pb'nin mesleki maruziyetini takiben uygulanan şelasyon tedavisinin Pb toksisitesini gösteren bazı parametreler üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi amağlanmıştır. şalışmanın geręekleřtirilebilmesi için, Ankara Mesleki ve çevresel Hastalıklar Hastanesi, Dahiliye (İç Hastalıkları) Polikliniği'ne başvuran Pb intoksikasyonu tanısı almış işçilerden alınan kan ve idrar örneklerinde şelasyon tedavisi uygulanması öncesi ve sonrasında olası esansiyel element düzeylerinde, ALAD enzimi, oksidatif stres parametreleri, apoptoz, antioksidan enzim düzeylerindeki değişimin ve işçilerdeki ALAD enzim polimorfizminin değerlendirilmesi amağlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kurşunun Genel Özellikleri ve Tarihçesi

Kurşun (*Plumbum*, (Pb)), insanoğlu tarafından kullanılan ilk metallerden biridir ve bu nedenle M.Ö. 4. yüzyılda metal işçilerinde görülen Pb koliği ile ilk kayıt altına alınan meslek hastalığının sebebi olarak gösterilmiştir (11). Simyacılar, Pb'nin çok eski bir metal olduğuna ve Satürn gezegeni ile Pb'nin ilişkilendirildiğine inanmıştır (11).

Pb'nin sahip olduğu özellikler yüzyıllar boyunca birçok farklı uygulamada kullanılmasına neden olmuştur (12). Tarihçiler, insan tarafından binlerce yıldır Pb kullanımının devam etmesini işlenebilmesi, dayanıklılığı ve korozyona karşı direnci gibi istenilen nitelikleri nedeniyle olduğunu ifade etmektedir. Korozyona karşı çok dayanıklı olması sebebiyle Roma imparatorlarının amblemini taşıyan kurşun borular hamamlarda kanalizasyon amacıyla halen kullanılmaktadır. Romalılar, Pb zehirlenmesine yol açacak şekilde şarabın tatlılığını arttırmak için Pb kaplar kullanmaktaydı. Geçtiğimiz yüzyıl boyunca, Pb ev boyalarında da dayanıklılığı arttırmak ve yakıtta ise vuruntu önleyici etkisi için kullanılmıştır (12, 13).

2.1.1. Kurşunun Fizikokimyasal Özellikleri

Doğal olarak oluşan bir element olan Pb periyodik tabloda Grup 14 (IVA)'te yer almaktadır. Atom numarası 82 ve atomik kütlesi 207.19 olan kimyasal bir elementtir (12). Tablo 2.1.'de Pb'nin genel fizikokimyasal özellikleri gösterilmiştir (14, 15).

Tablo 2.1. Kurşunun genel fizikokimyasal özellikleri (14, 15).

Kimyasal Özellikler	
CAS #	7439-92-1
Formül	Pb
Fiziksel Özellikler	
Fiziksel Tanımlama	Yumuşak, gümüş-mavimsi beyaz veya gri renkli metal
Kaynama Noktası	1740°C
Donma Noktası/Erime Noktası	327,5°C
Moleküler Ağırlık	207.2 (1 µg = 0.004826 µmol; 1 µmol/L = 207.19 µg/L)
Buhar Basıncı	1,77 mmHg
Yoğunluk	11,3 g/cm ³
Oksidasyon Durumu	İnorganik bileşiklerdeki Pb genellikle oksidasyon durumuna göre II değerliğe sahiptir, ancak IV değerlikte de bulunur.

Kurşun, mavimsi-gri renge sahip bir ağır metaldir ve hava ile temas ettiğinde kararmaktadır. Pb'nin kendine özgü bir tadı veya kokusu bulunmamaktadır (16). Yumuşak, eğilebilir bir metal olan Pb atom numarası 82'nin üzerinde olan metaller arasında doğada en sık bulunanıdır. Doğada en çok bulunan formu kurşun sülfür (PbS) (galen/galena) filizidir. Serussit (PbCO₃, kurşun karbonat) ve anglesit (PbSO₄, kurşun sülfat) gibi diğer önemli cevherler, galenin aşınmış ürünleri olarak kabul edilebilir ve genellikle yer kabuğunun yüzeyine daha yakın bulunur (12).

Doğada Pb, ²⁰⁴Pb (%1,4), ²⁰⁶Pb (%25,2), ²⁰⁷Pb (%21,7) ve ²⁰⁸Pb (%51,7) olmak üzere dört kararlı izotopun bir karışımı halindedir. Pb izotopları, doğal olarak meydana gelen üç radyoaktif element serisinin her birinin son ürünleridir: uranyum serisi için ²⁰⁶Pb, aktinyum serisi için ²⁰⁷Pb ve toryum serisi için ²⁰⁸Pb. Pb'nin hepsi radyoaktif olan diğer kırk üç izotopu olduğu bilinmektedir. Farklı Pb numuneleri arasında dört kararlı izotopunun (²⁰⁴Pb, ²⁰⁶Pb, ²⁰⁷Pb ve ²⁰⁸Pb) miktarı değişiklik göstermektedir. Bu nedenle, Pb'nin jeolojik kaynağına bağlı olarak izotopları arasında sabit bir doğal oran bulunmamaktadır. Yer kabuğundaki Pb galenit (Pb

sülfür), serisit (Pb karbonat), anglezit (Pb sülfat minerali) ve miniyum gibi cevherlerde bileşikler halinde bulunmaktadır. Az miktarda kurşun volkanlardan, orman yangınlarından ve deniz tuzu spreylерinden havaya salınabilir. Ancak, çevrede yaygın olarak bulunan kurşunun varlığı, büyük ölçüde insan faaliyetlerinden kaynaklanmaktadır (12).

Pb, doğada elementel Pb (0) veya inorganik Pb^{+2} ve Pb^{+4} olmak üzere farklı yapılarda bulunabilmektedir. Çevremizde Pb, esas olarak Pb^{+2} şeklinde bulunmaktadır. İnorganik Pb^{+4} bileşikleri, yalnızca aşırı oksitleyici koşullar altında oluşmakta olup normal koşullarda doğada bulunmamaktadır. Organokurşun (II) bileşikleri bilinmekle birlikte, organokurşun kimyasına tetravalent (IV) oksidasyon durumu hakimdir. Metalik kurşun, Pb (0) doğada bulunur, ancak oluşumu nadirdir (2).

Dayanıklısı organik Pb bileşikleri, tetraetil ve tetrametil Pb, belirli koşullar altında sentez edilebilir. Bu bileşiklerin toksisiteleri inorganik bileşiklerinkinden farklıdır ve sadece potansiyel olarak mesleki olarak maruziyet söz konusudur ve bu durum koklandıklarında Pb içeren bileşiklerin halüsinogen etkileri olması nedeniyle önemlidir (17).

Çevrede, Pb biyolojik olarak parçalanmamaktadır (18). Metalik Pb'nin suda çözünmesi zordur, ancak metalik Pb nitrik asit ve konsantre sülfürik asitte çözünür. Pb^{+2} tuzlarının büyük çoğunluğunun çözünmesi zordur (örneğin; Pb sülfat ve Pb oksitler), fakat istisnalar da bulunmaktadır, örneğin; Pb nitrat, Pb klorat ve -bir dereceye kadar- Pb sülfat ve Pb klorür. Buna ek olarak, organik asitlere sahip bazı tuzlar çözünmez (örneğin; Pb oksalat) (15).

2.1.2. Kurşuna Maruziyet Yolları

Toksisitesi iyi bilinen bir ağır metal olan Pb'ye hem çevresel hem de mesleki maruziyet söz konusudur. Genel popülasyonda Pb'ye çevresel maruziyet temel olarak kurşunla kontamine toprak, hava, içme suyu, orman ürünleri, sigara dumanı, mavimsi gri çatlamış sırları önemli miktarda Pb sızdırabileceği için seramik tabak takımları ve eski evlerde Pb bazlı zararlı boyalar ile temas edilmesi durumunda gerçekleşir (19). Bozulan eski duvar boyalarından kaynaklanan Pb zehirlenmesi, hassas bir grup olan çocuklarda görülen yüksek kan Pb seviyelerinin birincil

kaynağıdır. (11). Kalıcı çevre kirliliğine yol açan bir madde olan Pb, genel popülasyon için gıdalarda, içme sularında ve havada düşük fakat tehlikeli konsantrasyonlarda bulunabilir. Pb'nin içme suyu için DSÖ tarafından belirlenen limit değeri 0.01 mg/l'dir (10 µg/l), Türkiye'de de içme suyu için Pb limit değeri 10 µg/l olarak verilmektedir (20, 21). Bunlara ek olarak, sigara kullanımı da Pb için önemli bir maruziyet kaynağı olarak değerlendirilmektedir (15, 19). Kozmetik amaçlı olarak ve geleneksel tıpta kullanılan sürme gibi ürünler de genellikle fazla miktarda Pb içerir (19).

Mesleki maruziyet ise, Pb'nin endüstriyel olarak kullanıldığı bir meslekte çalışmak ile meydana gelmektedir (19). Pb maruziyeti, birçok iş kolunda çalışan kişilerde gerçekleşebilmektedir ve iş ortamında maruz kalınan Pb'nin genellikle inorganik formdadır. Bazı endüstri alanlarında çalışan işçilerde, Pb içeren toz veya duman oluşturan mesleğe özgü faaliyetler sebebiyle Pb'ye maruziyeti görülmektedir (14). Bununla birlikte, her metal bileşiğinde olduğu gibi doğada kendiliğinden yok olmayan ve süresiz olarak varlığını devam ettiren Pb'ye maruziyet sıklıkla solunum ve gastrointestinal yol ile gerçekleşmektedir (22). İşçilerde mesleki Pb maruziyeti de, esas olarak solunum yoluyla maruziyete bağlı olarak görülmekle birlikte işyeri sağlık talimatlarını takip etmeyen işçilerde sindirim sistemi yoluyla da Pb maruziyeti söz konusudur (23, 24). Pb maruziyetinde, sindirim sisteminden alınan Pb'nin fizikokimyasal özellikleri büyük önem taşır (15).

Kronik olarak Pb maruziyeti söz konusu olan işçiler arasında, mesleki maruziyet yüzde dağılım oranı metalürji (yaklaşık %45), elektromekanik mühendisliği (yaklaşık %25), maden endüstrisi (yaklaşık %5) ve kimya endüstrisi (yaklaşık %5) şeklindedir (4). Bu endüstriler arasında, özellikle, birincil ve ikincil Pb eritme ve arıtma endüstrileri, akü üretim tesisleri, çelik kaynak veya kesme işlemleri, Pb içeren pigmentlerle boyanmış yapıların sökülmesi, tadilatı veya yıkılması şeklinde inşaat, boya ve baskı endüstrisi, fırınlama alanları, taşıt radyatörü tamir atölyeleri, demir dışındaki metallerin işlenmesi ve dökümü ve Pb lehiminin alev lehimlemesini gerektiren diğer endüstriler, benzin istasyonları ve garajlar yer almaktadır (11, 25).

İşçiler, lehim içindeki Pb, tesisat armatürleri, şarj edilebilir piller, Pb mermiler, Pb içeren cam, pirinç veya bronz nesneler ve radyatörler aracılığıyla Pb ile

temas edebilir. Pb maruziyeti, yalnızca bu tür nesnelerin üretiminde değil, aynı zamanda bunların kullanımında (örneğin, ateş menzilleri), onarımında (örneğin, radyatör onarımı) ve geri dönüşümünde (örneğin, Pb asitli akünün geri dönüşümü) meydana gelebilir (11).

Kurşun, ayrıca kablo kaplama, sıhhi tesisat ve mühimmat için de kullanılmaktadır. Pb, ses emici ve X-ray cihazları ve nükleer reaktörlerin çevresinde radyasyon kalkanı olarak çok etkilidir. Buna ek olarak, titreşimi absorbe etmek için de kullanılmaktadır. Kalayla alaşımlanmış Pb, alet borularının yapımında da kullanılmaktadır. Kurşun karbonat ($PbCO_3$), kurşun sülfat ($PbSO_4$), kurşun kromat ($PbCrO_4$), kurşun tetraoksit (Pb_3O_4) ve diğer Pb bileşikleri boyalarda yoğun olarak uygulanmış, ancak son yıllarda sağlık üzerindeki tehlikelerini azaltmak için bu şekilde kullanımı yasaklanmıştır. Pb oksit (genellikle Pb monoksit), akromatik lensler için yüksek kırılma indisine sahip olan ince “kristal cam” ve “çakmaktaşı cam” üretiminde de kullanılmaktadır. Pb nitrat ve asetat, ara ürün olarak kullanılan ve özel uygulamalarda işlev gören çözünür tuzlardır. Pb arsenat gibi Pb tuzları böcek öldürücüler olarak kullanılmıştır, ancak son yıllarda bu kullanım neredeyse ortadan kaldırılmıştır (12).

Akümülatörlerde hem metal hem de dioksit olarak yüksek miktarlarda Pb kullanılmaktadır. En yaygın Pb-asit akü tipi, az miktarda bakır (Cu), arsenik (As), kalay (Sn) gibi elementlerin eklenmesiyle Pb antimon alaşımından (genellikle %0,75-5 antimon içeren) yapılmış ızgaraları içeren ve ızgara özelliklerini iyileştirmek için selenyum (Se) kullanılan ağır iş tipi plastik bir kutudan (normalde polipropilen) oluşur (12).

Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (*International Agency for Research on Cancer, IARC*) ise, mesleki Pb maruziyetini, maruziyet sıklığı açısından Pb'ye sürekli maruziyeti olan meslekler (örneğin, çalışanların iş faaliyetlerinin bir parçası olarak Pb maruziyeti), orta derecede maruziyet sıklığına sahip olan meslekler ve düşük sıklıkta maruziyeti olan meslekler olarak sınıflandırmaktadır. Tanımlanan mesleklerin kapsamı detaylı bir şekilde aşağıda verilmiştir:

- **Kurşun maruziyeti sürekli olan meslekler:** akü üretim işçileri, akü geri dönüşüm işçileri, dökümhane işçileri, Pb-asit pillerinin üretimi ve geri dönüşümü, Pb

eritme ve rafineri işçileri, Pb içeren cam montajı, bakımı veya imhası ile uğraşan cam işçileri, boya işçileri, araç radyatör tamir işçileri ve trafik polisleri;

- **Kurşun maruziyeti orta sıklıkta olan meslekler:** atış menzili eğitmenleri, tadilat işi ile uğraşanlar, Pb madencileri, gazeteciler, plastik işçileri, lastik işçileri, kuyumcu işçileri, seramik işçileri ve çelik kaynakçıları ve kesicileri;

- **Kurşun maruziyeti düşük sıklıkta olan meslekler:** otomobil tamir işçileri, kablo üretim işçileri, inşaat işçileri, yıkım işçileri, atış menzili katılımcıları, alev-lehim işçileri, tesisatçılar ve boru işçileri, seramik sır üreticileri, gemi tamir işçileri ve vitray üreticileri (26).

Ağır metal maruziyet riski olan işlerde çalışan işçilerin kıyafetleri, saçları ve ayakkabıları aracılığıyla metaller de dahil olmak üzere kimyasal maddeler işçilerin evlerine taşınmakta, bu nedenle işçilerin yanı sıra aileleri de ağır metal maruziyeti yaşayabilmektedir. Bu tür kimyasallar eşler ve çocuklar açısından da potansiyel bir tehlike oluşturmaktadır. Bu konuda ilk kanıtlardan biri, Baker ve ark. tarafından 1977'de, Kuzey Carolina'daki bir akü fabrikasında çalışan işçilerin çocukları (27 çocuk) üzerinde yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada, akü fabrikasında çalışan işçilerin çocuklarının Pb konsantrasyonlarının mahalledeki diğer çocuklardan (kontrol grubu) daha yüksek olduğu ve işçilerin Pb'yi işyerinden eve taşımalarının en önemli yolunun iş kıyafetlerini eve götürmek olduğu gösterilmiştir (27).

- **Dünyada ve Türkiye'de Mesleki Kurşun Maruziyeti**

Kurşunlu benzin kullanımının dünya çapında yasaklanmasıyla, hem çevredeki Pb düzeyi hem de dünya nüfusunun kan Pb düzeyi önemli ölçüde azalmıştır. Bununla birlikte, Pb nispeten yaygın bir çevresel ve mesleki maruziyet kaynağı olmaya halen devam etmektedir (27). Çevresel Pb konsantrasyonu son yıllarda istikrarlı bir şekilde azalmış olsa da, mesleki Pb maruziyeti olan bazı popülasyonlarda daha yüksek konsantrasyonlarda Pb tespit edilmektedir (28). Mesleki Pb maruziyeti, yüzyıllardır endişe kaynağı olmuştur ve yüksek kan Pb düzeyinin %80'inden fazlası mesleki maruziyetten kaynaklanmaktadır (29). Sağlık Ölçümleri ve Değerlendirme Enstitüsü (*Institute for Health Metrics and Evaluation, IHME*), Pb maruziyetinin 494.550 ölüm vakası ve 9,3 milyon Yeti kaybına (sakatlığa) Uyarlanmış Yaşam Yılları (*Disability Adjusted Life Years; DALY*) şeklindeki 2015 yılına ait verileri doğrultusunda Pb'nin

sağlık üzerindeki uzun dönem etkilerini esas alarak gelişmekte olan bölgelerde en fazla sağlık yükü oluşturduğunu tahmin etmektedir (28).

Çalışma ortamındaki Pb seviyesini ve işçi tarafından maruz kalınan Pb dozunu azaltmak için yasal düzenlemeler ile hem endüstriye hem de endüstri işçilerine katı kurallar getirilmektedir (30). Gelişmiş ülkeler, Pb zehirlenmesinde birincil ve ikincil önleme amacıyla son yıllarda sistematik önlemler ortaya koymuştur. Gelişmekte olan bölgelerde ise, Pb'nin geniş kullanım alanı, özellikle katı yasal düzenlemelerin ve politikaların eksikliği veya uygulanamaması, bireylerde önemli derecede hastalık oluşturacak şekilde artan Pb maruziyeti ile sonuçlanmaktadır (16). Sonuç olarak, elde edilen bulgular hem yüksek gelirli ülkelerde hem de düşük ve orta gelirli ülkelerde Pb maruziyetinin halk sağlığı açısından önemli bir sorun olmaya devam ettiğini göstermektedir (31).

Havadaki Pb konsantrasyonu, çalışma ortamındaki mesleki Pb maruziyetini izlemek üzere ölçülebilmektedir. Bununla birlikte, mesleki maruziyet dolaylı biyomonitorizasyon ile, yani işçilerin bireysel olarak kan kurşun seviyesinin (PbB) ölçülmesiyle ortaya konmaktadır (15). Çocukluk Çağında Kurşun Zehirlenmesini Önleme Danışma Komitesinin (*Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention, ACCLPP*) tavsiyeleri üzerine, PbB terimi artık "PbB referans seviyesi" terimi ile değiştirilmiştir. Yıllar içerisinde, Hastalık Kontrol Merkezi (*Centers for Disease Control, CDC*) tarafından 1-5 yaş grubundaki çocuklar için belirlenen PbB referans seviyesi, 1960'larda 60 µg/dL'den 5 µg/dL'ye değişmiştir. Çalışan popülasyon için kabul edilebilir PbB referans seviyesi 30 ile 49.9 µg/dL arasında değişmektedir. Maruziyeti takiben, çocuklarda ve yetişkinlerde sırasıyla 70 µg/dL ve 100 µg/dL'den yüksek PbB önemli toksisite ile ilişkili bulunmuştur. Erişkinlerde, PbB 70 µg/dL'nin altında olduğunda şelasyon tedavisi genellikle gerekmez. Çocuklarda ise, PbB 45-69 µg/dL arasında ise süksimer ile şelasyon tedavisi bir tedavi seçeneği olarak önerilmektedir (20).

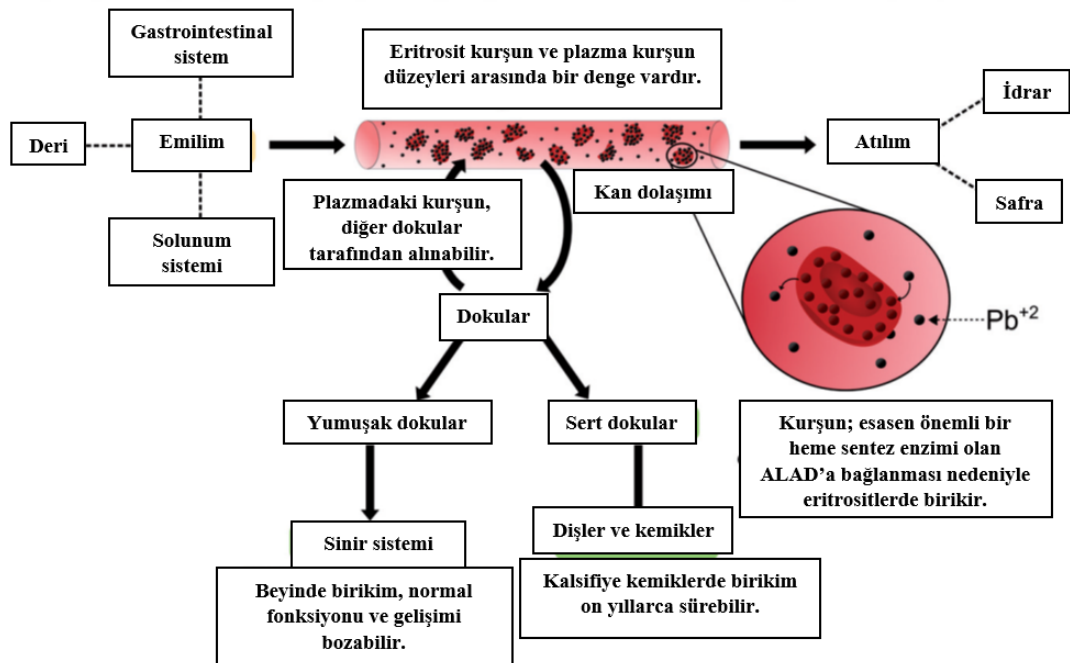
Ulusal Mesleki Güvenlik ve Sağlık Enstitüsü (*The National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH*), yetişkinler için kan Pb seviyesi referans değerini 50 µg/L olarak belirlemiştir (29).

Türkiye'de Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı tarafından 12 Ağustos 2013 tarihli Resmi Gazete'de yayınlanan "Kimyasal Maddelerle Çalışmalarda Sağlık

ve Güvenlik Önlemleri Hakkında Yönetmelik” uyarınca, mesleki maruziyet değeri için 8 saatlik belirlenen referans süre için ölçülen veya hesaplanan zaman ağırlıklı ortalama (TWA) inorganik Pb ve bileşikleri için $0,15 \text{ mg/m}^3$ olarak belirlenmiştir. Pb ve iyonik Pb bileşiklerinin biyolojik izlemesi, absorpsiyon spektrometri veya eşdeğer sonucu veren bir başka metod kullanılarak, PbB ölçümü ile gerçekleştirilir. Bağlayıcı biyolojik sınır değeri, kan için $70 \text{ } \mu\text{g Pb/100 mL}$ ’dir. Türkiye’de işyerlerinde, havadaki Pb’nin, haftada 40 saat çalışma süresine göre hesaplanmış, zaman ağırlıklı ortalama konsantrasyonu 0.075 mg/m^3 ’ten fazla ise veya çalışanlardan herhangi birinin kanındaki kurşun seviyesi $40 \text{ } \mu\text{g Pb/100 mL}$ kandan fazla ise tıbbi gözetim yapılır (32).

2.1.3. Kurşunun Toksikokinetik Özellikleri

Kurşun maruziyetinde, Şekil 2.1.’de gösterildiği üzere Pb toksikokinetiği vücut Pb yükünün ve toksisitesinin önemli bir belirleyicisidir. Öncelikle, Pb vücuttaki yazgısı yoluyla, ikincil olarak vücutta birikme eğilimi gösterdiği bölgeler (örneğin; kemikler) yoluyla Pb toksisitesini etkiler (33).



Şekil 2.1. Kurşunun toksikokinetiği (34).

Absorbsiyon

Kurşun, organizmaya esas olarak gastrointestinal sistem ve solunum sistemi aracılığıyla girmekle birlikte, organik Pb bileşikleri gibi bileşikler (özellikle tetraetil Pb gibi hidrofobik organik bileşikler oluşturarak) bazı nadir durumlarda cilt tarafından da absorbe edilebilir (34). Sindirim sistemine giren Pb'nin yaklaşık %5 - %10'u absorbe olabilmektedir. Bununla birlikte, Pb'nin pulmoner absorpsiyon oranı %50-%70 arasında olup, pulmoner absorpsiyon, partiküllerin boyutuna, yarı ömrüne ve çözünürlüğüne bağlıdır (35). Pb'nin absorpsiyon oranı, hem Pb'nin fizikokimyasal özelliğine (örneğin; partikül büyüklüğü, mineraloji, çözünürlük ve Pb'nin kimyasal formu) hem de Pb'ye maruz kalan bireyin durumuna bağlıdır (16).

Pb, vücuda gastrointestinal sistem veya solunum sistemi yoluyla alınsa da vücuda her iki giriş yolu ile gözlenen etkileri aynıdır (35). Pb'ye gastrointestinal yoldan maruziyette absorpsiyonun etkinliği, yiyecek tüketiminin suda çözünür Pb'nin absorpsiyonunu azaltması ve Pb'nin diyetle yer alan diğer elementler ile etkileşime girmesi sebebiyle Pb'ye maruziyet öncesinde bireyin diyet ve beslenme durumuna bağlıdır (36). Çinko (Zn), bakır (Cu), demir (Fe) veya kalsiyum (Ca) açısından zengin bir diyet, Pb'nin sindirim sistemi tarafından absorpsiyonunu azaltabilir. Fe eksikliği olan kişilerde Pb absorpsiyonu, Fe eksikliği olmayan kişilere göre 2-3 kat daha yüksek olabilir. Yağ veya protein açısından zengin diyetler, D vitamini düzeylerini iyileştirerek Pb alımını arttırabilir (37). Bağırsaklarda Pb'nin biyoyararlanımı üzerine yiyeceklerin etkisi, temel olarak bağırsak pH'sının tüketilen gıda içeriğine bağlı olarak değişmesinden kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalardan birinde fareler süt tozu ile beslendiğinde süt tozunun Pb'nin biyoyararlanımını arttırdığı bulunmuştur. Buna bağlı olarak, protein içeriği yüksek gıda alımı da Pb absorpsiyonunu arttırdığı değerlendirilmiştir (38). Yiyeceklerdeki fosfor (P), Pb'nin sınırlı bir ölçüde absorbe edilebilen yüksek oranda çözünür fosfatlara dönüşmesine neden olabilir. Pb ile C vitamini tüketimi, Pb absorpsiyonunu artırabilir. Pb, aynı zamanda esansiyel mikro elementleri metalloenzimlerden ayırma yeteneğine de sahiptir (37).

Etil alkolün, Pb absorpsiyonunda gastrointestinal sistemde irritasyon oluşumuna bağlı olarak bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Yasadışı olarak

damıtılmış alkol içerisinde Pb'ye maruz kalan bireylerde doz-etki ilişkilerini değerlendirirken bu durum önem kazanmaktadır (39).

Hamile kadınlarda ve çocuklarda Pb absorpsiyon oranı daha yüksektir ve bu durum açlık sırasında daha da artabilir (16). Küçük çocuklarda Pb absorpsiyonunun, yetişkinlerden önemli ölçüde daha yüksek olması (yetişkinlere kıyasla 4-5 kat daha fazla) olması sebebiyle toksisitesi daha yüksektir (36, 40). Çocuklarda Pb toksikokinetiği yetişkinlerdekine benzer görünse de, küçük çocuklar ile yetişkinler karşılaştırıldığında absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve eliminasyon düzeyinde önemli farklılıklar bulunmaktadır. Çocuklarda gelişme çağına bağlı olarak, birçok ksenobiyotik metabolize edici enzimin etkisi değişiklik göstermektedir. Bu durum, çocukların Pb'nin toksik etkilerine veya detoksifikasyona karşı daha duyarlı olmalarına yol açar, ancak bu duyarlılığın kesin mekanizmaları tam olarak anlaşılmamıştır. Çocuklar ve yetişkinlerde Pb zehirlenmesinin zararlı etkilerinden kaynaklanan hasarı onarma kapasitesi açısından da farklılıklar bulunmaktadır. Bununla birlikte, çocukların yetişkinlere göre toksik maruziyetten kaynaklanan hasarların gözlemlenebileceği daha uzun yaşam sürelerine sahip oldukları da ifade edilmektedir (36).

Dağılım

Kurşun absorbe edildiğinde, vücutta kan, yumuşak dokular ve kemikler olmak üzere üç ana bölüme dağılmaktadır. Kan dolaşımındaki Pb, insan vücudu üzerinde advers etkiler oluşturur. Yüksek dozda, kısa süreli (akut) ve düşük dozda, uzun süreli (kronik) Pb maruziyeti söz konusu olduğunda, bireyin vücudundaki biyolojik aktif Pb formlarının miktarını PbB yansıtır. Kan Pb düzeyinin ölçümü, yakın zaman içerisindeki Pb maruziyeti için en yaygın olarak kabul edilen ve doğrulanabilir bir biyobelirteçtir (41). PbB, akut maruziyeti takiben toplam vücut Pb yükünün yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır (24). Pb, birçok eritrosit proteinine yüksek afinite göstermektedir (30). Bu nedenle, kan Pb düzeyinin %95'den fazlası, eritrositlerde birikerek eritrositlerin işlevlerini bozmaktadır (24). Kan dolaşımına ulaştığında eritrositlerle birleşen Pb düzeyi, plazmada bulunan Pb düzeyi ile dengede kalır. Plazma Pb düzeyi, Pb maruziyetinde vücuttaki Pb yükünün düşük bir oranına karşılık gelmekle birlikte Pb'nin diğer hedef organlara dağılımını göstermesi

bakımından önem taşımaktadır. Pb, kemik ve diş gibi sert dokulara eriştikten sonra onlarca yıl boyunca bu dokularda depolanabilir. Böbrek, karaciğer, akciğer ve beyin gibi yumuşak dokular da Pb'yi depolayabilir (34). Kurşunun çoğu karaciğerde ve daha az oranda böbreklerde depolanır; kalan Pb ise tüm vücuda (serebral korteks, omurilik, yumurtalık, pankreas, dalak, prostat, adrenaller, beyin, yağ dokusu, testisler, kalp ve iskelet kasları) dağılır (37). Pb, kan-beyin bariyerine girdikten sonra beyinde birikebilir ve beyin gelişimini bozabilir (34).

Kurşun, vücutta Ca yerine geçme eğilimi gösterir ve Ca metabolizmasını etkileyen faktörlerden etkilenir. Bu nedenle, mineral içeren dokular Pb için uzun süreli depolama alanlarıdır (42). Pb, esas olarak kemik ve diş gibi Ca içeriği yüksek olan sert yapılarda birikmektedir ve aynı zamanda normal hücre fonksiyonları ile çeşitli fizyolojik süreçleri de etkilemektedir (22). Yetişkinlerde, kemiklerde özellikle tibia kemiğinde bulunan Pb'nin konsantrasyonu yaş ile birlikte on kata kadar artar (37). Yaşlı bireylerde yüksek kemik Pb konsantrasyonları, kronik toksisiteyi göstermesi sebebiyle önemli bir göstergedir (41). Kemik, yetişkin vücut Pb yükünün %94'ünden fazlasını oluşturduğundan, kemik Pb seviyesi ölçümü kümülatif Pb maruziyetinin bir göstergesidir. Pb, vücutta tahmini olarak 10 yıllık biyolojik yarı ömrü ile çok yavaş bir şekilde vücuttan atılır, bu nedenle vücutta birikmesi kolaylaşmaktadır (43).

Biyotransformasyon

İnorganik Pb vücut tarafından metabolize edilemez, bununla birlikte glutatyon gibi moleküllerle konjuge olur. Organik Pb, inorganik Pb'ye metabolize olabilir. İnorganik Pb, yumuşak dokularda ve kemiklerde dağılıma uğrar ve birikir veya doğrudan atılır (16, 36).

Eliminasyon

Kurşun maruziyetini takiben Pb eliminasyonu iki aşamadan oluşur: birinci aşama, kan ve yumuşak dokulardan eliminasyonu olup yaklaşık 20-30 gün sürer; ikinci aşama, Pb'nin kandan yavaş eliminasyon aşaması olup, kemiklerden atılımını içerir. Pb'nin biyolojik yarı ömrünün sırasıyla, trabeküler kemikte bir yıl ve kortikal kemikte 10-20 yıl olduğu tahmin edilmektedir (37).

Kurşunun ana eliminasyon yolağı böbreklerdir; ter, tükürük, saç ve tırnak gibi diğer eliminasyon yolları ise böbrek ile atılımı kıyaslandığında önemsiz kabul edilmektedir (36). İnorganik Pb'nin çoğu (yaklaşık 2/3'ü) idrarla atılırken, kalan 1/3'ü safrayla bağırsağa atılır ve ardından dışkıyla vücuttan atılır (37). İnorganik Pb'nin idrarla atıldığı mekanizmalar ise tam olarak karakterize edilmemiştir (36). Az miktarda Pb ter, süt ve tükürükte salgılanabilir veya saç ve tırnaklarda birikebilir (37). Maruziyeti takiben, Pb'nin yarılanma ömrü, kanda yaklaşık olarak 25 gün, yumuşak dokularda 40 gün ve kemiklerde ise 25 yıldır; sonuç olarak, Pb vücutta onlarca yıl kalabilir (37, 44).

2.1.4. Kurşunun Toksisite Mekanizması

Kurşunun toksik etkilerini açıklamak için birçok toksisite mekanizması ortaya konulmuştur. Bazı toksisite mekanizmaları diğerlerinden daha iyi aydınlatılmış olmakla birlikte ortaya atılan bazı toksisite mekanizmaları ise daha fazla araştırma ve doğrulama gerektirmektedir (45). Çeşitli antropojenik aktiviteler sonucu olarak çevrede her yerde bulunan toksik bir metal olan Pb'nin hematopoetik sistem (diğer tüm hücreleri de etkileyen “hem” sentezinin inhibisyonu dahil olmak üzere), gastrointestinal sistem, kardiyovasküler sistem, böbrek, karaciğer, sinir sistemi, endokrin sistem ve bağışıklık sistemi, dişi ve erkek üreme sistemi de dahil olmak üzere vücuttaki birçok organ sistemlerini etkilediği bilinmektedir (15, 25). Pb'nin tüm bu sistemik etkilerinin altında yatan mekanizmalar ise henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Pb toksisite mekanizmasının en makul nedeni serbest radikal hasarı olarak açıklanabilmektedir (16). Buna ek olarak, Pb, sülfidril (SH) gruplarına ve elektron verici gruplara karşı genel olarak güçlü bir afiniteye sahiptir, böylelikle birçok proteine bağlanarak ve bu proteinlerin fonksiyonlarını etkileyerek insan fizyolojisi ile iki önemli şekilde etkileşime girmektedir (46). Yıllar boyunca yapılan biyokimyasal çalışmalar ile, Pb'nin tiyol içeren enzimleri ve proteinleri inhibe ederek insan metabolizmasını modifiye ettiği kanıtlanmıştır (29). İki değerlikli bir katyon olan Pb, birçok düzeyde çeşitli hücre sinyal yollarını etkileyen Ca'nın yerini alabilir (16). Ca ve Zn gibi diğer iki değerlikli katyonlara benzerliği nedeniyle, Pb bu katyonlar tarafından düzenlenen ve bu katyonların aracılık ettiği pek çok hücresel süreç ile etkileşime girer. İnsan vücudunda esansiyel olan, elektron verici grupların

ve iki değerlikli katyonların vücutta bulunması nedeniyle, Pb toksisitesinin patofizyolojisi oldukça karmaşık hale gelmektedir ve hemen hemen her organ sistemini etkilemektedir (46). Pb toksisitesinin vücuttaki moleküler seviyedeki etkisi çoğunlukla bilinmemektedir ve çeşitli sistemik etkilere neden olan Pb maruziyetinin moleküler temeli kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. Bununla birlikte, bir neden, DNA metilasyonunu değiştiren serbest radikal hasarına bağlı olabilir (37, 47).

2.2. Kurşun Maruziyetinin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Kurşun, insan için hayati önem taşıyan organların ve dokuların zarar görmesine neden olacak şekilde pek çok biyolojik sistemde toksisiteye neden olan bir ağır metaldir (4). Pb, insan vücudundaki tüm sistemlerin çalışmasını bozmaktadır. Pb zehirlenmesi görülen kişilerde karmaşık bir klinik tabloya neden olur (45). Pb toksisitesinin klinik belirtileri, subklinik ve geç ortaya çıkan özelliklerden hayatı tehdit edici komplikasyonlara kadar çok çeşitli şekillerde olabilmektedir (20). Pb, önemli davranışsal ve nörolojik hastalıklara neden olmanın yanı sıra kusma, kasılmalar ve ensefalopati, koma veya ölüm gibi semptomlar oluşturan ksenobiyotik bir metal olarak bilinir (48). Akut Pb maruziyeti, Tablo 2.2.'de detaylı olarak sıralandığı şekilde iştah kaybı, baş ağrısı, hipertansiyon, karın ağrısı, böbrek fonksiyon bozukluğu, yorgunluk, uykusuzluk, artrit, halüsinasyonlar ve baş dönmesine neden olabilir. Bununla birlikte, kronik Pb maruziyeti ise zihinsel yetersizlik, doğum kusurları, psikoz, otizm, alerji, disleksi, kilo kaybı, hiperaktivite, felç, kas zayıflığı, beyin hasarı, böbrek hasarı ve hatta ölümle sonuçlanabilir (20).

Tablo 2.2. Kurşun zehirlenmesinin çocuklarda ve yetişkinlerde belirtileri ve semptomları (49).

Çocuklarda Pb Zehirlenmesinin Belirtileri ve Semptomları	Yetişkinlerde Pb Zehirlenmesinin Belirtileri ve Semptomları
Gelişimsel bozukluklar	Hayati organ ve sistem disfonksiyonu
Daha düşük IQ puanı	Merkezi sinir sistemi bozuklukları
Öğrenme bozuklukları/daha düşük Akademik yetenekler	Bilişsel fonksiyonda azalma
Davranışsal problemler	Kardiyovasküler bozukluklar
Göz, burun, boğaz ve solunum sistemi mukozasında tahriş	Renal toksisitede artış
Akciğer fonksiyonunda azalma	Hipertansiyon
Nörolojik kusurlar	Günlük yaşam aktivitelerini gerçekleştirme yeteneğinde azalma
Sözel yeteneklerde azalma	Hafıza kaybı
Bilişsel fonksiyonda azalma	Yorgunluk
Baş ağrısı	Baş ağrısı
Mide krampları	Uykusuzluk
Yorgunluk	Libidoda azalma
Hafıza kaybı	Depresyon
Hipertansiyon	

Kurşun toksisitesinin kronik maruziyette ortaya çıkan önemli belirteçlerinden bir tanesi de Şekil 2.2.'de gösterildiği şekilde genellikle üst çenede olmak üzere diş etinde ince mavimsi renk değişikliği olarak bilinen Burton çizgisidir. Bu durum, dolaşımdaki Pb ve sülfürlerin (kolon bakteriler tarafından salgılanan) arasındaki reaksiyonun diş etleri boyunca PbS şeklinde birikmesinin ortaya çıkmasından kaynaklanır. Burton çizgisi, Pb toksisitesi tanısından şüphelenmede potansiyel bir ipucu olarak kullanılabilir (50).



Şekil 2.2. Burton çizgisi, Pb toksisitesinin oral belirtisi (51).

Kurşun üzerine yürütülen epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar, erişkinlerde kronik Pb maruziyetinin $10 \mu\text{g/dL}$ kadar düşük kan Pb konsantrasyonlarında bile böbrek fonksiyonlarının bozulmasına, yüksek kan basıncına, sinir sistemi toksisitesine ve nöro-davranışsal etkilere neden olabildiğini göstermektedir. Ayrıca yürütülen çalışmalar, yaşamın ilerleyen dönemlerinde ortaya çıkan bilişsel işlev bozukluğunun doğum öncesi Pb maruziyeti ile ilişkili olduğunu göstermektedir. $20 \mu\text{g/dL}$ 'nin üzerindeki kan Pb konsantrasyonuna neden olan kronik maruziyet, bilişsel fonksiyonlar üzerinde belirtisiz etkilerin yanı sıra erkek üreme sistemini etkilemekte, sperm/semen kalitesini düşürerek infertilite problemlerine neden olabilmektedir. 20 ila $40 \mu\text{g/dL}$ arasındaki kan Pb konsantrasyonları, bilişsel yaşlanmanın yanı sıra görsel-motor koordinasyonunda aksaklıklar, reaksiyon sürelerinde düşme ve dikkat eksikliği ile ilişkilidir. Kan Pb konsantrasyonunun $40 \mu\text{g/dL}$ 'den daha yüksek olduğu durumlarda, işçiler baş ağrısı, yorgunluk, uyku bozukluğu, eklem ağrısı, kas ağrısı, anoreksi ve kabızlık gibi semptomlar yaşamaktadır. Günümüzde geçmiş yıllara kıyasla çok daha az görülse de işçilerde $60 \mu\text{g/dL}$ 'nin üzerinde kan Pb konsantrasyonu ile sonuçlanan yüksek Pb maruziyeti de söz konusu olabilmektedir. Bu çok yüksek kan Pb konsantrasyonlarında sağlık etkileri, konvülsiyonlar, koma ve bazı durumlarda ölüm gibi akut etkilerden anemi, periferik nöropati, interstisyel

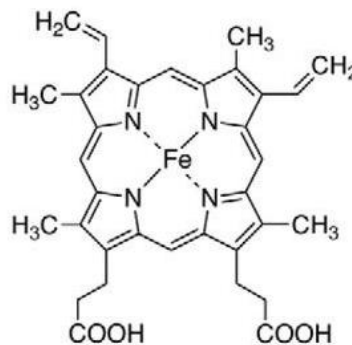
böbrek fibrozu ve ciddi karın krampı gibi kronik etkilere kadar değişebilmektedir (52).

Kurşun maruziyeti ile ortaya çıkan toksik cevaplar açısından genel nüfus ve işçiler arasında önemli farklılıklar vardır. Pb maruziyetinde bireylerin toksik cevabını, maruziyet derecesi, bireyin yaşı, alımı ve eliminasyonu etkileyecek şekilde bireyler arasındaki genetik farklılıklar veya maddenin toksik etkilerine karşı duyarlılık gibi faktörler etkileyebilir (53).

2.2.1. Kurşunun Hematolojik Sistem Üzerindeki Toksik Etkileri

Kurşuna uzun süreli maruziyetin hematolojik sistem üzerinde önemli toksik etkilerinin olduğu araştırmalar ile gösterilmiştir (54). Pb zehirlenmesi görülen işçilerinin önemli advers etkiler gösterdiği sistemlerden birisi hematolojik sistemdir (55). Kanda Pb konsantrasyonunun 10 µg/dL'nin altında olduğu durumlarda bile Pb'nin hematolojik sistem üzerindeki olumsuz sağlık etkileri tespit edilebilmektedir (24).

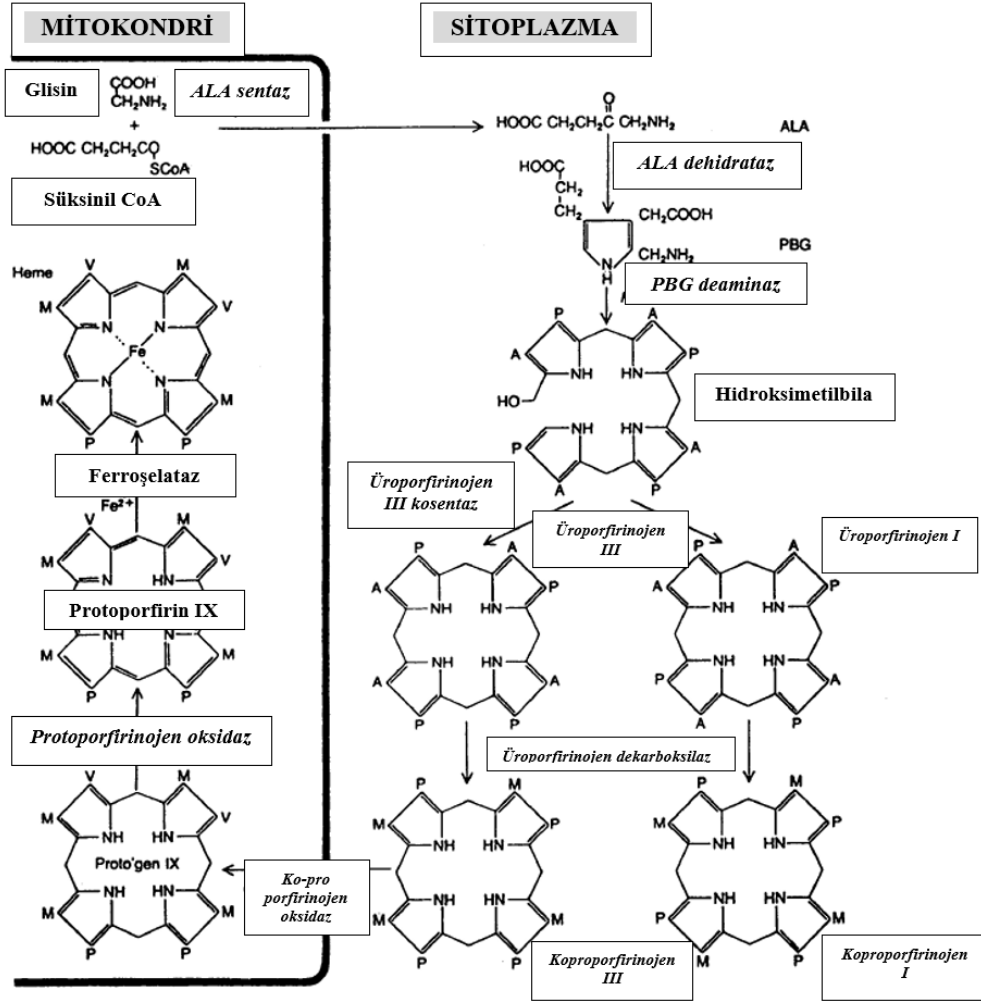
Kurşun toksisitesinin en iyi bilinen mekanizmalarından biri, Şekil 2.3.'te kimyasal yapısı gösterildiği üzere önemli bir demir-porfirin bileşiği olan ve hemoglobinin prostetik grubu "hem" in biyosentez yolağının bazı enzimleri ile Pb arasındaki etkileşim olsa da, Pb'nin hematolojik sistemi nasıl etkilediğine dair mekanizmanın detayları halen belirsizliğini korumaktadır (45, 54, 56).



Şekil 2.3. Demir-porfirin bileşiği olan "hem" in kimyasal yapısı (56).

"Hem", solunum, fotosentez, oksijen metabolizması ve taşınması gibi temel biyolojik süreçlerde görev alan birçok proteinin prostetik grubu olarak çalışır. Buna

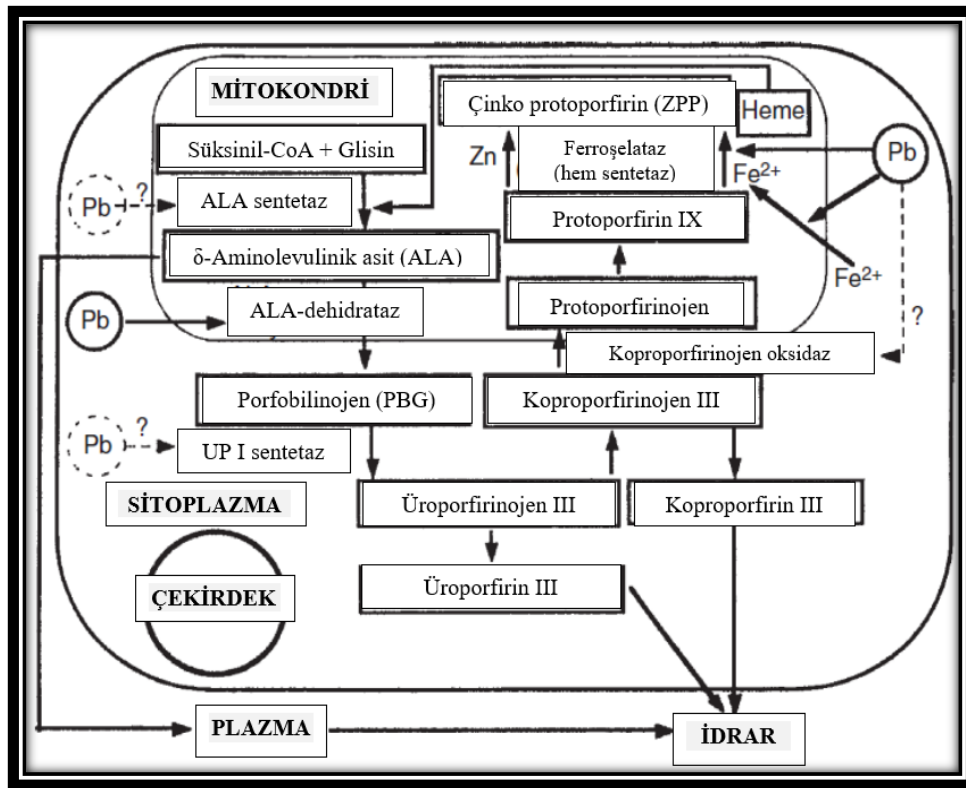
ek olarak, katalaz, peroksidaz ve sitokrom-P450 gibi enzimlerin temel kofaktörü olarak “hem” esas alınmaktadır. “Hem”, çoğu organizmada yüksek oranda korunmuş bir biyosentetik yolla sentezlenir. İnsanlarda, “hem” biyosentez yolağında meydana gelen kusurlar, porfiria adı verilen ciddi metabolik bozukluklara yol açar (57).



Şekil 2.4. “Hem” biyosentez yolağı. Aminolevulinik asit (ALA); koenzim A (CoA); porfobilinojen (PBG), A = -CH₂COOH; M = -CH₂; P = -CH₂CH₂COOH; V = -CH=CH₂ (58).

“Hem” biyosentezi, Şekil 2.4.’te gösterildiği üzere δ-aminolevulinik asit (ALA) oluşturmak üzere glisin ve süksinil-CoA’nın dekarboksilasyon ile kondensasyonu ile başlar. δ-aminolevulinat sentaz (ALA sentaz) için piridoksal fosfat koenzim olarak işlev görür, kondensasyon reaksiyonunu takiben koenzim-A ve glisinin karboksili kaybolur. SH sitozolik bir enzim olan ve delta-aminolevulinat

dehidrataz (ALAD) olarak da adlandırılan Porfobilinojen Sentaz (PBG sentaz), sitoplazmada PBG oluşturmak üzere 2 molekül δ -aminolevülinatın (δ -ALA) kondense olmasını katalize eder (59). ALAD enzimi, ağır metallere karşı yüksek afinite gösteren SH gruplarını içermektedir, bu nedenle Pb toksisitesinin önemli bir biyolojik göstergesidir (60). Reaksiyon mekanizması, iki lizin kalıntısı ve memeli enzimindeki bağlı katyon Zn^{++} olmak üzere aktif bölgede bağlı bir katyon içerir. İki δ -ALA substratının her biri aktif bölgeye bağlandıkça, bir Schiff bazı oluşturmak üzere keto grupları başlangıçta iki lizin kalıntısından birinin yan zincir amino grubu ile reaksiyona girer. Bu Schiff baz zincirleri, C-C ve C-N kondensasyon reaksiyonları sonrasında ALA amino gruplarına düzenlenen metal iyonu tarafından desteklenir. Hem biyosentezinde, sistein S ligandlarını içeren homo-oktomerik memeli PBG-sentaz enzimindeki Zn^{+2} bağlanma bölgeleri, Pb^{+2} 'i da bağlayabilir. PBG-sentazın Pb^{+2} tarafından inhibisyonu, hem sentezinin bozulması ve ALA sentaz geninin transkripsiyonunun baskılanmasıyla sonuçlanması sebebiyle kanda ALA değerinin yükselmesine neden olur (59).



Şekil 2.5. Kurşunun “hem” biyosentezi üzerine bilinen ve şüpheli etkileşimleri (15).

Kurşun, hem sentez yolağında, delta-aminolevulinat dehidrataz (ALAD), koproporfirinojen oksidaz (CPOX) ve ferroşelataz (FECH) olmak üzere üç enzimi büyük ölçüde inhibe edebilmektedir (29). Pb'nin "hem" sentezi yolağında önemli rolleri olan enzimler üzerindeki inhibitör etkisi sebebiyle kronik Pb zehirlenmesine bağlı olarak "hem" sentezi bozulur. Dolayısıyla hemoglobinin üretimi inhibe olur ve kırmızı kan hücrelerinin sayısı azalır, buna bağlı olarak da retikülositoz ve anemi riskinde artış meydana gelir. Bunun yanı sıra, yine Pb absorpsiyonu ile ortaya çıkan Fe eksikliğine bağlı olarak kansızlık görülebilir. Kronik Pb maruziyeti ile ilişkilendirilen anemi, kurşunun hem "hem" biyosentezini etkilemesi hem de kırmızı kan hücrelerinin yaşam sürelerinin kısaltılmasının bir sonucudur (4, 55). Buna ek olarak Pb, sadece kırmızı kan hücrelerinin sayısını ve fonksiyonlarını değil aynı zamanda trombosit ve lökosit içeriğini de etkileyerek immün sistemi baskılar (24). Kan Pb düzeyinin yüksekliği ile düşük hemoglobin (HGB) ve hematokrit (HCT) düzeyleri arasında ilişki olduğu belirlenmiştir (61). Pb maruziyetine bağlı olarak HGB ve HCT seviyesindeki azalmaya, eritrofagositoz, hemoliz ve kırmızı kan hücrelerinin kırmızı kan hücrelerinin splenik sekestrasyonu veya bozulmuş eritropoezis neden olabilir (24).

2.2.2. Kurşun Toksisitesi ve ALAD Enzimi Polimorfizmi

Kurşun toksisitesini bireyin genetik durumu doğrudan etkilemektedir. Pb absorpsiyonunu ve depolanmasını etkileyen genler (toksikokinetik faz) ve Pb'nin toksik etkilerini değiştiren genler (toksikodinamik faz) olmak üzere bireyin sahip olduğu belirli genlerin Pb toksisitesi üzerine önemli etkisi olmaktadır. Pb toksikokinetiğinde ve/veya toksikodinamiğinde önemli rol oynayan, aşağıda fonksiyonları özetlenen bir dizi gen ve bu genleri kodlayan protein tanımlanmıştır:

- **δ-aminolevulinik asit dehidrataz (ALAD)**, eritrositlerde Pb'nin %80'ini bağlayan "hem" biyosentez yolağındaki önemli bir enzimdir,
- **hemokromatoz (HFE)**, hücrel Fe ve Pb dahil diğer iki değerlikli metallerin alımını düzenleyen bir zar proteindir,
- **hem oksijenaz-1 (HMOX1)**, "hem" degradasyon enzimidir ve Pb tarafından indüklenen inflamatuvar ve oksidatif stres üzerinde önemli bir rol oynar,

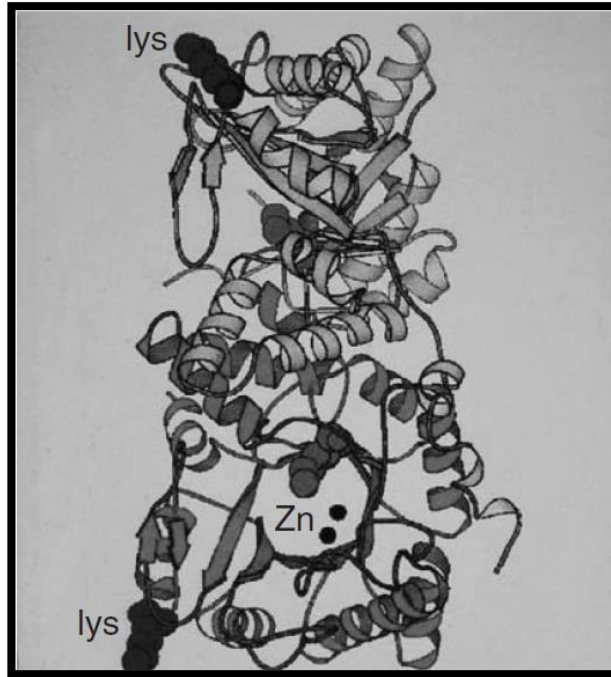
- **vitamin D reseptörü (VDR)**, kan ve kemik tarafından Pb absorpsiyonunu etkileyen Ca homeostazında rol oynar,
- **apolipoprotein E (APOE)**, lipid metabolizmasını etkiler, kandaki Pb konsantrasyonlarını düşürür ve antioksidan özelliğe sahiptir,
- **glutasyon S-transferazlar (GSTs)**, hücrel makromolekülleri reaktif elektrofollere karşı koruyan Faz-II detoksifikasyon izoenzim ailesinden, termodinamik olarak stabil bir kompleks oluşturmak için Pb ve glutasyon konjugasyonunu katalizlemede yer alır, Pb biyoyararlanımını azaltır ve düşük oksidatif stres yoluyla Pb toksisitesine karşı korur (62).

Yüksek miktardaki Pb düzeyi, hemoglobin sentezinde önemli bir rol oynayan ALAD enzimini inhibe edebilir. Bu enzimin etkinliğinin inhibisyonu, kan ve idrardaki nörotoksik aminolevulinik asit düzeylerini artırır. ALAD enziminin Pb iyonlarına yüksek duyarlılığı olması sebebiyle, insanlarda Pb maruziyetini değerlendirmek için ALAD enzim düzeyleri bir biyobelirteç olarak kullanılır (63). *ALAD* sadece kırmızı kan hücrelerinde değil, vücuttaki bütün hücrelerde eksprese edilir. Bu nedenle, *ALAD* polimorfizminin, tam kandaki ve belki de idrardaki konsantrasyonlar dahil olmak üzere Pb'nin toksikokinetiğini etkileyebileceğine inanmak için sebepler vardır. Gerçekten de yayınlanan veriler, yüksek Pb maruziyetinde *ALAD*₂ taşıyıcılarının *ALAD*₁ homozigotlarından daha yüksek BPb'ye sahip olduğunu, düşük maruziyette ise hiçbir fark olmadığını göstermektedir (64).

Bireylerin Pb toksisitesine duyarlılık bakımından büyük ölçüde farklılık gösterdiği bilinmektedir ve genetik yapı çoğu zaman bu tür bir varyasyonun olası nedeni olarak belirtilmiştir (65). Pb zehirlenmesinde önemli hedeflerden biri olan ALAD enzim genindeki polimorfizm, bireylerin Pb toksisite semptomlarına cevaplarını etkileyebilmektedir (59). ALAD, Pb maruziyetindeki genetik farklılıkların anlaşılması açısından önemli enzimlerden biridir (66).

ALAD geni, 9q34 kromozomunda bulunur ve yaklaşık 16 kilobaz uzunluğundadır. *ALAD* geni, hem'in öncüsü olan monopirol porfobilinojeni oluşturmak için iki aminolevulinik asit molekülünün asimetrik eklenmesini içeren "hem" biyosentezindeki ikinci adımı katalize eden polimorfik ALAD enzimini (Şekil 2.6.) kodlar (67, 68). Battistuzzi ve ark. tarafından 1981 yılında Pb ve ALAD arasındaki etkileşimine ek olarak ALAD'ın polimorfik bir enzim olduğunu

göstermiştir (69). Birçok çalışma, ALAD enzimini kodlayan gen polimorfizminin, Pb toksikokinetiğinin değiştirilmesinde rol oynadığını ortaya koymuştur. Pb toksisitesi bağlamında en çok çalışılan polimorfizm, ekzon 4'te yer alan *ALAD* G177C (dbSNP ID: rs1800435) varyantıdır. *ALAD* G177C'nin *ALAD*₁ ve *ALAD*₂ olmak üzere iki ko-dominant aleli bulunmaktadır (29). *ALAD*₁ ve *ALAD*₂ alelleri, Pb toksisitesine duyarlılıkla ilişkilendirilmiştir. Bu iki alel, yapısal olarak birbirine benzeyen, aynı mekanizmayla etki gösteren, ancak farklı yüklere sahip 1-1, 1-2 ve 2-2 olarak adlandırılan üç izozim oluşturur. *ALAD*₂ aleli, kodlama bölgesinin 177. pozisyonunda G→C transversiyonu içerir, bu durumda 59. amino asitte lizin yerine asparajinin yer değiştirmesiyle sonuçlanır (70). Bu süstitüsyonun, *ALAD*₂'nin Pb için artan bir afiniteye sahip olmasına neden olduğu düşünülmektedir (71). Beyaz popülasyonun birçoğunda *ALAD*₁ ve *ALAD*₂ alellerinin sıklığının sırasıyla 0.9 ve 0.1 olduğu tahmin edilirken, Asya ve Afrika popülasyonlarında *ALAD*₂ alel sıklığı düşüktür (65).



Şekil 2.6. δ -aminolevulinik asit dehidrataz (ALAD; porfobilinojen sentaz) enziminin kristal yapısı (maya ve *Pseudomonas aeruginosa* homologlarının yapısına dayanarak). İnsan homo-oktamer dimeri gösterilmektedir. İki aktif bölge Zn (II) alt monomerde gösterilmektedir. Amino asit 59 *ALAD*₁'de lizin; *ALAD*₂'de asparajin olarak görülmektedir (15).

ALAD₁ (59Asn) geni, *ALAD₂*'den (59Lys) daha fazla elektronegatif olduğundan, *ALAD_{1-2/2-2}* Pb'yi *ALAD₁₋₁*'den daha sıkı bağlayabilir (68). Sonuç olarak, enzimin elektronegatif özelliği, Pb için afinitesini artırmaktadır. Bununla birlikte, Pb seviyeleri ve *ALAD*'ın genetik varyantları arasındaki ilişkideki tutarsızlıklar yıllar boyunca tartışılmaktadır (29). *ALAD* sadece kırmızı kan hücrelerinde değil, vücuttaki bütün hücrelerde eksprese edilir. Bu nedenle, *ALAD* polimorfizminin, tam kandaki ve belki de idrardaki konsantrasyonlar dahil olmak üzere Pb'nin toksikokinetiğini etkileyebileceğine inanmak için sebepler vardır. Gerçekten de yayınlanan veriler, yüksek Pb maruziyetinde *ALAD₂* taşıyıcılarının *ALAD₁* homozigotlarından daha yüksek BPb'ye sahip olduğunu, düşük maruziyette ise hiçbir fark olmadığını göstermektedir (64).

2.2.3. Kurşunun Nörolojik ve Nörotoksik Etkileri

Kurşun, hem çocuklar hem yetişkinler için potansiyel olarak tehlikelidir ve toksisitesinin ana hedef organı esas olarak merkezi sinir sistemidir (72). Pb maruziyeti, ağır metal maruziyetleri arasında insanlarda önemli nöropsikolojik ve fonksiyonel düşüşe yol açabilen en yaygın maruziyetlerden biridir (73). İnsanlarda kronik Pb maruziyeti akut Pb maruziyetinden daha yaygındır, genellikle baş ağrısı, sinirlilik, karın ağrısı ve nörolojik belirtiler olarak kendini gösterir. Kronik Pb ensefalopatisi, genellikle uykusuzluk, zayıf dikkat süresi, kusma, konvülsiyonlar ve koma ile karakterizedir. Çocuklarda Pb ensefalopatisi, uyuşukluk, zihinsel donukluk, kusma, sinirlilik ve anoreksi ile karakterizedir; ciddi vakalarda, Pb'ye uzun süreli maruziyet bilişsel işlevi azaltabilir ve davranış bozukluklarını, özellikle saldırganlık ve hiperaktiviteyi artırabilir (74). Beynin prefrontal serebral korteks, hipokampus ve serebellumundaki Pb hasarı, zeka geriliği, davranış sorunları, sinir hasarı ve muhtemelen Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve şizofreni gibi çeşitli nörolojik bozukluklara sebep olur (75). Maruziyet türüne bağlı olarak, nörotoksik maruziyet, merkezi sinir sistemi hasarına, duygulanım bozukluklarına ve/veya nörobilişsel bozulmalara neden olabilir (73).

Çocuklarda, Pb'nin çevresel maruziyeti sonucu ortaya çıkan yüksek kan Pb seviyesi, çocukların zeka katsayı puanında (*intelligence quotient*, IQ) konsantrasyona bağlı bir düşüşe ve buna bağlı olarak potansiyel olarak geri dönüşü olmayan bilişsel

ve davranışsal eksikliklere neden olabilir. Buna ek olarak, son araştırmalar prenatal ve çocukluk dönemi Pb maruziyetinin yaşlılık döneminde nörodejenerasyonu indükleyebildiğini ve Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve amiotrofik lateral skleroz için bir risk faktörü olduğunu tespit etmiştir (76). Pb'nin Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve şizofreni gibi insan yaşamının çok daha sonraki evrelerinde ortaya çıkan bozuklukların başlangıcını nasıl etkilediği hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Bu hastalıkların karmaşık patofizyolojileri düşünüldüğünde, Pb maruziyetinin, kalıtsal ve çevresel faktörler de göz önüne alınarak bu hastalıkların tetiklenmesine neden olan diğer faktörler arasında yer aldığı düşünülmektedir (77). Yapılan çalışmalarda, mesleki ve çevresel Pb maruziyeti ile azalan bilişsel yetenekler ve nöro-davranışsal performans ilişkilendirilmiştir (78). Yetişkinlerin uzun süreli Pb maruziyeti, sinir sisteminin işlevlerini ölçen bazı testlerde performansın düşmesine neden olmuştur (72).

Kurşunun insan vücudundaki varlığı, çeşitli mekanizmalar yoluyla sinir sisteminde hasara neden olur. Sinir sistemi üzerindeki doğrudan etkiler, morfolojik veya farmakolojik olarak sınıflandırılabilir (73). Pb oksidatif stres üretebilir, kan-beyin bariyerini bozabilir ve gelişmekte olan ve yetişkin hayvanlarda merkezi sinir sistemi üzerinde nitrik oksit sentezini içeren fizyolojik süreçler dahil olmak üzere birçok Ca^{+2} bağımlı süreci değiştirebilir (74).

Oksidatif stres, Pb'nin toksik etkilerini gösterdiği başlıca mekanizmalarındandır. Nispeten zayıf antioksidan savunması, yüksek oranda oksijen kullanımı, yüksek miktarda Fe içeriği ve ayrıca reaktif oksijen bileşikleri (*reactive oxygen species*, ROS) üretimine bağlı olarak nörotransmitter seviyelerinde değişikliklere yol açabilecek aşırı çoklu doymamış yağ asitlerinin mevcudiyeti nedeniyle beynin oksidatif hasara karşı yüksek derecede duyarlı olduğu yaygın olarak rapor edilmektedir (48).

Kurşun toksisitesinde, Ca^{+2} , Fe^{+2} ve Zn^{+2} dahil olmak üzere çok çeşitli önemli biyomoleküllerdeki diğer iki değerli katyonların Pb^{+2} ile yer değiştirmesi önemli rol oynamaktadır. Merkezi sinir sistemindeki nörotransmitterlerin işlevi için önemli olan voltaj kapılı Ca^{+2} iyon kanalları ve dopamin reseptörleri Pb'nin bazı önemli biyolojik hedefleri arasında bulunmaktadır (77). Pb, beynin farklı bölgelerinde nöral nitrik oksit sentazın (*neuronal nitric oxide synthases*, nNOS) ve endotelial nitrik oksit

sentazın (*endothelial nitric oxide synthases*, eNOS) aktivitesini ve ekspresyonunu değiştirebilir, çünkü Pb, bağlanma yerlerinde Ca^{+2} 'yı taklit edebilir, bu bağlanma Ca^{+2} 'nın nitrik oksit sentaza (*nitric oxide synthases*, NOS) erişilebilirliğini önleyebilir, böylece nNOS/eNOS aktivitesinin azalmasına yol açarak beynin farklı bölgelerinde düşük NO üretimi söz konusu olur. Diğer çalışmalar da hipokampus, serebral korteks ve serebellumdaki NOS aktivitesinin Pb maruziyeti ile önemli ölçüde inhibe edildiğini göstermiştir. Bu inhibe edici etkinin derecesi, maruziyet süresine ve Pb konsantrasyonuna bağlıdır; ancak bu birikim, belirli bölgelerde NOS kalsiyum-bağımlı aktivitesinin inhibisyonunu açıklamaz (74). Süt içmek (günde yaklaşık 700 mL), Pb'nin kurşunun periferik nörotoksitesine karşı koruma sağlayabilir (77).

2.2.4. Kurşunun Renal Sistem Üzerindeki Toksik Etkileri

Kurşun, iyi bilinen bir nefrotoksindir ve yüksek miktarda Pb maruziyeti böbrek fonksiyonlarının bozulmasına ve böbrek yetmezliğine neden olabilir (79). Pb tarafından zarar gören organlar arasında yer alan böbrek, başlıca eliminasyon ve boşaltım organı olması sebebiyle Pb'nin toksik etkisine karşı özellikle hassastır (7). Düşük düzeyde çevresel Pb maruziyeti de dahil olmak üzere Pb maruziyeti kronik böbrek yetmezliği gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (80). Kurşun nefrotoksitesisi, proksimal tübüler nefropati, glomerüler skleroz ve interstisyel fibröz şeklinde ortaya çıkabilmektedir (81).

Kurşun maruziyeti, diğer etkilerin yanı sıra *N*-asetil- β -d-glukozaminidaz (U-NAG) ve albümin (U-ALB) atılımının artmasıyla böbrek fonksiyon bozukluğuna da neden olur. Pb'nin böbrek fonksiyonu üzerindeki etkilerinin potansiyel modifikasyonuna ilişkin çalışmalar sınırlıdır ve çeşitli sonuçlar bulunmaktadır. Ayrıca, *ALAD*₂'nin kan basıncı artışı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (64). Kurşun maruziyetine bağlı nefrotoksitesinin araştırıldığı kapsamlı bir çalışmada, Pb'nin, özellikle hipertansiyon ve diyabet gibi diğer hastalıkları olan insanlarda, 5 μ g/dL'nin altındaki kan Pb seviyelerinde bile nefrotoksitesiteye katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, Pb maruziyeti olan işçilerin mesleki mortalite çalışmalarında, nispeten nadir görülen bir ölüm nedeni olan böbrek hastalıkları ile tutarlı bir ilişki gösterilmemiştir (82).

Kurşunun neden olduğu nefrotoksisite için farklı mekanizmalar bildirilmiştir. Bu mekanizmalar arasında, oksijen türleri ile ilişkili olaylar dikkat çekicidir, bu olaylar: artmış ROS seviyelerini, biyolojik hedeflerdeki bozulmaları ve hücrel antioksidan metabolizmalarındaki bozuklukları içermektedir. Bu nedenle, Pb toksisitesine karşı terapötik seçenekler olarak antioksidanların kullanılması mantıklı görünmektedir (83).

2.2.5. Kurşunun Gastrointestinal Sistem Üzerindeki Toksik Etkileri

Çoğu durumda, diyet, elementlerin organizmamıza girdiği ana yoldur (84). Soluma, yutma ve deri yoluyla emilim, Pb maruziyetinin ana yoludur ve mesleki Pb maruziyetin birincil yolu solumadır (28). Kirlenmiş toprağın kazara yutulması, insanların, özellikle çocuklar için elden ağza faaliyetler yoluyla, Pb maruziyetinde önemli bir yol olarak kabul edilmiştir. Toprak alımını takiben gıda alımı, Pb'nin gastrointestinal sistemdeki biyoerişilebilirliğini etkileyebilir (38).

Kurşun zehirlenmesi ciddi vakalarında, çocuklar veya yetişkinler, akut karın ağrısı veya apandisit olarak teşhis edilebilecek karın ağrısı, şiddetli kramp, iştahsızlık, baş dönmesi, mide bulantısı, kusma, kabızlık ve metalik tat semptomları gösterir. Röntgen muayenesinde, pelvise inen genişlemiş mide ve ince bağırsak şişkinliği görülmüştür. Pb'nin bağırsak mikrobiyota disbiyozuna neden olduğu bildirilmiştir (85).

Kurşun toksisitesine, Fe^{+2} dahil olmak üzere çok çeşitli önemli biyomoleküllerdeki diğer iki değerlikli katyonların yerine Pb^{+2} 'nin geçmesi neden olur. Bağırsaklardan kan dolaşımına demir transportu için temel protein olan iki değerlikli metal taşıyıcı 1'in (*divalent metal transporter 1*, DMT1) yutulan Pb'yi taşıyabildiğine ve Fe^{+2} eksikliğinin bağırsak hücreleri tarafından Pb alımını arttırdığına dair kanıtlar vardır. Fe^{+2} düzeylerinin düşük olduğu koşullar altında, DMT1 aktivitesi, Fe^{+2} alımını artırmak için yukarı doğru düzenlenir ve muhtemelen Pb'nin de alımına yol açar (77).

2.2.6. Kurşunun İmmün Sistem Üzerindeki Toksik Etkileri

Ağır metal maruziyeti, otoimmünite yanı sıra immünotoksisite geliştirebilir. Otoimmün hastalıklar, bireyin kendi bağışıklık sisteminin bir veya daha fazla dokuya

veya organa saldırarak fonksiyonel bozukluk, inflamasyona ve bazen kalıcı doku hasarı ile sonuçlandığı hastalıklardır (86). İnsanda Pb maruziyetine bağlı olarak immün fonksiyonunun bozulduğu gösterilmekle birlikte, konuya ilişkin veri sayısı sınırlıdır (87). Pb, düşük çevresel konsantrasyonlarda ana bağışıklık hücrelerinde açık bir hasara neden olmamasına ve bağışıklık hücrelerinde rutin testlerle belirlenen eksikliklere yol açmamasına rağmen, bağışıklık hücrelerinin düzenlenmesini ve işlevini olumsuz yönde etkiler. Pb, beyinde ve tüm vücutta güçlü bir proinflamatuvar faktör olarak ayrıca işlev görebilir (88). Pb zehirlenmesi, hem immün sistemin baskılanması hem de potansiyalizasyonuna yol açabilmektedir (4).

Kurşun, hücre içi sinyal yollarının modülasyonu ve aktivasyonu ile inflamatuvar süreçleri indükleyebilir. Pb'nin, epidermal büyüme faktörü reseptörü (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) dahil olmak üzere hücre yüzeyi reseptörü tirozin kinazları aktive ettiği gösterilmiştir. EGFR, sadece hücre proliferasyonu, sağkalımı, migrasyonu ve farklılaşmasının modülasyondan sorumlu değil, aynı zamanda siklooksijenaz-2 ekspresyonunu arttırarak inflamatuvar yanıtı indüklemektedir. Buna ek olarak, mesleki Pb maruziyeti söz konusu olan bireylerde bazı pro-inflamatuvar sitokin düzeylerinde artış bildirilmiştir (89).

Kurşun toksisitesi, bazı hematopoetik sitokinlerin seviyelerinin değişmesi ile de ortaya çıkabilir. Yapılan bir çalışmada, kısa süreli mesleki Pb maruziyeti nedeniyle hematopoezi etkileyen interlökin (IL)-7, granülosit koloni uyarıcı faktör (*granulocyte colony stimulating factor*, G-CSF), hepatosit büyüme faktörü (*hepatocyte growth factor*, HGF), kök hücre faktörü (*stem cell factor*, SCF), platelet kaynaklı büyüme faktörü (*platelet-derived growth factor*, PDGF) ve platelet endotelial hücre adezyon molekülü 1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule 1*, PECAM-1) gibi seçilmiş sitokin düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir. Eşzamanlı olarak, hemoglobin seviyesi, beyaz kan hücresi sayısı (*white blood cell*, WBC) ve trombosit (*platelet*, PLT) indeksleri gibi kan hücresi indekslerinde de Pb kaynaklı değişiklikler gözlemlenmiştir (4).

In vitro Pb maruziyeti, hem B-hücresi hem de T-hücresi proliferasyonunu ve B-hücreleri tarafından majör histo-uyumluluk kompleksi (*major histocompatibility complex*, MHC) Sınıf II ekspresyonunu arttırmıştır. Bununla birlikte, CD4⁺ T-yardımcı (*T-helper*, T_H) hücrelerinin işlevi, immünotoksik Pb etkisine karşı özellikle

hassastır. T_H hücreleri, T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} ve T -düzenleyici (*T-regulatory*, T_{reg}) hücreleri dahil olmak üzere farklı alt kümelere ayrılabilir. T_{H1} aracılı yanıtlar, hücresel sitotoksik bağışıklığı teşvik eder ve interferon (IFN)-c, interlökin (IL)-2 ve IL-12'nin işleviyle ilişkiliyken, T_{H2} aracılı yanıtlar, hümmoral bağışıklıktan sorumludur ve IL-4, IL-5 ve IL-13 işleviyle ilgilidir. Her iki yanıt türü arasındaki Pb kaynaklı dengesizlikler, B-hücreleri aktivitesini uyarabilir ve teorik olarak antikor aracılı otoimmün bozukluğun gelişmesine yol açabilir. Ayrıca, T_{H2} yanıtlarına doğru kayma, bazı patolojik ajanlara karşı artan duyarlılığa ve alerjik aşırı duyarlılığa katkıda bulunabilir. Deney hayvanlarında, Pb'nin hücresel ve hümmoral bağışıklık üzerindeki etkileri yazılı kanıtlara dayanmakla birlikte, Pb'nin kimyasal formuna, maruziyet yoluna, dozuna, maruziyet süresine ve bireyin yaşına ve genetiğine bağlı olarak deneysel çalışmaların sonuçları çelişkili görünmektedir (87).

Çevresel olarak kurşuna maruz kalan çocuklarda İmmünglobülin E (IgE) seviyelerinin arttığı bulunmuştur. Bu artışın, T_{H2} yanıtının artmasının bir sonucu olduğuna inanılmaktadır. Kurşun maruziyeti olan akü üretim işçilerinde de IgE düzeylerinde artış tespit edilmiştir (87).

2.2.7. Kurşunun Üreme Sistemi Üzerindeki Toksik Etkileri

Üreme bozuklukları başlıca küresel bir sağlık sorunudur ve DSÖ tarafından infertilite dünya çapındaki prevalansının ülkeler genelinde yaklaşık %4 ila %14 olmasıyla, dünya çapında bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir. Artan infertilitenin esas nedenlerinden biri, yaygın olan ve çok sayıda yoldan ortaya çıkan çevresel kirleticilere yüksek oranda maruziyettir. Ağır metaller, çevremizi etkileyen en önemli kontaminantlardan biridir. Kronik veya akut ağır metal toksisitesinin neden olduğu potansiyel sağlık bozuklukları, üreme toksisitesini de içermektedir (90).

Ağır metaller, dişi üreme sistemini olumsuz etkiler ve aynı zamanda bu tür toksik ağır metaller plasenta bariyerini kolayca geçebileceğinden hamile kadınlarda savunmasız büyüyen fetüsü de etkiler. Pb'nin plasentaya girme riski kadmiyumdan (Cd) bile yüksektir ve implantasyon başarısızlığına neden olabilir. Doğum öncesi ölüm, implantasyondan önce veya sonra Pb maruziyetinden kaynaklanabilir (91). Meme kanseri, endometriyum kanseri, endometriozis ve spontan düşükler gibi

östrojene bağlı hastalıklar ile erken doğumlar, ölü doğumlar ve hipotrofi ile insanların farklı organlarında ve kanında bulunan ağır metal konsantrasyonu arasında potansiyel bağlantılar bildirilmiştir (90). Mesleki ve çevresel Pb maruziyeti de, büyümede, endokrin fonksiyonlarda, organ sistemlerinde değişiklikler ve üreme sistemi üzerine etkiler gibi çeşitli sağlık sorunlarıyla ilişkilendirilmiştir (92).

Bazı çalışmalar, Pb'nin potansiyel teratojenik etkisi yoluyla doğrudan spontan düşük için daha yüksek riske yol açabileceğini öne sürmüştür. Bu sonucun arkasındaki dolaylı nedenler, kanıta dayalı olarak insan sperminin kalitesi üzerinde Pb'nin advers etkileri veya arteriyel hipertansiyona bağlı olarak hormonal bozukluklara ve plasental vasküler bozukluklara neden olmasıdır (90). Kurşun maruziyeti, spermatogenezi bozabilir ve düşük semen kalitesine neden olabilir, ancak bu etkilerin altında yatan mekanizmalar henüz belirlenmemiştir (93).

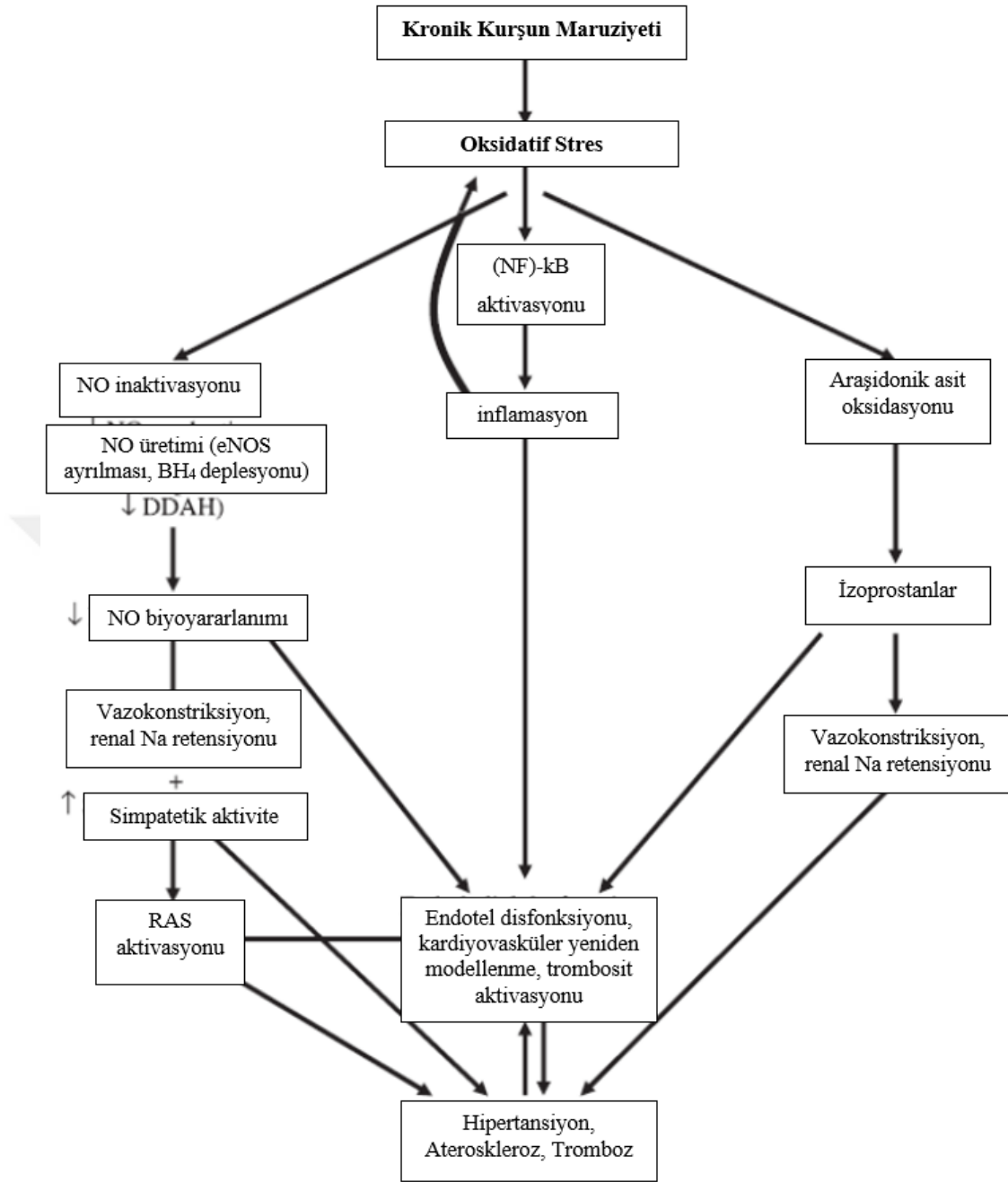
Birçok prelinik ve klinik çalışma, Pb'nin kadın üreme sağlığı üzerindeki zararlı etkisini kanıtlamıştır. Uzun bir geçmişe dayanan bir çalışma, 30 gün boyunca 5 µg Pb asetat verilen dişi sıçanlarda östrojen döngüsünde düzensizlik bildirilirken, 30 gün boyunca 100 µg Pb asetat ile verilen dişi farelerde kalıcı vajinal östrus ve korpus luteum sayısında azalma ile birlikte yumurtalık foliküler kistlerinin büyümesi bildirilmiştir. Başka bir çalışmada, yetişkin sağlıklı dişi sıçanlarda 28 gün boyunca 30, 100 ve 300 mg L⁻¹'de içme suyunda Pb asetat verildikten sonra endometriyum ve miyometriyumda doza bağlı Pb ile indüklenen patofizyolojik değişiklikler bildirilmiştir (91).

Deneyssel hayvan çalışmalarında, Pb maruziyetinin testis atrofisine, yardımcı bezlerin ağırlıklarında değişikliklere, semen kalitesinde değişikliklere ve hipotalamus-testis hipofiz ekseninin bozulmasına yol açabileceğini gösterilmiştir. TE sentezinin baskılanmasına neden olduğundan Leydig hücreleri Pb maruziyeti için bir hedef gibi görünürken, Sertoli hücre fonksiyonu Pb maruziyetinden etkilenmiş gibi görünmemektedir. Pb, tercihen epididimis ve diğer yardımcı bezlerde birikir. Bununla birlikte, bu çalışmaların büyük çoğunluğunun bulguları, insanın mesleki ve çevresel maruziyet koşullarından (sigara içme dahil) önemli ölçüde farklı olan, enjeksiyonla uygulanan tek, büyük dozda Pb (ve/veya kadmiyum) maruziyetine dayanmaktadır (94). Sigara içen kadınlarda da, insan endometriyumunda artan Pb seviyeleri gösterilmiştir. (90).

Mesleki maruziyet araştırmalarında, kandaki Pb seviyesi sürekli olarak azalan sperm sayısı, zayıf sperm hareketliliği ve anormal sperm morfolojisi ile ilişkilendirilmiştir (94). Mesleki Pb maruziyeti olan erkeklerin eşlerinde kısırlık ve gebelik gecikmesi riskinde artış; çevresel Pb maruziyeti görölen genç kızlarda puberte gelişiminde ve büyümesinde gecikme; prenatal yüksek kan Pb seviyesi erken doğum, baş çevresi ve tepe-topuk uzunluğu düşüklüğü; yüksek kan ve kordon Pb seviyesi olan annelerin düşük doğum ağırlığı olan bebeklere sahip olmaktadır ve kordon Pb seviyeleri ile doğum uzunluğu arasında negatif bir ilişki; kan Pb seviyesi ≥ 10 $\mu\text{g/dl}$ olan hamile kadınlarda üç kat daha yüksek riskli erken doğum ve dört kat küçük gestasyonel yaş doğumu; kadınlara Pb maruziyetinde spontan düşük riski, ancak kan Pb düzeyi (< 5 $\mu\text{g/dl}$) spontan düşük için bir risk faktörü değildir; düşük ila orta düzeyde Pb maruziyetinde spontan düşük riski görölmektedir (92).

2.2.8. Kurşunun Kardiyovasküler Sistem Üzerindeki Toksik Etkileri

Kurşun ve diğer ağır metaller gibi çevresel toksik maddelerin, kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olduğu bilinmektedir. Kardiyovasküler sistem üzerindeki etkiler ile Pb'nin potansiyel olarak ilişkisi böbrek fonksiyonunda azalma, oksidatif stres ve inflamasyonun indüklenmesi, nitrik oksit sinyalizasyonunda bozulma, renin-anjiyotensin sisteminin yanı sıra endotel disfonksiyonu gibi birçok hücresel ve moleküler mekanizma ile açıklanabilir (13, 62). Mesleki maruziyet koşullarında, hipertansiyon gelişimi Pb maruziyetinin neden olduğu nefropatinin olası bir sonucu olarak ortaya çıkabilmektedir (95). Pb'nin indüklediği hipertansiyon ve kardiyovasküler komplikasyonların patogeneğinde oksidatif stresin katılabileceği potansiyel mekanizmalar ise şekil 2.7.'de özetlenmiştir.



Şekil 2.7. Kurşunun indüklediği hipertansiyon ve kardiyovasküler komplikasyonların patogeneğinde oksidatif stresin katılabileceği potansiyel mekanizmalar (96). Na: sodyum, NO: nitrik oksit.

Hipertansiyon hem çevresel hem de genetik faktörlerle ilişkili çok yönlü bir patolojik durumdur; bu nedenle Pb maruziyeti kaynaklı hipertansiyon mekanizmaları iyi karakterize edilmemiştir. Bir hipotez, Pb'nin böbrek üzerindeki doğrudan etkileri yoluyla hipertansiyonu tetiklediğidir. Başka bir hipotez, atardamarlarda Pb

birikmesinin, hipertansiyona neden olan damar sertliğe yol açtığıdır. Pb'nin hem insan aortunda biriktiği hem de yaşlanma ile oluşan nabız basıncındaki artışa katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Artan damar sertliğinin ayrıca yüksek sistolik kan basıncını indüklediği ve nabız basıncını arttırdığı bilinmektedir (65).

Nitrik oksit (NO) biyoyararlanımının bozulması ile karakterize edilen endotel disfonksiyonu, hem hipertansiyon hem de kardiyovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörüdür. Kanıtlar, endotel NO'nun kan basıncını düzenlemede önemli bir rol oynadığını ve bozulmuş NO biyoaktivitesinin hipertansiyonun önemli bir bileşeni olduğunu göstermektedir. Endotelial NO sentaz geninin bozulduğu fareler, kontrol hayvanlarına kıyasla yüksek kan basıncı seviyelerine sahiptir, bu da bozulmuş NO biyoaktivitesi ve hipertansiyon arasındaki ilişkide genetik bir bileşeni düşündürmektedir (97). Pb'nin vasküler sinyal yollarını etkileyerek kan basıncını değiştirmesi de mümkündür. Pb maruziyetinin, endotel NO üretimini önemli ölçüde inhibe ettiği ve ayrıca oksidatif stresi artırarak NO aktivasyonuna neden olduğu ve böylece NO kullanılabilirliğini azalttığı bildirilmiştir (65).

Çok sayıda hayvan çalışması, Pb ile ilişkili hipertansiyonun patogenezinde Pb kaynaklı oksidatif stresin önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur (96). Pb'nin indüklediği oksidatif strese bağlı olarak lipid peroksidasyonu ortaya çıkmış, temel bileşeni yağ asidi olan hücre zarında membran bütünlüğü, geçirgenliği ve fonksiyonunda değişiklikler meydana gelmiştir (41).

Epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar Pb maruziyetinin hipertansiyon riskini arttırdığını göstermiştir. Diğer araştırmalar, Pb maruziyetinin iskemik kalp hastalığı, kalp ve kan damarlarında fonksiyonel rahatsızlıkların oluşması için bir risk faktörü olduğuna dair güçlü kanıtlar sağlamıştır (25). Yüksek düzeyde Pb maruziyeti olan işçilerde ve hayvanların uzun süreli yüksek dozda Pb'ye maruz kaldığı deneysel çalışmalarda Pb'nin hipertansif etkileri bildirilmiştir (95). Çok sayıda insan ve hayvan çalışması ile düşük seviyede Pb maruziyeti ve hipertansiyon arasında nedensel bir ilişki gösterilmiştir (41). Kardiyovasküler hastalıkların başlangıcı ile ilişkili artmış kan basıncı, Pb maruziyetiyle ilişkilendirilmiştir (95). Mesleki maruziyet üzerine yapılan birçok çalışma, 40 µg/dl'den daha yüksek kan Pb seviyesinin artmış kan basıncı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (65). Pb'nin, ≤ 0.5

$\mu\text{mol/L}$ ortalama kan Pb seviyesinde kan basıncında artışa neden olduğu belirlenmiştir (15).

2.2.9. Kurşun ve Karsinojenite

Hayvan deneylerinde Pb'nin karsinojen olduğu gösterilmiş olmakla birlikte, insanlarda karsinojenik potansiyeline ilişkin kanıtlar sınırlıdır (15). Deney hayvanlarında yapılan çalışmalar, Pb bileşiklerin içerdiği Pb bileşeninin kanser oluşturan süreçler için kritik olduğunu göstermiştir (12).

Mesleki Pb maruziyeti olan işçiler arasında mide ve akciğer kanseri için bir risk artışı olduğunu düşündüren kanıtlar göz önünde bulundurularak IARC inorganik Pb bileşiklerini insanlar için muhtemel kanserojen (Grup 2A) olarak sınıflandırılmakla birlikte, organik formu insanlar için kanserojenliğine göre sınıflandırılmaz (Grup 3) olarak sınıflandırmaktadır (22). Bununla birlikte, Pb'nin insanlarda kansere neden olduğuna dair kesin bir kanıt yoktur. Yüksek dozlarda bir çeşit Pb bileşiğinin verildiği ratlarda ve farelerde böbrek tümörü gelişmiştir. Amerika Sağlık ve İnsan Hizmetleri Bölümü (*The Department of Health and Human Services, DHHS*), Pb ve Pb bileşiklerinin, insanlarda yapılan çalışmalardan elde edilen sınırlı kanıtlar ve hayvan çalışmalarından elde edilen yeterli kanıtlara dayanarak orta derecede insan kanserojeni olarak öngörülebileceğini belirlemiştir. Amerika Çevre Koruma Ajansı (*Environmental Protection Agency, EPA*), Pb'yi olası bir insan kanserojeni olarak belirlemiştir (72).

Kurşun maruziyeti olan işçilerde yürütülen sitogenetik çalışmalarının çoğu, kromozom sapmaları veya kardeş kromatid değişiminde artışlar olduğunu göstermiştir (98). Bir kanserojen olarak Pb'ye ait kanıtların çoğu, DNA onarımının inhibisyonu veya artan oksidatif stres ile serbest radikallerin oluşması gibi dolaylı mekanizmalara dayandırılmaktadır. Ayrıca, ALAD polimorfizm durumuna bağlı olarak, kişinin olası Pb maruziyetinden farklı düzeyde etkilenmesi de mümkün olmaktadır (61). δ -ALAD'ın Pb tarafından inhibe edilmesinden dolayı ROS oluşmaktadır. Bunun bir sonucu olarak, enolizasyon ve oto-oksidasyona uğrayan ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit (O_2^-) radikalini üreten ve aynı zamanda oksihemoglobin ile etkileşime giren δ -ALA birikimi artmaktadır. δ -ALA'nın son oksidasyon ürünü, 4,5-dioksovalerik asit olup DNA'daki guanin için etkili bir

alkilleyici ajandır. Potansiyel olarak genotoksik bileşik üretimi, Pb'nin metal-bağımlı DNA karsinojenitesi için olası bir mekanizmadır (99).

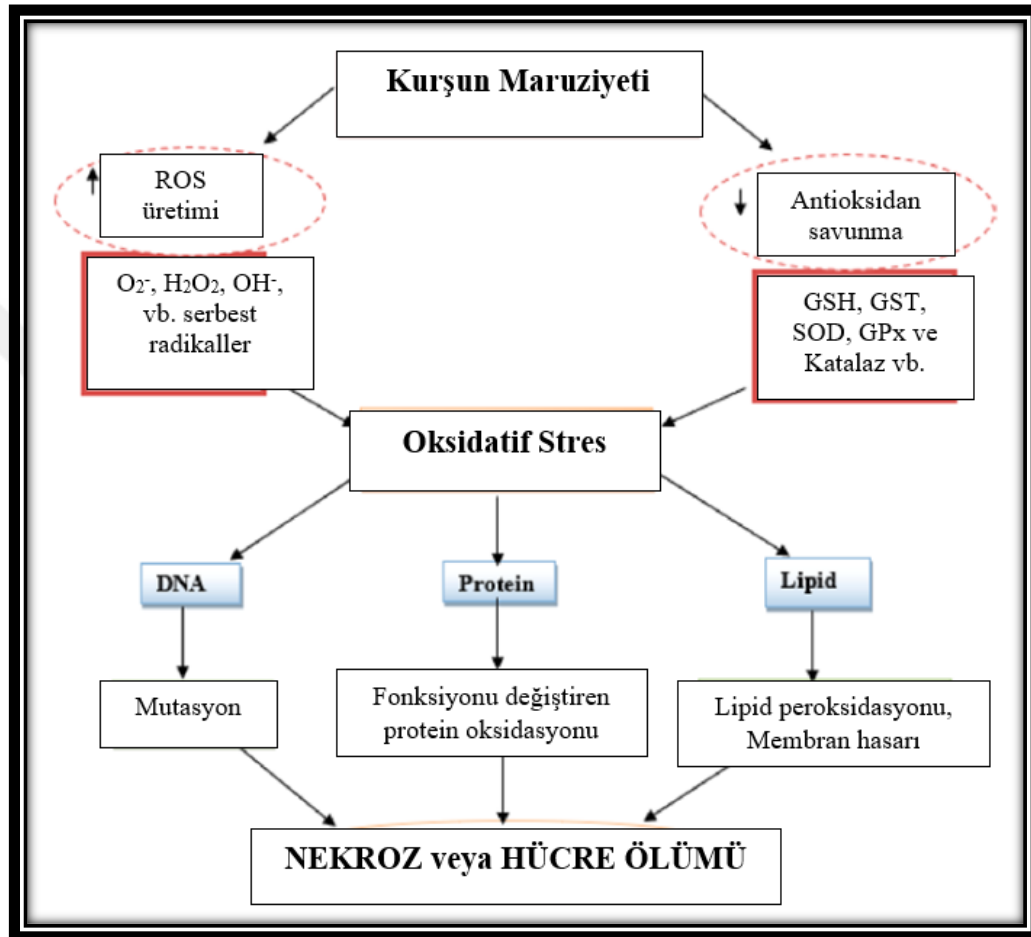
Hem biyosentezinde ikinci basamağı katalizlenmesinden sorumlu ALAD, protein parçalanması için ana sistem olan 26S proteazomunun endojen bir inhibitörüdür. Proteazom, birçok kanserde yer almaktadır ve prostat kanseri için geliştirilmekte olan tedaviler dahil olmak üzere farklı kanser türü tedavileri için belirlenmiş bir hedeftir (61). Proteazom, çoğu hücrel proteini kontrollü, sıkı ve düzenlenmiş bir şekilde bozar ve böylece hücre döngüsü, transkripsiyon, sinyalleşme, kaçakçılık ve protein kalite kontrolü dahil olmak üzere birçok işlemi kontrol eder. Proteazomal bozunma, tüm hücrelerde ve organizmalarda hayati öneme sahiptir ve proteazomal bozunmadaki işlevsizlik veya başarısızlık, kanser ve nörodejenerasyon dahil olmak üzere insanlarda çeşitli hastalıklarla ilişkilidir (100).

2.3. Kurşun Maruziyeti ile Oksidatif Stres İlişkisi

Oksidatif stres, vücutta oksijen metabolizması sırasında önemli miktarda oluşan O_2^- ve H_2O_2 gibi ROS'un üretimi ve detoksifikasyonu arasındaki dengesizliktir. ROS, proteinlerdeki amino asitleri oksitleyerek enzimlerin inaktivasyonuna yol açacak şekilde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere, lipid peroksidasyonuna ve hücre zarında zarara, ayrıca DNA hasarına yol açar (48, 96). ROS, sinyal molekülleri olarak da önemli bir biyolojik rol oynamaktadır. Ayrıca, vücuda giren mikroorganizmalara karşı doğal immün cevap oluşmasında da ROS'un önemli görevleri vardır. Normal koşullar altında, ROS oluşumu çok sayıda endojen ve eksojen molekülden meydana gelen antioksidan sistem ile dengelenmektedir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) önemli antioksidan enzimler olup, vücudu ROS oluşumuna karşı korumaktadır (96).

Mesleki Pb maruziyeti, Şekil 2.8.'de gösterildiği üzere ROS'un doğrudan üretilmesi sırasında pro-oksidan/antioksidan dengesizliğine neden olma yetisine sahiptir (25). Pb maruziyetinde, serbest radikal düzeyinin artması ve hücre içerisindeki antioksidan savunma sistemini zayıflaması oksidatif strese neden olur. Pb, öncelikle, lipid, protein ve nükleik asitler gibi büyük biyomoleküllere zarar verir, takiben nekroz veya hücre ölümüne neden olan değişmiş hücrel fonksiyonlara yol açar (85). Pb, serbest radikaller oluşturarak veya elektron paylaşım özelliklerinden

dolayı SH protein grubu ile kovalent bağ oluşturarak toksik etki göstermektedir (48). Birçok kanıt da Pb toksisitesinin ana moleküler mekanizmalarının, artmış lipid peroksidasyonu, DNA hasarı, değişmiş Ca ve SH gruplarının homeostazı ile ilişkili olduğu ortaya çıkartılmıştır (7).



Şekil 2.8. Kurşunun etki mekanizmasına ve moleküler hedeflerine genel bakış (85).

ROS: reaktif oksijen türleri. O_2^- : süperoksit, H_2O_2 : hidrojen peroksit, OH^- : Hidroksil, GSH: Glutasyon, GST: Glutasyon S-transferaz, SOD: Süperoksit dismutaz, GPx: Glutasyon peroksidaz.

Kurşunun neden olduğu oksidatif stresin bir başka mekanizması da hücrelerin antioksidan savunma sistemleri üzerindeki etkisidir. Pb, SH grupları için yüksek bir afinite sergiler ve SOD, CAT, GPx, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) gibi çeşitli enzimlerdeki fonksiyonel SH gruplarını inhibe ederek antioksidan aktivitelere

müdahale edebilir (41). Pb'nin neden olduğu oksidatif hasarı değerlendirmek için yaygın olarak antioksidan enzimler, SOD, CAT aktivitesi ve GPx düzeyleri ölçülmektedir (101). Pb'nin ayrıca antioksidan enzimler SOD, CAT ve GPx kan seviyelerini hem yükselttiği hem de baskıladığı gösterilmiştir. Bu enzimlerin yükselmeleri düşük kan seviyelerinde ($< 40 \mu\text{g/dL}$) görülür (102).

SOD, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'ye karşı ilk savunma hattıdır ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin H_2O_2 'ye dismutasyonunu katalize eder, H_2O_2 daha sonra CAT veya GPx tarafından H_2O 'ya detoksifiye edilir (101).

Lipit Peroksidasyonu

Lipitlerde oluşan hasar yani lipit peroksidasyonu, oksidatif stresin yoğunluğu için yaygın olarak kullanılan bir biyolojik belirteç olan malondialdehit (MDA) dahil olmak üzere birçok toksik metabolitin oluşumuna yol açar. Pb'nin lipit peroksidasyonuna katkıda bulunduğu birçok insan ve hayvan çalışmasında geniş çapta araştırılmıştır (45). Pb tarafından indüklenen ROS üretimi, oksidasyona son derece hassas olan çoklu doymamış yağ asidi fosfolipitlere saldırı ile sonuçlanmaktadır. Lipit peroksidasyonunun ana ürünü olan MDA, DNA bazlarıyla (G, A ve C) reaksiyona girebilir ve katım ürünü oluşturabilir. M1G (pyrimido [1,2-a] purin-10(3H)-bir), insanlarda bulunan büyük bir endojen DNA eklentisi olup mutajeniktir ve DNA-DNA çapraz bağlarının veya DNA-protein çapraz bağlarının oluşumuna yol açabilir. Pb'nin düşük konsantrasyonlarına maruz kalan işçiler arasında bile plazmada anlamlı derecede yüksek lipit peroksit seviyeleri gözlemlenmiştir (99).

Çoklu doymamış yağ asitlerini yüksek oranda içermesi ve heme demir konsantrasyonlarının yanı sıra oksijen yüksek konsantrasyonlarına sürekli maruz kalmaları nedeniyle, eritrosit membranları, özellikle lipid peroksidasyonundan kaynaklanan oksidatif hasara karşı oldukça hassas olabilir. Bu nedenle, eritrositlerin savunmasız ortamının, lipit peroksidasyon reaksiyonlarının döngülerini başlatmak ve membran fosfolipitlerinin bileşimine ve bunların metilasyonuna yol açarak oksidatif yaralanmalara yol açmak için reaktif oksijen türlerinin oluşumunu provoke etmek için Pb'nin toksik eğilimini kolaylaştırabileceği varsayılmıştır. Bu durum, Pb toksisitesinin önemli mekanizmasını sağlamaktadır (103).

Protein Oksidasyonu

Kurşun genotoksisitesinin önemli mekanizmaları, ROS artışı ve DNA onarımında rol oynayanlar da dahil olmak üzere proteinlerle etkileşimi içermektedir (12). ROS'un neden olduğu protein modifikasyonları, proteinlerin lizin, arginin, prolin ve histidin yan zincirleri oksitlendiğinde oluşan protein karbonil (CO) türevlerini üretir (104). Protein karbonilasyonu, oksidatif stres koşulları altında Lys, Arg, Thr ve Pro amino asitlerinin geri dönüşümsüz bir modifikasyonudur (105).

Kurşunun hematolojik hücrelerle etkileşimi, hücre homeostazında değişikliklere neden olur ve anemi ile sonuçlanır. Pb, biyomoleküllerin sentezini ve metabolitlerin işlenmesini kontrol ederek kan dolaşımı metabolizmasında temel işlevleri yerine getiren proteinleri etkilemektedir. Hematolojik yollarla ilgili enzimlerin inhibisyonu, nihai yolak metabolitlerinin konsantrasyonunu azaltarak substrat birikimine neden olur (34).

DNA Oksidasyonu

Kronik Pb maruziyetinden kaynaklanan oksidatif stres, bozulmuş redoks durumunun bir sonucu olarak yoğun DNA hasarına neden olur (34). Oksidatif olarak değiştirilmiş ürün 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG), serbest radikal kaynaklı DNA lezyonlarının baskın biçimlerinden biridir (106); 8-OHdG seviyesi dolaylı olarak vücuttaki ROS seviyelerini yansıtabilir (107). 8-OHdG oluşumu, organizmanın antioksidan sisteminin zayıflamasının yanı sıra hasarlı nükleik asidin kesin olmayan onarımından kaynaklanır. Pawlas ve ark. ayrıca Pb maruziyet göstergeleri ile idrardaki DNA'nın oksidatif hasar seviyesi (8-OHdG konsantrasyonu) arasında pozitif bir korelasyon bulmuştur. Sonuçlar, Pb düşük seviyelerinde ve yasal olarak izin verilen Pb seviyelerinde bile mesleki maruziyetin genetik hasar riskini artırdığına dair daha önceki bulgularla uyumludur (108).

Apoptoz

Apoptoz, geri dönüşsüz olarak hasar gören hücrelerin düzenli ve etkili bir şekilde uzaklaştırılması için programlanmış bir hücre ölümü şeklidir (109). Bununla birlikte, apoptoz, embriyogenezisin düzenlenmesinde ve yetişkin organizma

dokusunda homeostazın korunmasında önemli bir rol oynar (110). Apoptoz mekanizması karmaşık süreçler dizisidir ve birçok sinyal yolağı bu duruma katkıda bulunur. Bir hücrede apoptoz, kaspaz-aracılı ekstrinsik veya intrinsik yollar aracılığıyla tetiklenebilir. Her iki yolak da, sonunda morfolojik ve biyokimyasal hücresel değişiklikler ile sonuçlanan efektör apoptotik kaspazları aktive etmek için birleşir (109). Kaspaz proteinleri, apoptozun önemli araçlarıdır. Mitokondriyal hasar tarafından indüklenen kaspaz proteinlerinin aktivasyonunun, sonunda hücre ölümüne neden olabilecek apoptotik sinyal yolunu tetiklediği düşünülmektedir. Bu nedenle kaspazlar, hücre apoptozu sürecindeki en önemli proteazlardır ve kaspazların aktivasyonu, apoptozun gerçekleştirilmesinde kilit bir noktadır (111). Kaspaz-8, ekstrinsik yolak üzerinden apoptozun indüklenmesi sırasında başlatıcı işlev görmektedir. Apoptoz mekanizmalarının düzensizliği, bir dizi onkolojik ve nörodejeneratif hastalığın patogenezi ve ilerlemesi ile ilişkilidir (110).

Özellikle Pb, hücrelerin mitokondrilerini depolarize ederek sitokrom c salınımına, kaspaz aktivasyonuna ve apoptoza yol açabilir (111). Pb kaynaklı sitotoksitenin önerilen başka bir mekanizması, Pb'nin apoptotik hücre ölümünü tetiklemesidir. Birçok araştırma grubu, Pb'nin karaciğer, sıçan beyni, sıçan akciğeri, sıçan fibroblastları ve sıçan böbreği gibi bir dizi deneysel sistemde apoptozu indüklediğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, Pb kaynaklı toksisitede oksidatif stres ile apoptoz arasındaki ilişkinin mekanizmaları hala tam olarak bilinmemektedir (7).

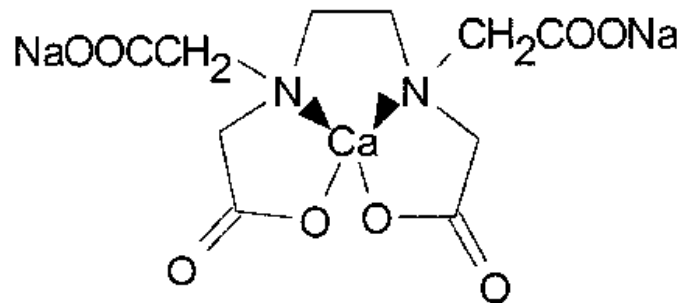
2.4. Kurşun Zehirlenmesinde Uygulanan Tedavi Yaklaşımları

Şelasyon ajanları, metal zehirlenmelerinin tedavisinde ve aşırı metal yüklenmesinde ilk tercih olmaları açısından büyük bir öneme sahiptir (112). Prensip olarak, şelasyon ajanları, toksik metalleri ortadan kaldırmak ve metale maruziyetine bağlı toksisiteyi en aza indirmek veya ortadan kaldırmak için kullanılabilir (113).

Kurşun dahil olmak üzere toksik ağır metal zehirlenmeleri, etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), 2,3-dimerkaptopropanol (BAL) ve mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit (süksimer, DMSA) gibi şelasyon ajanları ile tedavi edilmektedir (114). Kurşun zehirlenmesinde uygulanan tedavinin temelini, 50 yılı aşan bir süredir intravenöz CaNa_2EDTA oluşturmaktadır ve DSÖ Temel İlaçlar Model Listesi'nde yer

almaktadır. Çeşitli çalışmalar, DMSA'nın mezo formu olan dimerkaprolün suda çözünür türevinin de Pb için güçlü bir şelasyon ajanı olduğunu göstermiştir. ABD, orta düzeyde Pb zehirlenmesi için standart tedavi olarak DMSA'yı da onaylanmıştır ve DSÖ Temel İlaçlar Model Listesi'nde yer almaktadır (115). Kalsiyum disodyum etilen diamin tetra asetik asit (CaNa_2EDTA) gibi metal şelasyon ajanları ile tedavi, Pb'nin toksik etkilerini gidermek için hala en iyi terapötik yaklaşımdır (116). Şelasyon tedavisinin mekanizması, idrarla atılan şelat komplekslerinin oluşturulmasıdır (117). Bununla birlikte, EDTA'nın yüksek şelasyon gücü nedeniyle toksik metallere karşı seçiciliği yoktur ve homeostazın değişmesi gibi diğer sağlık sorunlarına neden olacak şekilde endojen metallerle (Cu, Zn, Mg ve Ca) kompleksler oluştur (118). Pb zehirlenmesinin tedavisi üzerine yürütülen çalışmalar, alternatif tedavi şekilleri de ayrıca aramaktadır (114).

Renksiz, suda çözünür sentetik bir bileşik olan CaNa_2EDTA Şekil 2.9.'da gösterildiği üzere metal iyon koordinasyonu için dört oksijen atomu ve iki azot atomu ile hücre dışındaki Pb'yi güçlü bir şekilde bağlar ve metali idrarda hızla elimine eder (117).



Şekil 2.9. EDTA kalsiyum disodyum USP; sodyum kalsiyum etilen diamin tetraasetik asit yapısal formülü (119).

Sodyum kalsiyum EDTA, gastrointestinal kanaldan zayıf bir emilim gösterir. Bu nedenden dolayı, klinikte CaNa_2EDTA daima parenteral yolla uygulanır (9). CaNa_2EDTA 'nın uygulama dozu, başlangıçtaki kan Pb düzeyine bağlı olarak beş gün boyunca günde 25 ila 50 mg/kg şeklindedir (120). CaNa_2EDTA , ekstraselüler sıvıda hızlıca dağılır. Alyuvarlar ve birçok başka hücre membranından geçememektedir.

CaNa₂EDTA metabolize edilemez ve eliminasyonu yalnızca böbrek yoluyla ve glomerüler filtrasyonla olur. Pb'nin, CaNa₂EDTA ile şelasyonu; antidotun merkezi kalsiyum iyonunun (Ca⁺²) bir kurşun iyonu (Pb⁺²) ile yer değiştirmesi şeklinde olur. Pb kompleksi, Ca kompleksinden daha stabildir ve oluşan Pb şelatı glomerüler filtrasyonla atılır (9).

İntravenöz CaNa₂EDTA'nın etki mekanizması çoğunlukla kan damarları içerisinde ekstraselüler sıvıdadır ve intraselüler sıvıda taşınmaz. EDTA -metal kompleksleri de, CaNa₂EDTA ile benzer şekilde esas olarak ekstraselüler sıvıda dağılır ve glomerüler filtrasyonla hızla atılır. EDTA'nın böbrekler dışında herhangi bir organda biriktiğine veya organı etkilediğine dair bir kanıt yoktur. Genel olarak, EDTA'nın toksisite profili düşüktür ve şimdiye kadar bildirilen toksik en ciddi yan etkiler çoğunlukla böbrek hasarı, kemik iliği baskılanması ve gastrointestinal ve kas-iskelet semptomları ile ilgilidir. EDTA tedavileri sırasında ölümcül epizotlar da bildirilmiştir (113).

2.5. Kurşun Maruziyetinin ve Şelasyon Tedavisinin (CaNa₂EDTA)

Esansiyel Elementler Üzerine Etkisi

Esansiyel elementlerin, insan vücudunun normal homeostazı için gerekli konsantrasyonda olmaları büyük önem taşımaktadır. Esansiyel elementlerin dört ana fonksiyonları: stabilize edici, yapı elementleri, hormonal fonksiyonun düzenlenmesi, enzimlerde kofaktör olma şeklindedir. İnsanlar için esansiyel bir element olmayan Pb, proteinlere bağlanarak proteinlerin işlevlerini potansiyel olarak değiştiren bir ağır metaldir (53, 121). Mg, Ca, Cu, Zn, Se ve Mn gibi metaller ise insanlar için esansiyel elementlerdir. Vücutta, bu esansiyel elementlerin homeostatik seviyelerin altında veya üstünde bulunması hastalık durumuna sebep olabilir (122).

Hücre içerisinde Pb, sitoplazma ve çekirdekte dağılır. Pb, proteinlere Ca, Zn ve diğer metallerin yanı sıra -SH, amin, fosfat ve karboksil grupları ile iyonik bağlanma bölgelerinde yarışarak bağlanır (123). Pb⁺²'nin elektrokimyasal özellikleri, Pb⁺²'nin biyolojik sistemlerde hem Zn⁺² hem de Ca⁺² iyonlarını taklit etme kabiliyeti verir (15). Pb⁺², Ca, Mg, Fe, Zn, Cu ve Se gibi iki değerlikli katyonlar ile etkileşime girmektedir (122).

Sodyum kalsiyum EDTA'da, Pb^{+2} haricinde Zn, Mn ve Fe gibi esansiyel elementleri de bağlar. Çeşitli metallerin $CaNa_2EDTA$ ile bağlanma sabitleri in vitro ortamda ölçülmüş ve $Cr^{+2} > Fe^{+3} > Cu^{+2} > Pb^{+2} > Zn^{+2} > Cd^{+2} > Co^{+2} > Fe^{+2} > Mn^{+2} > Ca^{+2} > Mg^{+2}$ şeklinde bir sıralama gösterilmiştir. Bu durum, özellikle şelasyon tedavilerine başlamadan önce bu element düzeylerinin eksik veya çok eksik olduğu hastalarda istenmeyen klinik sonuçlar doğurabilir. Bazı hastalarda esansiyel elementlerin eksikliğinin bir seri şelasyon tedavi seansı sırasında meydana çıkması da mümkündür. Örneğin, genç kadınlarda ve çocuklarda çoğunlukla sınırda veya belirgin Fe eksikliği görülmektedir. Eğer böyle bir hastada, Pb intoksikasyonu için $CaNa_2EDTA$ ile şelasyon tedavisine gerek duyulursa, tedavi sonucunda eksikliğin artması görülebilir veya anemi ortaya çıkabilir (10). Bağırsaklardan kan dolaşımına Fe transportu için temel protein olan iki değerlikli metal taşıyıcı 1'in (*divalent metal transporter 1*, DMT1) oral yol ile alınan Pb'yi taşıyabildiğine ve Fe eksikliğinin bağırsak hücrelerinin Pb alımını arttırdığına dair kanıtlar vardır. Fe seviyelerinin düşük olduğu koşullar altında, Fe alımını artırmak için DMT1 aktivitesi yukarı doğru düzenlenir ve Pb alımına da muhtemelen yol açar (77).

Zn eksikliği belirtileri olan bireylerde $CaNa_2EDTA$ ile tedavi sonucunda ciltte pul pul dökülme, koku veya tat alma duyularında azalma, immün fonksiyonda azalma şeklindeki etkiler ortaya çıkabilir. (10).

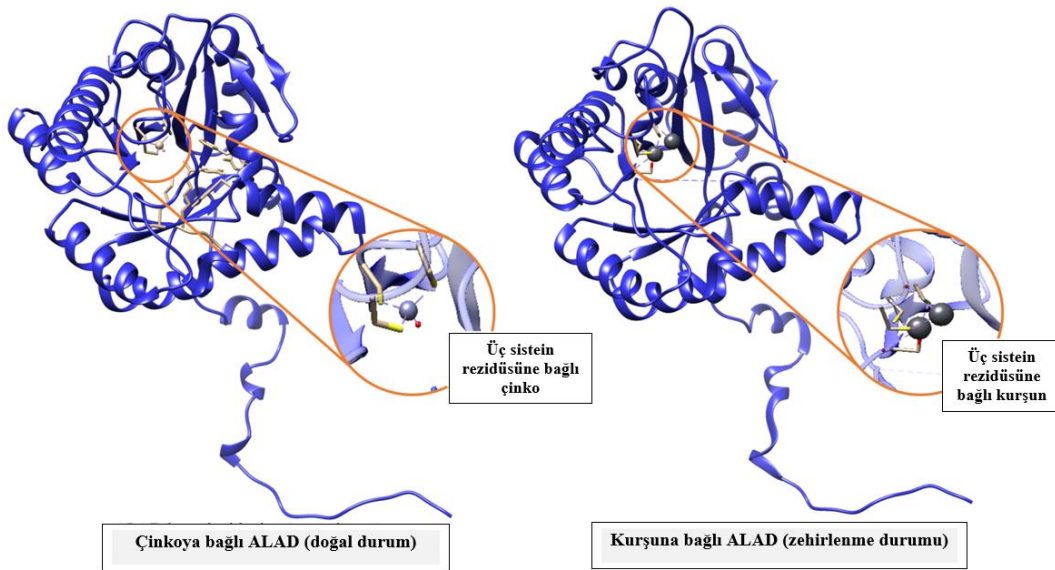
Araki ve arkadaşları tarafından, mesleki maruziyet sonucu Pb zehirlenmesi görülen 20 erkeğe 20 mg/kg $CaNa_2EDTA$ intravenöz yolla uygulandığında 24 saatlik idrarda Zn atılımında ortalama 11 katlık bir artış gözlenmiştir. $CaNa_2EDTA$ tek bir infüzyonunun ardından, yirmi dört saatlik idrarda Pb, Mn, Cd, Cu ve Cr atılımı da başlangıç değerlerine göre sırasıyla 13, 3.8, 3.4, 1.3 ve 1.1 kat artmıştır ancak olumsuz klinik etkilerle bir ilişki bulunamamıştır (9).

Bir araştırmada, günde i.v. 1 gr. EDTA'nın 5 gün boyunca uygulanması sonucunda, dört döküm işçisinde ortalama idrar Zn konsantrasyonlarında anlamlı bir artış olmuştur ($p < 0.01$) (9).

Üçer günlük 5 adet EDTA kürü sırasında, şelasyon tedavisi öncesine göre idrarla Zn atılımında $33.0 \pm$ (standart sapma) 20.6 katlık bir artış gözlenmiştir ($p < 0.01$). Serum Zn konsantrasyonları da, bu üç kür boyunca normal değerlerin altına düşmüştür (9).

Zn, birçok enzimin aktivitesi için gerekli olan esansiyel bir metaldir ve bu metal ile takviye, farklı toksik maddelerin neden olduğu oksidatif strese karşı etkilidir (124). Zn, antioksidan sistemde önemli olmasının yanı sıra, metal şelasyonunda dolaylı etkiye sahiptir. Esansiyel bir metal olan Zn, GSH, metal-bağlayıcı proteinler ve metallothionein (MT) biyosentezinin indüklenmesinde rol oynamaktadır (114). En önemli hücre içi antioksidan moleküllerinden biri GSH'dır. GSH, hücrel homeostazın sağlanmasında, radikal süpürücü antioksidan özelliklerinden dolayı temel bir bileşiktir. Bazı çalışmalar, Zn maruziyetinin karaciğer GSH düzeylerini arttırdığını göstermiştir (60).

Kurşun, Zn içeren bazı proteinlerde Zn'nin yerini alabilir. Bunun en iyi bilinen örneği, ALAD içerisindeki Zn'nin kurşun ile yer değiştirmesidir; Şekil 2.10.'da gösterildiği üzere ALAD'ın her biri Zn içeren sekiz aynı alt birim içermesi sebebiyle, bu durum, ALAD enzimin inhibisyonu ile sonuçlanır (61).



Şekil 2.10. Kurşunun ALAD yapısında yer alan Zn ile yer değiştirmesi.

Çinko için Pb süstitüsüyonu, spesifiklik proteini 1 (*specificity protein 1*, Sp1), erken büyüme faktörü 1 (*early growth factor 1*, Egr-1) ve transkripsiyon faktörü IIIA (*transcription factor IIIA*, TFIIIA) dahil olmak üzere pek çok Zn-parmak proteininde ve hem biyosentezinde yer alan proteinlerde gösterilmiştir. Zn-parmak alanı, DNA

replikasyonu, transkripsiyon ve translasyon için önemli olan bir DNA bağlama motifidir. Pb'nin, Zn-parmak proteinleri olan Sp1, Egr-1 ve TFIIIA'daki Zn bağlayıcı bölge için rekabet ettiğinin ve bu süstitüsyonun DNA'ya bağlanmanın zamanlamasını ve afinitesini değiştirdiğine dair güçlü kanıtlar vardır. Diğer Zn-parmak proteinlerinin çoğu nörolojik bozukluklarla bağlantılıdır. Bu Zn-parmak proteinleri, Alzheimer hastalığında DNA metiltransferaz 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1) ve Presenilin 1 ve 2'yi (PSEN1/2), Parkinson hastalığında dopamin reseptörü ve NMDA reseptörünü, Zn-parmak proteini 804A'yı (*zinc-finger protein 804A*, ZNF804A) ve şizofrenide parçalanmış-şizofreni 1-bağlayıcı çinko parmağı (*disruptedin-schizophrenia 1 (DISC1)-binding zinc-finger (DBZ)*) içerir. Bunların hiçbirinin Pb'den doğrudan etkilenmediği bilinmemekle birlikte, Pb zehirlenmesinin her hastalıkla bağlantılı olduğuna dair kanıtlar ve Pb'nin Zn-parmak proteinlerine bağlanabileceğini gösteren güçlü kanıtlar vardır. Zn-parmak proteinlerinde Zn yerine Pb süstitüsyonu dolayısıyla, Pb maruziyeti söz konusu olan bireyler için her bir bozukluğun başlangıcına katkıda bulunan bir faktör olabilir (77).

Pb maruziyetinin izlenmesi için çinko protoporfirin (ZnPP) konsantrasyonu tercih edilen bir biyobelirteçtir. ZnPP, genellikle Pb düşük kan konsantrasyonuna sahip kişilerde veya gelişigüzel bir şekilde Pb'nin düşük konsantrasyonuna maruz kalan kişilerde yükselmez. ZnPP'nin yükselmesi, Fe eksikliği olan kişilerde de görülebilir. Bununla birlikte, tüm bu standart maruziyet belirteçleri her zaman işçilerin gerçek toksikolojik durumunu yansıtmayabilir, çünkü ksenobiyotiklere karşı bireysel duyarlılıkları, metallerin metabolik proseslerini içeren genlerin polimorfizmi ile belirlenir (125).

Kurşun Ca, Fe, Mg ve Zn'yi taklit eder veya onların yerine geçer. Pb, hücrelere bu iyonların kullandığı çeşitli kanallar veya pompalar yoluyla girer ve biyolojik olarak önemli olaylarda bu iyonlardan daha yüksek afinite ile hareket eder. Intraselüler, artmış Ca konsantrasyonları ve Ca tarafından düzenlenen mekanizmalar Pb toksisitesinin birincil mekanizmaları olarak kabul edilmiştir (126).

Kalsiyum, birçok hücresel fonksiyonun kontrolünden sorumlu olup çok çeşitli proseslerdeki rolünden dolayı en önemli iyonlardan biridir. Ekstraselüler ortamda daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Ca akışı, iyonların hidrofobik zardan geçmesine izin veren protein kanalları tarafından gerçekleştirilir. Bu kanalların

açılması ve intraselüler Ca tamponlama sistemi, hücre içi ve hücre dışı ortamlar arasındaki iyonik dengeyi düzenler. Ca, birçok proteinle etkileşime girme kapasitesi olan önemli bir ikincil habercidir. Nöral hücre içindeki Ca bağlayıcı proteinlerin düzenlenmesi, nöral uyarılabilirlik, sinaptik aktarım ve nöral plastiklik için esastır (34). Pb, proteinlerin bağlanma bölgeleri için Ca gibi esansiyel elementlerle rekabet halindedir. Test tüpü çalışmalarında, Pb birçok Ca-bağlayıcı proteine karşı Ca'dan daha yüksek bir afiniteye sahiptir. Bu durum birden fazla etkiye neden olabilir. Örneğin, nörotransmitter salınımı, Pb varlığının bozduğu Ca-bağımlı bir süreçtir (121).

Kurşun, fosfatidilserin içeren membranların varlığında bağlayıcı bölgenin Ca iyonlarının yerine geçerek Ca etkileşimli alanlar protein kinaz-C bölgesi için daha yüksek bir afiniteye sahiptir. Protein kinaz-C ve membran lipidlerinin etkileşimi kinaz aktivitesi için çok önemlidir. Pb ile Ca karşılaştırıldığında, düşük kurşun konsantrasyonları protein kinaz-C aktivasyonunu tetikleyebilir. Pb ve protein kinaz-C etkileşimi, protein kinaz-C aktivasyonu tarafından tetiklenen geniş hücresel tepkiler dizisi göz önüne alındığında Pb toksisitesinin temel mekanizmasına katkıda bulunur (34).

Kurşun iyonu, eritrositlere Ca taşıma sistemleri yoluyla taşınmaktadır ve Ca iyonlarıyla yarışabilir. Sonuç olarak, eritrositler tarafından Ca alımı azalabilir ve serumda Ca seviyesinin yükselmesine neden olabilir. Diğer taraftan, Pb'nin eritrositlerde Ca seviyesinin yükselmesine neden olan zıt mekanizmaları tetiklediğine de inanılmaktadır. Pb'nin indüklediği oksidatif stresin, ROS-aracılı Ca kanallarının aktivasyonu ve Ca çıkışından sorumlu olan (Ca^{+2}, Mg^{+2}) -ATPaz aktivitesinin baskılanması ile Ca akışını indüklediği öne sürülmüştür. Ayrıca, Pb^{+2} (Ca^{+2}, Mg^{+2}) -ATPaz aktivitesini doğrudan inhibe eder (122).

Gebelikle ilişkili metabolik değişikliklerin kemik depolarından Pb mobilizasyonunu artırabileceği ve fetüsün endojen metal içeriğine maruz kalmasına yol açabileceği de bulunmuştur. İlginç bir şekilde, Ca'nın bu sürece karşı koruyucu bir rol oynadığı bildirilmiştir ve bu nedenle hamileliğin ikinci yarısında Ca alımının Pb mobilizasyonunu azaltabileceği öne sürülmüştür (90).

Selenyum, gelişimde ve çok çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli bir rol oynayan esansiyel bir mikro besindir. Biyolojik olarak kullanılabilir Se'nin yeterli

seviyeleri, merkezi sinir sistemi, erkek üreme biyolojisi, endokrin sistem, kas fonksiyonu, kardiyovasküler sistem ve bağışıklık dahil olmak üzere insan biyolojisinin çeşitli sistemleri için işlevsel olarak önemlidir (127). Se, redoks homeostazının devam ettirilmesinde, kardiyovasküler sistemin normal fonksiyonlarının korunmasında, akut veya kronik metal toksisitesinin azaltılmasında hayvan modelleri ve insan çalışmalarında tümörlerin önlenmesinde önemli bir rol oynar (128). Vücuttaki Se düzeylerinin, yaygın olarak kullanılan ölçütleri arasında selenoprotein P seviyeleri ve GPx aktivitesinin yanı sıra plazma ve serum Se konsantrasyonları bulunmaktadır (127).

Selenyum, 21'inci amino asit, yani selenosistein (Sec) olarak doğrudan proteinlere dahil edilmiş olması diğer besin elementlerinden ayırtmaktadır. Selenoproteinlerin hücreler içindeki sentezi, benzersiz yapısal elementler içeren selenoprotein mRNA ile birlikte ribozomlar üzerine toplanmış özel bir dizi protein ve tRNA ile gerçekleşmektedir (127). Selenoproteinlerin vücutta biyosentezi, esansiyel eser elementin ve mikronutrient Se'nin yeterli varlığına bağlıdır (129).

Kurşun maruziyetinde, ROS seviyesi artarken, antioksidan sistem zayıflamaktadır. ROS'un enzimatik detoksifikasyonunu gerçekleştirmek için eser elementler ve GPx, CAT ve SOD gibi antioksidan enzimler, Pb toksisitesine yönelik güçlü hedeflerdir (20). Se, selenoproteinlere dahil edildiğinde selenosistein (Sec) formunda bulunur ve Pb gibi toksik maddelerin neden olduğu oksidatif strese karşı korunmada hayati rol oynar. Çok sayıda çalışma, Se'nin Pb zehirlenmesinin subklinik semptomlarını etkili bir şekilde azaltabildiğini doğrulamıştır (128).

Düşük Mg seviyelerinin, oksidatif stres ve inflamatuvar yanıt açısından Pb toksisitesini artırabileceği varsayılmaktadır. Buna paralel olarak, Pb kaynaklı oksidatif stres, pozitif bir geri besleme mekanizması olarak hipomagnezemiye katkıda bulunabilir (130). Luo Y. ve ark.'nın, Cu, Zn, Mg ve Mn'nin Cd ve Pb seviyeleri ile pozitif olarak ilişkili olduğunu öne süren bulguları ise, bu minerallerin maruziyeti şiddetlendirebileceğini öne sürdükleri için mevcut kılavuzlarının temelini oluşturan önceki çalışmalarla çelişmektedir (124).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar Maddeler

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Firma Adı
%0,02 etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Biowest
%30 hidrojen peroksit (%30 H ₂ O ₂)	Sigma
% 65 nitrik asit (%65 HNO ₃)	Sigma
1 Kb DNA Ladder	GENESTA™
100 base pairs (bp) DNA Ladder	GENESTA™
1,1,3,3-Tetraetoksipropan (TEP)	Sigma
2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH)	Sigma
2-Tiyobarbitürik asit (TBA)	Merck
5-Sülfosalisilik asit (SSA)	Sigma
Absolü etanol	Riedel
Albumin, sığır serumu	Sigma
Asetonitril (HPLC kalitesinde)	Riedel
Bakır(II)-sülfat-5-hidrat	Merck
Borik asit	Sigma
Bütillenmiş hidroksi toluen (BHT)	Sigma
ddH ₂ O	Sigma
Deoksinükleosid Trifosfat (dNTP)	Sigma
Dipotasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄)	Merck
Etanol	Riedel
EDTA	Sigma
Ethidium Bromür (EtBr Çözeltilisi)	Sigma
Forward Primer (Primer F)	Sentegen
Folin & Fenol Reaktifi	Sigma
Glasiyel asetik asit (HPLC kalitesinde)	Riedel
Glutatyon, redükte form (GSH)	Sigma
Hekzan	Riedel
Hidroklorik asit (HCl)	Merck
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Sigma

Kullanılan Kimyasal Maddeler

HpaII restriksiyon enzimi
 Jel Yükleme Solüsyonu 6X (Orange G)
 Metal kalibrasyon Standartı
 Metanol (HPLC kalitesinde)

Firma Adı

NZYTEch genes&enzymes
 SNP Biyoteknoloji
 Merck
 Merck

Pirogallol

Sigma

Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)

Sigma

Potasyum ferri siyanür ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)

Merck

Potasyum hidroksit (KOH)

Sigma

Sodyum azid (NaN_3)

Merck

Sodyum bikarbonat (NaHCO_3)

Merck

Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4)

Merck

Sodyum hidroksit (NaOH)

Merck

Sodyum potasyum tartarat

Merck

Track It ψ X 174 RF DNA/Hae Fragment

Invitrogen

Track It Cyan/Orange Buffer

Invitrogen

Trikloroasetik asit (TCA)

Sigma

Tris HCl

Sigma

Tris (hidroksimetil) aminometan hidroklorür

Aldrich

Ultra SafTM Agaroz

Invitrogen

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler**Kullanılan Araç ve Gereçler**

37°C inkübatör
 Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi
 Buzdolabı
 Buz kırma makinası
 Ca Oyuk Katot Lambası
 Cam test tüpleri (10 ml)
 Cu Oyuk Katot Lambası
 Deiyonize su cihazı

Firma Adı, Modeli

Eastbiopharm ELISA Kit
 Perkin Elmer AAnalyst 800
 Beko BK 3531 T
 Skotsman
 PerkinElmer
 Fisher Scientific
 PerkinElmer
 Baunstead

Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	AS-Polar 530 V
Distile su cihazı	Mes
DNA Görüntüleme Cihazı	Gel Logic 200 Imaging System
Ependorf santrifüjü	Abott
Etüv	Dedeoğlu
Evaporatör	Univapo 150 H
Grafit tüpler	PerkinElmer THGA
Hassas terazi	Shimadzu ATX 224
Hassas otomatik pipetler ve pipet uçları	Gilson, Mettler Toledo
Mg Oyuk Katot Lambası	PerkinElmer
Mn Oyuk Katot Lambası	PerkinElmer
Mikrodalga fırın	Milestone Ethos Up
Orbital çalkalayıcı	Heidolph tetramax 101
PCR Cihazı	AB Applied Biosystem Veriti
	96-well Thermal cyler
Santrifüj	Lanofuge 200 Heraeus
Se Oyuk Katot Lambası	PerkinElmer
Su banyosu	Nuve B5
Spektrofotometre	Shimadzu UV-1600
Steril pipet uçları	Orange Scientific
Terazi	Schimadzu Libror EB-330D
Ultra saf su cihazı	Elga PF3XXXXM1 Purelab Flex
Ultrasonik Banyo	Transsonic 460/H
Yatay jel elektroforez tankı	Invitrogen
Vakum fırını	Kendro B6420
Vorteks	Janke & Kunkel VF 2
Zn Oyuk Katot Lambası	PerkinElmer

3.3. Hazırlanan Çözeltiler

3.3.1. Esansiyel Element Düzeylerinin Tayininde Kullanılan Standartların Hazırlanması

Kalsiyum Analizi Standartlarının Hazırlanması

1 g/L standart Ca çözeltisinden distile su ile dilue edilerek 1 mg/L (Standart 1), 2 mg/L (Standart 2), 4 mg/L (Standart 3) , 8 mg/L (Standart 4) ve 16 mg/L (Standart 5) olmak üzere toplam 5 adet standart çözelti hazırlanmıştır.

Magnezyum Analizi Standartlarının Hazırlanması

1 g/L standart Mg çözeltisinden distile su ile dilue edilerek kalibrasyon eğrisi oluşturmak için 0.3 mg/L (Standart 1), 0.4 mg/L (Standart 2) ve 0.5 mg/L (Standart 3) olmak üzere toplam 3 adet standart çözelti hazırlanmıştır.

Çinko Analizi Standartlarının Hazırlanması

1 g/L standart Zn çözeltisinden distile su ile dilue edilerek kalibrasyon eğrisi oluşturmak için 0.25 mg/L (Standart 1), 0.5 mg/L (Standart 2), 1 mg/L (Standart 3) ve 2 mg/L (Standart 4) olmak üzere toplam 4 adet standart çözelti hazırlanmıştır.

Bakır Analizi Standartlarının Hazırlanması

1 g/L standart Cu çözeltisinden distile su ile dilue edilerek kalibrasyon eğrisi oluşturmak için 2 mg/L (Standart 1), 4 mg/L (Standart 2) ve 8 mg/L (Standart 3) olmak üzere toplam 3 adet standart çözelti hazırlanmıştır.

Selenyum Analizi Standartlarının Hazırlanması

1 g/L standart Se çözeltisinden distile su ile dilue edilerek kalibrasyon eğrisi oluşturmak için 20 µg/L (Standart 1), 40 µg/L (Standart 2), 60 µg/L (Standart 3), 80 µg/L (Standart 4) ve 100 µg/L (Standart 5) olmak üzere toplam 5 adet standart çözelti hazırlanmıştır.

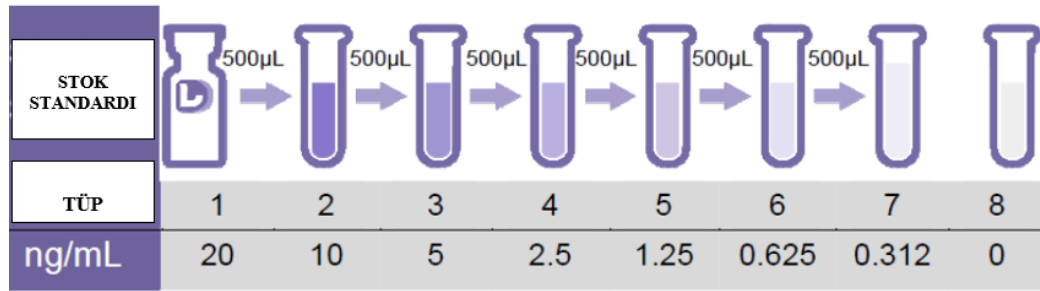
Mangan Analizi Standartlarının Hazırlanması

1 g/L standart Mn çözeltisinden distile su ile dilüe edilerek kalibrasyon eğrisi oluşturmak için 20 µg/L (Standart 1), 30 µg/L (Standart 2), 40 µg/L (Standart 3) ve 50 µg/L (Standart 4) olmak üzere toplam 4 adet standart çözelti hazırlanmıştır.

3.3.2. İnsan Aminolevulinat Delta Dehidrataz (ALAD) Miktar Analizinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Standart Çözeltilerinin Hazırlanması:

Standartlar, test kitinde sağlanan standartın dilüe edilmesi ile elde edilen stok çözeltisinin Şekil 3.1’de gösterildiği şekilde seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.



Şekil 3.1. Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.

Çalışma kitinde sağlanan konsantre stok çözelti, 1 mL standart dilüenti ile seyreltilir. 10 dakika oda sıcaklığında (18°C-25°C) bekletilmesini takiben köpük oluşturmayacak şekilde yavaşça karıştırılmıştır. Stok çözeltisinin son konsantrasyonu 20 ng/mL’dir. 0.5 mL standart dilüenti içerecek şekilde hazırlanan 7 adet tüpe çifte dilüsyon serileri üretebilmek için Şekil 3.1.’de gösterildiği şekilde dilüe edilmiş standart serisi kullanılmıştır. Her bir tüp içerisinden diğer tüpe aktarılmadan önce tüp iyice karıştırılmıştır. 20 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1.25 ng/mL, 0.625 ng/mL ve 0.312 ng/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler ve yalnızca dilüent içeren kör çözelti hazırlanmıştır.

3.3.3. ALAD Enzim Polimorfizmi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

DNA Saflaştırmada Kullanılan Çözeltiler:

GeneAll Exgene™ Blood SV mini (Katalog No. GA-105-152) markalı ticari kit içeriğinde 60 mL Tampon BL, 90 mL Tampon BW (konsantre), 50 mL Tampon TW (konsantre), 60 mL Tampon AE, 120 mg Proteinaz K (mg) ve 7 mL Proteinaz K Saklama Çözeltisi sağlanmıştır.

Çalışma başlamadan önce, PK Saklama Tamponu ile rekonstitüe edilerek Proteinaz K çözeltisi 20 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Proteinaz K'nın PK Saklama Tamponu ile rekonstitüsyonunu takiben -20°C'de saklanmıştır.

0.5 mM EDTA Çözeltisinin Hazırlanması

146.12 g EDTA tartılarak 1 L distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

10 mM Tris-HCl, Çözeltisinin Hazırlanması

g Tris HCl tartılarak 1 L distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

Tam kan örneğinden elde edilen saflaştırılmış DNA 0.5 mM EDTA ve 10 mM Tris-HCl, pH 9.0 içeren ve kit içeriğinde sağlanan tampon AE ile SV kolon membranından ayrıştırılmıştır. Ayrıştırma işlemi, 200 µL tampon AE kullanılarak iki basamakta yürütülmüştür.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Master Mix (Ana Karışım)

Hazırlanması:

Tam kan örneğinden elde edilen saflaştırılmış DNA'lar polimorfizm çalışmasında kullanılmak üzere polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulanmıştır. Saflaştırılan DNA örneklerinin ALAD gen bölgesinin çoğaltılmasına yönelik yürütülen PCR çalışmasında, 45 µL Master Mix (Ana Karışım) hazırlanmıştır. 5 µL PCR Tamponu (MgCl₂), 2 µL deoksinükleosidtrifosfat (dNTP), 10 µm konsantrasyonda 1 µL İleri (Forward) Primer (Primer F: AGACAGACATTAGCTCAGTA), 10 µm konsantrasyonda 1 µL Ters (Reverse) Primer (Primer R: GGCAAAGACCACGTCCATTC) ve son olarak 2,5 U/µL

konsantrasyonda 1 μ L Taq Polimeraz enzimi eklenerek Master Mix (Ana Karışım) hazırlanmıştır. Hem gradient hem de standart PCR yönteminde aynı şekilde PCR reaksiyon ortamı hazırlanmış ve hazırlanan PCR reaksiyon ortamı Tablo 3.1’de sunulmuştur.

Tablo 3.1. PCR bileşenleri ile stoktaki ve reaksiyondaki konsantrasyonları.

Bileşen	Stok Konsantrasyon	Reaksiyona Konulan Miktar (μ L)	50 μ L’lik Reaksiyon Karışımındaki Final Konsantrasyon	Master Mix (Ana Karışım) Toplam
PCR Tamponu	10X	5	1X	70
dNTP	10 m μ /ea	2	100 m μ /ea	28
Primer F	10 μ m	1	200 μ m	14
Primer R	10 μ m	1	200 μ m	14
Taq Pol	2,5 U/ μ L	1	2,5 U/ μ L	14
DNA	10,3-31 ng/ μ L	5	50-155 mg	70
ddH ₂ O	-	35	-	490
		50		

Polimeraz Çalışma Sonuçlarını Jel Elektroforezi ile Görüntüleme için Agaroze Jel Hazırlanması:

PCR çalışma sonuçlarını jel elektroforezi ile görüntülemek için 1X Tris Asetik Asit EDTA (TAE) jeli hazırlanmıştır. Büyük hazneli jel tankı, 500 mL su ile doldurulmuştur. Hazır olarak bulunan 1/50 konsantrasyonda TAE’den 10 mL alınarak 500 mL distile su ile 1/10 konsantrasyonda TAE elde edilmiştir. %1’lik jel hazırlamak için, 0.7 g agaroz toz hassas terazide tartılmıştır. Hazırlanmış olduğumuz 1X TAE, 70 mL olarak mezüre alınmıştır. Takiben erlen içerisinde, 70 mL 1X TAE ve 0.7 g agaroz toz karıştırılmıştır. Çözünmesi için mikrodalgada 1-2 dk ısıtılmıştır. Erlen soğutulduktan sonra, 1 mL Ethidium Bromür (EtBr) eklenmiştir. EtBr eklendikten sonra çözelti jel oluşturmak üzere jel elektroforez kasetine dökülmüştür ve kurumaya bırakılmıştır. Belirteç olarak her agaroz jeline 1000 bp’lik Track It ψ X 174 RF DNA/Hae Fragment yüklenirken, nükleik asit boyası olarak Track It Cyan/Orange iki renkli boya kullanılmıştır.

Enzim Kesimini Jel Elektrofözezi ile Görüntüleme için Agaroz Jel

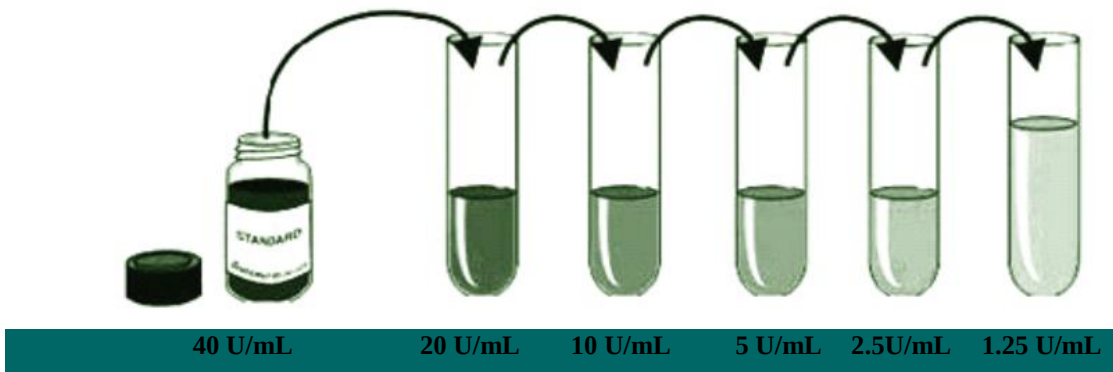
Hazırlanması:

Enzim kesimini jel elektrofözezi ile görüntülemek için 1X Tris Borik Asit EDTA (TBE) jeli hazırlanmıştır. Büyük hazneli jel tankı, 500 mL su ile doldurulmuştur. 10X konsantrasyonda TBE önceden hazırlanmıştır. 1X TBE elde etmek için, 50 mL 10X TBE 450 mL distile su ile seyreltilmiştir. %2'lik jel hazırlamak için, 1.4 g agaroz toz hassas terazide tartılmıştır. 70 mL 1X TBE için, 1.4 g agaroz toz gereklidir. Hazırlanmış olduğumuz 1X TBE'den mezüre 70 mL alınmıştır. Takiben erlen içerisinde, 70 mL 1X TBE ve 1.4 g agaroz toz karıştırılır. Çözünmesi için mikrodalgada 1-2 dk ısıtılmıştır. Erlen su içerisinde yavaş yavaş soğumaya bırakılmıştır. Erleni soğuttuktan sonra, 1X olacak şekilde erlene SYBR® Gold nucleic acid gel stain eklenmiştir. SYBR® Gold nucleic acid gel stain eklendikten sonra çözelti jel oluşturmak üzere jel elektroföze kasetine dökülmüştür ve kurumaya bırakılmıştır.

3.3.4. Plazmada Bulunan Glutasyon Miktar Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

Standart Çözeltilerinin Hazırlanması:

Standartlar, test kitinde sağlanan ana stok çözeltinin standart çözücü ile Şekil 3.2.'de verildiği şekilde dilüe edilmesiyle hazırlanmıştır.



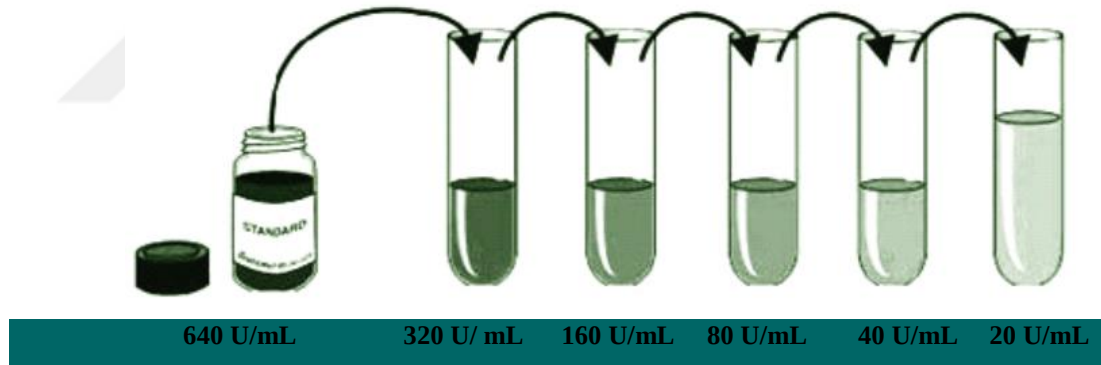
Şekil 3.2. Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.

Çalışma kitinde sağlanan 40 U/mol/L konsantrasyondaki stok çözeltinin 120 µL'si üzerine 120 µL standart çözücü eklenerek 20 U/mol/L konsantrasyondaki Standart 5 çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra 120 µL standart çözelti üzerine 120 µL standart çözücü eklenerek ve bu işlem her bir standarttan bir sonraki için tekrar edilerek sırasıyla 10 U/mol/L, 5 U/mol/L, 2.5 U/mol/L, 1.25 U/mol/L konsantrasyon aralığındaki standart çözeltiler hazırlanmıştır.

3.3.5. Plazmada Bulunan Glutasyon Peroksidaz Miktar Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

Standart Çözeltilerinin Hazırlanması:

Standartlar, kullanma talimatı doğrultusunda çalışılan test kitinde sağlanan Chromogen Solution A standart çözeltisine Chromogen Solution B standart çözücüsünün eklenerek dilüe edilmesi ile hazırlanmıştır (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.

120 µL Chromogen Solution A standart çözeltisine (640 U/mL) 120 µL Chromogen Solution B standart çözücüsü eklenerek 320 U/mL konsantrasyondaki Standart 5 çözeltisi hazırlanmıştır. Standart 5 çözeltisinden başlayarak, her bir standart ½ oranda dilüe edilmiş sırasıyla 160 U/mL, 80 U/mL, 40 U/mL, 20 U/mL konsantrasyonlarda 4 adet standart çözelti daha hazırlanmıştır.

Üreticinin kullanma kılavuzuna uygun olarak plazma örnekleri ve standartlar ELİSA kitine uygulanarak ölçümler yapılmıştır.

3.3.6. Katalaz Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Fosfat Tamponu (50 mM)

Bazik formu olarak, 0.724 g Na_2HPO_4 100 mL distile-deiyonize suda çözülerek 50 mM çözeltisi hazırlanmıştır. Asit formu olarak, 0.680 g KH_2PO_4 100 mL distile-deiyonize suda çözülerek 50 mM çözeltisi hazırlanmıştır. Her iki formdan gerekli miktarlarda karıştırılarak pH'sı 7.00 olan 50 mM'lık fosfat tamponu elde edilmiştir.

Hidrojen Peroksit Çözeltisi (10mM)

500 μL 'si 5 mL'ye distile su ile tamamlandıktan sonra 240 nm'de spektrumu alınmıştır. Gerekli dilüsyonlar yapılarak 10 mM çözelti elde edilmiştir.

3.3.7. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Tris Tamponu (50 mM)

0.6055 g Tris ve 37.2 g disodyum etilen diamin tetra asetik asit (Na_2EDTA) 100 mL distile suda çözülmüştür. Çözelti pH'sı 8.2'ye derişik HCl ile ayarlanmıştır.

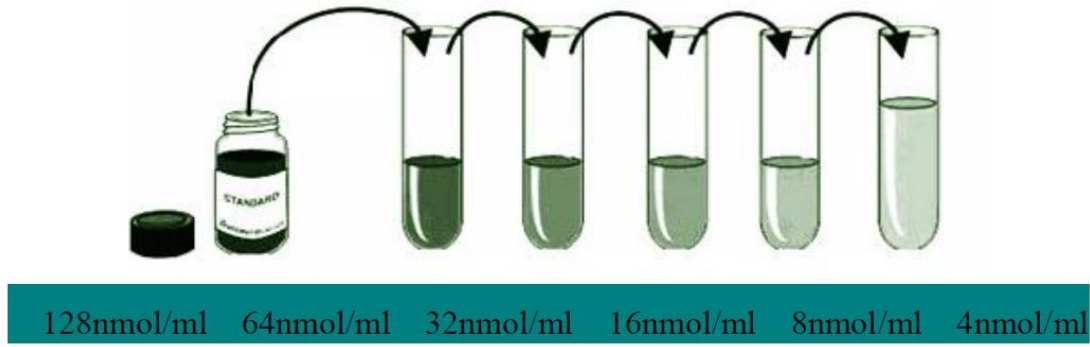
Pirogallol Çözeltisi (6mM)

7.56.g pirogallol 10 ml 10 mM HCl içinde çözülerek hazırlanmıştır.

3.3.8. Malondialdehit Düzeylerinin Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Standart Çözeltilerinin Hazırlanması:

Standartlar, kullanma talimatı doğrultusunda çalışılan test kitinde sağlanan Chromogen Solution A standart çözeltisine Chromogen Solution B standart çözücüsünün eklenerek dilüe edilmesi ile hazırlanmıştır (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.

120 μ L Chromogen Solution A standart çözeltisine (128 nmol/mL) 120 μ L Chromogen Solution B standart çözücüsü eklenerek 64 nmol/mL konsantrasyondaki Standart 5 çözeltisi hazırlanmıştır. Standart 5 çözeltisinden başlayarak, her bir standart $\frac{1}{2}$ oranında dilüe edilmiş sırasıyla 32 nmol/mL, 16 nmol/mL, 8 nmol/ mL, 4 nmol/ mL konsantrasyonlarda 4 adet standart çözelti daha hazırlanmıştır.

3.3.9. Protein Karbonil (CO) Düzeylerinin Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Standart Çözeltilerinin Hazırlanması:

Standartlar, test kitinde sağlanan ana stok çözeltisinin Şekil 3.5.'te gösterildiği şekilde dilüe edilmesiyle hazırlanmıştır.



Şekil 3.5. Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.

Ana stok CO çözeltisinin konsantrasyonu 640 ng/mL'dir. 120 µL ana stok çözeltisi üzerine 120 µL standart çözücü eklenerek 320 ng/mL Standart 5 çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra Standart 5 çözeltisinden başlanmak üzere her bir standart ½ oranda dilüe edilmiş sırasıyla 160 ng/mL, 80 ng/mL, 40ng/mL ve 20 ng/mL konsantrasyonlarda 4 adet daha CO standart çözeltisi hazırlanmıştır.

3.3.10. 8-hidroksi-deoksiguanozin (8-OhdG) Düzeylerinin Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Standart Çözeltilerinin Hazırlanması:

Standartlar, test kitinde sağlanan ana stok çözeltinin Şekil 3.6.'da gösterildiği şekilde dilüe edilmesiyle hazırlanmıştır.



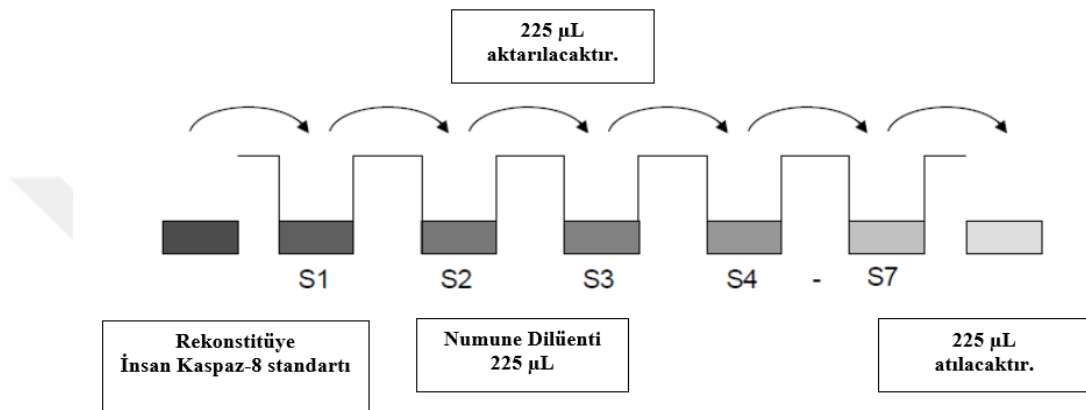
Şekil 3.6. Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.

Çalışma kitinde sağlanan 128 ng/mL konsantrasyondaki stok çözeltinin 120 µL'si üzerine 120 µL standart çözücü eklenerek 64 ng/mL konsantrasyondaki Standart 5 çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra 120 µL standart çözelti üzerine 120 µL standart çözücü eklenerek ve bu işlem her bir standarttan bir sonraki için tekrar edilerek 64 ng/mL ila 4 ng/mL aralığındaki standart çözeltiler hazırlanmıştır.

3.3.11. Kaspaz-8 Düzeylerinin Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Standart Çözeltilerinin Hazırlanması:

Standartlar, test kitinde sağlanan standartın distile su eklenerek rekonstitüye edilmesi ile elde edilen stok çözeltisinin Şekil 3.7.'de gösterildiği şekilde dilüe edilmesiyle hazırlanmıştır.



Şekil 3.7. Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.

Çalışma kitinde sağlanan İnsan Kaspaz-8 standartı distile su eklenerek standart flakon etiketinde belirtilen hacme rekonstitüye edilmiştir (rekonstitüye standartının konsantrasyonu 20 ng/mL'dir). İnsan Kaspaz-8 standartının tam olarak rekonstitüye olması için 10 ila 30 dakika beklenmiş ve dilüsyonları oluşturmadan önce iyice karıştırılmıştır. Her bir standartı içermek üzere 7 adet tüp etiketlenmiş ve her bir standart $\frac{1}{2}$ oranda dilüe edilmiştir. Her bir tüp içerisine pipet ile 225 µL dilüent eklenmiştir. 10.00 ng/mL konsantrasyonda Standart 1 oluşturmak üzere ilk tüpe 225 µL rekonstitüye standart (standartın konsantrasyonu 20.00 ng/mL'dir) eklenmiştir. Numune dilüenti kör şeklinde kullanılmak üzere, standart eğri noktalarını elde edecek şekilde seri halinde 6 dilüsyon oluşturulmuştur.

3.3.12. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Albumin Stok Çözeltisi

Stok için, 2 mg BSA distile-deiyonize su ile son hacim 5 mL olacak şekilde çözülmüştür (400 µg/mL). Stok çözeltiden, 50, 100, 150, 200 ve 400 µg/mL'lik standartlar hazırlanmıştır.

Bakır Sülfat (CuSO₄)

100 mg CuSO₄ 10 mL distile-deiyonize suda çözülerek % 1'lik çözeltisi hazırlanmıştır.

Sodyum/Potasyum Tartarat (Na/K Tartarat)

100 mg Na/K tartarat 5 mL distile-deiyonize suda çözülerek % 2'lik çözeltisi hazırlanmıştır.

Sodyum Karbonat (Na₂CO₃)

10 g Na₂CO₃ 100 mL 0.5 N NaOH içinde çözülerek, % 10'luk çözeltisi hazırlanmıştır.

Sodyum Hidroksit (NaOH)

2 g NaOH, 100 mL distile-deiyonize suda çözülerek, 0.5 N NaOH çözeltisi hazırlanmıştır.

Folin Fenol Reaktifi

5 mL folin fenol distile-deiyonize su ile 50 mL'ye tamamlanarak, 1/10 oranında seyreltilmiş çözeltisi hazırlanmıştır.

3.4. Çalışma Grubunun Seçimi ve Demografik Özellikleri

Bu çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için çalışma protokolü Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca, Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak onaylanmıştır (GO 16/449-28).

Ankara Mesleki ve Çevresel Hastalıklar Hastanesi, Dahiliye (İç Hastalıkları) Polikliniği'ne başvuran kan Pb düzeyi 35 µg/dL üzerinde ve Pb intoksikasyonu tanısı almış 42 hasta işçiden (yaş 25 ila 48, n=42) şelasyon tedavisi öncesinde ve sonrasında olmak üzere kan ve idrar örnekleri toplanmıştır. Çalışma grubu içerisinde bulunan hastalar, hastanede yatan 18 yaş üzeri yetişkin hasta grubundan seçilmiştir. İşçilerin yaş ortalamaları 35.69 ± 7.58 yaş (n=42) olup, işçilerin tamamı erkektir. İlgili hekim tarafından mesleki öyküsü, maruziyetleri ve sigara öyküsü alındıktan sonra rutin tetkikler alınmış ve klinik parametreleri değerlendirilmiştir.

Parametrelerin karşılaştırması Pb maruziyeti nedeniyle EDTA şelasyon tedavisi almak zorunda olan aynı 42 işçinin EDTA şelasyon tedavisi öncesi ve sonrası için yapılmış, her hasta kendi kontrolü olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda yer alan işçilerin, Ankara Mesleki ve Çevresel Hastalıklar Hastanesi'nde ortalama yatış süresi 11.76 gündür. İşçilere uygulanan şelasyon tedavisi sonrası kan Pb düzeyleri klinik ortamında ölçülmüş, ilgili hekim tarafından bu değer esas alınarak hastane yatışı ve takiben taburculuk kararı verilmiştir.

Kronik hastalığa sahip, kemoterapi/radyoterapi tedavisi almış, viral enfeksiyon geçirmiş ve mesleki olarak Pb maruziyeti olmayan bireyler hasta grubuna dahil edilmemiştir.

3.5. Kan ve İdrar Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Ankara Mesleki ve Çevresel Hastalıklar Hastanesi, Dahiliye (İç Hastalıkları) Polikliniği'ne başvuran kan kurşun düzeyi 35 µg/dL üzerinde ve kurşun intoksikasyonu tanısı almış 42 hasta işçiden (yaş 25 ila 48, n=42) şelasyon tedavisi öncesinde ve sonrasında olmak üzere 5 mL'lik 2 tüp heparinize tam kan örneği ve 5 mL'lik 1 tüp idrar örneği alınmıştır. 1 mL tam kan örneği DNA izolasyonu ve polimorfizm çalışması için ependorf tüp içerisine aktarılmış ve çalışmaya kadar -80°C derin dondurucuda saklanmıştır. 1 mL tam kan örneği DNA izolasyonu için ayrılmasını takiben, tam kan örnekleri 2500 rpm'de 15 dk santrifüjlendikten sonra plazma ve supernatant kısmı ayrılarak 2 defa soğuk fosfat tampon ile yıkandıktan sonra alttaki eritrosit kısmı ependorf tüplere porsiyonlanarak -80°C derin dondurucuda analiz sürecine kadar saklanmıştır. Benzer şekilde idrar örnekleri de

ependorf tüplere porsiyonlanarak -80°C'lik derin dondurucuda analiz sürecine kadar saklanmıştır.

3.6. Esansiyel Element Düzeylerinin Ölçülmesi

Yıkılama işleminin gerçekleştirilebilmesi için 1'er mL idrar, plazma ve eritrosit örnekleri ayrı ayrı mikrodalga ünitesinin teflon kaplarına konarak, üzerlerine 7 mL nitrik asit (%65 HNO₃) ve 2 mL hidrojen peroksit (%30 H₂O₂) çözeltileri ilave edilmiştir. Kapakları sıkıştırılarak mikrodalga ünitesinde yıkılama işlemi gerçekleştirilmiştir. İşlem sonunda örnekler polipropilen tüplere alınmış ve ultra saf su ile 10 mL hacme tamamlanmıştır. Analiz süresine kadar +4°C'de saklanmıştır. Yakma işlemi için mikrodalga fırın kullanılmıştır.

Ön işleme tabi tutulan numunelerdeki metal düzeyleri, Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi (AAS) kullanılarak belirlenmiştir. Ca, Mg, Zn ve Cu için AAS cihazının alev ünitesi kullanılmıştır. Analiz için hava/asetilen alev tipi kullanılmıştır. Se ve Mn için AAS cihazının fırın ünitesi kullanılmıştır. Analiz için ortam gazı olarak argon gazı kullanılmıştır. Kalibrasyon için 1 g/L standart çözeltiden dilüsyon yapılarak uygun konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmıştır. Analizde her elemente spesifik olan EDL/HCL tipi oyuk katot lamba kullanılmıştır. Dalga boyu, slit açıklığı, sinyal tipi, sinyal zamanı, numune hacmi, lamba akımı gibi metod bilgileri Tablo 3.2.'de detaylı olarak verilmiştir.

Tablo 3.2. Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi (AAS) Metod Bilgileri.

Element	Ca	Mg	Zn	Cu	Se	Mn
Enstrüman	Alev AAS	Alev AAS	Alev AAS	Alev AAS	Fırın AAS	Fırın AAS
Konsantrasyon Birimi	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	µg/L	µg/L
Enstrüman modu	Absorbans	Absorbans	Absorbans	Absorbans	Absorbans	Absorbans
Alev tipi	Hava /Asetilen	Hava /Asetilen	Hava /Asetilen	Hava /Asetilen	Argon	Argon
Hava akışı	17	17	17	17	-	-
Asetilen akışı	2.2	2	2.1	2.1	-	-
Dalga boyu	422.7	285.2	213.9	324.8	196	279.5
Slit Açıklığı	0.7H	0.7H	0.7H	0.7H	2.0L	0.2L
Sinyal Tipi	AA	AA	AA	AA	AA-BG	AA-BG
Ölçüm Zamanı	3	3	3	1,5	2	3
Okuma öncesi bekleme	1	1	1	1	0	0
Tekrar sayısı	3	3	3	3	3	3
Lamba tipi	C-HCL	C-HCL	C-HCL	C-HCL	EDL	C-HCL
Standart 1	1	0,3	0,25	2 mg/L	20 µg/L	20 µg/L
Standart 2	2	0,4	0,5	4 mg/L	40 µg/L	30 µg/L
Standart 3	4	0,5	1	8 mg/L	60 µg/L	40 µg/L
Standart 4	8	-	2	-	80 µg/L	50 µg/L
Standart 5	16	-	-	-	100 µg/L	-
Kalibrasyon Eşitliği	Sıfırdan Geçen Lineer Eğri	Sıfırdan Geçen Lineer Eğri	Sıfırdan Geçen Lineer Eğri	Sıfırdan Geçen Lineer Eğri	Sıfırdan Geçen Lineer Eğri	Sıfırdan Geçen Lineer Eğri
Kalibrasyon Düzeltmesi	42 örnekte	42 örnekte	42 örnekte	42 örnekte	42 örnekte	42 örnekte

3.7. Aminolevulinat Delta Dehidrataz (ALAD) Enzim Düzeylerinin Ölçülmesi

Kurşun, en yoğun etkiyi δ -ALAD üzerinde gösterir. Pb, enzimin yapısını değiştirerek inhibisyona neden olur. δ -ALAD'ın inhibisyonu, yüksek düzeyde aminolevulinik asit seviyelerine neden olur (131). Heme biyosentezdeki ikinci enzim olan δ -ALAD'ın inhibisyonu, Pb zehirlenmesinin biyokimyasal bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (132).

Parametrenin eritrosit örneklerinde değerlendirilebilmesi için MBS Biotechnology markalı ticari enzim bağlı immunosorban analizi (*double-antikor sandwich enzim linked immunosorbent assay*, ELISA) kiti kullanılmıştır.

Testin prensibi, numunelerdeki ALAD seviyesini tayin etmek için çift antikorlu sandviç enzim bağlı immunosorban testinde (ELISA) olduğu gibi antikor-antijen kompleksinden enzim aracılığıyla oluşan ürünün belirlenmesi üzerine kuruludur.

Çalışma kiti ile sağlanan mikrotitre plakası, ALAD enzimine özgü antikor ile önceden kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler, ALAD enzimine özgü biyotinle işaretlenmiş antikor içeren uygun mikrotiter plaka kuyularına eklenir. Takiben, Horseradish Peroxidase (HRP) ile konjuge edilmiş Avidin her mikropilaka kuyusuna eklenir ve inkübe edilir. TMB substrat solüsyonu eklendikten sonra, yalnızca ALAD, biotin-konjuge antikor ve enzim-konjuge Avidin içeren oyuklar renk değişikliği göstermiştir. Enzim-substrat reaksiyonu sülfürik asit solüsyonu eklenerek sonlandırılır ve renk değişimi ölçülür. Enzim-substrat reaksiyonu, sülfürik asit çözeltisi ilave edilerek sonlandırılır ve renk değişimi, $450\text{nm} \pm 10\text{nm}$ dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Numunelerdeki ALAD konsantrasyonu daha sonra numunelerin O.D. standart eğriye oranı ile karşılaştırılarak belirlenir.

Miktar Tayini Prosedürü

- Standart, numune ve kör çift olarak çalışılmıştır. Standartlar için 7, kör için 1 kuyucuk hazırlanmıştır. Standartın her bir dilüsyonundan, kör ve numunelerden 100 μL uygun kuyucuklara eklenmiştir. Plaka, plaka filmi ile kapatılmıştır. 37°C 'de 2 saat inkübe edilmiştir.
- Her bir kuyucuktan sıvı uzaklaştırılmıştır.
- 100 μL Saptama Reaktifi A çalışma çözeltisinden her bir kuyucuğa eklenmiştir. Plaka, plaka filmi ile kapatılarak 37°C 'de 1 saat inkübe edilmiştir.
- Çözeltiyi çekilmiştir ve çok kanallı pipet kullanılarak her bir kuyucuk 300 μL $1\times$ yıkama çözeltisi ile yıkanmıştır. 1-2 dakika beklenmiştir. Emici bir kağıt üzerine plakayı hafifçe vurularak bütün kuyucuklardan sıvı tamamen uzaklaştırılmıştır. 3 defa iyice yıkanmıştır. En son yıkamadan sonra, kalan yıkama çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Plaka ters çevrilmiş ve emici bir kağıda karşı kapatılmıştır.
- Her bir kuyucuğa 100 μL Saptama Reaktifi B çalışma çözeltisinden eklenmiştir. Plaka, plaka filmi ile kapatılarak 37°C 'de 1 saat inkübe edilmiştir.
- Saptama Reaktifi A çalışma çözeltisi için yukarıda belirtildiği şekilde çözeltinin çekilmesi/yıkaması işlemini 5 defa tekrar edilmiştir.

- Her bir kuyucuğa 90 µL Substrat çözeltisi eklenmiştir. Yeni plaka filmi ile plakayı kapatılmıştır. Işıktan koruyarak 37°C’de 25 dakika inkübe edilmiştir. Substrat çözeltisinin eklenmesi ile sıvının rengi maviye dönmüştür.
- Durdurma reaksiyonu için her kuyucuğa 50 µL durdurma çözeltisi eklenmiştir (Bu işlem sonucunda kuyucuklardaki mavi renkli çözelti hemen sarı renge dönmüştür).
- Durdurma çözeltisi eklendikten sonra 15 dakika içinde 450 nm dalga boyunda OD ile ölçüm gerçekleştirilmiştir.
- Standartların konsantrasyonu ve örneklerin absorbans değerlerine göre standart doğru oluşturulmuş ve regresyon denklemi hesaplanmıştır. Denklemden yararlanarak örneklerdeki ALAD miktarları belirlenmiştir.

3.8. ALAD Enzim Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi ile Analizi

Kurşunun neden olduğu toksisite, bireylerin kısmen metalin etkilerine duyarlılıklarındaki genetik farklılıklar nedeniyle bireyler arasında değişkenlik göstermektedir. Pb toksisitesi ile ilişkili bir genetik polimorfizm, *ALAD*’ın kodlama bölgesinde 177 pozisyonundaki iki ortak baskın alelden (*ALAD*₁ ve *ALAD*₂) kaynaklanan bir G-C transversiyonudur. *ALAD*₁ ve *ALAD*₂ genotipi bulunup bulunmadığının tespit edilmesi bu işçilerde önem taşımaktadır (133).

DNA Saflaştırma:

DNA saflaştırması işlemi, GeneAll Exgene™ Blood SV mini (Katalog No. GA-105-152) markalı ticari kit kullanılarak yürütülmüştür.

Ön hazırlık aşaması

- İlk çalışmadan önce, üreticinin önerdiği şekilde Tampon BW ve Tampon TW içerisine saf etanol (ACS kalitesinde) eklenmiştir.
- Sıcak su banyosu, 56°C’ye hazırlanmış, Tampon AE’nin sıcaklığı, oda sıcaklığına ayarlanmıştır.
- Bütün santrifüj işlemleri oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Prosedür

- Sıcak su banyosu, 56°C'ye ayarlanmıştır.
- Yaklaşık 50 mL saf etanol ağzı kapalı bir kap içerisinde soğutulmak üzere buzdolabının üst kısmına (-20°C) yerleştirilerek hazırlanmıştır.
- İlk çalışmaya başlamadan önce 20 mg/mL konsantrasyonda Proteinaz K çözeltisi hazırlanmıştır.
- Tampon AE'nin sıcaklığı, oda sıcaklığına getirilmiştir.
- Numaralandırılmış 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpü ve etiketler hazırlanmıştır.
- 20 µL Proteinaz K Çözeltisi pipet ile 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpünün içerisine eklenmiştir.
- 200 µL tam kan numunesi, mikrosantrifüj tüpünün içerisine eklenmiştir.
- Proteinaz K çözeltisi ve tam kan numunesi iyice karışmasını sağlamak için pipet ile yavaş yavaş çek-bırak (up&down) yapılmıştır.
- 200 µL Tampon BL, mikrosantrifüj tüpünün içerisine eklenmiş, iyice karışmasını sağlamak için tüp 1 dk. süreyle vortekslenmiştir.
- Hazırlanan karışım, 56°C'lik sıcak su banyosunda 10 dk. boyunca inkübe edilmiştir.
- Mikrosantrifüj tüpünün kapağında materyal kalmasını önlemek için, mikrosantrifüj tüpü 15 sn. boyunca 13000 rpm'de mikrosantrifüj içerisine yerleştirilmiştir.
- DNA'yı içerisine alacak organik fazı sağlamak üzere, buzdolabında -20°C'de bekletmiş olduğumuz saf etanolden 200 µL karışıma eklenmiştir.
- Karışımın iyice karışmasını sağlamak için, mikrosantrifüj tüpü 5-6 defa vortekslenmiştir.
- Mikrosantrifüj tüpünün kapağında materyal kalmasını önlemek için, mikrosantrifüj tüpünü 60 sn. 13000 rpm'de spinner içerisine yerleştirilmiştir.
- Saflaştırma kolonuna (SV kolon) hazırlanan numaralandırılmış etiketler yapıştırılmıştır.
- Pipet 630 µL'ye ayarlanarak saflaştırma kolonuna (SV kolon) karışım dikkatlice, köpürtmeden yavaş yavaş aktarılmıştır.

- Saflaştırma kolonuna (SV kolon) karışım aktarılırken pipetin membrana değmemesine özen gösterilmiştir.
- 1 dk boyunca 6.000 X g üzerinde (> 8.000 rpm) (13.000 rpm) santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpü, yeni bir tüp ile değiştirilmiştir, SV kolon membranı yeni toplama tüpüne aktarılmıştır.
- 600 µL Tampon BW eklenmiştir.
- 1 dk boyunca 6.000 X g üzerinde (> 8.000 rpm) (13.000 rpm) santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpü, yeni bir tüp ile değiştirilmiştir.
- 700 µL Tampon TW eklenmiştir.
- 1 dk boyunca 6.000 X g üzerinde (> 8.000 rpm) (13.000 rpm) santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpündeki kalıntı atılmıştır, peçete içerisine sıvıyı tamamen atmak için ters çevirerek vurulmuştur. SV kolon membranı, toplama tüpüne tekrar konulmuştur.
- Yıkama tamponlarının kalıntılarını ortamdaki uzaklaştırmak için, 1 dk. tam hızda (13.000~20.000 X g) santrifüj edilmiştir, bu aşama iki defa tekrar edilmiştir.
- SV kolon membranı, yeni-temiz 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tübüne yerleştirilmiştir.
- 200 µL Tampon AE (ayırıştırıcı ajan) eklenmiştir.
- Tam kan örneğinden elde edilen saflaştırılmış DNA 0,5 mM EDTA ve 10 mM Tris-HCl, pH 9.0 içeren ve kit içeriğinde sağlanan Tampon AE ile SV kolon membranından ayırıştırılmıştır. Ayırıştırma işlemi, 200 µL Tampon AE kullanılarak iki basamakta yürütülmüştür.
- 1 dk. oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 1 dk. tam hızda (13.000~20.000 X g) santrifüj edilmiştir.
- Mikrosantrifüj tüpündeki sıvı saflaştırılmış DNA olup, üst kısım atılmıştır.

DNA Miktar Tayini

İşçilerin kan örneklerinden saflaştırılan DNA'ların miktarının tayini spektrofotometre cihazında 260 ve 280 nm'de verdikleri absorbans değerleri ölçülerek tespit edilmiştir. Nükleik asitler 260 nm'de; proteinler ise 280 nm'de maksimum absorbans vermektedir ve bu iki değerde ölçülen absorbans değerlerinin oranı (A_{260}/A_{280}), örneğin saflık derecesini göstermekte ve bu oranın DNA için 1,6-1,8 değerleri arasında olması beklenmektedir. DNA miktarı tayininde, 260 nm'de 1 absorbans değeri veren saf DNA miktarının 50 µg/mL olduğu kabul edilmektedir. Hücrelerden saflaştırılan DNA'lar steril bir ependorf içinde TE tamponu ile 1/100 oranında seyreltildikten sonra kuartz küvetine aktararak 260 ve 280 nm'deki absorbanslar ölçülmüş ve A_{260}/A_{280} oranı ve DNA miktarları hesaplanmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Tam kan örneğinden elde edilen saflaştırılmış DNA'lar polimorfizm çalışmasında kullanılmak üzere polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) tabi tutulmuştur. Bunun için ilgilenilen gen bölgesi için özgün primerler tasarlanmış ve bu primerlerin DNA'ya optimum bağlandığı sıcaklığı doğrultusunda standart PCR yöntemi uygulanmış ve standart PCR yöntemi için sıcaklık döngüleri Tablo 3.3'de sunulmuştur.

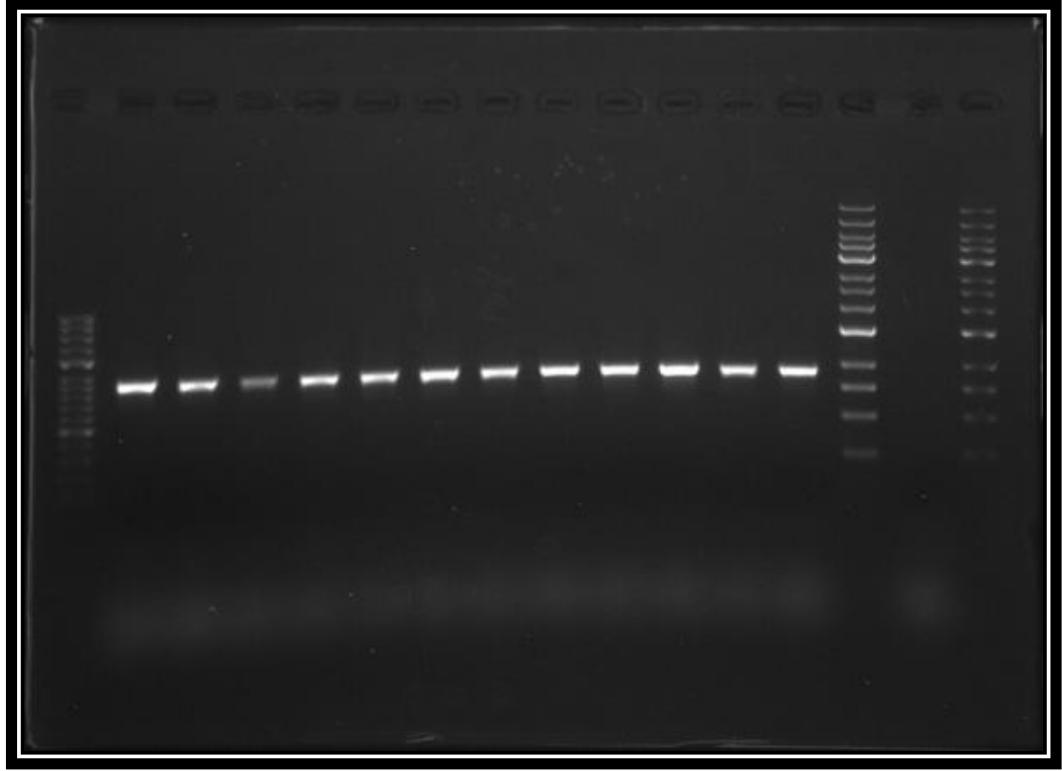
Tablo 3.3. Standart PCR yöntemi için sıcaklık döngüleri.

Protokol	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Zaman
1	1	95°C	5 dakika
2	34	95°C	1 dakika
		52°C	1 dakika
		72°C	1 dakika
3	1	72°C	10 dakika
4	-	4°C	∞

Jel Yükleme

Parafinli kâğıt üzerine 2 µl Jel Yükleme Solüsyonu 6X (Orange G) eklenmiştir. Üzerine 6 µl DNA PCR ürünü eklenmiş ve pipet ile yukarı-aşağı yön doğrultusunda çekilmiştir. Takiben, jel içerisindeki kuyucuklara yükleme DNA ladder ve parafin üzerinde oluşturduğumuz 8 µl karışım (2 µl Jel Yükleme

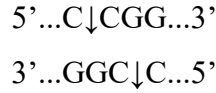
Solüsyonu 6X + 6 µl DNA PCR ürünü) eklenmiştir. Jel içerisindeki en sağ ve en sol kuyucuğuna 1 µl DNA ladder eklenmiştir. Jel havuzuna jeli yerleştirdikten sonra, kapağı kapatılmıştır. 100 Volt sabit, akım değişken olacak şekilde jel elektroforezi yürütülmüştür. Jel elektroforez tamamlandığında, Kodak GEL Logic 200 ile görüntülemesi yapılmıştır, görüntü örneği Şekil 3.8.'de sunulmaktadır.



Şekil 3.8. Çalışmamızda 31-42 numaralı işçilere ait DNA örnekleri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerine ait Jel Elektroforez görüntüsü.

ALAD Enzim Genotipinin Belirlenmesi

Tam kan örneklerinde saflaştırılan DNA örnekleri kullanılarak yapılan PCR çalışmasından çoğaltılan genetik materyal, ALAD geninin genomik dizisinin 177. kodonunda ALAD₁ ve ALAD₂ genotipi bulunup bulunmadığının tespit edilmesi amacıyla polimorfizm çalışmasında kullanılmıştır. Bunun için HpaII (10 U/µL) restriksiyon enzimi kullanılmıştır. HpaII restriksiyon enziminin kesim bölgesi Şekil 3.9.'da gösterilmektedir.



Şekil 3.9. HpaII restriksiyon enziminin kesim bölgesi.

Polimorfizm çalışması için hazırlanan reaksiyon ortamı Tablo 3.4’de sunulmuştur.

Tablo 3.4. Polimorfizm çalışması için hazırlanan reaksiyon ortamı.

	Miktarlar (µL)
Hpa II enzimi	1 µL
10X NZYBuffer C	2 µL
Substrat DNA	5 µL
Sterilize Ultra Saf su	12 µL

3.9. Plazma Glutasyon (GSH) Düzeylerinin Ölçülmesi

Sistein, glutamik asit ve glisin kalıntılarını içeren bir tripeptit olan GSH birçok hücrel işlevi etkileyen endojen bir antioksidan görevi görür. GSH ve çeşitli enzimler, organizmalarda reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin (sırasıyla, ROS ve RNS) kullanımında ve düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynayan glutasyon sistemini oluşturmak üzere birleşir. Oksidatif strese bağlı olarak antioksidan savunmadaki değişimlerde kullanılan önemli bir parametredir (134).

Parametrenin kan plazma örneklerinde değerlendirilebilmesi için Sun Red Biotechnology markalı ticari enzim bağlı immunosorban analizi (*double-antikor sandwich enzim linked immunosorbent assay*, ELISA) kiti kullanılmıştır.

Testin prensibi, numunelerdeki insan glutasyonu (GSH) seviyesini tayin etmek için çift antikorlu sandviç enzim bağlı immunosorban testinde (ELISA) olduğu gibi antikor-antijen kompleksinden enzim aracılığıyla oluşan ürünün belirlenmesi üzerine kuruludur. Kuyucuklara hGSH monoklonal antikor ile hGSH eklenmiş ve inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra biyotinle işaretlenmiş hGSH antikorları eklenmiş ve immün kompleksi oluşturmak için Streptavidin-HRP ile birleştirilmesi sağlanmıştır. Tekrar bir inkübasyonu takiben bağlanmayan enzimler uzaklaştırılmıştır. Kromojen çözelti A ve B eklenerek renkli çözeltinin absorbansı ölçülmüştür. Renk şiddeti ile örneklerde bulunan hGSH madde konsantrasyonu arasında pozitif bir korelasyon vardır.

Miktar Tayini Prosedürü

- Standart, numune ve kör çift olarak çalışılmıştır.
- Örneklerin uygulanması sırasında kör kuyucuklarına, sadece renk çözeltisi A, B ve durdurma çözeltisi eklenmiştir.
- Standart kuyucuklarına, 50 µL standart ve 50 µL Streptavidin-HRP eklenmiştir. Örnek test kuyucuklarına ise 40 µL numune ile 10 µL hGSH-antikör ve 50 µL Streptavidin-HRP ilave edilmiştir. Sonra kuyucuklar kapatma membranı ile kapatılmış ve yavaşça çalkalandıktan sonra 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.
- Distile su ile 30 kat daha dilüe edilerek yıkama çözeltisi hazırlanmış ve 96 kuyucuklu plağa 300 µL uygulanmış ve uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmıştır.
- 50 µL renk çözeltisi A eklenmiş, ardından 50 µL renk çözeltisi B aynı kuyucuğa ilave edilmiş ve nazikçe karıştırılmıştır. Işıktan koruyarak 37°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Durdurma reaksiyonu için her kuyucuğa 50 µL durdurma çözeltisi eklenmiştir (Bu işlem sonucunda kuyucuklardaki mavi renkli çözelti hemen sarı renge dönmüştür).
- Durdurma çözeltisi eklendikten sonra 15 dakika içinde 450 nm dalga boyunda OD ile ölçüm gerçekleştirilmiştir.
- Standartların konsantrasyonu ve örneklerin absorbans değerlerine göre standart doğru oluşturulmuş ve regresyon denklemi hesaplanmıştır. Denklemden yararlanarak örneklerdeki hGSH miktarları belirlenmiştir.

3.10. Plazma Glutatyon Peroksidaz (GPx) Enzim Düzeylerinin Ölçülmesi

Selenyum içeren glutatyon peroksidazlar (GPxs)₁₋₄, oksidatif strese karşı koruma sağlar, inflamasyonu ve oksidan kaynaklı programlanmış hücre ölümünü inhibe eder (135). GPx'lerin H₂O₂ veya organik hidroperoksitleri indirgeyici olarak glutatyon (GSH) kullanarak sırasıyla H₂O veya karşılık gelen alkollere indirgenmesini katalize ettiği bilinmektedir (136).

Parametrenin kan plazma örneklerinde değerlendirilebilmesi için Hangzhou Eastbiopharm Co., Ltd. markalı ticari enzim bağlı immunosorban analizi (*double-antikor sandwich enzim linked immunosorbent assay*, ELISA) kiti kullanılmıştır.

Test prensibi, ELISA'da olduğu gibi, antikor-antijen kompleksinden enzim aracılığıyla oluşan ürünün belirlenmesidir. Analizde, kuyucuklara GSH-Px monoklonal antikor ile önceden GSH-Px eklenmiş ve inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra biyotinle işaretlenmiş GSH-Px antikorları ilave edilerek immün kompleksi oluşturmak için Streptavidin-HRP ile birleştirilmesi sağlanmıştır. Tekrar eden inkübasyonu takiben bağlanmayan enzimlerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Kromojen A ve B çözeltisi ilave edilmiş, renkli çözeltinin absorbansı ölçülmüştür. Örneklerde bulunan GSH-Px konsantrasyonu ile renk şiddeti arasında pozitif bir ilişki vardır.

Miktar Tayini Prosedürü

- Standart, kör ve numune çift olarak çalışılmıştır.
- Örneklerin uygulanması sırasında kör kuyucuklarına, sadece renk çözeltisi kromojen A, B ve durdurma çözeltisi eklenmiştir.
- Standart kuyucuklarına, 50 µL standart ve 50 µL Streptavidin-HRP eklenmiştir. Test kuyucuklarına ise 40 µL numune ve sonra 10 µL GSH-Px-antikor ve 50 µL Streptavidin-HRP ilave edilmiştir. Daha sonra kuyucuklar kapatma membranı ile kapatılmış ve nazikçe çalkaladıktan sonra 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.
- Yıkama işlemi için distile su ile 30 kat daha seyreltilmiş yıkama çözeltisinden çalışılan plağa 300 µL uygulanmış ve uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.
- 50 µL renk çözeltisi A ve ardından 50 µL renk çözeltisi B aynı kuyucuğa ilave edilmiş ve yavaşça çalkalanmıştır. 37°C'de 10 dakika ışıktan korunarak inkübe edilmiştir.
- Reaksiyonun durdurulması için her kuyucuğa 50 µL durdurma çözeltisi eklenmiştir (Kuyucuklardaki mavi renkli çözelti hemen sarı renge dönmüştür).
- OD ile ölçümü için durdurma çözeltisi eklendikten sonra 15 dakika içinde 450 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır.

- Standartların konsantrasyonu ve okunan absorbands değerlerine göre analizin standart doğrusu çizilmiş ve regresyon denklemi hesaplanmıştır. Denklemden yararlanarak örneklerdeki GSH-Px aktivitesi belirlenmiştir.

3.11. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçülmesi

Süperoksit dismutaz, antioksidan sistemdeki temel bir enzimdir ve süperoksit serbest radikalleri $O_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyonu ile ROS'un etkisizleştirilmesinde çok önemli bir rol oynar. SOD'lar, temel katalitik metalleri ile ilişkilidir. Etki mekanizmaları, geçiş metallerinin indirgenmesine ve yeniden oksitlenmesine bağlıdır. Pb, toksik etkilerini belirli proteinlere bağlanarak gösteren toksik bir maddedir. Pb toksisitesinin sonuçları, Pb'nin metalloenzimler ile etkileşimi ile ilişkilidir. Pb, enzimlerin normal biyokimyasal fonksiyonları için gerekli olan temel metallerin yerini alır. Bir metalloenzim olan SOD, optimal aktiviteleri için Cu^{+2} ve Zn^{+2} gibi belirli kofaktörlere ihtiyaç duyar (137).

Hastalardan alınan kandan elde edilen eritrosit örneklerinde, SOD aktivitesi spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir. Yöntem, ortamdaki SOD'ın pirogallol oksidasyonunu inhibe etmesi esasına dayanmaktadır. Spesifik aktivite İÜ/mg protein birimi ile ifade edilmiştir. 1 İÜ, 25°C'de 1 dakikada, pirogallol oksidasyonunu %50 inhibe eden enzim aktivitesi olarak tanımlanmıştır (138).

Eritrosit hemolizatının 30 µL'si 60 µL distile su eklenerek dilüe edilmiştir. Ölçüm küvetine 2,9 ml 50 mM fosfat tamponu, 20 µL dilüe hemolizat ve 0,1 ml 6 mM pirogallol konmuş ve altüst ederek 20 sn. karıştırılmıştır. Absorbans değişimi spektrofotometrede 420 nm'de 2 dk. süre ile izlenmiştir.

3.12. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Ölçülmesi

Katalazlar, $2H_2O_2$ 'i yüksek verimlilikle $2H_2O$ ve O_2 'e indirgeyerek hücre oksidatif hasarını önleyen yaygın olarak bulunan enzimlerdir. Enzim önce, diğer hidroperoksidazların aksine, H_2O_2 ile daha fazla reaksiyona girerek dinlenme durumuna geri indirgenen Bileşik I (Cpd I) olarak bilinen yüksek değerlikli bir Fe ara maddesine oksitlenir. Kinetik çalışmalardan elde edilen kanıtlar, CAT Cpd I oluştuğunda, O_2 ve bir H_2O molekülü oluşturmak için ikinci bir H_2O_2 molekülü ile hızla reaksiyona girdiğini göstermektedir (139).

Hastalardan alınan kandan elde edilen eritrosit örneklerinde, CAT aktivitesi spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir. Yöntem, ortamdaki CAT'ın hidrojen peroksiti (H_2O_2) H_2O ve O_2 'e yıkılması esasına dayanmaktadır. Spesifik aktivite İÜ/mg protein birimi ile ifade edilmiştir. 1 İÜ, 25°C'de 1 dakikada, 1 μM H_2O_2 'in yıkımını katalizleyen enzim aktivitesi olarak tanımlanmıştır (140).

Hazırlanan eritrosit hemolizatının 10 μL 'si 50 mM fosfat tamponu ile 5 ml'ye tamamlanmıştır. Ölçüm küvetine 2 mL dilüe hemolizat ve 1 mL 10 mM H_2O_2 konulduktan sonra altüst ederek karıştırılmıştır ve absorbans değişimi spektrofotometrede 240 nm'de 30 sn izlenmiştir.

3.13. Plazma Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Ölçülmesi

Oksidatif stresi değerlendirmek için, serbest radikallerin saldırısına duyarlı olan genellikle çoklu doymamış yağ asitleri olmak üzere lipid peroksidasyon ürünlerinin düzeyleri yaygın olarak esas alınmaktadır. MDA, çoklu doymamış yağ asidi peroksidasyonunun başlıca ve en çok araştırılan ürünüdür. Oldukça toksik bir molekül olan MDA, lipid peroksidasyonunun bir belirtecinden daha fazlası olarak düşünülmelidir (48).

Parametrenin kan plazma örneklerinde miktar tayininin değerlendirilebilmesi için Hangzhou Eastbiopharm Co., Ltd. markalı ticari enzim bağlı immunosorban analizi (*double-antikor sandwich enzim linked immunosorbent assay*, ELISA) kiti kullanılmıştır.

Test prensibi, ELISA'da olduğu gibi, antikor-antijen kompleksinden enzim aracılığıyla oluşan ürünün belirlenmesidir. Analizde, kuyucuklara MDA monoklonal antikor ile önceden MDA eklenmiş ve inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra biyotinle işaretlenmiş MDA antikorları ilave edilerek immün kompleksi oluşturmak için Streptavidin-HRP ile birleştirilmesi sağlanmıştır. Tekrar eden inkübasyonu takiben bağlanmayan enzimlerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Kromojen A ve B çözeltisi ilave edilmiş, renkli çözeltinin absorbansı ölçülmüştür. Örneklerde bulunan MDA konsantrasyonu ile renk şiddeti arasında pozitif bir ilişki vardır.

Miktar Tayini Prosedürü

- Standart, kör ve numune çift olarak çalışılmıştır.
- Örneklerin uygulanması sırasında kör kuyucuklarına, sadece renk çözeltisi kromojen A, B ve durdurma çözeltisi eklenmiştir.
- Standart kuyucuklarına, 50 µL standart ve 50 µL Streptavidin-HRP eklenmiştir. Test kuyucuklarına ise 40 µL numune ve sonra 10 µL MDA-antikör ve 50 µL Streptavidin-HRP ilave edilmiştir. Daha sonra kuyucuklar kapatma membranı ile kapatılmış ve nazikçe çalkaladıktan sonra 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.
- Yıkama işlemi için distile su ile 30 kat daha seyreltilmiş yıkama çözeltisinden çalışılan plağa 300 µL uygulanmış ve uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.
- 50 µL renk çözeltisi A ve ardından 50 µL renk çözeltisi B aynı kuyucuğa ilave edilmiş ve yavaşça çalkalanmıştır. 37°C'de 10 dakika ışıktan korunarak inkübe edilmiştir.
- Reaksiyonun durdurulması için her kuyucuğa 50 µL durdurma çözeltisi eklenmiştir (Kuyucuklardaki mavi renkli çözelti hemen sarı renge dönmüştür).
- OD ile ölçümü için durdurma çözeltisi eklendikten sonra 15 dakika içinde 450 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır.
- Standartların konsantrasyonu ve okunan absorban değerlerine göre analizin standart doğrusu çizilmiş ve regresyon denklemi hesaplanmıştır. Denklemden yararlanarak örneklerdeki MDA miktarları belirlenmiştir.

3.14. Plazma Protein Karbonil (CO) Düzeylerinin Tayini

Karbonil (CO) grupları (aldehitler ve ketonlar), oksitlendiklerinde protein yan zincirlerinde (özellikle Pro, Arg, Lys ve Thr) üretilir. Bu parçalar kimyasal olarak kararlıdır ve bu durum hem tespit edilmeleri hem de saklanmaları için yararlıdır. CO türevleri, proteinlerin a-amidasyon yoluyla veya glutamil yan zincirlerinin oksidasyonu ile oksidatif bölünmesi yoluyla da üretilebilir, bu durum N-terminal amino asidin bir a-ketoasil türev tarafından bloke edildiği bir peptit oluşumuna yol açar (141).

Parametrenin kan plazma örneklerinde düzeyinin değerlendirilebilmesi için Hangzhou Eastbiopharm Co., Ltd. markalı ticari enzim bağlı immunosorban analizi (double-antikor sandwich enzim linked immunosorbent assay, ELISA) kiti kullanılmıştır.

Test prensibi, ELISA'da olduğu gibi, antikor-antijen kompleksinden enzim aracılığıyla oluşan ürünün belirlenmesidir. Analizde, kuyucuklara CO monoklonal antikor ile önceden CO eklenmiş ve inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra biyotinle işaretlenmiş CO antikorları ilave edilerek immün kompleksi oluşturmak için Streptavidin-HRP ile birleştirilmesi sağlanmıştır. Tekrar eden inkübasyonu takiben bağlanmayan enzimlerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Kromojen A ve B çözeltisi ilave edilmiş, renkli çözeltinin absorbansı ölçülmüştür. Örneklerde bulunan CO konsantrasyonu ile renk şiddeti arasında pozitif bir ilişki vardır.

Miktar Tayini Prosedürü

- Standart, kör ve numune çift olarak çalışılmıştır.
- Örneklerin uygulanması sırasında kör kuyucuklarına, sadece renk çözeltisi kromojen A, B ve durdurma çözeltisi eklenmiştir.
- Standart kuyucuklarına, 50 µL standart ve 50 µL Streptavidin-HRP eklenmiştir. Test kuyucuklarına ise 40 µL numune ve sonra 10 µL CO-antikor ve 50 µL Streptavidin-HRP ilave edilmiştir. Daha sonra kuyucuklar kapatma membranı ile kapatılmış ve nazikçe çalkaladıktan sonra 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.
- Yıkama işlemi için distile su ile 30 kat daha seyreltilmiş yıkama çözeltisinden çalışılan plağa 300 µL uygulanmış ve uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.
- 50 µL renk çözeltisi A ve ardından 50 µL renk çözeltisi B aynı kuyucuğa ilave edilmiş ve yavaşça çalkalanmıştır. 37°C'de 10 dakika ışıktan korunarak inkübe edilmiştir.
- Reaksiyonun durdurulması için her kuyucuğa 50 µL durdurma çözeltisi eklenmiştir (Kuyucuklardaki mavi renkli çözelti hemen sarı renge dönmüştür).
- OD ile ölçümü için durdurma çözeltisi eklendikten sonra 15 dakika içinde 450 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır.

- Standartların konsantrasyonu ve okunan absorban değerlerine göre analizin standart doğrusu çizilmiş ve regresyon denklemi hesaplanmıştır. Denklemden yararlanarak örneklerdeki CO miktarları belirlenmiştir.

3.15. Deoksiguanozin (8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, 8-OHdG) Düzeylerinin Tayini

Hidroksil radikali, DNA'nın tüm nükleobazları ile reaksiyona girer, ancak en sık olarak guanin hasarına neden olur. Bu durum, nükleosit formu olan C8-hidroksiguanin (8-OHGua) veya deoksiguanozin (8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, 8-OHdG) oluşumuna yol açar. 8-OHdG oluşumu, organizmanın antioksidan sisteminin zayıflamasının yanı sıra hasarlı nükleik asidin onarımından kaynaklanır. 8-OHdG promotajeniktir ve bu nedenle artan karsinogenez riskinin potansiyel bir biyobelirteci olarak kullanılabilir (99).

Parametrenin idrar örneklerinde düzeyinin değerlendirilebilmesi için Hangzhou Eastbiopharm Co., Ltd. markalı ticari enzim bağlı immunosorban analizi (double-antikor sandwich enzim linked immunosorbent assay, ELISA) kiti kullanılmıştır.

Test prensibi, ELISA'da olduğu gibi, antikor-antijen kompleksinden enzim aracılığıyla oluşan ürünün belirlenmesidir. Analizde, kuyucuklara 8-OHdG monoklonal antikor ile önceden 8-OHdG eklenmiş ve inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra biyotinle işaretlenmiş 8-OHdG antikorları ilave edilerek immün kompleksi oluşturmak için Streptavidin-HRP ile birleştirilmesi sağlanmıştır. Tekrar eden inkübasyonu takiben bağlanmayan enzimlerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Kromojen A ve B çözeltisi ilave edilmiş, renkli çözeltinin absorbanı ölçülmüştür. Örneklerde bulunan 8-OHdG konsantrasyonu ile renk şiddeti arasında pozitif bir ilişki vardır.

Miktar Tayini Prosedürü

- Standart, kör ve numune çift olarak çalışılmıştır.
- Örneklerin uygulanması sırasında kör kuyucuklarına, sadece renk çözeltisi kromojen A, B ve durdurma çözeltisi eklenmiştir.

- Standart kuyucuklarına, 50 µL standart ve 50 µL Streptavidin-HRP eklenmiştir. Test kuyucuklarına ise 40 µL numune ve sonra 10 µL 8-OhdG-antikör ve 50 µL Streptavidin-HRP ilave edilmiştir. Daha sonra kuyucuklar kapatma membranı ile kapatılmış ve nazikçe çalkaladıktan sonra 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.

- Yıkama işlemi için distile su ile 30 kat daha seyreltilmiş yıkama çözeltisinden çalışılan plağa 300 µL uygulanmış ve uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

- 50 µL renk çözeltisi A ve ardından 50 µL renk çözeltisi B aynı kuyucuğa ilave edilmiş ve yavaşça çalkalanmıştır. 37°C'de 10 dakika ışıktan korunarak inkübe edilmiştir.

- Reaksiyonun durdurulması için her kuyucuğa 50 µL durdurma çözeltisi eklenmiştir (Kuyucuklardaki mavi renkli çözelti hemen sarı renge dönmüştür).

- OD ile ölçümü için durdurma çözeltisi eklendikten sonra 15 dakika içinde 450 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır.

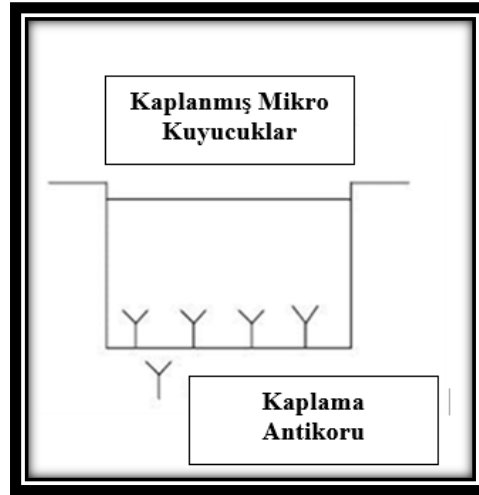
- Standartların konsantrasyonu ve okunan absorbans değerlerine göre analizin standart doğrusu çizilmiş ve regresyon denklemi hesaplanmıştır. Denklemden yararlanarak örneklerdeki 8-OhdG miktarları belirlenmiştir.

3.16. Kaspaz-8 Düzeylerinin Tayini

Kaspaz-8, apoptoz adı verilen programlanmış hücre ölümünde yer alan kritik derecede önemli olan apikal bir kaspazdır (142).

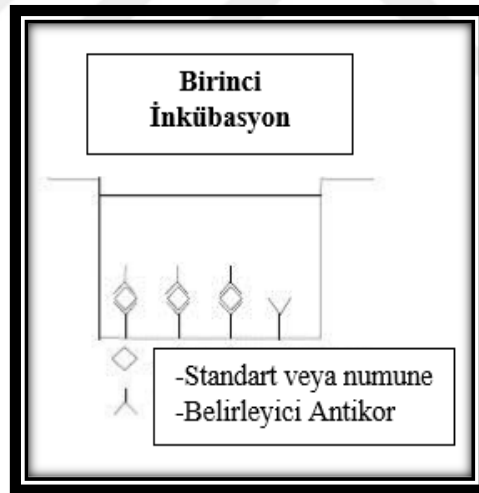
Parametrenin plazma örneklerinde düzeyinin değerlendirilebilmesi için Thermo Fisher Scientific Inc., Invitrogen markalı ticari enzim bağlı immunosorban analizi (double-antikör sandwich enzim linked immunosorbent assay, ELISA) kiti kullanılmıştır.

Test prensibi, mikro kuyucuklar içerisine Şekil 3.10.'da gösterildiği üzere anti-insan kaspaz-8 kaplama antikoru adsorbe ettirilmiştir.



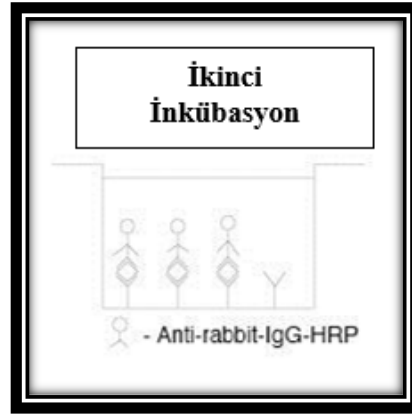
Şekil 3.10. Anti-insan kaspaz-8 kaplama antikoru ile kaplanmış mikro kuyucuklar.

Numunede veya standart içerisinde varolan insan kaspaz-8 mikro kuyucuklara adsorbe edilmiş antikorlara Şekil 3.11.'te gösterildiği üzere bağlanır. Belirleyici antikor, ilk antikor tarafından bağlanan insan kaspaz-8'e bağlanır.



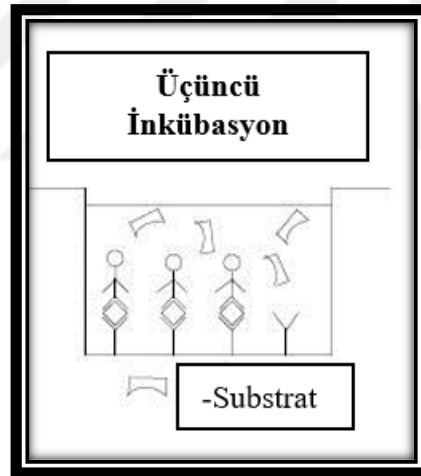
Şekil 3.11. İlk inkübasyon basamağı.

İnkübasyondan sonra bağlanmamış belirleyici antikorlar yıkama basamağında uzaklaştırılmıştır. Belirleyici Antikorları bağlayacak olan Anti-rabbit-IgG-HRP Şekil 3.12.'de gösterildiği üzere eklenmiştir.



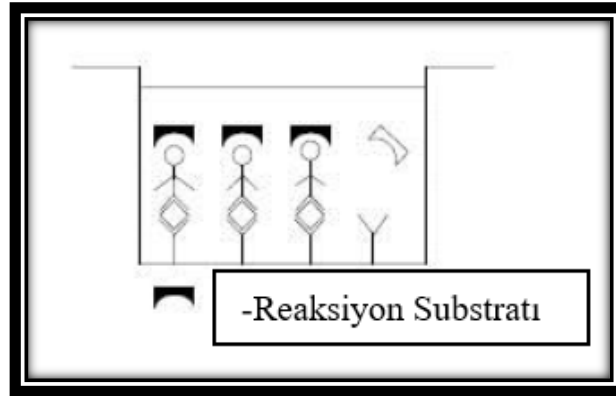
Şekil 3.12. İkinci inkübasyon basamağı.

İnkübasyondan sonra bağlanmamış anti-rabbit-IgG-HRP yıkama basamağında uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklara HRP içeren substrat çözeltisi reaktifi Şekil 3.13.'te gösterildiği üzere eklenmiştir.



Şekil 3.13. Üçüncü inkübasyon basamağı.

Numunede veya standartta bulunan insan kaspaz-8 miktarının oranına göre Şekil 3.14'te gösterildiği üzere renkli ürün oluşmaktadır. Reaksiyon asit eklenmesi ile durdurulmuş ve 450 nm'de absorbans ölçülmüştür. 7 adet insan kaspaz-8 standart çözeltisinden standart eğri hesaplanmış ve insan kaspaz-8 konsantrasyonu tayin edilmiştir.



Şekil 3.14. Reaksiyon substratının oluşumu.

Miktar Tayini Prosedürü

- Standart, kör ve numune çift olarak çalışılmıştır.
- 100 μ L Numune Çözeltisi kör kuyucuklarına iki defa eklenmiştir.
- 50 μ L Numune Çözeltisi numune kuyucuklarına eklenmiştir.
- Her bir numuneden 50 μ L numune kuyucuklarına iki defa eklenmiştir.
- Hazırlanmış olan Belirleyici Antikor'dan 50 μ L bütün kuyucuklara eklenmiştir.
- Kuyucuklar yapışkanlı film ile kaplanmış ve oda sıcaklığında (18°C-25°C) 2 saat süreyle 400-rpm'e ayarlanmış mikrolaka çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir.
- Yapışkanlı film çıkartılmış ve kuyucuklar boşaltılmıştır.
- Mikrokuyucuk dizileri, 3 defa uygun şekilde yıkanmıştır. Her bir yıkama arasında mikrokuyucuk içeriğini aspire ederek, mikrokuyucuk dizilerini yaklaşık olarak 400 μ L Yıkama Tamponu ile yıkanmıştır. Aspirasyondan önce Yıkama Tamponu'nun kuyucuklarda tam oturması için yaklaşık olarak 10-15 sn zaman aralığı bırakılmıştır. Mikrokuyucukların yüzeyinin çizilmemesine özen gösterilmiştir.
- Son yıkama basamağından sonra, kuyucukları boşaltılmış ve kuyucuk dizilerini kağıt havlu üzerine hafifçe vurarak fazla miktardaki Yıkama Tamponu'yu uzaklaştırılmıştır.
- Kör kuyucuklarını da içerecek şekilde bütün kuyucuklara 100 μ L dilüe anti-rabbit-IgG-HRP eklenmiştir.

- Kuyucuklar yapışkanlı film ile kaplanmış ve oda sıcaklığında (18°C-25°C) 1 saat süreyle 400-rpm'e ayarlanmış mikrolaka çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir.
- Yapışkanlı film çıkartılmış ve kuyucuklar boşaltılmıştır. Mikrokuyucuk dizileri, 3 defa yıkanmıştır. Hızlıca diğer basamağa geçilmiştir.
- Bütün kuyucuklara 100 µL TMB Substrat Çözeltisi pipetle eklenmiştir.
- Mikrokuyucuk dizileri oda sıcaklığında (18°C-25°C) 15-dakika süreyle inkübe edilmiştir. Yoğun ışığa maruziyetten kaçınılmıştır.
- Plaka üzerindeki renk değişimi gözlenmiş ve substrat reaksiyonu durdurulmuştur. Koyu mavi renk oluştuğunda Durdurma Çözeltisinin eklenmesi önerilmektedir. 100 µL Durdurma Çözeltisi her bir kuyucuğa hızlıca pipetle eklenerek enzim reaksiyonu durdurulmuştur. Enzimin tamamen etkisiz hale gelmesi için Durdurma Çözeltisinin hızlıca ve tekdüze şekilde mikrokuyucuklara yayılması önemlidir. Sonuçlar Durdurma Çözeltisi eklendikten hemen sonra okunmuştur.
- Her bir mikrokuyucuğun absorbansını ana dalga boyutu 450 nm spektrofotometre de okunmuştur.
- Standartların konsantrasyonu ve okunan absorbans değerlerine göre analizin standart doğrusu çizilmiş ve regresyon denklemi hesaplanmıştır. Denklemden yararlanarak örneklerdeki kaspaz-8 miktarları belirlenmiştir.

3.17. Protein Miktar Tayini

Ölçülen oksidatif stres parametreleri, protein miktarına oranlanarak ifade edilmiştir. Protein düzeylerinin saptanması için Lowry metodu kullanılmıştır (143). BSA standart çözeltileri, kör (distile-deiyonize su) ve örneklerin 200'er µL'si üzerine 200 µL Cu reaktifi eklenmiştir. Vortekslenip 10 dk oda ısısında bekletilmiştir. Süre sonunda tüplere 600 µL folin-fenol çözeltisi ilave edilmiştir ve hemen vortekslenerek 50°C'lik su banyosunda 10 dk süre ile inkübe edilmiştir. Su banyosundan çıkan tüplerdeki çözeltinin optik dansitesi 540 nm'de spektrofotometrede okunarak standart doğru çizilmiş ve örneklerin protein içerikleri saptanmıştır.

3.18. Çalışma Grubunun Klinik Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Biyokimyasal olarak klinik parametrelerin analizi Ankara Keçiören Mesleki ve Çevresel Hastalıklar Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarında gerçekleştirilmiş olup bireylerin klinik verileri Göğüs Hastalıkları Polikliniği'nde bulunan uzman hekim tarafından sağlanmıştır.

3.19. İstatiksel Analiz

İstatistiksel analizler Windows Sürüm 22.0 için paket program IBM SPSS'de gerçekleştirilmiştir. Kolmogorov Smirnov testi: nümerik değişkenlerin normal dağılıma sahip olup olmadığını incelemek için kullanılmıştır. Gruplar arasında sayısal değişkenler arasında fark olup olmadığını belirlemek için Paired *T* Test kullanılmıştır.

Sayısal değişkenler arasındaki ilişki Pearson veya Spearman korelasyon katsayısı tarafından gösterilmiştir. Tüm veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SS) olarak ifade edilmiştir. Bütün karşılaştırmalarda, *p* değerlerinin 0,05'ten küçük olması anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hastalara ait Demografik Bulgular

Ankara Mesleki ve Çevresel Hastalıklar Hastanesi, Dahiliye (İç Hastalıkları) Polikliniği'ne başvuran kan Pb düzeyi 35 µg/dL üzerinde ve Pb intoksikasyonu tanısı almış 42 hasta işçiden (yaş ortalaması 35.69 ± 7.58 yaş, n=42) şelasyon tedavisi uygulanmasından öncesinde ve sonrasında olmak üzere kan ve idrar örnekleri toplanmıştır. Çalışma grubu içerisinde bulunan hastalar, hastanede yatan 18 yaş üzeri yetişkin hasta grubundan seçilmiştir. Bu hastalara, şelasyon tedavisi hastane ortamında uygulanmıştır. İlgili uzman hekim tarafından işçilerin mesleki öyküsü, maruziyetleri ve sigara öyküsü alındıktan sonra klinik parametreleri değerlendirilmiştir. İşçilerin tamamı erkektir. İşçilerin sigara kullanım alışkanlıkları değerlendirildiğinde, 42 işçiden 38 işçi sigara kullanırken 5 işçi sigara kullanmamaktadır.

Çalışma grubunda yer alan, Pb intoksikasyonu tanısı almış 42 işçiden 20'si akü işçisi, 4'ü döküm işçisi, 1'i kurşun ftalasyon işçisi, 11'i metal işçisi, 3'ü PVC boru fabrikası işçisidir. İşçilerin temel demografik özelliklerine ilişkin verileri Tablo 4.1.'de ve işçilerin karakteristik özellikleri Tablo 4.2.'de sunulmaktadır.

Tablo 4.1. Kurşun maruziyeti işçilerin çalışma alanları ve çalışma süreleri (n=42).

Hasta No.	Uluslararası Hastalık Sınıflandırması (<i>International Statistical Classification of Diseases, ICD10</i>) Tanıları	Çalışma Süresi (yıl)	Çalışma Alanı
1	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	1.5	Akü İşçisi
2	Z57-Mesleki risk faktörlerine maruz kalma	1	Akü İşçisi
3	Z57-Mesleki risk faktörlerine maruz kalma	3	Metal İşçisi
4	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	1.3	Metal İşçisi
5	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	2.4	Metal İşçisi/ Taşlama
6	F41.1-Yaygın anksiyete bozukluğu	6	Metal İşçisi
7	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	4	Akü İşçisi
8	Z57-Mesleki risk faktörlerine maruz kalma	5	Döküm İşçisi
9	Z57-Mesleki risk faktörlerine maruz kalma	1.5	Metal İşçisi
10	Z57-Mesleki risk faktörlerine maruz kalma	0.9	Döküm İşçisi
11	Z57-Mesleki risk faktörlerine maruz kalma	8	Metal İşçisi
12	Z57-Mesleki risk faktörlerine maruz kalma	18	Akü İşçisi/ Kurşun Eritme
13	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	2	Akü İşçisi
14	G56.0-Karpal tünel sendromu	1.5	PVC Boru Fabrikası İşçisi
15	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	1.25	PVC Boru Fabrikası İşçisi
16	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	8.5	PVC Boru Fabrikası İşçisi
17	M51.8-İntervertebral disk bozuklukları diğer, tanımlanmış	19	Metal İşçisi
18	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	4	Akü İşçisi
19	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	10	Kurşun Fırlatma İşçisi
20	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	2.	Metal İşçisi
21	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	0.4	Metal İşçisi
22	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	1	Akü İşçisi
23	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	1.5	Metal İşçisi
24	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	1.3	Akü İşçisi
25	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	20	Döküm İşçisi
26	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	4	Akü İşçisi
27	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	8	Akü İşçisi
28	Z57-Mesleki risk faktörlerine maruz kalma	1.25	Akü İşçisi
29	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	1.5	Akü İşçisi
30	J39-Üst solunum yolu diğer hastalıkları/ Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi/ Z01-Yakınma veya bilinen teşhisi olmayan kişilerin diğer özel	0	Akü İşçisi
31	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	1	Akü İşçisi
32	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	0	Akü İşçisi
33	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	11	Metal İşçisi
34	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	1	Akü İşçisi
35	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	0.6	Akü İşçisi
36	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	5	Döküm İşçisi
37	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	0.9	Akü İşçisi
38	F41.1-Yaygın anksiyete bozukluğu	1	Akü İşçisi
39	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	0.6	Akü İşçisi
40	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	1	Akü İşçisi
41	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi/ Z01.0-Göz ve görme muayenesi	0	Akü İşçisi
42	Z10.0-Mesleki sağlık muayenesi	8	Akü İşçisi

Tablo 4.2. İşçilerin karakteristik özellikleri (n=42).

	Ortalama±Standart Sapma
Yaş	35.69±7.58
Kilo (kg)	80.14±11.17
Boy (m)	1.72±0.05
BMI (kg/m²)	26.97±3.62
Çalışma süresi (yıl)	4.35±5.16

İşçilere ait şelasyon tedavisi uygulaması öncesi ve sonrası klinik veriler ortalama±standart sapma şeklinde Tablo 4.3.'te sunulmaktadır.

Tablo 4.3. İşçilere ait şelasyon tedavisi uygulaması öncesi ve sonrası klinik veriler (n=42).

	Şelasyon Tedavisi Öncesi Ortalama± Standart Sapma	Şelasyon Tedavisi Sonrası Ortalama± Standart Sapma
Hematokrit (HCT) (%)	47.23±3.17	45.92±3.03
Hemoglobin (HGB) Düzeyi (g/dL)	15.79±1.17	15.48±0.94
Kreatinin (mg/dL)	0.79±0.08	0.81±0.09*
Kan Üre Azotu (<i>Blood Urine Nitrogen</i>, BUN) (mg/dL)	13.00±3.27	11.22±2.68*
Ürik Asit (mg/dL)	5.12±1.01	4.87±1.12*
Kreatin Klerens (ml/dk)	154.90±48.03	117.99±41.70**
24 Saatlik İdrarda Kreatinin (mg)	93.84±58.61	69.86±55.06**
Glomerüler Filtrasyon Hızı (<i>Glomerular Filtration Rate</i>, GFR) Hesap (mL/dk)	115.96±8.39	113.91±10.69

* $p < 0,05$

4.2. İşçilerin Kurşun Düzeyleri

İşçilerin kan ve idrar Pb düzeyleri şelasyon tedavisi öncesinde ve sonrasında ölçülmüştür. Pb konsantrasyonlarına ilişkin ortalama±ss değerleri Tablo 4.4.'te sunulmaktadır. Elde edilen sonuçlar, şelasyon tedavisi ile kan ve idrar Pb düzeylerinin anlamlı şekilde azaldığını göstermiştir (* $p < 0,001$) (n=42).

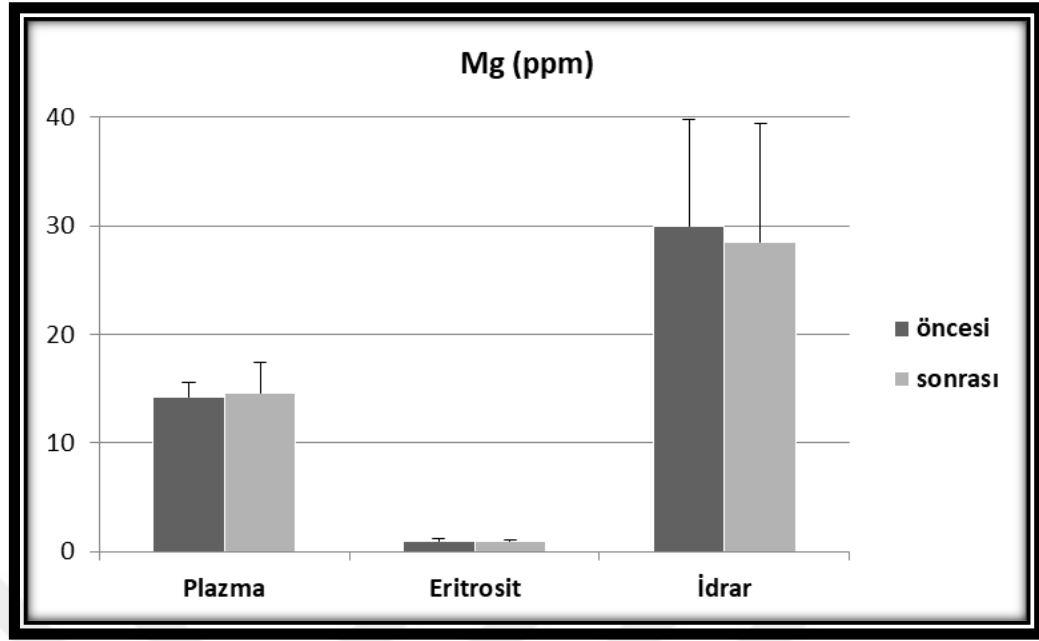
Tablo 4.4. İşçilerin şelasyon tedavisi uygulaması öncesi ve sonrası kan ($\mu\text{g/L}$) ve idrar ($\mu\text{g/dL}$) kurşun düzeyleri ($*p<0,001$) (n=42).

	Şelasyon tedavisi öncesi	Şelasyon tedavisi sonrası
İdrar ($\mu\text{g/dL}$)	254.90 $\pm$ 510.60	141.40 $\pm$ 116.48
Kan ($\mu\text{g/L}$)	61.85 $\pm$ 29.55	22.71 $\pm$ 8.30

4.3. İşçilerin Esansiyel Element Düzeyleri

Aşağıdaki grafiklerde görüldüğü üzere, Pb maruziyeti için uygulanan şelasyon tedavisinin öncesi ve sonrasında idrar, plazma ve eritrosit esansiyel element düzeyleri ölçülmüştür.



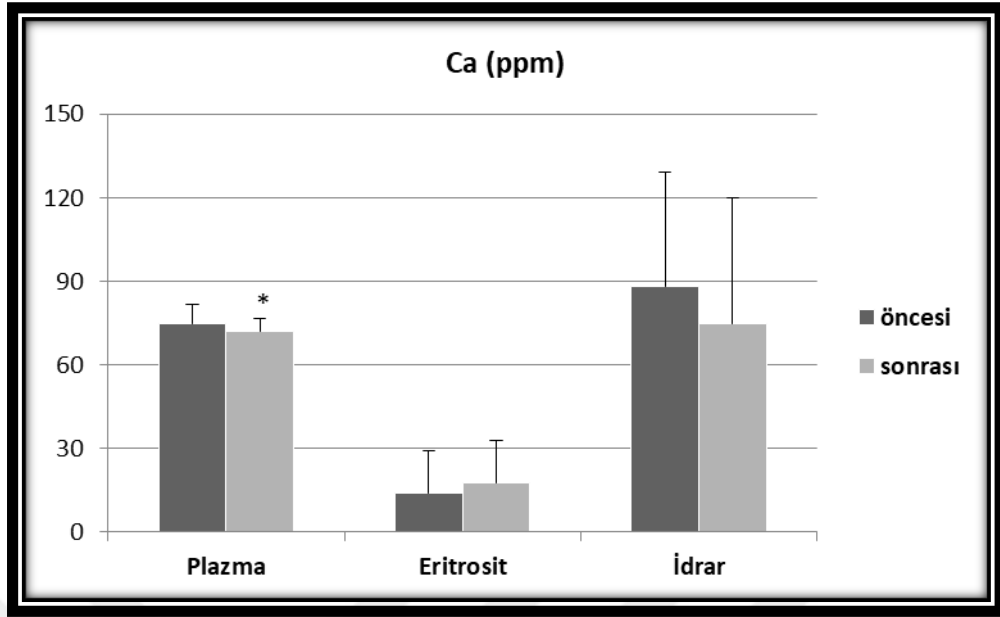


Şekil 4.1. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Mg düzeyleri (ppm) (n=42); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

Tablo 4.5. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Mg düzeyleri (ppm) (n=42); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

Örnek türü	Öncesi (ppm)	Sonrası (ppm)
Plazma	14,21±1,37	14,66±2,81
Eritrosit	0,95±0,29	0,91±0,18
İdrar	29,97±9,80	28,46±10,94

Şelasyon tedavisinden önce ve sonra işçilere ait plazma, eritrosit ve idrar örneklerinde ölçülen Mg düzeyleri (ppm) Şekil 4.1. ve Tablo 4.5.'te gösterilmiştir. Her üç biyolojik örnekte de şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (n=42).

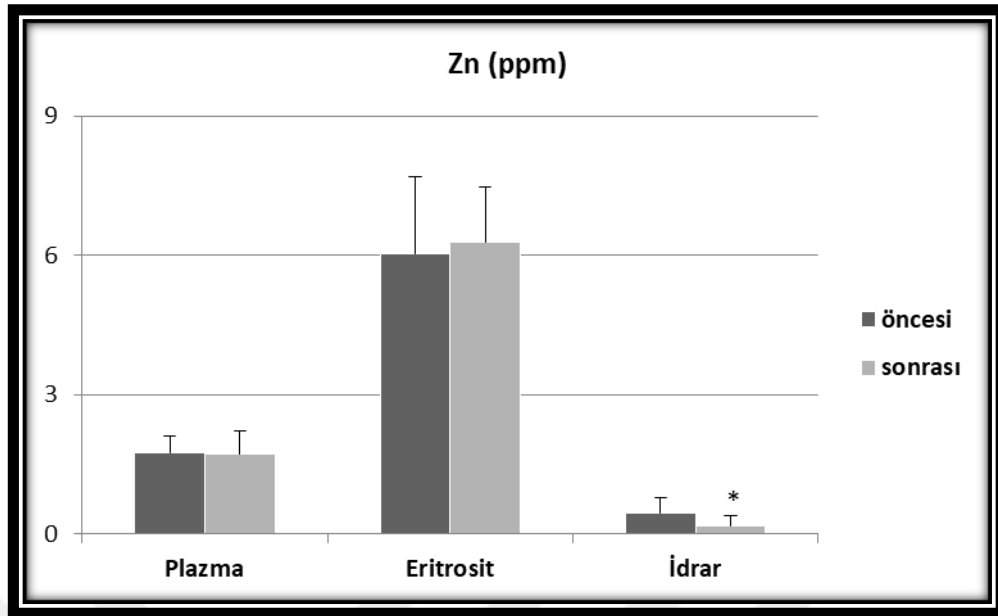


Şekil 4.2. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Ca düzeyleri (ppm), ($p < 0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

Tablo 4.6. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Ca düzeyleri (ppm), ($p < 0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

Örnek türü	Öncesi (ppm)	Sonrası (ppm)
Plazma	74,65±6,86	71,79±4,99
Eritrosit	13,89±15,02	17,69±14,92
İdrar	88,16±40,96	74,96±44,90

Şelasyon tedavisinden önce ve sonra plazma, eritrosit ve idrar örneklerinde ölçülen Ca düzeyleri (ppm) Şekil 4.2. ve Tablo 4.6.'da verilmiştir. Toplanan örneklerden yalnızca plazma Ca düzeyleri şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p < 0,05$) ($n=42$).

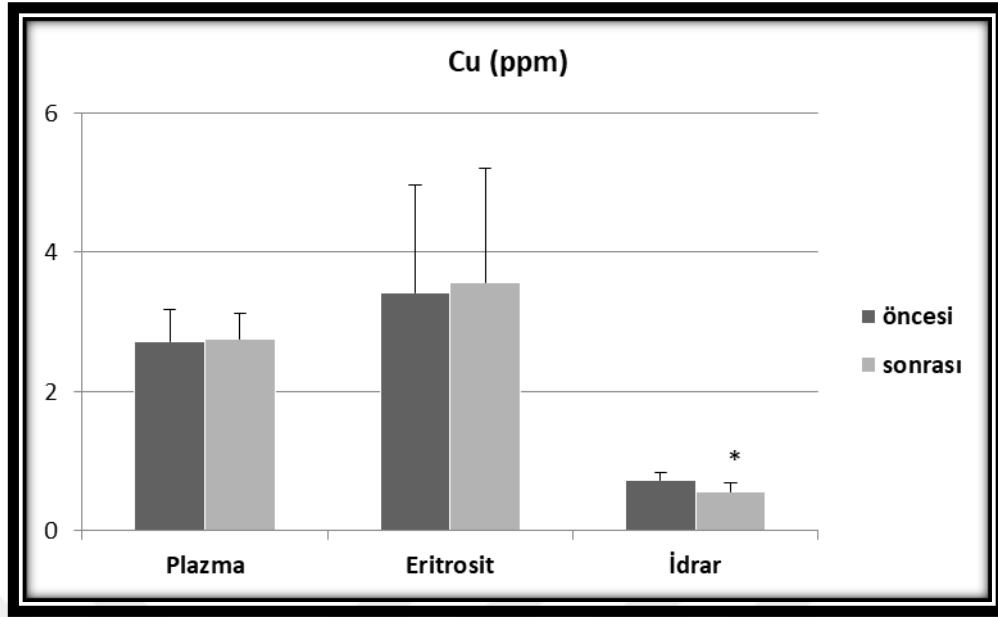


Şekil 4.3. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Zn düzeyleri (ppm), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

Tablo 4.7. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Zn düzeyleri (ppm), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

Örnek türü	Öncesi (ppm)	Sonrası (ppm)
Plazma	1,74±0,36	1,72±0,49
Eritrosit	6,04±1,66	6,27±1,20
İdrar	0,46±0,32	0,16±0,23

Şelasyon tedavisinden önce ve sonra plazma, eritrosit ve idrar örneklerinde ölçülen Zn düzeyleri (ppm) Şekil 4.3. ve Tablo 4.7.'de verilmiştir. Toplanan örneklerden yalnızca idrar Zn düzeyleri şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0,05$) ($n=42$).

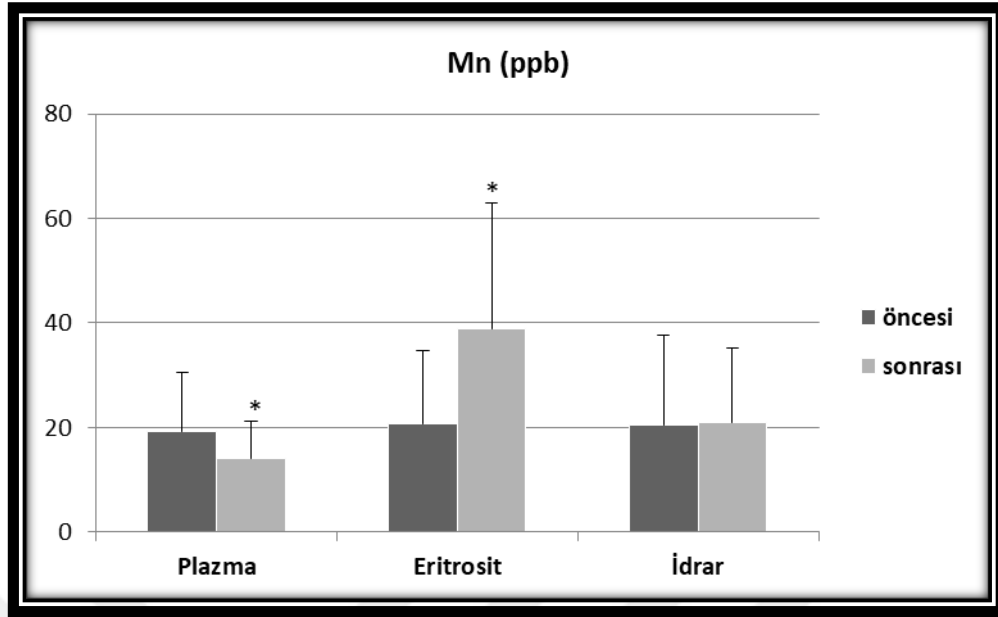


Şekil 4.4. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Cu düzeyleri (ppm), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

Tablo 4.8. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Cu düzeyleri (ppm), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

Örnek türü	Öncesi (ppm)	Sonrası (ppm)
Plazma	2,71±0,48	2,75±0,38
Eritrosit	3,41±1,55	3,56±1,64
İdrar	0,73±0,10	0,57±0,12

İşçilerden şelasyon tedavisinden önce ve sonra toplanan plazma, eritrosit ve idrar örneklerinde Şekil 4.4. ve Tablo Tablo 4.8.'de özetlendiği şekilde Cu düzeyleri (ppm) ölçülmüştür. Toplanan örneklerden yalnızca idrar Cu düzeyleri şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0,05$) ($n=42$).

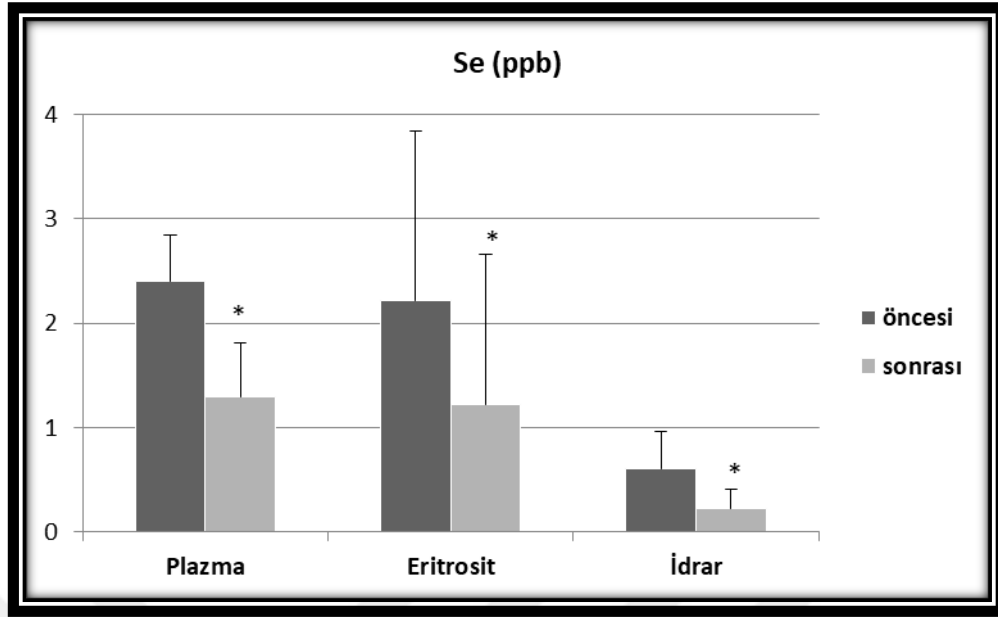


Şekil 4.5. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Mn düzeyleri (ppb), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

Tablo 4.9. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Mn düzeyleri (ppb), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

Örnek türü	Öncesi (ppb)	Sonrası (ppb)
Plazma	19,15±11,30	14,01±7,23
Eritrosit	20,61±13,99	38,86±24,14
İdrar	20,38±17,38	21,02±14,20

Şekil 4.5. ve Tablo 4.9.'da gösterildiği üzere şelasyon tedavisinden önce ve sonra toplanan plazma, eritrosit ve idrar örneklerinde Mn düzeyleri (ppm) ölçülmüştür. Söz konusu örneklerden eritrosit Mn düzeyleri şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış göstermiştir ($p<0,05$) ($n=42$).



Şekil 4.6. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Se düzeyleri (ppb), ($p < 0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

Tablo 4.10. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Se düzeyleri (ppb), ($p < 0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

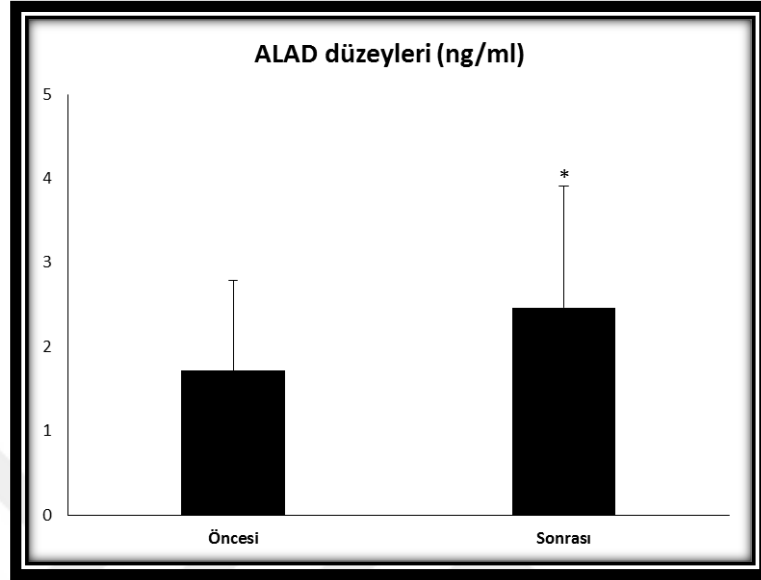
Örnek türü	Öncesi (ppb)	Sonrası (ppb)
Plazma	2,41±0,43	1,29±0,52
Eritrosit	2,22±1,62	1,22±1,44
İdrar	0,61±0,35	0,22±0,18

Şekil 4.6. ve Tablo 4.10.'da gösterildiği üzere işçilerden şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında toplanan plazma, eritrosit ve idrar örneklerinde Se düzeyleri (ppb) ölçülmüştür. Plazma, eritrosit ve idrar örneklerinin Se düzeyleri şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma göstermiştir ($p < 0,05$) ($n=42$).

4.4. Aminolevulinat Delta Dehidrataz (ALAD) Enzim Düzeyleri

İşçilere ait eritrosit örneklerinde ALAD enzim düzeyleri uygulanan şelasyon tedavisinin öncesi ve sonrasında kıyaslandığında Şekil 4.7.'de ve Tablo 4.11.'de

gösterildiği üzere şelasyon sonrası enzim düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir ($p<0,05$) ($n=42$).



Şekil 4.7. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen ALAD enzim düzeyleri (ng/mL), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

Tablo 4.11. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen ALAD enzim düzeyleri (ng/mL), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

	Öncesi	Sonrası
ALAD enzim düzeyi (ng/mL)	1,71±1,06	2,46±1,44

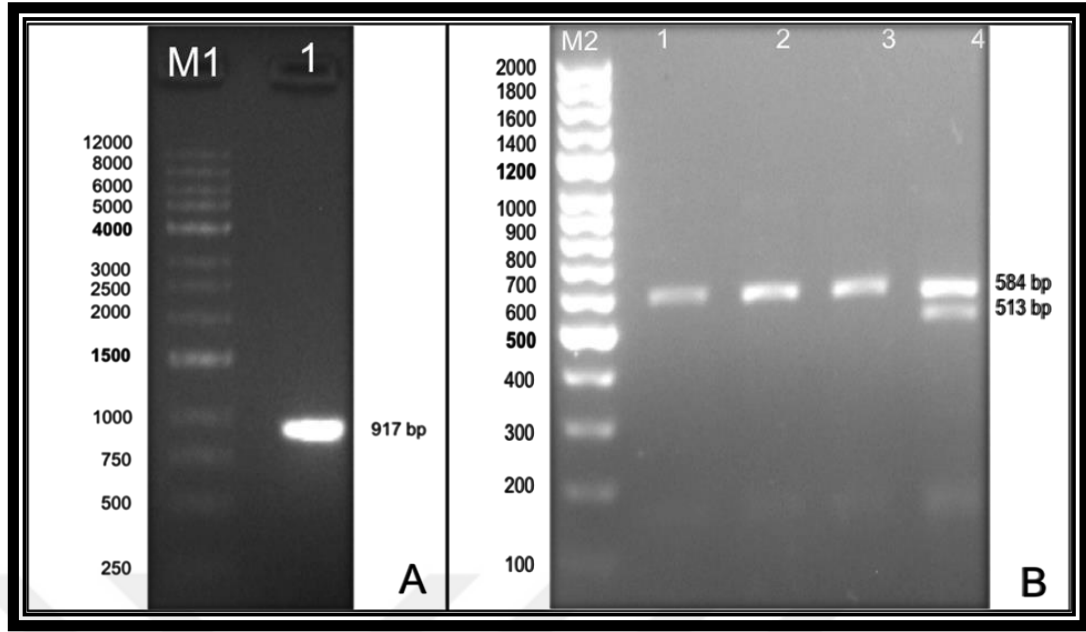
4.5. Aminolevulinat Delta Dehidrataz (ALAD) Enzim Gen

Polimorfizminin Değerlendirilmesi

Kurşun maruziyeti olan işçilerin ALAD gen polimorfizmleri çalışılmıştır. 36 işçide ALAD₁₋₁ (Hasta No. 1, 2, 3, 5-9, 11-17, 19, 20, 22, 23, 24, 26-34, 36-42), 5 işçide ALAD₁₋₂ (Hasta No. 4, 18, 21, 25, 35), 1 işçide ALAD₂₋₂ (Hasta No.10) izozimi tespit edilmiştir. İşçilerin ALAD genotiplerine ilişkin bilgiler Tablo 4.12.'de sunulmaktadır. Bu işçilerde, kan Pb düzeylerinin tedavi öncesi ortalamaya göre yüksek olduğu görülmüş olmakla birlikte sayının az olması nedeniyle kan Pb düzeyleri ile ilişkili anlamlı bir istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır.

Tablo 4.12. Çalışmada yer alan kurşun maruziyeti olan işçilerin ALAD Genotipleri (n=42).

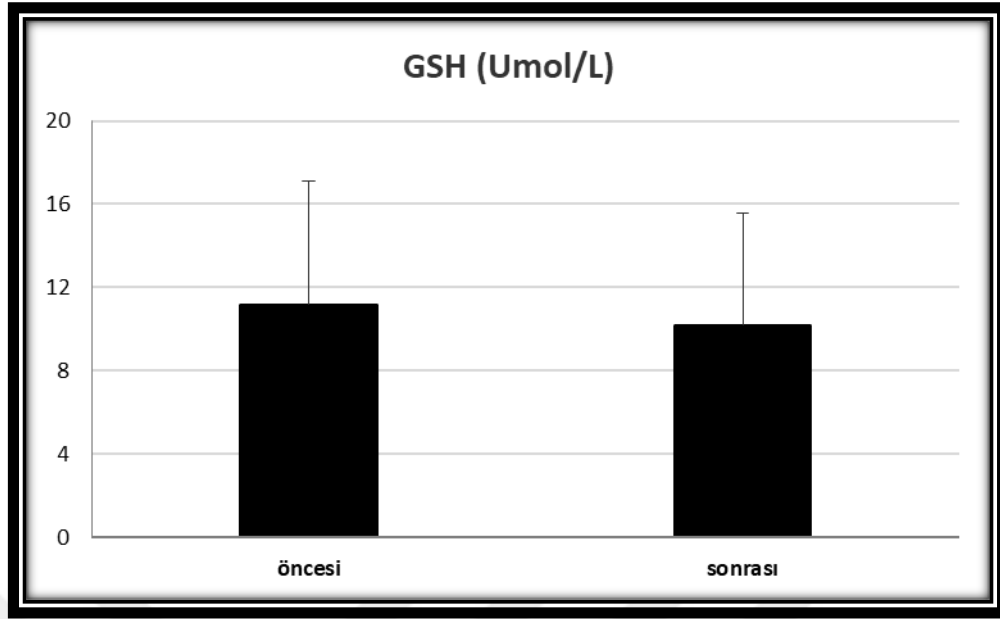
Hasta No.	ALAD Genotipi
1	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
2	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
3	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
4	ALAD₁₋₂ Heterozigotu
5	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
6	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
7	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
8	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
9	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
10	ALAD₂₋₂ Homozigotu
11	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
12	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
13	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
14	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
15	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
16	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
17	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
18	ALAD₁₋₂ Heterozigotu
19	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
20	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
21	ALAD₁₋₂ Heterozigotu
22	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
23	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
24	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
25	ALAD₁₋₂ Heterozigotu
26	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
27	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
28	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
29	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
30	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
31	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
32	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
33	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
34	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
35	ALAD₁₋₂ Heterozigotu
36	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
37	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
38	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
39	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
40	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
41	ALAD ₁₋₁ Homozigotu
42	ALAD ₁₋₁ Homozigotu



Şekil 4.8. G177C ALAD Polimorfizm için agaroz jel elektroforezi. (A) M1, 1 kb DNA molekül ağırlığı belirteci (Genesta); 1. sıra, Dijeste edilmemiş ürün 917 bp. (B) M2, 100 bp DNA molekül ağırlığı belirteci (Genesta); Sıra 1-3: Homozigot ALAD₁₋₁ (548 bp), Sıra 4: Heterozigot ALAD₁₋₂ (548 bp ve 513 bp).

4.6. Glutasyon (GSH) Düzeyleri

Kurşun maruziyeti olan işçilere uygulanan şelasyon tedavisinin öncesi ve sonrasında kıyaslandığında, hücre içi antioksidan moleküllerinden biri olan GSH düzeylerinin plazma örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir (Şekil 4.9. ve Tablo 4.13.) ($p < 0,05$, $n=42$).



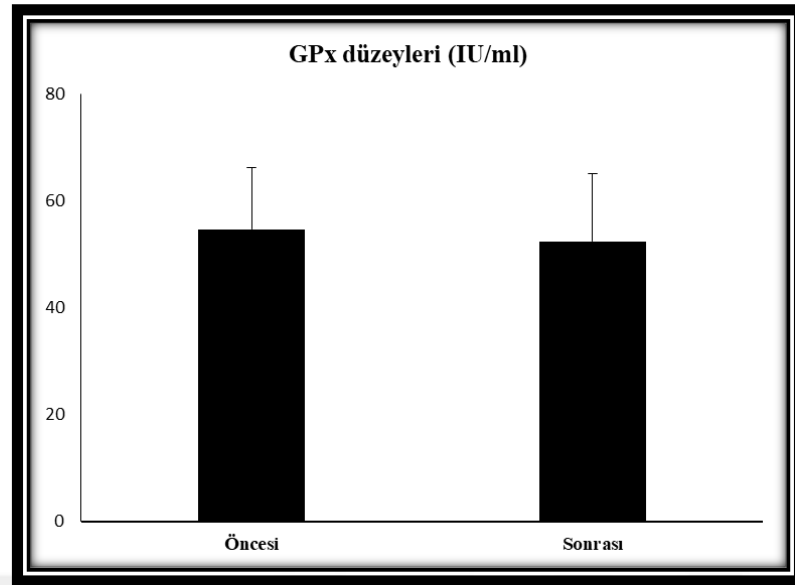
Şekil 4.9. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen GSH düzeyleri (Umol/L) ($p<0,05$) (n=42); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

Tablo 4.13. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen GSH düzeyleri (Umol/L), ($p<0,05$) (n=42); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

	Öncesi	Sonrası
GSH düzeyleri (Umol/L)	11,17±5,94	10,18±5,38

4.7. Glutatyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesi

Kurşun maruziyeti olan işçilere ait plazma örneklerinde GPx aktivitesi uygulanan şelasyon tedavisinin öncesi ve sonrasında ölçülmüş ve şelasyon tedavisi sonrasında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.10. ve Tablo 4.14.) (n=42).



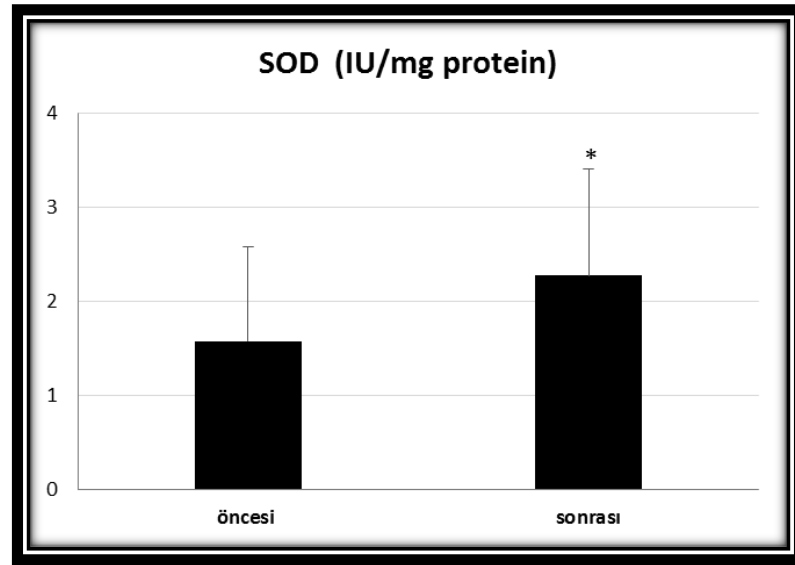
Şekil 4.10. Şelasyon tedavisi öncesinde ve sonrasında plazma GPx (IU/mL) aktivitesi ($p<0,05$) (n=42); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

Tablo 4.14. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen GPx (IU/mL) aktivitesi ($p<0,05$) (n=42); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

	Öncesi	Sonrası
Glutasyon Peroksidaz (GPx) aktivitesi (IU/mL)	54,69±11,46	52,41±12,64

4.8. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi

Kurşun maruziyeti olan işçilere ait eritrosit örneklerinde SOD enzim aktivitesi uygulanan şelasyon tedavisinin öncesi ve sonrasında ölçülmüş ve şelasyon tedavisi sonrasında SOD enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.11. ve Tablo 4.15.) ($p<0,05$, n=42).



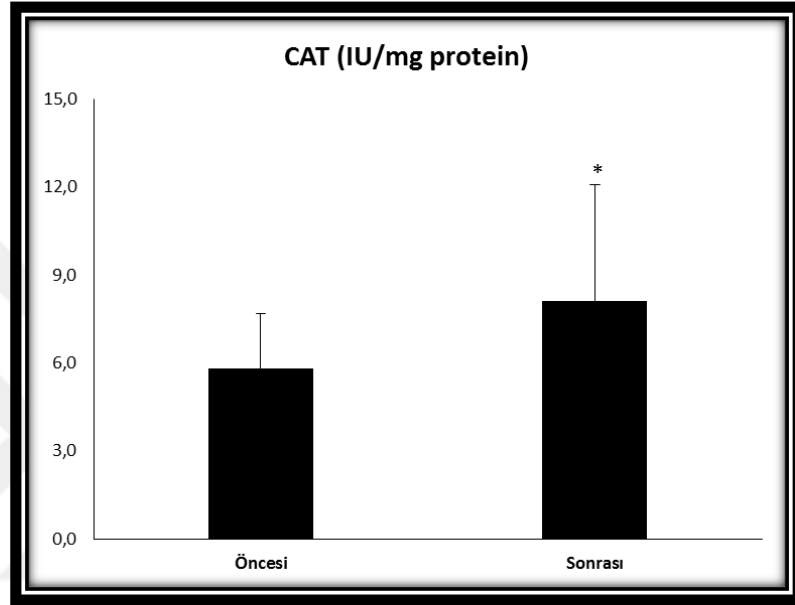
Şekil 4.11. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma SOD (IU/mg protein) aktivitesi, ($p < 0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

Tablo 4.15. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma SOD (IU/mg protein) aktivitesi, ($p < 0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

	Öncesi	Sonrası
SOD aktivitesi (IU/mg protein)	1,57±1,00	2,27±1,13

4.9. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi

İşçilere ait eritrosit örneklerinde CAT aktivitesi uygulanan şelasyon tedavisinin öncesi ve sonrasında ölçülmüş ve şelasyon tedavisi sonrası CAT aktivitelerinde meydana gelen artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir. (Şekil 4.12 ve Tablo 4.16.) ($p<0,05$, $n=42$).



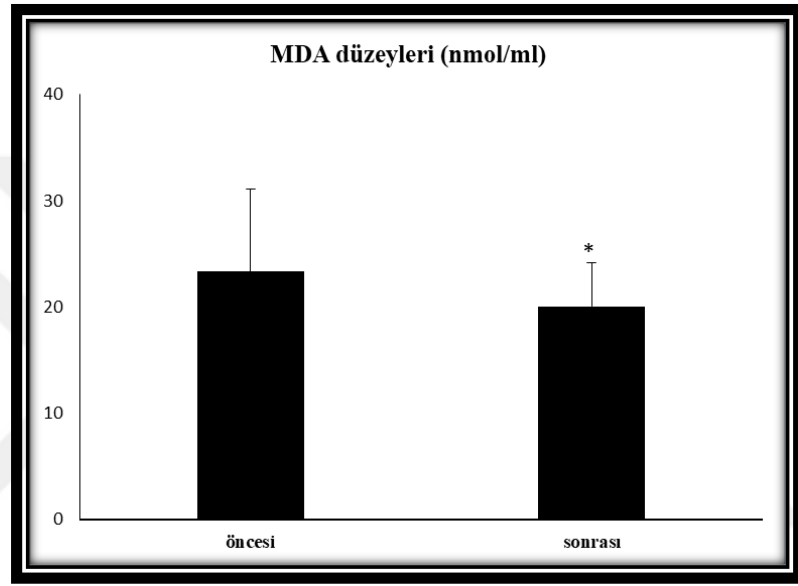
Şekil 4.12. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma CAT aktivitesi (IU/mg protein), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

Tablo 4.16. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma CAT aktivitesi (IU/mg protein), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

	Öncesi	Sonrası
CAT aktivitesi (IU/mg protein)	5,8±1,9	8,1±4,0

4.10. Malondialdehit (MDA) Düzeyleri

Kurşun maruziyeti olan işçilere ait plazma örneklerinde uygulanan şelasyon tedavisinin öncesi ve sonrasında lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan MDA düzeyleri ölçülmüştür. Şelasyon tedavisi sonrası MDA düzeylerin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir (Şekil 4.13. ve Tablo 4.17.) ($p<0,05$) ($n=42$).



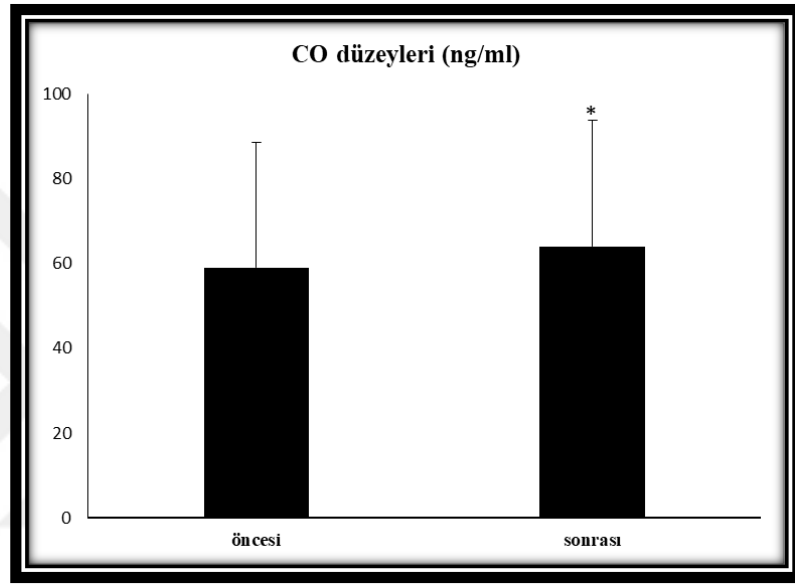
Şekil 4.13. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma MDA düzeyleri (nmol/mL), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

Tablo 4.17. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma MDA düzeyleri (nmol/mL), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

	Öncesi	Sonrası
Malondialdehit (MDA) düzeyleri (nmol/mL)	23,30±7,79	20,02±4,16

4.11. Protein Karbonil (CO) Düzeyleri

Kurşun maruziyeti olan işçilere ait plazma örneklerinde protein oksidasyonunu değerlendirmek üzere uygulanan şelasyon tedavisinin öncesi ve sonrasında CO düzeyleri ölçülmüştür. Şelasyon tedavisi sonrası düzeylerdeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.14. ve Tablo 4.18., $p<0,05$) ($n=42$).



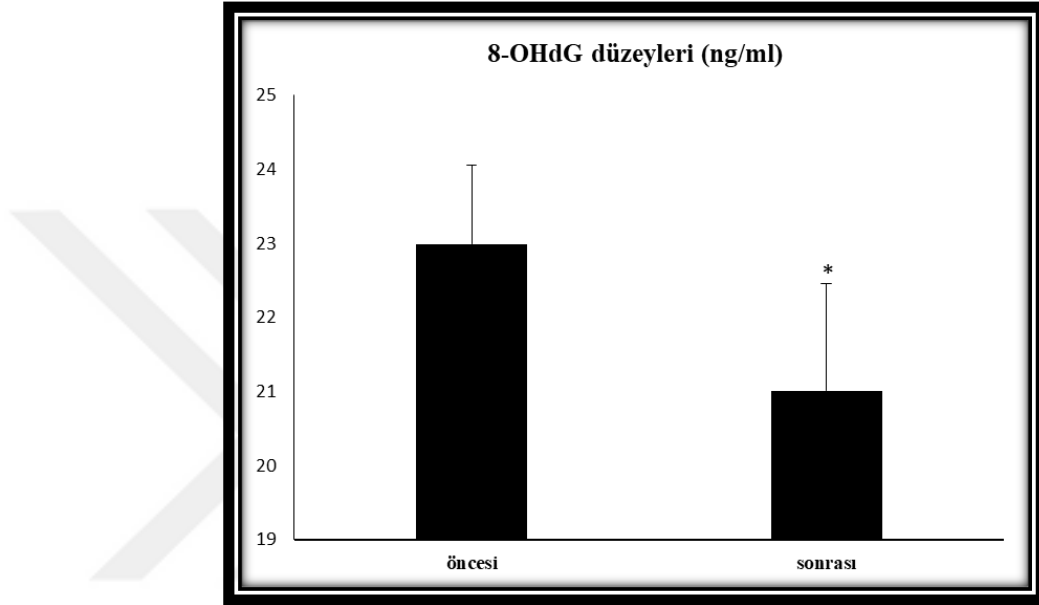
Şekil 4.14. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma insan Protein Karbonil (CO) düzeyleri (ng/mL) ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

Tablo 4.18. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma insan Protein Karbonil (CO) düzeyleri (ng/mL), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

	Öncesi	Sonrası
Protein Karbonil düzeyleri (ng/mL)	58,98±29,53	64,01±29,72

4.12. 8-Hidroksi Deoksi Guanozin (8-OHdG) Düzeyleri

Kurşun maruziyeti olan işçilere ait idrar örneklerinde DNA oksidasyonunun önemli bir göstergesi olan 8-OHdG düzeyleri uygulanan şelasyon tedavisinin öncesi ve sonrasında kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde şelasyon sonrası düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (Şekil 4.15. ve Tablo 4.19.) ($p<0,05$) ($n=42$).



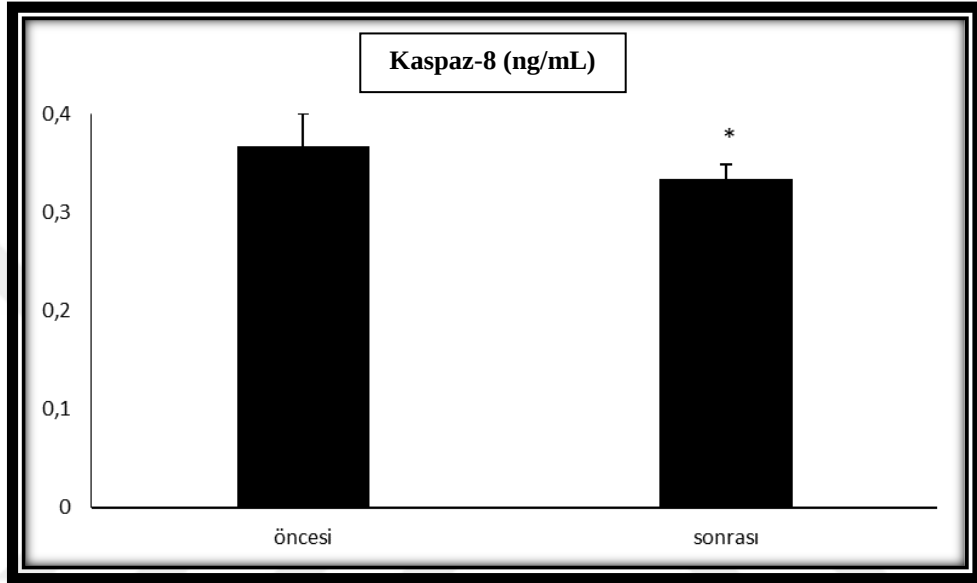
Şekil 4.15. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma 8-OHdG düzeyleri (ng/mL), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

Tablo 4.19. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma 8-OHdG düzeyleri (ng/mL), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

	Öncesi	Sonrası
8-OHdG düzeyleri (ng/mL)	22,98±4,11	21,00±3,58

4.13. Kaspaz 8 Düzeyleri

Kurşun maruziyeti olan işçilerde indüklenen olası apoptozu değerlendirmek üzere ölçülen kaspaz-8 düzeylerinin, şelasyon tedavisinin öncesi ve sonrasında karşılaştırması yapılmış, tedavisi sonrasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir (Şekil 4.16. ve Tablo 4.20.) ($p<0,05$) ($n=42$).



Şekil 4.16. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma Kaspaz-8 düzeyleri (ng/mL), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

Tablo 4.20. İşçilerin şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma Kaspaz 8 düzeyleri (ng/mL), ($p<0,05$) ($n=42$); Öncesi: Şelasyon tedavisinden önce, Sonrası: Şelasyon tedavisinden sonra.

	Öncesi	Sonrası
Kaspaz 8 düzeyleri (ng/ml)	0,36±0,03	0,33±0,01

4.14. Ölçülen Oksidatif Stres Parametreleri Arasındaki İlişkiye Ait Korelasyon Bulguları

Tablo 4.21.'de düzeyleri ölçülen oksidatif stres parametreleri arasındaki olası korelasyonlar gösterilmiştir.

Tablodan görüldüğü gibi GSH düzeyleri ile oksidatif stres parametresi olarak ölçülen MDA ($r=-0,462$; $p<0,001$), GPx ($r=0,147$; $p<0,001$), 8-OHdG ($r=-0,454$; $p<0,001$) ve CO ($r=-0,360$; $p<0,001$) düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif, kaspaz-8 ($r=-0,212$; $p<0,05$) düzeyleri ile ise anlamlı negatif korelasyon belirlenmiştir. Kaspaz-8 düzeyleri ile lipid peroksidasyon parametresi olan MDA ($r=-0,207$; $p<0,05$), ve protein oksidasyonu parametresi olan CO ($r=-0,211$; $p<0,05$) düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon görülmüştür ($n=42$).

Antioksidan enzimlerden CAT ile SOD ($r=0,233$; $p<0,05$) aktiviteleri arasında anlamlı pozitif korelasyon belirlenmiştir. Ayrıca, SOD aktivitesi ile CO ($r=0,244$; $p<0,05$) düzeyleri arasında da anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır ($n=42$).

Oksidatif stresin önemli göstergelerinden biri olan MDA ile 8OHdG ($r=0,286$; $p<0,05$) ve CO ($r=0,275$; $p<0,05$) düzeyleri arasında da yine tablodan görüldüğü gibi istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon belirlenmiştir ($n=42$). Benzer şekilde GPx düzeyleri ile 8-OHdG ($r=0,622$; $p<0,001$) ve CO ($r=0,322$; $p<0,005$) düzeyleri arasında da anlamlı pozitif korelasyon olduğu görülmüştür. Bunlara ek olarak 8-OHdG ve CO ($r=0,351$; $p<0,005$) arasında da istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır ($n=42$).

Tablo 4.21. Tez kapsamında ölçülen oksidatif stres parametrelerinin korelasyonları.

		GSH	Kaspaz8	CAT	SOD	MDA	GPx	OHdG	CO
GSH	r	1	-,212*	0,037	0,127	,462**	0,147	,454**	,360**
	p		0,035	0,376	0,171	0,001	0,124	0,001	0,001
Kaspaz8	r	-,212*	1	-0,075	-0,045	-,207*	-0,098	-0,064	-,211*
	p	0,035		0,261	0,371	0,049	0,221	0,305	0,044
CAT	r	0,037	-0,075	1	,233*	-0,196	0,028	0,011	0,167
	p	0,376	0,261		0,039	0,056	0,412	0,465	0,085
SOD	r	0,127	-0,045	,233*	1	0,026	0,019	0,187	,244*
	p	0,171	0,371	0,039		0,429	0,45	0,096	0,044
MDA	r	,462**	-,207*	-0,196	0,026	1	-0,063	,286*	,275*
	p	0	0,049	0,056	0,429		0,316	0,012	0,015
GPx	r	0,147	-0,098	0,028	0,019	-0,063	1	,622**	,322**
	p	0,124	0,221	0,412	0,45	0,316		0,001	0,004
OHdG	r	,454**	-0,064	0,011	0,187	,286*	,622**	1	,351**
	p	0	0,305	0,465	0,096	0,012	0,001		0,002
CO	r	,360**	-,211*	0,167	,244*	,275*	,322**	,351**	1
	p	0,001	0,044	0,085	0,044	0,015	0,004	0,002	

zayıf	orta	güçlü
--------------	-------------	--------------

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasının amacı, Pb'nin mesleki maruziyetini takiben uygulanan şelasyon tedavisinin Pb toksisitesini gösteren bazı parametreler üzerindeki etkisinin değerlendirilmesidir.

Kurşun, çevrede yaygın olarak bulunan toksik bir elementtir. İnsanların Pb maruziyeti, en çok hava, gıda ve su yoluyla olmaktadır. Çocuklarda, Pb içeren ev ve sokak tozu ve Pb içeren boyalar da önemli maruziyet kaynaklarıdır (144).

Akümülatör yapım ve tamiri, matbaacılık, pil üretimi, kaynakçılık, boyacılık, Pb izabehaneleri gibi Pb kullanılan iş kollarında çalışan işçiler; meslekleri nedeniyle Pb'ye maruz kalmaktadırlar. Ülkemizde, akümülatör sanayisinde çalışan işçilerde görülen Pb zehirlenmeleri, önemli meslek hastalıklarından biridir. Yüksek kan Pb düzeyine sahip çok sayıda işçi, maruziyet şikayetleri ile hastaneye başvurmaktadır. Pb, insanda birçok organ ve sistemi etkileyen toksik bir metaldir. Pb'un, hematolojik, nörolojik, renal, immün sistem, kardiyovasküler, üreme sistemi, kemik üzerinde toksik etkileri söz konusudur. Ayrıca, Pb'a maruz kalan işçilerde; mide, akciğer, mesane kanserlerinden ölümün önemli derecede arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (145).

Pb toksisitesinde önemli risk faktörleri, yaş, beslenme, esansiyel elementler ve sosyoekonomik durum olarak belirlenmiştir. Bebekler ve çocuklar, Pb toksisitesi yönünden daha fazla risk altındadır. Pb toksisitesini, beslenme de etkilemektedir. Suda ve diğer içeceklerdeki Pb, gıdadaki Pb'dan daha fazla absorbe olmaktadır. Diyetin kompozisyonunun Pb alımını etkilediği, özellikle yüksek protein içeriğinin Pb emilimini azalttığı gösterilmiştir (144). Sıçanlarda yürütülen bir çalışmada, tüketilen içme suyu hacmindeki farklılıklar veya endokrin fonksiyonlardaki farklılıklar nedeniyle Pb toksisitesinin erkek sıçanları dişi sıçanlardan daha fazla etkilediği gösterilmiştir (146).

İnsan vücudunda biyolojik sistemin işleyebilmesi için 26 elementin insan için esansiyel olduğu kabul edilmektedir. Bunlardan 11'i majör element, 15'i ise eser element olarak tanımlanmıştır. Majör elementlerden 5'i karbon, hidrojen, azot, oksijen ve sülfür "bulk" elementler, 6'sı ise, sodyum, potasyum, Ca, Mg, klor ve fosfor makromineral olarak tanımlanmaktadır. "Bulk" elementler ve makromineraler vücut dokularında g/kg düzeylerinde bulunurlar. Cu, Zn, Se, Fe gibi eser

elementlerin insan organizmasındaki konsantrasyonları ise çok daha düşüktür. Dokulardaki düzeyleri, miligram veya mikrogram olarak ifade edilir. Majör elementler ve eser elementlerin canlı organizmasının çeşitli fonksiyonlarında rolleri vardır ve esansiyel olarak kabul edilmektedirler (147).

Toksik elementlere maruz kalmanın esansiyel element düzeylerini etkilediği farklı çalışmalarla gösterilmiştir. Örneğin inorganik Pb'a maruziyetin, hayvan ve insanda total serum Ca düzeylerinde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (148). Ancak, Pb'un serum Ca düzeylerine etkisi konusundaki çalışmalarda, farklı sonuçlar söz konusudur. Bazı araştırmacılar tarafından sadece, yüksek dozda Pb'a maruziyette, serum Ca düzeylerinin arttığı da bildirilmiştir. Bu da, Pb tarafından kemikten Ca mobilizasyonu olması ile ilişkilendirilmiştir (149). Pb, gastrointestinal kanaldan absorbe olma, dokuda birikme ve metaloenzimlerde kofaktör görevi için esansiyel elementlerle, özellikle Ca, Fe ve Zn ile etkileşmekte veya hedef proteinleri için yarışmaktadır. Ca ve Fe eksikliğinde, Pb absorpsiyonunun arttığı kanıtlarla gösterilmiştir. Diyetteki Zn'nun artırılması ile, Pb'un dokularda birikimi ve toksisitesi azalmaktadır. Bu etkinin, Pb'un gastrointestinal kanaldan absorpsiyonunun azalmasına bağlı olduğu sanılmaktadır (144).

Sıçanlarda, diyetlerindeki Ca azaldığında, Pb absorpsiyonunun arttığı rapor edilmiştir. Yine Ca eksikliğinde, Pb itrahının azaldığı bildirilmiştir. Fe eksikliği oluşturulmuş sıçan ve farelerde, diyetteki Pb daha fazla absorbe olmaktadır. Sıçanlarda, diyetle Zn eksikliğinde, Pb absorpsiyonu artmakta, Zn desteklenmesi ise, absorpsiyonu azaltmaktadır. Hayvanlarda yapılmış bazı çalışmalar Cu'nun, Pb toksisitesinin bazı parametreleri üzerinde koruyucu bir etkisi olduğunu düşündürmektedir (147). Ancak, Cu'nun Pb'un toksik etkilerini şiddetlendirdiğini ileri süren çalışmalar da vardır (150).

Pb'a maruz bırakılmış sıçanlarda yapılan bir çalışmada, beyin Zn, Cu, Fe ve Mg düzeylerinde önemli azalmalar rapor edilmiştir (147). Bazı ağır metallerin toksik etkilerinin, esansiyel elementler tarafından önlenemediğine dair deneysel veriler, insanın metal maruziyetinin toksik etkilerinden korunmasında esansiyel elementlerin yararlı katkılarının olabileceğinin ileri sürülmesine yol açmıştır. Bunun tersi olarak, esansiyel elementlerin eksikliği, metallerin toksisitesinde artışa neden olabilmektedir. Bu yüzden Pb, Cd, civa (Hg) gibi ağır metallerin esansiyel elementlerle etkileşmesi,

toksikoloji yönünden önem kazanmaktadır. Hayvan çalışmaları, Pb toksisitesinin, diyetteki ve dokulardaki Fe, Ca, Zn, Se, krom (Cr) gibi bazı esansiyel elementler tarafından etkilendiğini göstermiştir. Yapılan çalışmalarda, genellikle bu elementlerin eksikliğinin, Pb absorpsiyon ve toksisitesini artırdığı gösterilmiştir. Bu elementlerin takviyesi ise, Pb'un toksik etkilerinden korunmada, yararlı gözükmemektedir. Ancak bazı çelişkili sonuçlar içeren çalışmalar da bulunmaktadır (150).

Pb zehirlenmesinde, Fe'in kullanımındaki azalmaya bağlı olarak, serum ve plazma Fe düzeylerinin artabileceği bildirilmiştir. Bazı çalışmalarda ise, Pb maruziyetinin, Fe absorpsiyonunu etkileyerek, Fe eksikliğine yol açabileceğine işaret edilmektedir. Çocuklarda, Fe eksikliği prevalansının, kan Pb konsantrasyonu yüksek olanlarda, daha fazla olduğu gösterilmiştir. Pb zehirlenmesi ve Fe eksikliği arasındaki bu ilişkinin bir nedeninin de, Pb'un Fe absorpsiyonunu bozarak, Fe eksikliği oluşturmaya bağlı olabileceği ileri sürülmüştür (120).

Pb'a maruziyetin Cu üzerine etkileri konusunda da çelişkili sonuçlar söz konusudur. Bir çalışmada, 250 ppm ve 500 ppm Pb'a maruz kalan sıçanlarda, karaciğer, böbrek ve kalp Cu düzeyleri önemli derecede azalmıştır. 500 ppm Pb maruziyetinde ise, serum ve dalak Cu düzeyleri de azalmıştır (151). Diğer bir çalışmada ise, Pb'a maruziyetin, dokulardaki Cu düzeylerini artırdığı gösterilmiştir (150). Bu çelişkili sonuçların deney hayvanlarının diyetlerindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Pb'a maruziyetin Zn'nun absorpsiyon ve/veya dokuya alınımını azaltabileceği ileri sürülmüştür. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, Pb'a maruziyetin Zn itirahını artırdığı ve plazma Zn düzeylerini azalttığı bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise, Pb'a maruziyetin Zn itirahını artırdığı, kemik, testis ve beyinde Zn düzeylerini azalttığı, ancak plazma Zn düzeylerini değiştirmedeği gösterilmiştir (148).

Pb maruziyetinin kendisi dışında uygulanan şelasyon tedavisi de esansiyel element eksikliğini derinleştirebilmektedir. Pb dahil olmak üzere toksik metal zehirlenme vakaları, EDTA, 2,3-dimerkaptopropanol (BAL) ve mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit (DMSA) gibi şelasyon ajanları ile tedavi edilmektedir. Kalsiyum disodyum etilen diamin tetra asetik asit (CaNa_2EDTA) gibi metal şelasyon ajanları ile tedavi, kurşunun toksik etkilerini gidermek için hala en iyi terapötik

yaklaşımıdır (114). Şelasyon tedavisinin mekanizması, idrarla atılan şelatör-metal komplekslerinin (şelatlar) oluşturulmasıdır. Bununla birlikte, EDTA'nın yüksek şelasyon gücü nedeniyle toksik metallerle karşı seçiciliği yoktur ve homeostazın değişmesi gibi diğer sağlık sorunlarına neden olacak şekilde endojen metallerle (Cu, Zn, Mg ve Ca) kompleksler oluştur (152). Kurşun zehirlenmesinin tedavisi üzerine yürütülen çalışmalar alternatif tedavi şekilleri aramaktadır (114).

Bu tez çalışmasında, Mg düzeyleri için işçilerin plazma, eritrosit ve idrar olmak üzere her üç biyolojik örneğinde şelasyon tedavisi öncesinde ve sonrasında ölçüm yapılmış, fakat istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (n=42). Şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen plazma, eritrosit ve idrar Ca düzeylerinden yalnızca plazma Ca düzeyleri şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0,05$) (n=42). Şelasyon tedavisinden önce ve sonra ölçülen Zn ve Cu düzeyleri plazma, eritrosit ve idrar örneklerinden yalnızca idrar Zn ve Cu düzeyleri şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0,05$) (n=42). Şelasyon tedavisinden önce ve sonra toplanan plazma, eritrosit ve idrar örneklerinde Mn düzeyleri için söz konusu örneklerden eritrosit Mn düzeyleri şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış göstermiştir ($p<0,05$) (n=42). İşçilerin şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında toplanan plazma, eritrosit ve idrar örneklerinde Se düzeyleri değerlendirildiğinde plazma, eritrosit ve idrar örneklerinin Se düzeyleri şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma göstermiştir ($p<0,05$) (n=42).

Bu tez çalışmasının hipotezine uygun olarak, plazma esansiyel elementlerinin düzeyleri üzerine şelasyon tedavisinin etkisi değerlendirildiğinde Ca, Mn ve Se düzeylerinin şelasyon tedavisi ile literatürü de destekler şekilde anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Bu durum, Pb maruziyet grubuna esansiyel element desteğinin anlamlı olabileceğini düşündürmüştür.

Oksidatif stres, Pb'nin toksik etkilerini gösterdiği başlıca mekanizmalarından biri olarak değerlendirilmektedir. Beynin, nispeten zayıf antioksidan savunma, yüksek oksijen kullanımı, yüksek Fe içeriği ve ayrıca ROS üretimine bağlı olarak nörotransmitter seviyelerinde değişikliklere yol açabilecek aşırı çoklu doymamış yağ asitlerinin mevcudiyeti nedeniyle oksidatif hasara karşı yüksek derecede duyarlı

olduğu yaygın olarak rapor edilmektedir (48). Vücuda daha yüksek miktarda Fe alımı, hücresel hasara neden olabilecek çeşitli serbest radikaller üreten Fenton reaksiyonu yoluyla ROS oluşumuyla ilişkili hücresel hasara neden olur. Ayrıca aşırı Fe ile yüklenen beyin hücreleri, SOD ile $O_2^{\cdot-}$ tüketerek veya CAT ile H_2O_2 'yi parçalayarak ve aktivitelerini artırarak antioksidan savunma mekanizmaları geliştirebilir (153).

Kurşunun oluşturduğu oksidatif hasarın mekanizmalarında, ROS artışı sonucu lipid peroksidasyonu ile hücrelerdeki SH (tiyol) grubu taşıyan antioksidan savunma sistemlerinin tüketilmesi başrolü oynamaktadır (114). Linoleik, linolenik ve araşidonik asidin Pb ile inkübasyona bırakıldığı bir çalışmada, lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA miktarının arttığını görülmüştür. Daha sonraki çalışmalarda ise Pb'ye maruz kalan dokularda lipid peroksidasyonunun arttığı ve antioksidan savunma sisteminin azaldığı görülmüştür (154). El-Sokary ve ark. (155), Pb'ye maruz bırakılan sıçanların beyin homojenatlarında lipid peroksidasyonunun Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler (*Thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS) olarak, antioksidan enzimler azalırken arttığını tespit etmişlerdir. Sıçanlara oral yolla 5 hafta süresince 2000 ppm Pb asetat verilerek yapılmış olan bir çalışmada, serumdaki MDA miktarının da arttığı tespit edilmiştir (156).

Bununla birlikte, ROS'un neden olduğu protein modifikasyonları, proteinlerin lizin, arginin, prolin ve histidin yan zincirleri oksitlendiğinde oluşan CO türevlerini üretir. Pb asetat veya nitrat ile tedavi edilen sıçanların serumunda, beyin dokusunda, karaciğer dokusunda ve kemik iliğinde CO içeriğinde bir artış bildirilmiştir (104). Tez çalışmamızda da, literatür ile uyumlu şekilde şelasyon tedavisi sonrası düzeylerdeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir.

8-OHdG, oksidatif DNA hasarının bir ürünüdür ve genom stabilitesini incelerken genotoksik maruziyetin bir biyolojik belirteci olarak kabul edilir. Szymańska-Chabowska ve ark. tarafından 2009'da; Leelapongwattana and Bordeerat 2020'de; Nsonwu-Anyanwu 2021'de; Singh ve ark. tarafından 2021'de yürütülen çalışmaların sonuçları, Pb'ye maruz kalan popülasyonda kontrolden daha yüksek kan 8-OHdG içeriğine işaret etmiştir (157).

Kurşunun SH grupları için yüksek bir afinitesi vardır, bu nedenle Pb birçok antioksidan enzimi ve SH grupları içeren moleküller olan tripeptit GSH'ı ve GSH ile ilgili enzimleri (GPx, glutatyon redüktaz (GSR), glutatyon sentetaz (GSS) ve glutamat-sistein ligazlar (GCLs)) etkileyerek işlevlerini inhibe eder ve hücrel redoks durumunun dengesini bozar. Bununla birlikte, Pb kronik maruziyeti olan bireylerde yürütülen bir çalışmada, GSH seviyeleri üzerinde Pb maruziyetinin etkisinin gözlemlenmemiş olması dikkat çekicidir. GSH sentezinin, hücrel oksidasyon süreçleri sırasında düzenleyici bir mekanizma olarak arttığı bilinmektedir. Bu nedenle, Pb'ye maruz kalmayan bireyler ile düşük veya orta derecede kan Pb düzeyine sahip bireyler, özellikle kronik maruziyette, karşılaştırıldığında GSH seviyelerinde göreceli bir artış gözlemlemek mümkündür. Ancak, Pb'ye maruz kalma seviyesi çok yüksek olduğunda, GSH sentezi, okside glutatyon (Glutatyon disülfid, GSSG)'a oksidasyonu telafi etmek için yetersiz hale gelebilir ve sonuç olarak GSH seviyelerinde bir düşüş olabilir (158).

Kurşun, insan vücudunda majör tiyol antioksidanı olarak görev yapan GSH içeriğini sadece tüketmekle kalmaz, aynı zamanda fonksiyonel tiyol gruplarına sahip SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimleri de etkisiz hale getirebilir (104, 159). SOD, CAT tarafından parçalanarak H_2O_2 'ye dönüşen $O_2^{\cdot-}$ 'i kullanan antioksidan enzimdir. Her iki enzim de Pb kaynaklı oksidatif strese karşı antioksidan savunma mekanizmasının bir parçası olarak görev yapmaktadır. Pb, CAT ve SOD'un ekspresyonunu ve aktivitelerini birçok mekanizma aracılığıyla değiştirebilir. Bir yandan Pb, SOD ve CAT substratlarını arttırarak CAT ve SOD ekspresyonlarını ve aktivitelerini indükleyebilir. Öte yandan, Pb'nin aktif bölgelerinin tiyol gruplarına bağlanması veya kofaktörleri ile etkileşimi sonucunda CAT ve SOD aktiviteleri azaltabilir. Sonuç olarak, Pb maruziyeti olan bireylerde SOD ve CAT aktiviteleri zıt mekanizmaların toplamı tarafından belirlenmektedir (160).

Oksidatif stres ve apoptoz, Pb kaynaklı toksisitede iyi karakterize edilmiş iki olgudur. Birçok çalışma, Pb'nin ROS oluşumunu indükleyerek ve hücrelerin antioksidan savunma sistemini zayıflatarak oksidatif strese neden olduğunu desteklemektedir. Pb'nin neden olduğu sitotoksitenin bir başka önerilen mekanizması, kurşunun apoptotik hücre ölümüne neden olmasıdır. Apoptoz, hücre

ve çekirdek büzülmesi, zar taşması ve DNA parçalanması vb. şekillerde görülebilen aktif bir hücre ölümü sürecidir (7).

Bu tez çalışmasında, oksidatif stres ve antioksidan sistem parametreleri  zerine Pb maruziyetinde şelasyon tedavisinin etkisi değerlendirilmiştir. Artan oksidatif stresin şelasyon tedavisinin uygulanması ve dolayısıyla Pb düzeylerinin düşmesiyle azaldığı, antioksidan enzim aktivitelerinin de arttığı gösterilmiştir. Apoptozla ilgili olan başlatıcı kaspazlardan kaspaz-8 düzeylerinin, şelasyon tedavisi sonrasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı çalışmamızda gösterilmiştir ($p<0,05$) ($n=42$). Ayrıca beklenildiğı şekilde Pb intoksikasyonunda azalan ALAD aktivitesi de şelasyon tedavisi ile artma eğilimi göstermiştir ($p<0,05$) ($n=42$). Ayrıca, bu parametrelerin de birbirleriyle anlamlı korelasyon gösterdiği de belirlenmiştir.

Kurşun toksisitesine duyarlılık bakımından bireylerin büyük ölçüde farklılık gösterdiği bilinmektedir ve bu tür bir varyasyonun olası nedeni olarak çoğu zaman genetik yapı belirtilmiştir (65). Pb zehirlenmesinde önemli bir rol oynayan ALAD genindeki polimorfizm, bireylerin Pb toksisite semptomlarına cevaplarını etkileyebilmektedir (59). İnsan ALAD, 9q34 kromozomu üzerindeki tek bir gen tarafından kodlanan polimorfik bir enzimdir. Birçok  alışma, ALAD kodlayan gen polimorfizminin, Pb'nin toksikokinetiğinin değiştirilmesinde rol oynadığını göstermiştir. Pb toksisitesi bağlamında en çok incelenen polimorfizm, ekzon 4'te yer alan *ALAD* G177C (dbSNP ID: rs1800435) varyantıdır; iki ko-dominant alel, *ALAD*₁ ve *ALAD*₂ elde edilir (29). *ALAD*₁ ve *ALAD*₂ alelleri, Pb toksisitesine duyarlılıkla ilişkilendirilmiştir. Bu iki alel, yapısal olarak birbirine benzeyen, aynı mekanizmayla etki gösteren, ancak farklı yüklere sahip 1-1, 1-2 ve 2-2 olarak adlandırılan üç izozim oluşturur. *ALAD*₂ aleli, kodlama bölgesinin 177. pozisyonunda G→C transversiyonu içerir, bu durumda 59. amino asitte lizin yerine asparajinin yer değiştirmesiyle sonuçlanır (70). Bu s bstit syonun, *ALAD*₂'nin Pb için artan bir afiniteye sahip olmasına neden olduğu düşünülmektedir (71). Beyaz popülasyonun birçoğunda *ALAD*₁ ve *ALAD*₂ alellerinin sıklığının sırasıyla 0.9 ve 0.1 olduğu tahmin edilirken, Asya ve Afrika popülasyonlarında *ALAD*₂ alel sıklığı düşüktür (65).

Bu tez çalışmasında da, Pb maruziyeti olan işçilerde ALAD gen polimorfizmlerinin belirlenmesi üzerine çalışma yürütülmüştür. Alınan sonuçlarda, 36 işçi *ALAD*₁₋₁ homozigot (Hasta No. 1, 2, 3, 5-9, 11-17, 19, 20, 22, 23, 24, 26-34,

36-42), 5 işçi $ALAD_{1-2}$ heterozigot (Hasta No. 4, 18, 21, 25, 35) ve 1 işçi $ALAD_{2-2}$ homozigot (Hasta No.10) olduğu belirlenmiştir. $ALAD_2$ aleline sahip işçilerde, kan Pb düzeylerinin tedavi öncesi ortalamaya göre yüksek olduğu görülmüş olmakla birlikte sayının az olması nedeniyle kan Pb düzeyleri ile ilişkili anlamlı bir istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır. Buna ek olarak, $ALAD_{2-2}$ homozigotuna nadir rastlanılmaktadır. $ALAD_2$ 'nin $ALAD_1$ 'e kıyasla Pb için artan bir afiniteye sahip olması sebebiyle, söz konusu $ALAD_{2-2}$ homozigot (Hasta No.10) (yaş=42) işçinin hastane ortamında uygulanan şelasyon tedavisi öncesi Pb düzeyi ($\mu\text{g/L}$) (24 saatlik idrar) ve kurşun düzeyi ($\mu\text{g/dL}$) (tam kan) değerlendirildiğinde, bu değerler sırasıyla 18.6 $\mu\text{g/L}$, 39.7 $\mu\text{g/L}$ şeklindedir. Şelasyon tedavisi sonrasında ise, $ALAD_{2-2}$ homozigot (Hasta No.10) (yaş=42) işçiye ait bu değerler sırasıyla 22.1 $\mu\text{g/L}$ ve 24.6 $\mu\text{g/L}$ olarak ölçülmüştür. Söz konusu hasta döküm işçisi olup, 9 aydır üretim bölümünde çalışmaktadır. Periyodik muayenede Pb yüksek olması üzerine hastane yatışı verilmiştir.

Sonuçlarımız kurduğumuz hipoteze de uygun olarak esansiyel element düzeylerinin şelasyon tedavisi uygulanması ile azaldığını, Pb maruziyeti ile lipit metabolizmasının etkilendiğini ve oksidatif stresi tetiklediğini, şelasyon tedavisinin bu hasarın azaltılmasına yardımcı olduğunu göstermiştir. Bu hastalarda, esansiyel element ve antioksidan desteğinin önemli olduğu, Pb toksisitesinde şelasyon tedavisinin koruyucu rolü olduğu ve daha geniş gruplarla yapılan çalışmalara ihtiyaç bulunduğu öngörülmektedir. Ayrıca tüm bu parametrelerin Pb maruziyetinde şelasyon tedavisinin etkisini değerlendirmek üzere bir araya getirildiği başka bir çalışmaya rastlanmamış ve çalışmamız bu yönüyle bir ilk özelliği taşımaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması ile, Pb'nin mesleki maruziyetinin ve şelasyon tedavisinin toksisiteyi etkileyen bazı parametreler üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Pb maruziyeti söz konusu olan işçilerde, şelasyon tedavisi ile olası esansiyel element kaybının, ALAD enzimi aktivitesi üzerine olası esansiyel element düzeyi değişimlerinin etkisinin, oksidatif stres parametreleri ile antioksidan enzim düzeyleri üzerine şelasyon tedavisinin olası etkisinin, apoptozun şelasyon tedavisi ile değişiminin, kan Pb ve ALAD enzim düzeylerinde görülen farklılıkların, ALAD polimorfizmi ile ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

- Pb maruziyetinin ve şelasyon tedavisinin esansiyel element düzeyleri üzerine etkisinin değerlendirilebilmesi amacıyla Mg, Ca, Zn, Cu, Se ve Mn düzeyleri işçilere şelasyon tedavisi uygulanmasından önce ve sonra olmak üzere idrar, plazma ve eritrosit örneklerinde ölçülmüştür. Ca, Mn ve Se düzeylerinin şelasyon tedavisi ile anlamlı olarak literatürü de destekler şekilde azaldığı belirlenmiştir. Bu durum, maruziyet grubuna esansiyel element desteğinin anlamlı olabileceğini düşündürmüştür.

- Elde edilen bulguların, hastalarda oksidatif stres ve oksidatif lipit hasarının tetiklendiğini işaret etmesi, hastalara antioksidan takviyesi yapılmasının ve bu hastaların beslenmelerine dikkat etmelerinin de önemli olduğunu düşündürmektedir. Düzenli olarak kullanılacak antioksidan takviyelerinin serbest radikal reaksiyonlarını ve oksidatif lipit hasarını azaltabileceğini, dolayısıyla da oksidatif stres mekanizması üzerinden oluşan Pb toksisitesinin azalmasına ve oksidatif lipit hasarının da önlenmesine yardımcı olabileceği sonucuna varılabilir.

- Kurşun maruziyeti olan işçilerde ALAD gen polimorfizmleri çalışılmış ve 36 işçi *ALAD*₁₋₁ homozigot (Hasta No. 1, 2, 3, 5-9, 11-17, 19, 20, 22, 23, 24, 26-34, 36-42), 5 işçi *ALAD*₁₋₂ heterozigot (Hasta No. 4, 18, 21, 25, 35) ve 1 işçi *ALAD*₂₋₂ homozigot (Hasta No.10) olduğu görülmüştür. Pb maruziyetinde hastane ortamında uygulanan şelasyon tedavisinin öncesi ile sonrası kıyaslandığında *ALAD*₂ aleline sahip işçilerde, kan Pb düzeylerinin tedavi öncesi ortalamaya göre yüksek olduğu görülmüş olmakla birlikte sayının az olması nedeniyle kan Pb düzeyleri ile ilişkili anlamlı bir istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır. Dolayısıyla, gelecekte hasta

sayısının da artırılarak geniş çaplı polimorfizm çalışmaların yapılmasının anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır.

- Yapılan literatür taramasında, tüm bu parametrelerin Pb maruziyetinde şelasyon tedavisinin etkisini değerlendirmek üzere bir araya getirildiği başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Buna ek olarak, şelasyon tedavisinin etkisinin uygulama öncesi ve sonrası şeklinde tüm parametrelerle birlikte değerlendirilmesi yönüyle bir ilk özelliği taşımaktadır.



7. KAYNAKLAR

1. Shruti Agrawal PB, S.J.S.Flora. Changes in tissue oxidative stress, brain biogenic amines and acetylcholinesterase following co-exposure to lead, arsenic and mercury in rats. *Food and Chemical Toxicology* 86. 2015:208–16.
2. Gidlow DA. Lead toxicity. *Occup Med (Lond)*. 2015;65(5):348-56.
3. van Bommel DM, Li Y, McLean J, Chang MH, Dowling NF, Graubard B, et al. Blood lead levels, ALAD gene polymorphisms, and mortality. *Epidemiology*. 2011;22(2):273-8.
4. Chwalba A, Maksym B, Dobrakowski M, Kasperczyk S, Pawlas N, Birkner E, et al. The effect of occupational chronic lead exposure on the complete blood count and the levels of selected hematopoietic cytokines. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018;355:174-9.
5. da Cunha Martins A, Jr., Mazzaron Barcelos GR, Jacob Ferreira AL, de Souza MF, de Syllos Cólus IM, Antunes LM, et al. Effects of Lead Exposure and Genetic Polymorphisms on ALAD and GPx Activities in Brazilian Battery Workers. *J Toxicol Environ Health A*. 2015;78(16):1073-81.
6. Süzen HS, Duydu Y, Aydin A. Molecular analysis of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) gene polymorphism in a Turkish population. *Biochem Genet*. 2004;42(11-12):461-7.
7. Jia Q, Ha X, Yang Z, Hui L, Yang X. Oxidative stress: a possible mechanism for lead-induced apoptosis and nephrotoxicity. *Toxicol Mech Methods*. 2012;22(9):705-10.
8. Grover P, Rekhadevi PV, Danadevi K, Vuyyuri SB, Mahboob M, Rahman MF. Genotoxicity evaluation in workers occupationally exposed to lead. *Int J Hyg Environ Health*. 2010;213(2):99-106.
9. Bradberry S, Vale A. A comparison of sodium calcium edetate (edetate calcium disodium) and succimer (DMSA) in the treatment of inorganic lead poisoning. *Clin Toxicol (Phila)*. 2009;47(9):841-58.
10. Waters RS, Bryden NA, Patterson KY, Veillon C, Anderson RA. EDTA chelation effects on urinary losses of cadmium, calcium, chromium, cobalt, copper, lead, magnesium, and zinc. *Biol Trace Elem Res*. 2001;83(3):207-21.
11. United States Department of Labor OSHA. Safety and Health Topics/Lead/Overview www.OSHA.gov: Occupational Safety and Health Administration; 2019 [Available from: <https://www.osha.gov/SLTC/lead/>].
12. Inorganic and organic lead compounds. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2006;87:1-471.
13. Daley GM, Pretorius CJ, Ungerer JP. Lead Toxicity: an Australian Perspective. *Clin Biochem Rev*. 2018;39(4):61-98.
14. United States Department of Labor OSHA. OSHA Occupational Chemical Database/Report Page www.OSHA.gov2019 [updated 21 Haziran 2019].

Available from:
<https://www.osha.gov/chemicaldata/chemResult.html?recNo=500>.

15. Skerfving S, Bergdahl IA. CHAPTER 31 - Lead. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT, editors. *Handbook on the Toxicology of Metals* (Third Edition). Burlington: Academic Press; 2007. p. 599-643.
16. Mitra P, Sharma S, Purohit P, Sharma P. Clinical and molecular aspects of lead toxicity: An update. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2017;54(7-8):506-28.
17. Goyer RA. Lead toxicity: from overt to subclinical to subtle health effects. *Environ Health Perspect*. 1990;86:177-81.
18. Machon-Grecka A, Dobrakowski M, Kasperczyk A, Birkner E, Korzonek-Szlacheta I, Kasperczyk S. The association between occupational lead exposure and serum levels of selected soluble receptors. *Toxicol Ind Health*. 2018;34(8):555-62.
19. Jain RB. Co-exposures to toxic metals cadmium, lead, and mercury and their impact on unhealthy kidney function. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019.
20. Jan AT, Azam M, Siddiqui K, Ali A, Choi I, Haq QM. Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. *Int J Mol Sci*. 2015;16(12):29592-630.
21. <https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=7510&MevzuatTur=7&MevzuatTertip=5> [T.C. CUMHURBAŞKANLIĞI MEVZUAT BİLGİ SİSTEMİ].
22. Caini S, Bendinelli B, Masala G, Saieva C, Assedi M, Querci A, et al. Determinants of Erythrocyte Lead Levels in 454 Adults in Florence, Italy. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(3).
23. Mohammadyan M, Moosazadeh M, Borji A, Khanjani N, Rahimi Moghadam S. Exposure to lead and its effect on sleep quality and digestive problems in soldering workers. *Environ Monit Assess*. 2019;191(3):184.
24. Dobrakowski M, Boron M, Czuba ZP, Birkner E, Chwalba A, Hudziec E, et al. Blood morphology and the levels of selected cytokines related to hematopoiesis in occupational short-term exposure to lead. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;305:111-7.
25. Machon-Grecka A, Dobrakowski M, Kasperczyk A, Birkner E, Pryzwan T, Kasperczyk S. The effect of subacute lead exposure on selected blood inflammatory biomarkers and angiogenetic factors. *J Occup Health*. 2018;60(5):369-75.
26. Driscoll TR, Carey RN, Peters S, Glass DC, Benke G, Reid A, et al. The Australian Work Exposures Study: Occupational Exposure to Lead and Lead Compounds. *Ann Occup Hyg*. 2016;60(1):113-23.
27. Mohammadyan M, Moosazadeh M, Borji A, Khanjani N, Rahimi Moghadam S. Investigation of occupational exposure to lead and its relation with blood lead levels in electrical solderers. *Environ Monit Assess*. 2019;191(3):126.

28. Han L, Wang X, Han R, Xu M, Zhao Y, Gao Q, et al. Association between blood lead level and blood pressure: An occupational population-based study in Jiangsu province, China. *PLoS One*. 2018;13(7):e0200289.
29. Mani MS, Kunnathully V, Rao C, Kabekkodu SP, Joshi MB, D'Souza HS. Modifying effects of delta-Aminolevulinate dehydratase polymorphism on blood lead levels and ALAD activity. *Toxicol Lett*. 2018;295:351-6.
30. Felix PM, Almeida SM, Franco C, Almeida AB, Lopes C, Claro MI, et al. The suitability of EBC-Pb as a new biomarker to assess occupational exposure to lead. *Int J Environ Health Res*. 2015;25(1):67-80.
31. Obeng-Gyasi E. Sources of lead exposure in various countries. *Rev Environ Health*. 2019;34(1):25-34.
32. Kimyasal Maddelerle Çalışmalarda Sağlık ve Güvenlik Önlemleri Hakkında Yönetmelik. 2013.
33. Mushak P. New directions in the toxicokinetics of human lead exposure. *Neurotoxicology*. 1993;14(2-3):29-42.
34. de Souza ID, de Andrade AS, Dalmolin RJS. Lead-interacting proteins and their implication in lead poisoning. *Crit Rev Toxicol*. 2018;48(5):375-86.
35. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Toxic Substances Portal/Lead - ToxFAQs™ Toxic Substances Portal2019 [updated 9 Mayıs 2019. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Frequently asked health questions about lead.]. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxfaq/tf.asp?id=93&tid=22>.
36. Rădulescu A, Lundgren S. A pharmacokinetic model of lead absorption and calcium competitive dynamics. *Sci Rep*. 2019;9(1):14225.
37. Charkiewicz AE, Backstrand JR. Lead Toxicity and Pollution in Poland. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(12).
38. Kan J, Sima J, Cao X. Transformation and bioaccessibility of lead induced by steamed bread feed in the gastrointestinal tract. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2017;137:158-64.
39. Nordberg GF, Gerhardsson L, Broberg K, Mumtaz M, Ruiz P, Fowler BA. CHAPTER 7 - Interactions in Metal Toxicology. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT, editors. *Handbook on the Toxicology of Metals* (Third Edition). Burlington: Academic Press; 2007. p. 117-45.
40. Villasenor-Granados T, Diaz-Cervantes E, Soto-Arredondo KJ, Martinez-Alfaro M, Robles J, Garcia-Revilla MA. Binding of Pb-Melatonin and Pb-(Melatonin-metabolites) complexes with DMT1 and ZIP8: implications for lead detoxification. *Daru*. 2019;27(1):137-48.
41. Sirivarasai J, Kaojarern S, Chanprasertyothin S, Panpunuan P, Petchpoung K, Tatsaneeyapant A, et al. Environmental lead exposure, catalase gene, and markers of antioxidant and oxidative stress relation to hypertension: an analysis based on the EGAT study. *Biomed Res Int*. 2015;2015:856319.

42. Hegde S, Sridhar M, Bolar DR, Bhaskar SA, Sanghavi MB. Relating tooth- and blood-lead levels in children residing near a zinc-lead smelter in India. *Int J Paediatr Dent*. 2010;20(3):186-92.
43. Yun S, Wu Y, Niu R, Feng C, Wang J. Effects of lead exposure on brain glucose metabolism and insulin signaling pathway in the hippocampus of rats. *Toxicol Lett*. 2019;310:23-30.
44. Deshommes E, Tardif R, Edwards M, Sauve S, Prevost M. Experimental determination of the oral bioavailability and bioaccessibility of lead particles. *Chem Cent J*. 2012;6(1):138.
45. Dobrakowski M, Pawlas N, Kasperczyk A, Kozłowska A, Olewinska E, Machon-Grecka A, et al. Oxidative DNA damage and oxidative stress in lead-exposed workers. *Hum Exp Toxicol*. 2017;36(7):744-54.
46. Halmo L, Nappe TM. Lead Toxicity. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
StatPearls Publishing LLC.; 2019.
47. Foxworth V, Kage L, Barber K. Association Between Covid-19 Severity And Residing In High Lead Level Locations. *Spartan Med Res J*. 2022;7(2):35880.
48. Agrawal S, Bhatnagar P, Flora SJ. Changes in tissue oxidative stress, brain biogenic amines and acetylcholinesterase following co-exposure to lead, arsenic and mercury in rats. *Food Chem Toxicol*. 2015;86:208-16.
49. Miracle VA. Lead Poisoning in Children and Adults. *Dimens Crit Care Nurs*. 2017;36(1):71-3.
50. Verma S, Santhosh AP, Shukla S, Gupta P, Mandavdhare HS, Dutta U, et al. Gastrointestinal: An oral clue to an unusual cause of pain abdomen: Burton's line. *J Gastroenterol Hepatol*. 2019;34(4):629.
51. Saito T, Ikezoe T, Taguchi H, Miyoshi I. Plumbism. *Br J Haematol*. 2004;124(1):2.
52. United States Department of Labor OSHA. Safety and Health Topics/Lead/Health Effects [www.OSHA.gov](https://www.osha.gov/SLTC/lead/healtheffects.html): Occupational Safety and Health Administration; [Available from: <https://www.osha.gov/SLTC/lead/healtheffects.html>.
53. Fan G, Du G, Li H, Lin F, Sun Z, Yang W, et al. The effect of the hemochromatosis (HFE) genotype on lead load and iron metabolism among lead smelter workers. *PLoS One*. 2014;9(7):e101537.
54. Chen CJ, Lin TY, Wang CL, Ho CK, Chuang HY, Yu HS. Interactive Effects between Chronic Lead Exposure and the Homeostatic Iron Regulator Transport HFE Polymorphism on the Human Red Blood Cell Mean Corpuscular Volume (MCV). *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(3).
55. Hsieh NH, Chung SH, Chen SC, Chen WY, Cheng YH, Lin YJ, et al. Anemia risk in relation to lead exposure in lead-related manufacturing. *BMC Public Health*. 2017;17(1):389.

56. Bryant DA, Hunter CN, Warren MJ. Biosynthesis of the modified tetrapyrroles-the pigments of life. *J Biol Chem*. 2020;295(20):6888-925.
57. Layer G, Reichelt J, Jahn D, Heinz DW. Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein Sci*. 2010;19(6):1137-61.
58. Kelada SN, Shelton E, Kaufmann RB, Khoury MJ. Delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype and lead toxicity: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2001;154(1):1-13.
59. Shaik AP, Jamil K. A study on the ALAD gene polymorphisms associated with lead exposure. *Toxicol Ind Health*. 2008;24(7):501-6.
60. Oliveira VA, Oliveira CS, Ineu RP, Moraes-Silva L, de Siqueira LF, Pereira ME. Lactating and non-lactating rats differ in sensitivity to HgCl₂: Protective effect of ZnCl₂. *J Trace Elem Med Biol*. 2014;28(2):240-6.
61. Neslund-Dudas C, Levin AM, Rundle A, Beebe-Dimmer J, Bock CH, Nock NL, et al. Case-only gene-environment interaction between ALAD tagSNPs and occupational lead exposure in prostate cancer. *Prostate*. 2014;74(6):637-46.
62. Ding N, Wang X, Weisskopf MG, Sparrow D, Schwartz J, Hu H, et al. Lead-Related Genetic Loci, Cumulative Lead Exposure and Incident Coronary Heart Disease: The Normative Aging Study. *PLoS One*. 2016;11(9):e0161472.
63. Abdel Hamid OI, Khayal EEH, Tolba SAR, Orabi EE. Maternal Δ -aminolevulinic acid dehydratase 1-2 genotype enhances fetal lead exposure and increases the susceptibility to the development of cerebral palsy. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2020;27(36):44709-23.
64. Zheng G, Tian L, Liang Y, Broberg K, Lei L, Guo W, et al. δ -Aminolevulinic acid dehydratase genotype predicts toxic effects of lead on workers' peripheral nervous system. *Neurotoxicology*. 2011;32(4):374-82.
65. Scinicariello F, Yesupriya A, Chang MH, Fowler BA. Modification by ALAD of the association between blood lead and blood pressure in the U.S. population: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Environ Health Perspect*. 2010;118(2):259-64.
66. Süzen HS, Duydu Y, Aydin A, Işimer A, Vural N. Influence of the delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism on biomarkers of lead exposure in Turkish storage battery manufacturing workers. *Am J Ind Med*. 2003;43(2):165-71.
67. Huo X, Peng L, Qiu B, Zheng L, Yekeen TA, Xu X. ALAD genotypes and blood lead levels of neonates and children from e-waste exposure in Guiyu, China. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2014;21(10):6744-50.
68. Zheng G, Tian L, Liang Y, Broberg K, Lei L, Guo W, et al. delta-Aminolevulinic acid dehydratase genotype predicts toxic effects of lead on workers' peripheral nervous system. *Neurotoxicology*. 2011;32(4):374-82.
69. F. Montenegro M, Barbosa Jr F, C. Sandrim V, F. Gerlach R, E. Tanus-Santos J. A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene modifies

- plasma/whole blood lead ratio. Springer-Verlag 2005 Arch Toxicol. 2006:394–8.
70. N. Kelada S, Shelton E, B. Kaufmann R, J. Khoury M. δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Genotype and Lead Toxicity: A HuGE Review. American Journal of Epidemiology. 2001:Vol. 154, No. 1.
 71. M. van Bommel D, Li Y, McLean J, Chang M-h, F. Dowling N, Graubard B, et al. Blood Lead Levels, ALAD Gene Polymorphisms, and Mortality. NIH-PA Author Manuscript. 2011;22(2): 273–8.
 72. Abadin H, Ashizawa A, Stevens YW, Lladós F, Diamond G, Sage G, et al. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) Toxicological Profiles. Toxicological Profile for Lead. Atlanta (GA): Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US); 2007.
 73. Mason LH, Harp JP, Han DY. Pb neurotoxicity: neuropsychological effects of lead toxicity. Biomed Res Int. 2014;2014:840547.
 74. Nava-Ruiz C, Méndez-Armenta M, Ríos C. Lead neurotoxicity: effects on brain nitric oxide synthase. J Mol Histol. 2012;43(5):553-63.
 75. Liu KS, Hao JH, Zeng Y, Dai FC, Gu PQ. Neurotoxicity and biomarkers of lead exposure: a review. Chin Med Sci J. 2013;28(3):178-88.
 76. Feng C, Liu S, Zhou F, Gao Y, Li Y, Du G, et al. Oxidative stress in the neurodegenerative brain following lifetime exposure to lead in rats: Changes in lifespan profiles. Toxicology. 2019;411:101-9.
 77. Ordemann JM, Austin RN. Lead neurotoxicity: exploring the potential impact of lead substitution in zinc-finger proteins on mental health. Metallomics. 2016;8(6):579-88.
 78. Vlasak T, Jordakieva G, Gnambis T, Augner C, Crevenna R, Winker R, et al. Blood lead levels and cognitive functioning: A meta-analysis. Sci Total Environ. 2019;668:678-84.
 79. Bertke SJ, Lehman EJ, Wurzelbacher SJ, Hein MJ. Mortality of lead smelter workers: A follow-up study with exposure assessment. Am J Ind Med. 2016;59(11):979-86.
 80. Chen X, Zhu G, Wang Z, Zhou H, He P, Liu Y, et al. The association between lead and cadmium co-exposure and renal dysfunction. Ecotoxicol Environ Saf. 2019;173:429-35.
 81. Buser MC, Ingber SZ, Raines N, Fowler DA, Scinicariello F. Urinary and blood cadmium and lead and kidney function: NHANES 2007-2012. Int J Hyg Environ Health. 2016;219(3):261-7.
 82. Steenland K, Barry V, Anttila A, Sallmen M, McElvenny D, Todd AC, et al. A cohort mortality study of lead-exposed workers in the USA, Finland and the UK. Occup Environ Med. 2017;74(11):785-91.
 83. Shafiekhani M, Ommati MM, Azarpira N, Heidari R, Salarian AA. Glycine supplementation mitigates lead-induced renal injury in mice. J Exp Pharmacol. 2019;11:15-22.

84. Vázquez M, Calatayud M, Jadán Piedra C, Chiocchetti GM, Vélez D, Devesa V. Toxic trace elements at gastrointestinal level. *Food Chem Toxicol*. 2015;86:163-75.
85. Singh N, Kumar A, Gupta VK, Sharma B. Biochemical and Molecular Bases of Lead-Induced Toxicity in Mammalian Systems and Possible Mitigations. *Chem Res Toxicol*. 2018;31(10):1009-21.
86. Dietert RR, Piepenbrink MS. Lead and immune function. *Crit Rev Toxicol*. 2006;36(4):359-85.
87. Dobrakowski M, Boron M, Czuba ZP, Kasperczyk A, Machon-Grecka A, Kasperczyk S. Cytokines related to three major types of cell-mediated immunity in short- and long-term exposures to lead compounds. *J Immunotoxicol*. 2016;13(6):770-4.
88. Metryka E, Kupnicka P, Kapczuk P, Aszakiewicz B, Piotrowska K, Tkacz M, et al. Lead (Pb) Accumulation in Human THP-1 Monocytes/Macrophages In Vitro and the Influence on Cell Apoptosis. *Biol Trace Elem Res*. 2021;199(3):955-67.
89. Machon-Grecka A, Dobrakowski M, Boron M, Lisowska G, Kasperczyk A, Kasperczyk S. The influence of occupational chronic lead exposure on the levels of selected pro-inflammatory cytokines and angiogenic factors. *Hum Exp Toxicol*. 2017;36(5):467-73.
90. Rzymiski P, Tomczyk K, Rzymiski P, Poniedziałek B, Opala T, Wilczak M. Impact of heavy metals on the female reproductive system. *Ann Agric Environ Med*. 2015;22(2):259-64.
91. Dutta S, Gorain B, Choudhury H, Roychoudhury S, Sengupta P. Environmental and occupational exposure of metals and female reproductive health. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2022;29(41):62067-92.
92. Kumar S, Sharma A, Kshetrimayum C. Environmental & occupational exposure & female reproductive dysfunction. *Indian J Med Res*. 2019;150(6):532-45.
93. El-Magd MA, Kahilo KA, Nasr NE, Kamal T, Shukry M, Saleh AA. A potential mechanism associated with lead-induced testicular toxicity in rats. *Andrologia*. 2017;49(9).
94. Wirth JJ, Mijal RS. Adverse effects of low level heavy metal exposure on male reproductive function. *Syst Biol Reprod Med*. 2010;56(2):147-67.
95. Almeida Lopes ACB, Silbergeld EK, Navas-Acien A, Zamoiski R, Martins ADC, Jr., Camargo AEI, et al. Association between blood lead and blood pressure: a population-based study in Brazilian adults. *Environ Health*. 2017;16(1):27.
96. Vaziri ND, Khan M. Interplay of reactive oxygen species and nitric oxide in the pathogenesis of experimental lead-induced hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(9):920-5.
97. Hermann M, Flammer A, Lüscher TF. Nitric oxide in hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2006;8(12 Suppl 4):17-29.

98. Steenland K, Boffetta P. Lead and cancer in humans: where are we now? *Am J Ind Med.* 2000;38(3):295-9.
99. Pawlas N, Olewinska E, Markiewicz-Gorka I, Kozłowska A, Januszewska L, Lundh T, et al. Oxidative damage of DNA in subjects occupationally exposed to lead. *Adv Clin Exp Med.* 2017;26(6):939-45.
100. Rousseau A, Bertolotti A. Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(11):697-712.
101. Kasperczyk A, Machnik G, Dobrakowski M, Sypniewski D, Birkner E, Kasperczyk S. Gene expression and activity of antioxidant enzymes in the blood cells of workers who were occupationally exposed to lead. *Toxicology.* 2012;301(1-3):79-84.
102. Shraideh Z, Badran D, Hunaiti A, Battah A. Association between occupational lead exposure and plasma levels of selected oxidative stress related parameters in Jordanian automobile workers. *Int J Occup Med Environ Health.* 2018;31(4):517-25.
103. Prasanthi RP, Devi CB, Basha DC, Reddy NS, Reddy GR. Calcium and zinc supplementation protects lead (Pb)-induced perturbations in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in developing mouse brain. *Int J Dev Neurosci.* 2010;28(2):161-7.
104. Kasperczyk S, Słowińska-Łożyńska L, Kasperczyk A, Wielkoszyński T, Birkner E. The effect of occupational lead exposure on lipid peroxidation, protein carbonylation, and plasma viscosity. *Toxicol Ind Health.* 2015;31(12):1165-71.
105. Kryndushkin D, Wu WW, Venna R, Norcross MA, Shen RF, Rao VA. Complex Nature of Protein Carbonylation Specificity After Metal-Catalyzed Oxidation. *Pharm Res.* 2017;34(4):765-79.
106. Nakajima H, Unoda K-i, Ito T, Kitaoka H, Kimura F, Hanafusa T. The Relation of Urinary 8-OHdG, A Marker of Oxidative Stress to DNA, and Clinical Outcomes for Ischemic Stroke. *Open Neurol J.* 2012;6:51-7.
107. Feng C, Liu S, Zhou F, Gao Y, Li Y, Du G, et al. Oxidative stress in the neurodegenerative brain following lifetime exposure to lead in rats: Changes in lifespan profiles. *Toxicology.* 2019:101-9.
108. Pawlas N, Olewińska E, Markiewicz-Górka I, Kozłowska A, Januszewska L, Lundh T, et al. Oxidative damage of DNA in subjects occupationally exposed to lead. *Adv Clin Exp Med* 2017;26(6):939-45.
109. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY).* 2016;8(4):603-19.
110. Ivanisenko NV, Lavrik IN. [Mechanisms of Procaspase-8 Activation in the Extrinsic Programmed Cell Death Pathway]. *Mol Biol (Mosk).* 2019;53(5):830-7.
111. Jiang N, Wen H, Zhou M, Lei T, Shen J, Zhang D, et al. Low-dose combined exposure of carboxylated black carbon and heavy metal lead induced

- potentiation of oxidative stress, DNA damage, inflammation, and apoptosis in BEAS-2B cells. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020;206:111388.
112. Aaseth J, Skaug MA, Cao Y, Andersen O. Chelation in metal intoxication--Principles and paradigms. *J Trace Elem Med Biol.* 2015;31:260-6.
 113. Born T, Kontoghiorghe CN, Spyrou A, Kolnagou A, Kontoghiorghe GJ. EDTA chelation reappraisal following new clinical trials and regular use in millions of patients: review of preliminary findings and risk/benefit assessment. *Toxicol Mech Methods.* 2013;23(1):11-7.
 114. Pedroso TF, Oliveira CS, Fonseca MM, Oliveira VA, Pereira ME. Effects of Zinc and N-Acetylcysteine in Damage Caused by Lead Exposure in Young Rats. *Biol Trace Elem Res.* 2017;180(2):275-84.
 115. Sakthithasan K, Levy P, Poupon J, Garnier R. A comparative study of edetate calcium disodium and dimercaptosuccinic acid in the treatment of lead poisoning in adults. *Clin Toxicol (Phila).* 2018;56(11):1143-9.
 116. Cabarkapa A, Borozan S, Zivkovic L, Stojanovic S, Milanovic-Cabarkapa M, Bajic V, et al. CaNa₂EDTA chelation attenuates cell damage in workers exposed to lead--a pilot study. *Chem Biol Interact.* 2015;242:171-8.
 117. Bjorklund G, Mutter J, Aaseth J. Metal chelators and neurotoxicity: lead, mercury, and arsenic. *Arch Toxicol.* 2017;91(12):3787-97.
 118. Diaz-Cervantes E, Garcia-Revilla MA, Soto-Arredondo K, Villasenor-Granados T, Martinez-Alfaro M, Robles J. Computational study of metal complexes formed with EDTA, melatonin, and its main metabolites: implications in lead intoxication and clues to a plausible alternative treatment. *J Mol Model.* 2019;25(1):18.
 119. Lanigan RS, Yamarik TA. Final report on the safety assessment of EDTA, calcium disodium EDTA, diammonium EDTA, dipotassium EDTA, disodium EDTA, TEA-EDTA, tetrasodium EDTA, tripotassium EDTA, trisodium EDTA, HEDTA, and trisodium HEDTA. *Int J Toxicol.* 2002;21 Suppl 2:95-142.
 120. Ellis MR, Kane KY. Lightening the lead load in children. *Am Fam Physician.* 2000;62(3):545-54, 59-60.
 121. Knollmann-Ritschel BEC, Markowitz M. Lead Poisoning. *Acad Pathol.* 2017;4:2374289517700160.
 122. Dobrakowski M, Boron M, Birkner E, Kasperczyk A, Chwalinska E, Lisowska G, et al. The Effect of a Short-Term Exposure to Lead on the Levels of Essential Metal Ions, Selected Proteins Related to Them, and Oxidative Stress Parameters in Humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:8763793.
 123. Markowitz M. Lead Poisoning: An Update. *Pediatr Rev.* 2021;42(6):302-15.
 124. Luo Y, McCullough LE, Tzeng JY, Darrah T, Vengosh A, Maguire RL, et al. Maternal blood cadmium, lead and arsenic levels, nutrient combinations, and offspring birthweight. *BMC Public Health.* 2017;17(1):354.

125. Szymanska-Chabowska A, Laczmanski L, Jedrychowska I, Chabowski M, Gac P, Janus A, et al. The relationship between selected VDR, HFE and ALAD gene polymorphisms and several basic toxicological parameters among persons occupationally exposed to lead. *Toxicology*. 2015;334:12-21.
126. Shefa ST, Héroux P. Both physiology and epidemiology support zero tolerable blood lead levels. *Toxicol Lett*. 2017;280:232-7.
127. Avery JC, Hoffmann PR. Selenium, Selenoproteins, and Immunity. *Nutrients*. 2018;10(9).
128. Bi M, Zhang H, Yuan L, Zhao L, Liu R. Molecular mechanisms of lead-induced changes of selenium status in mice livers through interacting with selenoprotein P. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2019;175:282-8.
129. Steinbrenner H, Sies H. Selenium homeostasis and antioxidant selenoproteins in brain: implications for disorders in the central nervous system. *Arch Biochem Biophys*. 2013;536(2):152-7.
130. Wyparło-Wszelaki M, Wąsik M, Machoń-Grecka A, Kasperczyk A, Bellanti F, Kasperczyk S, et al. Blood Magnesium Level and Selected Oxidative Stress Indices in Lead-Exposed Workers. *Biol Trace Elem Res*. 2021;199(2):465-72.
131. Qader A, Rehman K, Akash MSH. Genetic susceptibility of δ -ALAD associated with lead (Pb) intoxication: sources of exposure, preventive measures, and treatment interventions. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2021;28(33):44818-32.
132. Ahamed M, Verma S, Kumar A, Siddiqui MK. Delta-aminolevulinic acid dehydratase inhibition and oxidative stress in relation to blood lead among urban adolescents. *Hum Exp Toxicol*. 2006;25(9):547-53.
133. Moreira AO, Almeida A, Costa S, Laffon B, García-Léston J, Pásaro E, et al. Genotyping an ALAD polymorphism with real-time PCR in two populations from the Iberian Peninsula. *Biochem Genet*. 2012;50(7-8):560-4.
134. Iskusnykh IY, Zakharova AA, Pathak D. Glutathione in Brain Disorders and Aging. *Molecules*. 2022;27(1).
135. Brigelius-Flohé R, Flohé L. Regulatory Phenomena in the Glutathione Peroxidase Superfamily. *Antioxid Redox Signal*. 2020;33(7):498-516.
136. Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(5):3289-303.
137. Kumar A, Khushboo, Pandey R, Sharma B. Modulation of Superoxide Dismutase Activity by Mercury, Lead, and Arsenic. *Biol Trace Elem Res*. 2020;196(2):654-61.
138. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. 1974;47(3):469-74.
139. Alfonso-Prieto M, Biarnés X, Vidossich P, Rovira C. The molecular mechanism of the catalase reaction. *J Am Chem Soc*. 2009;131(33):11751-61.
140. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.

141. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 2003;329(1-2):23-38.
142. Orning P, Lien E. Multiple roles of caspase-8 in cell death, inflammation, and innate immunity. *J Leukoc Biol*. 2021;109(1):121-41.
143. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
144. Goyer RA. Mechanisms of lead and cadmium nephrotoxicity. *Toxicol Lett*. 1989;46(1-3):153-62.
145. Goyer RA, Clarkson TW. Toxic effects of metals. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 1996;5:691-736.
146. Babiker F, Al-Kouh A, Kilarkaje N. Lead exposure induces oxidative stress, apoptosis, and attenuates protection of cardiac myocytes against ischemia-reperfusion injury. *Drug Chem Toxicol*. 2019;42(2):147-56.
147. Chowdhury BA, Chandra RK. Biological and health implications of toxic heavy metal and essential trace element interactions. *Prog Food Nutr Sci*. 1987;11(1):55-113.
148. Miller GD, Massaro TF, Massaro EJ. Interactions between lead and essential elements: a review. *Neurotoxicology*. 1990;11(1):99-119.
149. Mahaffey KR, Gartside PS, Glueck CJ. Blood lead levels and dietary calcium intake in 1- to 11-year-old children: the Second National Health and Nutrition Examination Survey, 1976 to 1980. *Pediatrics*. 1986;78(2):257-62.
150. Cerklewski FL, Forbes RM. Influence of dietary copper on lead toxicity in the young male rat. *J Nutr*. 1977;107(1):143-6.
151. Chiba M, Shinohara A, Matsushita K, Watanabe H, Inaba Y. Indices of lead-exposure in blood and urine of lead-exposed workers and concentrations of major and trace elements and activities of SOD, GSH-Px and catalase in their blood. *Tohoku J Exp Med*. 1996;178(1):49-62.
152. Díaz-Cervantes E, García-Revilla MA, Soto-Arredondo K, Villaseñor-Granados T, Martínez-Alfaro M, Robles J. Computational study of metal complexes formed with EDTA, melatonin, and its main metabolites: implications in lead intoxication and clues to a plausible alternative treatment. *J Mol Model*. 2019;25(1):18.
153. Khedr NF, Talkan OFA. New insights into arsenic, lead, and iron neurotoxicity: Activation of MAPK signaling pathway and oxidative stress. *J Biochem Mol Toxicol*. 2022;36(6):e23040.
154. Yiin SJ, Lin TH. Lead-catalyzed peroxidation of essential unsaturated fatty acid. *Biol Trace Elem Res*. 1995;50(2):167-72.
155. El-Sokkary GH, Kamel ES, Reiter RJ. Prophylactic effect of melatonin in reducing lead-induced neurotoxicity in the rat. *Cell Mol Biol Lett*. 2003;8(2):461-70.

156. Caylak E, Aytekin M, Halifeoglu I. Antioxidant effects of methionine, alpha-lipoic acid, N-acetylcysteine and homocysteine on lead-induced oxidative stress to erythrocytes in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2008;60(4-5):289-94.
157. Nagaraju R, Kalahasthi R, Balachandar R, Bagepally BS. Association between lead exposure and DNA damage (genotoxicity): systematic review and meta-analysis. *Arch Toxicol*. 2022;96(11):2899-911.
158. Devóz PP, Reis MBD, Gomes WR, Maraslis FT, Ribeiro DL, Antunes LMG, et al. Adaptive epigenetic response of glutathione (GSH)-related genes against lead (Pb)-induced toxicity, in individuals chronically exposed to the metal. *Chemosphere*. 2021;269:128758.
159. Kasperczyk S, Dobrakowski M, Kasperczyk A, Romuk E, Rykaczewska-Czerwińska M, Pawlas N, et al. Effect of N-acetylcysteine administration on homocysteine level, oxidative damage to proteins, and levels of iron (Fe) and Fe-related proteins in lead-exposed workers. *Toxicol Ind Health*. 2016;32(9):1607-18.
160. Dobrakowski M, Boroń M, Birkner E, Kasperczyk A, Chwalińska E, Lisowska G, et al. The Effect of a Short-Term Exposure to Lead on the Levels of Essential Metal Ions, Selected Proteins Related to Them, and Oxidative Stress Parameters in Humans. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:8763793.

8. EKLER

EK-1. Tez Çalışması Orijinallik Raporu Ekran Görüntüsü

TEZİN TAM BAŞLIĞI: KURŞUN MARUZİYETİNİN VE ŞELASYON TEDAVİSİNİN TOKSİSİTEYİ ETKİLEYEN BAZI PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: ASLI DİNÇER

DOSYANIN TOPLAM SAYFA SAYISI: 164 SAYFA

Aslı Karacan Dinçer doktora

ORIGINALITY REPORT

4%	4%	0%	2%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	docplayer.biz.tr Internet Source	2%
2	Submitted to Inonu University Student Paper	2%

Exclude quotes On

Exclude matches < 2%

Exclude bibliography On

EK-2. Turnitin Dijital Makbuz**Digital Receipt**

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Aslı Karacan Dinçer
Assignment title: Aslı Karacan Dinçer doktora
Submission title: Aslı Karacan Dinçer doktora
File name: ASLIKARACAND_NCER-DOKTORA_TEZ.pdf
File size: 4.28M
Page count: 164
Word count: 33,741
Character count: 215,234
Submission date: 06-Jan-2023 04:53PM (UTC+0300)
Submission ID: 1989197486



EK-3. Tez Çalışması ile İlgili Yayın ve Bildiriler

1. Dincer A, Samadi A, Lay İ, Cetin T, Nadir-Ozis T, Oztas Y, Sabuncuoglu S.
Kurşun Maruziyeti Oksisterol Düzeylerini Nasıl Değiştirir? (Poster Sunumu)
Hacettepe Üniversitesi II. Lipit Araştırmaları Çalıştayı
07.10.2017 (Ankara-Türkiye)
2. Dincer A, Cetin T, Sabuncuoglu S, Girgin G, Nadir-Ozis T.
Influence of Chelation Therapy on Oxidative Stress Parameters in
Occupationally Lead Exposed Workers. (Poster Sunumu)
10th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC 10) and the 12th
Serbian Congress of Toxicology
18.04.2018-21.04.2018 (Belgrad-Sırbistan)

EK-4. Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kararı



**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 -657

Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 13 TEMMUZ 2016 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2016/14
Proje No : GO 16/449(Değerlendirme Tarihi : 13.07.2016)
Karar No : GO 16/449- 28

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Suna SABUNCUOĞLU'nun sorumlu araştırmacı olduğu, Uzm. Dr. Türkan Nadir ÖZİŞ, Doç. Dr. Ayşe ERCAN, Doç. Dr. Gözde GİRGİN, Doç. Dr. Yeşim ÖZTAŞ, Doç. Dr. İncilay LAY ve Vet. Afşin SAMADI ile birlikte çalışacakları, GO 16/449 kayıt numaralı ve "*Kurşun Maruziyetinin Ve Şelasyon Tedavisinin Toksikiteyi Etkileyen Bazı Parametreler Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, idari izinlerin tamamlanması kaydı ile etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Sevdâ F. MÜFTÜOĞLU	(Başkan)	10 Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU	(Üye)
2. Prof. Dr. Nurten AKARSU	(Üye)	11 Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ	(Üye)
3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARA	(Üye)	IZINLI	(Üye)
4. Prof. Dr. Necdet SENGİLİM	(Üye)	12. Doç. Dr. Gözde GİRGİN	(Üye)
5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU	(Üye)	IZINLI	(Üye)
6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL	(Üye)	13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR	(Üye)
7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	(Üye)	14. Yrd. Doç. Dr. Can Ebru KURT	(Üye)
8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN	(Üye)	15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL	(Üye)
9. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL	(Üye)	16. Öğr. Gör. Dr. Müge DEMİR	(Üye)
		17. Öğr. Gör. Meltem ŞENGELİN	(Üye)
		18. Av. Meltem ONURLU	(Üye)

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580 • E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi için:

9. ÖZGEÇMİŞ

