



**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**Yüksek Lisans Tezi**

**AĞIR METAL İYONLARININ İNSAN LENFOSİTLERİ  
ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN MİKRONÜKLEUS  
TEKNİĞİYLE BELİRLENMESİ**

**İsa Beytullah DOĞAN**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Genel Biyoloji Programı**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Tuncay ORTA**

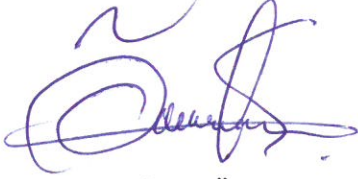
**Ağustos, 2019**

**İSTANBUL**

Bu çalışma, 19.08.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Genel Biyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi**

Prof. Dr. Tuncay ORTA (Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Önder KILIÇ  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Dr. Öğr. Üyesi Narin ABDULLAH  
İstanbul Aydın Üniversitesi  
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2016-20926 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’nun 22.01.2016 tarihli 95 sayılı kararı ile yürütülmüştür.

## ÖNSÖZ

İlk olarak lisans eğitimimden başlayıp yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren, çok şeyler öğreten ve bolca sabır gösteren danışman hocam Prof. Dr. Tuncay ORTA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca en zor anımda imdadıma yetişen sayın Prof. Dr. Ali Osman GÜROL hocam ve her yardıma ihtiyacım olduğunda desteklerini asla esirgemeyen sayın Prof. Dr. Önder KILIÇ, Prof. Dr. Murat BELİVERMİŞ, Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TOPÇUL, Doç. Dr. Uğur AKSU ve Dr. Öğr. Üyesi Narin ABDULLAH hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Yardıma ihtiyaç duyduğum her anda yanımda olan sevgili Merve CİVELEK, Gözde KILIÇ, Kübra VARDAR, Gizem AKMAN, Özlem Dağdeviren ÖZSÖYLEMEZ, İdil ÇETİN, Asiye TAVLI, Beste BOZKURT, Metin USLU, Çağla MOZAKOĞLU, Meryem ATAY ve şu an hatırlayamadığım bütün arkadaşlarıma çok teşekkür ederim, iyi ki varsınız.

Son olarak bütün hayatım boyunca yanımda olan, doğduğum günden beri desteklerini hiç eksik etmeyen ve bugünlere gelmemde çok büyük emeği olan aileme sonsuz teşekkürler.

Ağustos 2019

İsa Beytullah DOĞAN

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ .....	ix
ÖZET.....	x
SUMMARY.....	xii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR .....</b>	<b>3</b>
2.1. AĞIR METALLER .....	3
2.1.1. Kadmiyum (Cd).....	4
2.1.1.1. Kadmiyum Klorür ( $CdCl_2$ ) .....	6
2.1.1.2. Kadmiyum Toksisitesi.....	6
2.1.2. Alüminyum (Al).....	8
2.1.2.1. Alüminyum Sülfat ( $Al_2(SO_4)_3$ ).....	10
2.1.2.2. Alüminyum Toksisitesi.....	10
2.2. MİKRONÜKLEUS.....	11
2.2.1. Mikronükleus Oluşum Mekanizmaları.....	12
2.2.1.1. Asentrik Kromozom Parçacıkları Kökenli Mikronükleus Oluşumu .....	12
2.2.1.2. Bütün Kromozom Kökenli Mikronükleus Oluşumu.....	12
2.3. MİKRONÜKLEUS TESTİ (CBMN ASSAY).....	14
2.3.1. CBMN Tekniği Uygulanışı.....	14
2.3.2. CBMN Testi Değerlendirmesi .....	15
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM.....</b>	<b>17</b>
3.1. DENEY MATERYALLERİ .....	17
3.1.1. Kadmiyum Klorür ( $CdCl_2$ ) .....	17
3.1.2. Alüminyum Sülfat ( $Al_2(SO_4)_3$ ) .....	17
3.2. DENEY GRUBU.....	17
3.3. DENEY SÜRECİ.....	18
3.3.1. Kanların Temini ve Kültüre Alınması .....	18

3.3.2. Metal Dozlarının ve CytoB'nin Kültüre Eklenişi .....	19
3.3.3. Fiksasyon ve Preparatların Hazırlanması .....	19
3.3.4. Boyama ve Preparatların Kapatılması .....	19
3.4. PREPARATLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ .....	20
3.5. İSTATİSTİKSEL METOT.....	22
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>23</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>29</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>31</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>37</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Asentrik parçacıklardan mikronükleus oluşum şeması (Fenech, 2006). ....	13
Şekil 2.2: Skorlanabilir binükleat hücre kriterleri (Fenech ve diğ. 2003). ....	16
Şekil 2.3: Skorlanabilir mikronükleus kriterleri (Fenech ve diğ. 2003). ....	16
Şekil 3.1: Kültür aşaması. ....	18
Şekil 3.2: Gözlemlenen mikronükleus örnekleri. ....	20
Şekil 3.3: Işık mikroskobu altında mikronükleus örnekleri (Fenech ve diğ. 2003). ....	22
Şekil 4.1: CdCl <sub>2</sub> , dozlara göre mikronükleus oluşum grafiği. ....	24
Şekil 4.2: CdCl <sub>2</sub> , dozlara göre Pİ karşılaştırmalı grafiği. ....	25
Şekil 4.3: Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> , dozlara göre mikronükleus oluşum grafiği. ....	27
Şekil 4.4: Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> , dozlara göre Pİ karşılaştırmalı grafiği. ....	28

## TABLO LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 2.1:</b> Reaktif Oksijen Türleri (ROS) (Preiser, 2012).....	7
<b>Tablo 4.1:</b> CdCl <sub>2</sub> doz-cevap tablosu.....	23
<b>Tablo 4.2:</b> Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> doz-cevap tablosu.....	26





## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
<b>*OH</b>	: Hidroksil Radikali
<b>°C</b>	: Santigrat Derece
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µM</b>	: Mikromolar
<b>Al</b>	: Alüminyum
<b>Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub></b>	: Alüminyum Sülfat
<b>Cd</b>	: Kadmiyum
<b>CdCl<sub>2</sub></b>	: Kadmiyum Klorür
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*</b>	: Hidrojen Peroksit
<b>IU</b>	: Uluslararası birim
<b>KCl</b>	: Potasyum Klorür
<b>O<sub>2</sub>*</b>	: Süperoksit Radikali
<b>p</b>	: İstatistiksel Anlamlılık Değeri
<b>R<sup>2</sup></b>	: Determinasyon Katsayısı

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>CytoB</b>	: Sitokalsin B
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>FISH</b>	: Floresan İn Situ Hibridizasyon
<b>IARC</b>	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
<b>MN</b>	: Mikronükleus
<b>PHA</b>	: Fitohemaglutinin
<b>PI</b>	: Proliferatif İndeks
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### AĞIR METAL İYONLARININ İNSAN LENFOSİTLERİ ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN MİKRONÜKLEUS TEKNİĞİYLE BELİRLENMESİ

İsa Beytullah DOĞAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Tuncay ORTA

Çevremizdeki ağır metal konsantrasyonları, günümüzde sanayileşme ve endüstrinin giderek çoğalması ve pek çok metal bileşiğinin günlük hayatımızda yer bulan araç gereçlerde kullanılması neticesinde giderek artmaktadır. Birçok metal iyonu insan metabolizması için esansiyel öneme sahip olsa da bazı ağır metallerin yüksek konsantrasyonlarının toksik karakter gösterdiği pek çok bilimsel çalışmayla ortaya konulmuştur. Olası toksik etkiler doku, hücre ve molekül seviyesinde gözlemlenebilir.

Ağır metaller elementtir ve yer kabuğunun doğal bileşenleridir. Bu sebeple birçok organik veya inorganik kirleticinin ve toksik materyalin aksine daha zararsız bileşenlere indirgenemez veya yok edilemezler. Bu sebeple özellikle hayatımıza sık olarak giren bazı ağır metaller için geri dönüşüm programları hayata geçirilmiştir. Fakat günümüzde hem bu geri dönüşüm programlarının yeterli derecede uygulanmaması hatta bazı metaller için gerçekleştirilmemesi, hem de kullanımlarının giderek artması sonucu ağır metal kirliliği büyük bir sorun haline gelmiştir.

Ağır metallerin sitotoksik ve genotoksik etkileri her bir elemente göre değişiklik gösterebilmektedir fakat temelde toksisite mekanizmaları direkt ve indirekt olarak iki ana başlık altında toplanabilir. İndirekt etkiler de DNA tamir mekanizmalarını engellemeleri, oksidatif stres oluşumunu tetiklemeleri ve hücre bölünmesi kontrol mekanizmasını devre dışı bırakabilmeleri olarak sıralanabilir.

Alüminyum (Al) ve kadmiyum (Cd) elementlerinin insan lenfosit hücreleriyle etkileşiminin incelendiği bu çalışmada, bu metallerin suda çözülebilen tuz formları olan alüminyum sülfat ( $Al_2(SO_4)_3$ ) ve kadmiyum klorür ( $CdCl_2$ ) kullanılmıştır. Taşıyıcı olarak suyun tercih edilmesinin nedeni, diğer çözücülerin de kendilerine has olası toksik etkilerinin deney sonuçlarına negatif olarak yansımalarının önüne geçmektir.

Bu çalışmada yöntem olarak, sigara kullanmayan sağlıklı üç bireylerden temin edilen periferik kan lenfositleri incelenecek olan metallerin tuz formlarıyla muamele edilmiş, elde edilen preparatların değerlendirilmesi için mikronükleus tekniği kullanılmıştır. Bu teknik, uygulama ve değerlendirme aşaması basit, hızlı ve güvenilir olduğu için tercih edilmiştir. İncelenen periferik kanlar, kültüre alındıktan sonra “Phytohaemagglutinin” (PHA) ile muamele edilmiş ve mitozu girmeleri sağlanmıştır. Daha sonra kültürle metaller eklenmiş, son aşamada ortama “Cytochalasin-B” (CytoB) ilave edilerek metafaz aşamasında kalıp bölünmesi durdurulan binükleat hücrelerdeki kromozom hasarı, gözlemlenen mikronükleus (MN)’ların skorlanması ile değerlendirilmiştir.

Doz başına 1000 binükleat hücrenin değerlendirildiği bu çalışmada her bir doz, kendi kontrol grubuyla ki kare testi uygulanarak karşılaştırılmıştır. Her iki metalde de belirli dozlarda kontrol grubunun 1,5-2 katı kadar mikronükleus artışı gözlemlenmiş fakat elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir. Bununla birlikte aynı metal için elde edilen sonuçlar donör grupları arasında tek yönlü anova testi uygulanarak birbiriyle karşılaştırıldığında, her iki metal için de bireylerdeki mikronükleus artışları arasında anlamlı farklılık gözlemlenmiştir ( $p < 0,0001$ ).

Her iki metal ve donörler için proliferatif indeksler (PI) de ayrıca değerlendirilmiştir. Preparatlardaki bütün hücrelerin skorlanmasıyla hesaplanan bu değerler kullanılarak, uygulanan dozlara göre hücrelerin sağ kalım grafikleri çizilmiş ve regresyon analizi kullanılarak birbiriyle karşılaştırılmışlardır. Hücrelerin PI değerleri, her iki metal için, doza bağlı olarak anlamlı şekilde düşüş göstermiştir ( $p < 0,01$ ,  $R^2 > 0,7$ ). Ayrıca PI değerleri her bireye özgün bir şekilde farklılık göstermesine rağmen, aynı metal için dozlara verilen cevapların, regresyon grafiğinde çizilen doğruların eğimleri karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde paralellik gösterdiği görülmüştür ( $p > 0,5$ ).

Ağustos 2019, 50 sayfa.

**Anahtar kelimeler:** ağır metaller, alüminyum, kadmiyum, mikronükleus, toksisite.

## **SUMMARY**

### **M.Sc. THESIS**

#### **DETECTING GENOTOXIC EFFECTS OF HEAVY METAL IONS ON HUMAN LYMPHOCYTHES BY MICRONUCLEUS TECHNIQUE**

**İsa Beytullah DOĞAN**

**İstanbul University**

**Institute of Graduate Studies in Sciences**

**Department of Biology**

**Supervisor : Prof. Dr. Tuncay ORTA**

Recently, the concentration of heavy metals in our environment has increasingly been on the rise as a result of industrialization, modernization and the use of many heavy metals in production of materials that we use in our everyday lives. Although many metal ions are essential to human metabolism, many scientific studies have demonstrated the toxicological character of heavy metals at higher concentrations. Some of the toxic effects may be observed at the tissue, cellular and molecular levels.

Heavy metals are elements and are present in natural composition of Earth's crust. For this reason; as opposed to many toxic organic or inorganic impurities, they cannot be destroyed, eliminated, or reduced to less harmful derivatives. Hence, recycling programs have been developed especially for those heavy metals that are routinely used in our daily lives. However, the heavy metal pollution has still been a big issue because these recycling programs have either not adequately been applied to; even not at all implemented for some of the metals, or consumption of them have increased.

The cytotoxic and genotoxic effects of heavy metals may be showing differences based on each element but toxicity mechanism essentially may be classified as direct and indirect. The indirect effects can be listed as inhibition of DNA repair mechanisms, triggering the formation of oxidative stress and deregulating the cell division mechanisms.

In this study, in which the interactions of aluminum (Al) and cadmium (Cd) elements with human lymphocyte cells were examined, the water-soluble salt forms of aluminum sulfate ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ) and cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$ ) were used. The reason why water is used as a carrier solvent is to prevent the possibility of special toxic effects of other solutions that may have a negative impact to the experimental results.

As for the method used in this study; the peripheral blood lymphocytes drawn from non-smoking three healthy volunteers treated with the salts of the metals intended to be investigated and micronucleus technique was used for the evaluation of the samples obtained. This technique was preferred because the application and the evaluation stages were simple, fast, and reliable. After the peripheral blood samples cultured, they were treated with “Phytohaemagglutinin” (PHA) to undergo a mitotic division. Then, metals were added to the cultures, and at the last stage; the chromosome damage in binucleate cells, the division of which was stopped at metaphase stage by adding “Cytochalasin-B” (Cytob), were evaluated by scoring of observed micronuclei (MN).

In this study where 1000 binucleate cells were evaluated per dose, each dose was compared with its own control group by applying chi-square test. For both metals, at certain doses an increase of 1.5 to 2 times micronucleus as the control group was observed but the results obtained were not found to be statistically meaningful. Besides, when the obtained results of the same metal are compared with each other between the donor groups using the one-way anova test, there have been a meaningful difference between micronucleus increases in different individuals ( $p < 0.0001$ ).

The proliferation index (PI) values for both metals and the donors were also evaluated. The cell survival graphs were drawn based on doses by using the calculated values from the all scored cell samples and compared with each other by using the regression analysis. For both metals, the PI values have shown a meaningful decrease based on the dose ( $p < 0.01$ ,  $R^2 > 0.7$ ). In addition, despite the PI values show differences for each individual, when the curves of lines drawn in regression graph are compared, a meaningful parallelism is observed ( $p > 0.5$ ) for the response to doses for the same metal.

August 2019, 50 pages.

**Keywords:** aluminium, cadmium, heavy metals, micronucleus, toxicity.

## 1. GİRİŞ

“Ağır metal”, yıllar boyunca üzerinde konsensüs sağlanamamış bir terimdir (Duffus, 2002). Birçok disiplinde ağır metal teriminin karşılığı farklıdır ve kesin bir kategorizasyon yapmak mümkün değildir. Bu terimin altını dolduran kriterlerden biri “toksikite”dir ve bu çalışmada da kadmiyum (Cd) ve alüminyum (Al) elementlerinin toksisitesi incelenmiştir. Kadmiyum elementinin yoğunluğu  $8,65 \text{ g/cm}^3$ ’tür ve ağır metal tanımı için en çok kullanılan “yoğunluk” kriterini karşılar. Alüminyum ise  $2,7 \text{ g/cm}^3$  olan yoğunluğu ve göreceli olarak düşük toksisitesi yüzünden bazı araştırmacılar tarafından ağır metal olarak kabul edilmemektedir. Yine de her iki elementin de toksisitesinin araştırılması, günümüzde bu metallerin endüstride yoğun olarak kullanılması ve günlük yaşamımızın bir parçası haline gelmelerinden ötürü önemlidir.

Bu çalışmada ağır metal olarak yer bulan kadmiyum ve alüminyum elementlerinin suda çözülebilen tuz formları olan kadmiyum klorür ( $\text{CdCl}_2$ ) ve alüminyum sülfat ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ) kullanılmıştır. Bu bileşiklerinin ilk etapta belirlenen yedi dozu, gönüllü olarak çalışmaya katılan 25-35 yaş aralığında 3 kişinin periferik kanları kullanılarak elde edilen kültürlere uygulanmıştır. Bu kişilerin herhangi bir kronik hastalıkları ve sürekli kullandıkları bir ilaç yoktur. Ayrıca sigara kullanmamaktadırlar ve geçmişlerinde bilinen herhangi bir genotoksik ajana maruz kalmamışlardır. İlk deneylerden elde edilen sonuçlara göre metal başına 2 doz deneyden çıkarılmış ve toplam doz sayısı beşe düşürülmüştür.

Her bir metal için kabaca 2 inceleme metodu kullanılmıştır ki bunlardan biri metallerin genotoksik etkilerini mikronükleus oluşumu sayesinde değerlendirmemizi sağlarken, bir diğeri ise sitotoksik etkilerin gözlemlenip yorumlanabilmesi açısından önemlidir. Metallerin hangi doz aralığında test edileceği, proliferatif indeks (PI) değerlerinin yorumlandığı bu ikinci metot sayesinde belirlenmiştir.

Bu metotlardan ilkinde lenfosit hücrelerindeki mikronükleus oluşumunun metallerin dozlarına bağlı olarak artışı “Sitokinez-Bloklanmış Mikronükleus Tekniği” (Cytokinesis-Block Micronucleus Technique) kullanılarak değerlendirilmiştir. Mikronükleuslar, mitoz bölünme geçiren hücrelerde görülür. Kopmuş bir kromozom parçasının veya kutuplara çekilemeyen bir kromozomun yavru hücrelerden birinde oluşturduğu ufak, çekirdek benzeri yapılardır ve genotoksikite çalışmalarında biyomarker olarak kullanılırlar.

Mikronükleus testi, mikronükleus artışlarını değerlendiren metotlardan birisidir ve pratik olması, maliyetinin düşük olması ve değerlendirmesinin kolay olması gibi avantajları vardır (Fenech ve Morley, 1986). Belirlenen dozlarla muamele edilen lenfosit kültürlerinden elde edilen preparatların bu teknikle skorlanan mikronükleus sayılarındaki artışlar, her donörün kendi kontrol grubuyla, istatistiksel yöntem olarak ki kare testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Ayrıca her bireyin kendisine has ortalama mikronükleus frekansı (Background Frequency) farklılık gösterebileceğinden, donörlerin doz-cevap değerlerinin direkt olarak karşılaştırılmasından ziyade, oluşan modellerin karşılaştırılması yapılmış, istatistiksel metot olarak tek yönlü anova testi kullanılmıştır.

Bir diğer değerlendirme yöntemi olarak ise lenfosit hücrelerinin Pİ değerlerinin metal dozlarına verdiği cevaplar kullanılmıştır. Metallerin sitotoksitesinin incelendiği bu metotta her bir doz karşılığında gözlemlenen Pİ değerlerine regresyon analizi uygulanmış, elde edilen sonuçların anlamlılığı değerlendirilmiştir. Ayrıca her iki metal için ayrı olarak, bireylerin doz-cevap grafikleri çizilerek elde edilen sağ kalım modellerinin benzer olup olmadığı, her bir bireyin regresyon grafiğinde gözlemlenen doğruların eğimleri karşılaştırılarak analiz edilmiştir.

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. AĞIR METALLER

Günümüzde sözlük anlamı “görece olarak yüksek yoğunluklu veya yüksek atom ağırlıklı metaller” olmasıyla birlikte; ağır metal terimini bilimsel olarak ilk kullanan bilim insanı Niels Janniksen Bjerrum olmuştur. Bjerrum (1936), yoğunluğu  $4 \text{ g/cm}^3$ 'ten daha az olan metaller için “Hafif Metal”,  $7 \text{ g/cm}^3$ 'ten daha ağır olanlar için ise “Ağır Metal” terimlerini kullanmış ve metalleri yoğunluğuna göre 2 gruba ayırmıştır. Daha sonra birçok araştırmacı ağır metal sınıflandırması için farklı minimum yoğunluk değerleri kullanmış fakat zaman içerisinde belirli bir değerde ortak görüş sağlanamamıştır. Yakın tarihte yapılan pek çok çalışmada ise genel olarak bir metalin ağır metal olarak değerlendirilebilmesi için minimum yoğunluk değeri  $5 \text{ g/cm}^3$  olarak alınmıştır (Brewer ve diğ. 1983; Parker, 1989). Zamanla farklı disiplinlerden bilim insanları, ağır metal tanımlaması için yoğunluk kriteri dışında atom ağırlığı, atom numarası, toksisite ve çeşitli kimyasal özellikleri de referans almışlardır (Duffus, 2002).

Bu çalışmada “Ağır Metal” terimi, yoğunluktan ziyade toksisite karakteri baz alınarak kullanılacaktır. Scott ve Smith (1981) ağır metaller için “genel olarak endüstride kullanılan, hayvanlar, aerobik ve anaerobik canlılar için toksik olan fakat hepsi yoğun veya tamamen metal olmayan elementler” tanımlamasını yapmış ve Arsenik (As) ve Alüminyum (Al) gibi yoğunluğu düşük, hatta metaloit elementleri de bu tanım altında toplamıştır. Hodgson ve diğ. (1988)'nin tanımına göre ise ağır metal, kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), cıva (Hg) ve benzeri görece toksik elementleri içine alan, zamanı geçmiş bir terimdir.

İnsanoğlu, çok eski tarihlerden beri ağır metalleri kullanmakta ve maruz kalmaktadır. Örneğin kurşunun yapı materyali ve savaş aleti olarak kullanılması 5000 yıl öncesine kadar dayanmaktadır. Hatta Antik Romalılar, şarap tatlandırıcısı olarak kurşun asetat kullanmışlardır ve günde bir gram civarında kurşun tükettikleri düşünülmektedir (Järup, 2003). Yakın geçmişte, özellikle sanayi devriminden sonra ise ağır metal kullanımında ciddi oranda artış olmuştur. Alaşımlarında olduğu gibi direkt kullanımları dışında, birçok sanayi dalında, madencilikte hatta sağlık sektöründe yardımcı madde olarak kullanılmaktadırlar. Bununla birlikte fosil yakıtların da yoğun olarak kullanılması, popülasyon yoğunluğu neticesinde çöp ve kanalizasyon atıklarının aşırı birikimi, gübre ve zirai ilaçların giderek artan kullanımı sonucu, ağır metal kirliliği günümüzde önemli bir sorun haline gelmiştir (Basile ve diğ. 2012).



Ağır metaller yer kabuğunun doğal bileşenleridir. Toprakta ve kayaların yapısında maden cevherleri olarak bulunurlar ve birçok organik kirleticinin ve toksik materyalin aksine ağır metaller yıkıma uğramaz veya yok edilemez (Wu ve diğ. 2016). Bu sebeple volkanik patlamalar ve erozyon gibi doğa olayları da ağır metal kirliliğinde önemli bir rol oynar (Shallari ve diğ. 1998; He ve diğ. 2005).

Her ağır metal elementi kendine özel atomik yapıya ve moleküler mekanizmalara sahip olduğu için fizyokimyasal davranışları ve doğal olarak toksisite mekanizmaları da kendilerine hasır (Tchounwou ve diğ. 2012). Bu mekanizmaların bir kısmı henüz anlaşılmış durumda olmasa da genel olarak hücre duvarı, organelleri ve genetik materyallerle etkileşime girdikleri, ayrıca bazı enzimlerin yapısını bozarak metabolik süreçleri olumsuz şekilde etkiledikleri birçok çalışmayla gösterilmiştir (Squibb ve Fowler, 1981). Bu direkt etkilerin yanı sıra ağır metallerin indirekt olarak genotoksik ve sitotoksik etkileri; oksidatif stres oluşumunu tetiklemeleri, DNA tamir mekanizmalarını engellemeleri ve mitojenik sinyal yollarını etkileyerek hücre bölünmesi kontrol mekanizmasını devre dışı bırakabilmeleri olarak kabaca üç ana başlık altında toplanabilir (Beyersman ve Hartwig, 2008).

Bir kısım metaller canlıların yaşamı için gereklidir ve eksiklikleri hastalıklara hatta bazı fonksiyon kayıplarına neden olur. Bazı enzimlerin yapısında bulunurlar ve birçok reaksiyonda önemli rol üstlenirler. “Mikronütrientler” olarak adlandırılan bu gruba giren elementlerden bazıları krom (Cr), magnezyum (Mg), demir (Fe), selenyum (Se), çinko (Zn), bakır (Cu), mangan (Mn), molibden (Mo), kobalt (Co) ve nikel (Ni)’dir. Mikronütrientlerin eksikliği sonucu çeşitli sağlık, gelişim ve fonksiyon sorunları görülebileceği gibi, gereğinden fazla alınmaları durumunda da toksik etkileri görülebilir (Rengel, 2004).

### **2.1.1. Kadmiyum (Cd)**

Atom numarası 48, atom ağırlığı 112 olan Cd, doğada çinko cevheri ile birlikte bulunur ve genel olarak çinko madenciliğinde yan ürün olarak elde edilir. Normal şartlarda erime sıcaklığı 321,07 °C, kaynama sıcaklığı ise 765 °C’dir. <sup>106</sup>Cd, <sup>108</sup>Cd, <sup>110</sup>Cd, <sup>111</sup>Cd, <sup>112</sup>Cd, <sup>113</sup>Cd, <sup>114</sup>Cd ve <sup>116</sup>Cd olmak üzere 8 stabil izotopu vardır. Yoğunluğu 8,65 g/cm<sup>3</sup> tür ve ağır metal olarak kategorize edilir.

Saf metal hali yumuşak, işlenmesi kolay, hafif maviye çalan gümüş renkte, tatsız ve kokusuzdur. Elektropozitifdir ve suda çözünmez fakat suda çözünebilen tuz formları kurabilir. Ayrıca birçok amin, klor ve sülfür grubuyla kompleks moleküller oluşturabilir (Adriano, 2001).

Günümüzde Cd bileşikleri ve alaşımlarının kullanımı toksik karakterinden dolayı giderek azaltılmaya çalışılsa da otomotiv başta olmak üzere birçok endüstri dalında elektrolitik kaplamada, sertleştirici olarak PVC üretiminde ve pigment olarak boya üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca pil üretiminde yerini yavaş yavaş lityum (Li) tabanlı pillere bırakmasına rağmen halen kullanımda olan nikel-kadmiyum pillerde (Ni-Cd) ve kadmiyum-tellürit güneş panellerinde de bulunmaktadır. Bu kadar yoğun kullanımına ve bilinen kanserojen etkilerine rağmen Cd için etkili bir geri dönüşüm programı bulunmamaktadır (Rahimzadeh ve diğ. 2017).

Kadmiyumun insan vücuduna alınımı genel olarak solunum ve beslenme yoluyla gerçekleşir. Kadmiyum klorür ( $CdCl_2$ ) gibi tuz formlarının sudaki çözünürlüğü çok yüksektir ve tarımda fosforlu gübre kullanımı ve atık sularla yapılan sulama faaliyetleri neticesinde yetiştirilen bitkiler vasıtasıyla besin zincirine katılabilir. Ayçiçeği (*Helianthus sp.*) ve tütün (*Nicotiana sp.*) gibi bazı bitkiler Cd için biyoakümülatör özelliktedir ve topraktan yüksek miktarda Cd alarak bu sürece destek olurlar (Chaney ve diğ. 1999; Li ve diğ. 1995). Su habitatlarında ise krustaseler ve yumuşakçalar gibi ortam suyunu filtre ederek beslenen canlılar Cd'un besin zincirine girmesine neden olurlar (Satarug ve diğ. 2003). Sigara kullanımı da Cd alımını önemli ölçüde arttıran etmenlerden biridir. Yapılan araştırmalara göre sigara kullanan bireylerin kan ve doku örneklerinde Cd miktarı kontrol gruplarına göre ortalama 5 kat daha fazla bulunmuştur. Her ne kadar bu oran tek başına tehlikeli boyutlarda olmasa da sigaraya bağlı kanser vakalarında önemli bir etken olarak görülmektedir (Järup ve diğ. 1998; Hossn ve diğ. 2001; Munisamy ve diğ. 2013).

Kadmiyumun mikronütrientler gibi insan vücudunda düşük miktarlarda dahi olsa kullanım alanı olmasa da deniz diatomlarında bulunan karbonik anhidraz (Carbonic Anhydrase) enziminin yapısına katıldığı keşfedilmiştir. Bu canlıların optimum büyüme hızlarını düzenlemek için kobalt, kadmiyum ve çinko elementlerini karbonik anhidraz enzimlerinin yapısında dönüşümlü olarak kullandıkları anlaşılmıştır (Lane ve Morel, 2000; Lane ve diğ. 2005).

### 2.1.1.1. *Kadmiyum Klorür (CdCl<sub>2</sub>)*

Beyaz renkte ve kristal yapıda olan CdCl<sub>2</sub>, su ve alkolde yüksek derecede çözünürlüğü olan toksik bir Cd tuz formudur. Kokusuzdur ve yanıcı değildir. Molar kütlesi 183,314 g/mol, erime sıcaklığı 568 °C, kaynama sıcaklığı ise 964 °C'dir. Kumaş boyama, fotoğrafçılık, galvanoplasti gibi pek çok alanda kullanılır.

### 2.1.1.2. *Kadmiyum Toksikitesi*

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) ve benzeri birçok düzenleyici kuruluş, Cd ve Cd içeren bileşikleri kanserojen olarak sınıflandırmıştır. Biyolojik yarı ömrü insanlarda 20-30 yıl arasındadır ve ekseriyetle yumuşak doku ve organlarda birikme eğilimi gösterir. İnsanlarda, sindirim yoluyla Cd Emilimi %5 civarındayken, solunum yoluyla emilim %25-50 civarındadır. Akciğerlerde absorbe edilen Cd iyonları %90 oranda kana karışır ve dolaşım sistemi yoluyla karaciğer, böbrek ve testislerde depolanır. Kan ve diğer dokularda uzun süreli tutulmayan Cd'un yarısından fazlası böbrek ve karaciğerde birikir (Goering ve diğ. 1995).

Hayvanlar üzerinde yapılan birçok in-vitro deneyde, Cd tuzlarının DNA zincir kırıklarına, gen mutasyonlarına, mikronükleus ve kromozom aberasyonlarının oluşumuna neden olduğunu gösterilmiş fakat izole edilmiş genetik materyaller ve hücre ekstraktları üzerinde yapılan çalışmalarda Cd'un herhangi bir hasara sebebiyet vermediği ve kuvvetli derecede mutajenik olmadığı gözlemlenmiştir (Waalkes ve Misra, 1996; Waalkes, 2000). Araştırmacılar bu durumu Cd'un DNA'ya direkt olarak etki etmediği şeklinde yorumlamış ve Cd genotoksitesisi ile ilgili üç endirekt mekanizma üzerinde durmuşlardır. Bunlar oksidatif stres artışının tetiklenmesi, DNA tamir mekanizmasının engellenmesi ve hücre çoğalma mekanizmasının kontrolünün bozulmasıdır (Beyersmann ve Hartwig, 2008; Rahimzadeh ve diğ. 2017).

Oksijenli solunum yapan hücrelerde, oksidatif reaksiyonlar sonucu "Reaktif Oksijen Türleri" (ROS) olarak adlandırılan ürünler ortaya çıkar (Tablo 2.1). En önemlileri "Hidroksil" (\*OH), "Süperoksit" (O<sub>2</sub><sup>\*</sup>) serbest radikalleri ve "Hidrojen Peroksit" (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)'tir (Frisard ve Ravussin, 2006). Bu yapılar hücre yaşamsal faaliyetlerini sürdürürken doğal olarak ortaya çıkarlar. Hücrenin bu durumla başa çıkmasında ise "Antioksidan" isimli yapılar baş rol oynar. Antioksidanlar, kendileri bozulmadan ve kararsız forma dönüşmeden ROS molekülleriyle etkileşime girer ve onları nötralize eder. Oksidanlar ve antioksidanlar arasında hücreye zarar verebilecek boyutlardaki dengesizliğe ise "Oksidatif Stres" adı verilir (Spies, 1985).

Kadmiyum, Glutasyon Redüktaz, Glutasyon Peroksidaz, Katalaz, bakır/çinko-dismütaz ve Süperoksit Dismütaz gibi antioksidan enzimlerini inaktive etmesinin yanı sıra sülfidril gruplarına bağlanıp reaktif oksijen türlerinin üretimini artmasına neden olur. Bunun sonucunda hücre içinde oksidatif stres artışına sebebiyet verir ve genotoksik hasara yol açar (Stohs ve diğ. 2001; Valko ve diğ. 2006; Filipič, 2012).

**Tablo 2.1:** Reaktif Oksijen Türleri (ROS) (Preiser, 2012).

NONRADİKALLER		SERBEST RADİKALLER	
Hidrojen Peroksit	$H_2O_2$	Süperoksit Radikali	$O_2^*$
Singlet Oksijen	$1O_2$	Lipid Peroksil Radikali	$LOO^*$
Hipoklorik Asit	$HOCl$	Hidroksil Radikali	$^*OH$
Ozon	$O_3$	Peroksinitrit	$ONOO^-$
Nitrik Oksit Radikali	$NO^*$		

Oksidatif stres veya diğer etkenler sonucu (kimyasal ajanlar, radyasyon gibi) genetik materyalin hasar görmesi doğal bir durumdur. İnsanlarda hücre başına günde ortalama 10000 kadar oksidatif stres kaynaklı DNA hasarı oluşur ve tamir mekanizması tarafından birçoğu elimine edilir (Ames ve diğ. 1993). Kadmiyum oksidatif stresi arttırmasının yanı sıra bu tamir mekanizmasında görev alan bazı proteinleri de etkileyerek var olan diğer etmenlerin verdiği zararı arttırır (Hartwig ve Schwerdtle, 2002).

Her ne kadar henüz tam olarak bütün yönleriyle anlaşılmasa da Cd'un hücre çoğalma kontrol mekanizmalarını ve apoptozu etkilediği birçok çalışmayla gözlemlenmiştir. Apoptoz basitçe hücrenin kendi kendisini öldürmesi olarak tanımlanabilir. Normal şartlarda, canlı gelişiminde planlı olarak veya genetik materyal dahil hücre hasarı tamir edilemeyecek boyutlarda olduğu zaman gerçekleşir. Apoptotik hücre ölümü, kanser ve otoimmün hastalıkların ilk adımı olarak değerlendirilebilecek olan mutasyona uğramış hücrelerin birikimini engeller ve anormal hücrelerin eliminasyonunu sağlar (Waalkes, 2000).

Kadmiyumun farklı hücrelerde farklı sinyal yollarına etki etmesi, hatta konsantrasyona göre farklı sonuçlara neden olması, Cd kaynaklı apoptoz ile alakalı literatürde çelişkili yorumlara neden olmaktadır. Bazı çalışmalarda Cd'un yüksek dozlarının apoptozu tetiklediği gösterilmişken, bazılarında ise engellediği öne sürülmüştür (Messner ve diğ. 2015). Bunun dışında, bazı hücre tiplerinde Cd'un tümör baskılayıcı protein olarak bilinen p53 proteinini ve "DNA-(sitozin-5) metiltransferaz" enzimini baskıladığı gözlemlenmiştir. DNA-(sitozin-5) metiltransferaz, DNA metilasyonundan sorumludur ve azalan DNA metilasyonu tümör gelişimini tetikler (Meplan ve diğ. 1999; Takiguchi ve diğ. 2003; Beyersmann ve Hartwig, 2008).

Yirminci yüzyılın başlarında, ilk olarak akciğerlere verdiği hasarla gündeme gelen Cd'un daha sonra böbrek ve iskelet sisteminde yaptığı tahribatlar da çalışılmaya başlanmıştır. 60'lı yıllarda Japonya'da görülen "itai-itai" hastalığının kronik Cd zehirlenmesi sebebiyle oluştuğu anlaşılmıştır ve Cd'a özgü olduğu için önemlidir. Düşük dozlarda uzun süre Cd'a maruz kalınması kemiklerde mineral azalmasına ve osteoporoza neden olur. Japonya'da bazı yerel pirinç tarlalarının Cd içeren sularla sulanması ve lokal popülasyonun bu pirinçlerle beslenmesi sonucu görülen itai-itai hastalığı, osteomalazi ve osteoporoz rahatsızlıklarının birlikte görülmesi durumu olarak açıklanabilir (Järup, 2003). Bunun dışında solunum yoluyla kronik Cd alımı akciğerin yapısını bozar ve amfizeme neden olur (Davison ve diğ. 1988).

### 2.1.2. Alüminyum (Al)

Atom numarası 13, atom ağırlığı 26,981 olan Al, saf hali gümüş renginde, parlak, yumuşak ve işlenmesi kolay bir metaldir. Toplam dünya kütlelerinin % 1,59'unu oluşturan Al, yer kabuğunda % 8,3 ile en çok bulunan metal ve oksijen ile silisyumdan sonra en çok bulunan 3. elementtir (McDonough ve Sun, 1995; Greenwood ve Earnshaw, 1997). Yoğunluğu  $2,7 \text{ g/cm}^3$  tür ve bazı kaynaklara göre metaloit sayılsa da ara geçiş elementi olarak kategorize edilir. Kimyasal olarak çok reaktif olduğu için doğada nadiren saf olarak bulunabilen Al'un ana cevheri boksit kayalarındır fakat 270'ten fazla mineralle birlikte bulunabildiği bilinmektedir. Bu reaktif özelliği, hava ile temas eden kısımların ince bir "Alüminyum Oksit" ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) tabakası ile kaplanmasını ve oksitlenmenin daha fazla ilerlememesini sağlar. Bu nedenle Al'un saf metal halinin korozyon rezistansı oldukça yüksektir (Vargel, 2004). Normal şartlarda erime sıcaklığı  $660,32 \text{ }^\circ\text{C}$ , kaynama sıcaklığı ise  $2470 \text{ }^\circ\text{C}$ 'dir.

Alüminyumun bilinen tek stabil izotopu  $^{27}\text{Al}$ 'dir. Radyoaktif izotopları arasında ise en stabil olanı  $^{26}\text{Al}$ 'dir ve Argon (Ar) elementinin atmosferde kozmik radyasyon ile etkileşime girmesi sonucu oluşur.  $^{26}\text{Al}$  izotopunun yarı ömrü ortalama 720000 yıldır ve  $10^5$ - $10^6$  yıl skalasında yaş tahmininde kullanılır (Dickin, 2005).

Metalik alüminyum, boksitten elde edilen  $\text{Al}_2\text{O}_3$ 'ün özel bir süreçle elektroliz edilmesiyle elde edilir ve bu işleme "Hall-Héroult Prosesi" (Hall-Héroult Process) adı verilir. Alüminyum oksitinin erime sıcaklığı  $2072\text{ }^\circ\text{C}$ 'dir ve yüksek enerji gereksinimi sebebiyle direkt elektrolizi pratik değildir. Hall-Héroult prosesinde önce boksit cevherinden "Bayer Prosesi" (Bayer Process) ile elde edilen  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , eritilmiş "Kriyolit" (Cryolite, soğuk taş,  $\text{Na}_3\text{AlF}_6$ ) minerali içinde çözülür. Kriyolitinin erime sıcaklığı  $1000\text{ }^\circ\text{C}$ 'nin biraz üzerindedir ve erime noktasının görece düşük olması, elektriği iletmemesi gibi özelliklerinden dolayı elektrolit olarak tercih edilir. Daha sonra bu karışıma "Alüminyum Florid" ( $\text{AlF}_3$ ) eklenerek erime noktası daha da düşürülür ve elektroliz  $940$ - $980\text{ }^\circ\text{C}$  aralığında gerçekleştirilir (Totten ve diğ. 2003).

Üretiminin meşakkatli olması ve üretim prosesinde fazla elektrik harcanmasından dolayı atık Al geri dönüştürülmektedir. Geri dönüşüm işlemi atığın eritilmesi ile olur ve bu işlemde cevherden elde edilirken harcanan enerjinin sadece %5 kadarı kullanılır. Geri dönüşüm işleminde metalin %15 kadarı cüruf olarak kaybedilse de daha sonra çıkan cürufun da büyük çoğunluğu geri dönüştürülür. Bu ikinci işlemin sonucunda oluşan atık ise dolgu malzemesi olarak asfalt yapımında kullanılır (Dunster ve diğ. 2005).

Alüminyum doğada bol bulunan bir element olması, toksisitesinin görece az olması, işlenmesi kolay, yoğunluğu az ve alaşımlarının hafif ve sağlam olması, ısı iletiminin iyi olması, dayanıklılığı gibi özelliklerinden dolayı günlük hayatımızda sık sık karşımıza çıkan bir elementtir. Metalik olarak hemen hemen her zaman magnezyum, bakır, silisyum, mangan ve çinko gibi metallerle birlikte alaşımlar halinde kullanılır. Bu alaşımları gıda paketlemede, yapı malzemesi olarak inşaat sektöründe, otomobil, uçak ve uzay sanayisinde ve dekoratif ev eşyalarının yapımında yoğun olarak kullanılan Al, elektronik eşyalarda yüksek ısı iletiminden ve ucuz olmasından dolayı ısı emici materyali olarak tercih edilir. Oluşturduğu bazı kimyasal bileşikler ise endüstride kağıt üretiminde, boya sanayinde, su arıtma tesislerinde, dericilikte ve kozmetik ürünlerinin üretiminde katalizör olarak kullanılır.

### 2.1.2.1. Alüminyum Sülfat ( $Al_2(SO_4)_3$ )

Alüminyum sülfat beyaz kristal yapıda, suda ve nispeten alkolde çözülebilen, kokusuz ve higroskopik bir alüminyum tuzudur. Molar kütlesi 342,15 g/mol olan  $Al_2(SO_4)_3$ 'ün normal şartlarda erime sıcaklığı 770 °C, kaynama sıcaklığı ise 1600 °C civarındadır. Kağıt üretiminde, tekstil sektöründe boyamada, PH düşürme amacıyla tarımda kullanımının yanı sıra içme suyu arıtımında koagülant olarak kullanılır.

### 2.1.2.2. Alüminyum Toksisitesi

Doğada bu kadar çok bulunmasına rağmen canlı vücudunda bilinen bir görevi olmayan Al, insan vücuduna solunum ve beslenme yoluyla alınır. İçme suyu normalde gıdalara nazaran daha fazla Al içerir (Dolara, 2014) ve bazı araştırmacılar gıdalarla alımına nazaran içme suyundan daha fazla Al alındığını iddia etmişlerdir. Yokel ve diğ. (2008)'nin yaptığı çalışmalar ise durumun tam tersi şekilde olduğunu, gastrointestinal yollarla absorbe edilen Al'un su ile alındandan daha fazla olduğunu göstermektedir. Memeliler üzerinde yapılan çalışmalarda, hayvanlara oral ve intravenöz yollarla verilen Al'un %58-70 oranla başta kemik dokuları olmak üzere beyin, karaciğer ve böbrekte biriktiği gözlemlenmiştir (Ganrot, 1986; Şahin ve diğ. 1994).

Yapılan pek çok çalışmanın sonucunda Al'un karsinogeneze neden olduğuna dair bir kanıt bulunamamış, bu sebeple Al "Toksik Madde ve Hastalık Kayıt Ajansı" (ATSDR) ve "Amerikan Sağlık ve İnsani Hizmetler Bakanlığı" (USDHHS) gibi düzenleyici kuruluşlar tarafından kanserojen olarak sınıflandırılmamıştır. IARC ise Al'u kanserojen olarak sınıflandırmamakla birlikte, Al üretimini kanserle ilişkilendirmiştir (Krewski ve diğ. 2007). Bununla birlikte, Kumar ve Gill (2009), Al'un yüksek konsantrasyonlarının hücrelerde bazı enzimlerin aktivitesini etkilediğini ve mitokondrinin fonksiyonunu bozduğunu göstermiş ve bunun oksidatif stresin artmasına neden olabileceğini söylemişlerdir.

Alüminyum toksisitesi, oluşturduğu bileşiğin kimyasal formuna, alınış şekline, dozuna ve maruz kalma süresine bağlı olduğu gibi, ilgili kişinin toleransına ve alınan elementin vücuttan uzaklaştırılabilme kabiliyetine göre de değişkenlik gösterir. Böbrek yetmezliği olan bireyler Al zehirlenmesi ve ilgili rahatsızlıklara daha yatkındır çünkü oral yolla alınan Al'un büyük çoğunluğu dışkı ile uzaklaştırılırken, az oranda kana karışan kısmı böbrekler yardımıyla idrar yollarından atılır. Kronik Al alımı sonucu iskelet sisteminde D vitamini dirençli osteomalazi görülebilir ve kendini ağrıların yanı sıra ileri derecelerinde kemik kırılmaları olarak gösterir.

Alüminyumun ayrıca eritropoietin dirençli mikrositer anemiye de sebep olduğu gösterilmiştir. Her ne kadar Al kan-beyin bariyerini geçemese de “Alüminyum Florür” ( $AlF_3$ ) gibi bazı bileşikler geçebilir ve beyinde birikebilir. Bunun sonucunda konuşma güçlükleri, dispraksi ve felç gibi merkezi sinir sistemi rahatsızlıkları görülebilir (Balch, 2000; Willhite ve diğ. 2012).

İngiltere Camelford’da 6 Haziran 1988 tarihinde 20 ton alüminyum sülfat  $Al_2(SO_4)_3$  kazayla içme suyu rezervuarına karışmış ve Camelford halkı haftalarca milimolar mertebesinde kontamine olan içme suyunu kullanmışlardır. Altmann ve diğ. (1999)’nin çalışmalarından öğrendiğimiz üzere yöre halkından bazılarında yıllar içinde bilişsel bozukluklar görülmüştür.

## 2.2. MİKRONÜKLEUS

Mitoz bölünme geçiren hücrelerde görülen, kopmuş bir kromozom parçasının veya kutuplara çekilemeyen bir kromozomun yavru hücrelerden birinde oluşturduğu ufak, çekirdek benzeri yapılara “Mikronükleus” denir (Fenech ve diğ. 2003). Mikronükleuslar, genotoksisite biyomarkırlardır ve bu nedenle mikronükleus sayılarındaki değişimleri değerlendiren bir takım metotlar geliştirilip birçok araştırmada kullanılmıştır.

Genetik materyalin hasar görmesi ve tamir mekanizmalarıyla kontrol altında tutulması nasıl doğal bir süreç ise, mikronükleus oluşumu da doğal olarak gözlemlenir. Her hücre tipinin her bireye özgü doğal bir mikronükleus ortalaması vardır ve buna “Ortalama Mikronükleus Frekansı” (Background Frequency) adı verilir. İnsanlarda sigara kullanımına ve çevresel faktörlere bağlı olarak bu sayı artabilir. Ayrıca doğal mikronükleus frekansı, yaşa bağlı olarak da artış gösterir ve bu artış kadınlarda daha belirgindir (Bonassi ve diğ. 2001).

Mikronükleuslar ilk olarak yirminci yüzyılın başlarında Amerikalı araştırmacı William Howell tarafından kedi kırmızı kan hücrelerinde gözlemlenmiş, çağdaşı Fransız bilim insanı Justin Jolly ise çeşitli memelilerin eritrositlerinde yaptığı çalışmalar sonucu, her ne kadar kökenleri konusunda aynı görüşte olmasa da Howell’in vargılarını rafine etmiş ve desteklemiştir. Bu nedenle mikronükleus aynı zamanda “Howell-Jolly Cisimciği” (Howell-Jolly Bodies) olarak da adlandırılır (Sears ve Udden, 2012). Kimyasalların etkisiyle mikronükleus artışını ilk olarak Klein ve Diğ. (1952) ortaya koyarken, çevresel ajanlar ile mikronükleus arasındaki ilişkiyi ilk olarak çalışan, hızlandırılmış nötronların ve gamma ışınlarının bakla kök ucu hücreleri üzerindeki etkilerini araştıran Evans ve diğ. (1959) olmuştur.



### **2.2.1. Mikronükleus Oluşum Mekanizmaları**

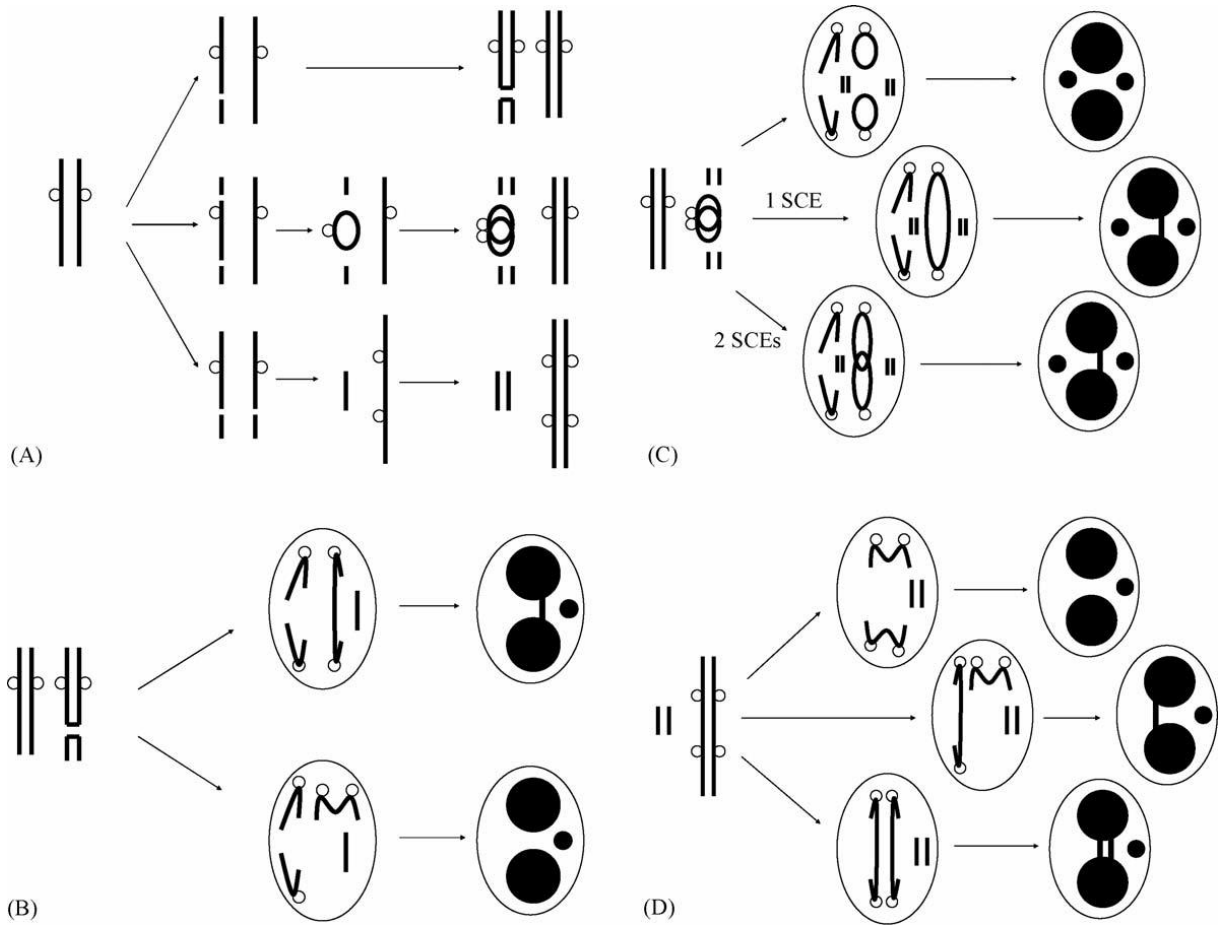
Bölünme geçirmiş ökaryotik hücrelerde görülebilen mikronükleuslar, hücre döngüsünün anafaz safhasında bir şekilde kutuplara hareket edemeyen sentromersiz (asentrik) kromozom parçacıkları veya bütün kromozomlardan kökenlenebilir. Daha sonra bu parçacıklar, telofaz evresinde nükleoplazma ile kaplanır ve oluşan yeni hücrelerde küçük çekirdekler olarak vücut bulur (Fenech, 2000).

#### ***2.2.1.1. Asentrik Kromozom Parçacıkları Kökenli Mikronükleus Oluşumu***

Asentrik kromozom parçalarının birden fazla oluşum mekanizması vardır (Şekil 2.1). DNA'da meydana gelebilecek tek zincir kırıkları, tamir mekanizmalarında görülebilecek sorunlar sebebiyle çift iplik kırığına dönüşebilir ve kopan parça mikronükleus oluşturabilir. Bunlar dışında özellikle radyasyon gibi doğrusal bir çizgide hasar oluşturabilen ajanlar, DNA üzerinde direkt olarak çift zincir kırığına sebebiyet verebilir. Kromozom parçacıkları eğer direkt olarak DNA çift zincir kırılması sonucu oluşmuşsa, ortaya çıkabilecek disentrik kromozomun sentromerlerinin farklı kutuplara çekilmesi sonucu mikronükleusun yanı sıra nükleoplazmik köprü oluşumu da gözlenebilir (Fenech, 2000; Fenech ve diğ. 2011). Bu mekanizmalarla mikronükleus ve nükleoplazmik köprü oluşumu şekil 2.1'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir (Fenech, 2006).

#### ***2.2.1.2. Bütün Kromozom Kökenli Mikronükleus Oluşumu***

Anafaz evresinde kromozomlar kutuplara doğru çekilirken (segregasyon), bütün bir kromozom herhangi bir kutba gidemeyip mikronükleus oluşturabilir. İğ iplikleri, sentromer ve sentrozomların yapısındaki bozukluklar ile birlikte mitoz kontrol noktalarındaki sorunlar ve anormal sentrozom artışı gibi etmenler bu tür mikronükleus oluşumuna sebebiyet verebilir. Ayrıca disentrik kromozomların sentromerleri anafaz esnasında ayrı kutuplara çekilmeye çalışılırsa, kromozom karşılıklı çekim gücü yüzünden iğ ipliklerinden ayrılabilir ve bunun sonucunda iki kutba da ilerleyemeyebilir. Bu mekanizmalardan hangisi sonucu mikronükleus oluşumu gözlenirse gözlenir, yavru hücrelerden birinde kromozom kaybı oluşacaktır (Gisselsson, 2008; Pampalona ve diğ. 2010; Fenech ve diğ. 2011).



(A) kısmında 3 farklı kromozom hasarından mikronükleus ve nükleoplazmik oluşumuna giden 3 farklı yol görüyoruz. Bu yollar sırasıyla (B), (C) ve (D) kısımlarında incelenecektir.

(A) kısmında üst yolu incelersek; kromozomlardan birinde çift iplik kırığı oluşmuş, tamir edilemeyen bu kırık uçlar replikasyondan sonra birbirine kaynamış ve sonuç olarak disentrik kromatid ve asentrik parça meydana gelmiştir. Bu yapı, (B) kısmında görebileceğimiz gibi 2 farklı olasılığa gider. Bunlardan üstteki yolda disentrik kromatidin her bir sentromeri anafazda ayrı kutuplara ilerler ve nükleoplazmik köprü ve mikronükleus oluşumu gözlenir. Alt yolda ise sentromerler aynı kutba çekildiği için nükleoplazmik köprü oluşumu gözlenmez.

(A) kısmında orta yolda sentromerin iki tarafında da çift iplik kırığı oluşmuş, bunun sonucunda halka şeklinde kromatid ve iki asentrik parça meydana gelmiş, bu yapının oluşturacağı olasılık (C) kısmında gösterilmiştir. Bu kısmın üst yolunda halka kromatidler normal ayrılmış ve nükleoplazmik köprü meydana gelmeden 2 mikronükleus oluşmuştur. Orta ve alt yolda ise sentromerler farklı kutuplara çekilmiş ve 2 mikronükleusa ayrıca nükleoplazmik köprü eşlik etmiştir.

(A) kısmının en alt yolunu incelediğimizde ise iki homolog veya homolog olmayan kromozomda birden çift iplik kırığı oluşmuş, bu uçların replikasyondan önce birleşmesi sonucu oluşan disentrik kromatid ve asentrik parça daha sonra replikasyona uğramıştır. Bu yapının önündeki 3 olasılık (D) kısmında gösterilmiştir. Üst yolda disentrik kromatidlerin sentromerleri aynı kutuplara gitmiş ve sadece mikronükleus oluşumu gözlemlenmiştir. Orta ve alt yolda ise disentrik kromatidlerin biri veya ikisinde birden sentromerler farklı kutuplara çekilmiştir. Bu olasılıklarda mikronükleus oluşumunun yanında sırasıyla bir veya iki nükleoplazmik köprü oluşumu gözlenir.

**Şekil 2.1:** Asentrik parçacıklardan mikronükleus oluşum şeması (Fenech, 2006).

### 2.3. MİKRONÜKLEUS TESTİ (CBMN ASSAY)

Tam adı “Sitokinez-Bloklanmış Mikronükleus Tekniği” (Cytokinesis-Block Micronucleus Technique) olan bu yöntem Michael Fenech ve Alexander A. Morley (1986) tarafından geliştirilmiştir. Bilindiği gibi klasik genotoksisite testleri ve bu testlerde kullanılan teknikler, toksik ajanların DNA molekülü üzerinde oluşturduğu hasarları ve kromozom anomalilerini değerlendirmek amacıyla yirminci yüzyılın ortalarından beri kullanılmaktadır. CBMN testi, kromozom aberasyonlarının metafaz evresinde sayımına dayalı klasik teknikler kadar ayrıntılı sonuçlar vermez fakat basit ve hızlı uygulanabilmesi ve değerlendirme aşamasının çok daha kolay olması gibi avantajları vardır. Sitokinez bloklanmış hücreler iki nükleuslu (Binükleat) halde buldukları için boyutları büyüktür ve mikronükleus skorlaması için çok daha uygundur. Ayrıca diğer mikronükleus testleri gibi bölünüp sayıca iki katına çıkmış hücreler yerine henüz sitokinez geçirmemiş hücreler değerlendirildiği için istatistiksel olarak iki kat daha hassas bir yöntemdir (Fenech ve Morley, 1986).

#### 2.3.1. CBMN Tekniği Uygulanışı

CBMN testi birçok memeli primer hücre tipinde veya hücre soylarında uygulanabilir. Mikronükleus oluşumu canlıya ve hücrelerine özgün frekanslarda doğal olarak da görülebildiği için, bu testin uygulanacağı genotoksisite çalışmalarında background frekansları bilinen hücrelerin seçilmesi tercih edilir. Eğer insan donörler kullanılacaksa 18-35 yaş aralığında olmalarına, sürekli bir hastalığa sahip olup uzun süreli ilaç kullanıyor olmamalarına, yakın tarihte bilinen bir genotoksik ajana maruz kalmamalarına ve sigara kullanmamalarına dikkat edilmelidir. Lenfosit hücreleri gibi mitotik olarak inaktif halde bulunan hücreler, kültüre alındıktan sonra bir mutajenle muamele edilir ve hücre döngüsü tetiklenir. İnsan lenfositleri için mitojen olarak “Phytohaemagglutinin” (PHA) kullanılır. Kullanılan hücreye göre belirlenecek olan kültür süresinden sonra, bu tekniğin temel mantığı gereğince, kültüre “Cytochalasin-B” (CytoB) eklenir. CytoB bir aktin polimerizasyon inhibitörüdür ve sitokinezi engellemek amacıyla kullanılır. Test edilecek kimyasallar tercihen su ile çözülüp kültüre eklenmeli ve maksimum konsantrasyon için %50-60 sitotoksisite hedeflenmelidir. Çözücü olarak DMSO veya farklı bir solvent kullanılacaksa, ilgili madde için de ayrıca kontrol grubu yapılmalıdır. Söz konusu kimyasallar veya test edilecek ajanların kültürlerle ne zaman ve ne kadar süreyle muamele edileceği, test edilen materyallerin öngörülen etkilerine, hücre tipine ve uygulanan kültür yöntemine göre farklılık gösterebilir (OECD/OCDE, 2016).

Kültür aşamasından sonra eğer değerlendirme mikroskopla yapılacaksa preparatlar hazırlanır. Preparatların boyanması için başta “Giemsa” olmak üzere çeşitli boyalar kullanılabilir. Aynı zamanda DNA’ya özel floresan boyalar da kullanılabilir ve bu sayede “Fluorescence in situ Hybridization” (FISH) analizi de uygulanabilir (OECD/OCDE, 2016).

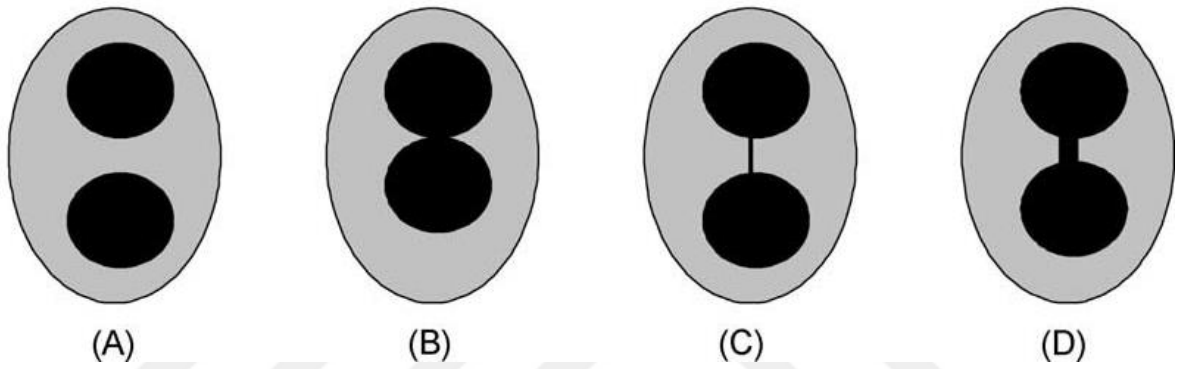
Kaba hatlarıyla uygulanışı bu şekilde olsa da bu tekniği uygulayan laboratuvarlar ve bilim insanları, kullanılan hücre tipine göre farklı kültür ve fiksasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu ufak farklılıklar ayrıca deneyimleri ve laboratuvar şartlarına göre de değişiklik gösterebilir.

### 2.3.2. CBMN Testi Değerlendirmesi

Değerlendirme aşaması preparat oluşturulup boyandıysa, boyaya göre ışık veya floresan mikroskopla yapılır. Bu preparatlar ayrıca “Lazer Tarama Sitometri” (Laser Scanning Cytometry, LSC) gibi bilgisayar tabanlı imaj analizi programlarına da saydırılabilir (Pozarowski ve diğ. 2012). Bunun dışında “Akış Sitometrisi” (Flow Cytometry, FCM) gibi tekniklerle preparat yapılmadan da mikronükleus analizi yapılabilir.

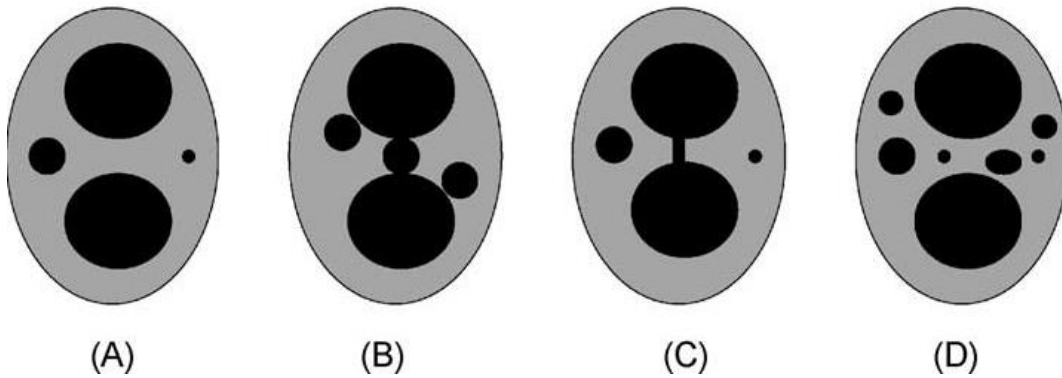
Değerlendirme eğer göz ile yapılacaksa, araştırmacının hata payını düşürmek amaçlı olarak preparatlar kodlanmalı ve değerlendirmeler rastgele yapılmalıdır. Kontrol grupları ve test materyalleri için en az 1000 binükleat hücre değerlendirilmelidir. Bu hücrelerin sitoplazmaları sağlam halde bulunmalı, çekirdekleri eşit miktarda boyanmış olmalı ve aynı sitoplazmik sınırlar içinde yer almalıdır. Çekirdekler kabaca eşit büyüklükte olmalıdır ve birbirine dokunur veya üst üste gelmiş halde bulunuyorlarsa, sınırlarının birbirinden ayrılabilir şekilde görülebildiğine dikkat edilmelidir. Çekirdekleri arasında nükleoplazmik köprü bulunan hücreler, eğer söz konusu köprülerin genişliği çekirdeklerin çapının 1/4 oranında veya daha küçükse binükleat olarak değerlendirilebilir (Şekil 2.2). Skorlanacak mikronükleusların çapı, çekirdeklerin çapının 1/16’sından daha küçük, 1/3’ünden de daha büyük olmamalıdır. Mikronükleuslar çekirdeğe bağlı veya çekirdekle üst üste durumda olmamalı, çekirdeğe dokunur halde bulunuyorlar ise yapıları çekirdekten ayrı olarak görünür halde olmalıdır (Şekil 2.3). Çekirdekler ve mikronükleus genellikle aynı oranda boyanmakla birlikte, mikronükleuslar bazen daha koyu boyanabilirler fakat ışığı kırmazlar. Bu özellikleri göz önünde bulundurulmalı ve ışığı kırabilen boya kalıntısı gibi parçacıklarla karıştırılmamalıdır (Fenech, 2000).

Mikronükleus oluşumunun yanı sıra test edilen ajanların sitotoksik veya sitostatik etkileri de analiz edilmelidir. CytoB kullanılan kültürler için “Sitokinez Bloklanmış Çoğalma İndeksi” (Cytokinesis-Block Proliferation Index, CBPI) veya “Replikasyon İndeksi” (Replication Index, RI) kullanılması tavsiye edilir. CytoB kullanılmayan kültürler için ise “Görece Popülasyon Katlanması” (Relative Population Doubling, RPD) veya “Görece Hücre Sayısı Artışı” (Relative Increase in Cell Count, RICC) kullanılmalıdır (OECD/OCDE, 2016). Bu analizlerin yapılabilmesi için yukarıda anlatılan kriterlere uymayan binükleat hücrelerle birlikte, tek veya ikiden fazla çekirdeğe sahip hücreler de ayrıca skorlanmalı ve değerlendirilmelidir.



(A) İdeal binükleat hücre, (B) çekirdekleri birbirine dokunan fakat sınırları belirgin binükleat hücre, (C) ve (D) nükleoplazmik köprü barındıran binükleat hücreler. (D)'deki hücre, nükleoplazmik köprü çekirdeklerin çapının 1/4'ünden küçük olduğu için skorlanabilir durumdadır.

**Şekil 2.2:** Skorlanabilir binükleat hücre kriterleri (Fenech ve diğ. 2003).



(A) İki mikronükleuslu hücre. Mevcut mikronükleuslar, çekirdeklerin çapının 1/16'sından daha küçük ve 1/3'ünden daha büyük olacak şekilde gösterilmiştir ve görsel olarak boyut kriterini temsil etmektedirler. (B)'de mikronükleuslar çekirdeklere dokunmaktadır fakat üst üste binmemiş durumdadırlar. (C) nükleoplazmik köprü barındıran hücre. Bu tarz hücrelerdeki mikronükleuslar da hücre binükleat olarak kabul edilebilir durumda ise skorlanabilirler. (D)'de gösterildiği gibi, oval mikronükleuslar da şekli bozuk olmadıkça skorlanabilir durumdadır.

**Şekil 2.3:** Skorlanabilir mikronükleus kriterleri (Fenech ve diğ. 2003).

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 22.01.2016 tarihli 95 sayılı kararı ile yapılan bu çalışmanın amacı, Al ve Cd iyonlarının insan kromozomları üzerindeki genotoksik etkilerini değerlendirmektir. Çalışma için gönüllü 3 donörden temin edilen total vücut kanları kültüre alınıp deney materyalleri ile muamele edilmiştir. Daha sonra total kan hücrelerinin bölünmeleri bloklanmış, son olarak bu kanlardan lenfosit hücreleri izole edilmiş ve oluşturulan preparatlar incelenmiştir. Bu çalışmada lenfosit hücrelerinin kullanılma sebebi, bu hücrelerin %95 oranında G<sub>0</sub> fazında ve doğal olarak senkronize şekilde bulunmalarındır (Bender ve diğ. 1988).

#### 3.1. DENEY MATERYALLERİ

##### 3.1.1. Kadmiyum Klorür (CdCl<sub>2</sub>)

Kadmiyum klorür, Sigma-Aldrich firmasından %99,99 saflıkta ve katı formda temin edilmiştir. Uygulanacak dozlar için 1000, 100 ve 10 µM'lık stok konsantrasyonlar hazırlanmış, çözücü olarak saf su kullanılmıştır. İlk aşamada 2,5, 5, 10, 20, 40, 80 ve 150 µM'lık 7 doz denenmiş ve sitotoksik etkileri göz önüne alınarak dozlar 2, 4, 8, 15 ve 30 µM olacak şekilde güncellenmiştir. Şekil 3.1'de dozların belirlenmesi ile ilgili ayrıntılı bilgi verilmiştir.

##### 3.1.2. Alüminyum Sülfat (Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>)

Alüminyum sülfat da Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Katı formda ve %99,99 saflıkta olan Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, su ile çözülerek 100000, 10000 ve 1000 µM'lık stok konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Kullanılacak dozlar 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 ve 8000 µM olarak seçilmiş, 4000 ve 8000 µM'lık dozlar yüksek sitotoksitesisi yüzünden değerlendirme dışı bırakılmıştır (Şekil 3.1).

#### 3.2. DENEY GRUBU

Bu çalışma için gönüllü donör olarak 25-35 yaş aralığında 3 kişi seçilmiştir. Bu kişiler sigara kullanmamaktadır ve herhangi bir kronik hastalıkları, dolayısıyla sürekli kullandıkları bir ilaç yoktur. Ayrıca bilinen herhangi bir genotoksik ajana maruz kalmadıkları bilinmektedir.

### 3.3. DENEY SÜRECİ

#### 3.3.1. Kanların Temini ve Kültüre Alınması

Kanlar donörlerden İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Radyobiyojoloji Laboratuvarında alınmış, deney süreci de bu laboratuvarında yürütülmüştür. Çeperi lityum heparin ile kaplı 2 steril tüp (Vacutainer) içine alınan kanlar, önceden 37,5 °C'ye ayarlanmış etüv içinde beklemeye alınmıştır. Daha sonra birisi kontrol grubu, diğer beşi deney materyalinin dozları olarak işaretlenen 6 flakon şişenin her birine 4 ml medyum (RPMI-1640) ve 0,5 ml Newborn Calf Serum koyulmuştur. Kullanılan medyum hazırlanırken, kontaminasyonu engellemek amaçlı olarak 100 IU/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin ile desteklenmiştir. Alınan kanlar daha sonra bu kültür şişelerinin her birine 0,5 ml miktarında ekilmiştir. Son olarak şişelere mitojen olarak 15µg/ml PHA eklenmiş ve etüve kaldırılmışlardır. Kültüre başlangıç saati olarak PHA eklenmesi baz alınmıştır (Şekil 3.1).



Fotoğrafta, bir numaralı donörden alınan periferik kanların 24. Saatte,  $Al_2(SO_4)_3$  dozlarıyla muamele edilmesinden hemen sonraki halleri görülüyor. Her iki metal için de bir numaralı donörde toplam 7 doz denenmiş ve istenilen aralık tespit edilip iki doz deneyden çıkartılmıştır. Diğer donörlerde de belirlenen toplam beş adet doz kullanılmıştır. Fotoğrafta görülen 6 ve 7 numaralı flakon kültür şişelerine sırasıyla 4000µM ve 8000 µM  $Al_2(SO_4)_3$  enjekte edilmiştir. 6 ve 7 numaralı şişede, 0 numaralı kontrol grubuna göre ciddi renk değişimi gözlenmiş, 7 numaralı şişede ise ayrıca kan dokusunda ciddi fiziksel bozulmalar görülmüştür. Preparatların değerlendirilmesi aşamasında 7 numaralı şişede hücrelerin tamamen parçalandığı, 6 numaralı şişede ise %60'ın üzerinde hücre ölümü olduğu gözlenmiş, bu sayede bahsedilen dozların deneylerden çıkartılmasına karar verilmiştir.

**Şekil 3.1:** Kültür aşaması.

### 3.3.2. Metal Dozlarının ve CytoB'nin Kültüre Eklenişi

Metal tuzları kültür şişelerine deney başlangıcının 24. Saatinde, belirlenen dozlarda eklenmiştir. Önceden hazırlanan stok çözeltilerden 1 ml'lik insülin şırıngalarıyla çekilen metal tuzlarının kültür şişelerine eklenirken kanlara iyice karışmasına özen gösterilmiştir. Daha sonra kültür başlangıcını takip eden 44. Saatin sonunda şişelere 6 µg/ml cytoB eklenmiş ve 72 saatlik kültür süresinin bitmesi beklenmiştir.

### 3.3.3. Fiksasyon ve Preparatların Hazırlanması

Kültür süresi sona erince kanlar deney tüplerine alınmış ve 200 G'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlemden sonra süpernatantlar atılmış ve çöken kısma vorteks yardımıyla 5 ml 0,075 M'lık yarı donmuş halde "Potasyum Klorür" (KCl) eklenmiş, daha sonra tüpler tekrar 10 dakikalığına 200 G'de santrifüje alınmıştır. Buradaki amaç, oluşturulan hipotonik ortam sayesinde eritrositlerin parçalanıp süpernatant ile birlikte atılabilmesini sağlamak ve lenfositleri şişirerek daha belirgin hale getirmektir.

Santrifüj edilen tüplerden süpernatantlar tekrar alınmış ve çökeltiler 5 ml fiksatif ile muamele edilip tekrar santrifüje alınmıştır. Fiksatif olarak 1/7 oranında asetik asit - metanol karışımı kullanılmış, santrifüj sonunda süpernatantlar atılmıştır. Bu işlem 3 defa tekrarlanmış ve sonuncudan sonra süpernatantlar atılıp pipetaj yapılarak kalan kısım süspansiyon haline getirilmiştir. Son olarak tüplerdeki lenfosit süspansiyonu, kabaca 5-10 cm'den, bir gün önce metanol ile temizlenip buzluğa atılarak soğutulmuş lamlara damlatılmış ve kurumaya bırakılmıştır.

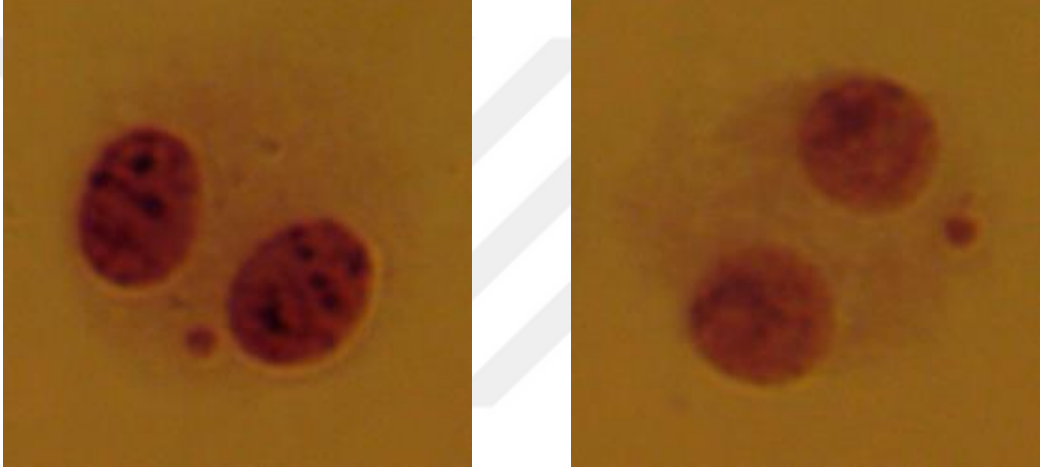
### 3.3.4. Boyama ve Preparatların Kapatılması

Kuruyan lamlar, %5'lik giemsa ile boyanmıştır. Boya hazırlanırken, stoktan alınan seyreltilmemiş boya kurutma kağıdıyla süzölmüş ve olası katı parçacıkların boyadan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Hazırlanan boya lamlarla 5 dakika muamele edilmiş, daha sonra preparatlar saf su ile yıkanıp kurumaya bırakılmıştır. Lamlar lamellerle kapatılırken yapıştırıcı olarak "Entellan" kullanılmış, kapatma esnasında hava kabarcıkları oluşmamasına özen gösterilmiştir.



### 3.4. PREPARATLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hazırlanan preparatlar kodlanmış şekilde rastgele sayılmıştır. Sayım için Prior B3000 ışık mikroskobu ve AmScope MU300 oküler kamerası kullanılmış, incelemeler 40x objektifle yapılmıştır. Her bir doz için 1000 binükleat ve içerdikleri mikronükleuslar değerlendirilmiş ve bunun yanında gözlemlenen bir, üç, dört, beş ve daha fazla çekirdeğe sahip hücrelerin yanı sıra skorlanabilir binükleat sınıflandırmasına girmeyen iki çekirdekli hücreler de kayıt altına alınmıştır. Mikronükleus içeren hücreler preparat üzerindeki koordinatlarıyla belirlenmiş, bu hücrelerin 3 saniyelik değişken odaklı videoları bilgisayar ortamına kaydedilmiştir.



Fotoğraflar Prior B3000 ışık mikroskopunda, 40x objektifle, AmScope MU300 oküler kamerasıyla çekilmiştir. Elde edilen ana görüntülerden 250x250 piksel olarak kesilip büyütüldükleri için çözünürlük düşüktür.

**Şekil 3.2:** Gözlemlenen mikronükleus örnekleri.

Değerlendirilen bütün preparatlar için proliferatif indeks (Pİ) hesaplanmış, her bir dozun ve kontrol grubunun Pİ değeri birbiriyle karşılaştırılıp doza göre sağ kalım grafikleri elde edilmiştir. Söz konusu Pİ değerinin hesaplanabilmesi için sayım esnasında binükleat hücrelerin yanında binükleat kategorisine uymayan iki nükleuslu hücreler, mononükleat hücreler ve polinükleat hücreler (üç veya daha fazla nükleusa sahip olan hücreler) de skorlanmalıdır. Pİ hesaplanmasında kullanılan formül denklem 3.1'deki gibidir.

(Denklem 3.1)

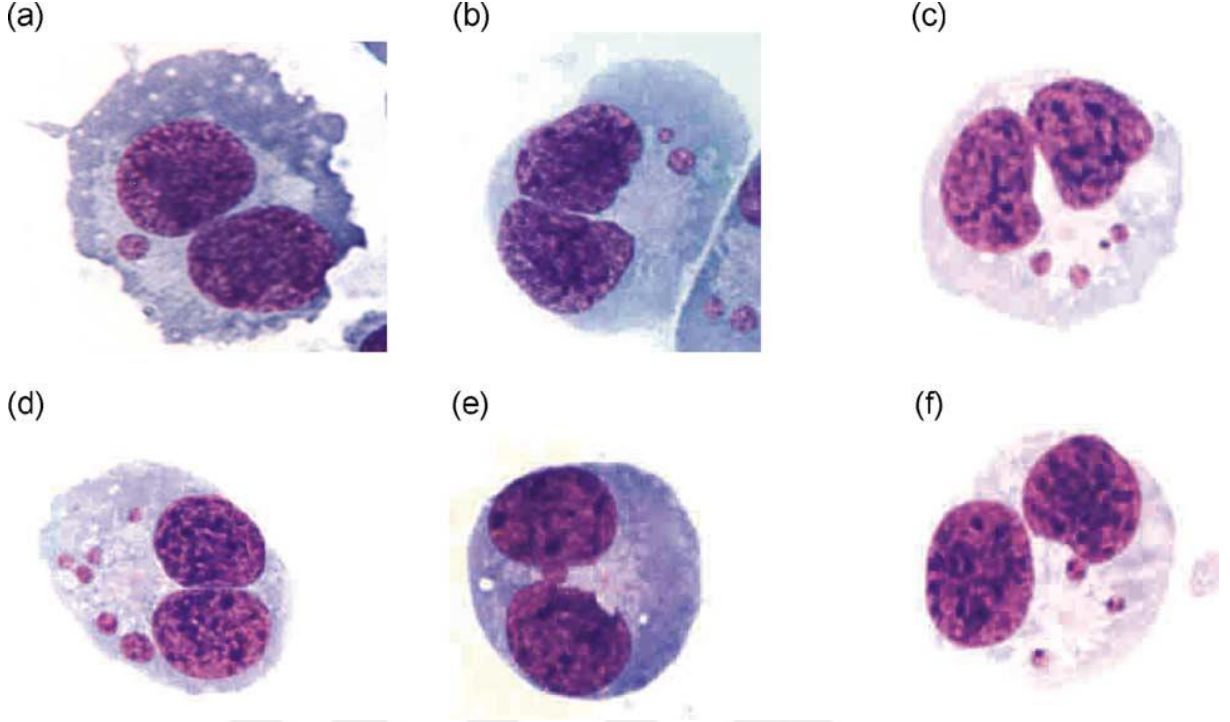
$$Pİ = \frac{((\text{mononükleat hücreler}) + (2 \times \text{binükleat hücreler}) + (3 \times \text{multinükleat hücreler}))}{(\text{toplam hücre sayısı})}$$

Değerlendirme için Fenech ve diğ. (2003)'nin "HUMN Projesi" (HUMAN MicroNucleus Project) adlı çalışmasında bahsi geçen kriterler esas alınmıştır. HUMN projesi, insan lenfositleri üzerinde yapılan CBMN testlerinin araştırmacı kaynaklı değerlendirme farklarını en aza indirmek amacıyla oluşturulmuş, dünya çapında 30'dan fazla laboratuvar tarafından desteklenen bir projedir ve testin hassasiyetini arttırıp farklı araştırmacı veya kurumların çalışmalarını diğer araştırmalarla karşılaştırabilmesi için bir platform oluşmasını hedeflemektedir. Projeye göre skorlanabilir binükleat lenfosit hücresi kriterleri şöyledir:

1. Hücre 2 çekirdek içermelidir.
2. Çekirdeklerin zarları sağlam olmalı ve iki çekirdek de aynı sitoplazmik sınırlar içinde bulunmalıdır.
3. Çekirdeklerin büyüklüğü ve boyanma yoğunlukları kabaca eşit olmalıdır.
4. Eğer çekirdekler arasında nükleoplazmik köprü varsa, genişliği çekirdeklerin çapının 1/4'ünden daha geniş olmamalıdır.
5. Çekirdekler birbirine dokunabilirler; eğer birbiri üstüne binmiş durumda iseler çekirdek sınırları açıkça görünür halde olmalıdır.
6. Hücrenin sitoplazması tam, açıkça görünür ve diğer hücrelerden ayrılabilir durumda olmalıdır (Fenech ve diğ. 2003).

Projenin mikronükleus skorlama kriterleri de şunlardır:

1. Mikronükleusun çapı, çekirdeklerin çapının 1/16'sından daha büyük, 1/3'ünden de daha küçük olmalıdır. Bu değerler alan olarak sırasıyla 1/9 ve 1/256'lık oranlara tekâmül eder.
2. Gözlemlenen mikronükleuslar yuvarlak veya oval şekilde olmalıdır.
3. Mikronükleuslar ışığı kırmaz. Bu durum göz önünde bulundurularak, gözlemlenen mikronükleuslar boya partikülleri veya boyanmış toz zerrecikleri gibi ışığı kıran parçacıklarla karıştırılmamalıdır.
4. Gözlemlenen mikronükleuslar çekirdeklere bağlı veya çekirdekle birleşmiş halde bulunmamalıdır.
5. Mikronükleuslar çekirdeğe dokunabilir fakat çekirdekle üst üste binmemelidir ve çekirdekle mikronükleusun sınırları belli olmalıdır.
6. Çekirdekle aynı oranda boyanmış olmalıdır fakat bazen daha koyu boyanmış olabilirler (Fenech ve diğ. 2003).



(a-f) arasında binükleat hücrelerde gözlemlenen ve değerlendirilebilir durumda olan mikronükleuslar gösterilmiştir. (b) kısmında görüldüğü üzere iki hücre duvarı bitişik olmasına rağmen sınırları belirgindir ve skorlanmaları bir sorun teşkil etmez. (c) kısmındaki en ufak parça boya kalıntısı gibi görünmektedir ve değerlendirilebilmesi için 100x objektif kullanılması gerekmektedir. (e) kısmındaki mikronükleus iki hücre çekirdeğine de dokunmaktadır fakat sınırları belirgin durumda olduğu için mikronükleus olarak değerlendirilebilir.

**Şekil 3.3:** Işık mikroskobu altında mikronükleus örnekleri (Fenech ve diğ. 2003).

### 3.5. İSTATİSTİKSEL METOT

Elde edilen veriler GraphPad Prism 6.0 programıyla değerlendirilmiştir. Pİ verilerinin istatistiksel karşılaştırılmalarında lineer regresyon analizi kullanılmış, farklı donörlerden elde edilen sonuçlar her bir metal için ayrıca birbiriyle karşılaştırılmıştır. Buradaki amaç, söz konusu metallerin lenfosit hücrelerinin çoğalmasına etkilerinin farklı bireyler üzerinde korelasyon gösterip göstermediğinin değerlendirilebilmesidir. Mikronükleus oluşumlarının değerlendirilmesi için ise tek yönlü ki kare testi uygulanmıştır. Her bir metalin her bir dozu, her donör için ayrı olarak, kendi kontrol gruplarıyla karşılaştırılmış ve yorumlanmıştır. Ayrıca her iki metalin uygulanması sonucu donörlerden elde edilen veriler, her metal için kendi içerisinde tek yönlü anova testi uygulanarak karşılaştırılmış ve donörlerde gözlemlenen mikronükleus oluşum sıklıkları arasındaki ilişki incelenmiştir.

## 4. BULGULAR

**Tablo 4.1:** CdCl<sub>2</sub> doz-cevap tablosu.

Donör 1										
Dozlar	CdCl <sub>2</sub> ( $\mu$ M)	BN	MN	P (Ki Kare)	M1	M2	M3	M4	M5+	Pİ
Kontrol	0	1000	3		867	69	405	265	26	1,9350
1	2	1000	4	0,4995	855	107	417	229	27	1,9309
2	4	1000	6	0,2534	898	162	358	252	33	1,9057
3	8	1000	5	0,3626	771	172	437	269	26	1,9854
4	15	1000	3	0,3413	914	198	287	243	21	1,8637
5	30	1000	4	0,4995	974	244	336	168	16	1,8342

Donör 2										
Dozlar	CdCl <sub>2</sub> ( $\mu$ M)	BN	MN	P (Ki Kare)	M1	M2	M3	M4	M5+	Pİ
Kontrol	0	1000	7		1140	221	364	177	16	1,8002
1	2	1000	8	0,4992	1250	302	473	288	34	1,8641
2	4	1000	11	0,2414	1285	286	411	242	26	1,8135
3	8	1000	6	0,4993	1556	383	498	262	36	1,7965
4	15	1000	7	0,3943	1230	188	262	124	3	1,7004
5	30	1000	6	0,4993	1712	428	401	125	9	1,6797

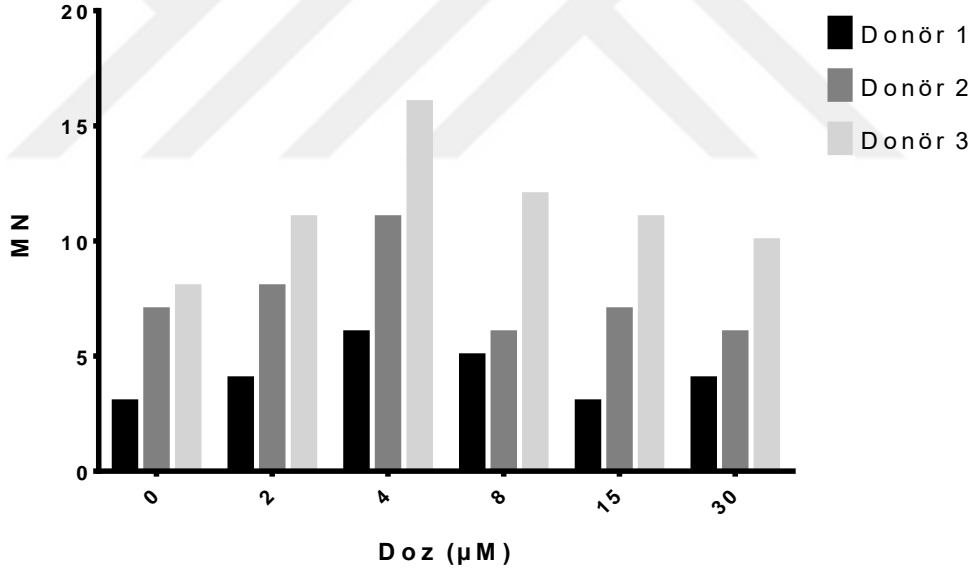
  

Donör 3										
Dozlar	CdCl <sub>2</sub> ( $\mu$ M)	BN	MN	P (Ki Kare)	M1	M2	M3	M4	M5+	Pİ
Kontrol	0	1000	8		7483	1106	264	128	19	1,2928
1	2	1000	11	0,3247	5187	652	174	110	9	1,3138
2	4	1000	16	0,0781	4865	514	121	56	6	1,2865
3	8	1000	12	0,2529	4263	421	97	40	5	1,2927
4	15	1000	11	0,3247	5246	409	127	82	4	1,2672
5	30	1000	10	0,4081	7543	676	181	108	15	1,2398

BN: binükleat hücre, MN: mikronükleus, P: Ki Kare anlamlılık değeri, M1: bir nükleuslu hücre, M2: iki nükleuslu hücre, M3: üç nükleuslu hücre, M4: dört nükleuslu hücre, M5+: beş ve üzeri nükleusa sahip hücre, Pİ: proliferatif indeks.

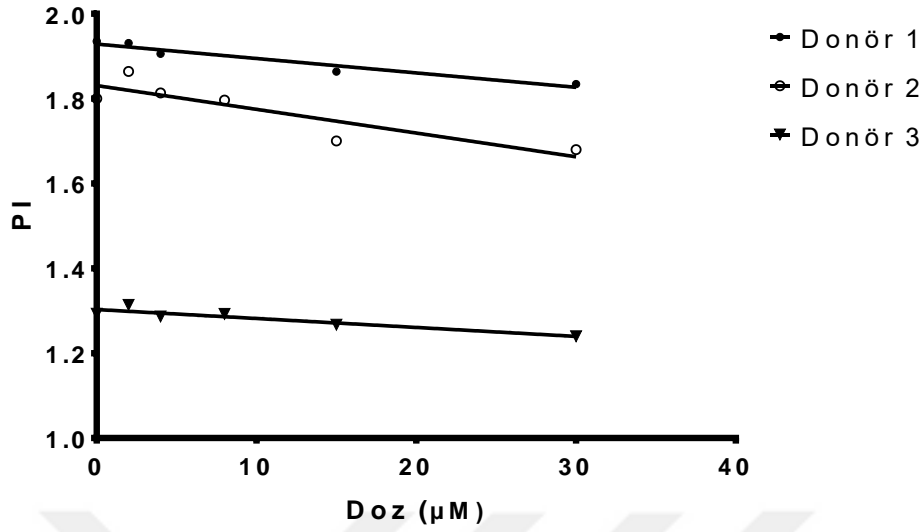
Kadmiyum klorüre ait bulgular tablo 4.1’de gösterilmiştir. Bütün donörlerin kontrol ve doz gruplarında hedeflenen toplam 1000 binükleat hücre sayılabildiği için, tablo hazırlanırken binükleat hücre başına düşen mikronükleus değerleri (MN/BN)’nin hesaplanıp tabloda gösterilmesine gerek duyulmamıştır. Karşılaştırması yapılan kontrol ve doz gruplarının toplam hücre sayıları aynı olduğu için, istatistiksel hesaplamalar yapılırken MN/BN değerleri yerine direkt olarak mikronükleus oluşum değerleri kullanılmıştır.

Tablo 4.1’deki verilere göre, mikronükleus oluşumu uygulanan dozların yükselmesi ile birlikte belirgin bir artış göstermiş, daha yüksek dozlarda ise düşüşe geçerek kontrol grubuna yaklaşmıştır. Bu dağılım şekil 4.1’deki sütun grafikte daha açık olarak görülebilmektedir. 4  $\mu\text{M}$ ’lık uygulama, her bir donör için en çok mikronükleus oluşumunun gözlemlendiği doz olarak tepe noktasını oluşturmaktadır. Her ne kadar dozlara göre mikronükleus artışı grafikte açık olarak görülebilsede ki kare testine göre istatistiksel olarak anlamlı gözükmemektedir.



Şekil 4.1:  $\text{CdCl}_2$ , dozlara göre mikronükleus oluşum grafiği.

Donörlerin kontrol ve diğer konsantrasyonlardaki mikronükleus oluşum frekansları diğer donörlerle kıyaslandığında, tek yönlü anova testine göre anlamlı farklılık görülmüştür ( $p < 0,0001$ ). Şekil 4.1’de açık olarak gözlemlenebilen bu durum, bireylerin doğal mikronükleus frekanslarının birbirinden farklı olmasıyla açıklanabilir.



Şekil 4.2: CdCl<sub>2</sub>, dozlara göre Pİ karşılaştırmalı grafiği.

Kadmiyum klorür için Pİ değerleri kullanılarak regresyon analizi yapıp doz-cevap grafiği çizilmiştir (Şekil 4.2). Yapılan lineer regresyon analizine göre her bir donörün Pİ değerleri, doz artışına paralel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (donör 1 için  $p=0,0064$ ,  $R^2=0,94$ ; donör 2 için  $p=0,0193$ ,  $R^2=0,78$ ; donör 3 için  $p=0,0077$ ;  $R^2=0,86$ ). Şekil 4.2'deki grafikte donörler arasındaki Pİ farkı açık bir şekilde görülebilmese de grafikteki eğimler birbiriyle karşılaştırıldığında aralarında anlamlı şekilde paralellik gözükmemektedir ( $p=0,0734$ ).

Tablo 4.1 ve şekil 4.2'de görülebileceği üzere 2 µM'lık CdCl<sub>2</sub> uygulanan hücrelerin Pİ değerleri, elde edilen regresyon doğrusunun aksine düşük miktarda da olsa pozitif sapma göstermiştir. Bahsedilen Pİ artışı istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemektedir. Deneyle katılan üç donörün lenfositlerinde de gözlemlenebilen mikronükleus oluşumundaki bu yükseliş tesadüf veya deney hatası şeklinde yorumlanabilir fakat kadmiyum elementinin düşük dozlarının (µM değerlerinin altı) proliferasyonu tetikleyebildiği, farklı bilim insanları tarafından farklı hücrelerle yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Zglinicki ve Diğ. 1992; Misra ve Diğ. 2002).

**Tablo 4.2:** Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> doz-cevap tablosu.

Donör 1										
Dozlar	Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (µM)	BN	MN	P (Ki Kare)	M1	M2	M3	M4	M5+	Pİ
Kontrol	0	1000	4		851	1145	893	577	75	2,1528
1	125	1000	4	0,3616	839	1028	632	445	47	2,0714
2	250	1000	7	0,2743	1467	1136	739	473	74	1,9630
3	500	1000	4	0,3616	1177	978	549	365	34	1,9442
4	1000	1000	3	0,4995	1450	927	304	170	15	1,7514
5	2000	1000	5	0,4994	1435	1009	345	207	11	1,7824

Donör 2										
Dozlar	Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (µM)	BN	MN	P (Ki Kare)	M1	M2	M3	M4	M5+	Pİ
Kontrol	0	1000	7		737	369	528	366	37	2,0639
1	125	1000	6	0,4993	768	442	409	493	37	2,0543
2	250	1000	10	0,3153	1016	438	541	396	63	1,9954
3	500	1000	6	0,4993	1029	304	311	275	23	1,8572
4	1000	1000	7	0,3943	1089	484	253	223	12	1,8037
5	2000	1000	5	0,3874	1257	465	241	187	9	1,7404

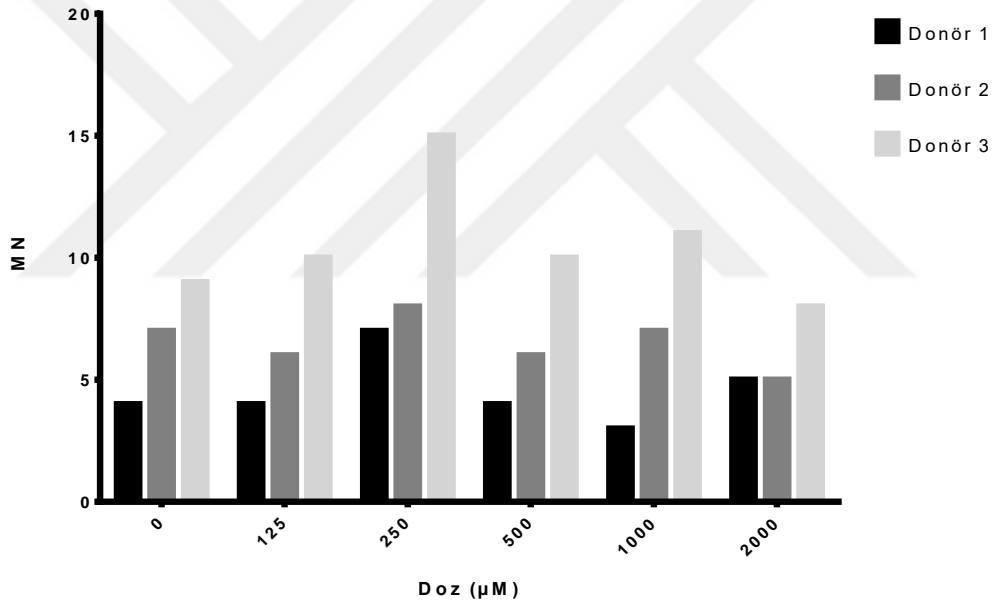
  

Donör 3										
Dozlar	Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (µM)	BN	MN	P (Ki Kare)	M1	M2	M3	M4	M5+	Pİ
Kontrol	0	1000	9		1041	467	345	226	14	1,8526
1	125	1000	10	0,4991	1033	502	343	219	13	1,8527
2	250	1000	15	0,1557	1267	616	477	174	9	1,8287
3	500	1000	10	0,4991	2150	811	440	160	6	1,6619
4	1000	1000	11	0,4128	1722	917	377	153	5	1,7156
5	2000	1000	8	0,4992	4625	3597	652	334	24	1,6467

BN: binükleat hücre, MN: mikronükleus, P: Ki Kare anlamlılık değeri, M1: bir nükleuslu hücre, M2: iki nükleuslu hücre, M3: üç nükleuslu hücre, M4: dört nükleuslu hücre, M5+: beş ve üzeri nükleusa sahip hücre, Pİ: proliferatif indeks.

Tablo 4.2’de  $Al_2(SO_4)_3$ ’e ait bulgular görülmektedir. Bu tabloda da donörlerin bütün doz ve kontrol gruplarına ait preparatlarında toplam 1000 binükleat skorlanabildiği için MN/BN değerlerinin yer almasında gerek görülmemiş, istatistiksel hesaplamalar direkt olarak mikronükleus skorları üzerinden gerçekleştirilmiştir.

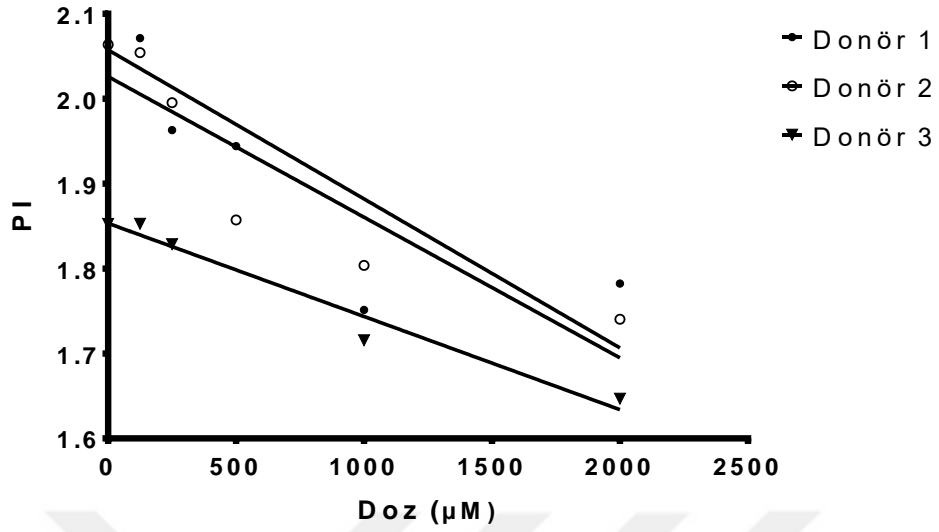
Tablodaki verileri dozlara göre mikronükleus artışı açısından değerlendirdiğimizde, mikronükleus dağılımlarının  $CdCl_2$  deneyleri ile benzerlik gösterdiği görülmektedir. Oluşan mikronükleus sayıları dozla birlikte artış göstermiş ve 250  $\mu M$ ’da en yüksek haline ulaşmıştır. Daha yüksek dozlarda ise tıpkı  $CdCl_2$  gibi düşme eğilimi gözlemlenmektedir. Kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda artışlar yine ki kare testine göre istatistiksel olarak anlamlı değildir fakat şekil 4.3’te de görülebileceği üzere göz önünde bulundurulacak düzeydedir.



**Şekil 4.3:**  $Al_2(SO_4)_3$ , dozlara göre mikronükleus oluşum grafiği.

Tıpkı  $CdCl_2$ ’de olduğu gibi, donörler arasında doza göre mikronükleus oluşum oranları karşılaştırıldıklarında gözle görülür bir farklılık göze çarpmaktadır. Tek yönlü anova testine göre anlamlı durumda olan bu farklılık ( $p < 0,0001$ ), bireyler arasındaki doğal mikronükleus frekanslarının farklı olmasıyla ilişkilendirilebilir.





**Şekil 4.4:**  $Al_2(SO_4)_3$ , dozlara göre Pİ karşılaştırmalı grafiği.

Şekil 4.4'te görüldüğü gibi,  $Al_2(SO_4)_3$  için Pİ değerleri kullanılarak yapılan regresyon analizinde ise yine  $CdCl_2$ 'de olduğu gibi donörlerden elde edilen veriler her ne kadar farklı çıksa da grup olarak karşılaştırıldıklarında gözlemlenen eğimler anlamlı şekilde paralellik göstermektedir ( $p=0,5097$ ). Ayrıca söz konusu Pİ değerleri de kullanılan dozlara karşı anlamlı derecede korelasyon göstermiş, metal dozları arttıkça buna paralel olarak Pİ değerleri düşmüştür. (donör 1 için  $p=0,0365$ ,  $R^2=0,71$ ; donör 2 için  $p=0,0125$ ,  $R^2=0,82$ ; donör 3 için  $p=0,0025$ ,  $R^2=0,97$ ).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Farklı ağır metallerin sitotoksik ve genotoksik etki mekanizmaları aynı olmamakta, her elementin kendisine özgü atomik özellikleri ve oluşturdukları moleküler yapıların kendilerine has fizyokimyasal davranışları bulunduğu bilinmektedir (Tchounwou ve diğ. 2012). Bununla birlikte direkt ve indirekt mekanizmalardan bahsedebiliriz. Ağır metaller direkt olarak genetik materyale, hücre duvarı ve organellerine zarar verebilir. Bunun dışında DNA tamiri ve hücre bölünmesini kontrol eden mekanizmalarda görev alan enzimlerin yapılarını bozarak bu süreçleri etkileyip genetik materyale indirekt olarak da zarar verebilirler. Buna ek olarak ağır metaller oksidatif stres artışına neden olarak dolaylı yoldan da genotoksik hasara sebep olabilir (Squibb ve Fowler, 1981; Beyersman ve Hartwig, 2008).

Kadmiyum iyonlarının, izole edilmiş DNA parçacıkları kullanılarak yapılan çalışmalarda DNA üzerinde direkt hasarına rastlanmamış ve bakteriler üzerinde yapılmış birçok araştırmada Cd iyonlarının mutajenik karakter göstermediği görülmüştür (Waalkes, 2003; DFG, 2006). Bu yüzden Cd'un genotoksik etkileri Beyersmann ve Hartwig'in (2008) öne sürdüğü indirekt mekanizmalarla açıklanabilir.

Yapılan birçok çalışmaya göre Al da tıpkı Cd gibi mutajenik bir element değildir (Leonard ve Leonard, 1989). Bununla birlikte Al içeren bazı bileşiklerin yükselen dozlarla birlikte kromozom hasarlarına ve mikronükleus oluşumuna neden olduğunu gösteren birçok çalışma vardır (Roy ve Diğ. 1990; Migliore ve Diğ. 1999). Banasik ve diğ. (2005), Al'un kromozom hasarlarını tetiklemeğini üç indirekt mekanizmayla açıklamışlardır. Bunlar oksidatif stres artışı, kromatinin yapısında oluşturduğu modifikasyonlar ve lizozom zarına verdiği hasar neticesinde lizozomal enzimlerin sitoplazmaya karışmasıdır.

Bu projede elde edilen bulgular, Migliore ve diğ. (1999)'nin çalışmalarında elde ettikleri verilerle paralellik göstermektedir. Her iki elementin de; her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı görünmese de; mikronükleus oluşumunu arttırdığı gözlemlenmiştir. Mikronükleus sayıları bütün donörlerde, Al için 250  $\mu$ M, Cd için ise 4  $\mu$ M'lık dozlarda kontrol grubuna göre 1,5-2 kat artış göstermiş, daha yüksek dozlarda ise giderek azalarak kontrol grubu değerlerine kadar düşmüştür. Bu durum iki elementin de doz artışına paralel olarak apoptozu tetiklemeğini ile açıklanabilir (Banasik ve diğ. 2005).

Çalışmaya katılan üç bireyin de doğal mikronükleus frekansı birbirinden farklı olduğu gibi, her bir bireyden farklı metallere testi için farklı zamanlarda alınan kanların kontrol grubunda da mikronükleus frekansları farklılık göstermiştir. Bu farklılık aynı zamanda Pİ değerlerinde de görülmüştür. Bu durum deneylerde kullanılmak üzere donörlerden farklı zamanlarda kan alınmasıyla ve kullanılan medyumun PH değerindeki ufak değişiklikler gibi materyallerin ve laboratuvar şartlarının zamanla değişkenlik gösterebilmesiyle açıklanabilir.

Aynı ağır metalin aynı dozlarının farklı bireylerde ortaya çıkardığı mikronükleus değerleri, tek yönlü anova testine göre anlamlı farklılık göstermiştir ( $p < 0,0001$ ). Kontrol gruplarında da gözlemlenen bu durum, bireylerin doğal mikronükleus frekansları arasındaki farklılıklarla açıklanabilir.

Her iki elementin doza bağlı Pİ değerleri incelendiğinde ise lineer şekilde düşüş görülmektedir. Buradan yola çıkarak iki elementin de yükselen dozlarla beraber sitotoksik karakter gösterdiği söylenebilir. Ayrıca kontrol gruplarının Pİ değeri kişiye göre farklılık göstermesine rağmen artan dozlara oranla Pİ değerlerindeki düşüş aynı metalin uygulandığı 3 bireyde de paralellik göstermiştir. Aynı metal için Pİ değerlerinin farklı bireylerde benzer olarak düşüş göstermesi, bu elementlerin sitotoksik etkilerinin bireylerden bağımsız olması şeklinde yorumlanabilir.

Kadmiyum klorür uygulanan hücrelerin Pİ değerlerinde,  $Al_2(SO_4)_3$ 'ten farklı olarak,  $2 \mu M$ 'lık dozlarda ufak da olsa artış gözlenmiştir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yapılan bazı çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Zglinicki ve Diğ. (1992)'nin sıçan myoblast hücreleri üzerinde yaptığı çalışmalarda düşük Cd dozlarının proliferasyonu tetiklediği görülmüştür. Bu çalışmanın bir benzerini daha sonra Misra ve Diğ. (2002) de sıçan makrofaj hücreleri üzerinde yapmış ve benzer sonuçlara ulaşmışlardır.

Sonuç olarak bu çalışmada Al ve Cd elementlerinin insan lenfosit hücrelerinde sitotoksik ve genotoksik hasarları gösterilmiştir. Metallerin farklı bireylerde benzer olarak hasar veriyor olması, her biri için daha kapsamlı çalışmalar yapılarak belirli bir hasar modeline ulaşılmasını sağlayabilir.

## KAYNAKLAR

- Adriano, D.C., 2001, *Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals*, 2<sup>nd</sup> ed., Springer, New York, 264-265.
- Altmann, P., Cunningham, J., Dhanesha, U., Ballard, M., Thompson, J. and Marsh, F., 1999, Disturbance of cerebral function in people exposed to drinking water contaminated with aluminium sulphate: retrospective study of the Camelford water incident, *BMJ*, 319 (7213), 807-811.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M., 1993, Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90 (17), 7915-7922.
- Balch, P.A., 2000, *Prescription for Nutritional Healing*, 3<sup>rd</sup> ed., Penguin Putnam, London.
- Banasik, A., Lankoff, A., Piskulak, A., Adamowska, K., Lisowska, H. and Wojcik, A., 2005, Aluminum-induced micronuclei and apoptosis in human peripheral-blood lymphocytes treated during different phases of the cell cycle, *Environmental Toxicology*, 20 (4), 402-406.
- Basile, A., Sorbo, S., Conte, B., Cobianchi, R.C., Trinchella, F., Capasso, C. and Carginale, V., 2012, Toxicity, accumulation and removal of heavy metals by three aquatic macrophytes, *International Journal of Phytoremediation*, 14 (4), 374-387.
- Bender, M.A., Awa, A.A., Brooks, A.L., Evans, H.J., Groer, P.G., Littlefield, L.G., Pereira, C., Preston, J.R. and Wachholz, B.W., 1988, Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation, *Mutation Research / Reviews in Genetic Toxicology*, 196 (2), 103-159.
- Beyersmann, D. and Hartwig, A., 2008, Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms, *Archives of Toxicology*, 82, 493-512.
- Bjerrum, N., 1936, *Bjerrum's inorganic chemistry*, 3<sup>rd</sup> Danish ed., Heinemann, London.
- Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Müller, W., Odagiri, Y., Scarfi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A., 2001, HUman MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 37 (1), 31-45.
- Chaney, R.L., Ryan, J.A., Li, Y.M. and Brown, S.L., 1999, *Soil cadmium as a threat to human health*, Developments in Plant and Soil Sciences, In: McLaughlin, M.J., Singh, B.R. (Ed.), Vol 85: Cadmium in Soils and Plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 219-256.

- Davison, A.G., Fayers, P.M., Taylor, A.J., Venables, K.M., Darbyshire J., Pickering, C.A., Chettle, D.R., Franklin, D., Guthrie, C.J. and Scott, M.C., 1988, Cadmium fume inhalation and emphysema, *The Lancet*, 331 (8587), 663-667.
- DFG, 2006, *Cadmium and its compounds (in the form of inhalable dusts/aerosols)*, The MAK collection for occupational health and safety: Part I: MAK value documentations In: Deutsche Forschungsgemeinschaft (ed), vol 22. Wiley-VCH, Weinheim.
- Dickin, A.P., 2005, *Radiogenic Isotope Geology*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Dolara, P., 2014, Occurrence, exposure, effects, recommended intake and possible dietary use of selected trace compounds (aluminium, bismuth, cobalt, gold, lithium, nickel, silver), *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65 (8), 911-924.
- Duffus, J.H., 2002, "Heavy metals"- a meaningless term? (IUPAC technical report), *Pure and Applied Chemistry*, 74, 793-807.
- Dunster, A.M.; Moulinier, F., Abbott, B., Conroy, A., Adams, K. and Widyatmoko, D., 2005, *Added value of using new industrial waste streams as secondary aggregates in both concrete and asphalt*, The Waste & Resources Action Programme, Banbury.
- Evans, H.J., Neary, G.J. and Williamson, F.S., 1959, The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on vicia faba roots and the effect of oxygen. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 1 (3), 216-229.
- Fenech, M., 2000, The in vitro micronucleus technique, *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455 (1-2), 81-95.
- Fenech, M., 2006, Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death, *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 600 (1-2), 58-66.
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E., 2003, HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534 (1-2), 65-75.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surralles, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D. and Thomas, P., 2011, Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells, *Mutagenesis*, 26 (1), 125-132.
- Fenech, M. and Morley, A.A., 1986, Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 161 (2), 193-198.
- Filipič, M., 2012, Mechanisms of cadmium induced genomic instability, *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 733 (1-2), 69-77.

- Frisard, M. and Ravussin, E., 2006, Energy metabolism and oxidative stress: impact on the metabolic syndrome and the aging process, *Endocrine*, 29 (1), 27-32.
- Ganrot, P.O., 1986, Metabolism and possible health effects of aluminum, *Environmental Health Perspectives*, 65, 363-441.
- Gisselsson, D., 2008, Classification of chromosome segregation errors in cancer, *Chromosoma*, 117 (6), 511-519.
- Goering, P.L., Waalkes, M.P. and Klaassen, C.D., 1995, *Toxicology of cadmium*, Handbook of Experimental Pharmacology, In: Barrett, J.E. (Ed.), Vol: 80, Springer, New York 189-214.
- Greenwood, N.N. and Earnshaw, A., 1997, *Chemistry of the Elements*, 2<sup>nd</sup> ed., Heinemann, Butterworth, 217.
- Hartwig, A. and Schwerdtle, T., 2002, Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications, *Toxicology Letters*, 127 (1-3), 47-54.
- He, Z.L., Yang, X.E. and Stoffella, P.J., 2005, Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19, 125-140.
- Hodgson, E., Mailman, R.B. and Chambers, J.E., 1988, *Macmillan Dictionary of Toxicology*, Macmillan, London.
- Hossn, E., Mokhtar, G., El-Awady, M., Ali, I., Morsy, M. and Dawood, A., 2001, Environmental exposure of the pediatric age groups in Cairo City and its suburbs to cadmium pollution, *Science of the Total Environment*, 273, 135-146.
- Järup, L., 2003, Hazards of heavy metal contamination, *British Medical Bulletin*, 68 (1), 167-182.
- Järup, L., Berglund, M., Elinder, C.G., Nordberg, G. and Vahter, M., 1998, Health effects of cadmium exposure - a review of the literature and a risk estimate, *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 24 (1), 1-51.
- Klein, G., Klein, E. and Klein E., 1952, The viability and the average desoxyribonucleic acid content of micronuclei-containing cells produced by colchicine treatment in the Ehrlich ascites tumor, *Cancer Research*, 12 (7), 484-489.
- Krewski, D., Yokel, R.A., Nieboer, E., Borchelt, D., Cohen, J., Harry, J., Kacew, S., Lindsay, J., Mahfouz, A.M. and Rondeau, V., 2007, Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 10 (1), 1-269.
- Kumar, V. and Gill, K.D., 2009, Aluminium neurotoxicity: neurobehavioural and oxidative aspects, *Archives of Toxicology*, 83 (11), 965-978.

- Lane, T. W. and Morel, F.M.M., 2000, A biological function for cadmium in marine diatoms, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (9), 4627-4631.
- Lane, T.W., Saito, M.A., George, G.N., Pickering, I.J., Prince, R.C. and Morel, F.M.M., 2005, A cadmium enzyme from a marine diatom, *Nature*, 435 (7038), 42-42
- Leonard, A. and Leonard, E.D., 1989, Mutagenic and carcinogenic potential of Aluminium and Aluminium compounds, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 23 (1-4), 27-31.
- Li, Y.M., Chaney, R.L., Schneiter, A.A. and Miller, J.F., 1995, Genotypic variation in kernel cadmium concentration in sunflower germplasm under varying soil conditions, *Crop Science*, 35, 137-141.
- McDonough, W.F. and Sun, S.-s., 1995, The composition of the Earth, *Chemical Geology*, 120 (3-4), 223-253.
- Meplan, C., Mann, K. and Hainaut, P., 1999, Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells, *Journal of Biological Chemistry*, 274 (44), 31663-31670.
- Messner, B., Türkcan, A., Ploner, C., Laufer, G. and Bernhard, D., 2015, Cadmium overkill: autophagy, apoptosis and necrosis signalling in endothelial cells exposed to cadmium, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73 (8), 1699-1713.
- Migliore, L., Cocchi, L., Nesti, C. and Sabbioni, E., 1999, Micronuclei assay and FISH analysis in human lymphocytes treated with six metal salts, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34 (4), 279-284.
- Misra, U.K., Gawdi, G., Akabani, G. and Pizzo, S.V., 2002, Cadmium-induced DNA synthesis and cell proliferation in macrophages: The role of intracellular calcium and signal transduction mechanisms, *Cellular Signalling*, 14 (4), 327-340.
- Munisamy, R., Ismail, S.N.S. and Praveena, S.M., 2013, Cadmium exposure via food crops: a case study of intensive farming area, *American Journal of Applied Science*, 10 (10), 1252-1262.
- OECD/OCDE, 2016, In vitro mammalian cell micronucleus test, *OECD Guideline for the Testing of Chemicals*, 487.
- Pampalona, J., Soler, D., Genescà, A. and Tusell, L., 2010, Whole chromosome loss is promoted by telomere dysfunction in primary cells, *Genes, Chromosomes and Cancer*, 49 (4), 368-378.
- Parker, S. P., 2003, *McGraw-Hill dictionary of scientific and technical terms*, 4<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill, New York.
- Pozarowski, P., Holden, E. and Darzynkiewicz, Z., 2012, Laser scanning cytometry: Principles and applications - An update, *Cell Imaging Techniques*, 187-212.

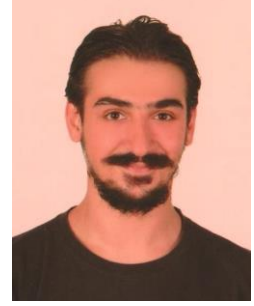
- Preiser, J.C., 2012, Oxidative stress, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 36 (2), 147-154.
- Rahimzadeh, M.R., Rahimzadeh, M.R., Kazemi, S and Moghadamnia, A., 2017, Cadmium toxicity and treatment: an update, *Caspian Journal of Internal Medicine*, 8 (3), 135-145.
- Rengel, Z., 2004, *Heavy metals as essential nutrients*, Heavy Metal Stress in Plants, In: Gupta, D.K., Corpas, F.J., Palma, J.M. (ed.), Springer, Berlin, 271-294.
- Roy, K.A., Talukder, G. and Sharma, A., 1990, Effects of aluminium sulphate on human leukocyte chromosomes in vitro, *Mutation Research Letters*, 244 (2), 179-183.
- Satarug, S., Baker, J.R., Urbenjapol, S., Haswell – Elkins, M., Reilly, P.E., Williams, D.J. and Moore, M.R., 2003, A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population, *Toxicology Letters*, 137 65-83.
- Scott, J.S. and Smith, P.G., 1981, *Dictionary of Waste and Water Treatment*, Butterworths, London.
- Scott, T.A. and Mercer, E.I., 1983, *Concise Encyclopedia of biochemistry and molecular biology*, Walter de Gruyter, Berlin.
- Sears, D.A. and Udden, M.M., 2012, Howell-Jolly bodies: a brief historical review, *The American Journal of the Medical Sciences*, 343 (5), 407-409.
- Shallari, S., Schwartz, C., Hasko, A. and Morel, J.L., 1998, Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania, *The Science of the Total Environment*, 209, 133-142.
- Spies, H., 1985, *Oxidative stress*, 1<sup>st</sup> ed., Academic Press, New York.
- Squibb, K.S. and Fowler, B.A., 1981, Relationship between metal toxicity to subcellular systems and the carcinogenic response, *Environmental Health Perspectives*, 40, 181-188.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E. and Bagchi, M., 2001, Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions, *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 20, 77-88.
- Şahin, G., Varol, I., Temizer, A., Benli, K., Demirdamar, R. and Duru, S., 1994, Determination of aluminum levels in the kidney, liver, and brain of mice treated with aluminum hydroxide, *Biological Trace Element Research*, 41 (1-2), 129-135.
- Takiguchi, M., Achanzar, W.E., Qu, W., Li, G. and Waalkes, M.P., 2003, Effects of cadmium on DNA-(cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation, *Experimental Cell Research*, (286), 355-365
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K. and Sutton, D. J., 2012, *Heavy metal toxicity and the environment*, Molecular, Clinical and Environmental Toxicology, In: Luch, A. (ed.), Vol 1: Molecular Toxicology (Experientia Supplementum), Birkhäuser, Berlin, 133-164.



- Totten, G.E. and MacKenzie, D.S., 2003, *Handbook of Aluminum: Volume 2: Alloy production and materials manufacturing*, Marcel Dekker, New York.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M., 2006, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-Biological Interactions*, 160 (1), 1-40.
- Vargel, C., 2004, *Corrosion of Aluminium*, 1<sup>st</sup> ed., Elsevier, Amsterdam.
- Waalkes, M.P., 2000, Cadmium carcinogenesis in review, *Journal of Inorganic Biochemistry*, (79), 241-244.
- Waalkes, M.P., 2000, Metals and disorders of cell accumulation: modulation of apoptosis and cell proliferation, *Toxicological Sciences*, 56 (2), 255-261.
- Waalkes, M.P., 2003, Cadmium carcinogenesis, *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533 (1-2), 107-120.
- Waalkes, M.P. and Misra, R.R., 1996, *Cadmium carcinogenicity and genotoxicity*, Toxicology of Metals, In: Chang, L.W. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 231-244.
- Willhite, C.C., Ball, G.L. and McLellan, C.J., 2012, Total allowable concentrations of monomeric inorganic aluminum and hydrated aluminum silicates in drinking water. *Critical Reviews in Toxicology*, 42 (5), 358-442.
- Wu, X., Cobbin, S.J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z. and Yang, L., 2016, A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment, *Environmental Science and Pollution Research*, 23 (9), 8244-8259.
- Yokel, R.A., Hicks, C.L. and Florence, R.L., 2008, Aluminum bioavailability from basic sodium aluminum phosphate, an approved food additive emulsifying agent, incorporated in cheese, *Food and Chemical Toxicology*, 46 (6), 2261-2266.
- Zglinicki, V.T., Edwall, C., Östlund, E., Lind, B., Nordberg, M., Ringertz, N.R. and Wroblewski, J., 1992, Very low cadmium concentrations stimulate DNA synthesis and cell growth, *Journal of Cell Science*, 103, 1073-1081.

## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	İsa Beytullah DOĞAN
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	19.12.1983
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	531 656 36 62
E-Posta Adresi	Patroclus1907@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	31.07.2008

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Genel Biyoloji