



**T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BAZI AĞIR METALLERİN mtDNA HASARI ve
mtDNA KOPYA SAYISI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Doğuş CAN

BURDUR, 2018

**T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BAZI AĞIR METALLERİN mtDNA HASARI ve
mtDNA KOPYA SAYISI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Doğuş CAN

Danışman: Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU

BURDUR, 2018

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

Doğuş CAN tarafından **Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU** yönetiminde hazırlanan “**Bazı Ağır Metallerin mtDNA Hasarı ve mtDNA Kopya Sayısı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05/09/2018

Doç. Dr Pınar ASLAN KOŞAR (Başkan)

Süleyman Demirel Üniversitesi.....

Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU (Jüri Üyesi)

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi.....

Dr. Öğr. Üyesi Füsun AKGÜL (Jüri Üyesi)

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

ONAY

Bu Tez, Enstitü Yönetim Kurulu'nun _____ Tarih ve _____ Sayılı Kararı ile Kabul Edilmiştir.

.....
Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU

Müdür
Fen Bilimleri Enstitüsü

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “**Bazı Ağır Metallerin mtDNA Hasarı ve mtDNA Kopya Sayısı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**” başlıklı bu tezin;

- Kendi çalışmam olduğunu,
- Sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi,
- Bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi,
- Kullandığım verilerde değişiklik yapmadığımı,
- Tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı,
- Bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı,

bildirir, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

05 / 09 / 2018

(İmza)

Doğuş CAN

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bana yardımcı olan, bıkmadan usanmadan sorularımı cevaplayan, bilimsel düşünmeyi ve araştırmayı öğreten, beni yönlendiren ve eğitim açılığımı gideren sayın hocam Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU'ya sonsuz teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında aldığım kararları destekleyen, sürekli olarak yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Saygı değer dostlarım Erdem Can TAŞDAN ve Işınbike GİRENTE'ye ellerinden gelen yardımı esirgemedikleri için, maddi ve manevi yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Üniversitesinin imkanlarını kullanmama izin veren, İngilizce seviyemi geliştirmemde yardımcı olan dostum Zrinka NAGLİC'e teşekkür ederim.

0449-YL-17 No`lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Son olarak canım annem Ayşe CAN'a teşekkürlerimi iletiyor, yazmış olduğum bu tezi ve gelecekteki başarılarımın tamamını ona armağan ettiğimi belirtiyorum.

Eylül, 2018

Doğuş CAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL DİZİNİ.....	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ÖZET.....	vii
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Mitokondri.....	3
2.2. Mitokondrial DNA (mtDNA).....	4
2.3. Mitokondrial DNA mutasyonları	5
2.4. Drosophila mtDNA'sının özellikleri.....	7
2.5. Kadmiyum	9
2.5.1. Kadmiyum Karsinojenitesi	10
2.6. Nikel.....	11
2.6.1. Nikel Karsinojenitesi	12
2.7. Arsenik	14
2.7.1. Arsenik Karsinojenitesi	16
2.8. Krom.....	17
2.8.1. Krom (VI) Karsinojenitesi.....	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Drosophila Kültürleri	21
3.2. Deney Grupları	21
3.3. mtDNA Çalışması	22
3.3.1. DNA'nın İzole Edilmesi	22
3.3.2. DNA'da Ön Kantitasyon İşlemi	23
3.3.3. Örneklerin PCR İşlemi	24
3.3.4. PCR Ürünlerinde Kantitasyon	25
3.3.5. mtDNA Hasarlarının Hesaplamaları	25
3.4. İstatistik	25
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	26
5. SONUÇ.....	31
KAYNAKLAR.....	32
ÖZGEÇMİŞ.....	40

ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Hayvan Mitokondrisi Diyagramı.....	3
Şekil 2.2. Memelilerdeki nükleer ve mitokondrial DNA'nın kalıtımı.....	5
Şekil 2.3. İnsan mitokondrial DNA'sı ve üretim için gerekli olan gen bölgeleri.....	7
Şekil 2.4. Kadmiyum atomik numarası (48) ve atomik ağırlığı (112.41).....	9
Şekil 2.5. Nikel atomik numarası (28) ve atomik ağırlığı (58.693).....	12
Şekil 2.6. Arsenik atomik numarası (33) ve atomik ağırlığı (74.922).....	16
Şekil 2.7. Krom atomik numarası (24) ve atomik ağırlığı (51.996).....	18
Şekil 3.1. Besi yeri hazırlanması aşaması.....	21
Şekil 3.2. PCR aşaması.....	23
Şekil 4.1. Kontrol ve deney gruplarının relatif amplifikasyon grafiği.....	27
Şekil 4.2. Kontrol ve deney gruplarının mtDNA kopya sayısı grafiği.....	27

ÇİZELGE DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Nükleer Genom ve Mitokondrial Genom arasındaki farklılıklar.....	8
Tablo 2.2. IARC çalışma grubu tarafından belirlenen bazı metallerin karsinojenik etkileri.....	20
Tablo 4.1. Relatif amplifikasyon ve mtDNA kopya sayısı değerleri.....	26



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

8-OHdG	: 8-hidroksiguanozin
A	: Adenin
ATSDR	: Zehirli Maddeler ve Hastalıklar Kaydı Ajansı
bp	: Baz çifti
C	: Sitozin
DHHS	: Sağlık ve İnsan Hizmetleri Dairesi
DMAA	: Dimethylarsinic acid
DMSO	: Dimetil sulfoksit
dsDNA	: Çift zincirli DNA
DYm	: Mitokondrial membran potansiyeli
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
G	: Guanin
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IPO	: Uluslararası Kimyasal Güvenliği Programı
MAK	: Maximum Concentrations
mM	: Milimolar
MMA (III)	: Methylarsonous asit
mtDNA	: Mitokondrial DNA
mtTFA	: Mitochondrial transcription factor A
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
NTP	: Ulusal Toksikoloji Programı
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RA	: Relatif Amplifikasyon
ROS	: Reaktif Oksijen Türevleri
rpm	: Revolutions per minute
T	: Timin
TE	: Tris Edta Tamponu
USEPA	: Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

μL : Mikrolitre
 μg : Mikrogram



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Bazı Ağır Metallerin mtDNA Hasarı ve mtDNA Kopya Sayısı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Doğuş CAN

**Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU

Eylül, 2018

Bu çalışmanın amacı bazı ağır metallerin *Drosophila melanogaster* türündeki mtDNA hasarı ve kopya sayısı üzerine etkilerini incelemektir. Ağır metaller günlük yaşamımızda ve sanayide sıkça kullanılmaktadır. Bunun dışında ağır metallerin insan yardımıyla ya da doğal olarak atmosfere, toprağa ve suya salınıyor olması insanlık açısından büyük bir tehlike oluşturmaktadır. Bu tehlike maruz kalınan doz miktarına ve kronikliğine göre artabilmekte hatta tümör ve kanser oluşumuna kadar ilerleyebilmektedir. Arsenik, Kadmiyum, Nikel ve Krom üzerine yapılan araştırmalar sonucunda bu metallerin insanlar için yüksek oranda karsinojen etkilere sahip oldukları belirlenmiştir. Bilimsel çalışmalardan elde edilen verilerin ardından bu metaller, class 1 karsinojen olarak sınıflandırılmışlardır.

Kanserin oluşması için çeşitli mekanizmaların biraraya gelmesi ve çeşitli mekanizmaların da devre dışı kalması gerektiği düşünülmektedir. Hücre içerisinde önemli etkilerinden dolayı mitokondri ve mtDNA karsinogeneze oldukça önemli bir rol üstlenmişlerdir. Bu bağlamda incelemiş olduğumuz dört ağır metalin *Drosophila*'nın mtDNA'sı üzerindeki mutatik etkileri ölçülmüştür. Arsenik, Nikel ve Kadmiyum *Drosophila*'da mtDNA mutasyonlarına neden olurken Krom'un istatistiksel olarak anlamlı derecede hasara neden olmadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: mtDNA hasarı, mtDNA kopya sayısı, krom, kadmiyum, arsenik, nikel, ağır metaller, *Drosophila*

Hazırlanan bu Yüksek Lisans tezi MAKÜ BAP Koordinatörlüğü tarafından 0449-YL-17 proje numarası ile desteklenmiştir.

SUMMARY

M. Sc. Thesis

Investigation of The Effects of Some Heavy Metals on mtDNA Damage and mtDNA Copy Number

Doğuş CAN

**Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU

September, 2018

The aim of this study is to examine the effects of some heavy metals on the mtDNA damage and the mtDNA copy number in *Drosophila melanogaster*. Heavy metals are used frequently in our daily life and industry. Apart from this, the fact that heavy metals are released by human activities or naturally to atmosphere, soil and water poses a great danger to humanity. This risk can be increased according to the amount and chronicity of the dose being exposed and can even progress to tumor and cancer formation. Researches on Arsenic, Cadmium, Nickel and Chromium have shown that these metals have high carcinogenic effects for humans. Following the data obtained from scientific studies, these metals were classified as class 1 carcinogens.

It is thought that various mechanisms must come together for the formation of cancer and that various mechanisms should be disabled. Mitochondria and mtDNA have played an important role in carcinogenesis because of their important effects in the cell. In this context, we have investigated the effects of the four heavy metals on the mtDNA of *Drosophila*. Arsenic, Nickel and Cadmium resulted in mtDNA mutations in *Drosophila*, resulting in chromium not causing a statistically significant damage.

Keywords: mtDNA damage, mtDNA copy number, chromium, cadmium, arsenic, nickel, heavy metals, *Drosophila*

The present M.Sc. Thesis was supported by MAKU Scientific Projects Unit under the Project number of 0449-YL-17

1. GİRİŞ

Bir ağır metalin ansiklopedik olarak net bir tanımı yoktur (Järup L, 2003). Herhangi bir toksik metal atomik kütlelerine veya yoğunluğuna bakılmaksızın ağır metal olarak tanımlanabilir (Singh vd., 2011). Birçok durumda yoğunluk, tanımlayıcı faktör olarak kabul edilir ve yoğunluğu 5g/cm^3 den fazla olan metaller ağır metal olarak tanımlanır (Järup L, 2003).

Ağır metaller sağlık etkileri açısından 2 ana gruba ayrılabilir;

1.) Esansiyel Ağır Metaller: Demir (Fe), Bakır (Cu), Mangan (Mn), Çinko (Zn), Krom (Cr), Molibden (Mo), Nikel (Ni) ve Kobalt (Co). Bu metaller ayrıca mikronütrientler olarak da adlandırılır. İhtiyaç olandan fazlasına maruz kalma durumunda toksik etki gösterir.

2.) Esansiyel Olmayan Ağır Metaller: Baryum (Ba), Alüminyum (Al), Lityum (Li), Arsenik (As), Kadmiyum (Cd), Kurşun (Pb), Zirkonyum (Zr), Cıva (Hg), Plütonyum (Pu), Wolfram (W) ve Vanadyum (V). Akut veya kronik organ toksisite potansiyeli olan metallerdir. Toksik aktivitelerini çeşitli mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştirirler. Tamamı hücre içi ve hücre dışı protein sülfhidrilleri ile etkileşime girme potansiyeline sahiptir. Bu da potansiyel olarak aynı zamanda oksidatif strese yatkınlık yaratmaktadır (Rengel, 1999; Theron vd., 2012; Kochare ve Tamir, 2015).

Ağır metaller her yerde bulunabilen bir grup çevresel kimyasal olup, biyolojik olarak parçalanamazlar (Wu vd., 2016). Biyosferin ağır metallerle kirleniyor oluşu dünya için ciddi bir sorun haline gelmiştir. Bu metallerin çevreye bırakılması temel olarak fosil yakıtların kullanımı, maden cevherlerinin çıkarılması ve maden cevherlerinin işlenmesi, belediye atıkları, gübreler, pestisitler ve kentsel kanalizasyonla bağlantılı insan faaliyetlerinin sonucu olarak önemli ölçüde artmıştır (Basile vd., 2012).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) Uluslararası Kimyasal Güvenliği Programı (IPO) tehlikeyi "bir organizmanın, sistemin veya alt popülasyonun ortaya çıkması durumunda olumsuz etkilere neden olma potansiyeline sahip bir maddenin veya durumun doğasında var olma özelliği" olarak ve riski "bir maddeye maruz kalmasıyla belirlenmiş şartlar altında bir organizmadaki, sistemdeki veya alt popülasyondaki olumsuz etkinin olasılığı" olarak tanımlamıştır.

İnsanlarda kimyasalların risk değerlendirmesi, bu tür kimyasalların genotoksik veya non-genotoksik olabileceği varsayımına dayanır. Genotoksik karsinojenler ve bunların metabolitlerinin, doğrudan ve potansiyel olarak geri dönüşü olmayan bir DNA-kovalent bağlanmayı içeren bir etki modu yoluyla hareket ettiği varsayılırken, non-genotoksik karsinojenlerin veya bunların metabolitlerinin, DNA'ya kovalent bağlanma olmaksızın bir epigenetik etki yoluyla hareket ettiği varsayılmaktadır. Yukarıdaki risk ve tehlike tanımlarında belirtildiği gibi, risk değerlendirmesi açısından, eşik değeri olmaksızın veya potansiyel bir etkisi olmayan bir dozda hayat boyu maruz kalınan lineer bir “düşük doz-yanıt” ilişkisi genellikle genotoksik karsinojenler için varsayılırken, indüklenen herhangi bir önemli etkinin gözlenemediği bir eşik seviyesinde maruziyet, genotoksik olmayan karsinojenler için varsayılır. Sonrasında bu durum homeostatik mekanizmaların, düşük alım seviyeleri tarafından üretilen biyolojik düzensizlikleri dengeleyebildiğini ve kanser içerebilecek olumsuz etkilere yol açan yapısal veya fonksiyonel değişikliklerin sadece daha yüksek alımlarda gözlenebileceğini belirtmektedir (Dorne vd., 2011).

Arsenik, kadmiyum, krom, kurşun, civa ve nikel gibi ağır metaller yaygın çevresel kirleticilerdir ve başta çeşitli kanserler olmak üzere çeşitli sağlık sorunlarına neden olabilirler. Bu metaller, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) ve Alman MAK (Maximum Concentrations) Komisyonu tarafından insan karsinojenleri olarak kabul edilir ve sınıflandırılır. Ağır metal maruziyetinin epigenetik faktörler, transkriptler, proteinler ve metabolitlerdeki anormal değişikliklere olan olumsuz etkilerini ilişkilendiren birçok önemli kanıt bulunmaktadır. Bununla birlikte, ağır metal karsinojenitesinin doğal mekanizmaları ve hücre içi tepki yolları tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bu nedenle çalışmalar toksikogenomik teknolojilerin geliştirilmesine yoğunlaşmıştır (Koedrith vd., 2013).

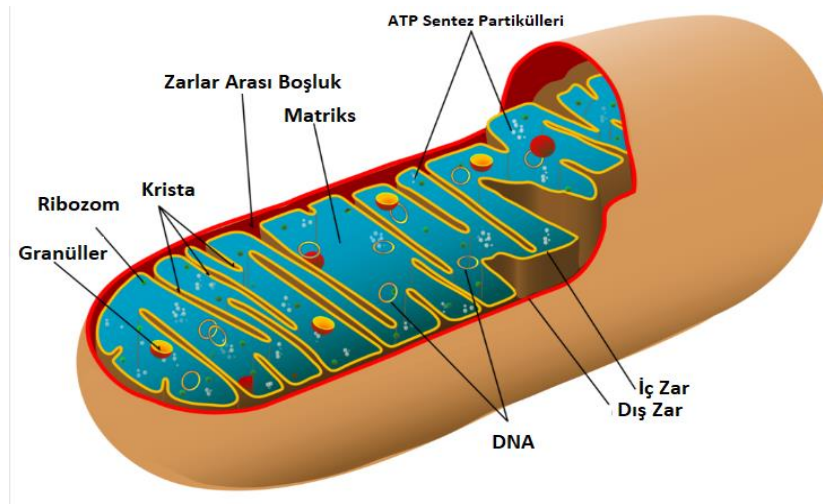
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mitokondri

Mitokondri ökaryotlarda bulunur ve oksidatif fosforilasyon ile ATP üretiminden ve elektron transfer zincirinden sorumludur. Hücre içerisindeki çekirdek ve bitkilerdeki kloroplastlar hariç kendisine ait DNA'sı olan tek organeldir (Taylor ve Turnbull, 2005).

Mitokondri, glukoz ve diğer organik bileşikler kullanılarak ATP moleküllerinin üretilmesini sağlayan organeldir. Daha fazla enerji elde edilebilmesi için oksijen kullanılır ki solunum yoluyla alınan oksijenin temel kullanım alanı mitokondrilere dir.

Mitokondri iki membrandan oluşur. Şekil 2.1 de görüleceği üzere dış membran stoplazma ile bağlantılı iken iç membran içe doğru birçok defa katlanmış bir haldedir. Bu ikili membran sistemi mitokondriyi ikiye ayırmaktadır. İç membran ATP üretiminden sorumlu enzim ve proteinlere ev sahipliği etmektedir ve matriks sıvısıyla kaplıdır. Dış membran ise mitokondrinin hücre sel bağlantısını kurmaktadır. Yaklaşık %50'si lipid tabakasından, diğer %50'si ise protein ve enzimlerden oluşmaktadır. İç membran ve dış membran arasındaki bölge "zarlar arası boşluk" olarak adlandırılır (Star ve Taggart, 1995). Ökaryotik hücrelerin tamamı bir yada daha fazla mitokondri taşımaktadır. Hücrenin enerji ihtiyacına göre bu sayı artabilmektedir. Örneğin memeli karaciğer hücresinde ortalama 1500 mitokondri bulunmaktadır ki buda hücrenin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır (Lodish vd. 2007).



Şekil 2.1. Hayvan Mitokondrisi Diyagramı (Anonim)

Mitokondrilerin büyüklüğü ve biyokimyası bakterilere benzerdir. Kalınlıkları 0.2-10 µm aralığında olup, uzunlukları 1-4 µm aralığındadır. Kendilerine ait DNA ve bir miktar ribozomları bulunmaktadır. Kendilerine ait DNA'larının olması mitokondrilerin kendi başlarına bölünmesine imkân sağlamaktadır. Bu özellikleri nedeniyle eski dönemde yaşamış bir bakteri iken predatörler tarafından hücre içerisine alınarak günümüzdeki haline evrimleştiği düşünülmektedir. Bunun olması için de hücre içerisinde bir şekilde çoğalmaya devam ettikleri ve sonraki nesillerin hücre dışında tek başına yaşamalarına olanak veren yapı ve fonksiyonları zamanla kaybederek hücre içerisinde hücreye bağımlı hale geldikleri düşünülmektedir (Karp, 1996).

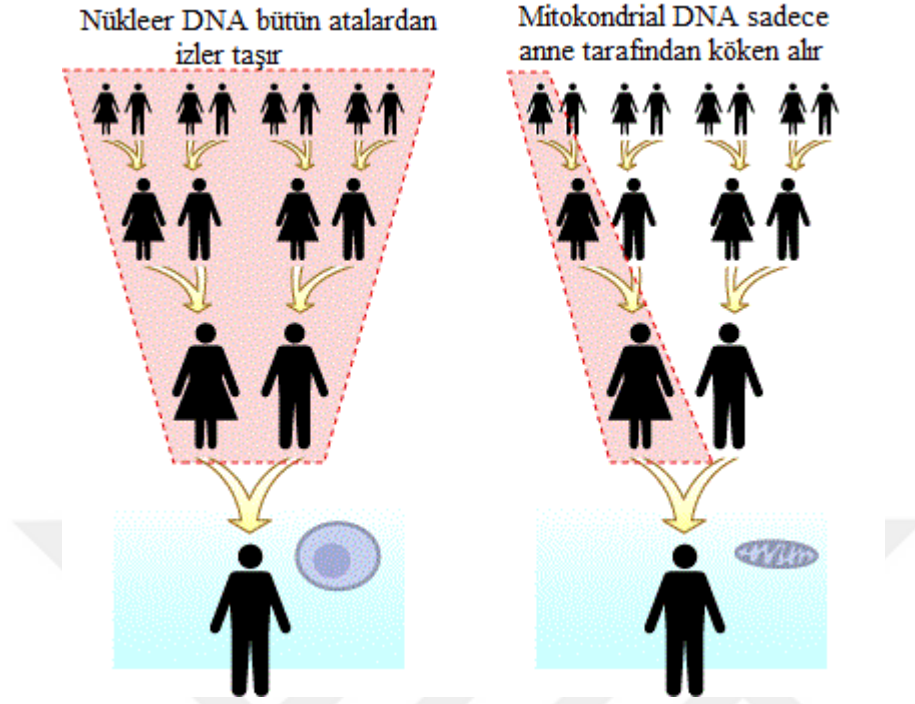
2.2. Mitokondrial DNA (mtDNA)

Mitokondrial DNA (mtDNA) mitokondri içerisinde matriks sıvısında bulunmaktadır. mtDNA sayısı hücreden hücreye farklılık gösterebilmektedir. Bunun sebeplerinden birisi mitoz bölünme sırasında mtDNA'ların kardeş hücrelere eşit sayıda dağıtımına olanak veren bir mekanizmanın olmamasıdır.

mtDNA'nın tarihçesi 20. yüzyıla dayanmaktadır. 1959'da mitokondriyal fonksiyon bozuklukları ile ilgili ilk klinik sendrom bildirildi (Luft hastalığı), 1964 yılında mayalarda mtDNA varlığı bildirildi, 1970'lerde ökaryotik canlılardaki mtDNA varlığı doğrulandı, 1981 yılında insan mtDNA'sındaki 16569 baz çiftinin tüm nükleotid dizisi rapor edildi (Ozawa, 1995).

Nükleer ve mitokondrial genomların farklılıkları Tablo 2.1'de gösterilmiş olup bu farklılıklara rağmen fonksiyonel olarak birbirine bağımlıdır. Mitokondriyal proteinlerin çoğu nükleer genler tarafından kodlanır. Sadece 2 rRNA (sadece mitokondriyal ribozomda yer alanlar), 20 ila 35 arası tRNA (mitokondride translasyon için gerekli olanlar) ve 13 protein (ATP sentezinde ve solunum zincirinde yer alan mitokondriyal komplekslerin alt birimlerinde yer alan) mitokondriyal DNA tarafından kodlanır. Mitokondriyal ribozomlar için gerekli olan yaklaşık 90 protein, 20 farklı aminoasit sentetaz ve mtDNA'yı kopyalamak için gereken tüm enzimler nükleer DNA tarafından kodlanır.

Şekil 2.2'de görüleceği üzere memeli mtDNA'sı nükleer DNA'dan farklı olarak anneden bir haploid olarak kalıtılır ve heteroplazmiye nadiren rastlanır. mtDNA'nın evrimsel değişim oranı nükleer genomdan 5 ila 10 kat daha hızlıdır. Bunun nedeni mitokondrilerin replikasyonda oluşan hatalara karşı ve DNA hasarlarına karşı oldukça savunmasız durumda olmasıdır (Lodish vd, 2007).



Şekil 2.2. Memelilerdeki nükleer ve mitokondrial DNA'nın kalıtımı (Anonim)

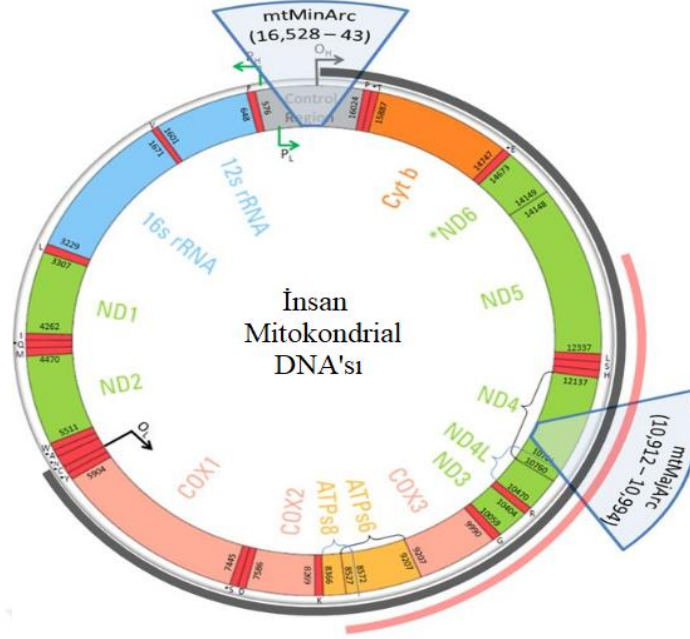
2.3. Mitokondrial DNA mutasyonları

Mitokondrial mutasyonların birikmesinin ve bu mutasyonları taşıyan hücrelerin bölünerek mutasyonlarını yeni hücrelere taşıyor olmasının sonucunda mtDNA'nın canlılarda birçok hastalığa doğrudan ya da dolaylı olarak önemli oranda katkı sağladığı öne sürülmüştür. Bu hipotezin temelini mtDNA'daki yüksek orandaki gen mutasyonu sıklığı, mitokondriyal genomun küçük boyutu ve elde edilen bilgi içeriği (Şekil 2.3), nükleer DNA'dan farklı olarak mtDNA'daki onarım mekanizması eksikliği, ökaryotik hücre bölünmesi sırasında mtDNA'daki mutasyonların sıklığı, mitokondriyal bozuklukların moleküler genetik lezyonlarına ait bulgular oluşturmaktadır (Linnane vd., 1989).

mtDNA mutasyonlarının sonucu olarak mitokondriyal protein sentezindeki bozulmalar anormal mRNA işlenmesine, anormal RNA transkriptlerinin birikimine, aminoasilasyon değişikliklerine ve hatalı amino asit-tRNA konjugasyonlarına neden olabilmektedir. Bu bozulmaların sonucunda solunum zinciri bozukluklarından kaynaklanan enerji üretimi aksaklıkları oluşmaktadır (Mirabella vd., 2000). mtDNA'daki delesyonlar gibi somatik olarak edinilmiş mutasyonlar esas olarak serbest oksijen radikallerin (ROS) neden olduğu hasarlar sonucu oluşur. mtDNA'nın baz dizileri incelendiğinde ROS hasarının nokta mutasyonlara neden olduğu ve delesyonların oluşmasını hızlandırdığı gözlemlenmiştir.

ROS'un neden olduğu mtDNA hasarlarının yaşlanma redoks mekanizmasına ve programlanmış hücre ölümüne (apoptoz) etki ettiği ortaya çıkmıştır (Ozawa, 1995). Çeşitli tümör örneklerinde yapılan çalışmalarda örneklerin birçoğunda mtDNA hasarı gözlemlenmiştir. Yapılan araştırmalarda mtDNA hasarının tek başına tümör oluşumuna neden olmadığı ancak tümör oluşumu için gerekli olan şartların bazılarına neden olabileceği ve bu şekilde tümör oluşumuna dolaylı yoldan yardımcı olduğu ortaya çıkmıştır (Taylor ve Turnbull, 2005).

Apoptoz, doku gelişimi ve homeostaz için gerekli olan bir mekanizmadır. Bir dizi farklı morfolojik ve biyokimyasal özelliklere yol ačan spesifik gen ve enzimlerin aktivasyonunu gerektirir. Apoptoz düzensizliği kanser, otoimmün ve nörodejeneratif bozukluklar gibi çeşitli hastalıklara neden olur. Elde edilen bilgiler apoptotik süreçte mitokondrinin merkezi bir rol üstlendiğini ortaya koymuştur. İn vitro deneysel çalışmalar, mitokondriyal transmembran potansiyelinde oluşan bozulmaların ve bazı mitokondriyal proteinlerin (sitokrom-c gibi) sitoplazmaya salınmasının farklı apoptotik yolları başlatıp apoptozu aktive edebildiğini ya da tam tersi olarak mitokondrideki çeşitli bozulmaların apoptozu engelleyebileceğini göstermiştir. mtDNA mutasyonları olduğu belirlenen kas hücrelerinde yapılan bir araştırmada apoptotik değişiklikler gözlemlenmemiş, yapısal gen mutasyonları taşıyan mtDNA'lı hücrelerin elimine edilmediği ancak mitokondriyal protein sentezini etkileyen mtDNA bozulmalarının mitokondriyal patojenezi tetiklediği gözlemlenmiştir. Bu bozulmalar sitokrom-c inaktivasyonuna neden olabilmektedir. Sitokrom-c apoptotik yolları tetikleyebilen bir moleküldür. Sitokrom-c'nin engellenmesi hücrelerin apoptoz mekanizmasını bozabilmekte ve apoptozu engelleyebilmektedir. Apoptozun engellenmesi tümör ve kanser oluşumu için gerekli olan basamaklardan birisidir. Bunun dışında mtDNA mutasyonlarının sitokrom-c'nin kontrolsüz salınımına neden olabileceği, bunun neticesinde de hücrelerde ihtiyaç olmamasına rağmen apoptozisin tetiklenebildiği ve biyokimyasal bozukluklara neden olabileceği, doku hasarlarında artışa sebebiyet verebileceği gözlemlenmiştir (Mirabella vd., 2000). Yapılan araştırmalarda meme kanseri, kolon kanseri, mide kanseri, karaciğer kanseri, böbrek kanseri, mesane kanseri gibi kanser türlerinde ve birçok tümörde yüksek oranda mtDNA mutasyonu olduğuna dair veriler bulunmaktadır (Penta vd., 2001).



Şekil 2.3. İnsan mitokondrial DNA'sı ve üretim için gerekli olan gen bölgeleri (Phillips vd., 2014)

2.4. Drosophila mtDNA'sının özellikleri

Drosophila mtDNA'sının tamamının sekanslanması 1995'de tamamlanmıştır. Drosophila mtDNA genomunun gen içeriği omurgalılarla aynıdır ancak her iki DNA ipliğindeki gen sırası ve dağılımı farklıdır. Drosophila mtDNA'sı 13 polipeptit, 22 tRNA ve 2 rRNA'yı kodlamaktadır. 19517 bp uzunluğundadır.

Drosophila mtDNA'sı alışılmadık şekilde yüksek miktarda A (adenin) + T (timin) içeriğine sahiptir. Yüksek miktardaki A + T özellikle kodlanmayan bölgelerde yoğun miktarda bulunur, bu bölge %90-96 oranında deoksiadenilat ve timildilat içerir. A + T bölgesinin polimorfizm uzunluğu tekrarlanan DNA dizisi parçalarının sayısı ile ilişkilidir. mtDNA'da iki tip ardışık olarak tekrarlanan kısım mevcuttur; 338-378 bp'lik beş kopyadan oluşan A+T bölgesi kısmı ve 470bp'lik dört kopyalık DNA sekans üyelerini içeren A+T kısmıdır.

Drosophila mtDNA'sı için esansiyel olarak 2 önemli protein vardır. Bunlar; DNA polimeraz (pol γ) ve mtDNA bağlayıcı protein (mtSSB)'dir. Hayvan mtDNA'larında yapılan araştırmalar pol γ 'nın mtDNA replikasyonunda ve tamirinde anahtar rol aldığını göstermektedir. Drosophila pol γ DNA iplikçiğinde mtSSB tarafından sürekli olarak uyarılmasıyla DNA bağlanmasını artırır ve DNA iplik sentezini tetikler. Aynı zamanda mtSSB pol γ 'nin düzeltme aktivitesini de uyarmaktadır (Garasse vd., 2005; Lewis vd.,1995).

Tablo 2.1. İnsanlarda Nükleer Genom ve Mitokondrial Genom arasındaki farklılıklar (Taylor ve Turnbull ., 2005)

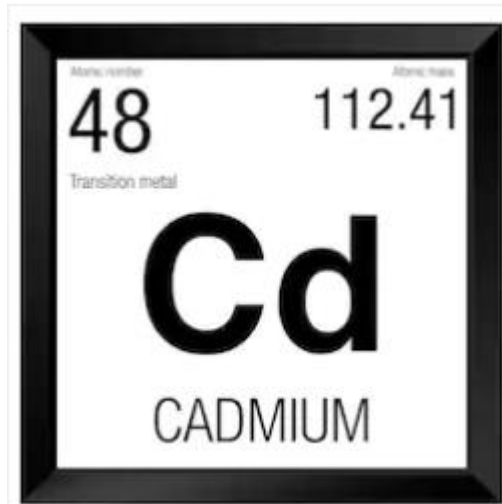
Karakteristik	Nükleer Genom	Mitokondrial Genom
Büyükklük	~3.3 x 10 ⁹ bp	16.569 bp
Hücredeki kromozom sayısı	Haploid hücrelerde 23 Diploid hücrelerde 46	Her hücrede binden fazla kopya (poliploidi)
Kodlanmış gen sayısı	~20.000 – 30.000	37 (13 polipeptit, 22 tRNA ve 2 rRNA)
Gen değişimi	~40.000 bp'de 1	~450bp'de 1
Ekson yüzdesi	~3%	~93%
Kodon kullanımı	Genel genetik kod	Metiyonin için AUA, triptofan için AGA ve AGG spesifik dur kodonları
Protein ilişkisi	Nükleozom bağlantılı histon proteinleri ve histon olmayan proteinler	Histon proteinleri yok ancak nükleoidlerden oluşan birkaç proteinle bağlantılı (TFAM gibi)
Kalıtım türü	Otozomlar için Mendel kalıtım ve X kromozomu; baba tarafından Y kromozomunun kalıtımı	Anneden gelen genlerin kalıtımı
Replikasyon	DNA polimeraz α ve δ kullanılan iplikçikli mekanizma	Sadece DNA polimeraz γ kullanılan iplikçikli mekanizma
Transkripsiyon	Çoğu gen bireysel olarak ifade edilir	Her iki iplikteki bütün genler büyük polisistronlar olarak ifade edilir
Rekombinasyon	Mayozun profaz safhasında her bir çift homolog yeniden bir araya gelir	Hücresele seviyede rekombinasyonun meydana geldiğini gösteren kanıtlar vardır ancak popülasyon seviyesinde meydana geldiğine dair kanıt azdır

2.5. Kadmiyum

Kadmiyum (Şekil 2.4), mesleki sağlık sorunlarına sebebiyet vermesiyle ve yükselen oranda halk sağlığına etki etmesiyle bilinen toksik bir ağır metaldir (Sethi ve Khandelwal, 2006). Bazı gıdalarda, tütün ürünleri dumanında, hava, su ve diğer ortamlarda bulunur. İnhalasyon, sindirim ve dermal temas yoluyla insan vücuduna girebilir (Wu vd., 2016). Kadmiyum, doğal ve antropojenik yollarla atmosfere salınır. Volkanlar, rüzgardaki partiküller ve biyogenik emisyonlar atmosferdeki temel doğal kadmiyum kaynakları olarak kabul edilir (WHO, 2007). Kadmiyum bileşikleri, PVC ürünlerinde, renk pigmentlerinde, çeşitli alaşımlarda ve günümüzde çoğunlukla tekrar şarj edilebilir nikel-kadmiyum bataryalarda stabilizatör olarak kullanılmaktadırlar (Järup, 2003).

Tütün ürünlerinin kullanımı, madencilik, madenlerin işlenmesi ve rafine edilmesi, fosil yakıtların kullanımı, belediye atıklarının yakılması (özellikle kadmiyum içeren piller ve plastikler), fosfat gübrelere üretilmesi, kadmiyum kaplamanın geri dönüştürülmesi, çelik hurda, elektrik ve elektronik atıklar gibi insan faaliyetleri ile atmosfere bırakılmaktadırlar.

Kadmiyum, böbrek (böbrek kadmiyum etkileri için en hassas hedef organ olarak kabul edilir), iskelet, solunum sistemi üzerinde toksik etkiler uygular ve insan karsinojeni olarak sınıflandırılır. Ortamda genellikle düşük seviyelerde bulunur. Bununla birlikte, insan aktivitesi bu seviyeleri önemli ölçüde arttırmaktadır (WHO, 2010; Wu vd., 2016).



Şekil 2.4. Kadmiyum atomik numarası (48) ve atomik ağırlığı (112.41)

(<https://www.shutterstock.com/tr/g/alejo%20miranda>).

2.5.1. Kadmiyum Karsinojenitesi

Kadmiyum ve kadmiyum bileşiklerinin insan karsinojenleri olduğu, epidemiyolojik ve mekanik çalışmalar dahil olmak üzere insanlarda yapılan çalışmalardan elde edilen karsinojenite kanıtlarına dayanarak bilinmektedir. Kadmiyum ve kadmiyum bileşikleri, deney hayvanlarında yapılan çalışmalardan elde edilen karsinojeniteye ilişkin yeterli kanıtlara dayanarak, 1980 yılında yapılan “Karsinojenler Hakkında İlk Yıllık Rapor” da insan karsinojenleri olarak kabul edilip buna uygun olarak listelenmiştir (EPA, 2016).

Kadmiyum onkojenitesinin potansiyel olarak katkıda bulunduğu faktörler; anormal gen aktivasyonu, baskılanmış apoptoz ve/veya DNA onarımının engellenmesini içerir (Waalkes, 2003).

Kadmiyum karsinojenitesine ilişkin ilk araştırmalardan birisi Amerika’daki kadmiyum işlemeciliğinde çalışan işçilerin akciğer kanseri risklerinin incelenmesidir. 1940-1969 yılları arasında minimum 6 ay boyunca kadmiyum işlemeciliğinde çalışmış olan 602 beyaz erkek gözlemlenmiştir. Populasyon 1978 yılının sonuna kadar gözlemlenmeye devam edilmiştir. 1960 yılından sonra işe alınan 261 işçinin verileri oldukça açık bir popülasyonu göstermektedir. Çalışmalar akciğer kanseri riskinin sadece arsenik ve sigara kullanımına bağlı olmadığını doğrulayabilmişlerdir. Akciğer kanseri riski gözlemlenmiş olsa da diğer karsinojenlerin (sigara kullanımı ve arsenik) etkisi çalışmaya netlik kazandıramamıştır (Thun vd., 1985).

1993’de IARC, kadmiyum ve kadmiyum bileşiklerini 1. Sınıf İnsan Karsinojenleri olarak (Tablo 2.2) sınıflandırmıştır (IARC, 1993).

Oksidatif etkisinden dolayı oluşan DNA hasarlarının doğrudan karsinojenik etkisi olmasa bile DNA hasarı sonucu oluşabilen apoptozun engellenmesi ya da hücre çoğalma mekanizmalarına etki ediyor oluşu karsinojenik etki yapabilmektedir. Bunun dışında kadmiyumun DNA onarımını engellediği bunun sonucu olarak da mutasyona neden olabileceği bilinmektedir. Tüm bunlar birleştirildiğinde kadmiyumun, karsinojenik olarak büyük etkilere sahip olduğu düşünülmektedir (Waalkes, 2000).

Fareler üzerinde yapılan bir deneyde, fare L6 miyoblastlarında c-myc, c-jun transkripsiyonlarını indükleyerek proto-onkogenlerin aktivasyonuna neden olduğu gözlemlenmiştir (Abshire vd., 1996).

Fareler üzerinde yapılan bir başka deneyde, kadmiyum oksit tozu ve kadmiyum oksit dumanına maruz bırakılan dişi farelerde akciğer tümörü oluşumu önemli ölçüde artmıştır (Heinrich, 1992).

IARC'ın elde etmiş olduğu veriler sonucunda kadmiyumun akciğer kanserine neden olduğu kanıtlanmış, prostat ve böbrek kanserlerine de neden olabileceği belirtilmiştir (Straif vd, 2009).

Çeşitli araştırmalarla prostat kanseri ve kadmiyum arasındaki bağlantılar gösterilse dahi şu an için kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Muhtemelen bunun sebebi bu bağlantının kadmiyumun dozuna bağlı olmasıdır. Farelerde yapılan bir çalışmada, yüksek dozlardaki kadmiyum maruziyetinin farelerin testislerinde bozunmalara ve tümör oluşumuna neden olduğu gözlemlenmiştir (Waalkes vd., 1989).

İnsan prostat kanseri, karmaşık bir etiyolojiye sahip olan ölümcül bir hastalıktır ve tüm vakaların nispeten küçük bir kısmını tek bir faktöre bağlamamak gerekir. Son kanıtlar, kadmiyumun in vitro'da insan prostat epitel hücrelerini, karsinojen olarak dönüştürülebildiğini göstermektedir (Waalkes, 2003).

Üç farklı epidemiyolojik çalışmadan elde edilen verilere göre kadmiyuma mesleki maruziyetin, yüksek oranda renal kanser riskiyle ilişkili olduğu ve bu olasılık oranlarının 1,2 ila 5,0 arasında değiştiğini göstermiştir (Il'yasova ve Schwartz, 2005).

1984-2013 yılları arasındaki verilerden yararlanarak kadmiyumun idrar kesesi kanseri ile ilişkisine yönelik kadmiyum maruziyeti, birikimi, toksisitesi, karsinojenitesi, epidemiyolojik ve deneysel çalışmaları içeren bir derleme hazırlanmıştır. Farklı metodolojilere rağmen, kadmiyumla ilgili epidemiyolojik ve nefrotoksisite çalışmaları kadmiyuma mesleki maruziyetin, mesane kanseri riskinin artması ile ilişkili olduğunu ve ürotelyal hücrelerde kadmiyumun potansiyel bir toksik element olduğuna dair ek kanıtlar sağladığını göstermektedir (Feki ve Hamza, 2014).

2.6. Nikel

Nikel (Şekil 2.5) mikroorganizmaların, bitkilerin, hayvanların bazı proteinlerinin ve enzimlerinin bir bileşeni olarak kabul edilir ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından insan sağlığı için esansiyel element olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, yüksek oranda nikel maruz kalma toksisite semptomlarına sebebiyet vermektedir (Xia vd., 2017).

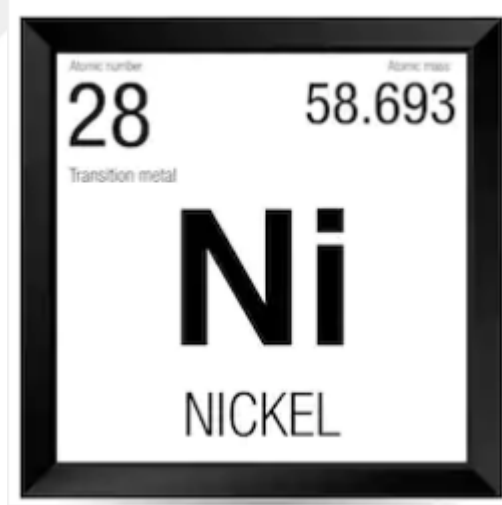
Nikel, dayanıklı olması, korozyon direnci, yüksek sıcaklık kararlılığı gibi özellikleri sebebiyle birçok farklı endüstride (paslanmaz çelik üretimi, elektro kaplama, batarya, elektronik, katalizörler vb.) kullanılmaktadır (Yin ve Wang, 2017).

Madencilik, öğütme, eritme ve diğer metalurjik endüstriyel prosesler ve fosil yakıtların kullanımı, hava ve su sistemlerinin nikel emisyonu ile sonuçlanır. Havadaki nikel taşıyan parçacıklar yüzey sularına ve toprağa çöker, böylece bitki ve hayvanlar bu şekilde

nikele maruz kalır (Schaumlöffel, 2012). İnsanlar yiyecek, su, hava ve madencilik, arıtma, elektro kaplama, gıda işleme aracılığı ile nikele maruz kalabilirler (Song vd., 2017).

Nikel yaygın bir deri alerjenidir. Kadınlarda en fazla karşılaşılan alerjendir ve erkeklerde de oldukça yaygın bir alerjendir. Kadın popülasyonunun %10-15'i ve erkek popülasyonunun %1-2'si Nikel'e karşı alerjik tepki göstermektedir. Nikelin immünolojik etkilerinden özellikle nikel iyonlarının sorumlu olduğu kabul edilmektedir. Bu duyarlılığın genellikle gençlerde, nikel alaşımlarına mesleki olmayan cilt temaslarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Özellikle nikel içeren sıvılar ve solüsyonlara mesleki maruziyetlerden oluşan tahrikler el egzemasına sebep olabilmektedir. Oral yolla düşük dozda nikel alımı duyarlı kişilerde kontakt dermatite neden olabilir. Nikel duyarlılığı olan kişilerin nikel içeren implant ve protezleri kullanması halinde alerjik reaksiyonlar oluşabilir (IARC, 1990).

Karsinojenitesinin dışında nikel ve nikel bileşiklerinin nörotoksitesitesi de son yıllarda büyük ilgi görmüştür. Solunum yoluyla maruz kalınan Nikel öncelikle serebral kortekste ve tüm beyinde birikerek baş ağrıları, sersemlik, yorgunluk, uyuşukluk ve ataksi gibi çeşitli nörolojik semptomlara neden olmaktadır (Song vd., 2017).



Şekil 2.5. Nikel atomik numarası (28) ve atomik ağırlığı (58.693)

(<https://www.shutterstock.com/tr/g/alejo%20miranda>).

2.6.1. Nikel Karsinojenitesi

Yapılan bir araştırmada nikel rafinelerinde veya nikel işleme tesislerinde çalışırken yüksek seviyelerde nikel bileşikleri içeren tozu soluyan işçilerin akciğer ve sinüs

kanserlerine yakalanma olasılıklarının çok yüksek oranda arttığı gözlemlenmiştir. Sağlık ve İnsan Hizmetleri Dairesi (DHHS), nikel metalinin karsinojen olabileceğini ve nikel bileşiklerinin insan karsinojenleri olduğunu belirtmiştir. IARC, bazı nikel bileşiklerinin insanlara karsinojenik olduğunu ve metalik nikelin ise insanlara karsinojenik olabileceğini açıklamıştır (Tablo 2.2). Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (USEPA), nikel rafineri tozlarının ve nikel subsülfatın insan karsinojenleri olduğunu belirtmiştir (ATSDR, 2005).

Bazı partiküllü nikel bileşiklerinin deney hayvanları üzerindeki karsinojenik etkileri araştırılmış ve suda çözünen nikel tuzlarının karsinojenik etkiye sahip olmadığı, bunun sebebinin de nikel tuzlarının hücreye giremiyor oluşundan kaynaklandığı raporlanmıştır. Bazı karsinojenik partiküllü nikel bileşiklerinin ise hedef hücreler tarafından fagositoz yoluyla hücre içerisine alındığı, nikel iyonlarının hücre içerisinde yüksek seviyelere çıkarak hücreye ve genetik materyale hasar verdiği, böylece karsinojenik etki gösterdiği gözlemlenmiştir (Costa vd., 1994).

Karsinojen aktivite esas olarak nikel bileşiklerinin çözünürlüğüne bağlıdır. NiS, NiO ve Ni₃S₂ gibi bileşiklerin dokulardan kolayca temizlenememesi ve çözünmez olmaları, bu bileşiklerin daha yüksek oranda karsinojen etkiye sahip olmalarını sağlamaktadır. Ni(OAc)₂, NiCl₂, NiSO₄ gibi in vivo da çözünebilen Nikel bileşiklerinin ise diğer Nikel bileşiklerine oranla çok daha az karsinojen etkiye sahip oldukları bilinmektedir. Tümör oluşumuna sebebiyet veren yollar ise şunlardır; inhalasyon, intramusküler, intrarenal, intraperitoneal, intraoküler ve deri altı (Denkhaus ve Salnikow, 2002).

Nikel işçilerinin nazal kanser eğilimleri ilk olarak 1933'de Bridge tarafından raporlandı. 1937'de Baader, galli rafineri işçileri arasında 17 nazal ve 19 akciğer kanseri vakası açıkladı. 1949'a gelindiğinde (1923 ve 1948 arasındaki teşhislerde), bu rakamlar 47 nazal kansere ve 82 akciğer kanserine kadar yükseldi. Her iki bölgedeki nikel çalışanlarında ortaya çıkan kanser vakaları sonucu olarak Büyük Britanya'da nikel endüstriyel hastalıklar sınıfına dahil edildi. Uzun yıllar boyunca, sadece suda çözünmeyen nikel bileşenlerinden kaynaklanan tozların karsinojen olduğuna inanılmaktaydı. Ancak, elde edilen epidemiyolojik veriler, nikel elektrorafinasyon tesislerinde üretilen ve suda çözünebilen nikel bileşiklerinin aerosollerinin, insan solunum yollarında da karsinojen etkiye sebep olduğunu açıkça göstermektedir. Nikel rafineri işçilerinde solunum yolu tümörlerinin histopatolojisi incelenmiş, araştırılan 100 sinonazal kanser arasında pullu hücreli karsinomalar (%48), anaplastik ve farklılaşmamış karsinomalar (%39), adenokarsinomalar (%6), geçiş hücresi karsinomaları (%3) ve diğer habis tümörler (%4) olarak belirlenmiştir.

İncelenen 259 akciğer tümöründe, pullu hücreli karsinomalar (%67), anaplastik, küçük hücreli ve yulaf hücreli karsinomalar (%15), adenokarsinomalar (%8), büyük hücreli karsinomalar (%3), diğer habis tümörler (%1) ve belirtilmemiş kanserler de (%6) olarak teşhis edilmiştir (Kasprzak vd., 2003).

Nikel ve kurşun tuzlarının maksimum tolerans dozlarında farelere enjekte edilerek yapılan bir çalışmada 30 haftanın sonunda incelemeler yapılmıştır. İncelemenin sonucunda deneklerdeki akciğer adenomalarının gerek nikel gerekse kurşun tuzuna maruz bırakılan farelerde önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir (Poirier vd., 1984).

Guinea domuzları ve farelerin uzun süreli nikel metal tozu solumalarının etkileri incelenmiş, nikelin akciğer tümörlerini yüksek oranda indüklediği gözlemlenmiştir (Hueper ve Payne, 1962).

Bir başka çalışmada Nikel (II) asetat enjekte edilen fareler 2 gruba ayrılmış ve gruplardan birisi sodyum bartibal ile tedavi edilmiştir. Sodyum bartibal kullanılmayan grupta hipofiz bezi tümörleri gözlemlenirken, sodyum bartibal kullanılan grupta renal tümörler gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Nikel (II) asetatın farelerin hipofiz bezi için karsinojenik etkiye sahip olduğunu ve fare böbrekleri için potansiyel karsinojenik etkilere sahip olabileceğini göstermiştir (Diwan vd., 1992).

Uzun süreli kronik Ni_3S_2 tozunun solunması sağlanan farelerde akciğer tümörlerinin oluştuğu (Ottolenghi vd., 1975), Ni_3S_2 'nin fareler üzerindeki etkilerini araştıran bir diğer çalışmada da fare testislerinde tümör oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir (Damjanov vd., 1978).

2.7. Arsenik

Arsenik (Şekil 2.6) inorganik ve organik formlarda her çevrede bulunabilen bir elementtir. Arsenik ölümcül akut zehirlenmelere neden olabilir ve uzun süreli maruziyeti çeşitli kanserlere, diyabete, deri hastalıklarına, kronik öksürüğe sebebiyet verebilir. Ayrıca karaciğere, böbreklere, kardiyovasküler sisteme, periferik ve merkezi sinir sistemlerine toksik etkilerde bulunabilmektedir. İnorganik formundan daha az zararlı etkiye sahip olan organik arsenik çoğunlukla gıdalarda bulunurken, inorganik arsenik bileşikleri çoğunlukla yer altı sularında bulunur ve bu bölgelerdeki birikimi erozyon, aşınma, biyolojik aktiviteler gibi doğal yollarla olabileceği gibi antropojenik kontaminasyonla da olabilir (Baastrup vd., 2007).

Arsenik, kömürle çalışan enerji üretim tesisleri, yanan bitki örtüleri ve volkanik patlamalar gibi yüksek sıcaklık süreçleri görülen ortamlardan atmosfere salınır. Kayaların,

minerallerin ve cevherlerin çözülmesiyle, madencilik atıkları dahil olmak üzere endüstriyel atıklarla ve atmosferik çökeltme yoluyla suya karışmaktadır. Toprakta bulunan arsenik, doğal olarak ortaya çıkan veya antropojenik salımlar sonucu toprak yüzeylerinde bulunan demir, alüminyum ve magnezyum oksitleri ile çözünmeyen bileşikler oluşturur ve bu formdaki arsenik genel olarak hareketsizdir.

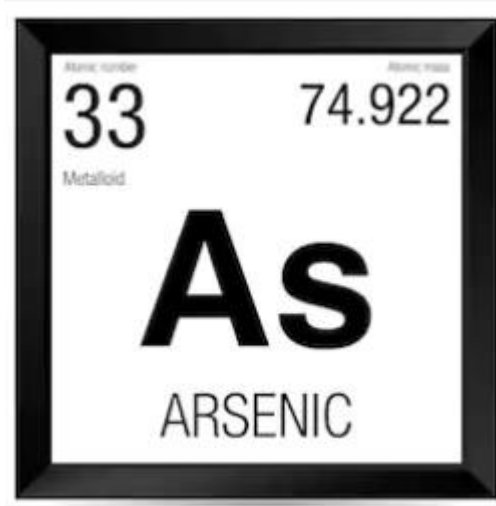
Arsenik çoğu gıdada, genellikle 20 ila 140 µg/kg arasında değişen oranlarda bulunur. Ancak bazı deniz ürünlerinde bu oran daha yüksek seviyelerde olabilmektedir (EPA, 2014).

Arsenik, doğal çevrede bulunan en zehirli metallere biridir. İnsanların arsenik toksisitesine başlıca maruz kalma nedeni doğal jeolojik kaynaklardan ziyade madencilik, eritme veya tarımsal kaynaklar (pestisitler veya gübreler) sebebiyle içme suyunun kirlenmesidir (Ratnaik, 2003).

Arsenik inorganik veya organik formda bulunabilen bir metaldir. İnorganik arsenik bileşiklerinde arsenitler, arsenatlar ve elementer arsenik bulunur. Organik arsenik bileşiklerini arsin ve organik türevleri oluşturur. Bununla birlikte, in vivo'da organik-inorganik ve inorganik-organik dönüşümler meydana gelebilir (Graeme, Pollack 1998).

Arsenik ve arsenik bileşikleri yüzyıllardır ticari olarak üretilmekte ve kullanılmaktadır. Arsenik'in güncel ve tarihsel kullanımları arasında ilaç sanayii, ahşap koruyucu, zirai kimyasallar, pigment imalatı, deri koruyucuları, zehirli yem üretimi, madencilik, metalürji, cam yapımı endüstrileri yer almaktadır. 1970'lere kadar çeşitli tıbbi uygulamalarda arsenik kullanılmıştır. İnorganik arsenik lösemi, sedef hastalığı ve kronik bronşiyal astım tedavisinde kullanılmıştır. Organik arsenik ise antibiyotiklerde spiroketal ve protozoal hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılmıştır. Elemental arsenik, özellikle kurşun (kurşun asitli bataryalar gibi) ve bakır ile alaşım imalatında kullanılmaktadır. Bunun dışında katalizörlerde, patlayıcılarda, boyalarda, sabunlarda, seramiklerde, elektrofotografide, alaşımlarda (otomobil lehim ve radyatörlerinde) ve teknelerde çürüme önleyici boyalarda kullanılmaktadır (Flanagan vd., 2012).

Arsenik kardiyovasküler hastalıklar, gelişim anomalileri, nörolojik bozukluklar, diyabet, işitme kaybı, hematolojik bozukluklar ve çeşitli kanser türlerine neden olabilmektedir. Her ne kadar dermal ve parenteral yollarla arsenik maruziyeti meydana gelebilse de yutma ve solunum arsenik maruziyetinin temelini oluşturmaktadır. Oluşan olumsuz sağlık etkilerinin şiddeti arseniğin kimyasal yapısı, doz ve maruziyet süresine bağlıdır. Elde edilen bilgiler, arsenik zehirlenmesinin en önemli halk sağlığı sorunlarından birisi olduğunu göstermektedir (Tchounwou vd., 2004).



Şekil 2.6. Arsenik atomik numarası (33) ve atomik ağırlığı (74.922)

(<https://www.shutterstock.com/tr/g/alejo%20miranda>).

2.7.1. Arsenik Karsinojenitesi

İnorganik arsenik, Uluslararası Kanser Ajansı (IARC 2012) ve Ulusal Toksikoloji Programı (NTP 2014) tarafından insanlardaki kanıtlara dayanarak karsinojen olarak kabul edilmiştir (Tablo 2.2). Günümüzdeki epidemiyolojik çalışmalar, oral arsenik maruziyetinin insanlarda karsinojen etkisi olduğuna dair ek kanıtlar sunmaktadır. Bu çalışmalar, oral yolla inorganik arseniğe maruz kalmanın mesane ve ürotelyum, gastrointestinal sistem, böbrek, karaciğer, gırtlak ve yutak, akciğer, pankreas ve deri kanserine neden olabildiğini göstermektedir. 1958–1970 arasında Şili’deki içme sularındaki yüksek arseniğin (yaklaşık 870 µg/L) insanlar üzerindeki etkileri incelenmiş, 30-49 yaş aralığındaki yetişkinlerin yüksek oranda kanser hastası olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle akciğer, mesane, gırtlak ve yutak, böbrek, karaciğer kanserinin ve diğer kanser türlerinin sayısında çok büyük bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Organik arseniğin hayvanlar üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışmada arsenik metaboliti olarak methylarsenous asitin (MMA (III)) karsinojenik etkileri değerlendirilmiştir. Gebelik dönemindeki (8-18. Günler arasında) CD1 farelerinin, MMA (III)'e maruz kalmasının, yavrularda kanser oluşumuna neden olduğu gözlemlenmiştir. Erkek yavrularda hepatosüллюler karsinom, adrenal adenoma ve akciğer adeno karsinomda artış gözlemlenmiştir. Dişi yavrularda adrenal kortikal adenoma ve rahim epiteli tümörlerinde artış olmuştur (FDA, 2016).

Metal işlemede çalışan işçi popülasyonlarının (Tacoma, WA; Magma, UT; Anaconda, Montana; Ronnskar, İsveç; Saganoseki-Machii, Japonya) incelenmesiyle

oluşturulan bir dizi çalışmanın sonucunda, mesleki arsenik maruziyetinin akciğer kanseri riskini önemli ölçüde arttırdığı sonucuna varılmıştır. Bir başka çalışmada akciğer kanseri ölümlerinin, pestisit üretim işçilerinde popülasyonun geri kalanına oranla daha fazla olduğunu belirtilmiştir. Ayrıca bir pestisit üretim tesisinin yakınında yaşayan bir popülasyon üzerinde yapılan incelemelerde, bu bölgede yaşayan insanların akciğer kanseri için aşırı risk altında olduğunu ortaya çıkarmıştır. Pestisit çalışanlarının vaka raporları, arsenik maruziyeti ve akciğer kanseri arasındaki ilişkiyi desteklemiştir (USEPA, 1995).

DMAA (dimethylarsinic acid) arseniğin çevrede bulunan ve en sık rastlanan formlarından birisidir. DMAA'nın erkek fareler üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışmada mesane tümörlerine sebebiyet verdiği (Li vd., 1998), bir başka çalışmada farelerde akciğer tümörlerine neden olduğu (Yamanaka vd., 1996) ve farelerde yapılan bir diğer çalışmada karaciğer tümörlerine sebebiyet verdiği gözlemlenmiştir (Johansen vd., 1984).

Fare karaciğer epitel hücrelerindeki kronik arsenik etkileri incelenmiş ve DNA hipometilasyonuna neden olduğu, DNA metiltransferaz aktivitesini azalttığı, proto-onkogen c-myc aktivitesini yüksek oranda arttırdığı belirlenmiştir. DNA hipometilasyonuna neden olarak anormal gen ifadelerine sebep olması nedeniyle arseniğin karsinojen etki gösterdiği belirlenmiştir (Abernathy vd., 1999).

Galyum arsenitin fareler üzerindeki etkisi incelenmiş, suya karıştırılarak oral yolla farelere verilen galyum arsenitin dozuna bağlı olarak bronşal tümörlerin oluştuğu, yüksek dozların sonucunda lösemi vakalarının ortaya çıktığı, akciğer alveolar epitelinde hiperplazi oluştuğu gözlemlenmiştir (WHO, 2000).

2.8. Krom

Beslenme yoluyla alınan krom (III) insan ve diğer hayvanlarda glukoz toleransının düzenlenmesinde esansiyel element olarak kullanılmaktadır (IARC, 1980). Krom (Şekil 2.7) çinko kaplama, çelik, deri ve boya endüstrileri dahil olmak üzere birçok endüstriyel alanda kullanılmakta ve çevreye salınmaktadır (Yang vd., 2004). Başlıca kullanım alanlarını metalurji, ısı yalıtımı ve kimya endüstrileri oluşturmaktadır. Metalurjide krom-metal, krom-nikel-çelik alaşımlarında kullanılmakta, bu metal alaşımlarının direnç ve dayanıklılıklarını arttırmaktadır. Yüksek erime noktasına sahip olması, ılımlı termal genleşme uygun olması, yüksek sıcaklıklarda kristal formunun stabilitesi ve nötr kimyasal davranışı sebebiyle yalıtım malzemesi olarak kullanılmaktadır. Yüksek oranda renklendirilmiş krom tuzları pigment ve renk sabitleyici olarak tekstil endüstrisinde, tabakalaştırmada, seramiklerde, fotografik emüsyonların sertleştirilmesinde organik ve inorganik reaksiyonlar için katalizörler olarak

kullanılmaktadır. Ayrıca patlayıcı yapımında da kullanılmaktadır. Tıpta, yakıcı ve aşındırıcı olarak krom trioksit, kırmızı kan hücrelerinin ölçümü için sodyum radyokromat kullanılmaktadır (Léonard ve Lauwerys, 1980).



Şekil 2.7. Krom atomik numarası (24) ve atomik ağırlığı (51.996)
(<https://www.shutterstock.com/tr/g/alejo%20miranda>).

Kentsel alanlardaki egzoz dumanı, kömür ve gazolin yakımı bu metal için çevre kirliliğinin ana potansiyel kaynaklarını temsil etmektedir. Kentsel bölgelerdeki havada bulunan Cr konsantrasyonlarının $0.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 'ten daha az olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, kronik olarak kroma maruz kalmanın olumsuz etkileri, çok düşük konsantrasyonlarda bile göz ardı edilemez (Alimonti vd., 2000).

Krom ortamda bulunması açısından iki sınıfta değerlendirilir. Bunlar trivalent krom (chromium(III)) ve hexavalent kromdur (chromium (VI)). Kroma maruz kalma doğal yollardan ya da endüstriyel kaynaklardan meydana gelir. Krom (III), krom (VI)'ya göre daha az toksik etkiye sahiptir. Krom (VI)'da olduğu gibi krom (III)'dede toksisitenin en çok etkilendiği bölge solunum sistemi organlarıdır. Ayrıca vücut içerisinde krom (VI)'nın bir kısmı krom (III)'e detoksifiye edilebilir (USEPA, 2000).

2.8.1. Krom (VI) Karsinojenitesi

Kroma maruz kalmanın biyolojik etkileri birbirinden farklı olup metal türüne bağlıdır. Krom (VI) içeren belirli bileşiklere maruz kalma akciğer kanseri riskinin artması ile ilişkilendirilmiştir.

IARC, krom (VI) içeren bileşikleri çeşitli meslek ortamlarında karşılaştırarak bu bileşikleri grup 1 insan karsinojenleri olarak sınıflandırmıştır (Tablo 2.2). Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (USEPA) havada bulunan krom (VI)'yı grup A insan kanserojeni olarak listelemiştir. Zehirli Maddeler ve Hastalıklar Kaydı Ajansı (ATSDR) ayrıca, krom bileşiklerinin endüstriyel ortamlardaki düşük çözünürlükteki partiküllerinin kronik solunumunun karsinojenik etkiye sahip olduğunu belirtmiştir. Bununla birlikte, tüm krom (VI) içeren bileşikler karsinojen değildir. 20. yüzyılın ortalarında epidemiyologlar, nispeten çözünmez olan altı değerli krom bileşiklerinin en büyük karsinojenik riski sunduklarını belirtmişlerdir (O'Brien vd., 2003).

Jinzhou (Çin)'da krom işlemeciği yapılan bir bölgenin etrafındaki insan popülasyonunda artan kanser vakaları üzerine bir çalışma yapılmıştır. Toplam kanser oranları belirlenmiştir. Elde edilen data daha sonrasında çeşitli çalışmacılar tarafından tekrar değerlendirilmiştir. Yapılan yeni araştırmalar orijinal araştırmayla uyumaktadır. Bu doğrultuda elde edilen verilerden krom (VI)'nın tek bir organ için karsinojen olmadığı ve karaciğer, böbrek, mesane, gastrointestinal sistem, hematopoetik sistem hatta kemiklere etki edebileceği sonucu elde edilmiştir (Linos vd., 2011).

Krom (VI)'nın farelerin akciğerleri üzerine etkilerini araştıran bir çalışmada, krom (VI)'nın apoptozu engellediği gözlemlenmiştir. Apoptozun oluşumunda anahtar rol alan p53 geninin, yüksek dozlardaki krom (VI)'ya maruz kalan fare akciğer hücrelerinde ifade edilemediği ve baskılandığı gözlemlenmiştir (D'Agostini vd., 2002).

Başka bir çalışmada, oral yolla krom (VI)'ya maruz bırakılan farelerin bağırsak ve karaciğerlerinde tümör oluşumları gerçekleşmiştir (Stout vd.,2009).

Tablo 2.2. IARC çalışma grubu tarafından belirlenen bazı metallerin karsinojenik etkileri (Straif vd, 2009).

Class 1 Karsinojenler	İnsanlarda tümör oluşumu ya da çeşiti kesin olarak kanıtlanmış bölgeler	Tümör oluşumu gözlemlenen diğer bölgeler	Diğer etkiler
Arsenik ve inorganik arsenik bileşikleri	Akciğer, deri, mesane	Böbrek, karaciğer, prostat	Oksidatif DNA hasarı, genomik düzensizlik, anaploidi, gen amplifikasyonları, epigenetik etkiler, DNA onarım mekanizmalarının bozulmasına bağlı mutasyonlar
Kadmiyum ve kadmiyum bileşikleri	Akciğer	Prostat, böbrek	DNA onarımı inhibasyonu, tümör süpresör proteinlerindeki bozukluklara bağlı genomik düzensizlik
Nikel bileşikleri	Akciğer, burun boşluğu, paranazal sinüsler	-	DNA hasarı, kromozom bozuklukları, genomik düzensizlik, mikronükleus, DNA onarımı inhibasyonu, DNA metilasyon değişiklikleri, histon modifikasyonları
Krom (VI) bileşikleri	Akciğer	Burun boşluğu ve paranazal sinüsler	Hücre içi krom (III) indirgenmesine bağlı doğrudan DNA hasarı, mutasyon, genomik düzensizlik, anaploidi, hücre transformasyonu

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Drosophila Kültürleri

Standart mısır unu besi yerinde (mısır unu, şeker, maya, agar, su ve antifungal olarak propiyonik asit), cam şişeler içerisinde, 24 ± 1 °C sıcaklığındaki inkübatörde üretilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Besi yeri hazırlanması aşaması

3.2. Deney Grupları

Besiyerinde, Kadmiyum ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) 5 $\mu\text{g/L}$ ve 50 $\mu\text{g/L}$; Nikel ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$) 20 $\mu\text{g/L}$ ve 200 $\mu\text{g/L}$; Arsenik (As) 10 $\mu\text{g/L}$ ve 100 $\mu\text{g/L}$ ve Krom (CrO_3) 50 $\mu\text{g/L}$ ve 500 $\mu\text{g/L}$ konsantrasyonlarda olmak üzere deneysel besi yerleri oluşturulmuştur. Bu konsantrasyonlar belirlenirken, doğada bulunabilme veya güvenli olarak kabul edilen sınır değerlerden faydalanılmış, düşük konsantrasyonlar her metal için bu değerlere yakın olarak

belirlenmiştir. İkinci ve daha yüksek konsantrasyonlar ise belirlenen bu değerlerin 10 katı olarak uygulanmıştır.

Dişi sirke sinekleri deneysel besiyerlerine alınmış ve yumurtalarını buraya bırakmaları sağlanmıştır. Bu yumurtalardan çıkan larvalar, 3. İnstar evresine gelene kadar ağır metal içeren besi yerlerinde beslenmiş, 3. İnstar evresinde besi yerinden alınarak, larvalardan DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Her bir grupta 50 adet sinekle deneye başlanmış, deney sonunda her gruptan 10 adet larva için (3. instar evresi) mtDNA ölçümleri yapılmıştır.

3.3. mtDNA Çalışması

3.3.1. DNA'nın İzole Edilmesi

DNA izolasyon işlemleri için SIGMA “Gen elute genomic DNA purification” kiti kullanıldı. Bu doğrultuda sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. Larvalar, 1,5 ml'lik ependorf tüplerin içerisinde, makas kullanılarak küçük partiküllere ayrıldı (işlem buz içinde gerçekleştirildi)
2. Tüplerin tamamına 180 µl Lizis T solüsyonları eklendi
3. Tüplerin tamamına proteinaz K (20 mg/ml) solüsyonlarından 20 µl eklendi
4. Tüplerin tamamı vortekslenip sonrasında 55°C'da (2-4 saat arası) dokuların tamamının çözülmesi sağlandı
5. Her bir tüpe 20 µl RNaz A eklenip oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi
6. Her bir tüpe 200 µl Lizis C solüsyonları eklendi
7. Tüplerin tamamı yaklaşık 15 saniye vortekslenip karışımların tamamen homojenize olması sağlandı
8. Lizat'ın elde edilebilmesi için 10 dakika boyunca 70 °C'da inkübasyon gerçekleştirildi
9. 500 µl kolon preparasyon çözültisi kolonların tamamına eklendi ve 1 dakika boyunca 12000 rpm' de santrifüjlenerek biriken sıvı uzaklaştırıldı
10. Bağlantının oluşup lizatın hazırlanması için, 200 µl'lik saf etanol lizata eklendi ve yaklaşık 5-10 saniye boyunca vortekslendi
11. Ağzı geniş pipet uçları yardımıyla 500 µl lizat hazırlanmış kolona yüklenmesinin ardından 1 dakika boyunca 9300 rpm'de santrifüjlendi. Santrifüjlenen kolon başka bir toplama tüpüne alındı.



Şekil 3.2. PCR aşaması

12. İlk yıkama işlemi için kolona 500 µl yıkama çözeltisi eklenip ve 1 dakika boyunca 9300 rpm’de santrifüj edildi. Elde edilen kolon başka bir toplama tüpüne aktarıldı
13. İkinci yıkama işlemi için kolona 500 µl yıkama solüsyonu eklenip ve 3 dakika boyunca 10200 rpm’de santrifüj edildi. Elde edilen kolon başka bir toplama tüpüne aktarıldı
14. 100 µl elusyon (10 mM Tris-HCl pH: 9, 0,5 mM EDTA) çözeltisi kolon merkezine ilave edildip, oda sıcaklığında 5 dakika boyunca bekletilip sonrasında 1 dakika boyunca 9300 rpm’de santrifüj edildi. Bu işlemin sonucunda kolondan DNA elde edilmiş oldu.

3.3.2. DNA’da Ön Kantitasyon İşlemi

PCR işlemi için tüplerin tamamına 5 ng kalıp ekleneceğinden dolayı, izole edilmiş DNA miktarının belirlenmiş olması gerekir. Bu nedenle, oldukça hassas ölçümlerin yapılabilmesine olanak veren Pico Green floresan dsDNA kantitasyon boyası kullanıldı, florimetrede 485 nm eksitasyon, 530 nm emisyon dalga boylarında ölçümler gerçekleştirildi.

Standart grafik, 100 ng/ µl'lik λ DNA stoğundan 1.25, 2.5, 5, 10 ng/ µl'lik dilusyonların hazırlanmasıyla oluşturuldu.

3.3.3. Örneklerin PCR İşlemi

Her biri 50 µl olan reaksiyon tüplerine 5 ng kalıp DNA eklendi (Ön kantitasyon verilerine göre seyreltilen kalıplardan). PCR enzimi olarak reaksiyon spesifikliği göz önünde bulundurularak hot start kapasitesine sahip olan, Thermo Phire hot start II DNA polimeraz kullanılmıştır. Bu karışıma %4 DMSO ilave edildi (Şekil 3.2).

PCR esnasında kullanılmış olan Drosophila'ya spesifik primer dizileri aşağıda sıralanmıştır.

100 bp'lik kısa fragment için primerler :

11426 5'- **TAAGAAAATTCCGAGGGATTCA** - 3'

11525 5'- **GGTCGAGCTCCAATTCAAGTTA** - 3'

10629 baz'lık uzun fragment için primerler :

1880 5'- **ATGGTGGAGCTTCAGTTGATTT** - 3'

12508 5'- **CAACCTTTTTGTGATGCGATTA** - 3'

Reaksiyonun ısı koşulları aşağıdaki gibi belirlendi:

Uzun fragment için;

98 °C'de 1 dakika

98 °C'de 10 saniye

52 °C'de 45 saniye

68 °C'de 4 dakika (düşük uzama sıcaklıkları uzun amplifikasyonlar için tavsiye edilmektedir)

68 °C'de 5 dakika

(Koyu renkle belirtilen kısımlar ana döngüyü belirtmektedir ve 18 kere tekrarlanmıştır)

Kısa fragment için;

98 °C'de 1 dakika

98 °C'de 10 saniye

55 °C'de 45 saniye

72 °C'de 10 saniye

72 °C'de 2 dakika

(Koyu renkle belirtilen kısımlar ana döngüyü belirtmektedir ve 19 kere tekrarlanmıştır)

3.3.4. PCR Ürünlerinde Kantitasyon

PCR'ın ardından örneklerin tamamındaki DNA miktarları tekrar PicoGreen boyası ile belirlendi. Kantitasyon işlemi için kuyucuklara 90 µl TE, 10 µl PCR ürünü, 100 µl Picogreen solüsyon eklenerek, florimetrede 485 nm eksitasyon, 530 nm emisyon dalga boylarında ölçümler gerçekleştirildi.

3.3.5. mtDNA Hasarlarının Hesaplamaları

Tek bir örnekte oluşan hasarın miktarını (lezyon frekansı) öğrenmek amacıyla, Uzun fragment amplifikasyonu sonucu, kısa fragment amplifikasyonu sonucuna bölündü. Bu şekilde, örneğin uzun fragment amplifikasyonundan elde edilen veriler, mtDNA kopyasının miktarı baz alınarak normalize edilmesi sağlandı.

3.4. İstatistik

Verilerin istatistiki analiz işlemleri, Minitab Release 13.0 istatistik programından (www.minitab.com/products/minitab) yararlanarak, Mann Whitney testi aracılığıyla gerçekleştirildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Yapmış olduğumuz deneylerin sonucunda gözlemlenen mtDNA kopya sayıları ve relatif amplifikasyon değerleri Tablo 4.1’de belirtildi. Düşük miktardaki relatif amplifikasyonlar (RA), yüksek miktarda mtDNA hasarı olduğunu gösterir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, doğada bulunabilme veya güvenli olarak kabul edilen sınır üzerinden belirlediğimiz düşük konsantrasyonlarda mtDNA hasarı gözlenmezken, 10 kat daha yüksek olan konsantrasyonlarda krom dışındaki diğer metaller için istatistiksel olarak anlamlı mtDNA hasarı gözlenmiştir.

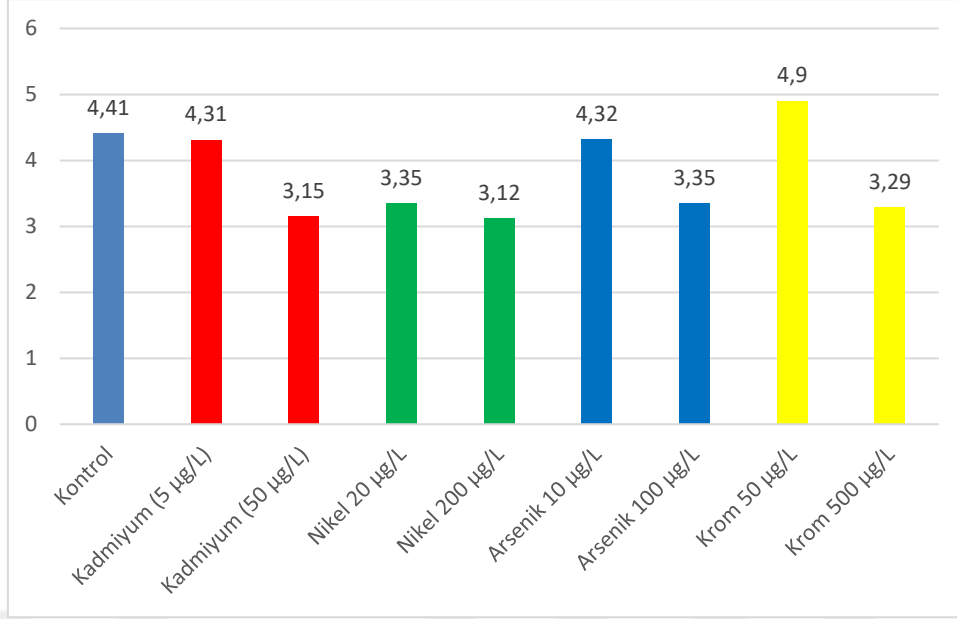
500 µg/L krom uygulanan grupta da kontrole göre düşük RA değerleri gözlemlenmesine rağmen, bu gruptaki hasarın istatistiksel olarak anlamlı çıkmamasının sebebi, bireyler arasındaki varyasyonun fazla olması ve bu durumun, standart hata ve standart sapma oranlarını yükseltmesidir.

Şekil 4.1 ve Şekil 4.2 ‘de grupların RA ve mtDNA kopya sayısı değerleri karşılaştırmalı olarak görülmektedir.

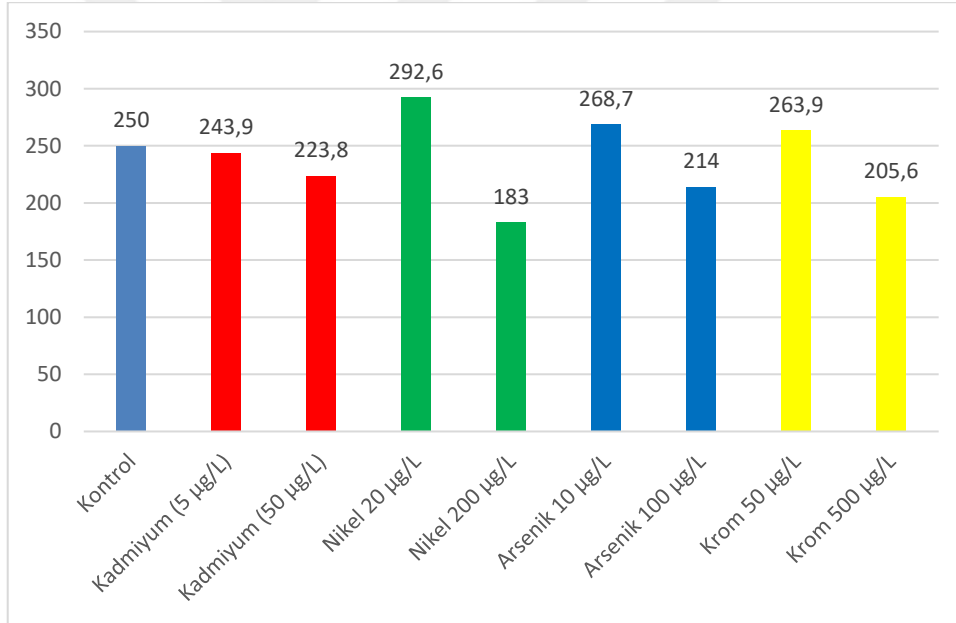
Tablo 4.1. Relatif amplifikasyon ve mtDNA kopya sayısı değerleri

Deney Grupları	Relatif Amplifikasyon	mtDNA Kopya Sayısı
Kontrol	4,41 ± 0,18	250 ± 9,2
Kadmiyum (5 µg/L)	4,31 ± 0,39	243,9 ± 18,1
Kadmiyum (50 µg/L)	3,15 ± 0,15*	223,8 ± 25,5
Nikel 20 µg/L	3,35 ± 0,51	292,6 ± 35,1
Nikel 200 µg/L	3,12 ± 0,14*	183 ± 16,7
Arsenik 10 µg/L	4,32 ± 0,27	268,7 ± 23,1
Arsenik 100 µg/L	3,35 ± 0,19*	214 ± 20,5
Krom 50 µg/L	4,9 ± 0,45	263,9 ± 12,3
Krom 500 µg/L	3,29 ± 0,35	205,6 ± 17,7

*İstatistiksel olarak kontrol grubundan farklıdır ($p < 0.05$)



Şekil 4.1. Kontrol ve deney gruplarının relatif amplifikasyon grafiği



Şekil 4.2. Kontrol ve deney gruplarının mtDNA kopya sayısı grafiği

Kadmiyumun yüksek dozlarında, *Drosophila*'da mtDNA hasarına sebep olabildiği, bu tez çalışmasının sonuçlarında görülmektedir. Mitokondrial bozukluklar doğrudan ya da dolaylı olarak kanserle bağlantılıdır. Kadmiyum mitokondrial fonksiyon bozukluklarına neden olabilmekte, bu bozunmalar da kansere neden olabilmektedir. Kadmiyumun ROS üretimi artışına neden olarak mitokondrideki hasarı indüklüyor olabileceği düşünülmektedir (Wang vd., 2004). Kadmiyum'a maruz kalmanın ilk aşamalarında mitokondriyal DNA'nın

çekirdek DNA'sına oranla daha hızlı hasar görüyor olması, ROS'un hücrenin diğer kısımlarına oranla mitokondri içerisinde daha fazla oluştuğu düşünüldüğünde, oluşan hasarın büyük ihtimalle ROS kaynaklı olabileceğini göstermektedir (Watanabe, 2003). Kadmiyum, mitokondrideki elektron transfer zincirini inhibe etmekte ve bu nedenle anormal bir ROS seviyesi artışına neden olmaktadır (Nzengue vd., 2008).

Euglena gracilis üzerinde yapılan bir çalışmada kadmiyum maruziyetinin mitokondrial DNA'da kırılmalara neden olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar, kadmiyum kaynaklı mitokondriyal DNA bozunmalarını, TUNEL testi ve DAPI boyama ile doğrulamışlardır. Yapmış oldukları çalışmada mitokondrinin *E. gracilis* hücrelerinde kadmiyum için birincil hedef organel olduğu gözlemlenmiştir (Watanabe vd., 2003). Karidesler (*Litopenaeus vannamei*) üzerinde yapılan bir başka çalışmada, Cd^{+2} maruziyetinin mitokondrial DNA hasarını ve ROS üretimini arttırdığı kanıtlanmış, bu durumun alınan Cd^{+2} dozuyla doğru orantılı olduğu belirtilmiştir (Chang vd., 2009).

Yüksek dozlarda nikel maruziyetinin mtDNA hasarına sebep olabildiği, bu tez çalışmasında ortaya çıkan bir başka sonuçtur. Bu hasarın sebebinin de, tıpkı kadmiyumdaki gibi, oksidatif stres kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Oksidatif stres proteinlerin, doymamış yağ asitlerinin ve mtDNA'nın oksidasyonuna neden olabilir ve bu da mitokondrinin morfolojik ve fonksiyonel olarak bozunmasına sebep olabilir (Xu vd., 2015). Son çalışmalar, Nikel nörotoksitesinin oksidatif stres ve mitokondrial fonksiyon bozukluklarının oluşumunda önemli rol oynadığını göstermektedir. Bunun nedeni, mitokondrial DNA'nın oksidatif strese karşı oldukça savunmasız olmasıdır. Mitokondrial DNA'nın iç zardaki solunum zincirine olan yakınlığı, hasar oluşması halinde tamir için sınırlı kapasitesinin olması ve intron eksikliği mtDNA'nın oksidatif strese oldukça duyarlı olmasına sebep olmaktadır (Ayhan vd., 2004).

Fare nöroblastoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada, fare nöroblastoma hücre dizileri (Neuro2a) 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda nikel klorite ($NiCl_2$, 0.125, 0.25 ve 0.5 mm) maruz bırakılmıştır. Nikelin, ROS üretimini ve mitokondrial süper oksit seviyelerini önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, nikel maruziyetinin mitokondriyal 8-hidroksiguanin (8-OHdG) içeriğini arttırdığı, mtDNA içeriği ve mtDNA transkript seviyelerini azalttığı gözlemlenmiştir. Elde edilen bu bulgularla doğru orantılı olarak, nikelin mtDNA nükleoid yapısına zarar verdiği ve nükleoid organizasyonu için önemli bir protein bileşeni olan mtTFA (mitochondrial transcription factor A) protein seviyesini azalttığı görülmüştür (Xu vd., 2011).

Nikel nörotoksitesisi üzerine yapılan başka bir çalışmada, Nikel maruziyetinin mitokondrial fonksiyonları inhibe ettiği, ATP üretimini azalttığı, mitokondrial membran potansiyelini (DYm) bozduğu, mtDNA içeriğinin azalmasına neden olduğu bulunmuştur. mtDNA içeriğindeki azalmanın, mtDNA'nın replikasyonunu azaltarak oksidatif stresi arttırdığı gözlemlenmiştir (Xu vd., 2010).

Fareler üzerinde yapılan ve nikel hidroksit NP (nano-NH) solunumunun kardiyovasküler etkilerini araştıran bir başka çalışmada ise, aort hücrelerindeki mtDNA hasarında artış olduğu gözlemlenmiştir (Kang vd., 2011).

Bu tez çalışmasından elde ettiğimiz sonuçlara göre, arsenik de yüksek dozlarında mtDNA hasarına sebep olmaktadır. Mitokondri, reaktif oksijen türleri olarak da bilinen, oksijen kaynaklı serbest radikallerin başlıca kaynağıdır. Artan ROS üretiminin gerek mtDNA'da gerekse çekirdek DNA'sında vermiş oldukları hasarlardan dolayı karsinojenik olarak önemli bir rolünün olduğu düşünülmektedir. Yapılan araştırmalar arseniğin ROS üretimini arttırdığını doğrulamıştır. Arseniğin mitokondriyal DNA'ya mutajenik etki yapabildiği ve çekirdek DNA'sına hasar verebildiği, bunları mitokondriyal ROS etkileriyle mtTFA (mitochondrial transcription factor A) ekspresyonunu değiştirerek gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Martinez vd., 2011).

Arsenik trioksit (As_2O_3) ile yapılan bir çalışmada, bu bileşiğin fare oosit mitokondrilerinde mtDNA bozulmalarına ve sayısal değişikliklerine olan etkisi araştırılmıştır. As_2O_3 'ün oksidatif stres ve mitokondri aktivitesi üzerine etkilerini belirlemek için ROS ve ATP içeriği kontrol edilmiştir. Sonuçlar, As_2O_3 'ün mtDNA kopya sayısını azalttığı ve bozunmalara neden olduğunu, ROS seviyesini arttırdığını, ATP içeriğini azalttığını göstermiştir (Zhang vd., 2011).

Arseniğin mtDNA üzerine etkilerini araştırmak için, insan-hamster hibrit AL hücrelerinden de faydalanılmıştır. Bu hücrelerdeki arsenik maruziyeti sonucunda sitokrom c oksidaz fonksiyonu ve oksijen kullanımı azalmış, sitrik sentaz fonksiyonu artmıştır. Bu değişikliklerle bağlantılı olarak mtDNA sayısında azalma ve büyük heteroplazmik mtDNA delesyonlarında artış gözlemlenmiştir. Ayrıca, sürekli olarak arsenikle muamele edilen kültürlerden periyodik olarak izole edilen mtDNA'larda birebir aynı delesyonlar gözlemlenmemiş, bu da arseniğe maruz kalan mitokondriyal genomun tekrar tekrar ve sürekli hasara uğradığını göstermiştir. Elde edilen bu veriler, memeli hayvanların mitokondri ve özellikle mtDNA'sının arseniğin mutatik etkileri açısından en önemli hedefleri olduğu teorisini de desteklemektedir (Partridge vd., 2007).

Bu tez çalışmasında krom uyguladığımız sinek grubunda, mtDNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tesbit edilememiştir. 500 µg/L krom uygulanan grupta kontrole göre oldukça düşük RA değerleri gözlemlenmesine rağmen, bu gruptaki hasarın istatistiksel olarak anlamlı çıkmamasının sebebi, bireyler arasındaki varyasyonun fazla olması ve bu durumun, standart hata ve standart sapma oranlarını yükseltmesidir.

Kromun mtDNA üzerine etkilerine ilişkin çok fazla çalışma literatürde mevcut değildir. Bazı yayınlarda, Krom (IV)'nın mitokondri içerisine girerek mtDNA, proteinler, lipitlere zarar verdiği ve hücre solunumu engellediği belirtilmektedir. Bu etkilerinden dolayı mitokondri bütünlüğüne zarar verebilmekte ve sitokrom c salınımına neden olup apoptozu tetikleyebilmektedir (Carlisle vd.,2000).

Zhong ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, mitokondriyal DNA kopya sayısını ve mitokondriyal kitleyi içeren mitokondriyal biyogenezin, düşük Cr (VI) konsantrasyonlarına maruz kalan HepG2 hücrelerinde önemli ölçüde arttığı, buna zıt olarak yüksek ve sitotoksik konsantrasyonlarda ise mitokondriyal biyogenezin inhibe edildiği ve regülatör faktörler ve antioksidanların ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir (Zhong vd., 2017).

5. SONUÇ

Mitokondri, bazı çevresel kirleticiler tarafından yoğun bir şekilde hedef alınır (Meyer vd., 2013). Bu kirleticiler tarafından oluşturulan mitokondriyal DNA (mtDNA) hasarı, nükleer DNA (nDNA) hasarından daha yoğun ve daha zararlı etkilere sahip olabilir (Yakes ve Van Houten, 1997). Ayrıca, primer insan kanserlerinde somatik mtDNA mutasyonları giderek daha fazla tesbit edilmektedir. Mitokondriyal fonksiyonlardaki kusurların, kanser gelişiminde ve ilerlemesindeki rollerinden uzun süredir şüphelenilmiştir. Warburg bu fikri ilk ortaya atan bilim insanıydı. O zamandan beri, mtDNA içeriği, kopya sayısı, değiştirilmiş gen ifadeleri, solunum zinciri aktivitesindeki değişiklikler ve mtDNA mutasyonları dahil olmak üzere kanser hücrelerindeki karsinogeneze bağlı farklılaşmalar ortaya çıkartılmaya devam edilmektedir. Meme kanseri, kolorektal kanser, yumurtalık kanseri, mide karsinomu, hepatoselüler kanser, pankreas kanseri, prostat kanseri, akciğer kanseri, renal hücreli karsinom, tiroid kanseri, beyin tümörleri, baş, boyun ve mesane kanserleri gibi birçok kanser türünde, kanser süreciyle ilişkili mtDNA mutasyonları bulunmuştur (Chatterjee vd., 2006).

Hasarlı DNA'ya sahip olan mitokondri, kanser hücrelerinin hayatta kalmasını sağlayacak mitokondriyal apoptoz yolunun sinyalini değiştirebilir. DNA hasarlı mitokondrilerin, oksidatif fosforilasyonunun bozulması ve artan oksijen radikalleri üretimi de karsinogenez sürecinde etkili olabilir (Tokarz ve Blasiak, 2014).

Bu tez çalışmasından elde ettiğimiz sonuçlara göre, doğada bulunabilme veya güvenli olarak kabul edilen sınır üzerinden belirlediğimiz düşük konsantrasyonlarda mtDNA hasarı gözlenmezken, 10 kat daha yüksek olan konsantrasyonlarda krom dışındaki diğer metaller için istatistiksel olarak anlamlı mtDNA hasarı gözlenmiştir. Bu metallerin, madencilik faaliyetleri, sanayi atıkları vb sebeplerle doğada miktarının artması ve canlı dokularına bir kez geçtikten sonra, besin zinciri yoluyla sürekli miktarlarının artarak, insan vücudunda birikime sebep olmasının ne kadar riskli olduğu ve kanser başta olmak üzere hastalıklara sebep olabileceği açıktır. Bu açıdan dikkatli olunması, özellikle sanayi bölgeleri ve madencilik faaliyetlerinin yapıldığı bölgelerde sürekli kirlilik miktarının belirlenmesinin, insan sağlığı açısından faydalı olacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Abernathy C.O., Liu Y.P., Longfellow D., Aposhian H.V., Beck B., Fowler B., Goyer R., Menzer R., Rossman T., Thompson C., Waalkes M., 1999. Arsenic: Health Effects, Mechanisms of Actions and Research Issues, *Environmental Health Perspectives*, 107(7), 593-597.
- Abshire M.K., Buzard G.S., Shiraishi N., Waalkes M.P., 1996. Induction of c-myc and c-jun Proto-oncogene Expression in rat L6 Myoblasts by Cadmium is Inhibited by Zinc Preinduction of the Metallothionein Gene, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 48(4), 359-377.
- Alimonti A., Petrucci F., Krachler M., Bocca B., Caroli S., 2000. Reference Values for Chromium, Nickel and Vanadium in Urine of Youngsters From the Urban Area of Rome, *Journal of Environmental Monitoring*, 2(4), 351-354.
- Anonim, 2017. What is Mitochondrial DNA and Mitochondrial Inheritance <https://www.zmescience.com/other/science-abc/about-mitochondrial-dna-42423/> (Erişim Tarihi: 10.04.2017)
- Anonim. <https://www.shutterstock.com/tr/g/alejo%20miranda> (Erişim Tarihi: 10.04.2017)
- Ayhan, A.G., Ozkan A., Fiskin K., 2004. Mitokondrial DNA ve Kanser, *Türk Hematoloji ve Onkoloji Dergisi*, 14(4),232-240.
- Baastrop R., Sørensen M., Balstrøm T., Frederiksen K., Larsen C.L., Tjønneland A., Overvad K., Raaschou-Nielsen O., 2008. Arsenic in Drinking-Water and Risk for Cancer in Denmark, *Environmental Health Perspectives*, 116(2), 231-237.
- Basile, A., Sorbo, S., Conte, B., Cobianchi, R.C., Trinchella, F., Capasso, C., Carginale, V., 2012. Toxicity, Accumulation and Removal of Heavy Metals by Three Aquatic Macrophytes, *International Journal of Phytoremediation*, 14(4), 374-387.
- Carlisle D.L., Pritchard D.E., Singh J., Owens B.M., Blankenship L.J., Orenstein J.M., Patierno S.R., 2000. Apoptosis and P53 Induction in Human Lung Fibroblasts Exposed to Chromium (VI): Effect of Ascorbate and Tocopherol, *Toxicological Sciences*, 55(1), 60-68.
- Chang M., Wang W.N., Wang A.L., Tian T.T., Wang P., Zheng Y., Liu Y., 2009. Effects of Cadmium on Respiratory Burst, Intracellular Ca²⁺ and DNA Damage in the White Shrimp *Litopenaeus Vannamei*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 149(4), 581-586.
- Chatterjee, A., Mambo, E., Sidransky, D., 2006. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene* 25, 4663-4674.
- Costa M., Salnikow K., Cosentino S., Klein C.B., Huang X., Zhuang Z., 1994. Molecular Mechanisms of Nickel Carcinogenesis, *Environmental Health Perspectives*, 102(3), 127-130.

- D'Agostini F., Izzotti A., Bennicelli C., Camoirano A., Tampa E., De Flora S., 2002. Induction of Apoptosis in the Lung but not in the Liver of Rats Receiving Intra Tracheal Instillations of Chromium(VI), *Carcinogenesis*, 23(4), 587-593.
- Damjanov I., Sunderman F.W. Jr., Mitchell J.M., Allpass P.R., 1978. Induction of Testicular Sarcomas in Fischer Rats by Intratesticular Injection of Nickel Subsulfide, *Cancer Research*, 38(2), 268-276.
- Denkhaus E., Salnikow K., 2002. Nickel Essentiality, Toxicity and Carcinogenicity, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 42(1), 35-56.
- Diwan B.A., Kasprzak K.S., Rice J.M., 1992. Transplacental Carcinogenic Effects of Nickel(II) Acetate in the Renal Cortex, Renal Pelvis and Adenohypophysis in F3447/NCr Rats, *Carcinogenesis*, 13(8), 1351-1357.
- Dorne, J.L., Kass, G.E., Bordajandi, L.R., Amzal, B., Bertelsen, U., Castoldi, A.F., Heppner, C., Eskola, M., Fabiansson, S., Ferrari, P., Scaravelli, E., Dogliotti, E., Fuerst, P., Boobis, A.R., Verger, P., 2011. Human Risk Assessment of Heavy Metals, *Metal Ions in Life Sciences*, 8, 27-60.
- EPA, 2014. *Arsenic, Inorganic and Soluble Salts Evaluation of Health Hazards and Proposal of a Health-Based Quality Criterion for Drinking Water*, The Danish Environmental Protection Agency, Denmark
- FDA, 2016. *Arsenic in Rice and Rice Products Risk Assessment Report*, U.S. Food and Drug Administration, U.S.
- Feki-Tounsi M., Hamza-Chaffai A., 2014. Cadmium as a Possible Cause of Bladder Cancer: A Review of Accumulated Evidence, *Environmental Science and Pollution Research International*, 21(18), 10561-10573.
- Flanagan S.V., Johnston R.B., Zheng Y., 2012. Arsenic in Tube Well Water in Bangladesh: Health and Economic Impacts and Implications for Arsenic Mitigation, *Bulletin of the World Health Organization*, 90(11), 839-846.
- Garasse R., Kaguni L.S., 2005. A Drosophila Model of Mitochondrial DNA Replication: Proteins, Genes and Regulation, *Life*, 57(8), 555-561.
- Graeme K.A., Pollack C.V.Jr., 1998. Heavy Metal Toxicity Part I: Arsenic and Mercury, *The Journal of Emergency Medicine*, 16(1), 45-56.
- Heinrich U., 1992. Pulmonary Carcinogenicity of Cadmium by Inhalation in Animals, *IARC Scientific Publications*, 118, 405-413.
- Hueper W.C., Payne W.W., 1962. Experimental Studies in Metal Carcinogenesis. Chromium, Nickel, Iron, Arsenic, *American Academy of Occupational Medicine*, 5, 445-462.

- IARC, 1980. *IARC Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans: Some Metals and Metallic Compounds-Volume 23*, International Agency for Research on Cancer, Switzerland.
- IARC, 1990. *IARC Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans: Chromium, Nickel and Welding-Volume 49*, International Agency for Research on Cancer, France.
- IARC, 1993. *IARC Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans: Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Manufacturing Industry-Volume 58*, International Agency for Research on Cancer, France.
- Il'yasova D., Schwartz G.G., 2005. Cadmium and Renal Cancer, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(2), 179-186.
- Järup L., 2003. Hazards of Heavy Metal Contamination, *British Medical Bulletin*, 68(1), 167-182.
- Johansen M.G., McGowan J.P., Tu S.H., Shirachi D.Y., 1984. Tumorigenic Effect of Dimethyl-Arsenic Acid in the Rat, *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 27, 289-291.
- Kang G.S., Gillespie P.A., Gunnison A., Moreira A.L., Wong K.M.T., Chen L.C., 2011. Long-Term Inhalation Exposure to Nickel Nanoparticles Exacerbated Atherosclerosis in a Susceptible Mouse Model, *Environmental Health Perspectives*, 119(2), 176-181.
- Karp G., 1996. *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*, First Edition. John Wiley & Sons, New York, 178-180 s.
- Kasprzak K.S., Sunderman F.W. Jr., Salnikow K., 2003. Nickel Carcinogenesis, *Mutation Research*, 533(1-2), 67-97.
- Kochare, T., Tamir, B., 2015. Assessment of Dairy Feeds for Heavy Metals, *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences*, 11(1), 20-31.
- Koedrith, P., Kim, H.L., Weon, J.I., Seo, Y.R., 2013. Toxicogenomic Approaches for Understanding Molecular Mechanisms of Heavy Metal Mutagenicity and Carcinogenicity, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216(5), 587-598.
- Léonard A., Lauwerys R.R., 1980. Carcinogenicity and Mutagenicity of Chromium, *Mutation Research*, 76(3), 227-239.
- Lewis D.L., Farr C.L., Kaguni L.S., 1995. Drosophila Melanogaster Mitochondrial DNA: Completion of the Nucleotide Sequence and Evolutionary Comparisons, *Insect Molecular Biology*, 4(4), 263-278.

- Li W., Wanibuchi H., Salim EI., Yamamoto S., Yoshida K., Endo G., Fukushima S., 1998. Promotion of NCI-Black-Reiter Male Rat Bladder Carcinogenesis by Dimethylarsinic Acid an Organic Arsenic Compound, *Cancer Letters*, 134(1), 29-36.
- Linnane A.W., Marzuki S., Ozawa T., Tanaka M., 1989. Mitochondrial DNA Mutations as an Important Contributor to Ageing and Degenerative Diseases, *Lancet*, 1(8639), 642-645.
- Linos A., Petralias A., Christophi C.A., Christoforidou E., Kouroutou P., Stolidis M., Veloudaki A., Tzala E., Makris K.C., Karagas M.R., 2011. Oral Ingestion of Hexavalent Chromium Through Drinking Water and Cancer Mortality in an Industrial Area of Greece--An Ecological Study, *Environmental Health*, 24, 10-50.
- Lodish H., Berk A., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Bretscher A., Ploegh H., Matsudaira, 2007. *Molecular Cell Biology*, Sixth Edition. W. H. Freeman and Company, New York.
- Martinez V.D., Vucic E.A., Adonis M., Gil L., Lam W.L., 2011. Arsenic Biotransformation as a Cancer Promoting Factor by Inducing DNA Damage and Disruption of Repair Mechanisms, *Molecular Biology International*, 718974.
- Meyer J.N., Leung M.C.K., Rooney J.P., Sandoel A., Hengartner M.O., Kisby G.E., Bess A.S., 2013. Mitochondria as a Target of Environmental Toxicants. *Toxicological Sciences*, 134: 1-17.
- Mirabella M., Di Giovanni S., Silvestri G., Tonali P., Servidei S., 2000. Apoptosis in Mitochondrial Encephalomyopathies with Mitochondrial DNA Mutations: A Potential Pathogenic Mechanism, *Brain: A Journal of Neurology*, 123(1), 93-104.
- Nzengue Y., Steiman R., Garrel C., Lefèbvre E., Guiraud P., 2008. Oxidative Stress and DNA Damage Induced by Cadmium in the Human Keratinocyte HaCaT Cell Line: Role of Glutathione in the Resistance to Cadmium, *Toxicology*, 243(1-2), 193-206.
- Ottolenghi A.D., Haseman J.K., Payne W.W., Falk H.L., MacFarland H.N., 1975. Inhalation Studies of Nickel Sulfide in Pulmonary Carcinogenesis of Rats, *Journal of the National Cancer Institute*, 54(5), 1165-1172.
- O'Brien T.J., Ceryak S., Patierno S.R., 2003. Complexities of Chromium Carcinogenesis: Role of Cellular Response, Repair and Recovery Mechanisms, *Mutation Research*, 533(1-2), 3-36.
- Ozawa T., 1995. Mechanism of Somatic Mitochondrial DNA Mutations Associated with Age and Diseases, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1271(1), 177-189.
- Partridge M.A., Huang S.X., Hernandez-Rosa E., Davidson M.M., Hei T.K., 2007. Arsenic Induced Mitochondrial DNA Damage and Altered Mitochondrial Oxidative Function: Implications for Genotoxic Mechanisms in Mammalian Cells, *Cancer Research*, 67(11), 5239-5247.

- Penta J.S., Johnson F.M., Wachsman J.T., Copeland W.C., 2001. Mitochondrial DNA in Human Malignancy, *Mutation Research*, 488(2), 119-133.
- Phillips N.R., Sprouse M.L., Roby R.K., 2014. Simultaneous Quantification of Mitochondrial DNA Copy Number and Deletion Ratio: A Multiplex Real-Time PCR Assay, *Scientific Reports*, 4, 3887.
- Poirier L.A., Theiss J.C., Arnold L.J., Shimkin M.B., 1984. Inhibition by Magnesium and Calcium Acetates of Lead Subacetate- and Nickel Acetate- Induced Lung Tumors in Strain a Mice, *Cancer Research*, 44(4), 1520-1522.
- Ratnaike R., 2003. Acute and Chronic Arsenic Toxicity, *Postgraduata Medical Journal*, 79(933), 391-396.
- Rengel, Z., 1999. *Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems*, (edit. Prasad M.N.V., Hagemeyer J.) Springer, New York, 231 s.
- Schaumlöffel D., 2012. Nickel Species: Analysis and Toxic Effects, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26(1), 1-6.
- Sethi P.K., Khandelwal D., Sethi.N., 2006. Cadmium Exposure: Health Hazards of Silver Cottage Industry in Developing Countries, *Journal of Medical Toxicology*, 2(1), 14-15.
- Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., Gupta, R., 2011. Heavy metals and living systems: An overview, *Indian Journal of Pharmacology*, 43(3), 246-253.
- Starr C., Taggart., 1995. *Biology-The Unity and Diversity of Life*, Seventh Edition. Wadsworth Publishing Company, New York, 67 s.
- Straif K., Benbrahim-Tallaa L., Baan R., Grosse Y., Secretan B., Ghissassi F., Bouvard V., Guha N., Freeman C., Galichet L., Coglianò V., 2009. A Review of Human Carcinogens—Part C: Metals, Arsenic, Dusts, and Fibres, *The Lancet Oncology*, 10(5), 453-454.
- Stout M.D., Herbert R.A., Kissling G.E., Collins B.J., Travlos G.S., Witt K.L., Melnick R.L., Abdo K.M., Malarkey D.E., Hooth M.J., 2009. Hexavalent Chromium is Carcinogenic to F344/N Rats and B6C3F1 Mice after Chronic Oral Exposure, *Environmental Health*, 117(5), 716-722.
- Song X., Fiati Kenston S.S., Kong L., Zhao J., 2017. Molecular Mechanisms of Nickel Induced Neurotoxicity and Chemoprevention, *Toxicology*, 392, 47-54.
- Taylor R.W., Turnbull D.M., 2005. Mitochondrial DNA Mutations in Human Disease, *Nature Reviews Genetics*, 6, 389-402.
- Tchounwou P.B., Centeno J.A., Patlolla A.K., 2004. Arsenic Toxicity, Mutagenesis and Carcinogenesis--A Health Risk Assessment and Management Approach, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 255(1-2), 47-55.

- Theron, A.J., Tintinger, G.R., Anderson, R., 2012. Harmful Interactions of Non-Essential Heavy Metals with Cells of the Innate Immune System, *Journal of Clinical Toxicology*, 3(5).
- Thun M.J., Schnorr T.M., Smith A.B., Halperin W.E., Lemen R.A., 1985. Mortality Among a Cohort of U.S. Cadmium Production Workers—an Update, *Journal of the National Cancer Institute*, 74(2), 325-333.
- Tokarz, P., Blasiak J., 2014 Role of Mitochondria in *Carcinogenesis*. *Acta Biochimica Polonica* 61; 671-678.
- USEPA, 1989. *Cadmium*, U.S. Environmental Protection Agency National Center for Environmental Assessment, U.S.
- USEPA, 1995. *Arsenic, Inorganic*. U.S. Environmental Protection Agency National Center for Environmental Assessment, U.S.
- USEPA, 2000. *Chromium Compounds*, U.S. Environmental Protection Agency National Center for Environmental Assessment, U.S.
- USEPA, 2005. *Toxicological Profile for Nickel*, U.S. Department of Health and Human Services, U.S.
- Waalkes M.P., Rehm S., Riggs C.W., Bare R.M., Devor D.E., Poirier L.A., Wenk M.L., Henneman J.R., 1989. Cadmium Carcinogenesis in Male Wistar [CrI:(WI)BR] Rats: Dose-Response Analysis of Effects of Zinc on Tumor Induction in the Prostate, in the Testes, and at the Injection Site, *Cancer Research*, 49(15), 4282-4288.
- Waalkes.M.P., 2000. Cadmium Carcinogenesis in Review, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 79 (1-4), 241-244.
- Waalkes M.P., 2003. Cadmium Carcinogenesis, *Mutation Research*, 533(1-2), 107-120.
- Wang Y., Fang J., Leonard S.S., Rao K.M., 2004. Cadmium Inhibits the Electron Transfer Chain and Induces Reactive Oxygen Species, *Free Radical Biology & Medicine*, 36(11), 1434-1443.
- Watanabe M., Henmi K., Ogawa K., Suzuki T., 2003. Cadmium-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial DNA Breaks in Photosynthetic and non-Photosynthetic Strains of *Euglena Gracilis*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 134(2), 227-234.
- WHO, 2000. *Air Quality Guidelines for Europe*. World Health Organization, Switzerland.
- WHO, 2007. *Health risks of heavy metals from long-range transboundary air pollution*, World Health Organization, Germany.
- WHO, 2010. *Exposure to Cadmium: A Major Public Health Concern*, World Health Organization, Switzerland.

- Wu, X., Cobbine, S.J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., 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.
- Wu H., Liao Q., Chillrud S.N., Yang Q., Huang L., Bi J., Yan B., 2016. Environmental Exposure to Cadmium: Health Risk Assessment and its Associations with Hypertension and Impaired Kidney Function, *Scientific Reports*, 6, 29989.
- Xia X., Lin S., Zhao J., Zhang W., Lin K., Lu Q., Zhou B., 2017. Toxic Responses of Microorganisms to Nickel Exposure in Farmland Soil in the Presence of Earthworm (*Eisenia Fetida*), *Chemosphere*, 192, 43-50.
- Xu S.C., He M.D., Zhong M., Zhang Y.W., Wang Y., Yang L., Yang J., Yu Z.P., Zhou Z., 2010. Melatonin Protects Against Nickel-Induced Neurotoxicity In Vitro by Reducing Oxidative Stress and Maintaining Mitochondrial Function, *Journal of Pineal Research*, 49(1), 86-94.
- Xu S.C., He M.D., Lu Y., Li L., Zhong M., Zhang Y.W., Wang Y., Yu Z.P., Zhou Z., 2011. Nickel Exposure Induces Oxidative Damage to Mitochondrial DNA in Neuro2a Cells: The Neuroprotective Roles of Melatonin, *Journal of Pineal Research*, 51(4), 426-433.
- Xu S.C., He M.D., Zhong M., Li L., Lu Y., Zhang Y., Zhang L., Yu Z.P., Zhou Z., 2015. The Neuroprotective Effects of Taurine Against Nickel by Reducing Oxidative Stress and Maintaining Mitochondrial Function in Cortical Neurons, *Neuroscience Letters*, 590, 52-57.
- Yamanaka K., Ohtsubo K., Hasegawa A., Hayashi H., Ohji H., Kanisawa M., Okada S., 1996. Exposure to Dimethylarsinic Acid, A Main Metabolite of Inorganic Arsenics, Strongly Promotes Tumorigenesis Initiated by 4-Nitroquinoline 1-Oxide in the Lungs of Mice, *Carcinogenesis*, 17(4), 767-770.
- Yakes, F.M., Van Houten, B., 1997. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:514-519.
- Yang L., Mester Z., Abranko L., Sturgeon R.E., 2004. Determination of Total Chromium in Seawater by Isotope Dilution Sector Field ICPMS Using GC Sample Introduction, *Analytical Chemistry*, 76(13), 3510-3516.
- Yin Q., Wang W.X., 2017. Uniquely High Turnover of Nickel in Contaminated Oysters *Crassostrea Hongkongensis*: Biokinetics and Subcellular Distribution, *Aquatic Toxicology*, 194, 159-166.
- Zhang W., Liu Y., An Z., Huang D., Qi Y., Zhang Y., 2011. Mediating Effect of ROS on mtDNA Damage and Low ATP Content Induced by Arsenic Trioxide in Mouse Oocytes, *Toxicology in Vitro*, 25(4), 979-984.

Zhong X., Sá R.C.S., Zhong C., 2017. Mitochondrial Biogenesis in Response to Chromium (VI) Toxicity in Human Liver Cells, *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1877.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Doğuş CAN
Doğum Yeri ve Yılı : Antalya / 1989

Eğitim Durumu

Lise : Konyaaltı Lisesi
Lisans : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Bilimleri
Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı