

**T.C.
MALTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**YENİDOĞANLARDA AĞIR METAL SEVİYELERİ İLE
DNA METİLASYONUNUN KARŞILAŞTIRILMASI**

**DR. AYLAL BALCI
UZMANLIK TEZİ**

AĞUSTOS 2017

**T.C.
MALTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**YENİDOĞANLARDA AĞIR METAL SEVİYELERİ İLE
DNA METİLASYONUNUN KARŞILAŞTIRILMASI**

**DR. AYLAL BALCI
UZMANLIK TEZİ**

Danışman: Doç. Dr. İlhan Asya Tanju

AĞUSTOS 2017

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim süresinde bilgi ve deneyimleri ile Hekim ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı olarak yetişmemde büyük katkısı olan ve her zaman desteğini yanımda hissettiğim; Bölüm başkanımız, değerli hocam Prof.Dr. İsmail Göçmen'e;

Bilgisi ve deneyimini her zaman paylaşmaya hazır olan ve hekimlik nosyonunu kendime örnek aldığım; her türlü sorun ve sorumlulukta yanımda olan, asistanlığım süresince kendisiyle çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum hocam, tez danışmanım Doç.Dr. İlhan Asya Tanju'ya;

Bilgi ve deneyimleri ile eğitime büyük katkısı olan; çalışma temposu ve dinamizmi ile her hekimin örnek alması gereken, YYBÜ' de en zor zamanlarımızda desteğini esirgemeyen her an yanımda olan, hocam Doç.Dr. Tuğba Erener Ercan 'a ;

Asistanlık eğitimim süresince tecrübe ve bilgilerini her zaman paylaşan, çalışma temposu ve dinamizmi ile her zaman örnek olan, hocam Doç.Dr. Arif Şahin Kut, Uzman Dr. Bahar Avgen, Yrd. Doç. Dr. Engin Deniz'e;

Hekimlik nosyonu, çalışma temposu ve dinamizmi ile her hekimin örnek alması gereken; bilgi ve deneyimlerini her zaman paylaşan, sıkıntılarımı her zaman dinleyip çözüm üretmeye çalışan ve pozitif yönde motive eden, hocam Yrd.Doç.Dr. David T. Thomas'a;

Kordon kanı toplama sürecinde desteklerini hiç esirgemeyen tüm Kadındoğum ve hastalıkları meslektaşlarım özellikle Dr. Ali Gürsoy ve Doç.Dr. Aygen Çelik'e;

Asistanlık süresinde her zaman yanımda olan, bana kariyerimde devam etme gücü veren, bana zor günlerimde destek olan başta Ailem, Hocalarım, Asistan arkadaşlarım, tüm laboratuvar çalışanlarına özellikle Özlem Öztürk'e, Hemşire ve tüm Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ekibine;

Bu yolda ilerlememi sağlayan, iyi bir hekim ve insan olmam için doğduğum andan itibaren her zaman yanımda olan değerli Annem, Babam ve Kardeşlerime; sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ayla Balcı
İstanbul, 2017.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	4
ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT).....	7
ŞEKİL VE TABLOLAR LİSTESİ	9
KISALTMALAR.....	10
1. GİRİŞ VE AMAÇ	11
2. GENEL BİLGİLER.....	14
2.1. Epigenetik ve Epigenetik Mekanizmalar.....	14
2.2. DNA Metilasyonu ve Gen İfadesindeki Rolü.....	17
2.3 Ağır Metallerin Biyokimyasal Özellikleri.....	21
2.5. Ağır Metallerin Plasentaya Geçiş Mekanizmaları	36
2.6. DNA Metilasyonu ve Hastalıklar	41
3. MATERYAL VE METOD	48
İstatistiksel İncelemeler.....	49
4. BULGULAR.....	51
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ	67
7. KAYNAKLAR	68

ÖZET

AMAC: DNA metilasyonu, yeni gelişmelerle birlikte araştırmacılara merak uyandıran en temel epigenetik mekanizmalardan biridir. Teknolojinin gelişmesiyle hızlı ilerlemeler kaydeden analiz yöntemleri sayesinde metilasyonun farklı rollerinin ortaya çıkması, özellikle hastalıklar üzerindeki etkilerinin keşfedilmesini kolaylaştırmıştır. DNA'nın kimyasal değişimiyle genlerde ifadesel farklılıklar sağlayan bu mekanizmada meydana gelebilecek bir hata ya dadüzensizlik, birçok hastalığın temelinde yatan sorunları oluşturabilir. Bu çalışmada amacımız, yenidoğanlarda ağır metallerin Global DNA Metilasyonu (GDM) paterninde yarattığı değişikliklerin araştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Bu çalışma 80 yenidoğanın kordon kanında Alüminyum, Civa, Bakır ve Kurşun ağır metal düzeyleri ve DNA metilasyon dağılımları değerlendirilerek yapıldı. Gruba dahil edilme kriterleri sigara içmeyen, demir takviyesi alan sağlıklı term gebelerdi. Alüminyum ve Civa, indüktif olarak eşleştirilmiş plazma ve Kütle spektrometresi (ICP MS) yöntemiyle, Bakır ve Kurşun Atomic absorption spectrometry (AAS) yöntemiyle çalışıldı.

DNA Metilasyon düzeyleri; ThermoPureLink Genomic DNA Mini Kit/250 preps, Epigentec MethylFlash Methylated DNA 5-MC Quantification Kit Colorimetric/96 assays, Epigentec MethylFlash Global DNA Hydroxymethylation(5-hmc) ELİSA Easy Kit kullanılarak ölçüldü. Ağır metal düzeyleri ile DNA metilasyon dağılımları karşılaştırıldı.

BULGULAR: Alüminyum ölçümleri 1,16 µg/L ile 13,98 µg/L arasında değişmekte olup, ortalama 5,45±3,50 µg/L saptanmıştır. Bakır ölçümleri 14,53 µg/dl ile 70 µg/dl arasında değişmekte olup, ortalama 33,41±13,11 µg/dl saptanmıştır. Kurşun ölçümleri 0,32 µg/dl ile 3,49 µg/dl arasında değişmekte olup, ortalama 1,35±0,50 µg/dl saptanmıştır. Civa ölçümleri 0,10 µg/L ile 1,65 µg/L arasında değişmekte olup, ortalama 0,50±0,32 µg/L saptanmıştır. Çalışmamızda baktığımız ağır metal düzeyleri kabul edilebilir referans aralığında

bulunmuştur. (Referans aralığı ; Alüminyum:1-14 µg/L , Bakır:20-70 µg/dl, Kurşun:0-10 µg/dl , Civa:0-10 µg/L olarak alınmıştır.)

DNA metilasyonu düzeylerine göre hastalar üç gruba ayrıldığında; Alüminyum ve Bakır düzeyleri ile DNA metilasyonu düzeyleri arasında herhangi bir ilişki gösterilemedi.(p>0.05).

(DNA metilasyonu 0,04 ile 0,89 arasında değişmekte olup, ortalama 0,18±0,15 saptanmıştır.

DNA metilasyon düzeylerine göre ayırdığımız grupların; % 25.3'ünün DNA metilasyonu 0,10'dan küçük, %44,0'ünün 0,11-0,20 ve %30,7'sinin 0,21'den büyüktür.)

DNA metilasyonu ile kurşun ölçümleri arasında anlamlı farklılık saptanmıştır. (p=0.041; p<0.05). Gruplara göre Civa ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,030; p<0,05).

SONUÇ:

Çalışma sonunda elde ettiğimiz verilere göre Alüminyum, Bakır, Kurşun, Civa seviyelerinin referans aralığında olmasına rağmen; DNA metilasyonuna göre hastalar 3 gruba ayrıldığında, Kurşun ve Civa ile DNA Metilasyonu artışı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu, Civa ile DNA metilasyonu arasında ise pozitif yönde korelasyon olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda baktığımız ağır metal düzeyleri normal aralıkta görülmesine rağmen özellikle civa ve kurşun ile DNA metilasyonu arasında ilişkinin anlamlı çıkması kabul edilebilir sınırlarda bile çevresel etmenlerin DNA metilasyonuna yol açabileceği şüphesini doğurmaktadır. Hamilelik sırasında maruz kaldığımız çevresel etmenlerin düşük düzeyde bile bazı sonuçlara yol açabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler:

Ağır metaller, DNA metilasyonu, Yenidoğan, Kordon kanı

İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)

AIM: New advances have increased curiosity of researchers towards DNA methylation which is one of many an epigenetic mechanisms. The increase in the speed of these advances have led to the discovery of various roles of methylation, and especially the discover of their effect on diseases. A chemical change or irregularity in genes leading to the different expressions of DNA may be the underlying basis for many diseases. In this study we examined if heavy metal levels of newborns effected Global DNA methylation (GDM).

PATIENTS AND METHOD: In this study, heavy metal levels (Aluminum, Mercury, Copper and Lead) and DNA methylation distributions were measured in 80 neonates. The children of healthy pregnant mothers' who did not smoke or take Iron suppliments were included in the study. Aluminium and Mercury were measured using inductively coupled plazma and mass spectrometry (ICP MS), while Copper and Lead were measured using absorpiton spectrometry (AAS).

DNA methylation levels were measured using ThermoPureLink Genomic DNA Mini Kit/250 preps, Epigentec MethylFlash Methylated DNA 5-MC Quantification Kit Colorimetric/96 assays and Epigentec MethylFlash Global DNA Hydroxymethylation(5-hmc) ELİSA Easy Kit. Heavy metal levels were compared to DNA methylation distributions.

RESULTS: Aluminium levels were between 1,16 µg/L and 13,98 µg/L and averaged 5,45±3,50 µg/L. Copper levels were between 14,53 µg/dl and 70 µg/dl and averaged 33,41±13,11 µg/dl. Lead levels were between 0,32 µg/dl and 3,49 µg/dl and averaged 1,35±0,50 µg/dl. Mercury levels were between 0,10 µg/L and 1,65 µg/L and averaged 0,50±0,32 µg/dl. All heavy metal levels were in normal ranges (Aluminium: 1-14 µg/L, Copper: 20-70 µg/dl, Lead: 0-10 µg/dl , Mercury: 0-10 µg/L)

When patients were separated into three groups according to their DNA methylation levels, no correlation was found between DNA methylation distributions and Aluminium or Copper levels ($p > 0.05$). (DNA methylation was between 0,04 and 0,89, averaging $0,18 \pm 0,15$. 25.3% of patients DNA methylation was lower than 0,10, 44.0% was between 0,11 and 0,20 and 30.7% was higher than 0,21)

A significant difference was detected between DNA methylation and Copper levels ($p = 0.041$; $p < 0.05$). There was a statistically significant difference between groups for Mercury. ($p = 0,030$; $p < 0,05$).

CONCLUSION:

This study has demonstrated that although Aluminium, Copper, Lead and Mercury levels were within reference ranges, when patients were separated into three groups according to DNA methylation, Lead and Mercury levels increased with an increase in DNA methylation and that there was a positive correlation between DNA methylation and Mercury. A correlation with DNA methylation of heavy metals despite being in normal ranges raises the suspicion that normal environmental factors may lead to DNA methylation. Pregnant women exposed to normal levels of heavy metals may also be under risk for unforeseen problems.

Keywords:

Heavy metals, DNA methylation, Newborn, Cord Blood

ŞEKİL VE TABLOLAR LİSTESİ

Şekil 1: DNA metilasyonu ile gen ifadesinin baskılanmasını sağlayan mekanizma	20
Şekil 2: Ağır metallerin plasenta aracılığı ile maternal dolaşım ve fetüs arasındaki etkileşimi	41
Şekil 3: Alüminyum ölçümlerinin dağılımları	52
Şekil 4: Bakır ölçümlerinin dağılımları	52
Şekil 5: Kurşun ölçümlerinin dağılımları	53
Şekil 6: Civa ölçümlerinin dağılımları	53
Şekil 7: DNA Metilasyonu dağılımları	55
Şekil 8: DNA metilasyon ölçümleri sınıflamalarının dağılımı	55
Şekil 9: DNA Metilasyonuna göre Kurşun ölçümlerinin dağılımları	58
Şekil 10: DNA Metilasyonuna göre Civa ölçümlerinin dağılımları	59
Şekil 11: DNA Metilasyonu ile Civa ilişkisi	60
Tablo 1: Tedavi edici siRNA'lar	17
Tablo 2: Temel endüstrilerden atılan metal türleri	23
Tablo 3: Civa zehirlenmesi riski taşıyan meslek grupları.	31
Tablo 4: Alüminyumun ambalajlamadaki çeşitli kullanım alanları	33
Tablo 5: DNA metilasyon mekanizması ile ilişkili hastalıklar	44
Tablo 6: Alüminyum, Bakır, Kurşun ve Civa Ölçümlerinin Genel Dağılımları	51
Tablo 7: DNA Metilasyonu Dağılımları	54
Tablo 8: DNA Metilasyonuna Göre Alüminyum, Bakır, Kurşun ve Civa Ölçümlerinin Değerlendirilmesi	57
Tablo 9: DNA Metilasyonu ile Alüminyum, Bakır, Kurşun ve Civa Ölçümlerinin İlişkisi	59

KISALTMALAR

5-HMC	Hydroxymethylation
5m-C	5-metil sitozin
AAS	Atomic absorption spectrometry
Ac	Asetilasyon
Al	Alüminyum
ATSDR	Toksik Madde ve Hastalık Kayıt Ajansı
C	Sitozin
CAs	Kromozomal aberasyon (chromosomal aberrationes)
Cd	Kadmiyum
CDC	ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri
Cu	Bakır
DMTP1	Divalan metal transporter 1
DNMT	DNA metiltransferaz
dsRNA	Çift sarmallı RNA
FMR1	Fragile X mentalretardation 1
G	Guanin
GDM	Global DNA metilasyonu
HDACs	Histon deasetilazlar
hESC	Human embriyonik stem cell
Hg	Cıva
Hg₂Cl₂	Cıva klorür
HP1	Heterokromatinproteinini
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
ICP MS	İndüktif olarak eşleştirilmiş plazma ve kütle spektrometresi
IKB	İmprinting kontrol bölgeleri
Me	Metilasyon
MeCPs	Metil-CpG bağlanma proteinleri
miRNA	MikroRNA
MNNG	N-metil-N-nitro-N-nitrozoguanidin
NCSS	Number Cruncher Statistical System
NPC	Nöral progenitor hücreleri
P	Fosforilasyon
Pb	Kurşun
RISC	İndüklenmiş susturma kompleksi
RNA	Ribonükleik Acid
RNAi	RNAi
SAM	S-adenozil-Lmetiyonin
SCEs	Kardeş kromatit değişimleri (sister chromatidexchanges)
siRNA	Küçük interferans RNA'sı
SNRPN	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N
ssRNA	Tek sarmallı RNA
Su	Sumoylasyon
Ub	Ubiquitinasyon
UBE3A	Ubiquitin-protein ligaseE3A

1. GİRİŞ VE AMAÇ

DNA metilasyonu en temel epigenetik mekanizmalardan biridir. İlk kez 1940'lı yıllarda kullanılan *epigenetik* terimi, DNA dizisinden bağımsız olarak genifadesinde meydana gelen, miyoz ve mitoz ile kalıtsal olarak aktarılabilen gen ekspresyonu değişikliklerini tarif eder (1,2). Son yıllarda gelişen teknolojiyle birlikte epigenetik alanında yapılan çalışmalar büyük ölçüde hız kazanmıştır. Epigenetik olayların özellikle insanlar üzerindeki önemli etkilerinin keşfedilmesi, hastalıklarla ilişkisinin kurulmasını da sağlamıştır. Birçok hastalık epigenetik mekanizmaların düzenlenmesindeki hatalardan dolayı ortaya çıkmaktadır (3). Epigenetik mekanizmaların birbiriyle uyum içinde etkileşmesi ve düzenlenmesi, organizmanın normal bir embriyonik gelişim geçirilebilmesi için çok kritiktir. Bu süreçte, aynı genetik diziye sahip hücreler, farklı ifade profilleri sergileyerek değişik fenotipler gösterirler. Bir organizmada tek bir atasal hücreden çok farklı hücre tipinin oluşması, genlerin farklı yer ve zamanlarda ifade olmalarından kaynaklanmaktadır. Epigenetik mekanizmalar, yer-zaman parametresine bağlı olarak, belirli genlerin ifade olmasını sağlarken belirli genlerin ifadesini de baskılamaktadır (4). Bunu sağlayan mekanizmaların herhangi birindeki hata ya da düzensizlik, genlerin ifadesinin aşırı artmasına veya baskılanmasına neden olarak epigenetik kaynaklı hastalıkları meydana getirmektedir (5).

Ağır metallerin DNA metilasyonuna etkisi incelendiğinde metallerin DNA'ya bağlanmasının genellikle baz eşleşmesini sağlayan hidrojen bağlarının kırılmasına ve çift zincirli yapının kararlılığının bozulmasına sebep olduğu bilinmektedir. Pozitif yüklü metal iyonlarının, DNA'nın her iki zincirinde bulunan fosfat gruplarındaki negatif yüklü oksijen atomları ve bazların azot ve oksijen gibi elektron donörü olan atomları ile reaksiyona girebileceği bildirilmiştir. Magnezyum ve kalsiyum gibi metal iyonları nükleik asitlerde fosfat gruplarına bağlanarak DNA çift zincirli heliks yapısının korunmasına katkıda bulunurken, civa ve gümüş iyonları bazlara bağlanarak heliks yapının kararlılığını bozabilmektedir. Hegzavalent krom

bileşiklerinin memeli hücre kültürlerinde kromozom anormalliklerine ve mutasyonlara sebep olduğu, ayrıca DNA'nın bir zincirinde kırılmalara yol açabileceği saptanmıştır. Metallerin DNA'ya bağlanması genellikle baz eşleşmesini sağlayan hidrojen bağlarının kırılmasına ve çift zincirli yapının kararlılığının bozulmasına neden olabilir, fakat nükleik asitlerin konformasyonunda meydana gelebilecek bu gibi değişimler bağlanan metal iyonunun çeşidine bağlıdır.

DNA metilasyon mekanizması ile ilişkili hastalıklar incelendiğinde; embriyonik gelişim, transkripsiyon, kromatin yapısının düzenlenmesi, X kromozomu inaktivasyonu, genomik “*imprinting*” ve kromozom stabilitesinin sağlanması gibi birçok hücresel süreçte rol oynadığı belirlenmiştir. Metilasyonun bu tip kritik süreçlerde rol alması, onun çok iyi bir şekilde kontrol edilmesini gerektirmektedir. Birçok hastalığın temelinde, epigenetik kontrol sisteminin düzgün bir şekilde çalışmaması yatmaktadır. Epigenetik modifikasyonlar düzgün bir şekilde kurulamaz ya da devam ettirilemezse, bu süreçle ilgili patolojik sonuçlar ortaya çıkabilmektedir (5,6). Bunlar; “*imprinting*” hastalıklar (Prader-Willi sendromu (PWS), Angelman sendromu (AS), Beckwith-Wiedemann sendromu (BWS)), üçlü tekrar hastalıkları (Frajil X sendromu(FRAXA), Myotonik distrofi (DM1), Fasiyoskapulohumeraldistrofi (FSHD)), mekanizma ile direk ilişkili hastalıklar (Sistemik lupuseritematozus (SLE), kanser (Kolon kanseri, bütün kanser tipleri) ve inflamatuvar hastalıklardır (Römatoid artrit (RA), Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA)).

Bu çalışmada amaç; Türkiye’de doğan yenidoğanlarda ağır metal düzeylerinin belirlenmesi ve bu düzeylerin DNA metilasyonu ile korelasyonunun araştırılmasıdır. Bu çalışmanın sonucunda Türkiye’de doğan bebeklerin ağır metal maruziyetinin belirlenmesi dışında, DNA

metilasyonunu artırdıklarının saptanması durumunda adı geçen ağır metallere maruziyetin azaltılması ile bebek ve toplum sağlığının iyileştirilmesinin sağlanacağı öngörülmektedir.

Epigenetik alanında yapılan bu çalışma ile birçok hastalığın patogenezinin anlaşılmasının yanı sıra kanser gibi çağımızın önemli hastalıkları içinde erkentanı, ilaç geliştirme ve tedavi olanaklarına büyük katkılar sağlayacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epigenetik ve Epigenetik Mekanizmalar

Bir organizmanın DNA baz diziliminde herhangi bir değişim olmaksızın oluşan, mitoz ve mayoz bölünme ile aktarılabilen gen fonksiyon değişimlerine epigenetik denir. Başka bir deyişle; gen ekspresyonuna bağlı kalıtsal bilgidir.

Epigenetik değişimler genlerin sessizleşmesine (silencing) neden olurlar. Bu da geni inaktive edici bir mutasyon veya delesyon gibi genetik bir mekanizmayla eşdeğerdir. Ancak epigenetik değişimler geri dönüşümlü oluşları ve DNA'nın baz dizisinde bir değişime neden olmamaları gibi özellikleriyle genetik değişimlerden ayrılırlar. Canlıların embriyodan yetişkin bireye doğru ilerleyen gelişim sürecinde gözlemlenen, hücre farklılaşması sırasında ortaya çıkan gen ifadesindeki değişikliklerde önemli rol oynamaktadır. Çevresel etmenlerin genler üzerine etkileri epigenetik mekanizmaların aktive olmasına veya sessizleştirilmesine neden olur.

Epigenetik mekanizmalar basitçe şu şekilde gruplandırılabilir;

Transkripsiyonel mekanizmalar:

➤ DNA metilasyonu:

DNA metilasyonu insanlarda ve birçok memelide bilinen tek doğal DNA modifikasyonudur. DNA metilasyonunda; Guanin tarafından takip edilen sitozin bazına DNA metiltransferaz (DNMT) enziminin bir metil grubu kovalent olarak bağlanır.

Hücredeki DNA metilasyonunun amaçları;

- Gen regülasyonu
- Genomik imprinting

- X Kromozomu inaktivasyonu
- Viral ajanlardan korunma

Gen Regülasyonu: Bir gen bölgesinin metillenmesi ile ifade edilmesi arasında ters bir oran vardır. Bir gen az metillenirse yüksek oranda ifade edilir. Bir gen çok metillenirse düşük oranda ifade edilir. DNA metilasyonu ve regülasyon arasındaki ilişkiyi anlamada en iyi örneklerden birisi kanser hücrelerindeki metilasyon oranlarının incelenmesidir. Kanser hücrelerinde normal hücrelere göre proto onkogenlerin daha az miktarda metillendiği, DNA hasar tamir genlerinin ise daha çok metillendiği gösterilmiştir.

Genomik İmprinting: Belirli bir geni taşıyan kromozomun kökeninin anaya yada babaya ait olmasına bağlı olarak fenotipik ifadenin değişmesi durumuna verilen isimdir. Bazı türlerde belirli kromozomal bölgelerdeki genler anadan ya da babadan köken almasına bağlı olarak ifade edilmesi veya genetik olarak sessiz kalması için bir çeşit hafıza ya da damga içerirler (ifade edilebilir allelin baskılanması).

X Kromozomu İnaktivasyonu: Dişiler X kromozomundan iki kopyaya sahip olduklarından X bağlı gen ürünlerini iki kat fazla üretme potansiyeline sahiptirler. Kaç tane olmasına bakmaksızın biri hariç tüm X kromozomları inaktive olmaktadır. Bu konu hakkında en çok bilinen hipotez Lyon Hipotezi'dir. Bu hipoteze göre; dişi memelilerin somatik hücrelerinde sadece bir X kromozomu transkripsiyonel olarak aktiftir. İnaktivasyon embriyonik yaşamın ilk evrelerinde olur. Dişi somatik hücrelerin her birinde inaktif X anneden veya babadan gelen olabilir, tesadüfidir. Ancak bir hücrede bir X kromozomu inaktive olunca bu hücreden oluşan tüm hücrelerde aynı X inaktif olur.

Viral Ajanlardan Korunma: Konak memeli hücrelerinin genomuna dahil olan viral DNA' nın metilasyon tarafından inaktivasyona uğratılması, bu yöntemin enfeksiyon ajanlarına karşı bir koruma mekanizması olarak görev aldığını göstermektedir.

➤ **Histon modifikasyonları**

Histonlar başlıca; Asetilasyon (Ac), Ubiquitinyasyon (Ub), Metilasyon (Me), Fosforilasyon (P), Sumoylasyon (Su) ile modifiye edilirler.

Histon Metilasyonu, histon proteinlerinde bulunan aminoasitlere histonmetiltransferaz enzimleritarafından 1, 2 veya 3 tane metilgrubu eklenmesidir. Histon Modifikasyonu gen aktivasyonu veya baskılanmasını sağlar.

Postranskripsiyonel mekanizmalar:

➤ **RNAi (RNA Interference)**

RNA interferens veya RNA girişimi (RNAi) , canlı hücreler içinde yer alan ve hangi genlerin aktif olacağını ve nasıl aktif olacaklarını belirleyen ve kontrol eden bir sistemin ismidir. Küçük RNA moleküllerinin iki tipi, mikroRNA (miRNA) ve küçük interferans RNA'sı (siRNA) RNA interferens için büyük önem taşır. RNA'lar genlerin doğrudan ürünü olup bu küçük RNA'lar, ya faaliyetlerini artırmak veya azaltmak suretiyle, örneğin bir mesajcı RNA'nın protein üretmesini engelleyerek diğer özel RNA'lar (mRNA) ile bağlanabilirler. Her bir siRNA'sı (Tablo 1), iki adet tek sarmallı (ss) ssRNA'ya bağlanır, tam olarak isimleriyle yolcu sarmal ile kılavuz sarmal. Yolcu sarmal indirgenerek ayrıştırılırken kılavuz iplikçik RNA-indüklenmiş susturma kompleksi (RISC) içine yerleştirilerek dahil edilir. Transkripsiyon sonrası sessizleşme olarak bilinen olay böylece meydana gelmiş olur.

siRNA hedef geni	Hastalık
p53 mutant K-Ras BCR-ABL MDR1 C-RAF Bcl-2 VEGF PKC- α B- Catenin	KANSER

Tablo 1: Tedavi Edici siRNA'lar

miRNA genlerinin %50'den fazlası kanserle ilişkili genomik alanlarda veya frajil sitelerde lokalizedir. Bunların tümör supresör gibi davranarak onkogenleri inhibe ettikleri veya tam tersiolarak onkogen gibi hareket ederek tümör supresörleri inhibe ettikleri gösterilmiştir. miR-15 ve miR- 16'nın insan kanserlerinde tümör supresör olarak hareket edebileceğini gösterilmiştir.

2.2. DNA Metilasyonu ve Gen İfadesindeki Rolü

Ökaryotik hücreler gen ifadesi kontrolünü sağlayabilmek için çekirdekte yüksek derecede kontrol edilen, dinamik ve karmaşık bir yapı olan kromatini kullanırlar. Kromatin yapısı, yapısal ve kimyasal birtakım değişimlere uğrayarak gen ifadelerini etkilemektedir. DNA'nın çok sıkı paketlenmiş formu olan kromatin yapısının DNA replikasyonu sırasında açılmasıyla, kalıp zincirde var olan yapısal ve kimyasal modifikasyonlar, diğer bir deyişle "epigenetik işaretler" yeni sentezlenen zincirlere aktarılır ve bu şekilde herbir replikasyon sırasında hücreden hücreye korunur (3). Kromatin yapı üzerinde meydana gelen epigenetik

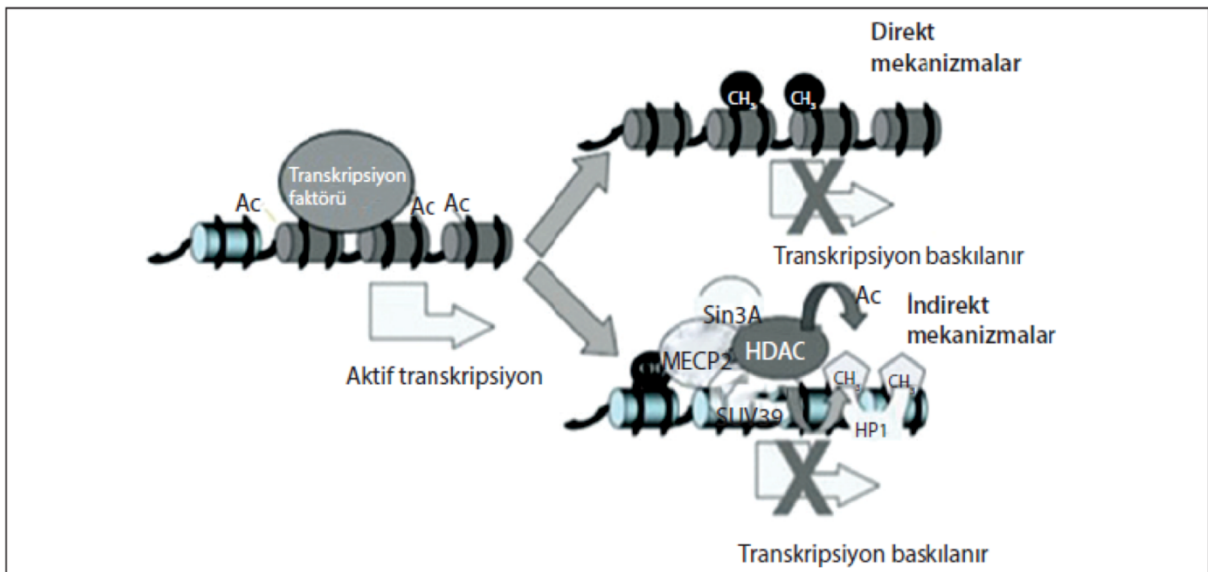
modifikasyonların genlerin ifadelerini etkilemesi, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi temel epigenetik mekanizmalar tarafından kontrol edilmektedir (6).

Son dönemlerde üzerinde çok çalışılan ve hakkında en çok bilgi sahibi olunan epigenetik mekanizma DNA metilasyonudur. DNA metilasyonu, kovalent bir modifikasyondur ve sitozin (C) bazının 5. karbonuna bir metil grubu (-CH₃) takılmasıyla 5-metil sitozin (5m-C) yapısının oluşmasıyla karakterize edilir (7). Bu kimyasal tepkime, DNAmetil transferazlar (DNMT) tarafından katalizlenmektedir. Bu enzimler, metil grubu donörü olan S-adenozil-Lmetiyonin (SAM)'den metil grubu alarak sitozinin 5. Karbonuna transfer ederler. Memelilerde bilinen beş DNMT enzimi vardır; DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L ve DNMT2. En önemli katalitik aktivitelere sahip olan enzimler DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B'dir. DNMT1, DNA zincirinde kurulu olan metilasyon paternlerinin yeni zincirlere aktarılmasından sorumludur. DNMT3A ve DNMT3B de denovo metil transferazlar olarak adlandırılırlar ve gelişimin erken evrelerinde kurulan ilk metilasyon paternlerinin oluşturulmasından sorumlulardır (8).

DNA metilasyonu, genomdaki sitozin (C) ve guanin (G) çiftlerinin ardarda sıralanmasıyla oluşan ve CpG dizilerinin yoğunlaştığı bölgelerde gerçekleşmektedir. İnsan genomunda yaklaşık olarak 28 milyon CpG dizisi bulunmaktadır. Bu dizilerin %10'dan azı, CpG adacıkları olarak adlandırılan 500 baz çiftinden büyük ve GC içeriğinin %55'den fazla olduğu bölgelerde bulunmaktadır. Evrimsel süreçte korunmuş olan CpG adacıkları, genellikle genlerin promotor bölgelerinde yerleşim göstermektedir. Yaygın olarak, organizmanın gelişimi ve sağ kalımı için sürekli olarak ifade edilmesi gereken housekeeping ve düzenleyici genlerdeki CpG adacıkları, DNA metilasyonuna karşı dirençli bölgelerdir. Bunun yanında, tekrar dizileri ve transpozonlar gibi heterokromatin bölgelerdeki CpG dizilerindeyse, DNA

metilasyon oranı yüksektir. Bu bölgelerin metillenmiş durumda olması ile transkripsiyon baskılanmakta ve bu elementlerin genom içi hareketi engellenerek kromozomun kararlı yapıda kalması sağlanmaktadır (9, 10). Buna ek olarak; uzun dönem baskılanması gereken inaktif X kromozomundaki genler, imprinted genler, gametlerde ifade olması gereken genler ve bazı dokuya özgül genler de, yer ve zaman durumuna bağlı olarak metilasyona uğramaktadır (5). Sitozine metil grubunun takılmasıyla DNA'da oluşan "epigenetik işaret" genlerin hangi hücrede ifade olup hangihücrede ifade olmayacağını belirlemektedir. Genel bir algı olarak DNA metilasyonu, promotor bölgedeki CpG adacıklarının metillenmesini sağlayarak o genin susturulmasını sağlamaktadır. Bu durumun gerçekleşmesi için iki mekanizma önerilmiştir; direk ve indirek mekanizmalar (Şekil 1). Direk mekanizmalarda, genin promotor bölgesine transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasının fiziksel olarak engellenmesi söz konusudur. Transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgesindeki metillenmiş CpG'ler, transkripsiyon faktörlerinin buraya bağlanmasını yapısal olarak engeller ve bu şekilde gen ifadesi baskılanır. Bu mekanizmaya alternatif olan ve günümüzde daha çok kabul gören diğer bir mekanizma da indirek mekanizmalardır. Burada, genin promotor bölgesindeki metillenmiş CpG'ler, metil-CpG bağlanma proteinleri (MeCPs) olarak adlandırılan birtakım faktörlerin bu bölgeye bağlanmasını tetiklemektedir. Bu proteinlerin bağlanması, histon deasetilaz ve histon metiltransferaz gibi birçok korepresör proteininde bölgeye gelmesini sağlamaktadır. Histon deasetilazlar (HDACs), bu bölgedeki histonları deasetile eder ve böylece kromatin yapısı inaktif konfigürasyon kazanır. Histon metiltransferazlar (SUV39) ise, H3 histonunu 9. lizin pozisyonundan (H3K9) metiller ve inaktif kromatin yapısını daha da sağlamlaştırır. H3K9 metilasyonu aynı zamanda bölgeye heterokromatin proteinini (HP1) ve kromatin remodelling proteinlerini (BRM, SIN3A) de bu bölgeye çeker. Sonuçta, genin promotor bölgesinde oluşan bu kompleks yapı genin transkribe olmasını engeller ve gen ifadesi baskılanır (11).

Bu güne kadar DNA metilasyonu ile ilgili yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu, promotor bölgedeki metilasyona odaklanmıştır. Aslında, promotor bölge metilasyonu ile gen sessizleşmesi arasındaki ilişki 1970'lerde tanımlanmıştır. Promotor bölgedeki CpG adacıklarının metillenmesi ve bunun gen ifadesini baskıladığının keşfi, DNA metilasyonunun işlevi hakkında genel algının şekillenmesini sağlamıştır. Şimdilerde ise, DNA metilasyonu ve gen sessizleşmesi arasındaki ilişkinin belirsiz olduğu gündemdedir. DNA metilasyonu, gelişen genom-boyu metilasyon haritalamaları sayesinde; transkripsiyon başlama bölgelerinde, ekzon ve intron bölgelerinde, düzenleyici bölgelerde ve tekrar dizilerinde analiz edilebilmektedir (12). X kromozomu üzerinde yapılan çalışmalar sonucu, gen içinde gerçekleşen metilasyon ile aktif transkripsiyon arasında pozitif korelasyonlar bulunmuştur(13). Gen içindeki metilasyonun transkripsiyonu engellemediği hatta transkripsiyonun uzamasını tetiklediği öne sürülmüştür. Promotor bölgedeki metilasyon, gen ifadesi ile negatif korelasyona sahipken, gen içindeki metilasyonun gen ifadesi ile pozitif korelasyona sahip olmasının açıkça bir paradoks olduğu da vurgulanmıştır (12). Bu açıdan bakıldığında, DNA metilasyonunun gen ifadesi üzerine etkilerinin hem baskılama hem de ifadeyi artırma yönünde olabileceği göz ardı edilmemelidir.



Şekil 1: DNA metilasyonu ile gen ifadesinin baskılanmasını sağlayan mekanizma.

2.3 Ağır Metallerin Biyokimyasal Özellikleri

Günümüzde artan nüfus, kentleşme ve endüstrileşme tüm canlıların ağır metal temasını artırmıştır (14,15). Ağır metaller yaygın kullanımları nedeniyle en zararlı çevresel kirleticilerdendir. Kurşun (Pb), cıva (Hg) ve kadmiyum (Cd) Toksik Madde ve Hastalık Kayıt Ajansı (Agency for Toxic Substances and Disease Registry: ATSDR)'nin en son 2007'de bildirdiği öncelikli tehlikeli maddeler içerisinde ilk 10'da yer almaktadır (16).

Yaşadığı çevrede ağır metal düzeyinin artması çoğu canlı dokusunda ağır metal düzeylerinin artmasına yol açmıştır (17). Besin zincirinin en üstünde yer alan insan, giderek artan düzeylerde ağır metallerle temas etmektedir. Bu nedenle son 30 yıldır ağır metallerin toksik ve istenmeyen etkilerini inceleyen çalışmaların sayısı giderek artmıştır. İnsanların toksik metallerle tanışması intrauterin dönemde başlar ve sonrasında başlıca anne sütü ve soludukları hava ile ağır metal teması sürer. Hızlı büyüme ve gelişim sürecinde olan fetüs ve bebekler ağır metallerin toksik etkilerine karşı erişkinlerden daha hassastır (14, 15).

Ağır metal fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 g/cm³' ten daha yüksek olan metaller olarak tanımlanmaktadır. Genel olarak zehirli ve çevre kirliliğine nedenolan tüm metaller ağırmetaldir. Bu gruba kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, cıva, alüminyum ve çinko olmak üzere 60' tan fazla metal dahildir.

Bazı metaller insan vücudu için vazgeçilmez iken bazıları da ileri derecede zehirleyicidirler. Ancak vücut için faydalı görünen metallerin de belirli miktarlardan sonra toksik etkili oldukları bilinmektedir. Örneğin bakır eksikliği çocukluktan itibaren önemli sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Bununla birlikte kurşunun düşük oranda alınması bile insanlar için toksik etki yaratma potansiyeline sahiptir.

Metallerin ekolojik sistem üzerine etkilerinden bahsederken aslında metalin ait olduğu grubun ele alınması ve bu özelliğin vurgulanması biyolojik etki açısından çok daha anlamlıdır.

Ağır Metallerin Doğada Bulunuğu ve Yayılımı:

Antik çağlarda metallerin cevherleri işlenmeye başlandığından beri metaller insan faaliyetleri sonucu olarak doğal çevrimler dığuında atmosfere, hidrosfere ve pedosfere yayılmaya başlamığulardır. Hergün yüzlerce kirletici doğaya değuarj edilmektedir. İnsanlığı tehdit eden kirleticilerin en önemlileri; petrol, yağ, klorlu hidrokarbonlar, radyoaktif atıklar, sentetik deterjanlar, pestisitler, yapay ve doğal tarımsal gübreler, ağır metaller, bakteri ve virüs gibi hastalık yapıcı canlılardır. Bu kirleticilerin içinde yer alan ağır metallerealıcı ortamların en ciddi kirleticileri gözüyle bakmak gerekmektedir. Çünkü ağır metal içeren kirleticiler sucul ortamlarda veya sucul canlılarda birikim gösterebilirler (18, 19).

Ağır metaller, su kaynaklarına, endüstriyel atıklar veya asit yağmurlarının toprağı ve dolayısıyla bileşimde bulunan ağır metalleri çözmesi ve çözünen ağır metallerin ırmak, göl ve yeraltı sularına ulaşmasıyla geçerler. Sulara taşınan ağır metaller aşırı derecede seyrelirler ve kısmen karbonat, sülfat, sülfür olarak katı bileşik oluşturarak su tabanına çöker ve bu bölgede zenginleşirler. Sediment tabakasının emilim kapasitesi sınırlı olduğundan dolayı da suların ağır metal konsantrasyonu sürekli olarak yükselir.

Ağır metallerin çevreye yayılımında etken olan en önemli endüstriyel faaliyetler çimento üretimi, demirçelik sanayi, termik santraller, cam üretimi, çöp ve atık çamur yakma tesisleridir. Tablo 2'de temelendüstrilerden atılan metal türleri genel olarak gösterilmiştir. Havaya atılan ağır metaller, sonuçta karayave buradan bitkiler ve besin zinciri yoluyla da hayvanlara ve insanlara ulaşırlar ve aynı zamanda hayvan ve insanlar tarafından havadan aeresol olarak veya toz halinde solunurlar. Ağır metaller endüstriyel atık suların içme sularına karışması yoluyla veya ağır metallerle kirlenmişpartiküllerin tozlaşması yoluyla da hayvan ve insanlar üzerinde etkin olurlar.

Endüstri Türü	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Sn	Zn
Kağıt Endüstrisi	-	+	+	+	+	+	-	-
Petrokimya	+	+	-	+	+	-	+	+
Klor-alkali Üretimi	+	+	-	+	+	-	+	+
Gübre Sanayi	+	+	+	+	+	+	-	+
Demir-Çelik Sanayi	+	+	+	+	+	+	+	+
Enerji Üretimi (Termik)	+	+	+	+	+	+	+	+

Tablo 2: Temel endüstrilerden atılan metal türleri

KURŞUN (Pb)

Kurşun periyodik tablodaki elementlerden biri olup, simgesi Pb ve atom numarası 82'dir. Kurşun insan faaliyetleri ile ekolojik sisteme en önemli zararı veren metal olma özelliği taşımaktadır. Kurşun doğada bol bulunmakta olup, tarih boyunca da geniş endüstriyel kullanım alanları bulunmaktadır. Antik uygarlıklardan itibaren özellikle su sistemlerinde yoğun olarak kullanılmış ve kurşuna bağlı zararlı etkiler o günlerden farkedilmeye başlamıştır. Ekolojik sistemde metal ve bileşik hallerinde bulunur ve her durumda toksik özellik taşır. 1920'li yıllarda kurşun bileşiklerinin (kurşuntetraetil Pb (C₂H₅)₄) benzine ilave edilmesi ekolojik sisteme yayılmasında önemli rol oynamıştır. Günümüzde yaygın olarak kurşunsuz benzin kullanma çabası olmakla birlikte bu yolla yayılım halende devam etmektedir (20, 21, 22, 23).

Kurşunun kullanım alanları:

- Boya hammaddesi olarak (Kurşun oksit, kurşun karbonat)
- Yemek saklama kaplarında
- Akü sanayisinde
- İnsektisitler (böcek ilaçları)

- Su borularında
- Kozmetik malzemelerde bulunan pigment ve diğere ana maddelerde
- Kuyumculuk işlemlerinde altının geri kazanımında
- Sigara

Kurşun gastrointestinal ya da solunum yolu ile emilir. Organik kurşun ayrıca deriden de hızlıca emilir. Çocukların kurşunu absorbe etme oranı %50 iken bu oran erişkinlerde %10 olarak bulunmuştur. Kurşun hızla kana geçer, %90'ı eritrositlere bağlı olarak bulunur. Kurşun daha sonra kemiklerde depolanır. Ana atılım yolu idrar ile olmakla beraber anne sütü, tükürük, saç ve tırnaklarda da bulunur. Kurşun toksisitesi hücre zarlarına ve mitokondrilere olan afinitesinden kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak oksidatif fosforilasyon ve ATPazlar üzerine etkileri ortaya çıkmaktadır. Ek olarak kurşun gen ekspresyonunu etkileyebilecek şekilde, nükleuslar içine girmesini sağlayacak şekilde inklüzyon cisimcikleri oluşturmaktadır (20, 21, 24, 23).

Kurşun toksisitesinin biyokimyasal ve moleküler mekanizması tam olarak anlaşılmış değildir. Kurşun enzim inhibisyonu, DNA sentezinin doğruluğu, mutasyon, kanser, doğum kusurları ve kromozomal aberasyon testleri de dahil olmak üzere birçok biyolojik ve kimyasal teste pozitif cevap vermiştir (25).

İnsan hücreleri kullanılarak yapılan *in vitro* çalışmalar kurşun iyonlarının DNA sentezinin devamlılığını ve onarımını engellediğini (26, 27) ve DNA polimeraz β ve ligaz aktivitesini inhibe ettiğini göstermektedir(28). Kurşun, UV-radyasyon ve N-metil-N-nitro-N-nitrozoguanidin (MNNG) gibi mutajenlerle ko-mutajen olarak hareket ederek DNA onarımını engelleyebilmektedir (29). Farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücrelerde UV

ile elde edilen kardeş kromatit değişimleri üzerinde yapılan bir çalışmada gösterildiği gibi DNA hasarı ve genotoksik etkiler onarım engellendiğinde artabilmektedir (30).

Genotoksisite kanser oluşununun başlaması için gereklidir. Artan genetik hasar ve insanlarda kanser oluşumu arasındaki bağlantı kanıtlanmıştır (31). Kurşun bileşiklerinin böbrek tümörleri, akciğer ve mide kanseri oluşumu ilebağlantılı olduğu bulunmuştur (32, 33, 34). Kurşunun zayıf bir mutajen ve olası bir karsinojen olduğu in hemster V79hcrelerinde gösterilmiştir (35,36). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (The International Agency for Research onCancer; IARC) kurşun ve inorganik kurşun bileşiklerini grup 2B’de olası insan karsinojeni olarak sınıflandırmaktaydı (37). Ancak IARC insandaki karsinojen etkileri yeterli görerek inorganik kurşunu yakın zamanda grup 2B’den grup 2A’ya muhtemel insan karsinojeni sınıfına almıştır (38). Organik kurşun bileşikleri ise grup 3’de bulunmaktadır ve insan karsinojeni olarak sınıflandırılmamaktadır (37). Sınıflandırma sıçan ve farede böbrek tümör oluşumu temel alınarak yapılmıştır. Kurşun için insan ile yapılan epidemiyolojik çalışmaların yeterliliği hala sorgulanmaktadır (39,40). Bazı alışmalar kurşun maruziyetinin lenfositlerde kromozomal aberasyon (chromosomal aberrations-CAs) ve kardeş kromatit değişimleri (sister chromatidexchanges-SCEs) sıklıklarının artırdığını göstermiştir (41, 42, 43, 30). Ancak bazı çalışmalarda negatif sonuçlar elde edilmiştir (44, 45). Kardeş kromatit değişimleri uzun dönemde genotoksik etkilere neden olabilmektedir.

Daha önce yapılan *in vitro* alışmalar birçok ağır metalin DNA protein çapraz bağları oluşturabileceğini ne sürmektedir. Bu ajanların çoğunun bu etkiye neden olabilmeleri için gerekli konsantrasyonun, hücreler için son derece toksik olduğu bulunmuştur. Kurşun bileşikleri *in vitro*’da 5nM konsantrasyonda DNA protein çapraz bağlarının oluşumunu indükler (46). Ancak kurşunla çalışan işçilerde şu ana kadar lenfositlerde DNA protein çapraz bağlarının oluşumu belirlenmemiştir (47). Kurşun, hücre iskeleti proteinleri ile etkileşerek kromozom segregasyonunu değiştirebilmektedir (48). Oksidatif solunumun, ağır metaller

aracılığı ile gerçekleşen Fenton reaksiyonlarının veya çevresel toksik ajanların yer aldığı redoks reaksiyonlarının yan ürünü olan reaktif oksijen bileşikleri de DNA hasarına neden olmaktadır (49).

Kurşun plasentadan kolaylıkla geçer ve çocukların Pb ile teması prenatal dönemde başlar. Fetusa geçen Pb miktarı anneye ait vücut Pb yükü ile ilişkilidir. Gebelik sırasında anne kemiğindeki Pb mobilize olur ve plasenta aracılığı ile fetusa geçer. Devam eden çocukluk dönemlerinde en önemli Pb teması, Pb ile kontamine boya tozu, kırıntısı, toprak, su ve yabancı cisimleri ağız yoluyla alması ile olmaktadır (50). Kurşun özellikle gelişen beyin üzerine toksiktir. Çocuklarda uzun süreli düşük dozlarda Pb teması entellektüel kapasitede azalmaya yol açar. Kan Pb düzeyinde 10µg/dl'lik artış IQ'da 2 puanlık düşmeye yol açmaktadır (51). Intrauterin dönemde Pb teması olan bebeklerde erken doğum ve intrauterin büyüme geriliği görülmüştür (52, 53).

Kurşun elementinin insan sağlığı üzerine akut ve kronik dönemlerde farklı ve zararlı etkileri olduğu bilinmektedir. Bu etkiler polinöropati, ensefalit, anemi, hipertansiyon, bilişsel fonksiyonlarda bozulma (özellikle çocuklarda), ensefalit, böbrek fonksiyon bozuklukları, bağışıklık sistemi bozuklukları, üreme fonksiyonlarında muhtemel bozulmalar ve muhtemel kanserojen etki olarak özetlenebilir (20, 21, 23, 54, 55).

BAKIR (Cu)

Bakır, 1B geçiş grubu elementidir ve atomnumarası 29'dur. Bakıra tarihte ilk defa Kıbrıs'ta rastlandığından tüm dillerdeki isimlerinin Cyprium kelimesinden türediği tahmin edilmektedir. Doğada 200'den fazla bakır minerali bulunmakla beraber sadece 20 tanesi bakır cevheri olarak endüstriyel öneme sahiptir. Bakırın bitkiler ve canlılar üzerindeki etkisi, kimyasal formuna ve canlının büyüklüğüne göre değişir. Küçük ve basit yapıları için

zehir özelliği gösterirken büyük canlılar için temel yapı bileşenidir. Bu nedenle bakır ve bileşikleri fungusit, biosit, anti bakteriyel madde ve böcek zehiri olarak zararlılarına ve yumuşakçalara karşı yaygın olarak kullanılır. Pestisidlerde yeralan bakır iyonları sağlık açısından çok tehlikelidir. Az miktarda bakır iyonu alınması vücudun bakır dengesini bozmakta, enzim aktivitesini engellemekte, karaciğer, beyinve böbreklerin normal çalışmasını bozmaktadır. Ayrıca bakır iyonu bitkilerde uzun süre kalabilir. Örneğin; elma ağaçlarında giderek azalmakla birlikte 12 hafta varlığını sürdürdüğü tespit edilmiştir.

Bakır, çeşitli kaya ve minerallerde bol bulunan esansiyel mikro besin elementlerinden biridir. Hem prokaryot hem de ökaryotlardaki metabolik süreçlerin geniş bir yelpazesi için gereklidir. Oksijen taşıyıcıları (hemosiyanin) ya da redoks katalizörleri (sitokrom oksidaz, nitrat redüktaz) gibi işlevleri olan, bilenen en az 30 tane bakır içeren enzim vardır. Bakır; Cu^0 , $Cu+1$ ve $Cu+2$ değerlikli üç oksidasyon durumu ile bir geçiş metalidir.

Bakır elektrik ve boya sanayinde, tesisat borularının üretiminde kullanılmaktadır. Bakır tuzları veteriner hekimlikte antelmintik olarak, tarımda fungusit olarak geniş kullanım alanına sahiptir. Bakır, solunan havayla, içilen suyla, yenilen yiyeceklerle ya da bakır içeren bileşiklerin deriye teması yoluyla organizmaya alınabilir. (56)

Bakır vücut işlevleri açısından önemli olmakla beraber özellikle saç, deri esnek kısımları, kemik ve bazı iç organların temel bileşenidir. Erişkin insanlarda ortalama 50-120 mg bulunan bakır, aminoasitler, yağ asitleri ve vitaminlerin normal koşullarda metabolizmadaki tepkimelerin vazgeçilmez öğesidir. Metalloenzimlerin yapısında bulunan bakır, insan metabolizmasında biyokatalizör olarak pek çok işleve sahiptir. Sitokrom c oksidaz, dopamin β -hidroksilaz, urat oksidaz, süperoksit dismütaz, tirozinaz, amin oksidaz ve askorbik asit oksidaz bilinen bakır metalloenzimlerinin başlıcalarıdır. Demirin vücutta düzenli bir şekilde kullanılması için de gereklidir. Bakır olmazsa demir hemoglobine bağlanamaz. Bakır insan

vücudunda tüm organ ve dokularda bulunmaktadır. Konsantrasyonları birkaç ppm'den 100 ppm'e kadar değişen miktarlarda bulunabilir. Karaciğerde yüksek derişimlerde bulunur. Ayrıca beyin, kalp, mide, bağırsağın çeşitli kısımlarında yüksek miktarda bulunur. Toksik bir madde olmasının yanı sıra esansiyel bir besin maddesi olan bakır ince bağırsaklardan emilir, emilen bakır serum albüminine ve aminoasitlere gevşek bir şekilde bağlanarak tüm vücuda dağılır. Bakır-albümin bakır-histidin kompleksleri halinde karaciğere gelen bakır, parankim hücrelerinde seruloplazmin sentezinde kullanılır. Memeli plazmasındaki bakırın yaklaşık %90' ı bakır metalloproteini ve seruloplazmin formundadır (57, 58, 59).

Bakırla ilgili en ciddi zehirlenmeler oral yolla olmaktadır. Bakır, memelilerin dokularında birikebilen ve dokulardaki derişimi kritik değerlere ulaştığında toksik etkiler gösterebilen bir metaldir. Bu metale maruz kalındığında başta karaciğer ve böbrek olmak üzere, pek çok dokuda patolojik değişiklikler geliştiği bildirilmektedir (56). Akut bakır zehirlenmesi seyrek olarak gözlenir. Ağız yoluyla alındığında akut zehirlenme insanlarda LD50, (Lethal Dose: Öldürücü Doz) 100 mg/kg'dır, ancak 600 mg/kg'a kadar emilim olduğunda dahi tedavisi mümkündür. Bağırsaktan bakır emiliminde bir hata oluşursa "Menkes Sendromu" ortaya çıkar. Bu hastalıkta, plazmadaki bakır ve bakır oksidaz düzeyi düşüktür. Büyüme yavaşlar, vücut ısısı düşer, saçlar ağarır ve beyinde dejenerasyon meydana gelir. Bakır eksikliği kalp hastalığı riskini azaltır. Bağırsaktan bakır emilimi artarsa "Wilson Hastalığı" görülür. Bakır, beyin ve karaciğerde birikir. Normalde dışkıyla ve çok azı idrar ile atılır (60, 61). Bakırın fazlası ise zehirleyicidir. 15 mg'dan daha fazla elementel bakır yutulması halinde, bulantı, kusma, ishal, karın ağrısı, yaygın kas ağrıları gibi belirtiler ortaya çıkar. Zihinsel kusurlar ile koma ve ölüm de görülebilir(62).

Bakırın insan sağlığı üzerindeki etkilerinden dolayı tespiti oldukça önemlidir. Bu nedenle bakırın kantitatif tayini için yüksek duyarlıklı analitik tekniklere ihtiyaç vardır.

CİVA (Hg)

Cıva, atom numarası 80 olan kimyasal bileşendir. Element; hava, su ve toprakta birkaç şekilde bulunur. Bunlar, elementel cıva, inorganik ve organik cıva bileşikleridir. Yer kabuğunda ortalama 0,08 ppm oranında bulunan cıva deniz suyunda 3×10^{-5} ppm civarında bulunmaktadır. Doğal cıva içeriği havada 0,005–0,06 ng/m³; bitkilerde 0,001–0,3 µg/g seviyelerindedir. Endüstride, gerek metalik gerekse organik ve inorganik cıva bileşikler olarak termometrelerde, bazı metallerin üretim süreçlerinde, ilaç sanayinde, diş tedavilerinde dolgu malzemesi olarak, laboratuvar uygulamalarında, boya sanayinde ve kâğıt sanayinde kullanılmaktadır. Ancak yarattığı riskler nedeniyle kullanım alanları giderek daralmaktadır. Fosil yakıtların yanması, madencilik sektöründe cıva içeren kayaçların kırılması, cıva üretimi esnasında ve katı atık depolarından sızma, atık pillerin rastgele atılması, diş hekimliğinde kullanılan amalgam dolgular ve evde kullanılan cıva içeren aletlerin kırılması cıvanın çevreye yayılması ile sonuçlanmaktadır.

Bir diğer önemli kirletici metilcıvadır. Suyu karışan cıvanın bakteriler ve organizmalar sonucu metilcıva'ya çevrilmesi ile oluşur. Planktonlar, onları yiyen küçük balıklar ve midyeler ile küçük balıklarla beslenen büyük balıklar ile besin zincirine karışır. Cıvanın üç ayrı kimyasal formu bulunmaktadır. Cıva buharı, tuzları ve organik cıva bileşikleridir.

Cıva tuzları iki farklı oksidasyon durumunda bulunurlar: tek değerlikli cıva tuzları ve iki değerlikli cıva tuzları olarak. Cıva klorür (Hg₂Cl₂) veya kalomel en iyi bilinen cıvalı bileşiktir. Bu formları daha önce çeşitli ilaç sektörlerinde kullanılmıştır. Ancak günümüzde bu durum değişmiştir. İki değerlikli cıva tuzları yaygın olarak kullanılmaktadır. Dünyanın birçok yerinde yer üstü sulara atılan atıklar çevre kirlilikleri ve bunlara bağlı salgınlar da gözlenmiştir. Cıva plastik, mantar ilacı, mikrop öldürücü üretimi gibi değişik alanlarda halen kullanılmaya devam etmektedir. Bugün kullanılan organik cıva bileşikler bir karbon

atomuyla tek bir kovalent bağı olan cıva içermektedir. Alkil cıva bu bileşikler içinde tehlikeli olanı, metilciva ise en sık görülenidir. Alkil cıva ve tuzları mantar ilacı olarak kullanılmış ve insanlarda toksik etkiye neden olmuştur. Cıva ile işlem görmüş tohumların bilinçsiz kullanımına bağlı zehirlenmeler Irak, Pakistan, Gana ve Guatemala'da gerçekleşmiştir.

Cıva zehirlenmesi bulguları karşımıza akut ya da kronik etkileşime bağlı olarak ya da elemental, organik veya inorganik cıva formuna bağlı olarak farklı tablolar çıkarmaktadır. Akut etkilenimde saatler içinde güçsüzlük, ürperme, metalik tat, bulantı, kusma, ishal, solunum güçlüğüne göğüs sıkışması görülebilir. Akciğer toksisitesi sonucu intersitisyel pnömoni ve buna bağlı da kalıcı hasar oluşabilir. Kronik etkilenimde ise daha yavaş gelişen bir tablo gözlenir. Bunun dışında psikolojik semptomlar, unutkanlık, sabırsızlık, vazomotor rahatsızlıklar, şiddetli tükürük salgılaması ve gingivitis görülmektedir. Minamata hastalığında olduğu gibi cıva ile ilgili etkilenimlerin çoğu metilciva ile ilgilidir. Metilciva zehirlenmesi ağırlıklı olarak nörolojiktir. Bunun dışında anne karnında bebeği etkilediğinden teratojenik etkileri de bulunmaktadır (63, 21, 22, 23, 64).

Cıvanın sağlık üzerine etkileri ağırlıklı olarak insan faaliyetlerine bağlıdır. Tablo 2'de farklı cıva formlarına bağlı olan risk altındaki mesleklerin dağılımı görülmektedir. Dolayısıyla bu meslek gruplarında çalışan insanların cıva zehirlenmesi yönünden özellikle takip edilmesi gerekmektedir.

Son zamanlarda dünyada geniş kapsamlı cıva zehirlenmesi atağı olmasa da dünya genelinde gebelerde hala maruziyet açısından risk artışı mevcuttur. Cıva, ekosisteme endüstriyel kirlilik yoluyla girer önce yüzeyel sulara, oradan da okyanuslara ulaşır. Özellikle, orkinos gibi büyük balıklar cıvayı emer ve depolar veya küçük balıkları ve su canlılarını yerken almış olurlar. Bu

balıkları yiyen kadınlar civayı sindirirler, metil civa barsak florasınca inorganik civaya metabolize edilir ve demetilasyon veya dışkıyla atılır. İşlem temizlenme süresi 45-70 gün olacak kadar yavaştır. Gebelik sırasında yüksek miktarda kontamine balık yenmesi fetüsü güvensiz düzeyde civaya maruz bırakabileceği için gebelerin köpek balığı, kılıç balığı, kral uskumru yememeleri önerilmektedir.

Metallikciva	İnorganikciva Tuzları	Organikciva Bileşikleri
Amalgam üreticileri ve diş hekimleri	Dezenfektan üreticileri	Bakteriyosit üreticileri
Barometre, manometre, termometre üreticileri	Boya sanayi işçileri	İlaç üreticileri
Civalı pil üreticileri	Mürekkep üreticileri	Mumyacılık yapanlar Fungusit üreticileri
Boiler kazan yapıcıları	Kimya laboratuvar işçileri	Histoloji teknisyenleri
Bronz işinde çalışanlar	Vinil klorid işçileri	Pestisid üreticileri
Kalibrasyon aygıtı yapanlar	Kürkçülükte çalışan işçiler	Tohum ayıran işçi ve çiftçiler
Kostik soba üreticileri	Patlayıcı üreticileri	Ağaç kaplama sanayi işçileri
Karbon fırçası üreticileri	Deri tabaklama işçileri	
Seramik işçileri	Çatapat üreticileri	
Klor üreticileri		
Direkt akım ölçme işçileri		
Elektrik ve elektronik aygıt üreticileri		
Altın ve gümüş ayırıcıları, kuyumcu işçileri		
Floresens, neon ya dacıvalı lamba üreticileri		
Civa rafine işçileri		
Kâğıt hamur işçileri		
Fotoğraf malzemesi işçileri		

Tablo 3.Cıva zehirlenmesi riski taşıyan meslek grupları.

Alüminyum (Al)

Yerkabuğunun yaklaşık yüzde 8'ini oluşturan alüminyum son derece önemli bir metaldir. Başlıca kompleks alüminyum silikatlar halinde bulunur. Buradan saf alüminyum elde etmek çok da mümkün değildir. Doğal olarak, bir alüminyum oksit olan boksit ($Al_2O_3 \cdot xH_2O$) yatakları bulunur. Buradan elektrolitik indirgenme ile saf alüminyum elde edilir.

Alüminyum ve tuzları metalürji (mekanik konstrüksiyon, ambalaj, ısı iletkeni vb.) endüstrisinde, tabakçılıkta, kumaş boyacılığında, sertsuların yumuşatılmasında kullanılmaktadır. Parlaticı maddelerin, eramiklerin, ilaçların, kozmetiklerin, patlayıcıların, mürekkeplerin, çimentonun, fitosaniter maddelerin içeriğinde bulunur. Alüminyuma bağlı çevresel etkileşimin çoğu kronik ve içme sularına bağlı olarak görülmektedir. Alüminyumun ambalajlamadaki çeşitli kullanım alanları Tablo 4'te gösterilmiştir.

Alüminyum temel vücuda giriş yolu sindirim sistemidir. Su ise alüminyum en fazla taşıma potansiyeline sahip etkindir. Sindirim sisteminden direk kana geçen alüminyum miktarı % 1'den azdır. Alüminyum normal yollarla sindirim sisteminden alındıktan sonra serumda çok az miktarlarda bulunmaktadır (1-2 $\mu g/L$). Alüminyumun büyük bir kısmı kemik ve akciğer olmak üzere çeşitli dokularda depolanmaktadır. Normal sağlıklı insanlarda alüminyum böbrek yolu ile vücut dışına atılmaktadır. Kronik böbrek yetmezliği olan diyaliz hastalarında serum alüminyum seviyesi 30 $\mu g/L$ seviyesine çıkabilmektedir (21, 65, 66, 67).

Alüminyumun bugüne kadar saptanan en önemli etkisi sinir sistemi üzerinedir. Dünyanın farklı bölgelerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda ise içme sularındaki alüminyum seviyesi ile Alzheimer hastalığı, demans veya kognitif hasarlanma arasında ilişki saptanmıştır. Post-mortem çalışmalarda Alzheimer demansı, Amyotrofik lateral skleroz ve Parkinson gibi hastalıklarda beyinde Al miktarının artmış olduğu gözlenmiştir (21, 65, 66, 67).

Ürün Tipi	Uygulama Örnekleri	Al kalınlığı (µm)	Al içeriği (%)
Kaplanmamış Al	Ev folyosu, çikolata ve şekerlemelerde	10-25	100
Kutular	İçecek kutuları (Meşrubatlar, bira, meyve suyu) Gıda kutuları (balık, bezelye vb.) Evcil hayvan yiyecek kutuları Kimyasal ve teknik ürünler (tutkal, yağ, vb) Aerosol kutuları (kozmetikler, boya, vernik vb.)	Gövde:310 Kapak:260 70-250	96 85-95
Hafif konteynerler	Pasta tabakları, menü tepsipleri, servis tabakları veya düz büyük tabaklar	50-160	>95
Tüpler	Gıda (hardal, mayonez vb.) Eczacılık (merhemler vb.) Teknik (tutkal, boya vb.)	70-140 400-700	>95
Laklı/kaplı folyolar	Yoğurt, lor peyniri vb. veya kozmetikler için laklı kapaklar, kurutulmuş gıdalar	20-50	80-95
Al folyo/İnce kağıt tabakalar	Tereyağı ambalajları, sigara ve çikolata folyosu, sabun ambalajı Kurutulmuş gıdalar, eczacılığa ait blister ambalaj	9-15 20-50	15-65 65-80
Al folyo Polimer ince tabakalar	Vakumlu ambalaj (kahve, çay vb.) İçecekler ve kurutulmuş gıdalar için torbalar Menü konteyneri Meyve suyu ve süt ambalajı	7-20 30-50 6-25	15-35 35-75 4-30

Tablo 4:Alüminyumun ambalajlamadaki çeşitli kullanım alanları

Alüminyumun makromoleküler biyolojik yapılardaki etkilerinin başında oksijen donörleri için olan çekiciliği gelir. Alüminyumun bağlandığı en önemli moleküller; fosfat, karboksilat, catecholate, aminler, tiolatlar, aminoasitler, nükleik asitler ve nükleotidlerdir. Alüminyum; özellikle AMP, ADP, ATP, 2,3-difosfogliserat, inozitol fosfat, glukoz 6-fosfat gibi metabolizmada önemli olan fosfat bağlı biyomolekülleri etkileyebilmektedir. Birçok biyolojik oluşumda ATP ile Mg²⁺ ile olduğundan daha stabil bir kompleks oluşturarak magnezyumun yerini geri dönüşümsüz olarak alabilmektedir. (68)

Yüksek miktarda alüminyum içeren diyet, merkezi sinir sisteminde alüminyum konsantrasyonunu artırmaktadır (69). Alüminyum, hücrede yüksek konsantrasyonda iken fosforilasyonu baskılayabilmekte, eser elementler olan manganez ve demirin konsantrasyonunu değiştirebilmekte ve orada lipid peroksidasyonunun oluşmasına neden

olabilmektedir. Ayrıca Ca^{2+} ATPaz'ın aktivitesini doza bağımlı olarak azaltıp, intrasellüler kalsiyum hareketini bozabilmektedir. Ayrıca, aminolevulinik asit-dehidrataz ve izositrat dehidrogenaz enzimlerini inhibe edebilmekte, $Na^{+}-K^{+}$ ATPaz ve Mg^{2+} aktivitesini azaltabilmektedir. Alüminyum tuzları da DNA ve RNA'ya bağlanarak heksokinaz, asit ve alkalin fosfataz, fosfodiesteraz ve fosfooksidaz gibi enzimleri inhibe edebilmektedir (70,68). Alüminyumun intravenöz tedavide kullanılan ve özellikle total parenteral beslenme solüsyonlarının bileşenlerinden olan kalsiyuma, ilave maddeler olarak kullanılan fosfat tuzlarına, heparin ve insan albüminine de afinitesi fazladır (71).

Büyük bir kısmı kemik ve akciğer olmak üzere çeşitli dokularda depolanan alüminyumun, sağlıklı insanlarda günde yaklaşık 10-40 mikrogram kadarı böbrek yolu ile atılmaktadır. Alınan miktar arttığında, böbrekten atılım miktarı günde 200-500 mikrograma kadar çıkabilmektedir. Böbreklerden alüminyum atılımı total vücut alüminyumunu dengelemektedir. Ayrıca safra yoluyla da alüminyum atılabilmektedir (72,73).

Günümüzde insan sağlığı ile ilişkisi gittikçe önem kazanan alüminyum genellikle zararsız bir bileşen olarak bilinmektedir; fakat yine de yüksek derişimlerine ya da düşük dozlarına uzun süreli maruz kalındığında sağlık sorunlarına neden olabilmektedir. Bu yüzden vücuda fazla alüminyum alınması sakıncalıdır. Yaşamın her safhasında ve birçok alanda karşılaşılabileceğimiz alüminyumun insan vücuduna etkisi; gastrointestinal, hematolojik, iskelet sistemine ve sinir sistemine etkiler şeklinde sıralanabilir(74, 71, 75).

Al'un beyin hücrelerindeki reaktif molekülleri hareketsizleştiren önemli bir cross-linking ajan olduğu bilinmektedir. Bunun yanında nöronlardaki serbest radikal patolojisini etkilemektedir, nörofibril düğümlerine neden olmaktadır. Alzheimerli beyin otopsilerinde bu değişimler görülmektedir (76).

Al, kolin ve dopamin yapımının güçlü bir inhibitörüdür. Bunlar, sinir impuls transmisyonda, kaslara ve değişik bezlere sinir impuls iletiminde önemli mediatörlerdir. Bu etki sonucunda beyindeki Al iyonları kısa süreli hafızaya ve düşünmeye etki etmektedir (76).

Yakın zamanda gençler üzerinde tutkal koklayıcılığının büyük bir problem olduğu göz önüne alınarak bir araştırma yapılmış ve deneye katılan tutkal koklayıcısı adölesanların serumlarındaki Al seviyelerinin sağlıklı adölesanlarınkine göre anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (77).

Alüminyumun diğer bir sistemik etkisi, hematolojik sisteme olan etkisidir. Gelişmekte olan civcivlerde Al alınımlı karaciğer ve bağırsaklarda demir depolarını azaltmış, dokularda ferritin düzeyleri daha fazla olmak üzere nonhem demir düzeylerinde azalmaya ve sonuçta anemiye yol açmıştır. Yine döllenmiş Ross cinsi besi tavuk yumurtalarına kuluçka döneminde verilen alüminyum sülfatın civciv karaciğerinde yaygın inflamatuvar ve oksidatif hasara yol açtığı bildirilmiştir (78).

Sonuç olarak alüminyumun sürekli alımıyla; beyin hücrelerinde birikiminin ciddi beyin rahatsızlıklarına neden olduğu, uzun süreli alüminyum içeren antiasit kullanımı sonucu kemiklerde birikmesiyle kemikleşmeye engel olduğu, hemoglobin sentezini inhibe ettiği, devamlı diyaliz tedavisi gören hastaların çoğunda mortalite için risk faktörü olması dahil bazı ciddi rahatsızlıklara neden olduğu saptanmıştır. Bunlar; Alzheimer hastalığı, Parkinsonhastalığı, amiotrofik lateral sklerozis, diyaliz demansı, diyaliz osteomalizisi, mikrositer anemi, eritropoietin tedavisine direnç ve adinamik kemik hastalığıdır(79, 71,70, 80, 68, 73).

2.5. Ağır Metallerin Plasentaya Geçiş Mekanizmaları

Dünya çapında artan endüstriyel kirlilik gerek suni gerekse doğal yanma aktivitelerinin sonucu olarak ortaya çıkmakta ve istemli ya da istemsiz şekilde birçok kaynaktan ağır metal, organik hidrokarbon, pestisid maruziyetinde kalmaktayız.

Toplum sağlığını tehdit eden bu kirlenici potansiyel artan şekilde devam etmektedir ve özellikle fetal gelişim periyodu dönemi bu açıdan çok önemlidir (81).

Prenatal yaşam; yüksek oranda fetal hücresel bölünme ve farklılaşmanın olması bu dönem insan gelişimi için en hassas evredir. Bu nedenden dolayı fetus ve yenidoğan üzerine olan toksik etkileri oldukça büyük bir ilgi görmüştür. Erişkin ile karşılaştırıldığında birçok biyokimyasal yolda farklılıklar olduğu bilinmektedir, özellikle çok düşük düzeyler belki anneyi etkilemese de fetus bu dönemde teratojenlere hassastır (82).

Bu durum ileri yaşam süresinde kronik hastalıklar için zemin hazırlayabilir (83). Maruziyetin olduğu dönemdeki fetal gelişim evresi maruziyetin sonuçları açısından önemlidir. Eğer ki maruziyet organogenezis döneminde meydana gelirse organlarda kalıcı yapısal bozukluklara yol açabilir. Maruziyet organogenezis döneminden sonra olursa fonksiyonel bozukluklara yol açabilir. İmmün, respiratuar ve santral sinir sistemi doğum sonrası maruziyete karşı savunmasızdır, çünkü doğumdan sonra immatür olan bu sistemlerin postnatal maturasyonu uzun bir periyodu içerir (84).

Bundan dolayı toksikokinetik olaylardaki çeşitlilik erişkinlerle karşılaştırıldığında özellikle hepatik ksenobiyotiklerle renal fonksiyon arasındaki ilişki, bu maddelere karşı duyarlılığı artırmaktadır (85).

Gebelik sonuçları üzerine tehdit oluşturmaları ve düşük dozlarda bile olumsuz sonuçlara yol açmasından dolayı çoğu uluslararası kılavuz tarafından artan bir endişe olarak izlenmektedir. Çevresel maruziyetin gebelik sonuçları üzerine olumsuz etkisi için bir eşik değeri alınmaması ve en mantıklı yaklaşımın çevresel maruziyeti tüm bireyler üzerinde azaltmak olmalıdır (86, 87).

Ağır metal fetusa geçişi transplental transfer ile olmaktadır. Gebelik boyunca plasenta besin, oksijen geçişine karşı selektif bir bariyer oluşturmakta toksik komponentlerin geçişini önlemektedir. Birçok çalışmada in vivo veya invitro plasental modellerde çevresel maruziyetin fetal gelişim üzerine olan etkisi araştırılmıştır (88,89).

Normal trofoblastik fonksiyon implantasyon, hormon üretimi, selektifmaterno -fetal bariyer oluşumu, uygun fetal gelişim için fetoplasental ünitenin kurulması ve bakımını içerir (90). Maternal sitotoksik ajan maruziyeti bu hücrelerin destrüksiyonuna, özellikle son evre olarak farklılaşmış sinsiyo trofoblastlara, etki ederek sayısız şekilde kötü gebelik sonuçlarına neden olur. Bu sonuçlar intrauterin gelişme geriliğinden malformasyonlara, spontan abortuslara ve erken doğuma kadar uzanabilir (90).

Bilinen çevresel maruziyetler sigara içilmesi, hava kirliliği, kurşun ve diğer ağır metaller fetal gelişimi etkilerler. Plasenta çoğu toksik metalin fetusa geçmesini önlemek için bir bariyer olsa da (cd) bazı maddeler için önleyici olamamaktadır (Pb, Hg, Al, Cu) Aynı zamanda bazı toksik metallerin plasentadaki akümülyasyonu anormal plasental fonksiyona yol açarak besin transportunu bozar.

Daha sonraları intrauterin gelişme geriliğinde izlenen bazı geçikmiş büyüme paternlerine neden olur. Diğer taraftan gebelik mitokondrik plasentadan dolayı oksidatif strese yol açar, bu durum metal veya non metal toksikanların varlığı ile gelişir. Gebelikte kurşun, arsenik, kadmiyum maruziyetine bağlı oksidatif hasar indüklenir.

Ağır metal maruziyeti besin zinciri, içme suyu ve hava yoluyla olabilmektedir. Metabolizma ve toksik etkiler ise metalin türü, maruziyet süresi ve periyoduna, fizyolojik ve nutrisyonel duruma bağlı olarak değişiklik göstermektedir (91).

Civa ve kurşun glutatyon ve protein bağlı sülfidril gruplarını tüketerek süperoksit iyonlar, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen radikallerinde artışa neden olur (92). Kan beyin bariyeri ve plasenta fetusa kurşun ve civa geçmesini önleyemez, altta yatan mekanizma hala anlaşılamamıştır (93,94). Fetal beyin hızlı gelişmenin merkezidir, bu nedenle prenatal yaşam boyunca maruz kalınan minör çevresel etki bile ileriki yaşam için kognitif fonksiyonlarda bozukluklara yol açabilir.

Gebelik ek olarak kurşun maruziyetine ortam oluşturur, kemiklerde depolanmış kurşunun serbestleşerek potansiyel endojen kaynak olması ile artan kurşun düzeylerine katkıda bulunur (95,96). Aynı zamanda prenatal yaşam boyunca kurşunun vücuttan atılımı yeterli değildir ve bu da kan kurşun düzeyinde artışa büyük katkıda bulunur (97). Böylece artmış kan kurşun düzeyi serbestçe plasentayı geçerek fetusta birikir. Sonuç olarak, fetusun toksik etkenlere karşı duyarlı çevresinden dolayı, kurşun nöral hücrelerde irreversible etkilere neden olur (98).

Plasentada biriken ve plasenta yoluyla transfer olan metallerin miktarları farklıdır. Kord kanındaki civa oranı maternal kandakinden genellikle daha yüksek bulunur. Metaanalizlerde gösterildiği üzere kord civa oranları maternal kan civa oranlarından neredeyse iki kat fazladır. Bu bulgu maternal kana oranla daha yüksek hemoglobin, hematokrit ve plazma albümin değerlerinden dolayı olabilir fakat daha çok civanın aktif transport ile fetusa geçmesinden kaynaklanır (99).

Kord kanı kurşun düzeyleri ise maternal kan düzeyi ile eşit ya da daha düşük saptanır (100). Kimyasal bileşikler plasentayı çeşitli mekanizmalarla geçerler. Bu geçiş maternofetal ve

fetomaternal transfer ayırıcı membranların kalınlığına bağlıdır. Erken gebelik boyunca, materno-fetal difüzyon aralığı 28-38 µm iken gebelik sonunda minimal difüzyon aralığı 4µm'dir. Kolaylaştırılmış ve aktif transportun yanısıra veziküler transport da plasental bariyerin tabaka sayısından etkilenir (101). İnsan plasentasında bu bariyer intervilloz aralık ve villöz yüzeyleri saransinsityotrofolat tabakasından oluşur, bu başlangıçta (ilk trimester) komplettir fakat daha sonra (ikinci ve üçüncü trimester) fetal endotelial hücreler gibi aralıktır vesitotroblastik tabaka hakimdir.

Ekstravillöz trofolast invazyonu ve spiral arter remodelinginden dolayı, intervillöz aralıktaki gerçek maternal kan akımı 12. haftadan sonra düzenlenir(100,102).

Kurşun ve cıvanın plasental toksikokinetiği az bilinmekle birlikte kurşunun plasental hücrelere pasif difüzyon aracılığı ile iken, cıvanın kimyasal formu ise kendi hücrel uptake'ni belirler. Buhar halindeki cıva pasif difüzyon ile taşınırken, metil cıva ise aminoasit yapıdaki taşıyıcılar ile aktif transportla taşınır ve kolaylıkla plasentayı geçerler.

İnorganik cıva ise plasental dokuda hapsolür (103,104). Divalan metal transporter 1 (dmtp 1) ise kurşun ve kadmiyumun intestinal alımından sorumludur aynı zamanda bu metallerin plasental alımında da rol alır. DMTP 1 in asıl fonksiyonu demir alımıdır. Bu taşıyıcı gebelik boyunca plasentada bolca eksprese edilir (105). Metalloproteinin intrasellüler metal bağlanmasında en önemli role sahip proteindir. Büyük oranda sistein içerir. Bu da yüksek oranda metal bağlama özelliğini verir. İnsan plasentasında mt hem fetal amniotik hücrelerde, maternal desidual hücrelerde hemde sinsityotrofolast ve villöz intertisyel hücrelerde bulunur. Kurşun, cıva ve kadmiyum plasentada mt sentezini indükler (106).

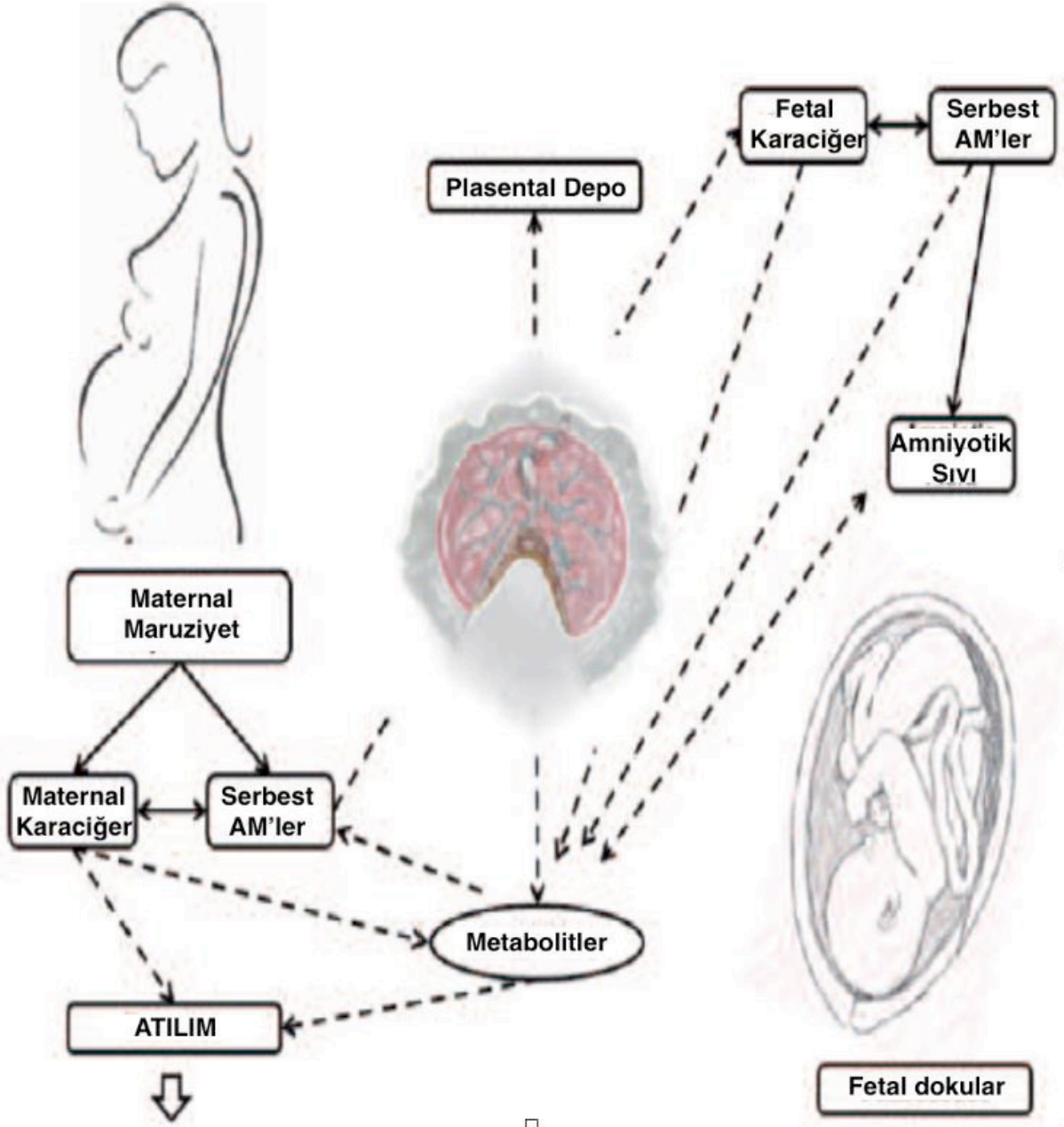
Hala kurşun, cıva, kadmiyum için plasental alım mekanizması net değildir. Deneysel olarak metallerin ABC ailesine ait MRP1, MRP2 VE P-glikoprotein gibi taşıyıcılara sahip glutatyon kompleksine bağlanarak plasentayı geçtiği vurgulanmıştır (107). Bunun yanında ratlarda

organik anyon transportu yapan protein taşıyıcılarolduğu saptanmıştır, insan plasentasındaki metal transportunda rol alabilirler (108). Civa plasentada aminosit taşınmasını, plasental oksijen tüketimini, enzimlerin aktivitesini, hormon sekresyonunu ve membran akışkanlığını bozarak toksisitesini gösterir. Kurşun sinsityotrofoblastlara kalsiyum alımını engeller. Term bir plasentada kurşun temel olarak sinsityotrofoblastlarda depolanır, sitokrom oksidaz aktivitesini azaltır (100).

Özetle gebeliğin ilk 2 ayında fetal dokular serbest oksijen radikallerine karşı minimum korumaya sahiptirler. Bu nedenle gebeliğin erken döneminde özellikle fetal dokular maruziyete açıktır (109). Glutasyon transferazlar glutasyon molekülü ile civa gibi elektrofil maddeler arasındaki konjugasyon reaksiyonlarını kataliz ederler. Glutasyon transferazların aktivitesi erken gebelikte başlayarak gebelik ortasına doğru artışı diğer GSH bağımlıenzimlerin aktivitesine bağlıdır (110).

MT sadece metal homeostaziste görev almazlar bunun yanı sıra antioksidan özelliklere de sahiptirler. MT oksidatif stresin indüklediği bazı trofoblastik fonksiyonları düzeltmez fakat ciddi oksidatif hasarın indüklediği apoptozisten korunmak için kritik role sahiptir. MT bu yüzden trofoblastik hücreler için apoptozisten koruyucudur (111).

MRP1 ve MRP2 ekspresyonu ise ilerleyen gebelik haftası ile artar. Plasentalbariyerdeki lokalizasyonlarına bağlı olarak MRP'ler fetal ksenobiyotik maruziyetiniarttırıp azaltabilirler (112).



Şekil 2: Ağır metallerin plasenta aracılığı ile maternal dolaşım ve fetüs arasındaki etkileşimi

2.6. DNA Metilasyonu ve Hastalıklar

DNA metilasyonu; embriyonik gelişim, transkripsiyon, kromatin yapısının düzenlenmesi, X kromozomu inaktivasyonu, genomik “*imprinting*” ve kromozom stabilitesinin sağlanması gibi birçok hücresel süreçte rol oynayan önemli bir epigenetik mekanizmadır. Metilasyonun bu tip kritik süreçlerde rol alması, onun çok iyi bir şekilde kontrol edilmesini gerektirmektedir.

Birçok hastalığın temelinde, epigenetik kontrol sisteminin düzgün bir şekilde çalışmaması yatmaktadır. Epigenetik modifikasyonlar düzgün bir şekilde kurulamazsa da devam ettirilemezse, bu süreçle ilgili patolojik sonuçlar ortaya çıkabilmektedir (5,6). Anormal DNA metilasyon modelleri ile ilişkili beş grup hastalık bulunmaktadır. Bunlar; “*imprinting*” hastalıklar, üçlü tekrar hastalıkları, mekanizma ile direkt ilişkili hastalıklar, kanser ve inflamatuvar hastalıklardır (5). (Tablo 1)

İmprinting hastalıklar

Genetik materyalin anneden ya da babadan kalıtılmasına bağlı olarak farklı ve mono allelik ifade oluşumuna genomik imprinting denir. Yoğun CpG adacıklarına sahip “imprinted” genlerin en önemli özelliği, farklı allellere özgü olarak metilasyon paterni göstermeleridir. Bu genlerin ifadesi imprinting kontrol bölgeleri (IKB) tarafından düzenlenmektedir(113,114). Bu hastalık grubunun en karakteristik örnekleri Prader-Willi ve Angelman sendromlarıdır. Paternal kromozomdaki Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N(SNRPN) geninin promotörü ve IKB delesyonu Prader-Willisendromuna yol açmaktadır. Delesyon sonucu imprinting mekanizması kontrol edilemez ve farklı metilasyon durumları ortaya çıkar. Monoallelik paternal ifade göstermesi gereken bir seri gen metillenir ve baskılanır (115,116).

15. kromozomun maternal alelinde dokuya özgül monoallelik ifade göstermesi gereken Ubiquitin-protein ligase E3A (UBE3A) geni bulunur. Aynı şekilde, IKB’de bir delesyon sonucu imprinting mekanizması kontrol edilemez ve UBE3A geni baskılanır. Bu genin imprinting mekanizmasının bozulması sonucu, beyin hücrelerinde her iki alel de ifade edilmez ve Angelman sendromu meydana gelir (115,117).

Üçlü tekrar hastalıkları

DNA metilasyon mekanizmasındaki hatalar, birtakım tekrar hastalıklarıyla da ilişkilidir. Genomda bulunan tekrar dizileri belli bir sayıda bulunmalıdır. Bu sayının normalden fazla

tekrar ederek artması birçok patolojik durumu beraberinde getirmektedir (118). Bazı tekrar dizilerinin CG içeriğinin fazla olması, bu dizilerin metillenme potansiyelini arttırmaktadır. Normalde belli bir oranda bulunan tekrarların bir şekilde artmasıyla bu bölgeler metilasyon için hedef oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar, bu dizilerde saptanan yüksek metilasyon oranlarının hastalıklarla ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur. (5) Frajl X sendromu (FRAXA), kalıtsal zeka geriliği ile ilişkili X kromozomuna bağlı bir hastalıktır (119).

CGG tekrarlarının normalden fazla sayıya ulaşması, anormal metilasyon durumlarını ortaya çıkarabileceği düşünülmüştür. Yapılan araştırmalar sonucunda, hastaların 5'UTR bölgesindeki uzamış CGG tekrarlarında de novo metilasyon ve promotor bölge metilasyonu gözlenmiştir (120).

Mekanizma ile ilişkili hastalıklar

Bu grup hastalıklar, DNA metilasyon mekanizmasında rol oynayan genlerdeki mutasyonlar sonucu oluşan hastalıklardır. Bir otoimmün hastalık olan sistemik lupus eritematozus (SLE)'de immün sistem tarafından üretilen ve kişinin kendi proteinlerini hedef alan oto-antikor üretimi söz konusudur. T hücreleri tarafından sentezlenen oto-antikorlar, DNA, kromatin faktörleri, küçük ribonükleer proteinler gibi nükleer komponentleri hedef alır (121,122). T hücrelerinde oluşan DNAmetilasyonu ile ilişkili hataların oto-antikor üretimi cevabını oluşturduğu düşünülmektedir. Normalde T hücrelerinde SLE ile ilişkili genler metile durumdadır. SLE'li T hücrelerindeyse tüm genomun global olarak hipometilasyonu ve düşük DNMT1 seviyeleri söz konusudur. Ayrıca, SLE ile ilişkili CD11a ve CD70 genlerinin promotorlarında gerçekleşen demetilasyon ile bu genlerin ifadeleri artmaktadır (122,123).

İmmün yetmezliği, sentromerik kararsızlık ve yüz anomalilikleri (ICF) sendromu, çok nadir görülen otozomal resesif kalıtıma sahip bir immün yetmezliği hastalığıdır ve en az iki immunoglobulin izotipinin eksik olması veya önemli oranda azalması sonucu ortaya

çıkılmaktadır (124). Yapılan araştırmalar sonucu, ICF hastalarının %70'inde DNMT3B geni mutasyonlarının hatalı metilasyonlara yol açtığı görülmüştür. DNMT3B enziminin işlev bozukluğundan dolayı B hücrelerinde kromozom1, 16 ve 9'daki uydu bölgeleri, inaktif X kromozomundakigenlerin ve genomdaki diğer tekrar bölgeleri hipometileolmaktadır. Bu anormal hipometilasyon sonucuda gen ifadesi paternleri bozulmaktadır (125,126).

	<i>Hastalık tipi</i>	<i>Kromozomal bölge</i>	<i>Etkilenen gen/ gen bölgeleri</i>	<i>DNA metilasyonu ile ilişkisi</i>
"İmprinting" Hastalıkları	Prader-Willi sendromu (PWS)	15q11.2	MKRN3, MAGEL2, NDN, SNURF1, SNRPN, IPW	Paternal alelde de novo metilasyon, IKB'de delesyon, paternal genlerde ifade kaybı
	Angelman sendromu (AS)	15q12	UBE3A, ATP10C	Maternal metilasyon kaybı, IKB'de delesyon, beyindeki maternal genlerde ifade kaybı
	Beckwith-Wiedemann sendromu (BWS)	11p15.5	IGF2, CDKN1C, H19, ASCL2, KCNQ1, KCNQ1OT1	Maternal metilasyon kaybı, maternal alelde de novo metilasyon, IKB'yi bozan translokasyonlar
Üçlü Tekrar Hastalıkları	Frajil X sendromu (FRAXA)	Xq27.3	FMR1	FMR1 5'UTR bölgesinde artan CGG tekrarları, promotorda de novo metilasyon
	Myotonik distrofi (DM1)	19q13.2-q13.3	DMPK, SIX5, diğerleri	DMPK 5' UTR bölgesinde artan CTG tekrarları
	Fasiyoskapulohumeral distrofi (FSHD)	4q35	FRG2, FRG1, SLC25A4 (ANT1)	D4Z4 tekrarlarında hipometilasyon
Mekanizma ile Direk İlişkili Hastalıklar	Sistemik lupus eritematozus (SLE)	Birçok	CD11a, CD70 ve birçok gen	T hücrelerinde global hipometilasyon ve azalan DNMT aktivitesi
	ICF sendromu	20q11.2	DNMT3B	DNMT3B mutasyonu
Kanser	Kolon kanseri	1q21.3	S100A4	Gene-özümlü hipometilasyon ve artan gen ifadesi
	Bütün kanser tipleri	3p22.2, 10q26.3, 9p21.3, 9q21.33, 16q22.1, 16q23.3, 11q13.2	MLH1, MGMT, CDKN2A, CDKN2B, DAPK1, CDH1, CDH13, GSTP1	Gene-özümlü hipermetilasyon ve azalan gen ifadeleri
İnflamatuvar Hastalıklar	Römatoid artrit (RA)	Birçok	Birçok	İnflamatuvar genlerde hipometilasyon ve hipermetilasyon
	Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA)	16p13	MEFV	MEFV geni 2. ekzonunda metilasyon ve azalan gen ifadesi

Tablo 5: DNA metilasyon mekanizması ile ilişkili hastalıklar

Kanser

DNA metilasyonu ve kanser ilişkisi ilk kez 1983 yılında yapılan bir çalışmada kanser hücre genomlarının normal hücrelere göre hipometile olduğunun bulunması ile ortaya konmuştur (127). Hipometilasyon ya da genomik metilasyon kaybı, kanserin erken evrelerinde sıkça

gerçekleşen, hastalık ciddiyetini etkileyen ve birçok tümör tipinde metastatik potansiyel oluşturan bir durumdur. Normal hücrelerde hipermetile olması gereken, tekrar bölgelerince zengin perisentrik heterokromatin bölgeler, kanser hücrelerinde hipometilasyona uğrayarak onkogenlerin ve metastaz ile ilişkili genlerin ifadesinin artmasına neden olmaktadır. Bu durum, mitotik rekombinasyon artışı ve genomik kararsızlık gibi tümör hücrelerini diğer hücrelerde nadir karakteristlik özelliklerin ortaya çıkmasını tetiklemektedir (128).

Kanser hücreleri üzerinde yapılan genom boyu demetilasyon çalışmaları, gene özgül hipermetilasyonun da genellikle hipometilasyon olayları ile birlikte gerçekleştiğini göstermiştir (129). Kanser hücrelerindeki anormal hipermetilasyonlar, normalde metillenmemiş halde bulunması gereken CpG adacıklarında gerçekleşmektedir. Normal hücrelerde tümör-baskılayıcı genlerin promotor bölgesindeki CpG'ler metillenmemiş durumda olması nedeniyle transkripsiyon olayı gerçekleşir. Ancak kanser hücrelerinde, bu tip genlerin CpG adacıklarında nedeni bilinmeyen bir şekilde oluşande novo metilasyon ya da hipermetilasyon durumları transkripsiyonel sessizleşmeye neden olmaktadır. Hücre döngüsü, DNA tamiri, kromatin remodelling, hücre sinyalizasyonu, transkripsiyon ve apoptozis gibi süreçlerde rol oynayan genler, hemen hemen tüm tümör tiplerinde anormal bir şekilde hipermetile olarak sessizleşmektedir. Bu durum, tümör hücrelerine büyüme avantajı sağlayarak genomik kararsızlıkta artışa neden olmaktadır (5). Costello ve arkadaşlarının tümör örnekleri üzerinde yaptığı çalışmada, kanser hücrelerinde CpG adacıklarının büyük oranda de novo metilasyon veya anormal hipermetilasyona uğradığı, metilasyon durumunun ve miktarının da tümör tiplerine göre değişim gösterdiği belirtilmiştir (130).

İnflamatuvar hastalıklar

Son yıllarda, özellikle hastalık mekanizması ve patogenezi tam olarak anlaşılabilen birtakım otoimmün ve otoinflamatuvar hastalıkların epigenetik incelemeleri hız kazanmıştır.

2012 yılında Kazuhisa ve arkadaşları romatoidartritli hastaların DNA metilasyon durumları araştırmıştır(131). Romatoid artrit, oynar eklemlerdeki inflamasyon ve hücre dışı matris tahribi ile tanımlanan otoimmün hastalıdır. Multifaktöryel bir mekanizmayla ortaya çıktığı düşünülse de kesin nedeni ortaya konamamıştır (132). Romatoid artrit hastalığında rol oynayan sinoviyal hücrelerin, hastalık durumundaki fenotipinin nasıl değişim gösterdiği bilinmemektedir. Farklı DNA metilasyon durumlarının sinoviyal hücrelerin gen ifadelerini ve dolayısıyla işlevini değiştirebileceği düşünülmüştür. Buradan yola çıkılarak, romatoid artritli hastalardan izole edilen sinoviyal hücrelerin DNA metilasyon durumları genom-boyu analizlerle incelenmiştir. Hastalar ve kontrollerin global metilasyon durumları arasında belirgin bir fark bulunamamasına rağmen daha sonra yapılan genom-boyu analizlerde, 1206 genin farklı metilasyon durumları gösterdiği bulunmuştur. Bu genlerin çoğu inflamatuvar hastalıklarda kritik rollere sahip olan genlerdir. Bu çalışmanın sonucunda, romatoid artritli sinoviyal hücrelerle kontrol sinoviyal hücreler DNA metilasyonu seviyesinde birbirlerinden ayrılabilmiştir. Ek olarak, hastalık durumunda sinoviyal hücrelerin nasıl değişime uğradığı ve bunun hastalık patogenezinin nasıl katkı sağladığının anlamaya katkı sağlayabilecek bir çalışma yapılmıştır (131). 2011 yılında Kireçtepe ve arkadaşları tarafından Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) hastalığına neden olan MEFV geninin 2. ekzonunun DNA metilasyon durumları incelenmiştir(133). AAA, doğal bağışıklık sisteminin belli aralıklarla ve neden bilinmeyen bir şekilde kontrolsüz inflamatuvar cevapoluşturması sonucu ortaya çıkan otoinflamatuvar bir hastalıktır(134). Bu çalışmada düşük MEFV ifade seviyelerinin AAA hastalığı ile ilişkili olduğu ve bu düşük ifadelerin metilasyondan kaynaklandığı hipotezi kurulmuştur. Sağlık lı kontroller ve hasta bireylerde MEFV geninin 2. Ekzonunun metilasyon durumları ve MEFV geni ifadesine bakılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, AAA hastalarında yüksek metilasyon oranları ve düşük MEFV ifadesi, sağlıklı kontrollerde ise düşük metilasyon oranları ve yüksek MEFV ifade seviyeleri elde edilmiştir (133). Kan dokusu, fonksiyonel ve

gelişimsel olarak farklı hücre populasyonları barındırmaktadır. Kan hücreleri, farklılaşma süreçlerinin enbaşında myeloid ve lenfoid kökenli hücreler olmak üzere birbirlerinden fizyolojik ve morfolojik olarak ayrılmaktadırlar(135). Yapılan çalışmalara göre, mononükleer hücrelerde ve granüositlerde 343 gen için %22 oranında farklı metilasyon durumları gözlenmiştir. Özellikle düzenleyici bölgelerdeki metilasyon durumları kan hücreleri arasında büyük farklar göstermektedir (136). AAA hastalığında yapılan bu metilasyon-ifade ilişkisi çalışmasında total periferik kan kullanılmıştır. Lökosit tipleri arasında MEFV ifadesi açısından büyük farklılıkların söz konusu olmasının yanında farklı hücre tiplerinde de farklı metilasyon durumları oluşmaktadır.

3. MATERYAL VE METOD

Örneklerin Seçimi, Çalışmanın Yeri ve Zamanı;

Çalışma prospektif olarak 1-30 Mart 2017 tarihinde bir üçüncü basamak üniversite hastanesinin Kadın Doğum Kliniğinde doğan 80 yenidoğanın, kordon kanında ağır metal düzeyi ve DNA metilasyon dağılımları değerlendirilerek yapıldı.

Bu çalışma için Maltepe Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alınmıştır (02.10.2016 tarih, 2016/900/54 sayılı karar) ve çalışma boyunca Helsinki Deklarasyonuna bağlı kalmıştır. Çalışmaya dahil edilen tüm yenidoğanların ailelerinden bilgilendirilmiş gönüllü olur izni yazılı olarak alındı.

Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri;

Çalışmaya dahil edilmesi planlanan olguların hepsi Sezeryan veya Normal doğumla doğan sağlıklı term bebeklerdi. Gebeler Fe ve vitamin takviyesi almakta idi.

Çalışmaya Dahil Edilmeme Kriterleri;

Herhangi bir doğumsal anomali tespit edilen bebekler, prematür bebekler, sigara kullanan Anneler

Kordon Kanı Örneklerinin Toplanması, Ağırmetal ve DNA Metilasyon Düzeylerinin Belirlenmesi;

Birçok çalışmada in utero maruziyet değerlendirilmesi umbilikal kan, maternal kan ve plasenta örneklemeyle yapılmıştır (140,141). Noninvaziv olarak plasentadan alınan kanın, birçok biomonitörize çalışmada periferal kandan alınan invaziv yöntemlere alternatif olarak kullanılması kabul etmiştir (142). Çalışmamızda, yenidoğandan alınacak periferik kandan daha non-invazif olması nedeniyle, kordon kanından örnek alınmıştır.

Doğumdan hemen sonra umbilikal venden 5cc kordon kanı toplandı. Toplanan kan örneği 3 tüpe (iki EDTalı tam kan tüpü ve bir eser element tüpü) ayrıştırıldı.

DNA metilasyonu ölçümü için EDTA' lı Tam kan tüpüne alınan numune santrifüj edilerek, plazma kısmı ayrıştırılarak sediment (presipitat) kısmı saklandı. Ağır metal düzeyi ölçümü için ayrıştırılan diğer iki numuneden biri EDTA'lı Tam kan tüpüne alınarak direk saklandı. Eser element tüpüne ayrıştırılan numune ise santrifüj edilerek serum kısmı , -80C'de tüm örnekler elde edilene kadar saklandı.

Alüminyum ve civa, indüktif olarak eşleştirilmiş plazma ve kütle spektrometresi (ICP MS) yöntemiyle Agilent 7500JP1201901 seri nolu cihazda; bakır Atomic absorption spectrometry (AAS) yöntemiyle SHİMADZU, AA6800 seri nolu cihazda, kurşun AAS yöntemiyle AGİLENT 7500,JP 1201901 seri nolu cihazda (Synlab, Ankara) çalışıldı.

DNA metilasyon düzeyleri; Thermo K182002 PureLink Genomic DNA Mini Kit/250 preps, Epigentec P-1034-96 MethylFlash Methylated DNA 5-MC Quantification Kit Colorimetric/96 assays, Epigentec P-1030-96 MethylFlash Global DNA Hydroxymethylation(5-hmc) ELİSA Easy Kit kullanılarak (Üsküdar Üniversitesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı, Üsküdar) çalışıldı.

İstatistiksel İncelemeler

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 (Kaysville, Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotlar (Ortalama, Standart Sapma, Medyan, Frekans, Oran, Minimum, Maksimum) kullanıldı. Normal dağılım gösteren üç ve üzeri grupların karşılaştırmalarında Oneway Anova Test, normal dağılım göstermeyen üç ve üzeri grupların karşılaştırmalarında ise Kruskal Wallis test

kullanıldı. Parametreler arası ilişkilerin değerlendirilmesinde de Spearman's Korelasyon Analizi kullanıldı. Anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.



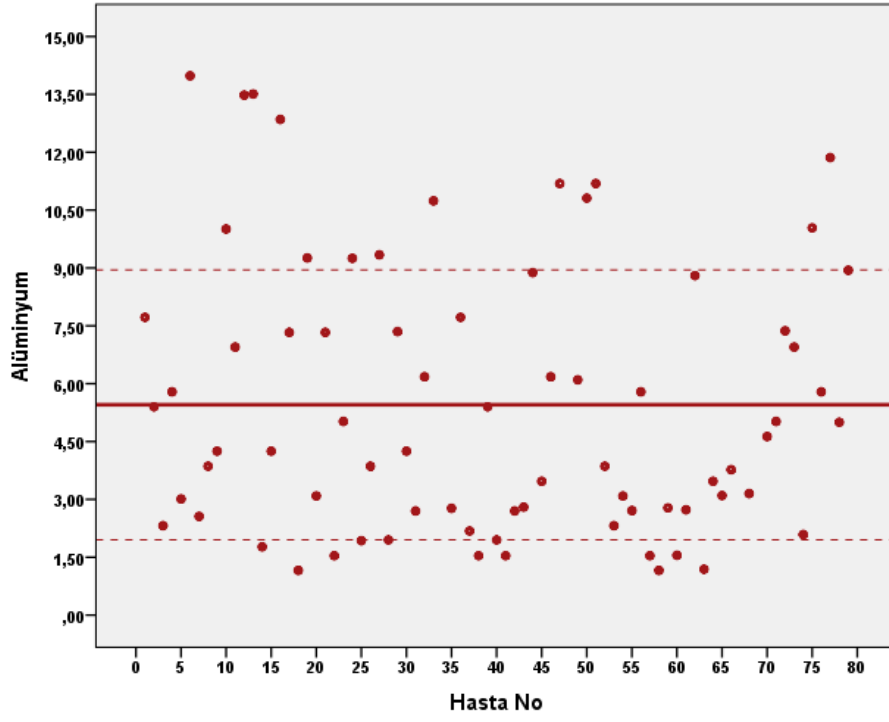
4. BULGULAR

Çalışmaya 80 hasta dahil edildi. 5 hasta DNA metilasyonu değerlendirilemediğinden dolayı çalışma dışında bırakıldı.

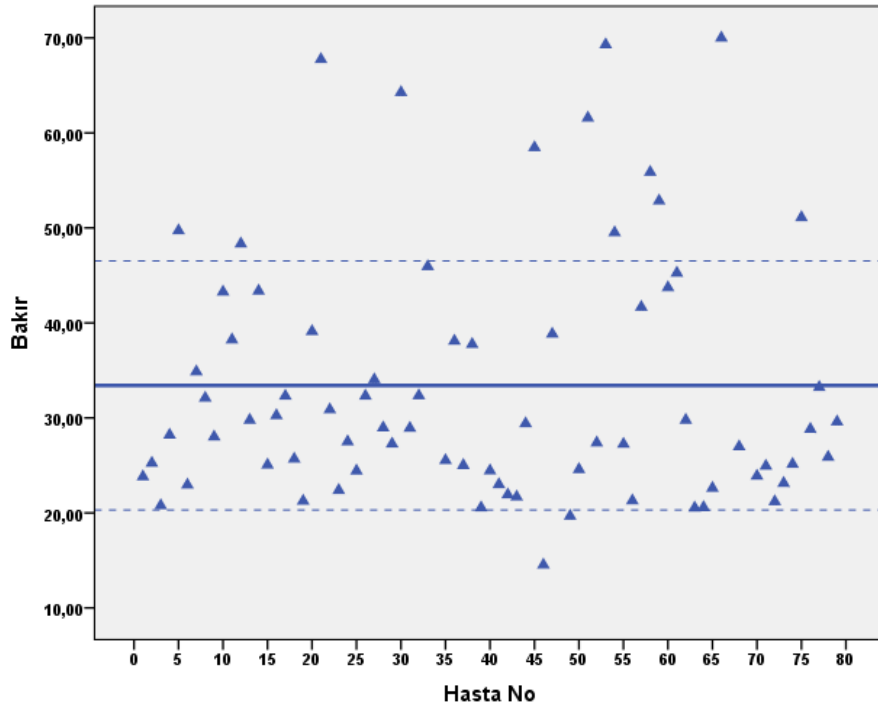
Hastaların alüminyum, bakır, kurşun ve civa ölçümlerinin genel dağılımı Tablo 1’de verilmiştir. Alüminyum ölçümleri 1,16 ile 13,98 µg/L arasında değişmekte olup, ortalama $5,45 \pm 3,50$ µg/L saptanmıştır (Şekil 1). Bakır ölçümleri 14,53 µg/dl ile 70 µg/dl arasında değişmekte olup, ortalama $33,41 \pm 13,11$ µg/dl saptanmıştır (Şekil 2). Kurşun ölçümleri 0,32 µg/dl ile 3,49 µg/dl arasında değişmekte olup, ortalama $1,35 \pm 0,50$ µg/dl saptanmıştır (Şekil 3). Civa ölçümleri 0,10 µg/L ile 1,65 µg/L arasında değişmekte olup, ortalama $0,50 \pm 0,32$ µg/L saptanmıştır (Şekil 4).

Tablo 6: Alüminyum, Bakır, Kurşun ve Civa Ölçümlerinin Genel Dağılımları

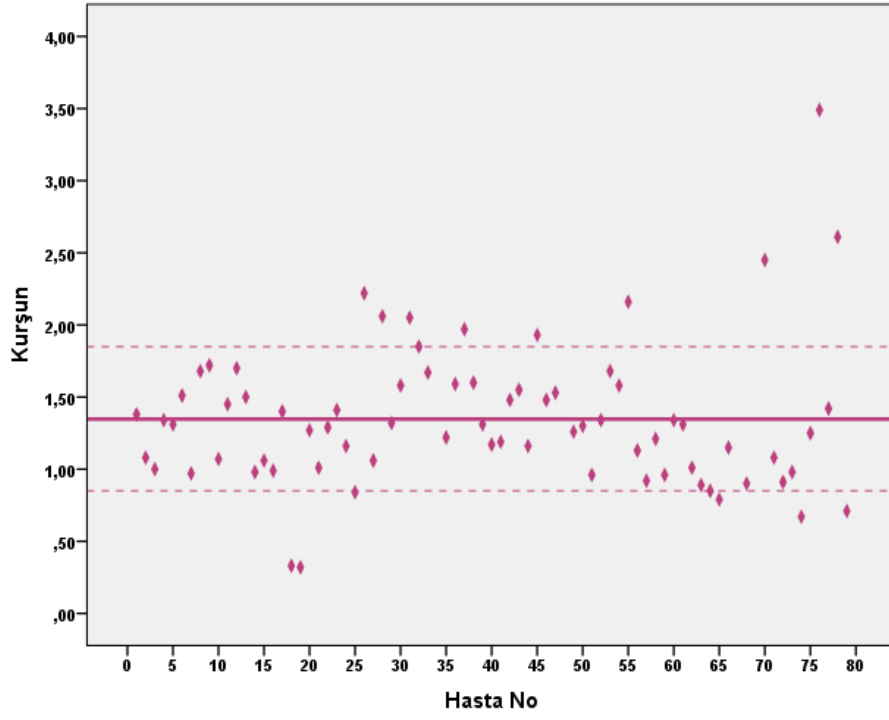
Alüminyum	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	1,16±13,98 (4,25)
	<i>Ort±Ss</i>	5,45±3,50
Bakır	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	14,53±70 (28,94)
	<i>Ort±Ss</i>	33,41±13,11
Kurşun	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	0,32±3,49 (1,30)
	<i>Ort±Ss</i>	1,35±0,50
Civa	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	0,10±1,65 (0,41)
	<i>Ort±Ss</i>	0,50±0,32



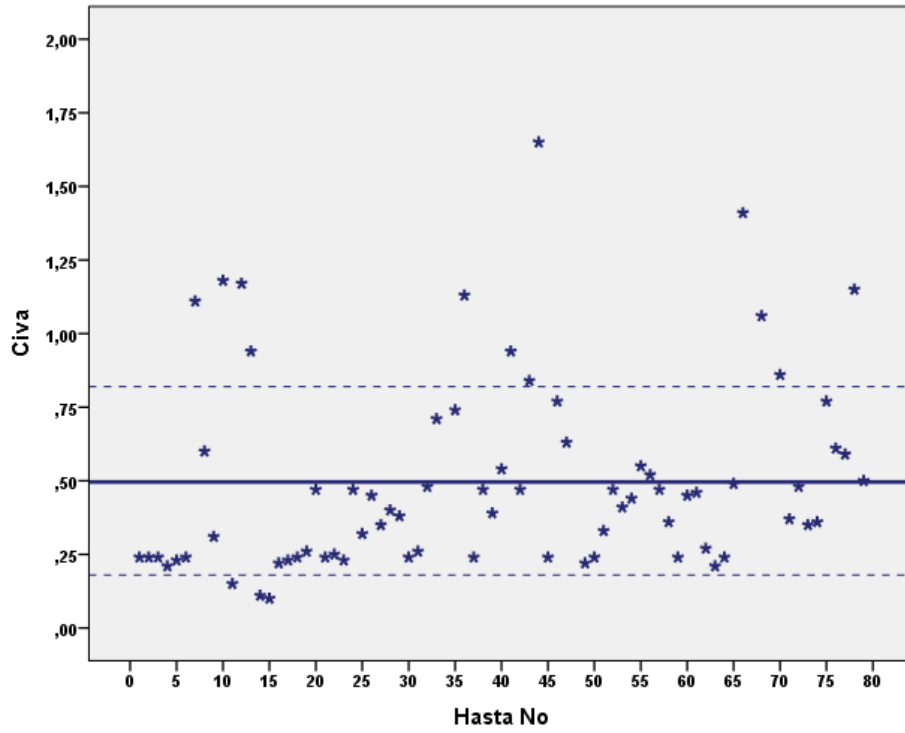
Şekil 3: Alüminyum ölçümlerinin dağılımları



Şekil 4: Bakır ölçümlerinin dağılımları



Şekil 5: Kurşun ölçümlerinin dağılımları

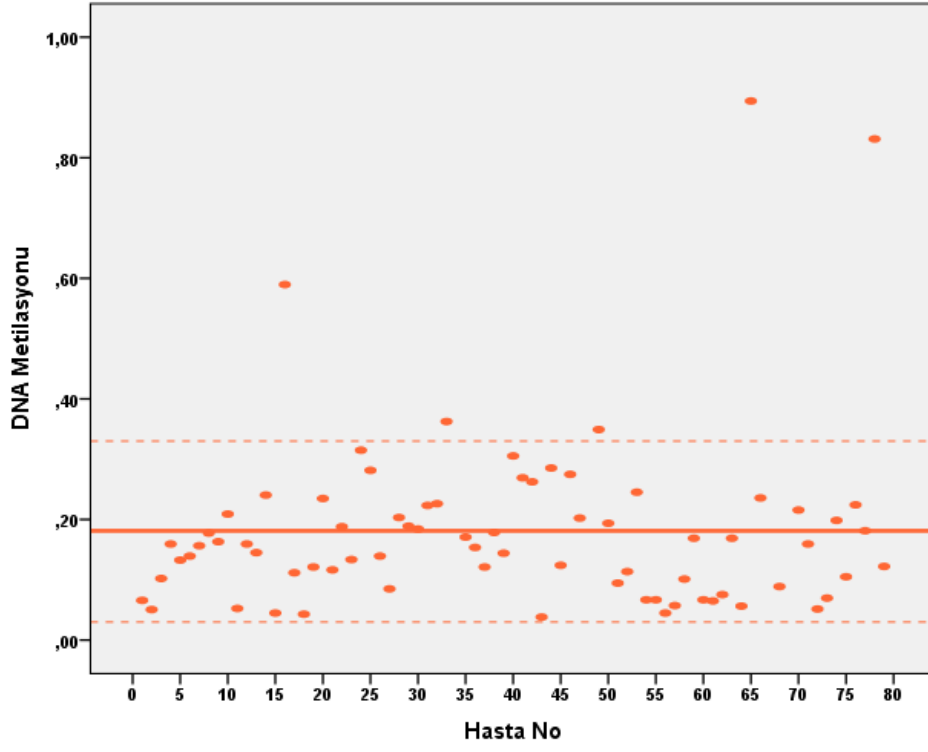


Şekil 6: Civa ölçümlerinin dağılımları

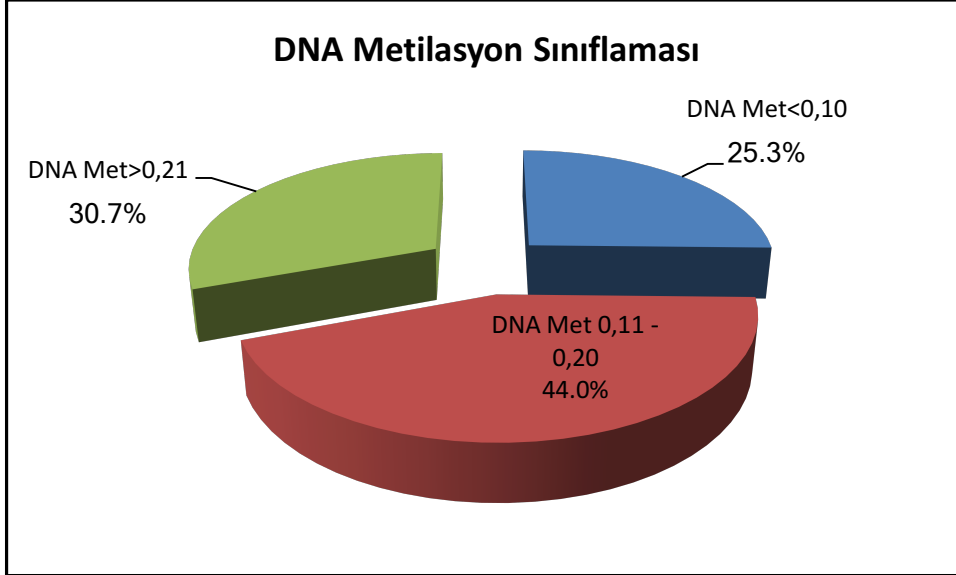
Hastaların DNA metilasyonu 0,04 ile 0,89 arasında değişmekte olup, ortalama $0,18 \pm 0,15$ saptanmıştır (Tablo 2). Olgularının %25,3'ünün ($n=19$) DNA metilasyonu 0,10'dan küçük, %44,0'ünün ($n=33$) 0,11-0,20 ve %30,7'sinin ($n=23$) 0,21'den büyüktür (Şekil 5-6).

Tablo 7: DNA Metilasyonu Dağılımları

DNA Metilasyonu; n (%)	Min-Mak (Medyan)	$0,04 \pm 0,89$ (0,16)
	<i>Ort\pmSs</i>	$0,18 \pm 0,15$
	<0,10	19 (25,3)
	0,11 - 0,20	33 (44,0)
	>0,21	23 (30,7)



Şekil 7: DNA Metilasyonu dağılımları



Şekil 8: DNA Metilasyon ölçümleri sınıflamalarının dağılımı

Gruplara göre ayrılmış DNA metilasyonu ile ağır metal düzeylerinin karşılaştırılması Tablo 3'te gösterilmiştir. Ağır metallerin DNA metilasyonunun gruplarına göre karşılaştırması Şekil 7-8'de gösterilmiştir.



Tablo 8: DNA Metilasyonuna Göre Alüminyum, Bakır, Kurşun ve Civa Ölçümlerinin Değerlendirilmesi

		DNA Metilasyonu			<i>p</i>
		<0,10 (n=19)	0,11- 0,20(n=33)	>0,21 (n=23)	
Alüminyum	<i>Min</i>				^a 0,910
	<i>-Mak</i>				
	(<i>Medyan</i>)	1,2-11,2 (4,3)	1,2-14 (4,3)	1,5-12,9 (4,6)	
	<i>Ort±Ss</i>	5,05±2,95	5,74±3,85	5,37±3,50	
Bakır	<i>Min</i>	20,6-61,6	20,5-67,8		^a 0,697
	<i>-Mak</i>			14,5-70 (28,9)	
	(<i>Medyan</i>)	(27)	(29,8)		
	<i>Ort±Ss</i>	31,88±11,62	34,66±13,49	32,89±14,09	
Kurşun	<i>Min</i>				^b 0,041*
	<i>-Mak</i>				
	(<i>Medyan</i>)	0,3-2,2 (1,1)	0,3-2,2 (1,3)	0,8-3,5 (1,3)	
	<i>Ort±Ss</i>	1,16±0,38	1,33±0,39	1,54±0,65	
Civa	<i>Min</i>				^b 0,030*
	<i>-Mak</i>				
	(<i>Medyan</i>)	0,1-1,1 (0,4)	0,2-1,2 (0,4)	0,1-1,7 (0,5)	
	<i>Ort±Ss</i>	0,41±0,23	0,44±0,29	0,64±0,40	

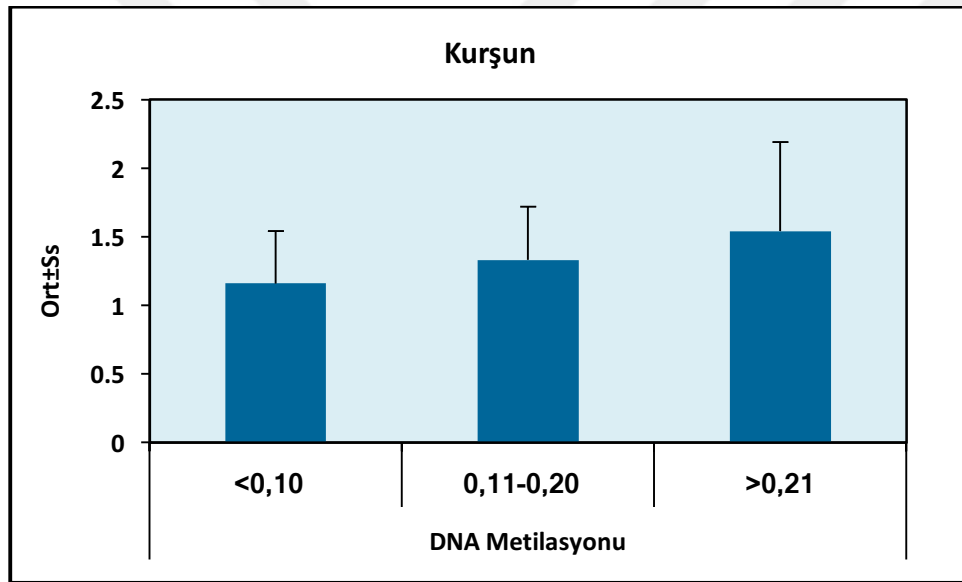
^aKruskal Wallis Test

^bOneway ANOVA Test

**p*<0,05

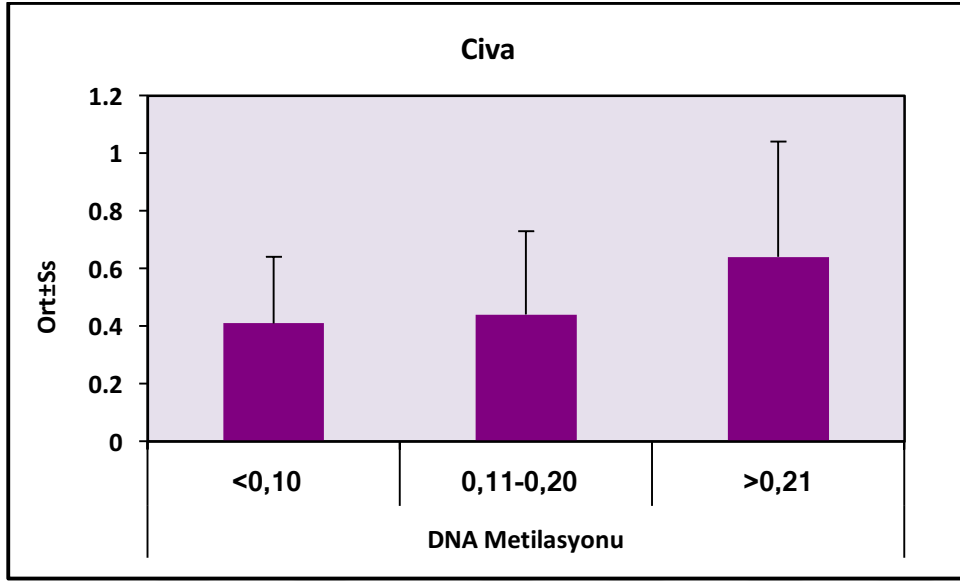
Gruplara göre Alüminyum ve Bakır ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$).

Gruplara göre Kurşun ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,041$; $p<0,05$). Anlamlı farklılık yaratan grubu saptamak için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucu; DNA metilasyonu 0,10'dan küçük olan olguların kurşun ölçümleri, DNA metilasyonu 0,21'den büyük olan olgulardan anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p=0,037$; $p<0,05$). Diğer ikili karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 9: DNA Metilasyonuna göre Kurşun ölçümlerinin dağılımları

Gruplara göre civa ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,030$; $p<0,05$). Anlamlı farklılık yaratan grubu saptamak için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucu; DNA metilasyonu 0,10'dan küçük olan olguların civa ölçümleri, DNA metilasyonu 0,21'den büyük olan olgulardan anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p=0,047$; $p<0,05$). Diğer ikili karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 10: DNA Metilasyonuna göre Civa ölçümlerinin dağılımları

Tablo 9: DNA Metilasyonu ile Alüminyum, Bakır, Kurşun ve Civa Ölçümlerinin İlişkisi

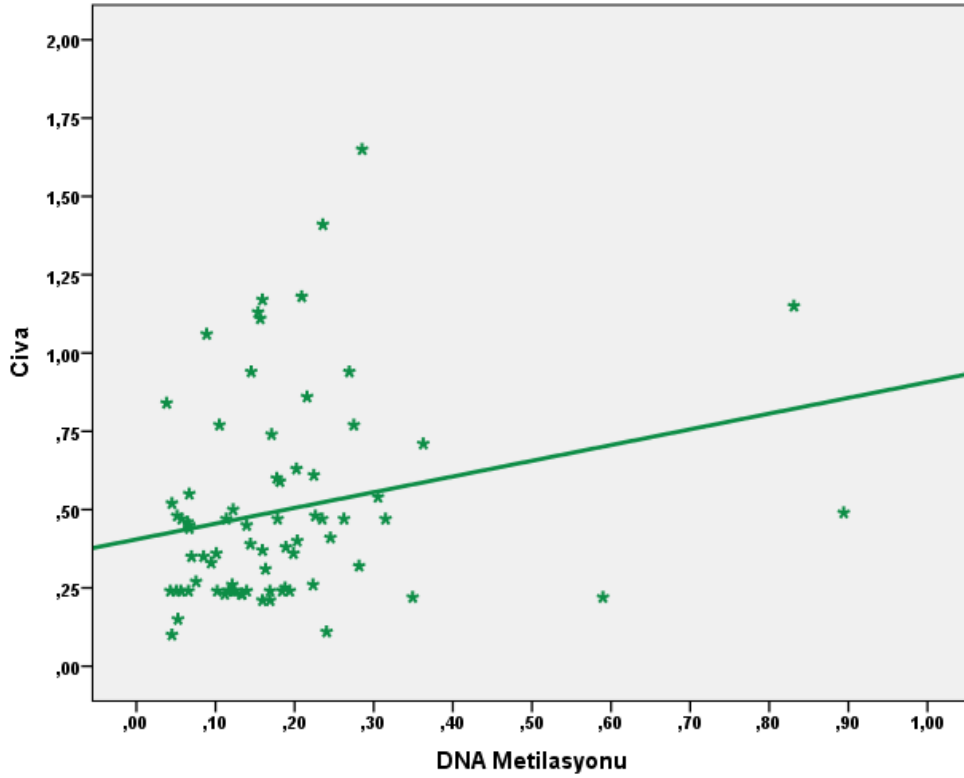
	DNA Metilasyonu	
	r	p
Alüminyum	0,015	0,898
Bakır	0,011	0,929
Kurşun	0,193	0,096
Civa	0,253	0,029*

r: Spearman's Korelasyon Katsayısı

*p<0,05

DNA metilasyonu ile alüminyum ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$). DNA metilasyonu ile bakır ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$). DNA metilasyonu ile kurşun ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

DNA metilasyonu ile civa ölçümleri arasında pozitif yönlü (DNA metilasyonu arttıkça Civa ölçümleri de artan) %25,3 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır ($r:0,253$; $p=0,029$; $p<0,05$) (Şekil 9).



Şekil 11: DNA Metilasyonu ile Civa ilişkisi

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda yenidoğan bebeklerde kordon kanında ağır metal (kurşun, civa, alüminyum, bakır) seviyeleri değerlendirildi. Ağır metal seviyeleri ile DNA metilasyonu arasındaki ilişki araştırıldı. İntrauterin dönemde ağır metallere maruziyetin fetüsün büyüme ve gelişimi için ciddi bir risk faktörü olduğu bilinmektedir(137). Bu dönemde ağır metal maruziyeti ile DNA yapısında epigenetik değişiklikler meydana gelebilmekte ve DNA metilasyonu ile sonuçlanmaktadır(138). Epigenetik kontrol sisteminin düzgün bir şekilde çalışmaması birtakım hastalıklar için risk faktörü oluşturmaktadır(5).

Taylor ve arkadaşları 2014 yılında yaptıkları çalışmada gebe kadınlarda kan Pb, Cd, Hg düzeylerini değerlendirmişlerdir. Ağır metal seviyelerinin gebelik için uluslararası düzeyde kritik bir seviyesi bulunmadığından karşılaştırmalar genellikle sadece benzer fizyolojik durumlara ya da yaşa ilişkin ulusal referans değerlerle yapılmıştır. ABD 'de kurşun için cut-off düzeyi 5.8µg/dl olarak belirlenmiştir (139). Çalışmamızda da umbilikal kord Kurşun ölçümleri 1.35±0.50 µg/dl aralığında, CDC'nin belirlediği sınırın altında bulunmuştur. Anne ne kadar düşük kan kurşun düzeyine sahip olsa da plasenta anneden fetusa kurşun transferini engelleyemeyebilir. Çeşitli çalışmalarda kurşunun düşük düzeyde bile fetal gelişimi olumsuz etkileyebileceği raporlanmıştır (140).

Furman ve ark. 2000 yılında İstanbul'da 104 gebe kadında yaptıkları çalışmada, umbilikal kord ortalama Kurşun konsantrasyonunu 1.69±0.91 µg/dl olarak bulmuşlardır. Çalışmada bu değerlerin önceki yıllardan daha düşük olduğu raporlanmıştır. Kan kurşun düzeylerindeki bu azalma büyük olasılıkla 1989 sonrasında benzinde tetraalkil kurşun kullanımındaki azalmayı yansıtmaktadır (141). Bizde çalışmamızda umbilikal kord kurşun konsantrasyonunu 1,35±0.5 µg/dl aralığında saptadık. Değerlerin 2000 yılında yapılan çalışmaya göre daha düşük

çıkması kurşun maruziyetinin daha da azaldığını düşündürmektedir, fakat daha geniş katımlı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Çalışmamızda kurşun seviyeleri referans aralığında olmasına rağmen DNA metilasyon düzeylerine göre hastalar 3 gruba ayrıldığında, kurşun ile DNA metilasyonu artışı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edilmiştir. Kabul edilebilir sınırlarda bile kurşuna maruziyet olması DNA metilasyonu ile sonuçlanabilmekte olduğunu düşündürmektedir. Bu durum gösteriyor ki; ağır metal seviyelerinde özellikle gebelik ve tüm yaş grupları için üst sınır düzeyleri konusunda uluslararası referans değerine ihtiyaç vardır (139).

Arbuckle ve ark. 2008-2011 yılları arasında Kanada genelinde yaklaşık 2000 gebe kadında yaptıkları çalışmada Ca, Fe, D vitamini takviyesi alan gebelerin;1.trimester, 3.trimester ve doğumda kordon kanında ağır metal (Cd, Pb, Mn, Hg) seviyelerini değerlendirmişlerdir. Gebeliğin ilerleyen haftalarında ağır metal konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma tespit edilen çalışmada kurşun seviyesi ortalaması $0.77\mu\text{g/dl}$ olarak saptanmıştır (142).Bizim çalışmada daha yüksek bir değer bulunması ($1.35\mu\text{g/dl}$), hala gelişmiş ülkelere göre kurşun maruziyetimizin yüksek olduğunu göstermektedir. Arbuckle ve ark. Ca, Fe, D vitamini alımının kordon kanında düşük Cd, Pb, Mn, Hg ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Çalışmamızda Fe ve Ca takviyesi alan gebelerin ağır metal seviyeleri normal sınırlarda saptanmıştır. Bu durum Fe ve Ca alımının gebelerde, bazı ağır metallerin (Pb, Cd) emilimini engellediğini göstermektedir (142). Gebelik sırasında destek tedavilerinin bu açıdan da değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir.

Kutlu ve ark. 2006 yılında yaptığı çalışmada; Pb ve Cd'a sigara dumanıyla maruz bırakılan gebe kadınlarda plasental Pb, Cd, Cu, Zn seviyeleri ölçülmüştür. Sigara içenlerde plasental Pb ve Cd düzeylerinin sigara içmeyenlere göre daha yüksek olduğu ve sigara içmeyenlerde Cu ve

Zn düzeylerinin daha düşük olduğu görülmüştür (143).Çalışmamızda sigara içmeyen gebelerin kordon kanında Pb, Cu, Al, Hg seviyelerine bakıldı ve tüm ağır metaller için seviyeler normal referans aralığında tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, daha önce yapılan çalışmalarda belirtildiği gibi (143) gebelik sırasında sigara içilmesinin kurşun maruziyetini artırdığını düşündürebilir.

Senut ve ark. 2014 yılında yaptıkları çalışmada Kurşuna maruz kalmanın, human embriyonik stem cell (hESC)'in nöral progenitor hücreleri (NPC) oluşturmasını engellediğini, sinir rozet oluşumu safhasındaki hESC'in Pb maruziyeti, PAX6 ve MS11 nöral işaretleyici genlerin ekspresyon seviyelerinde belirgin bir düşüş ile sonuçlandığını bulmuşlardır. Ayrıca ortaya çıkan NPC'ler daha kısa nöritlere sahip ve kontrol nöronlarına kıyasla daha az dallanmış nöronlar olarak bulunmuştur. Kurşuna maruz kalmanın, hESC'in nöronal farklılaşmasını hafifçe değiştirdiğini ve bu değişikliklerin DNA metilasyonuna yol açtığı gösterilmiştir(144). Çalışmamız Senut ve ark. yaptığı çalışma ile uyumlu bulunmuş ve bu sonuç, kurşun seviyesi referans sınırlar içinde olsa dahi DNA metilasyon riskini arttırabileceğini düşündürmektedir.

Verstraeten ve ark. 2008'de yaptığı çalışmada kurşunun hücre sinyallerinin ve nörotransmisyon yollarının kesilmesi haricinde, DNA metilasyonunda etkileyebileceğini öngörmüşlerdir (145). Pilsner ve ark. 2009'da, göbek kordonu örneklerinde kurşun düzeyleriyle göbek kordonu DNA metilasyon seviyeleri arasındaki ilişkiyi araştırırken kurşunun kemikte konsantrasyonunun Alu ve Line-1 metilasyon seviyeleriyle ters orantılı olduğunu bulmuşlardır. Aynı grup Kurşun maruziyetinin erken yaşta etkilenebileceğini, epigenetik mekanizmaları tetikleyebileceğini ve hastalığa hassasiyet üzerinde uzun vadeli bir etki yapacağını bildirmektedir (146).Waly ve ark. 2004'te kurşunun insülin-like growth faktör1'in uyarılmış metionin sentaz aktivitesini inhibe ettiğini ve dolayısıyla Büyüme faktörlerine cevap olarak DNA metilasyonunu bozduğunu göstermişlerdir (147). Kurşun üzerinde yaptıkları kapsamlı araştırmada erken yaşlarda maruz kalmanın Alzheimer gibi geç

başlangıçlı hastalıklara neden olabileceğini kanıtlamışlar ve kurşunun tetiklediği epigenetik değişikliklerin büyümeyi geciktirdiğini, bilişsel gelişimi etkilediğini saptamışlardır (147). Tüm bu çalışmalarda belirtildiği gibi kurşun maruziyeti DNA metilasyonu ve epigenetik değişiklikler için bir risk faktörüdür. Tüm bu çalışmalarda olduğu gibi çalışmamızda DNA metilasyonu ile urşun arasındaki ilişkiyi destekler nitelikte ve diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Unuvar ve ark. 2007 yılında İstanbul'da 143 gebe ve yenidoğanda yaptıkları çalışmada umbilikal kord kanı ortalama civa seviyesini $0.50 \pm 0.64 \mu\text{g/L}$ olarak, insanlar için toksik limitin (EPA, $5 \mu\text{g/L}$) altında olduğunu bulmuşlardır (148). Çalışmamızda umbilikal kord civa ölçümleri ortalama $0.50 \pm 0.325 \mu\text{g/L}$ arasında normal sınırlarda bulunmuş, fakat DNA metilasyonu ile civa ölçümleri arasında pozitif yönlü (DNA metilasyonu arttıkça Civa ölçümleride artan) %25,3 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır.

Jedrychowski ve ark. 2007 yılında yaptıkları çalışmada kord kanındaki $0,9 \mu\text{g/L}$ üstündeki civa düzeylerinin 12 aylık çocuklarda belirgin gecikmiş nörogelişimsel ve psikomotor geriliğe yol açtığını ve bu etkinin 24. Ay ve 36. Aydaki muayenelerde daha az izlendiğini raporlamışlardır (149). Çalışmamız normal aralıktaki Civa seviyeleri bile DNA metilasyonu için ciddi bir risk olabileceğini ve daha yüksek seviyelerinde de bu sebeple nörogelişimsel gecikmeye yol açtığı düşünülebilir.

Çalışmamızda umbilikal kord kanı bakır ölçümleri normal referans aralığında saptanmıştır. DNA metilasyonu ile bakır ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır. Kang ve ark.'nın 2004'te ve Lin ve ark.'nın 2005'te yaptıkları çalışmalarda bakırın, Histon asetilasyonunun azalması ile gen susturulmasına ve çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabileceğini bulmuşlardır (150,151). Bakırın DNA metilasyonu ile olan ilişkisi ile ilgili literatürde net bilgi bulunmamaktadır. Lee ve ark. 2002'de bakır ve hidrojen

peroksitein yol açtığı oksidatif hasarın, metilasyona uğramış DNA moleküllerinde CG-TT tandem mutasyona yol açtığını göstermişlerdir (152).Öte yandan, Ergaz ve ark. 2014'te yaptıkları bir hayvan deneyinde bakırın plasental oksidatif stresi ve global DNA metilasyonunu azalttığını saptamışlardır(153).

Çalışmamızda umbilikal kord kanı alüminyum ölçümleri referans aralığında saptanmış, DNA metilasyonu ile alüminyum ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır. Yang ve ark. 2015'te yaptıkları bir çalışmada alüminyum işçiliği yapanlarda kan Al düzeyi artışı ile birlikte Mini-Mental Durum Testi skorlarının azaldığı ama global DNA metilasyonunun da anlamlı bir şekilde azaldığını bildirmişlerdir(154). Dökmeci ve ark. 2005'te, Krewski ve ark. 2007'de yaptıkları çalışmalarda içme sularındaki alüminyum seviyesi ile Alzheimer hastalığı, demans veya kognitif hasarlanma arasında ilişki saptamışlardır(21,67).

Çalışmamızda Kurşun ve Civa seviyeleri normal sınırlarda olsa da DNA metilasyonu ile korelasyon saptanmış fakat aynı durum yine normal seviyelerde bulunan Bakır ve Alüminyum için saptanamamıştır. Bakır ve alüminyum seviyesindeki değişikliklerle, DNA metilasyonunda değişiklik olup olmadığının saptanması için daha geniş serili çalışmalara ihtiyaç vardır. Ülkemizde bakır ve alüminyum toksisitesi ile DNA metilasyonu arasında yapılan çalışma sayısı çok az olmakla beraber, DNA metilasyonu ile ilişkisini ortaya koymak için daha geniş serilerde çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmamızda alüminyum ve bakır seviyeleri ile DNA metilasyonu arasında ilişki çıkmaması bu ağır metal seviyeleri için normal aralıkta sonuçlar olması ile ilişkili olabilir ve bu metaller için daha yüksek seviyelerde değerler de DNA metilasyonuna yol açmayacağı anlamına gelmemektedir.

Tüm çalışmaların ele alındığı metaanalizler yapılsa bile, çalışmalarda aynı özelliklere sahip hastaların alındığı, örneklerin standardize şekilde toplandığı ve çalışma yönteminin açık

olduğu çalışmalar nadirdir. Ayrıca, örneklerin alındığı topluilar aynı olsa da ağır metal maruziyeti bölgesel farklılıklar da göstermektedir. Bu nedenle, prenatal ağır metal maruziyetinin önlenebilir nedenlerin saptanması ve gerekli postnatal bakımın da sağlanması için iyi tasarlanmış, hasta sayısı fazla olan çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızın birkaç sınırlaması bulunmaktadır. Öncelikle, kurşun, civa, alüminyum, bakır düzeyleri sadece doğum zamanında bakılmıştır. Bu yüzden sonuçlarımızın fetal gelişim periyodu süresince maruziyetin ne derecede olduğunu yansıtmaması mümkün değildir. İkincisi, çalışmaya katılmış olan hastaların tümünde ağır metal düzeyleri normal sınırdadır. Hasta sayısının az olması bu duruma yol açmış olabilir. Buna rağmen, ağır metaller ile DNA metilasyonu arasında bir korelasyon olabileceği tespit edilmiştir. Daha fazla hasta ile yapılan geniş seriler, bu korelasyonun araştırılması için gereklidir.

6. SONUÇ

Bugün tüm dünyada artan endüstrileşme sonucu ortaya çıkan maddelerin ekosistem kirliliği vasıtasıyla insan hayatını tehdit edecek düzeylere geldiği tartışılmaktadır. İnsan hayatının en önemli dönemi olan prenatal dönem, hücre bölünmesi ve farklılaşmasının en yoğun olduğu dönem olması nedeniyle dışarıdan gelecek her türlü toksik etkiye karşı savunmasızdır. Bu dönemde meydana gelebilecek herhangi bir bozukluk ileriki dönemlerde geri dönüşümsüz nörogelişimsel defektlere yol açabilmektedir. Çevresel kirleticilere daha duyarlı olan ve detoksifikasyon enzimleri daha az gelişmiş olan yenidoğanlarda ağır metal maruziyeti kromatin yapısında veya DNA 'da değişikliğe yol açarak epigenetik modifikasyonlara neden olabilir (155).

Çalışma sonunda elde ettiğimiz verilere göre alüminyum, bakır, kurşun, civa seviyelerinin referans aralığında olmasına rağmen; DNA metilasyon seviyelerine göre hastalar 3 gruba ayrıldığında, kurşun ve civa ile DNA metilasyonu artışı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu, civa ile DNA metilasyonu arasında ise pozitif yönde korelasyon olduğu saptanmıştır.

Çocukluğun erken dönemlerinde meydana gelebilen DNA metilasyonu hakkında literatürde az sayıda veri bulunmaktadır. DNA değişikliklerinin değerlendirilmesi için gelecekte daha geniş homojen örneklem grubuyla yapılacak olan çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 2007; 447: 396-8.
2. Waddington CH. The epigenotype. *Endeavour* 1942; 1: 18-20.
3. Jiang Y, Bressler J, Beaudet LA. Epigenetics and human disease. *Annu Rev Genet* 2004; 5: 479-510.
4. Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 2007; 447 (7143): 425-32.
5. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 2005; 6: 597-610
6. Rodenheiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ* 2006; 174 (3): 341-8.
7. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6-21.
8. Denis H, Ndlovu MN, Fuks F. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO reports* 2011; 12: 647-56.
9. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2013; 14: 204-20.
10. Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 (6): 3740-5
11. McGowen PO, Szyf M. The epigenetics of social adversity in early life: Implications for mental health outcomes. *Neurobiol Dis* 2010; 39 (1): 66-72.
12. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 484-92.

13. Helmann A, Chess A. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science* 2007; 315: 1141-43.
14. Järup, L.2003. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull*, 68, 167-82.
15. Wong, SL., ve Lye, E.J. 2008. Lead, mercury and cadmium levels in Canadians. *Health Rep*, 19(4), 31-6.
16. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) 2007. CERCLA Priority List of Hazardous Substances. U.S.Department of Health and Human Services. Atlanta, GA (<http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>).
17. Dietz, R., Outridge, P.M., ve Hobson, K.A. 2009. Anthropogenic contributions to mercury levels in present-day Arctic animals--a review. *Sci Total Environ*. 407(24):6120-31.
18. Harte, J., C. Holdren, R. Schneider and C. Shirley: *Toxics A to Z, A guide to everyday pollution hazards*, University of California Press, Oxford, England, pp. 478, (1991).
19. Schuhmacher, M., Domingo, J.L., Llobet, J.M., ve Corbella, J. 1991. Lead in children's hair, as related to exposure in Tarragona Province, Spain. *Sci Total Environ*. 15;104(3):167-73.
20. Kahvecioğlu Ö, Kartal G, Güven A, Timur S, 2009. Metallerin Çevresel Etkileri-I, *Metalurji*, 136.Sayı, http://www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136_4753.pdf.
21. Dökmeci İ, Dökmeci AH, 2005. *Toksikoloji Zehirlendirmede Tanı ve Tedavi*, 4.Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, 2005.
22. Sienko, R.A.1983. *Temel Kimya (Chemistry:Principles and Properties)*, (Çevirenler: Gündüz N., Gündüz T., Tüzün C., Pulat E., Üneri S., Zeren A., Özgüner S.), Savaş Yayınları,Fen Bilimleri Dizisi.

23. Klaassen CD, 2009ç (Çeviri: Kalkan Ş, Soner BC), Ağır Metaller ve Ağır Metal Antagonistleri(Konu:65), Brunton LL, Lazo JS, Parker KL(Editors), (Çeviri Editörü: Süzer Ö), TedavininFarmakolijik Temeli, Nobel TıpKitapevleri,2009
24. Howard, H., 2001. Heavy Metal Poisoning, Chapter 395 Harrison's Principles of Internal Medicine 15th Edition by The McGraw-Hill Companies, Inc.
25. Johnston, MV.,Goldstem, GW. (1998). Selective vulnerability of the developing brain to lead. *Curr Opin Neurol.* 11(6):689–693.
26. SKREB, Y., HABAZİN-NOVAK, V. (1975). Reversible inhibition of DNA, RNA, and protein synthesis in human cells by lead chloride. *Toxicology.* 5: 167–174.
27. SİROVER, MA., LOEB, LA. (1976). Infidelity of DNA synthesis in vitro: screening for potential mutagens or carcinogens. *Science (Wash. DC).* 194: 1434–1436.
28. POPENOE, EA., SCHMAELER, MA. (1979). Interaction of human polymerase beta with ions of copper, lead, and cadmium. *Arch. Biochem. Biophys.* 196(1): 109–120.
29. HARTWİG, A. (1994). Role of DNA repair inhibition in lead and cadmium induced genotoxicity: a review. *Environ. Health. Perspect.* 102 (Suppl. 3): 45–50.
30. HARTWİG, A., SCHLEPEGRELL, R., BEYERSMANN, D. (1990). Indirect mechanism of lead induced genotoxicity in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.* 241: 75–82.
31. BONASSİ, S., ABBONDANDOLO, A., CAMURRİ., DAL PRÁ, L., DE FERRARİ, M., DEGRASSİ, F., FORNİ, A., LAMBERTİ, L., LANDO, C., PADOVANİ, P., SBRANA, I., VECCHİO, D., PUNTONİ, R. (1995). Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. *Cancer Genet. Cytogenet.* 79: 133–135.

32. COOPER, WC. (1976). Cancer mortality patterns in the lead industry. *Ann. NY. Acad. Sci.* 27: 150–176.
33. SIEMIĄTYCKI, J. (1991). Epidemiological approaches to discovering occupational carcinogens. In *Risk Factors for Cancer in the Workplace*. Ed.: Boca Raton. London: CRC Press. p.: 17-28.
34. FU, H., BOFFETTA, P. (1995). Cancer and occupational exposure to inorganic lead compounds: a meta-analysis of published data. *Occup. Environ. Med.* 52: 73–81.
35. ZELIKOFF, JT., LI, JH., HARTWIG, A., WANG, XW., COSTA, M., ROSSMAN, TG. (1988). Genetic toxicology of lead compounds. *Carcinogenesis (Lon.)*. 9: 1727–1732.
36. ROY, NK., ROSSMAN, TG. (1992). Mutagenesis and comutagenesis by lead compounds. *Mutat. Res.* 298: 97–103.
37. IARC (International Agency for Research on Cancer) (1987). Overall evaluations of carcinogenicity: and updating of IARC monographs. *Proceedings of the IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans* 1–42(7): 230–232.
38. ROUSSEAU, MC., STRAIF, K., SIEMIĄTYCKI, J. (2005). IARC carcinogen update. *Environ. Health Perspect.* 113: A580-A581.
39. STEENLAND, K., BOFFETTA, P. (2000). Lead and cancer in humans: where are we now? *Am. J. Ind. Med.* 32: 295–299.
40. SILBERGELD, E.K., WAALKES, M., RICE, J.M. (2000) Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. *Am. J. Ind. Med.* 38: 316–323.
41. BAUCHINGER, M., SCHMID, E. (1972). Chromosome analysis in cell cultures of the Chinese hamster after application of lead acetate. *Mutat. Res.* 14: 95–100.

42. FORNÌ, A., CAMBIAGHÌ, G., SECCHÌ, GC. (1976). Initial exposure to lead: Chromosome and biochemical findings. *Arch. Environ. Health*. 31: 73–78.
43. POPENOE, EA., SCHMAELER, MA. (1979). Interaction of human polymerase beta with ions of copper, lead, and cadmium. *Arch. Biochem. Biophys*. 196(1): 109–120.
44. DEKNUDT, G., MANUEL, Y., AND GERBER, G. B. (1977). Chromosomal aberrations in workers professionally exposed to lead. *J. Toxicol. Environ. Health*. 3: 885–891.
45. GRANDJEAN, P., WULF, HC., NIEBUHR, E. (1983). Sister chromatid exchange in response to variations in occupational lead exposure. *Environ. Res*. 32: 199–204.
46. WEDRYCHOWSKI, A., SCHMIDT, WN., HNİLICA, LS. (1986). The in vivo cross-linking of proteins and DNA by heavy metals. *J. Biol. Chem*. 261: 3370–3376.
47. WU, FY., CHANG, PW., WU, CC., KUO, HW. (2002). Correlations of blood lead with DNAprotein cross-links and sister chromatid exchanges in lead workers. *Cancer Epid. Biomarkers Prevention*. 11: 287–290.
48. THIER, R., BONACKER, D., STOÏBER, T., BOHM, KJ., WANG, M., UNGER, E., BOLT, HM., DEGEN, G. (2003). Interaction of metal salts with cytoskeletal motor protein systems. *Toxicol. Lett*. 140–141: 75–81.
49. VALKO, M., RHODES, CJ., MONCOL, J., IZAKOVIĆ, M., MAZUR, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact*. 160: 1–40.
50. Markowitz, M. Lead Poisoning In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 18 th ed. Saunders 2007 (pp: 2913-2917).

51. World Health Organization (WHO) 2006. Environmental Health Criteria, 234. Elemental Speciation in Health Risk Assessment. Geneva. (<http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc234.pdf>).
52. Triche, E.W., ve Hossain, N. 2007 Environmental factors implicated in the causation of adverse pregnancy outcome. *Semin Perinatol.* 31(4), 240-2.
53. Atabek, M.E., Kurtoglu, S., Pirgon, O., Uzun, K., ve Saraymen, R. 2007. Relation of in utero lead exposure with insulin-like growth factor-I levels and neonatal anthropometric parameters. *Int J Hyg Environ Health*, 210(1): 91-5.
54. Sönmez, F., 2002. Lead exposure and Urinary N-Acetyl _ D Glucosaminidase activity in adolescent workers in auto repair. *Workshops Journal of Adolescent Health* 30, pp 213–216
55. Paglia, D.E., 1999. Differential effects of low-level lead exposure on the natural isozymes of erythrocyte 5-nucleotidase, *Clinical Biochemistry*, vol. 32, no. 3, pp193–199.
56. Alkış M. Türk şaraplarında ağır metallerin belirlenmesi (Yüksek lisans tezi) Ankara, Ankara Üniversitesi,2011.
57. Kartal G, Güven A, Kahvecioğlu Ö, Timur S. Metallerin çevresel etkileri-II. TMMOB Metalurji Mühendisleri Odası Dergisi, 2004;137:46-53.
58. Shorrocks VM. Copper and Human Health. USA, Copper Development Association Press,1984.
59. Ranjan R, Naresh R, Patra RC, Swarup D. Erythrocyte lipid peroxides and blood zinc and copper concentrations in acute undifferentiated diarrhoea in calves. *Vet Res Commun.*2006;30:249-54

60. Kabak YB, Gülbahar MY. Sıçanlarda deneysel bakır zehirlenmesinde karaciğer ve böbrek dokularında apoptozisin belirlenmesi. *Vet Fak Derg.* 2013;60:39-45.
61. Uyanık F. Bazı iz elementlerin organizmadaki başlıca fonksiyonları ve bağışıklık üzerine etkileri. *Sağlık Bilim Derg.* 2000;9:49-58.
62. Stern B, Solioz D, Krewski P, Aggett TC, Baker S, Crump K et al. Copper and human health: biochemistry, genetics, and strategies for modeling dose-response relationships. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2007;10:157-222.
63. Sarkar B.2002. *Heavy Metals in the Environment*, Marcel Dekker, Inc. New York.
64. Eto K, 2000. Minamata Disease, *Neuropathology* 2000;20,S14-S19
65. Flaten TP. 2001. Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. *Brain Research Bulletin* 55(2):187- 196.
66. Ganrot PO. 1986. Metabolism and possible health effects of aluminum, *Environmental Health Perspectives* 65:363-441.
67. Krewski D, Yokel RA, Nieboer E, Borchelt D, Cohen J, Harry J, Kacew S, Lindsay J, Mahfouz AM, Rondeau V. 2007. Human Health Risk Assessment for Aluminium, Aluminium Oxide, and Aluminium Hydroxide. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 10:1–269. DOI: 10.1080/10937400701597766
68. Günaydın N. Uzun Süreli Alüminyum Kaplarda Yapılan Yoğurtlarla Beslenenlerde Plazma Alüminyum Seviyeleri ile Oksidatif Durum Arasındaki İlişkinin Araştırılması. HRÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, 2005.
69. Blundell G, Henderson WJ, Price EW. Soil Particles in The Tissues of The Foot in Endemic Elephantiasis of The Lower Legs. *Ann Trop Med Parasitol.* 1989; 83: 381-5.

70. Bhagavan NV. Medical Biochemistry (4th edition). Harcourt/Academic Press, Canada. 2002: 894.
71. Onur E. Alüminyum Toksisitesinin Kalite Kontrol Açısından Değerlendirilmesi. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi. 1997; 74-9.
72. Bakar C, Baba A, Metaller ve İnsan Sağlığı: Yirminci Yüzyıldan Bugüne ve Geleceğe Miras Kalan Çevre Sağlığı Sorunu. 1. Tıbbi Jeoloji Çalıştayı. 2009.
73. Pastacı N, Bahtiyar N, Karalük S ve diğerleri. Köpeklerde Alüminyum Toksikasyonunun Alzheimer Hastalığı Üzerine Etkisi. TUBAV Bilim Dergisi. 2010; 3(3): 271-5.
74. Yurdakök K, İnce T. Aşı Adjuvanları. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi. 2008; 51: 225-39.
75. Aslan K. Elementler. Biyotıp Laboratuvarı, 2010.
76. Contamination with Aluminium Compounds and Effect of Human Neurophysiology and Behavior. <http://www.trufax.org/general/aluminium.html>.
77. Akay C, Kalman S, Dundaroz R, et al. Serum Aluminium Levels in Glue-Sniffer Adolescent and in Glue Containers. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2008; 102 : 433-6.
78. Oğuz EO, Yüksel H, Enli H ve diğerleri. Alüminyum Sülfatın "Ross" Cinsi Term Besi Cıvı Karaciğerinde Yarattığı Toksik ve İnflamatuar Hasar. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 2008; 61(1).
79. Akpolat T, Utaş C (Ed.). Hemodiyaliz Hekimi El Kitabı, 2.baskı, Anadolu Yayıncılık, Kayseri; 2001: 218-38.

80. Akpolat T, Arık N, Sayal A ve diğerleri. Eritropoietine Bağlı Demir Tüketiminin Serum Alüminyum Düzeyine Etkisi. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*. 1994; 3(2); 56-8.
81. Iman Al-Saleh, Neptune Shinwari, Abdullah Mashhou, Gamal El Din Mohamed, Abdullah Rabah Heavy metals (lead, cadmium and mercury) in maternal, cord blood and placenta of healthy women *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214 (2011) 79–101
82. Wells, P.G., Lee, C.J., McCallum, G.P., Perstin, J., Harper, P.A., 2010. Receptor- and reactive intermediate-mediated mechanisms of teratogenesis. *Handbook Exp. Pharmacol.* 196, 131–162.
83. Silbergeld, E.K., Patrick, T.E., 2005. Environmental exposures, toxicologic mechanisms, and adverse pregnancy outcomes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192, S11–21.
84. Sly, P.D., Flack, F., 2008. Susceptibility of children to environmental pollutants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1140, 163–183.
85. Ginsberg, G., Slikker, W., Bruckner, J., Sonawane, B., 2004. Incorporating children's toxicokinetics into a risk framework. *Environ. Health Perspect.* 112
86. Gardella, C., 2001. Lead exposure in pregnancy: a review of the literature and argument for routine prenatal screening. *Obstet. Gynecol. Surv.* 56, 231–238.
87. Mattison, D.R., 2010. Environmental exposures and development. *Curr. Opin. Pediatr.* 22, 208–218
88. Carter, A.M., 2009. Evolution of factors affecting placental oxygen transfer. *Placenta* 30 (Suppl. A), S19–25

89. Cross, J.C., 2006. Placental function in development and disease. *Reprod. Fertil. Dev.* 18, 71–76.
90. Mary Frances McAleer, Rocky S. Tuan Cytotoxicant-Induced Trophoblast Dysfunction and Abnormal Pregnancy Outcomes: Role of Zinc and Metallothionein; *Birth Defects Research (Part C)* 72:361 -370 (2004)
91. WHO, Lead, Cadmium, Mercury, In: *Trace Elements in Human Nutrition and Health*, Geneva:WHO:1996
92. Jose G.Dorea, Carmen M.Donangelo: Early (in uterus and infant) exposure to mercury and lead, *Clinical Nutrition* (2006) 25, 369-376
93. Nashashibi N, Cardamakis E, Bolbos G, Tzingounis V. Investigation of kinetic of lead during pregnancy and lactation. *Gynecol Obstet Inves* 1999;48:158–62.
94. Stern AH, Smith AE. An assessment of the cord blood: maternal blood methylmercury ratio: implications for risk assessment. *Environ Health Perspect* 2003;111: 1465–70.
95. Gulson BL, Mizon KJ, Korsch MJ, et al. Mobilization of lead from human bone tissue during pregnancy and lactation—a summary of long-term research. *Sci Total Environ.* 2003;303: 79-104.
96. Rothenberg SJ, Khan F, Manalo M, et al. Maternal bone lead contribution to blood lead during and after pregnancy. *Environ Res.* 2000;82:81-90
97. Emory E, Pattillo R, Archibold E, et al. Neurobehavioral effects of low-level lead exposure in human neonates. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;181: S2-S11.

98. Romero RA, Granadillo VA, Navarro JA, et al. Placental transfer of lead in mother/newborn pairs of Maracaibo City (Venezuela). *J Trace Elem Electrolytes Health Dis.* 1990;4:241-243.
99. Stern AH, Smith AE. An assessment of the cord blood: maternal blood methylmercury ratio: implications for risk assessment. *Environ Health Perspect*, 111: 1465–1470, 2003.
100. Gundacker C, Hengstschläger M; The role of the placenta in fetal exposure to heavy metals: *Wien Med Wochenschr* (2012) 162/9–10: 201–206
101. Myllynen P. In search of models for hepatic and placental pharmacokinetics. Dissertation University of Oulu 2003. Available at: <http://herkules oulu.fi/isbn9514270231/isbn9514270231.pdf>.
102. Benirschke K, Kaufmann P, Baergen RN. Pathology of the human placenta. 5th edn. Springer, New York, pp. 42–49, 2006.
103. Goyer RA. Transplacental transport of lead. *Environ Health Perspect*, 89: 101– 105, 1990.
104. Clarkson T, Vyas J, Ballatori N. Mechanisms of mercury disposition in the body. *Am J Ind Med*, 50: 757–764, 2007.
105. Kajiwara Y, Yasutake A, Adachi T, et al. Methylmercury transport across the placenta via neutral amino acid carrier. *Arch Toxicol*, 70: 310–314, 1996.
106. Aschner M, Syversen T, Souza DO. Metallothioneins: mercury species specific induction and their potential role in attenuating neurotoxicity. *Exp Biol Med*, 231: 1468–1473, 2006.

107. Gundacker C, Gencik M, Hengstschläger M. The relevance of the individual genetic background for the toxicokinetics of two significant neurodevelopmental toxicants: mercury and lead. *Mutat Res Rev Mutat*, 705: 130–140, 2010
108. Leazer TM, Klaassen CD. The Presence of xenobiotic transporters in rat placenta. *Drug Metab Dispos*, 31: 153–167, 2003.
109. Jauniaux E, Gulbis B, Burton GJ, et al. The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the foetus – a review. *Placenta*, 24: S86–S93, 2003.
110. Myllynen P, Immonen E, Kummu M, et al. Developmental expression of drug metabolizing enzymes and transporter proteins in human placenta and fetal tissues. *Expert Opin DrugMet*, 5: 1483–1499, 2009.
111. McAleer MF, Tuan RS. Metallothionein protects against severe oxidative stress-induced apoptosis of human trophoblastic cells. *In Vitro Mol Toxicol*, 14: 219–231, 2001.
112. Cordon-Cardo C, O'Brien J, Boccia J, et al. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem*, 38: 1277–1287, 1990.
113. Feinberg AP, Cui H, Ohlsson R. DNA Methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. *Sem Canc Biol* 2002; 12: 389-98.
114. Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 21-32.
115. Nicholls RD, Knepper JL. Genome organization, function and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001; 2: 153-75.

116. Sutcliffe J, Nakao M, Christian S, et al. Deletions of a differentially methylated CpG island at the SNRPN gene define a putative imprinting control region. *Nat Genet* 1994; 8: 52-8
117. Dan B. Angelman syndrome: Current understanding and research prospects. *Epilepsia* 2009; 50 (11): 2331-9.
118. Everett CM, Wood NW. Trinucleotide repeats and neurodegenerative disease. *Brain* 2004; 127: 2385-405.
119. Crawford DC, Acuna JM, Sherman SL. FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genet Med* 2001; 3: 359-71.
120. Oberle I, Rousseau F, Heitz D, et al. Instability of a 550-base pair segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991; 252: 1097-102.
121. Klippel JH. Systemic lupus erythematosus: demographics, prognosis and outcome. *J Rheumatol* 1997; 24: 67-71.
122. Richardson B, Scheinbart L, Strahler J, et al. DNA methylation and autoimmune disease. *Clin Immunol* 2003; 109: 72-79.
123. Richardson B, et al. Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1665-73.
124. Smeets DF, Mooq U, Weemaes CM, et al. ICF syndrome: a new case and review of the literature. *Hum Genet* 1994; 94: 240-46.
125. Ehrlich M. The ICF syndrome, a DNA methyltransferase 3B deficiency and immunodeficiency disease. *Clin Immunol* 2003; 109: 17-28.

126. Hansen RS, Wijimenga C, Luo P, et al. The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 14412-7.
127. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 1-11.
128. Widschwendter M, Jiang G, Woods C, et al. DNA hypomethylation and ovarian cancer biology. *Cancer Res* 2004; 64: 4472-80.
129. Strichman-Almashanu LZ, Lee RS, Onyango PO, et al. A genomewide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes. *Gen Res* 2002; 12: 543-54.
130. Costello JF, Frühwald MC, Smiraqlia DJ, et al. Aberrant CpG island methylation has a non-random and tumor type specific patterns. *Nat Genet* 2000; 25: 132-8.
131. Kazuhisa N, Whitaker JW, Boyle DL, et al. DNA methylome signature in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2012; 0: 1-8.
132. Majithia V, Geraci SA. Rheumatoid arthritis: diagnosis and management. *Am J Med* 2007; 120 (11): 936-9.
133. Kirectepe AK, Kasapcopur O, Arisoy N, et al. Analysis of MEFV exon methylation and expression patterns in familial Mediterranean fever. *BMC Med Genet* 2011; 12(105): 1-6.
134. Schaner PE, Gumucio DL. Familial Mediterranean Fever in the PostGenomic Era: How an Ancient Disease is Providing New Insights into Inflammatory Pathways. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy* 2005; 4 (1): 67-76.

135. Suarez-Alvarez B, Rodriguez RM, Fraga MF, et al. DNA Methylation: a promising landscape for immune system-related diseases. *Cell* 2012; 28 (10): 506-14.
136. Reinius LE, Acevedo N, Joerink M, et al. Differential DNA Methylation in Purified Human Blood Cells: Implications for Cell Lineage and Studies on Disease Susceptibility. *Plos One* 2012; 7 (7): 1-13.
137. Silbergeld, E.K., Patrick, T.E., 2005. Environmental exposures, toxicologic mechanisms, and adverse pregnancy outcomes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192, S11–21.
138. Bitto, Alessandra; Pizzino, Gabriele; Irrera, Natasha; Galfo, Federica; Squadrito, Francesco. *Current Genomics*, Volume 15, Number 6, December 2014, pp. 464-468(5)
139. Taylor, C. M., J. Golding, and A. M. Emond. "Lead, cadmium and mercury levels in pregnancy: the need for international consensus on levels of concern." *Journal of developmental origins of health and disease* 5.1 (2014): 16-30.
140. . Hu X, Zheng T, Cheng Y, Holford T, Lin S, Leaderer B, Qiu J, Bassig BA, Shi K, Zhang Y, Niu J, Zhu Y, Li Y, Guo H, Chen Q, Zhang J, Xu S, Jin Y.: Distributions of heavy metals in maternal and cord blood and the association with infant birth weight in China. *J Reprod Med.* 2015 Jan-Feb;60 (1-2):21-9.
141. Furman A, Laleli M Maternal and Umbilical Cord Blood Lead Levels: An Istanbul Study *Archives of Environmental Health: An International Journal* 56: 26-28 (2001).
142. Arbuckle, Tye E., et al. "Maternal and fetal exposure to cadmium, lead, manganese and mercury: the MIREC study." *Chemosphere* 163 (2016): 270-282.

143. Kutlu, Türkan, A. Alev Karagozler, and Engin M. Gozukara. "Relationship among placental cadmium, lead, zinc, and copper levels in smoking pregnant women." *Biological trace element research* 114.1 (2006): 7-17.
144. Senut, Marie-Claude, et al. "Lead exposure disrupts global DNA methylation in human embryonic stem cells and alters their neuronal differentiation." *Toxicological Sciences* 139.1 (2014): 142-161.
145. Verstraeten SV, Aimo L, Oteiza PI. 2008. Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. *Arch Toxicol* 82:789–802
146. . Pilsner JR, Hu H, Ettinger A, Sánchez BN, Wright RO, Cantonwine D, Lazarus A, Lamadrid-Figueroa H, Mercado-
147. Waly M, Olteanu H, Banerjee R, Choi SW, Mason JB, Parker BS, Sukumar S, Shim S, Sharma A, Benzecry JM, Power-Charnitsky VA, Deth RC. 2004. Activation of methionine synthase by insulin-like growth factor-1 and dopamine: a target for neurodevelopmental toxins and thimerosal. *Mol Psychiatry* 9:358–370.
148. Unuvar, Emin, et al. "Mercury levels in cord blood and meconium of healthy newborns and venous blood of their mothers: clinical, prospective cohort study." *Science of the total environment* 374.1 (2007): 60-70.
149. Jedrychowski W, Perera F, Jankowski J, Mrozek-Budzyn D, Mroz E, Flak E, et al. 2009. Gender specific differences in neurodevelopmental effects of prenatal exposure to very low-lead levels: the prospective cohort study in three-year olds. *Early Hum Dev* 85 (8):503–510.
150. Kang J, Lin C, Chen J, Liu Q. 2004. Copper induces histone hypoacetylation through directly inhibiting histone acetyltransferase activity. *Chem Biol Interact* 148:115–123.

151. Lin C, Kang J, Zheng R. 2005. Oxidative stress is involved in inhibition of copper on histone acetylation in cells. *Chem Biol Interact* 151:167–176.
152. Lee DH, O'Connor TR, Pfeifer GP. Oxidative DNA damage induced by copper and hydrogen peroxide promotes CG-->TT tandem mutations at methylated CpG dinucleotides in nucleotide excision repair-deficient cells. *Nucleic Acids Res.* 2002 Aug 15;30(16):3566-73.
153. Ergaz Z, Guillemin C, Neeman-Azulay M, Weinstein-Fudim L, Stodgell CJ, Miller RK, Szyf M, Ornoy A. Placental oxidative stress and decreased global DNA methylation are corrected by copper in the Cohen diabetic rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014 May 1;276(3):220-30.
154. Yang X, Yuan Y, Lu X, Yang J, Wang L, Song J, Nie J, Zhang Q, Niu Q. The Relationship Between Cognitive Impairment and Global DNA Methylation Decrease Among Aluminum Potroom Workers. *J Occup Environ Med.* 2015 Jul;57(7):713-7.
155. Bitto, Alessandra; Pizzino, Gabriele; Irrera, Natasha; Galfo, Federica; Squadrito, Francesco. *Current Genomics*, Volume 15, Number 6, December 2014, pp. 464-468(5)