



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**DİVALAN METAL TAŞIYICISI GEN
POLİMORFİZMİNİN METAL MARUZİYETİNDE
KURŞUN VE DEMİR DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

Miyase ODABAŞI

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. İsmail KURT

2011- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DİVALAN METAL TAŞIYICISI GEN
POLİMORFİZMİNİN METAL MARUZİYETİNDE
KURŞUN VE DEMİR DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

Miyase ODABAŞI

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. İsmail KURT

2011- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı
Adli Kimya ve Adli Toksikoloji

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

19.09.2011



Jüri Başkanı
Prof. Dr. İsmail KURT
G.A.T.A



Üye
Prof. Dr. Tülin SÖYLEMEZOĞLU
A.Ü. Adli Bilimler Enstitüsü



Üye
Doç. Dr. Birsen KAPLAN
G.Ü. Sağlık Hiz. M.Y.O



Üye
Doç. Dr. Nergis CANTÜRK
A.Ü. Adli Bilimler Enstitüsü



Üye
Yrd. Doç. Dr. Zeliha KAYAALTI
A.Ü. Adli Bilimler Enstitüsü

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xii
1.GİRİŞ	1
1.1. Metaller ve Metal Taşıyıcılar	2
1.2. Ağır Metaller, Ağır Metallere Maruziyet ve Toksikite	4
1.2.1. Toksik Metaller	5
1.2.1.1 Kurşun	5
1.2.1.1.1. Kurşunun Üretimi ve Kullanımı	6
1.2.1.1.2. Kurşuna Maruziyet	7
1.2.1.1.3. Kurşun Toksikokinetiği	12
1.2.1.1.4. Kurşun Toksikitesi	16
1.2.1.1.5. Kurşunun Üreme Sistemine ve Fötal Gelişime Etkileri	18
1.2.1.1.6. Kurşunun Hücrel Antioksidan Enzim Sistemlerine Etkisi	19
1.2.1.1.7. Kurşunun Organizma Üzerine Etkisi, Tanısı ve Tedavisi	20
1.2.1.1.8. Kurşunun Vücuttan Uzaklaştırılması	24
1.2.1.1.9. Kurşunun İz Elementlerle Etkileşimi	25
1.2.2. İz Elementler	27
1.2.2.1. Demir	27
1.2.2.2. Demirin Vücutta Dağılımı	29
1.2.2.3. Demirin Emilimi ve Taşınması	30
1.2.2.4. Vücutta Demirin Homeostazı	35
1.2.2.5. Demirin Vücuttan Atılımı	39
1.2.2.6. Demirin Toksik Etkisi ve Serbest Radikal Oluşumu	39
1.2.3. Metal Toksikitesinde Metal Bağlayan Proteinlerin Önemi	41
1.2.3.1. Divalan Metal Taşıyıcı Protein (DMT1)	41

1.2.3.1.1. DMT1 Geninin Yapı ve İzofomları	45
1.2.3.1.2. DMT1'in Lokalizasyonu	47
1.2.3.1.3. DMT1'in Ekspresyon ve Düzenlemesi	48
1.2.3.1.4. DMT1'in Biyokimyasal ve Fizyokimyasal Özellikleri	50
1.2.3.1.5. DMT1'in Biyolojik Rolü	51
1.2.3.2. DMT1 ve Esansiyel Metallerin Homeostazisi	52
1.2.3.3. DMT1 ve Metal Detoksifikasyonu	53
1.2.3.4. Serbest Radikal Süpürücüsü Olarak DMT1'in Rolü	54
1.2.3.5. DMT1 Geni IVS4+44 C/A Bölgesindeki SNP	54
1.3. DNA	57
1.4. Genetik Polimorfizm	57
1.4.1. Polimorfizm Çeşitleri	58
1.4.2. SNP'lerin Protein Sentezi Üzerine Etkileri	60
1.5. DNA'nın Saflaştırılması	60
1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction: PCR)	61
1.6.1. PCR'in Aşamaları	61
1.6.2. Standart PCR Bileşenleri	63
1.7. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP) Yöntemi	65
1.7.1. Restriksiyon Endonükleaz (RE) Enzimlerinin Sınıflandırılması	66
1.8. Gen Ekspresyonu	67
1.9. Biyolojik Materyallerde Metal Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	68
1.9.1. Atomik Absorbsiyon Spektrometresi (AAS)	68
1.9.1.1. Alevli Atomik Absorbsiyon Spektrometresi (AAAS)	69
1.9.1.2. Grafit Fırınli Atomik Absorbsiyon Spektrometresi (GFAAS)	69
2.GEREÇ ve YÖNTEM	70
2.1 Gereçler	70
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	70
2.1.2 Kullanılan Araç ve Gereçler	71
2.1.3. Deney Protokolü	72
2.1.3.1. Sıvı Kan ve İdrar Örneklerinin Toplanması	72
2.1.4. Yöntem	72

2.1.4.1. DMT1 geninin IVS4+44 bölgesinde bulunan C/A SNP'sinin belirlenmesi	73
2.1.4.1.1. DNA İzolasyonu	73
2.1.4.1.1.1. Sıvı Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu	73
2.1.4.1.2. Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi	74
2.1.4.1.2.1. %0,5'lik Agaroz Jelin Hazırlanması	74
2.1.4.1.2.2. Agaroz Jel'e Yükleme İçin Örnek Hazırlanması ve Yürütme Koşulları	74
2.1.4.1.3. PCR	75
2.1.4.1.3.1. Primerler	76
2.1.4.1.3.2. PCR Bileşenleri ve PCR Programı	76
2.1.4.1.3.3. PCR Ürünü İçin Agaroz Jel Hazırlanması	78
2.1.4.1.4. PCR Ürününün RFLP Yöntemi ile Kesimi	78
2.1.4.1.4.1. MnlI RE'nin Özellikleri	78
2.1.4.1.4.2. MnlI Enzimi ile Kesim İşlemleri	79
2.1.4.1.4.3. MnlI Enzimi ile İnkübasyondan Sonra Agaroz Jel Hazırlanması	79
2.1.4.2. Tam kanda Fe ve Pb Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	79
2.1.4.2.1. Tam Kanın Ön Analiz İşlemleri	80
2.1.4.2.2. Tam Kanda Metal Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	80
2.1.4.2.2.1. Tam Kanda Pb Konsantrasyonunun Belirlenmesi	80
2.1.4.2.2.2. Tam Kanda Fe Konsantrasyonunun Belirlenmesi	81
2.1.4.3. Tam Kanda Total Porfirin (Eritrosit protoporfirin, EP) Değerinin Belirlenmesi	83
2.1.4.4. İdrarda Delta-Aminolevülinik Asit (ALA) Değerinin Belirlenmesi	84
2.1.4.5. İdrarda Total Porfirin Değerinin Belirlenmesi	85
2.1.5. İstatistiksel Analiz	85
3.BULGULAR	86
3.1. Toplumumuz Bireylerinde DMT1 IVS4+44 Pozisyonunda Bulunan C/A Polimorfizm Sonuçları	86
3.1.1. Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Belirlenmesinin Sonuçları	86

3.1.2. PCR Reaksiyonu ile DMT1 IVS4+44 Bölgesinin Amplifikasyon Sonuçları	86
3.1.3. MnlI RE ile Amplifiye Edilen DMT1 geni IVS4+44 Bölgesinin Kesim Sonuçları	88
3.1.4. DNA Örneklerinin Tiplendirilmesi	88
3.2. Tam Kanda Pb ve Fe Konsantrasyon Sonuçları ile DMT1 Geni IVS4+44 Bölgesindeki Polimorfizm Sonuçlarının Karşılaştırılması	93
3.3. Tam Kanda EP Düzey Sonuçları ile DMT1 Geni IVS4+44 Bölgesindeki Polimorfizm Sonuçlarının Karşılaştırılması	94
3.4. İdrar ALA ve Total Porfirin Düzey Sonuçları ile DMT1 Geni IVS4+44 Bölgesindeki Polimorfizm Sonuçlarının Karşılaştırılması	96
4.TARTIŞMA	102
5.SONUÇ ve ÖNERİLER	107
ÖZET	108
SUMMARY	109
KAYNAKLAR	110
EKLER	123
ÖZGEÇMİŞ	126

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca paylaştığı bilgi ve deneyimlerini tez çalışmam süresince de esirgemeyen, tezimi yürütebilmem için gerekli laboratuvar ortamı ve imkanları sağlayan, insana saygısı, içtenliği ve ilkeli yöneticiliği ile bana örnek olan değerli hocam Adli Bilimler Enstitüsü Müdürü **Prof. Dr. Tülin Söylemezoğlu**'na, araştırma yöntemlerine ilişkin kafamdaki soru işaretlerini gideren, yakın ilgisini ve desteğini hiç esirgemeyen değerli danışman hocam **Prof. Dr. İsmail Kurt**'a, tezimin planlanmasından son şeklini alıncaya kadar her aşamasıyla ilgilenen, istatistiksel analizlerde bana yol gösteren, tatillerdeki zamanımı bile vermekten çekinmeyen ve bu süreçte bana araştırma disiplini ve heyecanını yaşatan değerli arkadaşım **Yrd. Doç. Dr. Zeliha Kayaaltı**'na, tez çalışmam süresince sevinçli ve sıkıntılı anlarımı paylaştığım ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım **Dr. Biyolog Vügar Aliyev**'e, **Uzm. Biyolog Ayşe Karakuş**'a ve **Yrd. Doç. Dr. Görkem Mergen**'e, örneklerin toplanması ve gerekli bilgilere ulaşmam konusundaki yardımlarını esirgemeyen **Uzm. Dr. Hınç Yılmaz**'a ve **Hemşire Ayşegül Akdoğan**'a,

Yüksek lisans ve Doktora eğitimim sırasında bursiyeri olduğum **TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı**'na,

Üniversiteye başladığım ilk günden itibaren değerli zamanlarını bana ayıran, her türlü sevincimi ve sıkıntımı paylaşan, desteklerini hep arkamda hissettiğim lisans dönemindeki hocam **Prof. Dr. Metin Aktaş**'a ve yüksek lisans tez danışmanım **Prof. Dr. Yavuz Beyatlı**'ya,

Eğitimim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, mutlu ve üzüntülü anlarımı paylaşan sevgili **anneme** ve **babama**, ihtiyaç duyduğumda hep yanımda bulduğum sevgili **abilerime** ve **ablama**, ilkokuldan itibaren üzerimde emeği olan **tüm hocalarıma** ve yanımda olan sevgili **arkadaşlarıma** en içten duygularla teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin
AAAS	Alevli Atomik Absorbsiyon Spektrometresi
AAS	Atomik Absorbsiyon Spektrometresi
ALT	Alanin aminotransferaz
ApoTf	Apotransferrin
ARE	Antioksidan yanıt elemanı (Antioxidant responsive element)
AST	Aspartat aminotransferaz
BAL	British Antilevisit
bp	Baz çifti (base pair)
C	Sitozin
cDNA	Komplementer DNA
dcytb	Duedonal cytochrome b
DMSA	Dimerkaptosüksinik asit
DMT1	Divalent metal taşıyıcı 1
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleozidtrifosfatlar
EDTA	Etilen-diamin-tetra-asetik asit
EP	Eritrosit protoporfirin
F primer	Forward Primer (İleri doğru olan primer)
Fe	Demir
Fe ⁺²	Ferröz demir
Fe ⁺³	Ferrik demir
FPN	Ferroportin
G	Guanin
GFAAS	Grafit Fırınlı Atomik Absorbsiyon Spektrometresi
GRE	Glukokortikoid yanıt elemanı (Glukokorticoid responsive element)
GSH	Glutasyon S transferaz
HFE	Hemokromatoziste mutasyona uğrayan gen
HH	Hereditör Hemokromatozis
HJV	Hemojuvelin
HNO ₃	Nitrik Asit
HPSF	Yüksek Performanslı Tuz içermeyen (High Performance Salt Free)
IL-6	İnterlökin-6

IRE-	Iron Responsive Element (Demir Yanıt Elemanı) içermeyen
IRE+	Iron Responsive Element içeren
IRE-BP	IRE Binding Protein
IRP	Iron Responsive Protein (Demir Yanıt Proteini)
IVS	Intervening Sekans (intron)
LPO	Lipid Peroksidasyonu
MRE	Metal yanıt elemanı (Metal responsive element)
mRNA	mesajcı RNA (messenger RNA)
MTF-1	Metal Transkripsiyonel Faktör 1 (Metal Transcriptional Factor 1)
NTBI	Tranferrine bağlı olmayan demir (Non Transferin Bound Iron)
Pb	Kurşun
PbB	Kan kurşun düzeyi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyon (Polymerase chain reaction)
ppb	Milyarda Bir Ölçütü ($\mu\text{g/L}$)
ppm	Milyonda Bir Ölçütü (mg/L)
R primer	Reverse Primer (Aksi yönde olan primer)
RE	Restriksiyon Endonükleaz
RFLP	Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
RLS	Restless Leg Syndrome
RNA	Ribonükleik asit
SNP	Tek nükleotid poimorfizm (Single Nucleotid Polymorphism)
SOD	Süperoksit dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikali
SP1	Specificity Protein 1
T	Timin
TBE	Tris-Borik Asit-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tf	Transferin
TfR	Transferrin reseptörü
Tm	Erime sıcaklığı
TM	Trans Membran Domain
UTR	Translasyona uğramayan bölge (Untranslated Region)
ZnPP	Çinko Protoporfirin

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Periyodik tablo	3
Şekil 1.2.	Kurşun cevheri galen (PbS) minerali, seruzit (PbCO ₃) minerali	8
Şekil 1.3.	Türkiye'nin kurşun-çinko maden yatakları	8
Şekil 1.4.	Türkiye'de kurşunun 2008 yılında dağılımı, kg/km ² /yıl	8
Şekil 1.5.	İnorganik kurşunun toksikokinetiği	9
Şekil 1.6.	İnorganik kurşuna akut maruziyette toksikokinetik etki	9
Şekil 1.7.	İnorganik kurşuna kronik maruziyette toksikokinetik etki	10
Şekil 1.8.	Organik kurşuna maruziyette toksikokinetik etki	10
Şekil 1.9.	Çocukların yaşadığı çevredeki kurşun etkilenim yolları	11
Şekil 1.10.	Kurşunun kullanımı ve mesleki maruziyeti	12
Şekil 1.11.	Hem inhibisyon basamakları	16
Şekil 1.12.	Çocuklar ve erişkinlerde kan kurşun seviyesine göre etkiler	17
Şekil 1.13.	Kurşuna akut ve kronik maruziyette tedavi planı	25
Şekil 1.14.	Yetişkin bir insanda demir dağılımı	31
Şekil 1.15.	Demir emiliminin mekanizması	35
Şekil 1.16.	Endostatik transferrin döngüsü	36
Şekil 1.17.	Hem emilimi	36
Şekil 1.18.	Demir homeostazına genel bakış	38
Şekil 1.19.	Hepsidin salınımını etkileyen faktörler	38
Şekil 1.20.	DMT1 geninin 12. kromozom üzerindeki yeri	42
Şekil 1.21.	DMT1'in protein yapısındaki amino asitler	42
Şekil 1.22.	DMT1'in üç boyutlu yapısı	44
Şekil 1.23.	DMT1 proteininin hücre membranındaki konumu	44
Şekil 1.24.	Fare DMT1'inin izoform II (IRE-) ve izoform I (IRE+)'in şematik gösterimi	44
Şekil 1.25.	Memeli hücrelerinde DMT1'in alternatif ekleme ile oluşan iki izoformu	46
Şekil 1.26.	İnsan DMT1'inin çoklu izoformları	47
Şekil 1.27.	DMT1 geni IVS4+44 bölgesindeki C/A Tek Nükleotid Değişimi (SNP)	55
Şekil 1.28.	Transisyonla tek nükleotid değişimin gösterilmesi	58
Şekil 1.29.	Transisyon ve transversiyonla tek nükleotid değişim oluşumunun şematik gösterimi	58

Şekil 1.30.	İnsersiyonla çerçeve kayması oluşumunun şematik gösterimi	59
Şekil 1.31.	Delesyon ile amino asit eksilmesinin şematik gösterimi	60
Şekil 1.32.	PCR programı	62
Şekil 1.33.	PCR'ın aşamaları	64
Şekil 1.34.	Taq-DNA polimeraz 1 enziminin yapısı	66
Şekil 1.35.	Protein sentezi	68
Şekil 2.1.	Agaroz jel kuyucuklarına örneklerin yüklenmesi	75
Şekil 2.2.	MnII RE'nin tanıma bölgesi ile kesim noktasının şematik gösterimi	78
Şekil 3.1.	DMT1 geni IVS 4+44 bölgesinin amplifikasyonunun jel görüntüsü	87
Şekil 3.2.	351 bp'lik amplifikasyon ürününün MnII enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotid uzunlukları	87
Şekil 3.3.	351 bp uzunluğundaki PCR ürününün "DMT1 IVS4+44 C/A SNP'nin" homozigot tipik C/C bireylerde MnII enzimi ile kesiminin şematik gösterimi	90
Şekil 3.4.	351 bp uzunluğundaki PCR ürününün "DMT1 IVS4+44 C/A SNP'nin" homozigot tipik C/C genotipli bireylerde, MnII enzimi ile kesimi sonucu ayrılan oligonükleotid uzunluklarının şematik gösterimi	90
Şekil 3.5.	351 bp uzunluğundaki PCR ürününün "DMT1 IVS4+44 C/A SNP'nin" homozigot atipik A/A" genotipli bireylerde, MnII enzimi ile kesiminin şematik gösterimi	91
Şekil 3.6.	351 bp uzunluğundaki PCR ürününün "DMT1 IVS4+44 C/A SNP'nin" homozigot atipik A/A genotipli bireylerde, MnII enzimi ile kesimi sonucu oluşan oligonükleotid uzunluklarının şematik gösterimi	91
Şekil 3.7.	351 bp uzunluğundaki PCR ürününün A aleli ve C aleli varlığında MnII enzimi ile kesim sonucu oluşan oligonükleotid uzunluklarının şematik gösterimi	92
Şekil 3.8.	DMT1 geni IVS4+44 bölge polimorfizmi ile tam kan Fe konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren sütun grafiği	95
Şekil 3.9.	DMT1 geni IVS4+44 bölge polimorfizmi ile tam kan Pb konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren sütun grafiği	95

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Kurşun cevheri çeşitleri	6
Çizelge 1.2.	Farklı ülkelerde çocuk ve yetişkinlerde kan-kurşun düzeyi	18
Çizelge 1.3.	Kurşun zehirlenmesinde laboratuvar bulguları	23
Çizelge 1.4.	Erişkin bireyde demir dağılımı	30
Çizelge 1.5.	Demir emilimini etkileyen faktörler	34
Çizelge 1.6.	Diyetteki demir kaynakları	34
Çizelge 1.7.	Divalan metal taşıyıcının farklı isimleri	42
Çizelge 1.8.	DMT1 geninin bazı SNP'leri	56
Çizelge.1.9.	Standart bir PCR'da bulunması gereken bileşenler ve miktarları	64
Çizelge 2.1.	Amplifikasyonda kullanılan primerler, özellikleri, çoğaltılan DMT1 geni IVS4+44 C/A bölgesinin kromozom üzerindeki lokalizasyonları ve amplifiye edilen bölgenin nükleotid dizilimleri	77
Çizelge 2.2.	PCR bileşenleri ile stoktaki ve reaksiyondaki konsantrasyonları	77
Çizelge 2.3.	MnII enzimi ile kesim işlemindeki bileşenler ve reaksiyondaki konsantrasyonları	79
Çizelge 2.4.	Mikrodalga fırına ait tam kan yakma programı	80
Çizelge 2.5.	Tam kanda Pb konsantrasyonunun belirlenmesi için uygulanan grafit fırın ayarları	81
Çizelge 2.6.	Tam kanda kurşun analizine ait örnek kalibrasyon grafiği	82
Çizelge 2.7.	Kurşun analizi için grafit fırın teknikli atomik absorpsiyon cihazında uygulanan metod	82
Çizelge 2.8.	Tam kanda demir analizine ait örnek kalibrasyon grafiği	83
Çizelge 2.9.	Demir analizi için alevli atomik absorpsiyon cihazında uygulanan metod	83
Çizelge 3.1.	PCR'da kullanılan primerler, kromozom üzerindeki lokalizasyonları ve amplifiye edilen bölgenin nükleotid dizilimleri	87

Çizelge 3.2. DMT1 IVS4+44 bölgesinde polimorfizm ile oluşan genotipler ve MnlI enzimi ile kesim sonucundaki oligonükleotid uzunlukları	89
Çizelge 3.3. Toplumumuz bireylerinde DMT1 IVS4+44 bölgesi polimorfizmi ile oluşan genotiplerin frekansı	92
Çizelge 3.4. Toplumumuz bireylerinde DMT1 IVS4+44 bölgesinde polimorfizmi ile oluşan alellerin frekansı	92
Çizelge 3.5. Çalıştığımız populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti	93
Çizelge 3.6. DMT1 geni IVS4+44 bölge polimorfizmi ile tam kan Pb ve Fe konsantrasyonlarına ait istatistiksel veriler	97
Çizelge 3.7. DMT1 geni IVS4+44 bölge polimorfizmi ile tam kan EP düzeylerine ait istatistiksel veriler	98
Çizelge 3.8. DMT1 geni IVS4+44 bölge polimorfizmi ile idrar Total Porfirin ve ALA düzeylerine ait istatistiksel veriler	99
Çizelge 3.9. 82 bireye ait tam kan Pb, Fe, EP düzeyleri, idrar ALA ve Total Porfirin düzeyleri ile bireye ait diğer verilerin birbirleriyle olan ilişkileri	101

1.GİRİŞ

Metal iyonlarının bir kısmı yaşayan her hücrede birçok metabolik olayda yer alan önemli yaşam elementleri iken demir, bakır, çinko gibi esansiyel iyonların vücutta yüksek düzeylerde bulunmaları zararlıdır. Bununla birlikte normal şartlarda vücutta bulunmayıp eser miktarlarda dahi bulunması zararlı sonuçlar doğuran kurşun, kadmiyum, cıva gibi elementler de vardır. Endüstrileşmiş toplumlarda metallerin yoğun şekilde kullanılması sonucu çevre kirliliği doğal hayatı ve insan sağlığını tehdit etmekte ve önemli çevre kirleticileri olan metal ve ağır metal bileşiklerinin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki etkileri son yıllarda daha fazla ilgi çekmektedir.

Kurşun kolay işlenebilir ve yaygın bir metal olmasından dolayı endüstride oldukça fazla kullanılmaktadır. Dolayısıyla gelişmiş ve endüstrileşmiş toplumlarda kurşuna maruziyet önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir (Baron ve Boyle, 1994; Trachtenbarg, 1996). İnsanlarda kurşuna maruz kalmanın asıl yolu sindirim ve solunum yoluyla (HHS, 1991).

Uzun süre ve düşük dozda maruziyetin vücutta kurşun birikimine neden olduğunu birçok epidemiyolojik çalışma göstermiştir. İnsan kemiği kurşun için ana yerleşim yeri olup hem depo hem de birikme yeridir. Kurşunun kemikte yarı ömrü 20 yıl kadardır (Grandjean ve Wallace, 1992). Kurşun intoksikasyonu kurşunun maruziyet dozuna ve süresine, kalsiyum diyetine, fosfor ve diğer deneysel değişikliklere bağlı olarak ortaya çıkar (HHS, 1991).

Kurşuna maruziyetin en yaygın nedeni yetişkinlerde kurşun ile ilgili meslek veya hobilerinin olması, çocuklarda ise kurşun bazlı boya ve kurşun ile kontamine olmuş tozların oral yolla alınmasıdır. Kurşunun iskelette toplanması fetal kemik doku gelişimi sırasında başlar ve 60 yaşına kadar sürer. Farklı yollarla alınan kurşun, kanda yeterli düzeye ulaştıktan sonra çeşitli organ ve dokularda birikmeye daha sonrada atılmaya başlar (WHO, 1992).

Genetik mutasyonlar önde gelen sağlık problemlerinden biridir, oluşan mutasyonlarla vücutta bazı proteinler fonksiyonlarını kaybedebilmekte ve buna bağlı olarak vücutta birtakım hastalıklar ortaya çıkmaktadır.

Toplumumuzda kurşunun vücuda alınmasında etkili olan metal taşıyıcı proteini (divalan metal taşıyıcı) kodlayan genin polimorfizmi ile vücuttaki Pb ve Fe oranı arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çalışmalara rastlanmamıştır. “Divalan metal taşıyıcı proteini kodlayan genin polimorfizmi vücuttaki Pb ve Fe konsantrasyonunu etkiliyor mu” “Vücuttaki Pb ve Fe düzeyi ile bu genin polimorfizmi arasında nasıl bir ilişki var” sorularının yanıtı açık değildir. Divalan metal taşıyıcı proteini kodlayan genin polimorfizminin vücut Pb ve Fe düzeylerini etkileyip etkilemediği, vücuttaki Pb ve Fe miktarı ile bu genin polimorfizmi arasında ilişki olup olmadığı konusunda henüz bilgimiz yoktur.

Bu çalışmada özellikle bazı meslek gruplarında sürekli olarak etkisine maruz kalınan kurşunun, demirin vücuda alınmasında etkili divalan metal taşıyıcı proteini kodlayan genin polimorfizmi ile bu bireylere ait tam kan örneklerindeki metal düzeyleri ile kan ve idrarlarındaki ilgili parametrelerin incelenmesi amaçlanmıştır.

1.1. Metaller ve Metal Taşıyıcılar

Metallerin ana grupları *IUPAC* inorganik kimya terminolojilerine göre periyodik sistemde grup 1 (alkali metaller Na, K, Rb, Cs, Fr), grup 2 (toprak alkalileri Be, Mg, Ca, Sr, Ba, Ra), grup 13 (Al, Ga, In, Tl), grup 14 (Ge, Sn, Pb), grup 15 (Sb, Bi) ve grup 16 (Po), geçiş metalleri ise grup 3 (Sc, Y, La, Ac), grup 4 (Ti, Zr, Hf), grup 5 (V, Nb, Ta), grup 6 (Cr, Mo, W), grup 7 (Mn, Tc, Re), grup 8 (Fe, Ru, Os), grup 9 (Co, Rh, Ir), grup 10 (Ni, Pd, Pt), grup 11 (Cu, Ag, Au) ve grup 12 (Zn, Cd, Hg) olarak sıralanmıştır (Şekil 1.1).

Periyodik tabloda aynı kolonda yer alan elementlerin kimyasal özellikleri birbirine benzerdir ve çoğunlukla daha üst sıradakilerin alt sıradakilere göre toksik özellikleri azdır. Canlı dokuların hemen hemen tamamı üst sıralardaki hafif

elementlerden oluşur ve hafif elementler çoğunlukla ağır elementlerin zararlı etkilerini azaltırlar. Organizmanın esansiyel ve nonesansiyel veya zararlı ağır metallere birlikte esansiyel metallere homeostazisini sağlaması ve bunlar arasındaki ayırımı yapması önemli bir biyolojik fonksiyondur. Biyolojik olarak ayırım işlemlerinin yapıldığı aşamalar; gastrointestinal kanaldan alım ve emilim, spesifik alanlara iletme, plazma proteinlerine bağlanma ve atım ile böbreklerden geri emilimi kapsamaktadır. Toksik metaller, besinlerle alınması gereken esansiyel elementlerle biyokimyasal ve enzimatik reaksiyonlar şeklinde etkiyerek sağlık üzerinde olumsuz etkilere neden olurlar. Bunun sebebi toksik metaller ile esansiyel elementlerin sahip oldukları ortak özellikleridir. Alüminyum, cıva, kadmiyum ve kurşun gibi metallere insan organizmasında gereksinim duyulmadığından tüm dozlarında toksik olarak kabul edilir ve toksisitelerinin derecesi de dozla orantılı olarak artar. Toksisitenin ortaya çıkması için minimum değer belirlenmediğinden moleküler düzeyde tüm dozlarda etkilerinin olduğu düşünülmektedir (Goyer, 1997).

Periyodik Tablo

Dmitri Mendeleev (1834-1907)

Design and production: Lorella Steyn Graphic Design Studio - Pretoria
 Illustrations: Dr. Jack Technical advisor: Carl Ahlers - Experilab
 www.pozitifgazete.com

Şekil 1.1. Periyodik tablo (<http://mythwiki.pbworks.com/f/1263999508/PeriodicTable.jpg>, Lorella Steyn Graphic Design Studio-Pretoria)

Metallerin vücutta yüksek düzeyde toksik olmaları, kötü beslenme ya da genetik bozuklukların bir sonucu olarak az ya da fazla düzeyde vücutta bulunmaları ile şiddetli hastalıklara ya da ölüme sebep olabilmeleri ile ilgilidir.

Metallerin taşınması özel bir takım taşıyıcılar sayesinde hücrel kompartman membranlarında hassas bir şekilde gerçekleştirilir. Metaller DNA ve proteinler üzerinde hasara neden olabilirken düzenli dağılımlarının olması hayati öneme sahiptir ve aktivitelerindeki az bir değişim ciddi hastalıklara neden olabilir. Anormal demir alımı ile anemi, Aterosklerozis, Parkinson, Alzheimer, Huntington, Friedreich ataxia, Pica, Hemokromatozis ve diğer nörolojik hastalıklarda olduğu gibi benzer bir hastalığı önlemek için hücreler metal iyon hemeostazisini sürdürmek zorundadırlar ve bu olay yüksek derecede düzenlenmiş alım, depolama ve salgılama işlemleri ile sürdürülür (Nelson, 1999, Nevo ve ark., 2006). Hücrel metal iyon düzeyindeki herhangi bir sapma hayati metabolik bir olayın gerçekleşmemesine ya da hücre ölümüne sebep olacak bir hasarın oluşmasına neden olabilir. Bu nedenle, tek bir metal iyon taşıyıcısının sınırlı aktivitesi büyümenin durmasına ve aynı taşıyıcının aşırı aktivitesi de hücre ölümüne sebep olarak toksik etki gösterebilir (Nelson, 1999).

1.2. Ağır Metaller, Ağır Metallere Maruziyet ve Toksikite

Metaller çevresel ve mesleki maruziyet yönünden önemli zehirlenme etkenidir. Bir metal vücuda girdiğinde önce kana karışır daha sonra böbrek, karaciğer, kemik gibi bazı organlar metalleri yüksek oranda ve yıllarca depolarlar. Çevresel ve endüstriyel maruziyetin söz konusu olduğu en önemli metaller; kurşun, kadmiyum, cıva, arsenik, antimon, bakır, bizmut, krom, nikel, kobalt, çinko, demir, manganez ve uranyumdur.

Bazı metaller, selenyum, demir ve bakır gibi, normal metabolik fonksiyonlar için gerekli iken yüksek oranda maruziyette, kurşun ve cıva gibi metaller ise bütün dozlarda toksik etkilidirler. Bu nedenle metallere maruziyet önemli bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmanın konusunu oluşturan element; çok fazla zarara neden olduğu düşünüldüğünden toksikolojik önemi olan ve çevrede yaygın olarak bulunan metal (kurşun) ile demir gibi esansiyel iz elementlerdir.

Ağır metallerin vücutta birikmesi öğrenme sorunları, davranışsal değişiklikler, anemi, titreme, jinjivit, depresyon, hafıza kaybı, baş ağrısı, yüksek tansiyon, kanser, gut, kronik böbrek yetmezliği, hiperürisemi, erkek kısırlığı, kemiklerde bozulmalar gibi önemli sağlık sorunlarına neden olur. Alzheimer, Parkinson ve amiyotrofik lateral sklerozis (ALS) gibi birçok hastalığın etiolojisinden de metallerin sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Tonlarca arsenik, kurşun, kadmiyum, cıva, uranyum ve nikel tarımsal gübrelerle çevreye yayılmaktadır. Çevreden besinler ve su ile sürekli olarak düşük dozda bu toksik metallere maruziyet söz konusudur. Bu nedenle toksik metallere kronik olarak düşük düzeyde maruziyet, yaygın bir sağlık sorunu olarak görülmektedir. Metaller, kontamine besin veya sularla ağızdan alındıkları zaman metalin kimyasal özelliklerinden tutun da vücuttaki fizyolojik koşullara kadar sindirim sisteminden alınmalarını etkileyen birçok faktör vardır. Toksik metallerin birikmesinin belirtileri, çok sayıda ve bazen de tanımlanmamış olabilir ya da yaşam süresince ortaya çıkmayabilir. Cıva, kurşun, kadmiyum ve arsenik gibi sülfidril grubuna ilgisi olan metaller prooksidatif etkilidir ve antioksidatif enzimleri inhibe ederek intraselüler glutatyonun tüketilmesine yol açarlar.

1.2.1. Toksik Metaller

1.2.1.1 Kurşun

Kurşun çevrede doğal olarak bulunan ve periyodik tablonun XIVA grubuna ait olan bir elementtir (ATSDR, 2007). Kurşunun (Pb: CAS 7439-92-1); atomik ağırlığı, 207,19 (1 μg =0,004826 μmol)dur. Kurşunun izotoplarından sadece bir tanesi kararlıdır, diğer izotopları ise radyoaktivite yıkımı sonucu her üç seriden biri son ürün olarak oluşur, uranyum serisi (son ürün ^{206}Pb), toryum serisi (son ürün ^{208}Pb), aktinyum serisi (son ürün ^{207}Pb). Bu dört izotopun varlığı farklı kurşun örnekleri arasında çeşitliliğe neden olur. Bu sebeple, izotopları arasında kurşun sabit bir orana sahip değildir, bu da jeolojik kaynaklardan kurşunun salınımına bağlıdır. Yoğunluğu 11,3 g/cm^3 ; kaynama noktası 1740°C, erime noktası 327,5°C'dir. Metalik kurşunun suda çözünmesi zordur fakat nitrik asit ve konsantre sülfirik asitte çözünebilir. Çoğu

kurşun (II) tuzlarının çözülmesi zordur (kurşun sülfid ve kurşun oksidler), fakat istisnaları vardır (kurşun nitrat, kurşun klorat, kurşun sülfat ve kurşun klorid). Bunun yanında bazı tuzlar (kurşun oksalat) ise organik asitler ile çözünmez. Kurşun bileşikleri; PbO (kurşun monoksit=mürdesenk), Pb₃O₄ (kurşuntetraoksit =sülyen =kırmızı kurşun), PbCO₃ (kurşun karbonat=üstübeç=beyaz kurşun), PbSiO₃ (kurşun silikat), PbS (kurşun sülfür) ve PbCrO₄ (kurşun kromat)'tır. En dayanıklısı PbO'dur. Kurşun alaşımlarından en çok kullanılanı kurşun antimondur (Gümüş, 1979; HHS, 1991; Temur, 1997 ve 2000). Kurşunun en çok rastlanılan cevherleri sülfür minerali galen (PbS) ve onun oksitlenmiş ürünleri olan serüsit (PbCO₃) ve anglezittir (PbSO₄). Bu mineraller arasında en önemli olan galendir (Çizelge 1.1) (Şekil 1.2).

Çizelge 1.1. Kurşun cevheri çeşitleri.

1. Pb Cevher Mineralleri	Formül	% Pb	Yoğunluk
Galenit	PbS	86	7,5
Seruzit	PbCO ₃	77	6,5
Anglezit	PbSO ₄	68	4,0
Jamesonit	Pb ₂ FeSb ₆ S ₁₄	40-50	5,62
Jordanit	Pb ₄ As ₂ S ₇	70	6,4
Boulanjerit	Pb ₅ Sb ₄ S	55	6,0
Promorfit	Pb ₂ Cl(PO ₄) ₃	82 (PbO)	6,8
Mimetizit	Pb ₂ Cl(AsO ₄) ₃	75(PbO)	7,2
Vulfenit	PbMoO ₄	62(PbO)	6,5

1.2.1.1.1. Kurşunun Üretimi ve Kullanımı

Kurşun kullanılmakta olan en eski metallere biridir. Kurşun, dünyada yıllık yaklaşık 3 milyon ton rezervlerinden çıkartılmaktadır. Kurşun işleyen ülkelerin başında Çin, ABD, Avustralya ve Peru gelmektedir (U.S. GS, 2005). Kurşun tüketimi dünyada oldukça fazla olup 2001-2004 yılları arasındaki tüketim miktarı 6,5-7,0 milyon tondur (ILZSG, 2005). Türkiye'nin Kurşun-Çinko maden yatakları Şekil 1.3'te, Türkiye'de kurşunun 2008 yılında dağılımı kg/km²/yıl olarak Şekil 1.4'de gösterilmiştir.

Günümüzde en önemli kurşun kullanım alanı (%71) bataryalardır ve özellikle bunlardan araç bataryaları, elektrik ve endüstriyel bataryalar önemlidir. Diğer

kullanım alanları ise boya (%12), cephaneler (%6) ve kablo kaplamadır (%3) (ILZSG, 2005). Ayrıca kurşun; asker, ağırlık, kristal, alaşım (pirinç ve bronz) ve polivinil klorür (PVC) içinde sabitleyici olarak, su, ses ve radyasyon izolasyonunda, muşamba ve alaşımlarda, elektronik iletkenler, lastik, lehim ve oyuncak yapımında yaygın olarak kullanılır. Diğer kullanım alanları ise; cephanede (kurşun mermi), bronz ve pirinçte, kozmetik ve mücevherlerde bulunur (DDMÖİK, 1992).

1.2.1.1.2. Kurşuna Maruziyet

Kurşun, birçok ülke endüstrisinde yaygın olarak kullanılmasından dolayı şehir çevresinde çok miktarda bulunan ve çevresel problem teşkil eden bir toksindir. İnsanların kurşuna maruz kalmaları hava ve besinler yolu ile olur. En önemli kaynakları ise kurşunla kontamine olmuş boya, toz, toprak ve sudur (HHS, 1991; Lanphear ve ark., 1996). Çevresel kurşun dağılımının en önemli yolu havadır. Havadaki kurşun kaynakları; kurşun ilave edilmiş petrolün yanma ürünleri, yakma fırınları, maden tasfiyehaneleri gibi kaynaklar ve bazı endüstriyel maddeleri içeren yanmış fosil yakıtlardır. Havadaki en önemli kurşun inorganik kurşundur ve esas kaynak benzine eklenerek kullanılan tetraetil ve tetrametil kurşunun yanmasından kaynaklanır (WHO, 1995). Nefesle çekilen kurşunun yaklaşık %30-40'ı kan dolaşımına geçmektedir (Philip ve Gerson, 1994b).

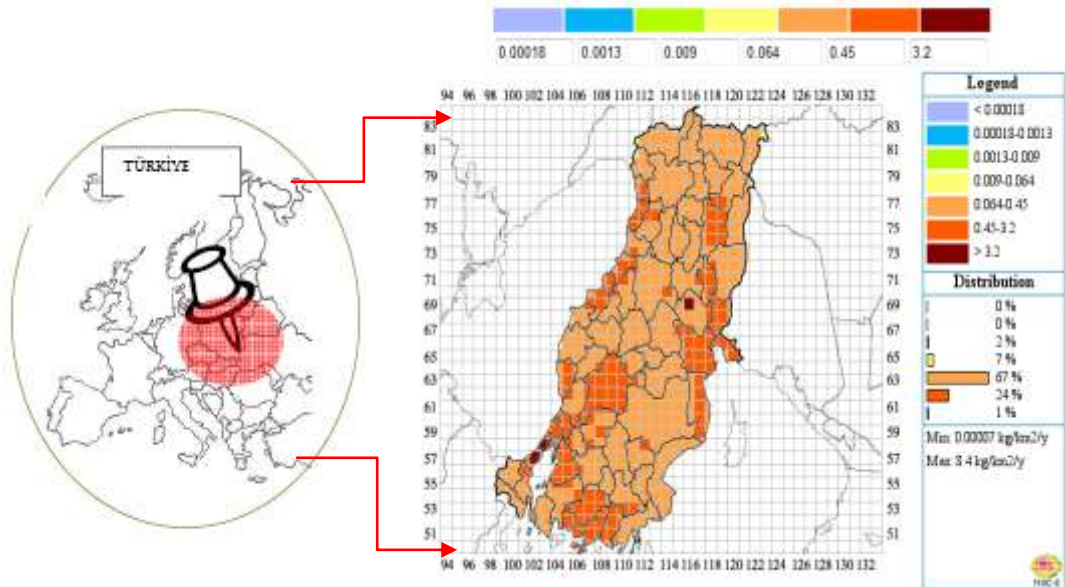
Eskiden besinlerin pişirilmesi ve saklanması amacıyla kullanılan kaplar kurşun içerdiğinden maruziyet daha fazla iken yirminci yüzyılda petrol kaynaklı kurşunun atmosfere salınması sonucu maruziyet arttıysa da kurşunsuz benzinin yaygınlaşması ile maruziyetin azaldığı düşünülebilir. Fakat havaya yayılan kurşun su ve toprakta biriktiğinden maruziyetin hızla azalması düşünülmemektedir. İnorganik kurşunun %50'sinden fazlası inhalasyon ile akciğerlerden emilirken kurşunun %10-15'i gıdalarla alınır. Kanda kurşun alyuvarlara bağlanır ve kurşunun kanda yarılanma ömrü bir ay, kemiklerde ise yaklaşık 20-30 yıl kadardır, idrarla atılımı ise yavaştır (Jarup, 2003) (Şekil 1.5, 1.6, 1.7 ve 1.8).



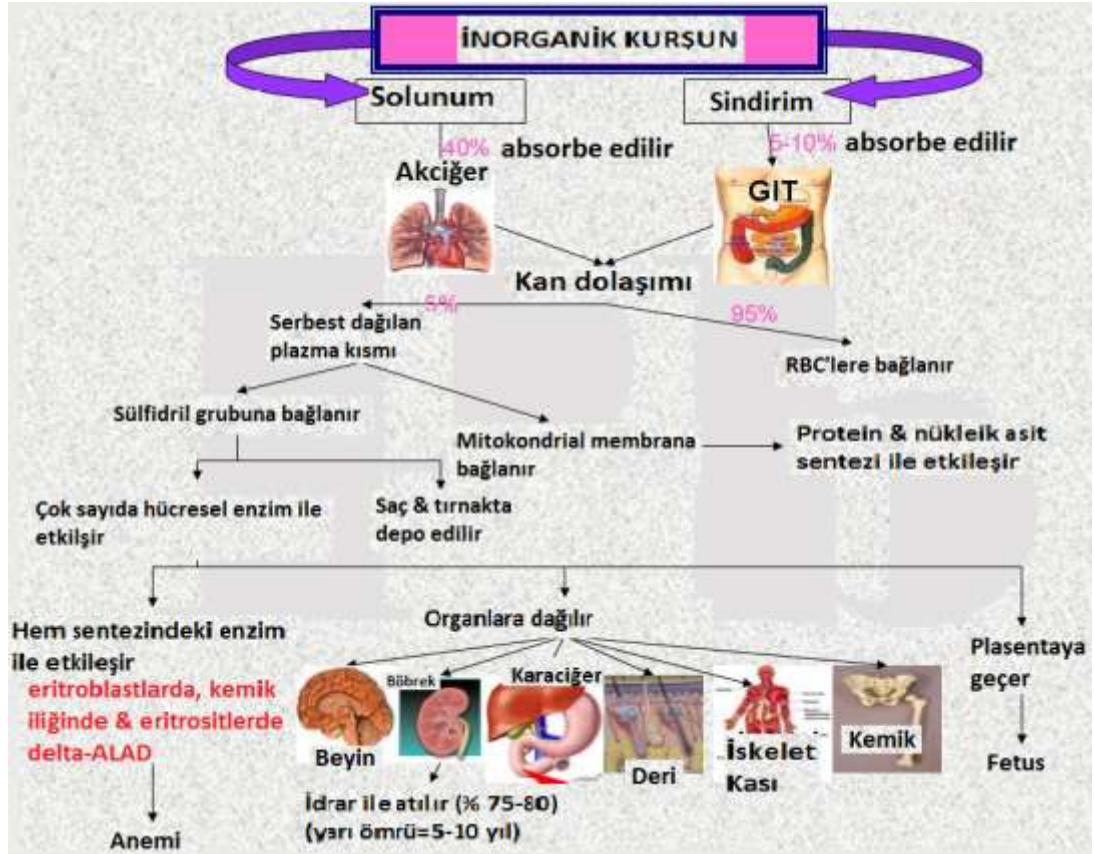
Şekil 1.2. Kurşun cevheri galen (PbS) minerali ve seruzit ($PbCO_3$) minerali.



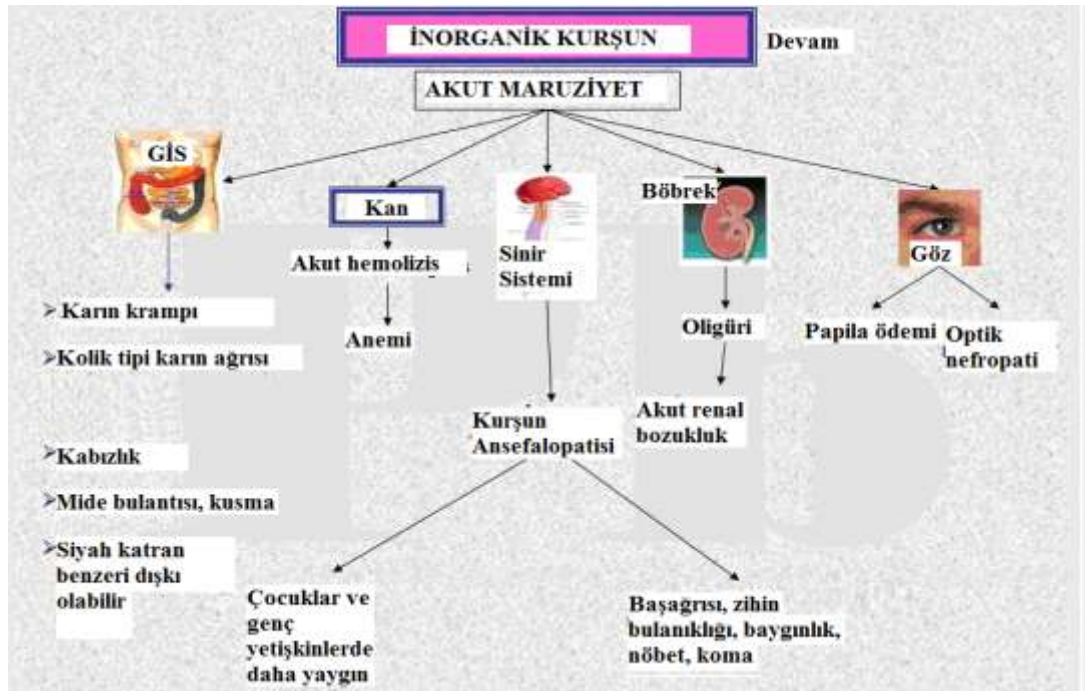
Şekil 1.3. Türkiye'nin kurşun-Çinko maden yatakları (http://www.mta.gov.tr/v1.0/images/turkiye_maden/maden_yataklari/b_h/kur_cin.jpg)



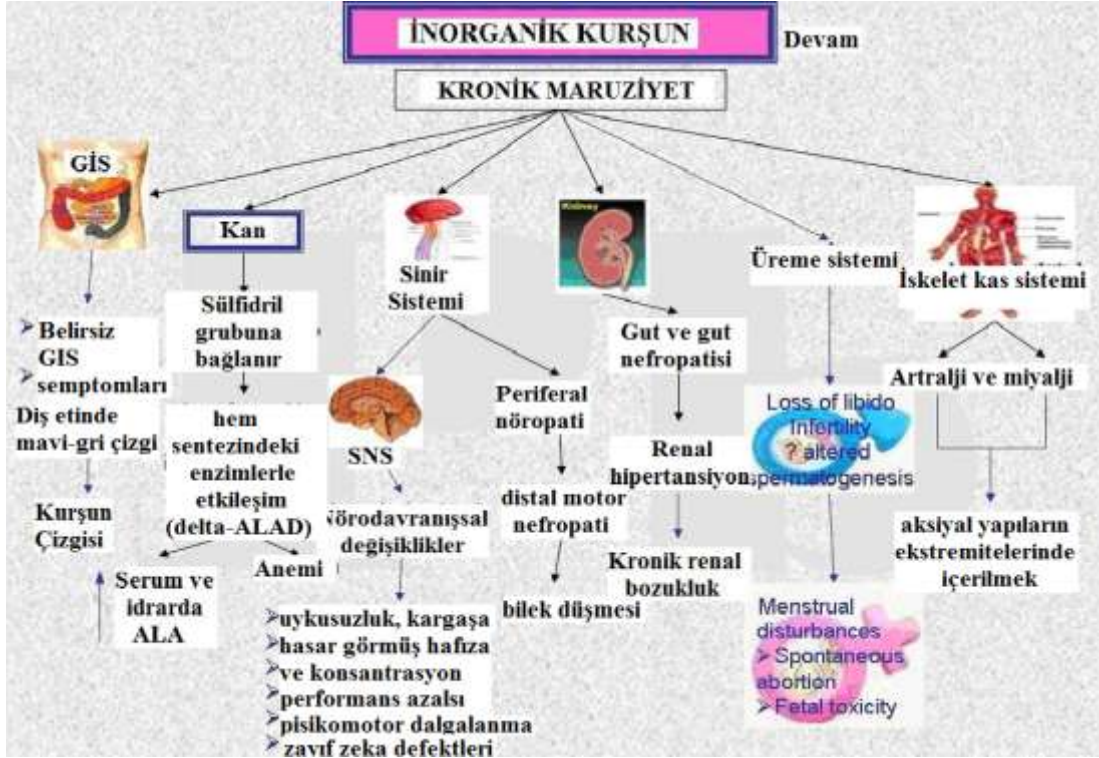
Şekil 1.4. Türkiye'de kurşunun 2008 yılında dağılımı, $kg/km^2/yıl$ (<http://www.msceast.org/Turkey>).



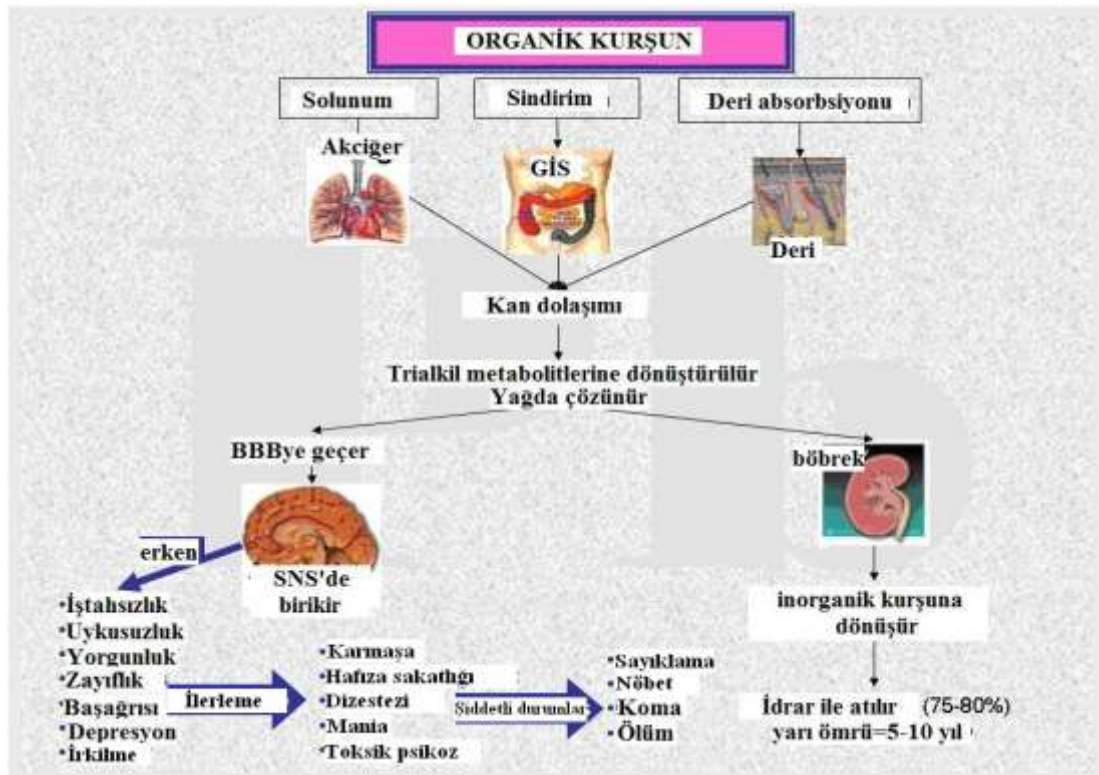
Şekil 1.5. İnorganik kurşunun toksikokinetiği (<http://com-med.ikalogic.com>).



Şekil 1.6. İnorganik kurşuna akut maruziyette toksikokinetik etki (<http://com-med.ikalogic.com>)



Şekil 1.7. İnorganik kurşuna kronik maruziyette toksikokinetik etki (<http://com-med.ikalogic.com>).



Şekil 1.8. Organik kurşuna maruziyette toksikokinetik etki (<http://com-med.ikalogic.com>).

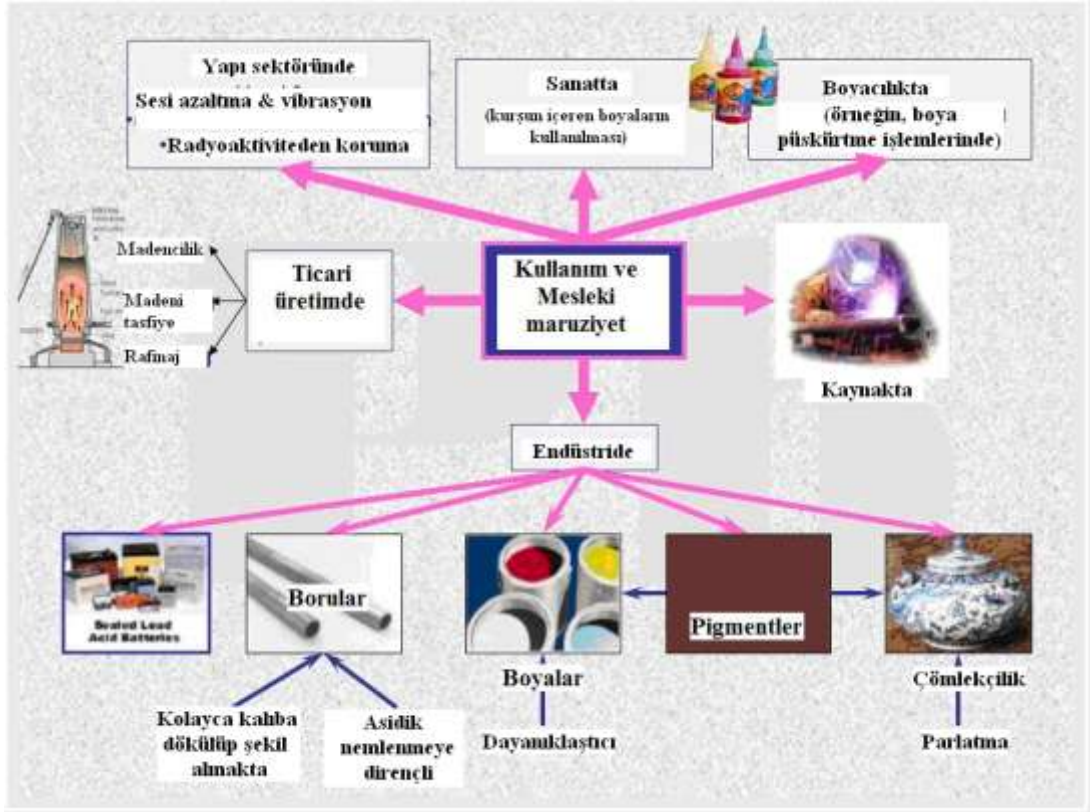
Dermal yol ile benzine eklenen tetraetil kurşun iyi derecede emilirken; boya, besinler, su ve vinil (pvc) kaplama ürünlerindeki inorganik kurşun kısmen emilmektedir (Papanikolaou ve ark., 2005). Kozmetikler, koklanan benzin, bitkisel ilaçlar ve mermiler kurşun zehirlenmelerinde daha az öneme sahip olan kaynaklardır. Yeraltı ve yüzey sularında kurşun miktarı genelde düşüktür, fakat su dağıtım sistemlerine girdiğinde oran artmaktadır. İçme suyunda bulunan kurşun, yiyeceklerdekinden daha fazla emilir. Gelişme çağındaki çocukların besinler ve su ile aldıkları kurşun %50 oranında emilirken yetişkinlerde bu oran %10-15'e kadar düşer (Lanphear ve ark., 1996; Markowitz, 2000). Kurşunun çocuklarda yüksek oranda emilebildiği ve çocuklar gelişen bir bünyede kolayca inhibisyona ve hasara uğrayabilen hücre farklılaşması ve büyümesi geçirdiklerinden yetişkinlere oranla kurşun zehirlenmesine karşı oldukça duyarlıdır (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Çocukların yaşadığı çevredeki kurşun etkilenim yolları (Çamurdan, 2007).

Benzin katkısı kurşun elimine edildiğinden dolayı birçok ülkede özellikle genel popülasyondaki maruziyet önemli derecede azalmıştır. Fakat gelişmekte olan ülkelerde bu maruziyet hala söz konusudur. Bununla birlikte kurşuna mesleki olarak maruziyet oldukça yüksektir. Pil, akümülatör, boya, pigment, plastik, seramik sanayi, dökümhane ve kaynak işlerinde çalışanlar için önemli birer mesleki tehdit oluşturmaktadır (Şekil 1.10). Toplumun geneli ise gıdalar ve sular ya da endüstriyel

baca dumanları veya benzin içindeki kurşunun havayı kirletmesi ile kurşuna maruz kalmaktadır (Kaya ve Akar, 1998). Kurşun zehirlenmesi klinik raporlarda, mesleki maruziyet, gıda depolama ve sırlı seramik kaplardan yenilen yiyeceklerden kaynaklandığı belirtilmektedir (Gerhardsson ve ark., 2002).



Şekil 1.10. Kurşunun kullanımı ve mesleki maruziyeti (<http://com-med.ikalogic.com>)

1.2.1.1.3. Kurşun Toksikokinetiği

İnorganik kurşun inhalasyon, oral ve dermal maruziyet sonucu emilebilirken dermal maruziyet diğer iki yola göre daha az orandadır. Hayvan çalışmaları göstermiştir ki dermal yolla en fazla organik kurşun emilmektedir. Mikron düzeyinden daha küçük olan inorganik kurşun partikülleri solunum sisteminde tamamen emilebildikleri halde daha büyük partiküller yutma yoluyla ancak emilebilmektedir. Gastrointestinal sistemde kurşunun emilim miktarı ve hızı bireye ve aynı zamanda mideye alınma durumuna da bağlıdır. Oral yolla yetişkinlerde suda çözünabilir kurşunun %3-10'unu emilebilirken (Rabinowitz ve ark., 1980; Heard ve Chamberlain 1982; Watson ve ark. 1986), çocuklarda %40-50'sini emilebilir (Alexander, 1974; Ziegler ve ark.

1978). İnorganik kurşunun gastrointestinal sistemde emilimi ilk olarak onikiparmak bağırsağında olur. Kurşun emildikten sonra kan dolaşımında %99 oranında alyuvarlarda (Schutz ve ark., 1996; Bergdahl ve ark., 1997, 1998 ve 1999; Hernandez-Avila ve ark., 1998; Manton ve ark., 2001; Smith ve ark., 2002) geri kalan kısmı ise serum ve plazmada bulunur ve yarı ömrü yaklaşık olarak 30-35 gündür. Bu hücrelerdeki kurşunun çoğu alyuvar membranlarından daha çok proteinlere bağlanır ve plazmadaki kurşunun yaklaşık olarak %40-75'i, albüminin esas ligand olarak ortaya çıktığı plazma proteinlerine bağlanırken (Ong ve Lee, 1980; Al-Modhefer ve ark., 1991) γ -globulinlere de bağlanabilir (Ong ve Lee, 1980). Kurşun serumda proteinlere bağlı olarak bulunmazken küçük molekül ağırlıklı sülfidril bileşikleriyle (sistein, homosistein gibi) ve diğer ligandlarla büyük kompleksler oluşturabilir (Al-Modhefer ve ark., 1991). Esas hücre dışı ligandlar albümin ve protein yapısında olmayan sülfidrilleri içerir. Kırmızı kan hücrelerindeki esas hücre içi ligand ALAD'dır. Kurşun aynı zamanda hücre çekirdeğinde ve sitozolde yer alan proteinlerle de kompleks oluşturabilir (ATSDR, 2005). Kurşun kan dolaşımından sonra karaciğer, beyin, böbrek, akciğerler gibi yumuşak dokular ile diş ve kemiğe dağılır (Rabinowitz ve ark., 1976; Kaya ve Akar, 1998). Kurşunun vücutta dağılımı değişik yollarla gerçekleşir ve yetişkin vücudundaki toplam kurşunun %94'ü kemiklerde bulunurken çocuklarda bu oran %73'tür (Barry, 1975; Philip ve Gerson, 1994a ve 1994b). Kemikte biriken kurşun düzeyi yaş ile birlikte artış gösterir (Schroeder ve Tipton, 1968; Gross ve ark., 1975; Barry, 1975 ve 1981) ve yaşam boyu kemiklerde biriken kurşunun düzeyi genellikle tibiada belirlenir ve genç bireylerde 3 $\mu\text{g/g}$, 30-50 yaş arasındaki bireylerde 17-30 $\mu\text{g/g}$ ve 75 yaş üstündeki bireylerde ise 30 $\mu\text{g/g}$ olarak belirlenmiştir (Wittmers ve ark., 1988). Bu birikim genellikle uzun süre kurşuna maruziyet söz konusu olmasa dahi maruziyet bittikten sonra bile yetişkinlerin kemiklerinden salınan kurşun, kan-kurşun düzeyinin devamlılığına neden olur (O'Flaherty ve ark., 1982; Kehoe, 1987; Inskip ve ark., 1996; Smith ve ark., 1996; Fleming ve ark., 1997). Hamilelik, emzirme dönemi, hipertiroidizm, menapoz ve osteoporoz gibi dönemlerde kemik resorpsiyonu arttığından kandaki kurşun oranı da artar. Kurşun havuzu gebelerde fetusun kemik oluşumu başladığı zaman bebeğin kemiklerine de geçer ve kemikte kurşun eşit oranda dağılmaz (Franklin ve ark., 1997; Gulson ve ark., 1997, 1999, 2003).

Kurşun anneden kordon bağı ile fetusa ve anne sütü yolu ile de bebeğe geçer. İnorganik kurşunun metabolizması çeşitli protein ve protein olmayan ligandlarla kompleksler oluşturarak gerçekleşir. Organik kurşun bileşikleri karaciğerde sitokrom P-450 enzim sistemleri tarafından oksidatif dealkilleme ile etkin olarak metabolize edilir ve kurşunun maruziyet yolundan bağımsız ve esas olarak idrar ve feçes ile boşaltımı gerçekleşir. Ter, tükürük, tırnak, saç ve anne sütü diğer atım yollarıdır. İnorganik kurşunun kanda ve kemiklerde yaklaşık olarak yarı ömrü sırasıyla 30 gün ve 27 yıldır (ATSDR, 2005). Mesleki maruziyete uğramış işçilerle yapılan çalışmalarda tetraetil kurşunun, dietil kurşun, etil kurşun ve inorganik kurşun olarak idrar yoluyla atıldığı belirlenmiştir (Turlakiewicz ve Chmielnicka, 1985; Zhang ve ark., 1994; Vural ve Duydu, 1995). İşçilerde tetraalkil kurşun bileşiklerine maruziyetin ardından karaciğer, böbrek ve beyinlerinde metabolitleri bulunmuş aynı zamanda bu metabolitler mesleki maruziyete uğramamış kişilerin beyin dokularında da bulunmuştur (Bolanowska ve ark., 1967; Nielsen ve Gregersen, 1978).

Parçacıklı aerosolleri içeren havada bulunan inorganik kurşun, aerosolün inhalasyonu sonucu soluk borusunda depolanabilir ve bu aerosolün miktarı ve bıraktığı kalıntı inhale edilen parçacıkların büyüklüğüne, solunum şekline (burun solunumu veya ağız solunumu), havadaki geometrisine ve soluk borusundaki hava-buhar hızına bağlı olarak değişir. Kurşunun emilimi parçacık büyüklüğü ve çözünürlüğü ile de ilişkilidir (James ve ark., 1994). Radyoaktif (^{203}Pb) tetraetil kurşun buharına maruziyetin (1-2 dakika boyunca yaklaşık olarak 1 mg/m^3) ardından dört kadında, inhale edilmiş ^{203}Pb 'nin %37'si ilk olarak soluk borusunda birikmiş ve 48 saatin ardından da yaklaşık olarak %20'si ekshale edilmiştir (Heard ve ark., 1979). Maruziyetten bir saat sonra, ^{203}Pb 'nin yaklaşık %50'si karaciğere geçerken kalanı da vücudun tamamına dağılır. Yapılan benzer bir deneyde inhale edilmiş tetraetil kurşunun (^{203}Pb) %51'i esas olarak soluk borusunda birikirken yaklaşık %40'luk kısmı 48 saatlik süre içerisinde ekshale olmuştur.

İNorganik kurşunun gastrointestinal sistemden emilim hızı ve miktarı bireye (yaş, diyet, hamilelik durumu, besindeki demir ve kalsiyum miktarı gibi) ve kurşunun fizikokimyasal özelliklerine (parçacık minerolojisi, çözünürlük ve

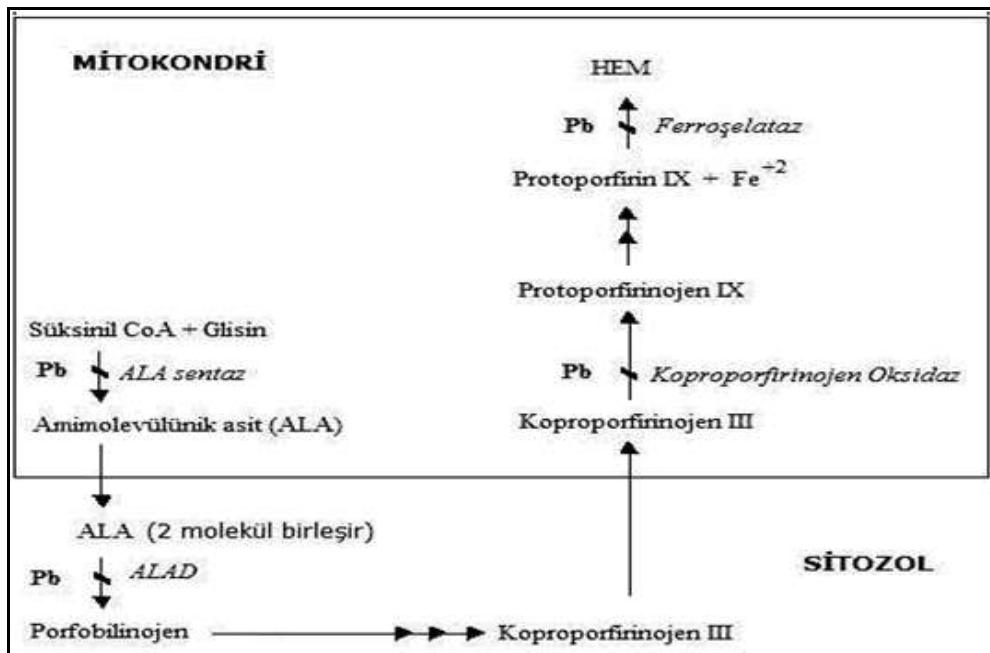
kurşunun türü) bağlıdır (ATSDR, 2005). İnorganik kurşun bileşiklerinin dermal emilimi genellikle inhalasyon veya oral yolla maruziyetle kıyaslandığında çok daha azdır. Yapılan bir çalışmada sekiz erkek gönüllüye 12 saat boyunca ²⁰³Pb etiketli kurşun asetatın kozmetik olarak hazırlanmış şekli (0,1 ml krem içinde 0,12 mg Pb veya 0,1 g krem içinde 0,18 mg Pb) deriye uygulandıktan sonra, emilim tüm vücutta, idrarda ve kanda \leq %0,3 ölçülmüş ve bu gibi karışımların normal kullanımı süresince emiliminin %0,06 olduğu tahmin edilmiştir. Emilimin çoğu 12 saatlik maruziyet içinde gerçekleşmiştir (Moore ve ark., 1980).

Tavşan ve farelerde, inorganik ve organik kurşun tuzları ile tetraalkil kurşun bileşiklerinin dermal yolla hızlıca ve geniş ölçüde emildiği gösterilmiş ve tetraetil kurşunun, kurşun asetata nazaran ratların derilerinden daha fazla emildiği belirlenmiştir (Laug ve Kunze, 1948). Dermal yolla emilim oranları insanlar ve guinea domuzları için; tetrabutyl kurşun > kurşun nuolat (kurşun linoleik ve oleik asit karışımı) > kurşun naftanat > kurşun asetat > kurşun oksit şeklinde sıralanmıştır (Bress ve Bidanset, 1991). Kandaki kurşun düzeyi; yaşa, fizyolojik duruma (hamilelik, emzirme dönemi, menapoz) ve maruziyeti etkileyen birçok faktöre göre farklılık gösterir. Yetişkinler arasında kandaki kurşun düzeyi 60 yaş ve üzeridekilerde en fazla stratumda olup bu kişilerde kandan kurşunun atılım yarıömrü yaklaşık 30 gün kadardır (Griffin ve ark., 1975; Rabinowitz ve ark., 1976; Chamberlain ve ark., 1978).

İnsanlarda organik kurşunun maruziyetten sonra vücuttaki dağılımıyla ilgili bilgiler henüz yeterli değildir. Tetraetil veya tetrametil kurşuna (1 mg/m³) yaklaşık 1-2 dakikalık maruziyetten bir saat sonra bu kurşunun %50'si karaciğerde ve %5'i böbrekte birikir, kalanı ise vücudun diğer kısımlarına dağılır (Heard ve ark., 1979). %31 oranında tetraetil kurşun içeren (ağırlıkça %17,6) çözücüye kaza sonucu solunum yoluyla maruz kalan kadın ve erkekte dokulardaki kurşun düzeyleri en yüksekten en düşüğe doğru sıralanmış ve karaciğer, böbrek, beyin, pankreas, kas ve kalp olarak belirtilmiştir. Bir başka olguda; %59 tetraetil kurşun içeren bir kimyasala maruz kalan kişide, kurşun düzeyi en fazla karaciğerde bulunmuş böbrek, pankreas, beyin ve kalp karaciğeri takip eden organlar olmuştur (Bolanowska ve ark., 1967).

1.2.1.1.4. Kurşun Toksikitesi

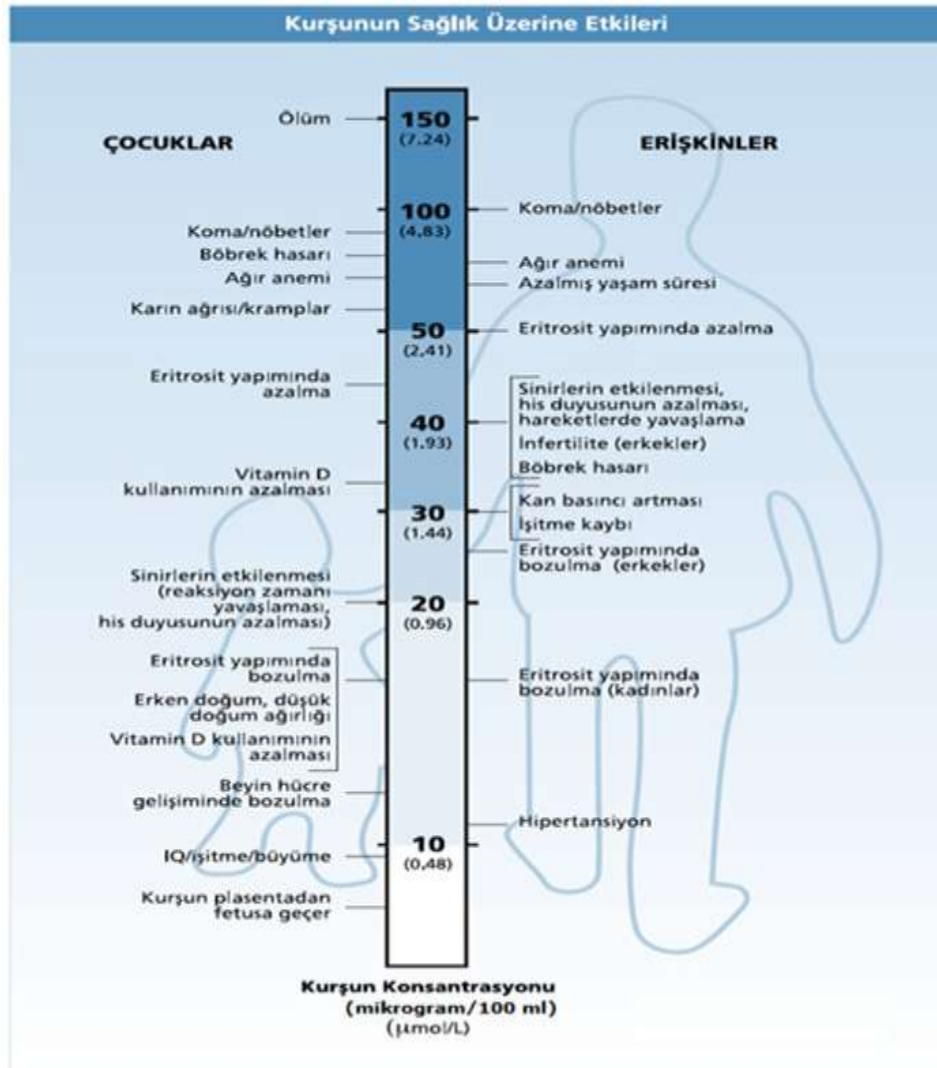
Kurşunun ana etki mekanizması oksitatif hasar geliştirmekle olur ve serbest radikallerin miktarını artırması ve hasara cevap verebilecek antioksidanların miktarını azaltmasıyla kendini gösterir. Kurşun zehirlenmesinin patogenezi çok faktörlüdür (enzim aktivasyonunun kesilmesi, iz minerallerin emiliminin engellenmesi, sülfidrilli proteinlerin bağlanması, kalsiyum homeostazının değiştirilmesi ve vücutta bulunan sülfidrilli antioksidanların miktarının azaltılması gibi). Kurşunun en önemli etkisi dolaşımda çok fazla bulunduğu hematopoetik sistem üzerinedir; kurşun alyuvarların zar bütünlüğünü bozup parçalanmalarını kolaylaştırmakta ve ömrünü kısaltmakta, “Hem” sentezinin çeşitli aşamalarını inhibe ederek sentezde önemli rol oynayan enzimlerden biri olan ALA sentaz, δ -aminolevülinik asit dehidrataz (ALA-D), koproporfirinojen oksidaz ile ferroşelataz enzimini inhibe etmekte ve ayrıca mikrositer anemiye neden olmaktadır (Şekil 1.11) (WHO, 1995; Ercal ve ark., 2001; Vural, 2005; Çaylak ve Halifeoğlu, 2010).



Şekil 1.11. Hem inhibisyon basamakları (Çaylak ve Halifeoğlu, 2010)

Kurşun insanlarda birçok enzim sistemini inhibe ettiği gibi laboratuvar hayvanlarında da merkezi ve periferik sinir sistemi, hematopoietik, renal, kalp-damar sistemi, kadın ve erkek üreme sistemi, endokrin ve iskelet sistemi gibi birçok

fizyolojik sistem üzerinde fizikokimyasal, biyokimyasal ve davranışsal fonksiyon bozukluklarına neden olduğu bildirilmiştir (Solliway ve ark., 1996; Hsu ve Guo, 2002; Kalia ve Flora, 2005). Etkiler yaş ve maruz kalınan doza bağlı olmakla birlikte bilişsel ve davranışsal etkilerinden dolayı toplumlarda en fazla çocuklar üzerinde durulmaktadır. Klinik olarak çocuklarda sinirsel gelişimi etkilemekte; yetişkinlerde ise hipertansiyona, akut olarak gastrointestinal toksisite belirtilerine; kronik olarak ise kan hücreleri ve sinir sisteminde hasara neden olmaktadır. Çocuklarda akut olarak ensefalopati ile yüksek düzeylerde nefropati, nöropati, kafa içi basınç artışı, konvülsiyon ve ölüme sebebiyet verebilmektedir. Vücutta biriken kurşunun birçok gizli nörolojik hasara, düşük akademik başarıya, davranış bozukluklarına, işitme azlığına ve zeka kaybına yol açtığı gösterilmiştir (WHO, 1995) (Şekil 1.12).



Şekil 1.12. Çocuklar ve erişkinlerde kan kurşun seviyesine göre etkiler (Ellenhorn's Medical Toxicology Matthew J. Ellenhorn, 1997)

Kurşun bazlı boyalar ve ev tozları gibi farklı çevresel kaynaklara bağlı olarak düşük dozda maruziyet ile de bu etkilerin ortaya çıkabileceği bilinmektedir. Havada, gıdada ve suda bulunan kurşunun benzin katkı maddesi olarak kullanımından vazgeçilmesi; musluk sularındaki oranın da kurşunlu boruların büyük ölçüde kullanılmamasından dolayı azaldığı bilinmektedir (Goyer, 1997) (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Farklı ülkelerde çocuk ve yetişkinlerde kan-kurşun düzeyi (Fewtrell ve ark., 2004).

Alan	Araştırma yapılan ülkeler	Kan- kurşun düzeyi (µg/dl)	
		Çocuk	Yetişkin
Afrika	Nijerya,	11,1	11,6
	Güney Afrika	9,8	10,4
Amerika	Kanada, USA	2,2	1,7
	Arjantin, Brezilya, Şili	8,5	7,0
	Jamaika, Meksika		
	Uruguay, Venezuela		
	Ekvator, Nikaragua, Peru	9,0	10,8
Doğu Akdeniz	Suudi Arabistan	6,8	6,8
	Mısır, Morokko, Pakistan	15,4	15,4
Avrupa	Danimarka, Fransa, Almanya,	3,5	3,7
	Yunanistan, İsrail, İsveç		
	Portekiz, Türkiye, Yugoslavya	5,8	9,2
	Bulgaristan, Rusya Federasyonu	6,7	6,7
Güney Batı Asya	Endonezya, Tailand	7,4	7,4
	Bangladeş, Hindistan	7,4	9,8
Batı Pasifik	Australya, Japonya, Yeni Zelanda, Singapur	2,7	2,7
	Çin, Filipinler, Kore	6,6	3,6

1.2.1.1.5. Kurşunun Üreme Sistemine ve Fötal Gelişime Etkileri

İsviçre’de bir kurşun işleme fabrikasında çalışan kadın işçilerle yapılan bir araştırmada gebelik boyunca çalışmaya devam edenlerin %13,9’unda ve gebelik öncesinde çalışıp devamında fabrikanın 10 km kadar yakınında yaşayanların gebeliğinin %17’si düşükle sonuçlanmıştır ve işçilerde kendiliğinden düşük sıklığında artış belirlenmiştir (Nordstrom ve ark., 1979).

Fötal kurşun maruziyeti önemli bir sağlık sorunu olup bunun nedenlerinden birisi de annenin iskeletindeki depolardan hamilelik sırasında kurşun salınımının artması (Hu ve Hernandez-Avila, 2002; Gulson ve ark., 2003) ve fötal sinir sisteminin nörotoksinlere olan duyarlılığıdır (Mendola ve ark., 2002). Fötusun, annenin kemiklerinden salınan kurşundan korunabilmesi için kalsiyum desteğinin faydalı olacağı ileri sürülmüş (Janakiraman ve ark., 2003; Gulson ve ark., 2004) ve yapılan diğer çalışmalarda kurşunun sinir sistemini, farklılaşma (Petit ve LeBoutillier, 1979; Alfano ve Petit, 1982), miyelinizasyon (Mendola ve ark., 2002) ve sinaptojenez (Johnston ve Goldstein, 1998) evrelerinde ilk trimestr süresince etkilediği bildirilmiştir. Epidemiyolojik çalışmalar ile prenatal kurşun maruziyeti ile yenidoğanın nörolojik gelişimi arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (Bellinger ve ark., 1987; Dietrich ve ark., 1987; Shen ve ark., 1998). Kurşunun anne ve fötus arasındaki toksikokinetiği henüz net olarak anlaşılammış, annenin PbB düzeyinin fötal kurşun maruziyeti için doğru bir gösterge olmadığı düşünülmüştür (Hu ve ark., 2006).

Kurşun maruziyetinin gelişim aşamasındaki organizmalarda nörodavranışsal değişikliklere yol açtığı, diğer çalışmalarda ise maruziyetin doğum ağırlığı ve gebelik süresini azalttığı (Jelliffe-Pawlowski ve ark., 2006), çocuklarda boyda kısalma (Schwartz ve ark., 1986; Sanín ve ark., 2001; Hernández-Avila ve ark., 2002) ve kız çocuklarda gecikmiş seksüel maturasyona (Selevan ve ark., 2003; Wu ve ark., 2003) neden olduğu görülmüş ve bu sonuçlar hayvan deneyleriyle de desteklenmiştir (Grant ve ark., 1980; Ronis ve ark., 2001; Dearth ve ark., 2002). Ratlarla yapılan bir araştırmada, kurşunun uzunlamasına kemik gelişimini ve pubertal periyod boyunca kemik direncini azalttığı belirlenmiştir (Ronis ve ark., 2001).

1.2.1.1.6. Kurşunun Hücresel Antioksidan Enzim Sistemlerine Etkisi

Kurşun zehirlenmesinin patogenezi birçok faktörün etkisinde olup kurşunun enzim aktivasyonunu ve iz minerallerin emilimini yarışmalı inhibisyonla engellemesi, sülfidrilli proteinlere bağlanması, kalsiyum homeostazının bozulması ve canlı için gerekli olan sülfidrilli antioksidanların düzeyinin azaltılması bunlar arasında sıralanabilir (Ercal ve ark., 2001). Kurşuna maruziyet söz konusu olan sıçan ve insanlarda ALAD, Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD), glutatyon (GSH),

glutasyon redüktaz (GR), glutasyon-S-transferaz (GST), glutasyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidanların etkilenmeleri üzerine birçok çalışmanın yapıldığı bilinmektedir (Costa ve ark., 1997; Gurer ve Ercal, 2000; Ercal ve ark., 2001; Kalia ve Flora, 2005).

1.2.1.1.7. Kurşunun Organizma Üzerine Etkisi, Tanısı ve Tedavisi

Kurşun zehirlenmesinin tanısı belirtileri özel olmadığından zordur. Erişkin hastada kolik ağrısı, kabızlık, anoreksi, uykusuzluk ve huzursuzluk; bazen de düşük hemogloblin düzeyi ve serum bilürubin düzeyinde artışın ortaya çıkmasıyla tanı konulabilir (WHO, 1995; Kaya ve Akar, 1998).

Kurşuna maruziyet söz konusu olan bir işte çalışma öyküsü ile klinik belirti ve bulgular önemli olmakla birlikte atomik absorpsiyon spektrometrisi yöntemi kullanılarak PbB düzeyinin belirlenmesi ile kesin tanı konulur. Çocuklarda ve hamile kadınlarda 10 µg/dl, yetişkinlerde 40 µg/dl'nin üstündeki PbB düzeyi anlamlı kabul edilmektedir. Ferroşelataz enzimi protoporfirin-IX (PP) içine demirin (Fe⁺²) girmesini katalize etmekte ve kurşun tarafından inhibe edilmektedir. Dolayısı ile demir yerine çinko bağlanmakta ve alyuvar içi çinko-protoporfirin (ZnPP) düzeyi ortamda yükselmektedir. PbB düzeyi 35 µg/dl'yi aştığı durumlarda ZnPP düzeyleri akut kurşun zehirlenmesinin tanısında değerlidir. ZnPP için eşik tanı değeri yetişkinler için 30 µg/dl; çocuklar için ise 15 µg/dl'dir (WHO, 1995; ATSDR, 2005; Petrone, 2007). Kadınlarda demir miktarının daha az olması sebebiyle daha düşük PbB düzeyinde ZnPP'de artış gözlenir (Petrone, 2007). Bununla birlikte, porfiriyalar karaciğer sirozu, demir eksikliği, alkolizm gibi etkenlerle de hem sentezi aynı etkiye uğradığından ZnPP'nin tanıda kullanımı sınırlanmaktadır (Somashekaraiyah ve ark., 1990).

Kurşuna maruziyette kullanılan ve en güçlü biyomarker olan PbB düzeyidir; ancak Çevre Koruma Ajansı (Environmental Protection Agency-EPA) kurşun için toksik bir eşik düzeyin olmadığını duyurmuştur. Bu da vücuda zarar vermeyen miktarda kurşun seviyesinin olmadığı anlamına gelir. Yine EPA su ile alınabilecek en fazla PbB düzeyinin sıfır olması gerektiğini de belirtmiştir (EPA, 2008).

Kurşun zehirlenmesinde en çok etkilenen hücreler alyuvarlardır. Yapılan in vitro çalışmalar kurşunun alyuvarlarda oksidatif stresi indüklediğini göstermiş (Gurer ve Ercal, 2000; Ercal ve ark., 2001) ve maruziyet söz konusu olan işçilerin alyuvarlarında belirlenmiştir (Solliway ve ark., 1996; Marchartova ve ark., 2000). Alyuvarlar oksidatif hasara karşı; oksijenle yüksek düzeyde muamele olmaları, içeriğindeki hemoglobinin kolayca otooksidasyona uğraması, membranlarının lipid peroksidasyona duyarlı olması ve hasarlı yapıtaşlarını tamir etme yeteneklerinin sınırlı olması nedeniyle oldukça duyarlıdır. Kurşun hem ve hemoglobin sentezini önleyerek alyuvar morfolojisini ve ömrünü değiştirerek etkili olur (Warren ve ark., 1998; Gurer ve Ercal, 2000). PbB düzeyi 20 µg/dl'nin üstünde olduğunda ALAD aktivitesinin %50 inhibisyona uğramasına rağmen ALAD ile PbB düzeyi arasında pozitif korelasyon görülmediğinden ALAD aktivite ölçümü kurşun zehirlenmesinin tanısında kullanılmamaktadır (Philip ve Gerson, 1994). ALAD'ın inhibisyonu sonucunda ortamda biriken aminolevülinik asitin (ALA) idrar düzeylerinin ölçümü, sıklıkla tanıda kullanılmakla birlikte sadece yetişkinlerde 35 µg/dl'nin; çocuklarda ise 25-75 µg/dl'nin üzerindeki PbB düzeyinde artış gösterdiğinden etkili olmakta ve düşük dozda kurşuna maruziyetin göstergesi olarak kullanılacak bir biyomarker henüz bulunmamaktadır (Somashekaraiyah ve ark., 1990).

Kurşun yine pirimidin 5'-nükleotidazın aktivitesini azaltarak alyuvarlardaki pirimidin nükleotidlerinin miktarında artışa ve olgunlaşmalarını engelleyerek de mikrositer anemiye yol açar. Mikroskobik incelemede alyuvarlarda bazofilik cisimciklerin görülmesi ve hemoliz tanıya yardımcı olabilirken benzen ve arsenik gibi diğer zehirlenme etkenleri ve enzim eksikliğinde de benzer etkiler görülebilir. Yetişkinlerde 50 µg/dl ve çocuklarda ise 25-40 µg/dl PbB düzeyinde ancak bazofilik cisimcikler ile mikrositer, normositer ya da hipokromik anemi görülmektedir (Paglia, 1977). PbB düzeyi yetişkinde 50 µg/dl; çocukta ise 40 µg/dl'yi geçmedikçe kan hemoglobin düzeyi düşmeye başlamamaktadır (ATSDR, 2005).

Gıda ile alınan D vitamininin aktif şekli olan 1,25-dihidroksivitamin D'ye dönüşümü kurşun tarafından engellenmektedir. Yapılan çalışmada bu etkinin anlamlı PbB düzeyi çocuklarda 33-120 µg/dl arasında görüldüğü hatta 12 µg/dl kadar düşük

değerde bile belirlenebildiği gösterilmiştir (Mahafey, 1982). 62 µg/dl'nin üzerindeki PbB düzeyinde total ve iyonize serum kalsiyum değerleri düşüş gösterirken parathormonun yükseldiği görülmüştür (Rosen ve ark., 1980).

Kurşuna akut maruziyette geri dönüşümlü olarak karaciğer fonksiyonlarında bozukluk (AST-Aspartat aminotransferaz ve ALT-alanin aminotransferaz'da artış), kronik maruziyette ise böbreklerde hiperürisemi ve kreatinin klerensinde azalma olabilir (Pollock ve Ibels, 1988; WHO, 2005) (Çizelge 1.3). PbB değerlerinin 10 µg/dl'nin altında olduğu düzeylerde bile normale göre her 10 kat artışta serum kreatinin değerinin 0,14 mg/dl kadar arttığı görülmüştür (Pollock ve Ibels, 1988). Kurşuna bağlı proksimal tübüler hasar, glomerüler skleroz ve interstisyel fibroz gibi böbrek rahatsızlıkları özellikle meslekleri nedeniyle kurşuna maruz kalan işçilerde görülmekte ve belirtileri proteinüri, glukoz ve organik aniyonların taşınmasında bozulma ve glomerüler filtrasyon oranında azalma meydana getirebilmesidir (Loghman-Adham, 1997; de Burbure ve ark., 2006).

Yükselmiş PbB düzeyi (20-29 µg/dl) ile tüm dolaşım ve kalp-damar sistemi hastalıklarına bağlı ölüm oranlarında önemli artış belirlenmiş (Fanning, 1988), klinik ve populasyon çalışmalarında mesleki olarak kurşuna maruz kalmış bireylerde hipertansiyon, serebrovasküler ve kalp-damar sistemine ait hastalıklarla ilgili korelasyon bulunmuş (Schober ve ark., 2006; Lin ve ark., 2008) ve uzun süreli düşük dozda kurşuna maruziyetin insan ve hayvanlarda hipertansiyona neden olduğu gösterilmiştir (Staessen, 1994). Kurşun ile artan hipertansiyonun etki mekanizmasının endotelyum kaynaklı nitrik oksidin inaktivasyonunun arttırılmasından ve reaktif oksijen türevlerinin (ROS) oluşturulmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ding ve arkadaşları (2000) ise hipertansiyonun kurşunun oluşturduğu hidroksil radikallerinin endotelyal disfonksiyona neden olmasıyla olduğunu belirtmişlerdir. Kurşunun kadın ve erkek üreme sisteminde toksik etkilerini gösteren çalışmalar da yapılmış; kurşunla ilgili işlerde çalışan kadınlarda spontan abortus, ölü doğum ve düşük ağırlıklı çocuk doğurma sıklığında artış belirlenmiştir. Erkeklerde ise sperm ve testisler üzerinde toksik etki, hiperspermi, teratospermi, astenospermi ve hipogonadizm oluşturabilmektedir (Grandjean, 1992).

Çizelge 1.3. Kurşun zehirlenmesinde laboratuvar bulguları (Çaylak ve Halifeoğlu, 2010)

Bulgular	Özellikler
↓ Alyuvar ALAD	En düşük 3 µg/dl başlamak üzere PbB ile ters orantılıdır
↑ İdrar ALA	Çocuklarda 25 µg/dl, kadınlarda 35 µg/dl ve erkeklerde 45 µg/dl PbB'den sonra artış gösterir
↑ Alyuvar protoporfirin (PP) veya ZnPP	Yetişkinlerde 30 µg/dl ve çocuklarda ise 15 µg/dl PbB'nin altında duyarlılığı düşüktür
Kan hücreleri sayımı	Bazofilik cisimciklerle karakterize normokromik veya hipokromik anemi, retikülosit miktarında yükselme (tüm değerler 50 µg/dl ve üzerindeki PbB'de görülür)
Akut kurşun zehirlenmesi	Yüksek BUN (idrar üre nitrojeni), serum kreatinin, serum ürik asit ve idrarda aminoasit, glukoz ve fosfat miktarları

ALA aminolevütünik asit, ALAD ALA dehidratöz,

Kurşun Uluslararası Kanser Araştırma Merkezinin (IARC) insanlar için muhtemel karsinojen olarak değerlendirilmiş (Rousseau ve ark., 2005) ve insanlarda sigara içimi ile kurşuna maruziyet sonucunda akciğer kanseri ve buna bağlı olarak gelişen böbrek, mide ve idrar kesesi kanserleri bildirilmiştir (Fu ve Boffetta, 1995).

Tedavi (T.C.S.B., 2006):

Acil ve Destekleyici Tedavi: Gerekliyse temel ve ileri yaşam desteği sağlanmalı, karın krampları için spazm çözücü ilaçlar verilebilir.

Özgül İlaç-Antidot: Kan kurşun düzeyi 45 µg/dl olan yetişkin ve çocuk hastalarda şelasyon tedavisi uygulanmalıdır. Şelasyon yataklı tedavi kurumlarında yapılmalıdır. Kullanılacak tedavi protokolünün seçimi zehirlenmenin ağırlığına göre yapılır:

- **Kan kurşun düzeyi 45 µg/dl üzerinde olan ve belirtileri olmayan çocukta;** ağız yoluyla Dimerkaptosüksinik asit (DMSA, Succinaptal® 200 mg) 10 mg/kg ya da 350 mg/m² dozda, 8 saatte bir, 5 gün boyunca verildikten sonra aynı doz 2 hafta süreyle 12 saatte bir verilerek sürdürülür.

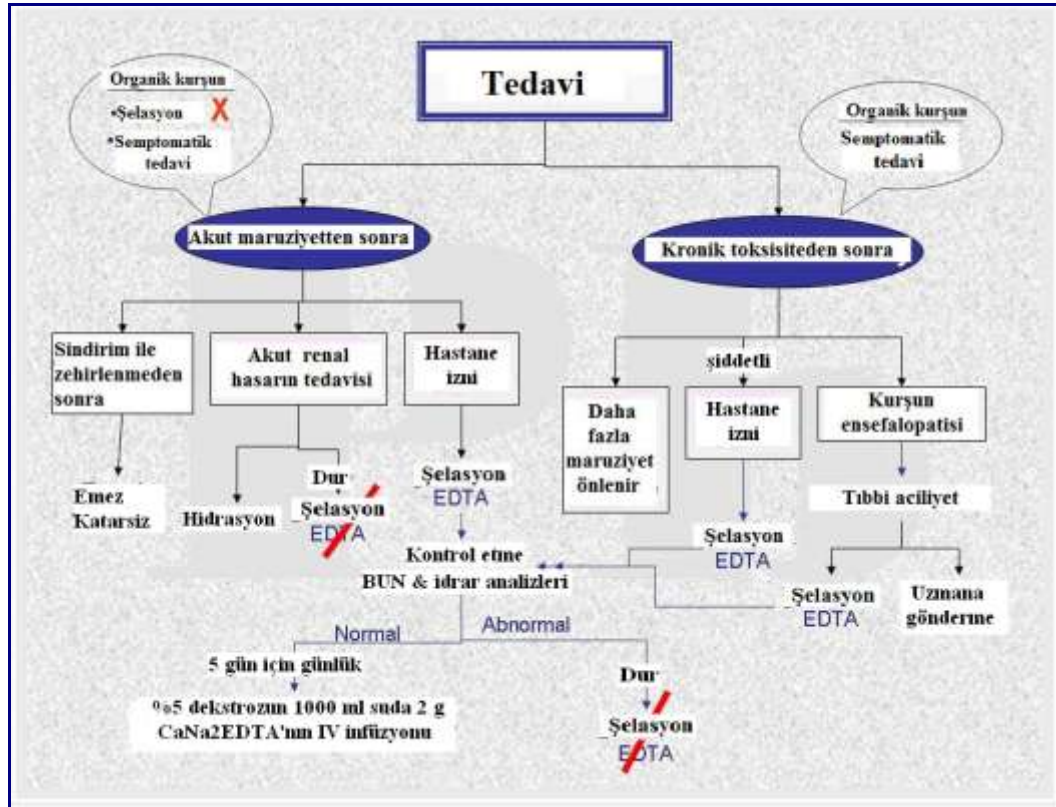
- **Kan kurşun düzeyi 80-100 µg/dl arasında olan, ensefalopati ve kusması olmayan yetişkinde** DMSA 30 mg/kg dozda, 8 saatte bir 5 gün boyunca verildikten sonra 20 mg/kg, 12 saatte bir 2 hafta süreyle verilir.
- **Belirtileri olan ancak ensefalopatisi olmayan yetişkin ve çocukta** DMSA ağız yoluyla, yukarıda belirtilen dozlarda kullanılır. Bu olgularda DMSA yerine Kalsiyum disodyumEDTA(Ca EDTA, Libenta® ampul, % 20'lik, 400 mg/2ml), yetişkinde 30-50 mg/kg/gün, çocukta 20-30 mg/kg (1000-1500 mg/m²) ven içine yavaş infüzyon ya da kas içine derin enjeksiyonla 4-8 saat arayla 5 güne kadar verilir.
- **Ensefalopatisi olanlarda** British anti-Lewisite (BAL, dimerkaprol) yetişkinde 4 mg/kg, çocukta 75 mg/m² kas içine derin enjeksiyonla verilir. BAL 2 gün boyunca 4 saat arayla, daha sonra 3 gün boyunca 4-6 saat arayla, sonraki 7 gün boyunca 6 saat arayla verilir. BAL'ın ilk dozundan 4 saat sonra CaEDTA yukarıda belirtilen dozlarda tedaviye eklenir.
- **DMSA'nın kullanılmadığı kurşun zehirlenmesinde** Penisillamin (Metalcaptase® 300 film kaplı tablet, 300 mg penisillamin) ağız yoluyla günde dört kez 250 mg, 5 gün süreyle uygulanır.

Arındırma: Hastanın kurşun ile temasının durdurulması, kurşun sindirim kanalındaysa mide yıkama ya da cerrahi yolla uzaklaştırılması gerekir. Radyolojik olarak görülüyorsa Golytely® Bağırsak Temizleme Tozu ile tüm bağırsak yıkaması yapılır. Etkinliği kesin olmamakla birlikte, ayakta karın grafisinde kurşun parçacıkları görülüyorsa kurşun alındıktan sonraki bir saat içinde aktif kömür ve katartik verilebilir (T.C.S.B., 2006) (Şekil 1.13).

1.2.1.1.8. Kurşunun Vücuttan Uzaklaştırılması

Emilen kurşun maruziyet yolundan bağımsız ve esasen idrar ve feçes, daha az oranda da epitelyum deskuamasyonu, ter, tükürük, saç ve tırnaklar yoluyla, ayrıca kadınlarda

menstruasyon ve emzirme sırasında sütle vücuttan atılır (Griffin ve ark., 1975; Rabinowitz ve ark., 1976; Chamberlain ve ark., 1978; Kehoe, 1987; Stauber ve ark., 1994).



Şekil 1.13. Kurşuna akut ve kronik maruziyette tedavi planı (<http://com-med.ikalogic.com>)

1.2.1.1.9. Kurşunun İz Elementlerle Etkileşimi

Kurşunun gastrointestinal kanaldan emilimi beslenme durumuna ve yaşa bağlı olarak değişmektedir. Beslenmede kalsiyum, demir, çinko ve bakır gibi esansiyel metallerin noksanlığı kurşun emilimini ve toksisitesini artırır. Yapılan çalışmalarda kurşun toksisitesine en fazla etki eden metalin kalsiyum olduğu bulunmuş ve bu konu ile ilgili birçok görüş ileri sürülmüştür. Goyer ve Rhyne (1971) kurşun ve kalsiyumun emiliminin ve vücuda dağılımının aynı mekanizma ile gerçekleştiğini söylemişlerdir. Gıda ile fazla miktarda kalsiyum alınması hayvanlarda ve insanda kurşun emilimini azaltmaktadır (Bogden ve ark., 1992). Ayrıca magnezyum, fosfat, alkol ve diyetin yağ oranının yüksek olması da kurşun emilim oranını düşürmektedir (Barltrop ve Khoo, 1975). Ratlar ile yapılan bir çalışmada düşük kalsiyum içeren diyetin kan ve

dokulardaki kurşun düzeyini artırdığı, bu artışın böbrekte kemiğe göre daha fazla olduğu bildirilmiştir (Six ve Goyer, 1970). Kurşun, sinirsel etkisini pikomolar düzeylerde dahi kalsiyumla yarışmalı olarak serebellumda fosfokinaz C için bağlanma yerlerini taklit ederek etki göstermesi ile gerçekleştirmektedir. Bu durum hücrelere kalsiyum girişini, nöronal fonksiyonları ve mitokondrilerin yapısal özelliklerini değiştirerek, hücreyel solunumu, kalsiyuma bağlı hücreyel reaksiyonları ve nöronal sinyali engellemektedir (Bressler ve ark., 1999; Garza ve ark., 2006).

Yapılan çalışmalarda kurşunun çinko atılımını ve çinko noksanlığının kurşun emilimini artırdığı belirlenmiştir (Victory ve ark., 1982; Goyer, 1995). PbB düzeyi ile çinko taşıyan bir enzim olan δ -aminolevülinik asid aktivitesi arasında ilişki olması, kurşunun bu enzimde yer alan çinkonun yerine geçtiğini düşündürmekte ve şelasyon tedavisinden sonra oral yolla çinko alınması δ -aminolevülinik asid dehidrataz aktivitesini yükseltmektedir (Dutkiewicz ve ark., 1979).

Kurşun ile bakır arasındaki etkileşim insan sütünde belirlenmiştir. Yenidoğan gelişimi için çok önemli olmasına karşın süt; demir ve bakırı düşük düzeylerde içermektedir. İnsan sütünde kurşun düzeyi yüksek ise bakır düzeyi azalmakta (Kies ve Umoren, 1989) ve kurşun maruziyeti olan ratlarda hepatic bakır düzeyi düşmektedir (Dhawan ve ark., 1995). Kemiricilerde kurşun maruziyetinin plazmada bakır ve serüloplazmin düzeylerini azalttığı bildirilmiştir (Petering, 1974).

Yapılan çalışmalarda demir eksikliğinin de çocuklarda ve deney hayvanlarında sindirim kanalından kurşun emilimini artırdığı gösterilmiş (Six ve Goyer, 1972; Dietrich, 1991), bu durumun intestinal ferritinle ilişkili olduğu (Flanagan, 1989), kurşunun ferritinin bağlanma bölgeleri için demirle yarıştığı bildirilmiştir (Kochen ve Greener, 1975). Demir eksikliği ve kurşun zehirlenmesi dünyanın birçok bölgesinde yeni doğanlarda ve çocuklarda yaygın olup anemiye sebep olduğu bilinmektedir. İlişkilerinin yapısı tamamen açıklanamamış olsa da, yaygın bir demir-kurşun taşıyıcısının tanımlanması ve çocuklar arasındaki epidemiyolojik çalışmalar demir noksanlığının kurşun zehirlenmesine karşı hassasiyeti artırabileceğini belirgin bir şekilde desteklemektedir. Son zamanlarda

yapılan insan çalışmaları yüksek demir alımı ve yeterli demir depolarının, kurşun zehirlenmesi riskini azaltabileceğini desteklemektedir (Kwong ve ark., 2004). Hem demir eksikliği hem de kurşun zehirlenmesi çocuk gelişimini ve insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Bağırsaklarda demirin kurşun emilimini engellediği bilinmektedir (Ziegler ve ark., 1978). Demir alımının artması ve demir-dolu durumun çocuklarda kurşun emilimini azaltabildiği yönündeki artan kanıt (Hammad ve ark., 1996; Kim ve ark., 2003, Wright ve ark., 2003, Wolf ve ark., 2003) sonucu demir noksanlığının giderilmesi, insanların kurşuna maruziyetini önlemek için potansiyel bir halk sağlığı uygulaması olarak ifade edilebilir (Mahaffey, 1995; CDC, 2002a).

1.2.2. İz Elementler

1.2.2.1. Demir

Demirin biyolojik önemi eski çağlardan beri bilinmekte ve son yıllarda hücresel düzeyde yeni proteinlerin keşfi ile demir metabolizmasının moleküler kontrolü, demirin emilimi, depolanması ve organizmadaki döngüsünün moleküler mekanizması ile ilgili çok büyük ilerlemeler kaydedilmiştir (Ganz, 2004).

Demir organizmada esas olarak enerji metabolizmasında yer alarak hemoglobin ve miyoglobin, sitokromlar, NADH dehidrojenaz, lipoksijenaz, süperoksit dismutaz, ribonükleotid redüktaz, yağ asidi desaturaz ve fosfatazlar gibi birçok protein ve enzimin yapısında esansiyel bileşen olarak bulunarak elektron alıp verme özelliği sebebiyle dokulara oksijen taşınması ve depolanması, elektron transferi, enerji üretimi, prostaglandin sentezi, serbest radikal süpürücüsü, vücut sıcaklığında sıvı olan yağ asitlerinin sentezi, sinyal iletimi, DNA, RNA, protein sentezi ve pekçok yaşamsal önemi olan fonksiyon için gereklidir (Fox, 1997; Ganz, 2004). Kolaylıkla ferröz (Fe^{++}) ve ferrik (Fe^{+++}) şeklinde değişebilen redoks kimyası ile demir metabolizmasındaki değişiklikler insan sağlığını önemli derecede etkilemektedir (Ponka ve ark., 1988; Andrews ve Bridges, 1998; Ponka, 1997; McKee ve ark., 2000; Ganz, 2004 ve 2006; Beutler, 2006).

Demir eksikliğinin başlıca nedenleri arasında diyetle alınan demirle büyüme ve metabolik fonksiyonlar için gerekli demir ihtiyacı arasındaki dengesizliktir. Yetişkinlerde alyuvar yapımı için gereken demirin %95'i yaşlı alyuvarların yıkımından sağlanırken çocuklarda hızlı büyüme ve gelişme nedeniyle yıkılan alyuvarlardan sağlanan demir miktarı sadece %70'tir. Bu dönemde eritropoez ve diğer yaşamsal fonksiyonlar için gerekli olan demirin %30'u diyetle alınması gerektiğinden, gıda demir eksikliği daha büyük oranda demir eksikliğine neden olabilmektedir (Andrews ve Bridges, 1998). WHO'nun verilerine göre demir eksikliği prevalansının %30 olduğu tahmin edilmekte ve bu değerler bilinen en yaygın beslenme bozukluğu olan demir eksikliğinin ne derece önemli bir sağlık sorunu olduğunu ortaya koymaktadır (Walter ve ark., 1989; Dallman, 1990). Çocuklukta demir eksikliğinin en önemli etkilerinden biri, sonradan eksiklik giderilse dahi, senelerce devam edecek hatta erişkin yaşamına da yansiyacak mental defektlerin meydana gelişidir (Soemantri ve ark., 1985; Andrews ve Bridges, 1998). Yetişkin yaşamında demir eksikliği; iş performansında azalma ve üretim gücünde düşme ile ekonomik kayıplara neden olmakta, erken gebelik döneminde ise demir eksikliği; prematüre ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerin dünyaya gelmesine yol açmaktadır (Andrews ve Bridges, 1998).

Gelişmekte olan ülkelerde düşük proteinli diyetteki inorganik demirin tam emilmemesine bağlı olarak yüksek sıklıkta demir eksikliği görülürken (Cin ve ark., 1978; Andrews ve Bridges, 1998) gelişmiş ülkelerde etle beslenme oranının yüksek olması ve etle alınan hem proteinin çok daha yüksek oranda emilimi nedeniyle demir eksikliği görülme oranı azalmış (Andrews ve Bridges, 1998; Uzel ve Conrad, 1998) ve bu ülkelerde artan vücut demirinin zararlı etkileri tartışılmaya başlanmıştır. Demir fizyolojik olarak esansiyel fakat biyokimyasal olarak tehlikeli bir elementtir. Diyetle alınan demirin %10'u emilmekte fakat fazla demir organizmadan atılamamaktadır. Organizmada eğer kayıp yok ise ilerleyen yaşla birlikte demir depoları artar (Uysal, 1999). Fenton reaksiyonları demirin oksidan yıkımda rol aldığı reaksiyonlardır (Llalliweii, 1987; Saltman, 1989). Bu reaktif özelliğinden dolayı demir, organizmada hasar oluşturabildiğinden, canlılar esansiyel fonksiyonları yerine getirecek ama hasar oluşturmayacak kadar demiri alabilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir.

İnsanda demir yüklenmesi durumunda demir atılımını arttıran fizyolojik bir mekanizma bulunmadığından demir metabolizması sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (Ganz, 2004; Nemeth ve Ganz, 2006). Bu kontrol mekanizmasının bozulması durumunda veya dışarıdan parenteral demir veya kan alınmasında fazla demir dokularda birikecek ve reaktif oksijen radikallerini oluşturacaktır. Demir ihtiyacında veya alımında dalgalanmalar olsa bile plazmada ve ekstraselüler sıvıda demir düzeyi dar bir aralıkta tutulur. Bu durum demirin hücre içine veya dışına taşınması, emilimi, depolanması ve geri dönüşümünün sıkı bir şekilde düzenlenmesi ile sağlanır (Nemeth ve Ganz, 2006).

1.2.2.2. Demirin Vücutta Dağılımı

İnsanda toplam vücut demir miktarı ağırlık, hemoglobin düzeyi, cins ve yaşa bağlı olarak değişmekle birlikte tam zamanlı doğan bir bebekte 75 mg/kg vücut demiri bulunurken bir yaşında bu değer 40-50 mg/kg'a kadar düşer. Yetişkinde bu miktar daha düşüktür. Yetişkin erkekte 35-45 mg/kg ve premenopozal kadında ise yaklaşık 35 mg/kg kadar toplam vücut demiri vardır (Andrews, 1999). Demir metabolizması iki cins arasında farklılık göstermemesine rağmen normal değerler arasındaki farklılık kadınlarda demir eksikliğinin yaygın olarak görülmesi nedeniyledir (Neyzi ve Ertuğrul, 2000). Kimyasal özellikleri ve fonksiyonları esas alınarak belirlenen üç ana demir kompartmanı bulunmaktadır (Gümrük ve Altay, 1995) (Çizelge 1.4). Yapılan çalışmalar; hücrel ve anatomik lokalizasyonu belirlenemeyen, vücut demirinin %2,2'sini içeren labil havuz demiri adı verilen dördüncü bir kompartmanın varlığını göstermiştir (Fairbanks, 1994). Organizmada bulunan demir ortalama olarak hemoglobinde %70, ferritin ve hemosiderinde %25, miyoglobinde %3-4, transferrin %2, hücreler arası sıvıda %0,1, sitokromlarda %0,1, demir-enzim komplekslerinde %0,1 ve plazmada transferrine bağlı olarak %0,1'i bulunurken kalan demirin %20-30'u gerektiğinde kullanılmak üzere başlıca karaciğer ve retiküloendotelial sistem (RES) makrofajları olmak üzere depolanır (Andrews, 1999; Atanasiu ve ark., 2006).

Çizelge 1.4. Erişkin bireyde demir dağılımı

Kompartmanlar	Fe konsantrasyonu (mg/kg)	
	Erkek	Kadın
1- Fonksiyonel demir		
- Hemoglobin	31	28
- Miyoglobin	5	4
- Hem enzimleri	1	1
- Non-hem enzimler	1	1
2- Transport demiri		
- Transferrin	<1(0.2)	<1(0.2)
3- Depo demir		
- Ferritin	8	4
- Hemosiderin	4	2

Normal bir yetişkin bireyde toplam vücut demir miktarı yaklaşık olarak 4 g (3-5 g) kadardır (Hagar ve ark., 2002). İnsanlarda demir yaşlanan alyuvarlardan (~20 mg/gün) ve diğer kaynaklardan geri dönüşümlü olarak sıkı bir şekilde korunarak sağlanmaktadır. Dengeli beslenme ile gıdalarla günde ortalama olarak 20-25 mg demir alınmasına rağmen alınan demirin 1-2 mg'ı emilir. Yaşam döngüsünü tamamlamış alyuvarların parçalanması ile hergün yaklaşık 20 mg kadar demir açığa çıkarken bunun 2,5 mg kadarı tekrar hemoglobinin yapısına girer. Günlük demir kaybı ise sadece 1-2 mg demirin emilmesi ile karşılanacak kadar az miktarlardadır (Ganz, 2004 ve 2006) (Şekil 1.14).

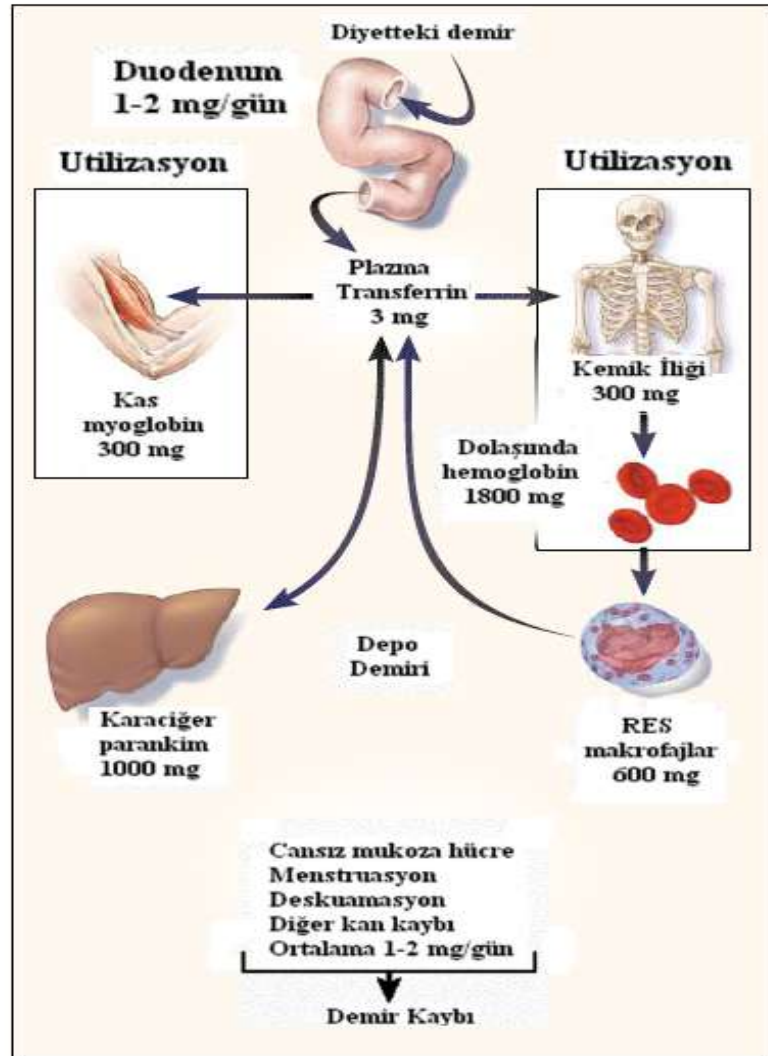
Demir, canlılar için eksikliği de fazlalığı da önemli sağlık sorunlara sebep olan esansiyel bir elementtir. Son yıllarda demir emiliminin moleküler kontrolü, demir taşınması ve hücrel demir alımı ile ilgili çok geniş araştırmalar yapılmakla birlikte halen tam bilinmeyen bazı noktalar vardır. 15 yıl öncesine kadar demir emiliminin moleküler mekanizması hakkında çok az bilgi varken 1997 yılında DMT1 (Divalan Metal Taşıyıcı)'in keşfinden sonra bu konuda hızlı gelişmeler oldu.

1.2.2.3. Demirin Emilimi ve Taşınması

1960'ın sonları ile 1970'in başlarında radyoaktif demir kullanılarak yetişkinlerde demir emilimi ile ilgili daha fazla bilgiye ulaşılmıştır (Hallberg, 1981; Bothwell ve ark., 1989). Hububat ve baklagillerdeki demirin %1-7'si ile et ve balıktakinin %10-25'inin emildiği bildirilmiş, Saarinen ve arkadaşlarının 1977'de yaptıkları çalışmada

anne sütündeki demirin %49 oranında emildiği, bu oranın inek sütünde %10, demirle zenginleştirilmiş mamalarda ise %4 olduğu bulunmuştur (Stockman, 1981).

Demirin plazma düzeyini dengeleyen başlıca hücre ve dokular; diyetten demir emilimini sağlayan duodenal enterositler, temel demir deposu olan hepatositler, eski alyuvarlardaki demirin geri dönüşümünü sağlayan makrofajlar ve gebelikte anneden bebeğe demir taşınmasını sağlayan sinsityotroblastlardır. Farklı hücre tipleri demir alımı için farklı mekanizmaları kullanır; ancak plazmaya demir salınımı sadece duodenal enterositler aracılığı ile olur (Nemeth ve Ganz, 2006).



Şekil 1.14. Yetişkin bir insanda demir dağılımı (Andrews, 1999)

Demir emilimi gastrointestinal kanalın duodenum ve proksimal jejunum bölgesinde primer olarak gerçekleşir. Bağırsağın son kısmına doğru emilim gittikçe azalırken demirin bağırsağın üst kısımlarında daha çok emilmesinin başlıca nedeni bu bölgenin pH'sının, duodenumun ve diğer ince barsak bölgelerinin pH'sına göre daha asidik olmasıdır. Demirin emilebilir formda olup olmaması, diyetin kompozisyonu, demirin diyetteki miktarı ve gastrik sekresyon, intestinal motilite ile hastalıklar ve cerrahi işlemler gibi gastrointestinal faktörler de demir emilim hızını değiştirir. Diyetle alınan demirin yaklaşık %90 kadarı demir tuzları şeklinde olan non-hem demiridir (WHO, 1989; Oski, 1993; Gümrük ve Altay, 1995; Hagar ve ark., 2002). Bu demirin %5 kadarı emilirken hem demirine göre bu oran çok düşüktür.

Gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde süt çocuklarında diyetle alınan demirin ana kaynağı non-hem demiridir. Non-hem demir gıdalarda ferrik kompleksler şeklindedir ve emilimi kişinin demir durumu ve diyetteki diğer faktörlerden etkilenir. Mukozal demirin plazmaya geçiş mekanizması, hepsidinin keşfine kadar belirsiz kalmıştır. Diyetle alınan demir zayıf çözünen ve emilen ferrik (Fe^{+++}) formda olup duodenumun fırçamsı kenar epitelinde bulunan askorbat bağımlı demir redüktaz (ferreredüktaz) (Dcytb) enzimi aracılığıyla Fe^{+2} 'ye indirgenmekte ve oluşan ferröz durumdaki demir, duodenal kript hücrelerinde yer alan ve vücudun major demir taşıyıcı proteini olan DMT1 aracılığı ile fırçamsı kenar membranından enterositlere taşınmaktadır (Parkkila ve ark., 1997; Zoller ve ark., 1999; McKee ve ark., 2000). Fe^{+2} hücrede ferritin olarak depolanıp dökülen enterositlerle birlikte atılmakta ya da ferroportin (FPN) aracılığı ile basolateral membrandan plazmaya aktarılmaktadır. Fe^{+2} hephestin (Heph) aracılığı ile Fe^{+3} olarak dolaşıma geçirilmektedir (Şekil 1.15).

Demir, bağırsak mukoza hücrelerinde ferritin şeklinde depolanır, ferrik demire okside olur ve basolateral taşıyıcı protein olan 'hephestin' aracılığı ile dolaşıma girer (Bacon ve ark., 1999). Enterositler tarafından emilen demir ya ferritin şeklinde depo edilerek enterositin yaşlanıp dökülmesi ile feçesle atılır ya da plazmaya transfer edilir. Demir vücudun ihtiyacına göre ferroportin ile plazmada bulunan transferine aktarılır. Bakır içeren, seruloplazmin homoloğu hephestin,

enterositleri terk eden Fe^{+2} 'yi Fe^{+3} 'e oksitler (Umbreit, 2005). Portal dolaşımında demir Fe^{+3} 'e yüksek afinitesi olan transferrin proteinine hızla bağlanır (Atanasiu ve ark., 2007). Transferrin demir metabolizmasında ana rol oynayarak nerede ihtiyaç varsa demiri oraya taşır. Hücrelerin çoğu plazmadan demiri transferrin aracılığıyla alır (Crichton, 2001; Umbreit, 2005). Diferrik transferrin hücre membranında bulunan transferrin reseptörüne (TfR) bağlanarak reseptöre bağlı endositoz yolu ile hücre içine alınır. Hücre yüzeyinde bulunan HFE proteini TfR ile birlikte hücre içine alınır (Waheed ve ark., 1997). Non-hem demirin emilimini etkileyen faktörler Çizelge 1.5'de belirtilmiştir (Umbreit ve ark., 1998). Demirin, demir transfer eden hücreler olan enterosit, hepatosit ve makrofajlardan çıkışını sağlayan tek protein olan ferroportin (FPN) aracılığıyla salınımı, demir homeostazının önemli bir aşamasıdır. Dolaşıma geçen demir transferine bağlanarak demir ihtiyacı olan hücrelerin yüzeyinde bulunan transferrin reseptörü 1 (TfR1) aracılığı ile hücrelere taşınmaktadır (Brittenham, 2000; Fleming ve Bacon, 2005; Yen ve ark., 2006). Endozom zarı üzerindeki H^+ pompası enterosit sitoplazmasında bulunan H^+ iyonlarını endozom içine pompalayarak ortamın pH'sını 6'ya kadar düşürür (Andrews, 1999 ve 2000; Trenor ve ark., 2000). Transferrin-demir kompleksinin hücre yüzeyindeki TfR'ne bağlanmasından sonra oluşan TfR-Transferrin-demir kompleksi endositozla hücre içine alınır. Asidik ortamda ($pH < 5,5$) demir, transferrinden ayrılarak sitoplazma içine ve buradan da mitokondriye geçer ve hem sentezinde kullanılmak üzere bırakılır. Bırakılan demir DMT1 tarafından endozomal membran boyunca taşınarak ihtiyaca göre hücre tarafından kullanılır ya da ferritin olarak depolanır (Griffiths ve ark., 1999; Roy ve Enns, 2000; Canonne-Hergaux ve ark., 2001). Endozomal asidifikasyon sonrasında demirsiz kalan apotransferrinin, transferrin reseptörüne olan ilgisi artar. Apotransferrin-reseptör kompleksi endositozla tekrar hücre yüzeyine iletilir. Hücre yüzeyinde nötral pH ile teması sonucu apotransferrin, reseptöre olan afinitesini kaybederek reseptör yüzeyi tekrar kullanıma uygun hale gelir (Andrews, 1999; Hunt, 2001; Garrick ve ark., 2003; Moriya ve Linder, 2006; Donovan ve ark., 2006) (Şekil 1.16).

Hem demiri diyetle alınan demirin yaklaşık %10 kadarını oluşturur. Diyetteki demir kaynakları ve emilim oranları Çizelge 1.6'da belirtilmiştir (WHO, 1989).

Çizelge 1.5. Demir emilimini etkileyen faktörler.

1- Diyetle ilgili faktörler:

- a- Emilimi arttıran faktörler;
 - Askorbik asit (C vitamini), sitrat, aminoasitler
 - Et (kümes hayvanları, balık ve diğer deniz ürünleri)
 - Düşük pH
 - b- Emilimi inhibe eden faktörler;
 - Fitatlar, fosfat, kalsiyum
 - Polifenoller (çaydaki tanin)
 - Yumurta sarısı, oksalat (ıspanakta), kepek
-

2- Konak faktörleri;

- a- Demir durumu
 - b- Sağlık durumu (enfeksiyonlar, malabsorbsiyon)
-

Çizelge 1.6. Diyetteki demir kaynakları.

1-Hem demiri: Et, balık, kümes hayvanları ve kan ürünlerinde bulunur. Gelişmiş ülkelerde diyetteki demirin %10-15'ini, gelişmemiş ülkelerde ise %10'undan azını hem demiri oluşturur. Emilimi %20-30 oranındadır.

2-Non-hem demiri: Tahıllar, sebzeler ve bitkilerde bulunur. Gelişmemiş ülkelerde başlıca demir kaynağıdır. Emilimi çok değişkendir, gıdalardan etkilenir ve %10 civarındadır.

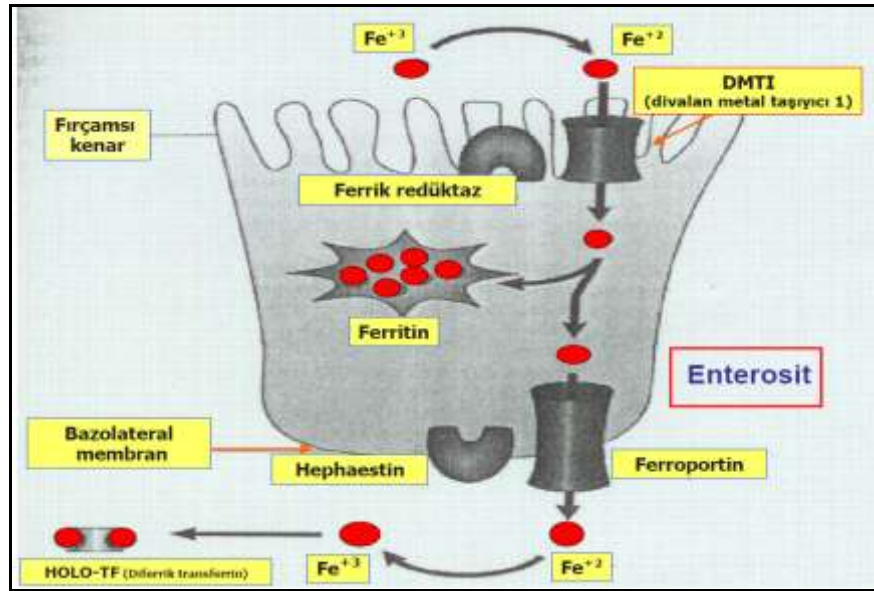
3-Kontamine demir: Toz, su ve toprak ile alınır. Bu yolla büyük miktarlarda demir alınmasına rağmen emilimi son derece düşüktür.

4-Zenginleştirilmiş demir: Bebek mamalarına katılan zenginleştirilmiş demirdir. Emilimi %4 oranındadır.

Hem demirinin lümeden enterositlere emilimi Hem taşıyıcı protein (Hem Carrier Protein-HCP1) vasıtası ile olmakta (Moriya ve Linder, 2006; Pradeep ve ark., 2010) yani Heme bağlı demir inorganik demirden farklı olarak apikal membrandan HCP1 aracılığı ile hücre içine alınmaktadır (Şekil 1.17).

Karaciğer ve Retikülo Endotelyal (RE) makrofajlar asıl demir depolarıdır (Kemna ve ark., 2008). RE makrofajlar demiri yüzey TfR aracılığı ile veya yaşlanan alyuvarların fagositozu ile sağlarlar. Hem oksijenaz enziminin etkisi ile açığa çıkan

demir, ferritin olarak depolanmakta ya da gerektiğinde plazmaya verilmektedir. Her bir ferritin molekülü 2000 demir atomu içermektedir (Nemeth ve Ganz, 2006).



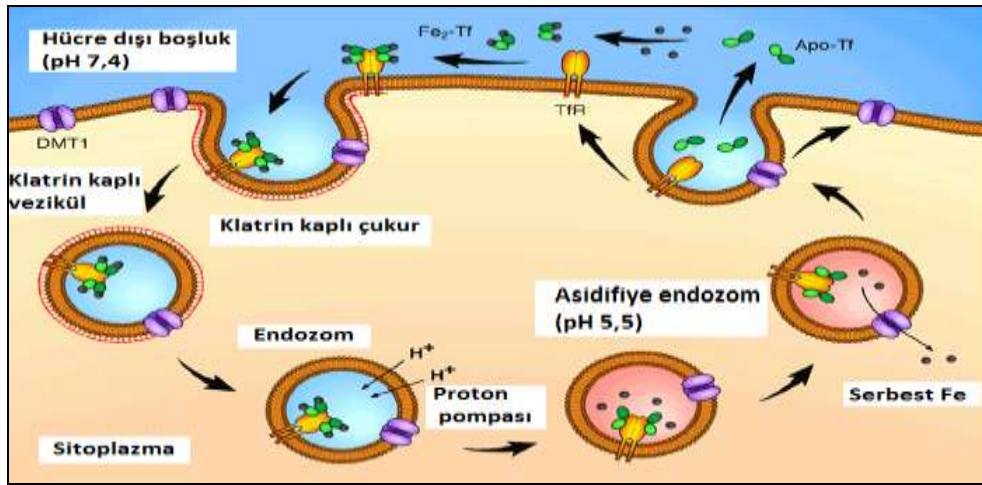
Şekil 1.15. Demir emiliminin mekanizması.

Ferritin mRNA'sı içinde yer alan ve 'Demir Düzenleyici Element-Iron Regulatory Elements-(IRE)' adı verilen kısım, ferritin molekülünün sentezinin düzenlenmesinde kontrol rolü oynar. IRE'e bağlanarak ferritin translasyonunu inhibe eden 'IRE Bağlayan Protein-IRE Binding Protein (IRE-BP)' adı verilen proteinler tanımlanmıştır. Hücrel demir düzeyi düşük olduğunda IRE-BP aktive olur ve ferritin sentezi azalır, diğer taraftan hücrel demir düzeyleri arttığında IRE-BP'ye demir bağlanır ve onu inaktive ederek, ferritin geni üzerindeki IRE elemanına bağlanmasını engeller ve sonuçta ferritin sentezinin artmasına neden olur (Fleming ve Bacon, 2005; Nemeth ve Ganz, 2006).

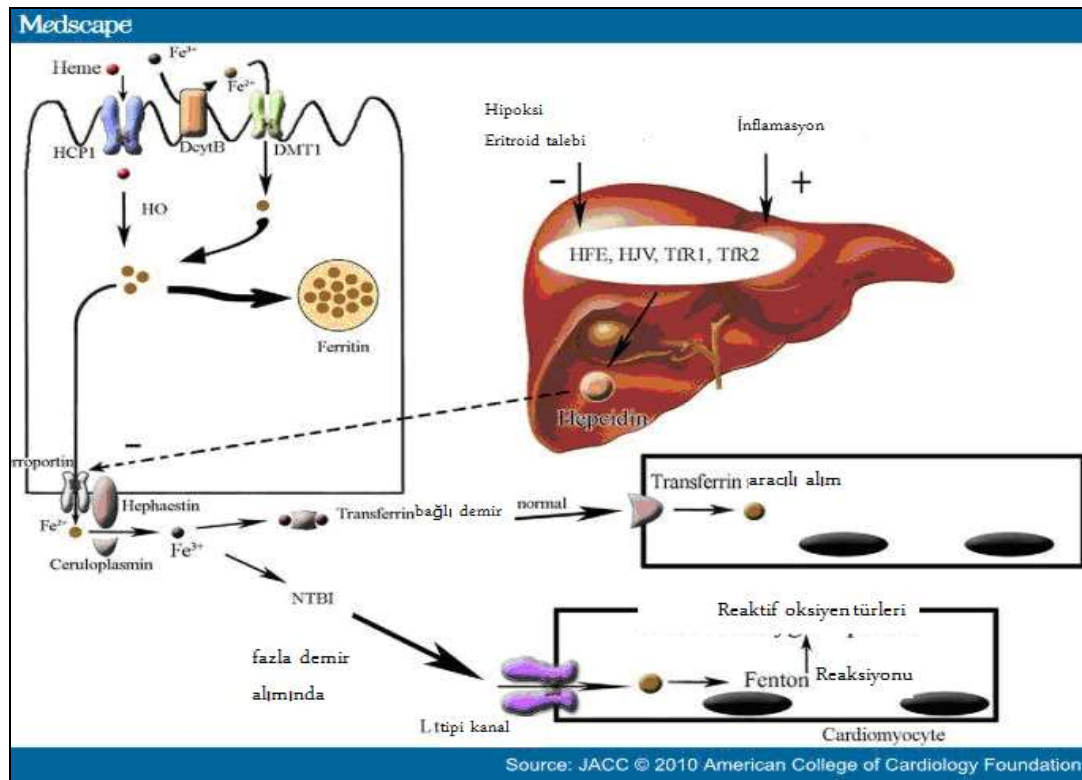
1.2.2.4. Vücutta Demirin Homeostazı

Vücut demir düzeyi esas olarak atılım düzenlemesi olmadığından emilim ile gerçekleştirilmektedir (McKee ve ark., 2000). Sistemik demir homeostazında hepsidin rolü diyetle demir yüklenen farelerin karaciğerlerinde hepsidin mRNA'sının aşırı ekspresyonunun belirlenmesi ile fark edilmiştir (Pigeon ve ark.,

2001). Günümüzde hepsidin, demir metabolizmasının düzenlenmesindeki asıl hormon olarak kabul edilir (Pigeon ve ark., 2001; Fleming ve Bacon, 2005).



Şekil 1.16. Endostatik transferrin döngüsü. Transferine bağlı Fe^{2+} hücre yüzeyinde Fe^{2+} -Tf-TfR kompleksi oluşturur ve bu kompleks endositoz ile hücre içine alınır. Endozomda düşük pH'da Fe transferinden ayrılır ve DMT1'e bağlanarak sitoplazmaya geçer. Apotransferrin-TfR kompleksi hücre yüzeyine geçerek apotransferrin tekrar dolaşıma katılır. Serbest hale gelen demir ya mitokondride Hem sentezine katılır ya da sitoplazmada ferritin ve ya hemosiderin şeklinde depolanır (Tom Walz, http://walz.med.harvard.edu/Research/Iron_Transport/Tfrtf.php)

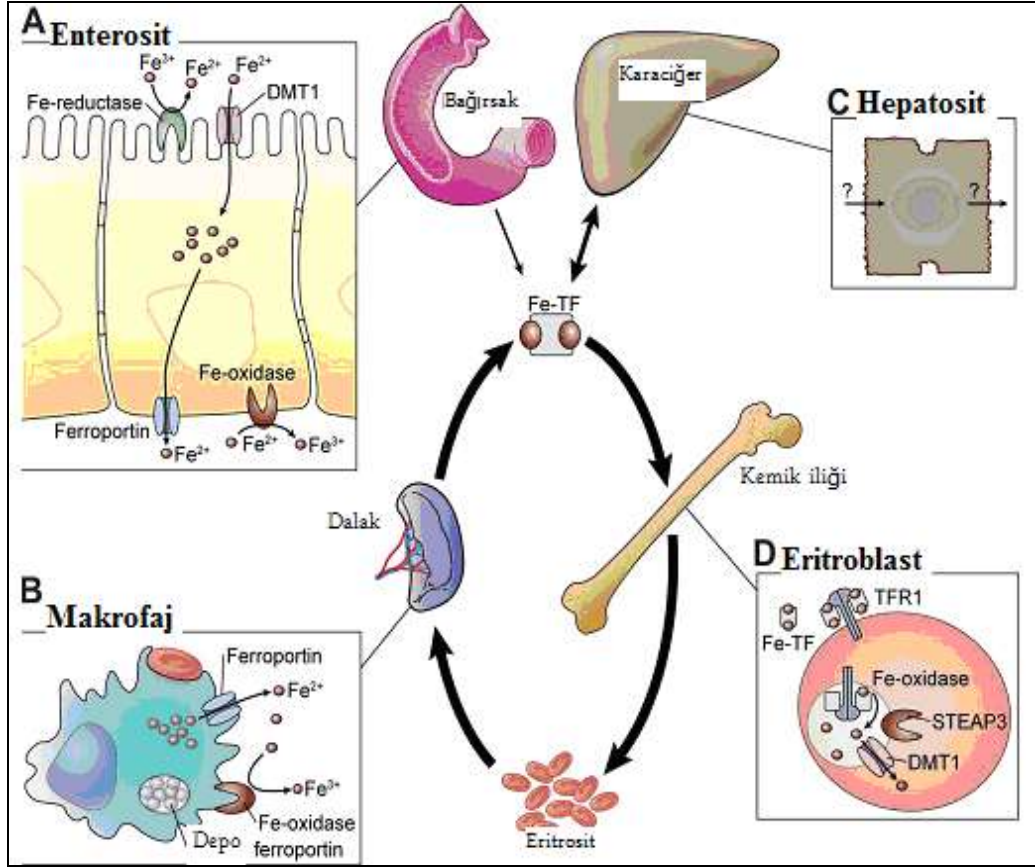


Şekil 1.17. Hem emilimi. Hem demirinin lümenen enterositlere Hem taşıyıcı protein (HCP1) aracılığı ile emilimi (Pradeep ve ark., 2010)

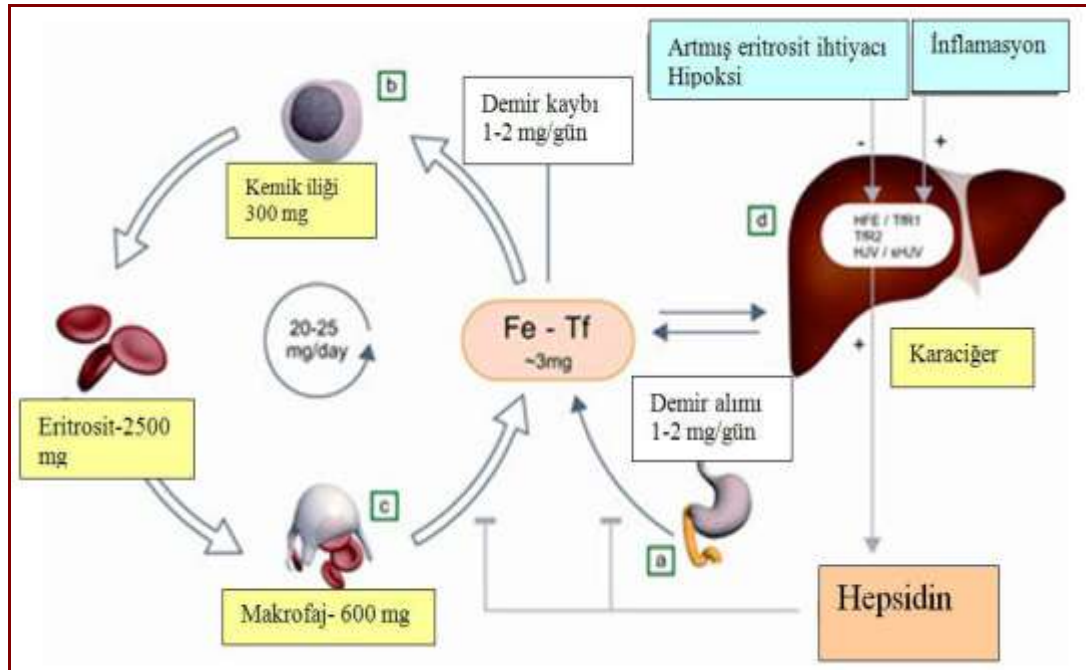
İnsan hepsidini in vitro olarak, 10-30 μ M gibi yüksek düzeylerde antibakteriyal ve antifungal özellik gösterir. Diyetel demir ile hepsidin sentezinin arttığı gözlenmesi, hepsidin demir metabolizmasında yer alabileceğini düşündürmüş ve transgenik fare modellerinde hepsidin eksikliği ve fazlalığının etkileri araştırılarak; fare hepsidin düzeyinin, barsakta demir emiliminin, makrofajlardan demir salımının ve plasentadan demir taşınmasının negatif düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir (Ganz, 2005). Hepsidin demir düzenlemesiyle ilgili en iyi örnekler herediter hemokromatozis (HH) gen çalışmalarından elde edilmiştir. Demir aşırı yüklenmesine rağmen homozigot HFE transferin reseptör-2 ve hemojuvelin (HJV) mutasyonu olan hastalarda veya farelerde hepsidin oranının düşük olduğu belirlenmiş ve bu moleküllerin demir bağımlı olarak hepsidin sentezini düzenlediği bildirilmiştir (Nemeth ve Ganz, 2006; Anderson, 2007) (Şekil 1.18).

Nemeth ve arkadaşlarının (2003) yaptıkları çalışmada, hepsidin direkt olarak FNP'ne bağlandığını, böylece FNP'nin internalize olarak yıkıldığını ve FNP'nin hücre membranından kaybının hücrel demir atılımını durdurduğunu bildirmişlerdir. Demir depoları yeterli veya yüksek olduğunda, karaciğer hepsidin üretimini artırır, sonuçta hepsidin, ince bağırsakta FNP'i internalize eder ve demiri enterositlerden plazmaya taşıyan tek yolu engeller. Demir depoları düşük olduğunda ise hepsidin üretimi azalarak FNP molekülleri demiri enterosit stoplazmasından plazma transferrinine verir. Aynı şekilde hepsidin FNP etkileşimi makrofajlardaki demir döngüsünün düzenlenmesine açıklık getirir. Hepsidin varlığında ferroportin internalize olarak demir makrofajlar içerisinde kalır (Ganz, 2005 ve 2006).

Diyetle alınan ve hemoglobinden açığa çıkan demir; kan kaybı ya da hipoksi gibi eritropoetik uyarıcıların ardından üretimi artan alyuvarlara yönelir (Ganz, 2007) ve eritropoetik uyarılar hepsidin üretimini azaltır. Hepsidin üretiminin azalması ile demir emilimi ve makrofajlardan demir salımını üzerine olan engelleyici etkisini de ortadan kaldırarak daha fazla demirin eritropoez için kullanılmasına olanak verir (Şekil 1.19).



Şekil 1.18. Demir homeostazına genel bakış. (A) Nonhem demirin bağırsak enterosit hücreleri tarafından taşınması, (B) Eritrofagositozis ve doku makrofajlarında demir döngüsü, (C) hepatosit demir döngüsü, (D) eritroblastta transferin döngüsü ile demir alımı (Andrews, 2008).



Şekil 1.19. Hepsidin salınımını etkileyen faktörler (Nicolas ve ark., 2002)

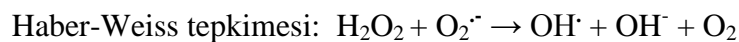
1.2.2.5. Demirin Vücuttan Atılımı

Demir esas olarak barsak hücreleri, dışkı, safra, tırnak, saç ve idrar ile vücuttan atılır. Sağlıklı yetişkin bir erkekte kaybın 1 mg/gün, kadında ise menstrüasyonla birlikte kaybedilen demirin eklenmesi ile daha fazla olduğu belirlenmiştir (Brittenham, 2000; Beutler, 2006). Vücut demir depoları, diyetle alınan ve gastrointestinal, üriner sistem ve derideki hücrelerin yıkımı ile atılan demir arasında sabit bir denge sağlar. Hergün ortalama 1 mg demir atılmakta ve bu miktar diyetle yeniden sağlanmakta iken hızlı büyüme dönemlerinde vücut kitlesindeki artış nedeniyle bu miktar yeterli olmayabilir. Demiri organizmadan günde 1 mg'dan daha fazla uzaklaştıracak bir sistem yoktur ve vücut demir depolarının dengesi esas olarak demir emilimindeki düzenleme ile sağlanmaktadır (Ponka ve ark., 1988; Andrews ve Bridges, 1998).

1.2.2.6. Demirin Toksik Etkisi ve Serbest Radikal Oluşumu

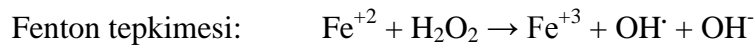
Fizyolojik şartlarda demir ve bakır gibi geçiş metalleri, çeşitli oksidasyon basamaklarında yer alır ve serbest radikal tepkimelerini hızlandıracak katalizör görevini üstlenirler. Bu maddelere oksidan stresör ismi verilmektedir (Gilbert ve Colton, 2002; Von Sonntag, 2006). Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarında Lipid Peroksidasyonu (LPO) üzerine etkileri olup oksijen, O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot ve geçiş metalleri serbest oksijen radikal (SOR) reaksiyonlarında önemli rol oynarlar (Burdon, 1994; Valko ve ark., 2007).

Canlı organizmalarda H_2O_2 ve O_2^- 'nin toksik etkileri, OH^\cdot ve reaktif radikal metal komplekslerine dönüşmeleri ile olur (Valko ve ark., 2007; Karihtala ve Soini, 2007). H_2O_2 , O_2^- ile Haber-Weiss denilen tepkimeye girerek hücre için son derece toksik olan OH^\cdot 'lere ayrılır (Duthie ve ark., 1989; Cadenas ve Davies, 2000; Karihtala ve Soini, 2007).



Bu tepkime hem katalizörün varlığında hem de katalizör olmadan oluşabilmektedir. Katalizör olmadan oluşan tepkime oldukça yavaş ilerlerken

tepkime eğer demir elementi ile katalizlenirse (Fenton tepkimesi) oldukça hızlı gerçekleşir (Von Sonntag, 2006). Enfeksiyon hastalıkları, inflamatuvar olaylar, iskemi ve reperfüzyon yapacak çok geniş kapsamlı patolojik durumlarda biyolojik olarak süperoksit oluşumu olur. Bir serbest radikal olan süperoksit ve hidrojen peroksit demirin serbest hale gelmesine yol açar. Demirin bunlarla reaksiyonu ile de çok daha güçlü serbest radikal olan hidroksil radikali ortaya çıkar (Fenton reaksiyonu). Oluşan hidroksil radikali tüm biyolojik makromolekülleri etkiler; polisakkaritleri depolimerize eder, DNA kırıklarına neden olur, enzimleri inaktive ederek lipid peroksidasyonunu başlatır. Lipid peroksidasyonu serbest demirle orantılı olarak artar ve çok önemli patolojik sonuçlara neden olur. İskemik kalp hastalıkları, maligniteler, nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson, Alzheimer) ile organizmada serbest demirin neden olduğu oksijen radikalleri arasındaki yakın ilgiyi gösteren çalışmalar bildirilmiştir (Mc Cord, 1998).



Vücutta demir transferine Fe^{+3} şeklinde bağlanarak plazmada taşınırken (Brittenham, 2000) serbest radikal oluşumuna katılmaz (Halliwell, 1989).

İz elementler normal gelişim ve fonksiyonların devamı için gerekli olup, eksiklikleri fetal gelişimde büyük önem taşımaktadır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde zayıf sosyoekonomik yapı nedeniyle besinlerle yeterli oranda alınamadıkları bilinmektedir. Hamilelik öncesinde yetersiz beslenme sadece anne için değil fötüs için de büyük risk taşımakta ve çinko, bakır ve magnezyum gibi iz elementlerin yokluğu konjenital anomaliler ve düşük doğum ağırlığı ile sonuçlanmaktadır (Black, 2001).

Metal iyonu taşıyıcıları ile ilgili yapılan son çalışmalar farklı dokular için uygun homeostazisi sağlamak amacıyla alım ve salım sistemlerinin koordineli işlevi üzerine durmaktadır. Bazı hücrel organellerde ve plazma membranında düşük ve yüksek afiniteli taşıyıcılar metal iyon düzeyinde uygun dengeyi sağlamak için fonksiyon gösterirler. Bununla birlikte yüksek spesifiklikte taşıyıcı sistemleri, uygun konsantrasyon dengesini yakalamak için metal iyon taşıyıcıları ile birlikte işlev

gösterirler. Ökaryotik hücrelerin vakuolar sistemi sadece metal iyonlarının depolanması için değil aynı zamanda salgılama yolağı olarak çeşitli hücrel membranlarda uygun taşıyıcıların miktarını ayarlayarak da metal iyon hemeostazisinde büyük rol oynar (Nelson, 1999).

1.2.3. Metal Toksisitesinde Metal Bağlayan Proteinlerin Önemi

Beslenme bozukluğu yanında toksik metallere maruziyet sonucunda iz elementlerin düzeyi sağlık sorunlarına neden olacak boyutta değişebilir. Bu değişimde genetik faktörlerin de etkili olduğu uzun süredir bilinmekte iken genetik araştırmaların önem kazanması sonucu metal taşıyıcı proteinlerle ilgili bilgiler de artmaktadır. Bu proteinler, hücrel membranlarda taşıma faaliyetlerini sağlarlar. Örneğin anormal demir alımı, anemi ve aterosklerozis, Parkinson, Alzheimer, Huntington, Friedreich ataxia ve Pica gibi diğer nörolojik hastalıklarda olduğu gibi en yaygın kalıtsal hemokromatozis hastalığı ile karıştırılır. Buna benzer bir hastalığı önlemek için hücreler metal iyon homeostazisini sürdürmek zorundadırlar. Bu olaylar son derecede düzenlenmiş alım, depolama ve salgılama işlemleri olarak sürdürülür (Nelson 1999, Nevo ve ark., 2006). Aslında, hücrel metal iyon düzeyindeki herhangi bir değişiklik metabolik bir olayın gerçekleşmemesine ya da hücre ölümüne yol açan hasara neden olur (Nelson, 1999).

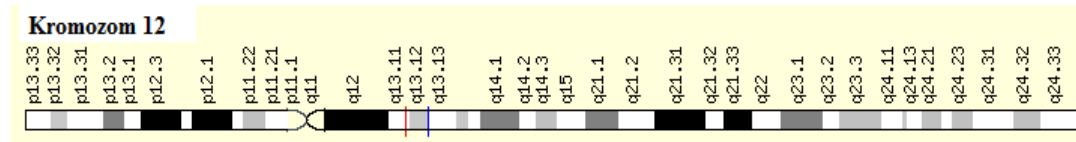
1.2.3.1. Divalan Metal Taşıyıcı Protein (DMT1)

1997'de Gunshin memeli hücrelerinde ferröz demir, kurşun ve diğer metal katyonların geçişini sağlayan bir metal taşıyıcının keşfini yayınladı. Bu metal taşıyıcının insan bağırsak hücrelerinde kurşun ve demirin geçişini sağladığı belirlenmiş (Tallkwist ve ark., 2000, Bannon ve ark., 2003, Garrick, 2003 ve 2006) ve daha sonra Divalan Metal Taşıyıcı (DMT1) olarak adlandırılmıştır. DMT1'in demir alımını sağlayan en önemli proteinlerden biri olduğu bildirilmiştir (Fleming ve ark., 2005). DMT1, hem bağırsak hem de çevre dokulardaki hücrelerin plazma ve endozomal membranlarında bulunan Nramp2 ya da Slc11a2 olarak da bilinen proton-bağımlı bir divalent metal taşıyıcıdır (Çizelge 1.7). DMT1 geni kromozom 12q13'de

lokalize olmuş, 1671 bp uzunluğunda, 557 aminoasitten oluşan ve birçok dokuda sentezlenen, 90-100 kDa ağırlığında integral membran proteinini kodlayan, 17 ekzon ve 3002 SNP noktası bulunan 3,6 kb'lık bir gen bölgesidir (Vidal ve ark., 1995; Hubert ve Hentze, 2002; Mackenzie ve ark., 2007) (Şekil 1.20, 1.21 ve 1.22). Bu SNP'lerden biri de 12. kromozom üzerindeki 51399050. noktaya denk gelen nükleotiddir. Bu noktada, DMT1 IVS4+44 C/A Tek Nükleotid Polimorfizmi tipik bireylerde C nükleotidi taşırken, atipik bireylerde A nükleotidi taşır.

Çizelge 1.7. Divalan metal taşıyıcının farklı isimleri.

Nramp2	Natural Resistance Associated Macrophage Protein 2
DCT1	Divalent Cation Transporter 1
DMT1	Divalent Metal Transporter 1
SLC11A2	Solute Carrier Family 11, member 2
FLJ37416	



Şekil 1.20. DMT1 geninin 12. kromozom üzerindeki yeri (<http://www.genecards.org>).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	Met	Ser	Thr	Val	Asp	Tyr	Leu	Asn	Ser	Val	Ser	Gly	Asp	His	Gly	Glu	Ser	Ala	Ser	Leu
21	Gly	Asn	Ile	Asn	Pro	Ala	Tyr	Ser	Asn	Pro	Ser	Leu	Ser	Gln	Ser	Pro	Gly	Asp	Ser	Glu
41	Glu	Tyr	Phe	Ala	Thr	Tyr	Phe	Asn	Glu	Lys	Ile	Ser	Ile	Pro	Glu	Glu	Glu	Tyr	Ser	Cys
61	Phe	Ser	Phe	Arg	Lys	Leu	Trp	Ala	Phe	Thr	Gly	Pro	Gly	Phe	Leu	Met	Ser	Ile	Ala	Tyr
81	Leu	Asp	Pro	Gly	Asn	Ile	Glu	Ser	Asp	Leu	Gln	Ser	Gly	Ala	Val	Ala	Gly	Phe	Lys	Leu
101	Leu	Trp	Ile	Leu	Leu	Leu	Ala	Thr	Leu	Val	Gly	Leu	Leu	Leu	Gln	Arg	Leu	Ala	Ala	Arg
121	Leu	Gly	Val	Val	Thr	Gly	Leu	His	Leu	Ala	Glu	Val	Cys	His	Arg	Gln	Tyr	Pro	Lys	Val
141	Pro	Val	Ile	Leu	Trp	Leu	Met	Val	Glu	Leu	Ala	Ile	Ile	Gly	Ser	Asp	Met	Gln	Glu	Arg
161	Val	Ile	Gly	Ser	Ala	Ile	Ala	Ile	Asn	Leu	Leu	Ser	Val	Gly	Arg	Ile	Pro	Leu	Trp	Gly
181	Gly	Val	Leu	Ile	Thr	Ile	Ala	Asp	Thr	Phe	Val	Phe	Leu	Phe	Leu	Asp	Lys	Tyr	Gly	Leu
201	Arg	Lys	Leu	Glu	Ala	Phe	Phe	Gly	Phe	Leu	Ile	Thr	Ile	Met	Ala	Leu	Thr	Phe	Gly	Tyr
221	Glu	Tyr	Val	Thr	Val	Lys	Pro	Ser	Gln	Ser	Gln	Val	Leu	Lys	Gly	Met	Phe	Val	Pro	Ser
241	Cys	Ser	Gly	Cys	Arg	Thr	Pro	Gln	Ile	Glu	Gln	Ala	Val	Gly	Ile	Val	Gly	Ala	Val	Ile
261	Met	Pro	His	Asn	Met	Tyr	Leu	His	Ser	Ala	Leu	Val	Lys	Ser	Arg	Gln	Val	Asn	Arg	Asn
281	Asn	Lys	Gln	Glu	Val	Arg	Glu	Ala	Asn	Lys	Tyr	Phe	Phe	Ile	Glu	Ser	Cys	Ile	Ala	Leu
301	Phe	Val	Ser	Phe	Ile	Ile	Asn	Val	Phe	Val	Val	Ser	Val	Phe	Ala	Glu	Ala	Phe	Phe	Gly
321	Lys	Thr	Asn	Glu	Gln	Val	Val	Glu	Val	Cys	Thr	Asn	Thr	Ser	Ser	Pro	His	Ala	Gly	Leu
341	Phe	Pro	Lys	Asp	Asn	Ser	Thr	Leu	Ala	Val	Asp	Ile	Tyr	Lys	Gly	Gly	Val	Val	Leu	Gly
361	Cys	Tyr	Phe	Gly	Pro	Ala	Ala	Leu	Tyr	Ile	Trp	Ala	Val	Gly	Ile	Leu	Ala	Ala	Gly	Gln
381	Ser	Ser	Thr	Met	Thr	Gly	Thr	Tyr	Ser	Gly	Gln	Phe	Val	Met	Glu	Gly	Phe	Leu	Asn	Leu
401	Lys	Trp	Ser	Arg	Phe	Ala	Arg	Val	Val	Leu	Thr	Arg	Ser	Ile	Ala	Ile	Ile	Pro	Thr	Leu
421	Leu	Val	Ala	Val	Phe	Gln	Asp	Val	Glu	His	Leu	Thr	Gly	Met	Asn	Asp	Phe	Leu	Asn	Val
441	Leu	Gln	Ser	Leu	Gln	Leu	Pro	Phe	Ala	Leu	Ile	Pro	Ile	Leu	Thr	Phe	Thr	Ser	Leu	Arg
461	Pro	Val	Met	Ser	Asp	Phe	Ala	Asn	Gly	Leu	Gly	Trp	Arg	Ile	Ala	Gly	Gly	Ile	Leu	Val
481	Leu	Ile	Ile	Cys	Ser	Ile	Asn	Met	Tyr	Phe	Val	Val	Val	Tyr	Val	Arg	Asp	Leu	Gly	His
501	Val	Ala	Leu	Tyr	Val	Val	Ala	Ala	Val	Val	Ser	Val	Ala	Tyr	Leu	Gly	Phe	Val	Phe	Try
521	Leu	Gly	Trp	Gln	Cys	Leu	Ile	Ala	Leu	Gly	Met	Ser	Phe	Leu	Asp	Cys	Gly	His	Thr	Val
541	Ser	Ile	Ser	Lys	Gly	Leu	Leu	Thr	Glu	Glu	Ala	Thr	Arg	Gly	Tyr	Val	Lys			

Şekil 1.21. DMT1'in protein yapısındaki amino asitler.

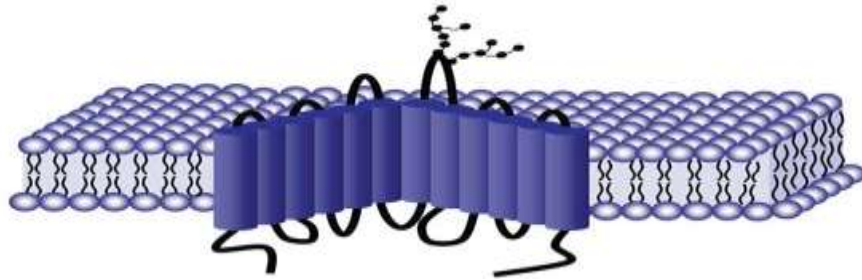
DMT1 geni mRNA'sı her hücrede bulunur. Bitkiler, böcekler, mikroorganizmalar ve omurgalı hayvanlarda benzer proteinlerle evrim sırasında yüksek oranda korunmuştur (Mims ve Prechal, 2005a). DMT1 mRNA'sı duodenum, karaciğer ve eritroid hücrelerde bulunurken böbrek, beyin, timus, kalp, akciğer ve testislerde de kolayca belirlenebilir (Gunshin ve ark., 1997). DMT1 ilk kez 1995'de kemirgenlerde 15. kromozom üzerinde belirlenerek klonlanmıştır (Gruenheid ve ark., 1995). Vidal ve arkadaşları (1995) insana ait formu klonlamış ve kromozom 12q13 üzerinde floresans in situ hibridizasyonla belirleyerek karakterize etmişlerdir, bununla birlikte daha sonra demir metabolizmasındaki rolünün tamamı belirlenmiştir (Gunshin ve ark., 1997). DMT1 mRNA'nın özellikle proksimal duodenumda (Gruenheid ve ark., 1995) ve her yerde düşük düzeyde eksprese olur ve demir eksikliği durumunda ekspresyonu artar (Gunshin ve ark., 1997). Klonlanmasının ardından mk fare ve Belgrade ratta demir eksikliği ve hipokromik/mikrositik anemiden sorumlu olan DMT1'de tanımlayıcı mutasyonlar belirlenmiştir (Fleming ve ark., 1997; Fleming ve ark., 1998). DMT1'in fonksiyon ve hücre içi lokalizasyonu ile ilgili bu gen içerisinde 185 (G185R) pozisyonunda transmembran 4 kıvrımında Gly yerine Arg geçmesine neden olan tek nükleotit mutasyonu ile birçok bilgi bu hayvanlar ile yapılan çalışmalardan edinilmiştir (Su ve ark., 1998).

DMT1 evrim sırasında yüksek oranda korunan Nramp ailesinden membran bağlı, 12 transmembran domaini bulunan divalent katyon taşıyıcıların bir üyesidir (Cellier ve ark., 1995; Fleming ve ark., 1997; Lam-Yuk-Tseung, 2003; Courville ve ark., 2006) (Şekil 1.23 ve 1.24). Bu proteinler geniş çeşitlilikte fonksiyon sergilerler; bitkilerde kök sistemi ile metal iyonlarının alımı, Drosofilada tat alma duyusuna cevap işlemi için önemli olan iyon kanalında ve mayada Nramp proteini mitokondriyal matrikse protein alımı için gerekli membran potansiyelini sağladığı görülür (Garrick ve ark., 2003). Xenopus yumurtasında yada HEK293 hücrelerinde eksprese olan DMT1 mRNA'sının DMT1'in demir dışında manganez, bakır, nikel ve muhtemelen çinko gibi metallerin pH bağımlı taşınmasında fonksiyonu olduğu belirlenmiştir (Bannon ve ark., 2002; Forbes ve Gros, 2003). Lam-Yuk-Tseung ve arkadaşları (2003) DMT1'in pH bağımlı taşıma mekanizmasının oluşmasında transmembran 6'da iki korunmuş histidin kalıntısının proton pompalanmasında rol

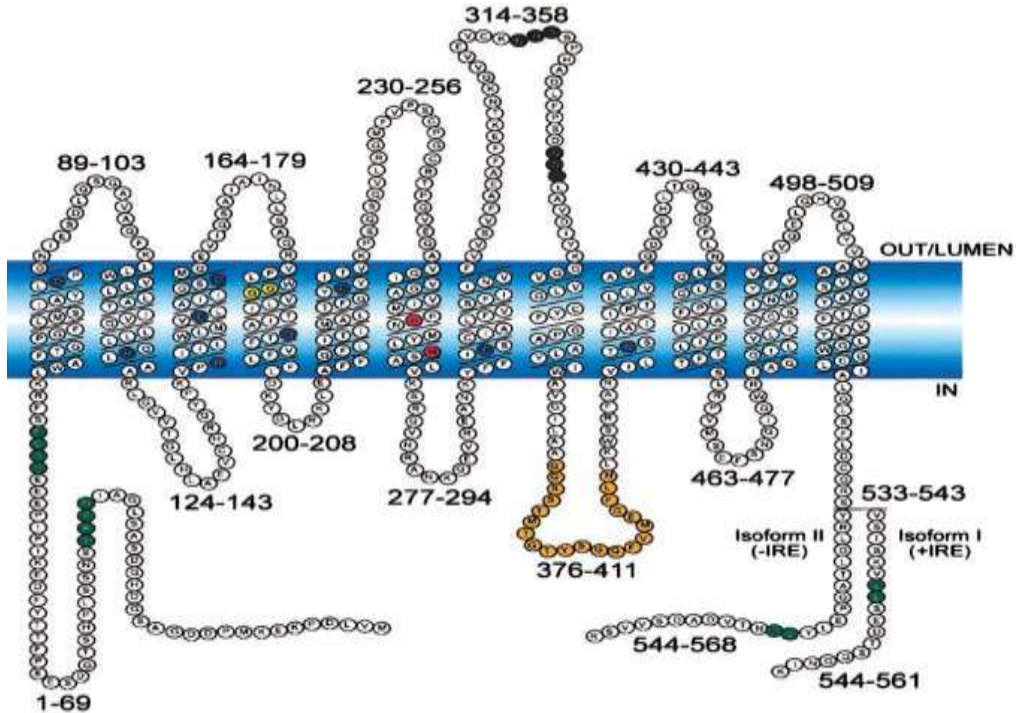
oynadığını önermişlerdir. Bu modelde anahtar rol oynayan histidin kalıntılarının mutasyonu protein aktivitesini ortadan kaldırmazken kanalları açmak ve katyon taşınmasını aktive etmek için daha düşük pH'ya gereksinim duyar.



Şekil 1.22. DMT1'in üç boyutlu yapısı ([http://www.uscnk.com/directory/Solute-Carrier-Family-11-Member-2\(SLC11A2\)-4426.htm](http://www.uscnk.com/directory/Solute-Carrier-Family-11-Member-2(SLC11A2)-4426.htm)).



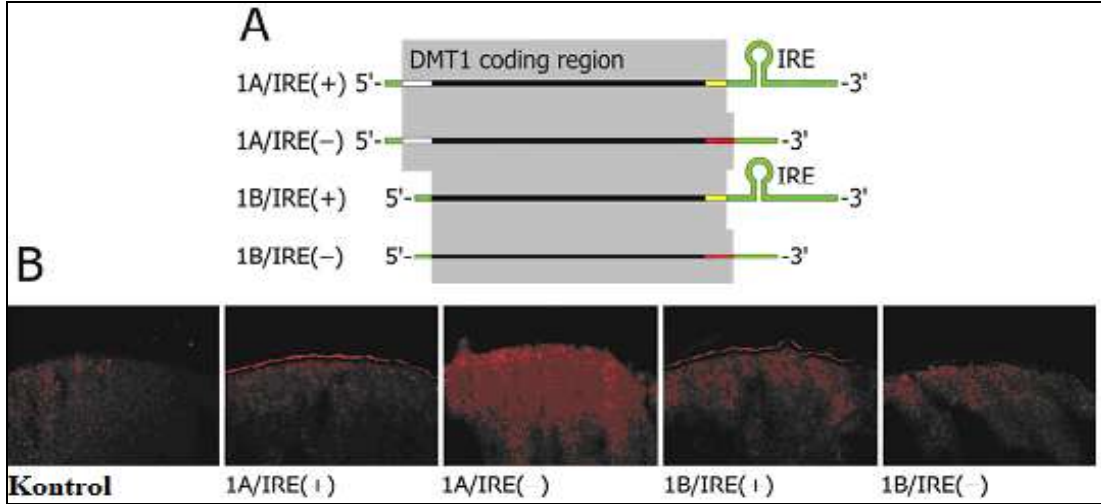
Şekil 1.23. DMT1 proteininin hücre membranındaki konumu (www.med.nus.edu.sg).



Şekil 1.24. Fare DMT1'inin izoform II (IRE-) ve izoform I (IRE+)'in şematik gösterimi (Lam-Yuk-Tseung, 2003).

1.2.3.1.1. DMT1 Geninin Yapı ve İzofomları

DMT1 ilk olarak Nramp2 (Vidal ve ark., 1995) ve ardından DCT1 (Gunshin ve ark., 1997) olarak adlandırılmış ve OMIM 600523 altında SLC11A2 olarak sınıflandırılmıştır (www.omim.org) (Çizelge 1.7). İnsan DMT1 geninin organizasyonu başlangıçta ilk olarak Lee ve arkadaşları tarafından (1998) tanımlanmıştır. Bu araştırmacılar genin 17 ekzon içerdiğini, 3,6 kb'dan fazla yer kapladığını, 4 farklı mRNA kodladığını, 5'nde alternatif promoter ve 3' alternatif ekzonlar içerdiğini göstermişlerdir (Hubert ve Hentze, 2002; Mackenzie ve ark., 2007). Detaylı çalışmalarda, Tchernitchko ve arkadaşları (2002) alternatif 3' ekzonlar içeren DMT1 mRNA izofomlarını karakterize etmişler, bunlardan biri 3' translasyona uğramayan bölgede (UTR-Untranslated Region) demir cevap elementi (IRE-iron responsive element) içeren (IRE+) iken diğeri içermeyen (IRE-) ve 18 aminoasitlik C-ucunun yeni 25 aminoasitlik bir parça ile yer değiştirdiğini karakterize etmişlerdir. IRE- izoformu 16. ekzon içinde alternatif ekleme tarafından oluşturulur. Bu kısım için uyarı bilinmemekle birlikte duodenum, karaciğer ve testiste öncelikle IRE+ izoform ekspres olurken dalak, böbrek, beyin ve timus gibi diğerk dokularda ise her iki izoformda eksprese olur. Son yıllarda, 1A ve 1B olarak dizayn edilen alternatif 5' ekzonların olduğu da belirlenmiştir (Hubert ve Hentze, 2002). DMT1'in 1A izoformu ilave 29 aminoasiti ile esas olarak duodenum ve böbrekte eksprese olurken 1B izoformu bütün doku ve endozomal membranlarda eksprese olur (Mackenzie ve ark., 2007). Ayrıca, 3' UTR'de IRE içerip içermemesine (sırası ile IRE+ ve IRE-) göre farklılık gösterir. Karboksi ucunda farklılık gösteren iki taşıyıcıyı kodlayan DMT1 IRE+ izoformunda 18 aminoasit bulunurken IRE- izoformunda 7 aminoasit daha uzundur (Şekil 1.25 ve 1.26). Ekzon 10 ve 12'nin atlanması nedeniyle oluşan diğerk küçük izoformlar da incelenmiştir (Lee ve ark., 1998). Ekzon 10 içermeyen DMT1 mRNA'sı tam uzunluktaki mRNA'dan daha düşük düzeylerde hemokromatozis hastalarında incelenmişken Mims ve arkadaşları (2005) ekzon 12 içermeyen izoformun normal retikülositlerde toplam DMT1 mRNA'sının %10'unu oluşturduğunu belirlemişlerdir (Lee ve ark., 1998; Mims ve ark., 2005b).



Şekil 1.26. İnsan DMT1'inin çoklu izoformları (A) DMT1'in çeşitli transkriptleri, UTR'da ve kodlanma bölgesinde farklılık gösteren en az dört DMT1 mRNA transkripti vardır. (B) Kontrol ve DMT1 izoformlarını eksprese eden oositlerde DMT1 immüno Floresans (Mackenzie ve ark., 2007).

1.2.3.1.2. DMT1'in Lokalizasyonu

Genelde DMT1 proteininin hüresel lokalizasyonu demir taşımadaki rolü ile ilişkilidir. DMT1'in izoformları hücre tipine özgü ekspresyon modellerine ve farklı hücre içi lokalizasyonlara sahiptir (Tabuchi ve ark., 2002). Bununla birlikte, DMT1 IRE+ ve IRE- izoformlarının mRNA'ları böbrek, timus ve karaciğer gibi birkaç dokuda eşzamanlı eksprese olurlar (Gunshin ve ark., 1997; Tabuchi ve ark., 2002; Johnson ve ark., 2005). IRE+ izoform duodonal fırçamsı kenarını içeren bazı epitelyum hücrelerinin plazma membranında eksprese olur. IRE- izoform ise birçok hücrede özellikle eritroid öncü hücrelerinde ve makrofajlarda eksprese olur ve asidifiye olmuş endozomlardan demir alımı için esansiyeldir (Cannon-Hergaux ve ark., 1999 ve 2001). 1A izoformu esas olarak duodonal ve böbrek hücrelerinde mevcut iken 1B aynı anda birçok doku ve hücrede eksprese olur (Hubert ve Hentze, 2002). Proksimal duodonda doku immüno boyama çalışmalarında DMT1 proteininin ekspresyonunun villuslarda sınırlandırıldığı ve kriptlerde olmadığı gösterilmiştir. Ekspresyonu enterositlerle sınırlı olup goblet hücrelerinde ya da lamina propriada ekspresyonu yoktur. Ekspresyon DMT1'in demir taşıyıcı rolü ile ilgili olarak enterositin apikal kutbunun fırçamsı kenarında fazladır (Cannon-Hergaux ve ark., 1999). Gruendheid ve arkadaşları (1999) makrofajlarda DMT1'in yaşlanmış kırmızı kan hücreleri parçalandığında alınan demirin taşınmasında

fonksiyonu olan fagozomal membranla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Transferin-TfR yolu ile demir alımına bağımlı olan hücrelerde DMT1 hem plazma membranında hem de endozomda bulunur. Böbrekte DMT1'in glomerulusta filtre edilen demirin geriemiğinde fonksiyon gösterdiği görülür ve kanal hücrelerinin apikal membranında lokalize olur. Bununla birlikte, ekspresyonun proksimal tübülde mi distal tübülde mi fazla olduğu konusunda çalışmalar farklılık göstermektedir (Ferguson ve ark., 2001; Canonne-Hergaux ve Gros, 2002). DMT1 nefronun bazolateral membranında eksprese olmaz, bu da bazolateral demir hareketinde yer almadığını göstermektedir (Ferguson ve ark., 2003). DMT1'in beyinde lokalizasyonu ile ilgili çelişkili bilgiler vardır (Wang ve ark., 2001; Moos ve Morgan, 2004a). Beyinde DMT1'in ekspresyon ve regülasyonuna yönelik yoğun çalışmalar, etkilenmiş bölgelerde önemli demir birikiminin olduğu Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalıklarında demirin zararlı rolünün olduğunu bildirmiştir (Moos ve Morgan, 2004b).

1.2.3.1.3. DMT1'in Ekspresyon ve Düzenlemesi

Sistemik ve hücrel demir homeostazını sürdürmek için DMT1 ekspresyonu kritik öneme sahiptir (Lee ve ark., 1998; Mackenzie ve ark., 2007). Hücrel ve sistemik demir düzeyindeki değişiklikler direkt ya da indirekt olarak DMT1 ekspresyonunu kontrol eder. Demir eksikliği, hipoksi, uyarılmış eritropoiezis gibi sistemik demir gereksinimi arttığında duodenumda DMT1 mRNA ve protein ekspresyonu artarak (Canonne-Hergaux ve ark., 2001; Conner ve Schmid, 2003) daha fazla demir emilir. Bununla birlikte, Li ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları bir çalışmada HepG2 hücre kültüründe hipoksi ile indüklenen DMT1 IRE+ ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. DMT1 ekspresyonu transkripsiyonel, post-transkripsiyonel ve post-translasyonel düzeylerde kontrol edilebilir. Gen ekspresyonunun transkripsiyonel düzenlemesi transkripsiyonel faktörler tarafından promotor sekanslar üzerinde etkili olabilir. Fleming ve arkadaşları (1998) rat yabancıl tip DMT1 ekspresyonunun Fe^{+2} alımını artırdığını oysa G185R mutant tipin minimal aktivite sergilediğini göstermişlerdir. Benzer olarak Su ve arkadaşları (1998) ekspresyon üzerine diğer

birkaç mutasyonun etkisini araştırmışlar ve her bir mutasyonun Fe^{+2} alımını azalttığını ya da elimine ettiğini bulmuşlardır.

DMT1'in 5' düzenleme bölgesi metallothionein 2A geninde bulunanlara benzer 5 potansiyel metal cevap elementi (MREs:metal responsive elements), 3 potansiyel SP1 (Specificity Protein1) bağlanma bölgesi ve bir γ -interferon düzenleme elementi içerir (Lee ve ark., 1998). Alternatif 5' ve 3' ekzonların tanımlanması DMT1'in ekspresyon ve düzenlenmesine ek bir karmaşa getirmiştir. Hem 5' promoter/ekzon 1A bölgesi hem de IRE-içeren terminal ekzon dokuya özgü bir mekanizma ile işleyen DMT1 ekspresyonunun demirle düzenlenmesine katılırken (Gunshin ve ark., 2001; Hubert ve Hentze, 2002) IRE-izoformun ekspresyonu demir muamelesi ile önemli derecede değişmez (Gunshin ve ark., 2001). Kutuplu hücrelerde apikal membrana doğru DMT1'in hedeflenmesi glikolizasyona bağlı olduğu görülür, oysa bazı çalışmalar IRE+ ve IRE- izoformların farklı endozomal kompartmanları hedeflediğini bildirir (Tabuchi ve ark., 2002). Hücre kültürü ve bazı hayvan modellerinde insan dokusunda olduğu gibi DMT1 IRE+ izoformunun regulasyonu demir alımına cevap olarak protein düzeylerindeki değişiklikleri düzenlemede demir algılayıcı olarak rol oynayan IRP sistemini içerir (Hentze ve Kuhn, 1996; Rouault ve Klausner, 1997) ve mRNA'nın 5'UTR'deki IRE/IRP kompleks oluşumu translasyonu inhibe eder, oysaki TfR1 ya da DMT1 mRNA'nın 3' UTR'da IRP'lerin IRE'lere bağlanması degradasyonunu önler. Kombine IRP'lerin IRE-bağlama aktivitesi demir-yetersiz hücrelerde yüksek iken demir-yüklü hücrelerde düşüktür (Muckenthaler ve ark., 2008). IRE- izoformun endozomlardan demir çıkışını sağlamada içerildiğini gösteren birçok kanıt vardır (Garrick ve ark., 2003). Beklenmedik bir şekilde IRE- izoform nöranal özelliklerle hücre çekirdeğinde görülmektedir (Roth ve ark., 2000; Garrick ve ark., 2003). IRE- DMT1'in çekirdekdeki fonksiyonu spekülasyonlu olup bu lokalizasyonun multifonksiyonel taşıyıcı için yeni bir rol ya da rolleri tanımlayabileceğini gösterir. DMT1 mRNA ve protein ekspresyonu artmış hücrelerde transferin bağlı olmayan demir (NTBI:non-transferrin-bound-iron) alımı upregüle olur. DMT1 hepatositlerde NTBI'nın major taşıyıcısı gibi görülmektedir (Shindo ve ark., 2006). Kemirgenler ve hücre kültüründe yapılan çalışmalar demir eksikliğini böbrek hariç karaciğer ve

bağırsaktaki DMT1 düzeyini upregüle ettiğini göstermiştir (Gunshin ve ark., 1997 ve 2001; Dupic ve ark., 2002). DMT1'in alternatif 5' ekzon formları üzerine yapılan çalışmalar hem 1A/IRE+ ve 1A/IRE- izoformların böbrekte değil de duodonda demir düzenlemesine karşı hassas olduğunu göstermiştir (Hubert ve Hentze, 2002). Demir eksikliği duodonal DMT1 mRNA düzeyini upregüle ederken oral demir yüklenmesi de DMT1'in transkripsiyonunu düşürür (Yeh ve ark., 2000). Hepsidin bağırsaktaki DMT1 mRNA ve protein düzeyini kendi başına azaltıyor gibi görünürken bu etkinin direkt mi yoksa enterosit demir düzeyine bağlı bir etki mi olduğu henüz açık değildir (Frazer ve ark., 2002; Yamaji ve ark., 2004). Sitokinlerin DMT1 düzenlemesindeki rolleri insan monosit hücreleri dışında büyük oranda çalışılmamıştır (Ludwiczek ve ark., 2003). Makrofajlarda ve bağırsakta DMT1 mRNA ve protein düzeyini düşüren hepsidin IL-6 tarafından önemli ölçüde upregulasyona uğrarken IL-6'nın DMT1 üzerine direkt etkisi herhangi bir hücre tipinde çalışılmamıştır. DMT1 üzerinde dışsal eritropoietinin etkisi tek bir konsantrasyonda sadece fare eritrolösemi hücrelerinde çalışılmış ve mRNA düzeyine etkisi olmadığı bildirilmiştir (Zoller ve ark., 2002).

1.2.3.1.4. DMT1'in Biyokimyasal ve Fizyokimyasal Özellikleri

DMT1 intestinal demir emilimi yanında eritroid demir kullanımı, karaciğerde demir birikimi ve plasental demir transferinde de önemli rol oynamaktadır. Fe (III) mide asidinde çözünür ve dcytb (duodonal cytochrome b) aracılığı ile (McKie ve ark., 2000 ve 2001) yada üst yüzeydeki benzer bir redüktaz ile Fe(II)'e indirgenir. Fe(II) fırçamsı kenardan DMT1 aracılığı ile hücre içine alınır. Oosit deneyinde DMT1 her bir Fe⁺² için bir H⁺ geçiren proton pompalayıcısı olarak rol oynar (Gunshin ve ark., 1997). DMT1 enterositin apikal yüzeyinde bulunur (Canonne-Hergaux ve ark., 1999; Trinder ve ark., 2000) ve bu lokalizasyon divalent katyon taşıma aktivitesi (Knöpfel ve ark., 2000) fırça kenar membran vezikülleri ile ilişkilidir. DMT1 genel bir katyon taşıyıcı olarak bilinmekle beraber DMT1'in önemli biyolojik fonksiyonu duodondan Fe⁺²'i taşıma dışında, esansiyel elementlerden Zn⁺², Mn⁺², Cu⁺², Co⁺², Ni⁺² ve toksik metallere Cd⁺² ve Pb⁺² gibi diğer metalleri de taşır (Garrick ve ark., 2006; Kayaaltı ve ark., 2011).

Bu genin, Nramp ailesine dahil olmasına rağmen enfeksiyonlara karşı dirençteki rolü halen bilinmemektedir. Bu taşıyıcının ekspresyonu insanlarda demir ve kurşun düzeyi ile tutarlı olarak duedonumda yüksek olup (Gunshin ve ark., 1997) demir eksikliğinde demir redüktaz ve DMT1 sentezi artar iken demir fazlalığında ise azalır (West ve ark., 2008). DMT1 ayrıca testis, böbrek ve beyin fizyolojisinde çok önemlidir. Testislere ilişkin yetişkin ratlarda bu proteinin sertoli hücrelerinde, spermatozoidlerde ve spermatidlerde lokalize olduğu görülür. DMT1'in yetişkin ratlarda ekspresyonu hücreye özgüdür ve spermatogenik döngü ile yüksek oranda düzenlenir (Griffin ve ark., 2005). Bu veriler üreme hücrelerinin kesin olarak hedeflenen ve zamanla tedarik edilen demire ihtiyaçları olduğunu ve demirin erkek üremesinde önemli bir rol oynadığını belirtir (Gunshin ve ark., 2005). Böbrek diğer dokularla kıyaslandığında oldukça yüksek düzeyde DMT1 eksprese eder. Bu ekspresyon çoğunlukla kortekste özellikle proksimal tübülde yoğunlaşmış ve daha az oranda da distal tübül ve kortikal toplama kanalındadır (Abouhamed ve ark., 2006). DMT1 ekspresyonu beyinde striatum, serebellum, talamus, üçüncü ventrikülde epididimal hücreler ve vasküler hücrelerde yüksektir (Burdo ve ark., 2001), bu da DMT1'in beyinde önemli bir fonksiyona sahip olduğunu gösterir. Beyin demir konsantrasyonunun anormal olduğu Parkinson, Alzheimer, RLS (Restless Leg's Syndrome), Huntington koresi, Hallervorden-Spatz hastalığı gibi nörolojik insan hastalıkları vardır. Bu hastalıkların nedeni anormal demir taşınması ya da metabolizması olabilir. IRP2-kusurlu farelerde bunun DMT1 üzerine etkisinden dolayı oluşan nörodejenerasyon gözlenmiştir (Knutson ve ark., 2004). Enterosit DMT1 aktivitesi herediter hemokromatoziste artar (Zöller ve ark., 1999 ve 2001).

1.2.3.1.5. DMT1'in Biyolojik Rolü

DMT1 enterositin bağırsak boşluğuna bakan membranının üzerinde yer alır ve intestinal lümeninden demir emilimi için esas mekanizmayı oluşturur. DMT1 proteininin plazma membranındaki yapısı, katlanması ve bağlanması ile ilgili çok az bilgi vardır. DMT1'in TM4'ünün biyolojik fonksiyonu için kritik öneme sahip olduğu gösterilmiştir. TM4'ün sirkular Dychroism ve nükleer manyetik rezonans spektroskopisi gibi analizlerle peptid modelleri kullanarak metal iyonlarının

taşınabildiği bir kanal oluşturmak üzere yarı bağlanabilen bir yapıda olduğu ve bu domaini etkileyen mutasyonların in vivo şartlarda DMT1'in fonksiyonunu değiştiren peptidlerin farklı yarı bağlanmalarına neden olduğunu düşündürmüştür (Li ve ark., 2005a ve 2005b). DMT1'in başlıca görevleri;

- ✓ Metal emilimi ve taşınması,
- ✓ Esansiyel metallerin homeostazisi ve metabolizması,
- ✓ Metal detoksifikasyonu,
- ✓ Serbest radikal süpürücüsü,
- ✓ Zn taşıyıcısı olduğundan hücre çoğalmasında ve hücre yenilenmesindedir.

DMT1'in değişik izoformlarının hücreye spesifik ekspresyonu, bu proteinin biyolojik fonksiyonları ile ilgili aydınlatılmayı bekleyen yönleridir.

1.2.3.2. DMT1 ve Esansiyel Metallerin Homeostazisi

DMT1 genel bir katyon taşıyıcı olarak bilinmekle beraber DMT1'in önemli biyolojik fonksiyonu duedonumdan Fe^{+2} 'i taşıma dışında, essential elementlerden Zn^{+2} , Mn^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} ve toksik metallerden Cd^{+2} ve Pb^{+2} gibi diğer metalleri de taşır (Garrick ve ark., 2006; Kayaaltı ve ark., 2011). Demirin organizmaya yararlarından ve aşırı durumda ise zararlarından daha önce bahsedildi.

Çinko insan ve hayvan organizmasında hızlı gelişen dokularda; protein sentezi, nükleik asit metabolizması, diğer metabolik işlemler, büyüme, immün fonksiyonlar, hormon sentezi ve taşınması, hormon aktivasyonu, tüm organ sistemlerinin gelişmesi ve üreme için gerekli olan önemli bir elementtir. 300'den fazla enzim katalitik görevini yapabilmek ve birçok fonksiyonel protein yapısını koruyabilmek için çinkoya gereksinim duymaktadır (Jacob ve ark., 1998; Maret ve Valee, 1998). Çinko ve bakır; superoksid dismutaz, DNA polimeraz ve karbonik anhidraz gibi enzimlerin kofaktörü olarak birçok biyokimyasal olayda yer alır. Bu elementlerin düzeyindeki herhangi bir değişiklik, yapılarında buldukları enzim ve proteinlerin aktivitelerini etkiler. Dolayısıyla canlılarda çinko ve bakırın biyolojik

öneminin bir bölümü çok sayıda enzimle olan yakın ilişkisinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, biyolojik membranların yapı ve fonksiyonlarının devamlılığında da çok önemli görevleri vardır. Çinko, membran taşıyıcıları ve membran bağlama bölgeleri için kadmiyum ile yarışarak dokularda kadmiyum birikimini önlemektedir. Çinko eksikliğinde gelişmede gerileme, deri, bağışıklık ve sinir sistemi ile üreme organlarında patoloji, yara iyileşmesinde gecikme, iştah azalması ve enfeksiyonlara karşı artan duyarlılık olur (Rostan ve ark., 2002).

Bakır Cu/Zn süperoksid dismutaz, sitokrom c oksidaz gibi enzimlerin yapısında bulunup yaklaşık 30 proteinin normal fonksiyonlarını yapabilmeleri için gerekli olan esansiyel bir elementtir (Dameron ve Harrison, 1998).

1.2.3.3. DMT1 ve Metal Detoksifikasyonu

Düşük demir depoları varlığı sırasında duedonumda DMT1'in ekspresyonu, sadece demir emilimini sağlayacak şekilde değil aynı zamanda kurşun emilimine de izin verecek şekilde büyük oranda artar (Gunshin ve ark., 1997). Bir çalışmada, insan hücrelerinde DMT1'in aşırı ekspresyonu kontrollere kıyasla kurşun taşınmasında 7 kattan daha fazla bir artışla sonuçlanmıştır (Bannon ve ark., 2002). Bu durumda DMT1'in yüksek düzeyde ekspresyonu kurşun emiliminde önemli artış için gerekli olduğu düşünülmektedir. Watson ve arkadaşları (1986) kurşun emiliminin demir emilimi normalin üzerinde yeterli düzeye ulaşınca kadar artmayacağını gözlemişlerdir. Bannon ve arkadaşları ise (2003) DMT1'in düşükten normal düzeylere kadar olan ekspresyonunda kurşun emiliminin ekspresyondaki değişiklikler tarafından etkilenmeyeceğini bildirmişlerdir. Bu nedenle normal oranda demir depoları kurşun emiliminde önemli bir artışa sebep olmazken demir eksikliği sırasında olabilir ve DMT1'in düzeyi artan kurşun emilimine neden olacak kadar yüksek olur.

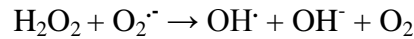
Yeterli düzeyde demir alımının kurşun emilimini önleyen ikili bir fonksiyon olabileceği bildirilmiştir (Bannon ve ark., 2002). Öncelikle, duedonumdaki DMT1 düzenleme mekanizması demir alımına karşı hassas olduğundan demir alımı

bağırsaktaki kurşun taşıyıcıların sayısını düşürür (Tallkvist ve ark., 2000; Morgan ve Oates, 2002). İkinci olarak, DMT1 demire karşı kurşundan daha fazla affiniteye sahip olduğundan bağırsakta demirin varlığı yarışmalı olarak kurşun alımını engeller. Demirin DMT1 tarafından tamamen kurşun alımını inhibe etme yeteneği gösterilmiştir (Bannon ve ark., 2002).

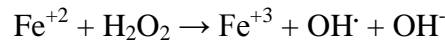
Demirin kurşun alımını yarışmalı olarak engelleyebilmesine rağmen kurşunun demir alımına karşı aynı etkiye sahip olup olmadığı konusu açık değildir (Ituri ve Nuez, 1998). Bunun yerine kurşun kadmiyuma benzer farklı bir mekanizma ile demir alımını sınırlayabilir. İnsanlarda fizyolojik mekanizması bilinmemekle birlikte DMT1 tarafından taşınan kurşun gibi kadmiyum da divalent bir metaldir. İlginç olarak kadmiyum insan bağırsak hücrelerine eklendiğinde kontrollerin %70'inin DMT1 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Tallkvist ve ark., 2001).

1.2.3.4. Serbest Radikal Süpürücüsü Olarak DMT1'in Rolü

Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarında, Lipid Peroksidasyonu (LPO) üzerine etkileri vardır. Oksijen, O_2^- , H_2O_2 , OH^- ve geçiş metallerinin iyonları serbest oksijen radikal (SOR) reaksiyonlarında önemli rol oynarlar (Burdon, 1994; Valko ve ark., 2007).



Katalizör olmadan oluşan tepkime oldukça yavaş ilerlerken demir elementi ile katalizlenirse (Fenton tepkimesi) oldukça hızlı gerçekleşir (Von Sonntag, 2006).

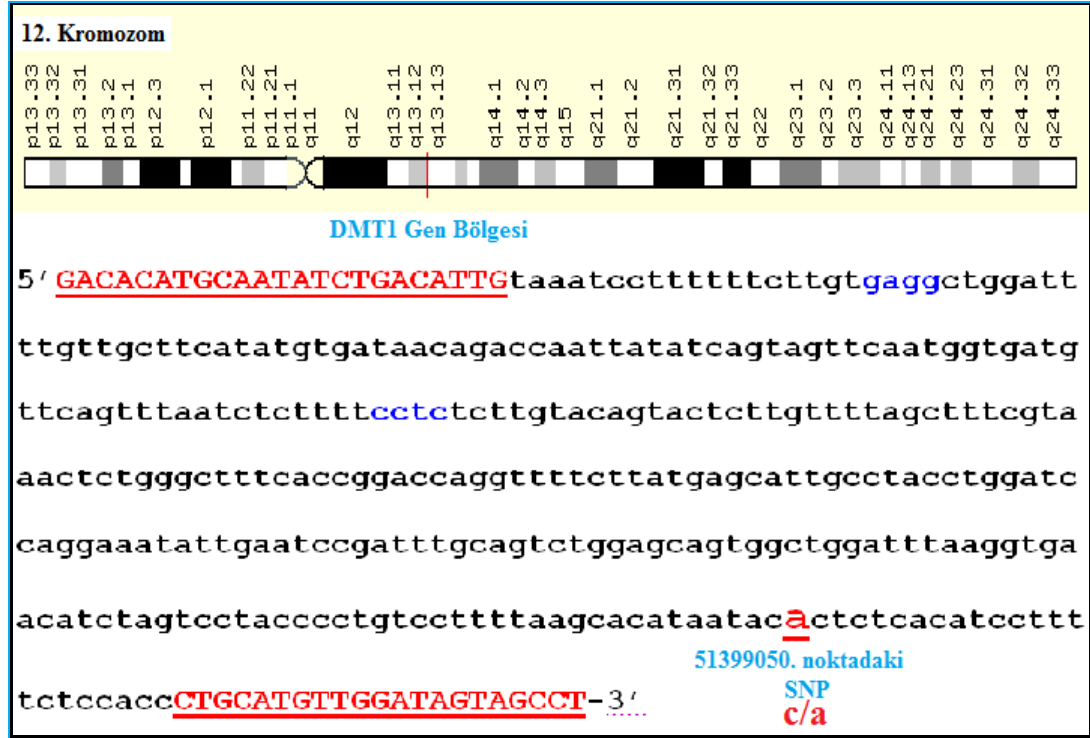


DMT1 demir homeostazisinde önemli görev alıp aşırı demir emilimine engel olarak serbest radikal oluşumunu önler.

1.2.3.5. DMT1 Geni IVS4+44 C/A Bölgesindeki SNP

DMT1 geni kromozom 12q13'de lokalize olmuş, 1671 bp uzunluğunda, 557 aminoasitten oluşan ve birçok dokuda sentezlenen, 90-100 kDa ağırlığında integral membran proteinini kodlayan, 17 ekzon ve 3002 SNP noktası bulunan 3,6 kb'lık bir

gen bölgesidir (Çizelge 1.8). Bu SNP'lerden biri de 12. kromozom üzerindeki 51399050. noktaya denk gelen nükleotiddir. Bu noktada, DMT1 IVS4+44 C/A SNP'ye sahip tipik bireyler C nükleotidi taşırken, atipik bireyler A nükleotidi taşır (Şekil 1.27).



Şekil 1.27. DMT1 geni IVS4C+44 bölgesindeki C/A Tek Nükleotid Değişimi (SNP).

Kelleher ve arkadaşlarının (2004) yaptığı çalışmada DMT1 geninde 4 spesifik mutasyon/polimorfizmin (1245T/C, 1303C/A, IVS4+44C/A, IVS15Ex16-16C/G) varlığı standart PCR tekniği kullanılarak analiz edilmiş ve IVS4+44C/A, 1303C/A, 1254T/C and IVS15Ex16-16C/G polimorfizmlerinin alel frekansı incelenen hasta ve kontrollerde önemli bir farklılık bulunamamıştır. Sonuçta DMT1 geni içindeki polimorfizmlerin Hereditör Hemokromatozis (HH) fenotip etkinliğini etkilememekte olduğunu belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmanın konusunu; toksikolojik önemi olan ve çevrede yaygın olarak bulunan kurşun gibi toksik metaller ile bununla bağlantılı olarak demir gibi esansiyel iz elementlerin insan biyolojik materyalindeki düzeyinin belirlenmesi ve bu düzeylerin DMT1 gen polimorfizmi ile bağlantısı oluşturmaktadır.

Çizelge 1.8. DMT1 geninin bazı SNP'leri. Alel frekansları literatürdeki popülasyon çalışmalarından ortalamalar alınarak hesaplanmıştır (<http://www.genecards.org/> adresinden alınan bilgiler ile yeniden düzenlenmiştir).

SNP ID	12. Kromozomdaki pozisyonu	Sekansı	%	Alel frekansı
rs224589	48430958(-)	AATACC/ACTCTC	17	
rs370462	48436575(+)	GGTAAC/TCTTGA	21	
rs394384	48435545(+)	AGATAT/CGAAGC	17	
rs445520	48434801(+)	TCAAAG/TAATCG	12	
rs422982	48438252(-)	CAAGTT/AGAAGA	10	
rs161046	48424147(-)	AGCAAG/ATGATT	14	
rs12366756	48435102(+)	TACACA/GGAGCC	12	
rs390424	48435256(-)	TAATTC/TAAAGC	11	
rs17125227	48438286(+)	TTCTAT/CCTACC	8	
rs12227734	48424218(+)	TCCCCG/AGTCA	13	
rs11169658	48425719(+)	AAAGAT/CAGTAT	5	
rs12831269	48430349(+)	GGTACC/TGTCTG	7	
rs2239862	48438808(-)	GATTCC/TTCAGT	6	
rs427020	48436363(-)	TTACCG/ACTTTG	9	
rs224454	48425011(-)	AGAGCG/AGGAAT	4	
rs7312269	48436334(+)	CTAATT/GACAAA	2	
rs17125212	48429942(+)	GCAACG/CGTAAG	13	
rs12316220	48438849(+)	GCTATT/GTGATA	8	
rs389829	48435412(-)	ATGCTT/CCCTGG	1	
rs12321633	48427730(+)	CTAGCA/GTCCAA	4	
rs12306082	48432345(+)	TTCACC/TTACAT	4	
rs78357601	48430874(+)	TACACA/GTAAGA	1	
rs374559	48438620(+)	AGCAGT/GACTCA	4	
rs191187	48421784(-)	CCTTAG/CGACTG	5	
rs224579	48423058(-)	TCTGTT/ATCATA	4	
rs389814	48435422(-)	GCTACC/TCATGA	0	Popülasyon verisi yok
rs224588	48429998(-)	CTCCA/GCCGGG	0	Popülasyon verisi yok
rs17216044	48422688(-)	TTCACG/ATTCCT	1	

1.3. DNA

Hücre çekirdeğinde, canlıları oluşturmak için gereken genetik bilgiyi taşıyan yapıya Deoksiribonükleik asit (DNA) denir (Watson ve ark., 1993; Watson, 1968). DNA'da bütün canlıların yaşamı için gerekli proteinlerin sentezi ile ilgili bilginin yer aldığı genler mevcuttur (Collins, 1997). Bütün hücrelerimizin DNA'sında aynı genler bulunmakla birlikte her gen her hücrede aktif değildir. DNA'nın sadece %3'ü genlerden oluşurken diğer %97'lik kısmı ise daha görevini tam olarak bilmediğimiz ve hiçbir proteini kodlamayan bölgelerden oluşur (Passarge ve ark., 1997).

1.4. Genetik Polimorfizm

DNA (Deoksiribonükleik asit) üzerinde bulunan ve herhangi bir ürünün sentezi için gerekli bilgiyi taşıyan spesifik nükleotid bölgesine gen adı verilir. İnsan DNA'sı yaklaşık olarak 3×10^9 baz çiftinden oluşan ve 23 çift kromozom üzerinde 30,000'den fazla gen bulunduran heliks şeklinde bir moleküldür. Yaşamakta olan canlılar birbirinden çok farklı görünmekle beraber DNA seviyesinde şaşılacak derecede benzerlerdir. İki insan arasında DNA'larının yaklaşık %99,9'u benzerdir ve geri kalan %1'i insanlar arasındaki farklı özelliklerin belirlendiği küçük değişikliklerden kaynaklanan kısımdır.

Bir popülasyonda herhangi bir karakter için iki veya daha fazla fenotip bulunuyorsa ve fenotiplerden her biri popülasyonda %1'den daha büyük sıklıkla bulunuyorsa bu duruma genetik **polimorfizm**, bulunma sıklığı %1'den daha az olur ise genetik **mutasyon** adı verilir. Polimorfizmler, zararlı olmayan ya da ılımlı mutasyonlar olarak değerlendirilirken, genetik bir rahatsızlığa neden olmayıp, canlıların üreme kapasitelerini etkilemezler, böylece nesilden nesile aktarılabildiklerinden frekansları yüksektir. Mutasyonların ise canlıların canlılıklarını sürdürebilme özellikleri ve üreme kapasitelerini doğrudan etkilediğinden toplumdaki frekansları fazla değildir (Gonzalez, 1999).

Bir populasyonda alel frekansları Hardy-Weinberg dengesinde bulunmalıdır. Hardy-Weinberg dengesi, belirli koşullar altında her iki alelin frekansının ve genotipik oranının sabit kalması durumudur. Bu genetik dengenin sağlanabilmesi için aşağıda belirtilen şartların oluşması gerekmektedir;

- Populasyon genetik analizler için yeterli sayıda olmalı
- Populasyondan dışarı ve içeri fazla sayıda göç olmamalı
- Üreme tamamen rasgele olmalı
- Mutasyon gözlenmemelidir.

Hardy-Weinberg dengesi ise;

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 \text{ eşitliği ile hesaplanmalıdır.}$$

p: birinci alelin frekansı

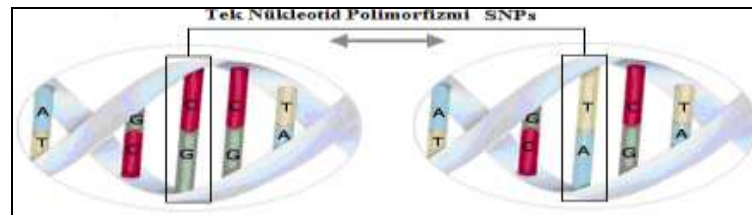
q: diğer alelin frekansı (Ayala ve Kiger, 1980).

1.4.1. Polimorfizm Çeşitleri

Populasyon içerisindeki polimorfizmler oluş şekillerine göre; tek nükleotid değişim (Single Nucleotide Polymorphism-SNP), insersiyon ve delesyon olmak üzere üç başlık altında gruplandırılabilirler.

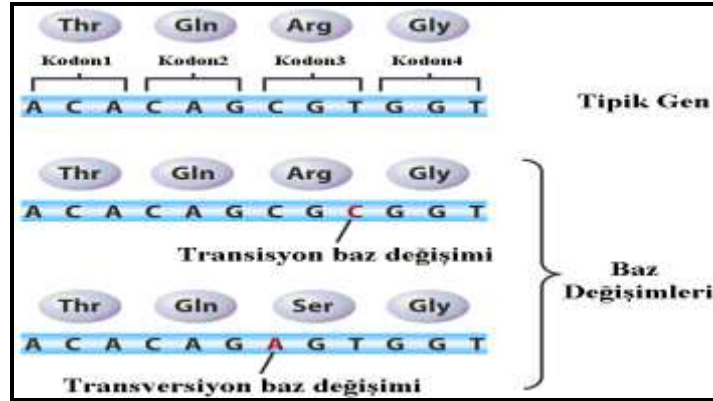
SNP: DNA dizisinde her 2000-2500 bazda bir tek baz değişikliği gözlenirken bu durum aynı tür içerisinde genom farklılığının bir göstergesi olarak kabul edilir. Tek nükleotid değişim polimorfizminin bazı alt grupları ise şunlardır;

Transisyon: Dizi içindeki bir pürin bazının diğer bir pürin bazına (A, G→G, A) veya bir pirimidin bazının (C, T →T, C) diğer bir pirimidin bazına dönüşmesine transisyon denir (Şekil 1.28 ve 1.29).



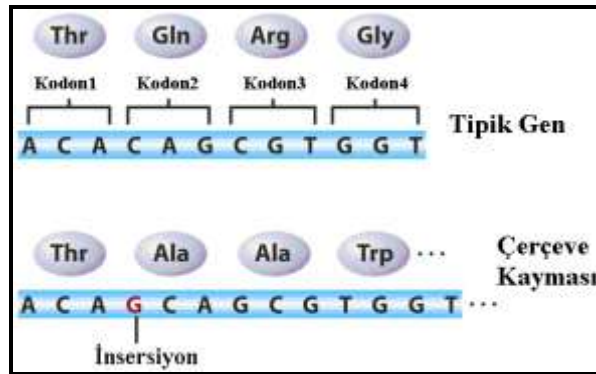
Şekil 1.28. Transisyonla tek nükleotid değişimin gösterilmesi (<http://www.mygenetree.com/images/img-snps.jpg>).

Transversiyon: Dizi içindeki bir pürin bazının bir primidin bazına (A, G →T, C) veya bir primidin bazının bir pürin bazına (T, C→G, A) dönüşmesine transversiyon denir (Şekil 1.29).



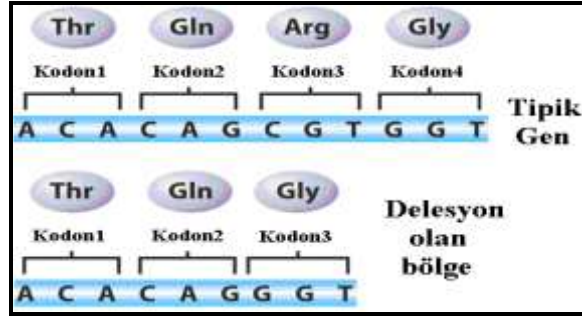
Şekil 1.29. Transisyon ve transversiyonla tek nükleotid değişim oluşumunun şematik gösterimi (<http://chemistry.gravitywaves.com/CHEMXL153/DNAMutationRepair.htm>).

İnsersiyon: DNA'nın yapısına tek bir nükleotid ya da nükleotidlerin eklenmesine insersiyon denilmekte ve nükleotidlerin eklenmesi ile gen normal uzunluğundan daha uzun hale gelir. Eğer bu gen protein kodlayan bir gense, kodlanan proteinin amino asit dizisinde artma olur. İnsersiyonla tek bir nükleotid eklendiğinde dahi çerçeve kayması oluşur ve tüm proteinin amino asit dizilimi değişerek sentezlenecek olan proteinin yapısı tamamen bozulabilir (Şekil 1.30).



Şekil 1.30. İnsersiyonla çerçeve kayması oluşumunun şematik gösterimi (<http://chemistry.gravitywaves.com/CHEMXL153/DNAMutationRepair.htm>)

Delesyonlar: DNA dizisi içerisinde tek bir nükleotidin ya da nükleotidlerin uzaklaşması delesyon olarak adlandırılmakta ve DNA üzerinde oluşan bir delesyon, genin normal uzunluğundan daha kısa olmasına neden olmaktadır (Emir ve Özden, 2006) (Şekil 1.31).



Şekil 1.31. Delesyon ile amino asit eksilmesinin şematik gösterimi (<http://chemistry.gravitywaves.com/CHEMXML153/DNAMutationRepair.htm>)

1.4.2. SNP'lerin Protein Sentezi Üzerine Etkileri

SNP, DNA üzerinde bulunduğu nokta ve meydana geliş şekline göre, proteinin yapı ve fonksiyonu üzerinde değişiklikler meydana getirebilir:

- Kodlanan bölgede sessiz (silent) bir SNP oluşup amino asit farklılığı oluşturmaz ise sentezlenen proteinin yapı ve fonksiyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmaz.
- DNA'da meydana gelen bir SNP, tesadüfen "Dur" kodonunda (UAA, UAG, UGA) oluşmuşsa SNP'nin meydana geldiği noktadan itibaren protein sentezi durur ve yarım kalan sentezlenmiş protein aktif bir şekilde fonksiyonunu yerine getiremez.
- SNP, bir genin sentezini düzenleyen yapıyı içeren promotor bölgede meydana gelmişse transkripsiyonla oluşan mRNA miktarı ve stabilitesi, sonuçta gen ekspresyon düzeyi değişir (Williams ve Hayward, 2001).

1.5. DNA'nın Saflaştırılması

DNA hücre içerisinde serbest halde değil büyük bir kısmı hücre materyalde bulunur ve incelemeye geçmeden önce DNA molekülleri hücre materyalden ayrıştırılmalıdır. Bazı kimyasal maddeler ve enzimler aracılığı ile hücrelere ait hücre zarı veya duvarının parçalanıp DNA'nın saf olarak elde edilmesine DNA izolasyonu denir. DNA hücre ortamında korunmak amacıyla hücre materyalleri tarafından paketlenmiş olarak bulunur ve bu koruma kalkanı DNA analizlerini etkiler. Bu

nedenle DNA molekülünden proteinleri ve hücre sel materyalleri uzaklaştırmak amacıyla farklı DNA saflaştırma yöntemleri vardır ve kullanılacak biyolojik materyalin özelliğine göre seçilir. Bunlardan bazıları; organik (Fenol-Kloroform), Chelex ve ticari hazır kitler ile gerçekleştirilir. DNA izole edildikten sonra saf su ya da tris-EDTA (TE) tamponu içerisinde -20°C 'de saklanır (Butler, 2005).

1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction: PCR)

PCR ilk kez Kary Mullis tarafından 1985 yılında bulunmuş ve Mullis bu buluşu ile 1993 yılında kimya dalında Nobel Ödülünü kazanmıştır. PCR, nükleik asitlerin *in vitro* (hücre dışı) ortamda tüp içerisinde çoğaltılmasını sağlayan yöntem olup bu buluş moleküler genetik çalışmalarda bir dönüm noktası olmuştur. Bir organizmanın DNA'sının bilinen herhangi bir bölgesinin çok hızlı ve başarılı bir şekilde çoğaltılması bu yöntemle mümkün olmuştur (Kubista ve ark., 2006). PCR analizi; moleküler biyoloji ve genetik, evrim, farmakoloji, onkoloji, toksikoloji, kriminoloji ve paleontoloji gibi çok farklı disiplinlerde; farmakogenetik ve toksikogenetik araştırmalarda, mutasyon ve polimorfizm çalışmalarında, Adli Tıp'ta, *in vitro* mutasyon oluşturulmasında, genetik bozuklukların incelenmesinde, DNA sekanslama çalışmalarında, enfeksiyon hastalıklarında bakteri ve virüslerin teşhisinde, evrimin aydınlatılması ve fosillerden DNA amplifiye edilmesinde, onkogenlerin belirlenmesinde, doğum öncesi genetik tanı konulması çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Butler, 2005; Wright ve Wynford-Thomas, 1990).

1.6.1. PCR'in Aşamaları

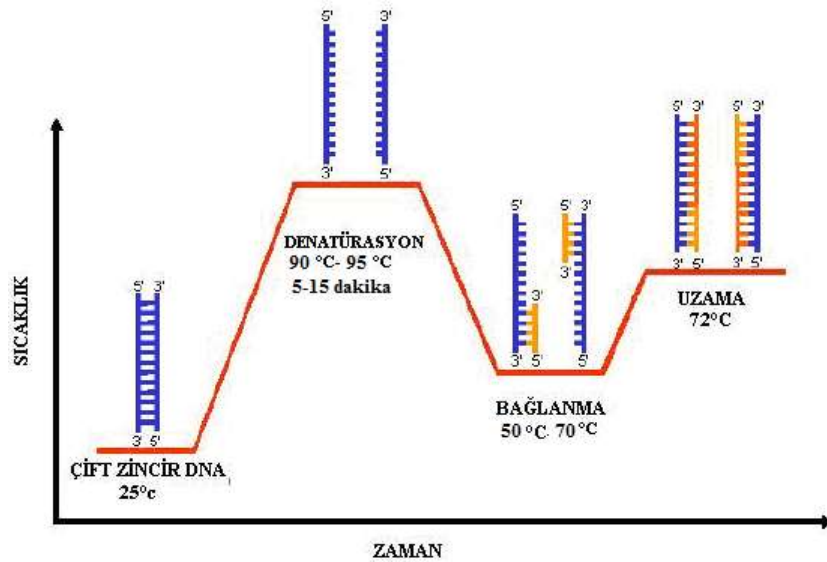
PCR esas olarak 3 aşamanın tekrarından oluşmaktadır;

1-Denatürasyon: Çoğaltılacak olan DNA parçası denatüre edilerek (çift iplikçik ayrılarak) tek iplikçikli hale getirilir. Genomik DNA çekirdek içeren bir çok hücreden; kan, kemik, semen, saç, doku, mumyalanmış kalıntılar ve fosillerden elde edilebilir. Bu amaçla çift sarmal halde olan DNA, iki ayrı tek iplikçik haline gelene

kadar yaklaşık 90-95°C'de 5-15 dakika ısıtılır. Ayrılan bu tek iplikçikler sentez aşamasında kalıp DNA olarak görev yaparlar.

2-Annealing (Primerin Hedef Bölge ile Eşleşmesi): Primerler, çoğaltılacak DNA parçasının uçlarındaki dizilere özel olarak bağlanabilen 17-30 nükleotid uzunluğundaki yapay oligonükleotidlerdir. Reaksiyon sıcaklığı primerlerin Tm değerlerine göre 50-70°C arasında bir değere ayarlanarak primerlerin DNA üzerinde tamamlayıcı olduğu bölgeyle eşleşmesi sağlanır. Primerin bağlanma yeri hedeflenen DNA bölgesinin çoğaltılmaya başlandığı noktadır.

3-Elongation (Zincir Uzaması): Orjinal DNA zincirlerine tamamlayıcı iki yeni zincirin sentezini gerçekleştirmek üzere, DNA polimeraz ve deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP) reaksiyon karışımına eklenir. Taq DNA polimeraz kalıba uygun olarak primerin 3'-hidroksil ucuna nükleotidleri ekler. Bu süreç hedef DNA boyunca devam eder ve DNA her zaman 5' ucundan 3' ucuna doğru uzar. Böylece hedef DNA'nın birçok tamamlayıcı kopyası elde edilir. DNA sentez işlemi 70-75°C arasında gerçekleşir (Şekil 1.32).



Şekil 1.32. PCR programı (http://www.genetiklab.com/altsayfa.php?giris_ID=1&tablo=tbl_yontemler)

Bu üç aşamanın defalarca tekrarlanması ile reaksiyon gerçekleşir ve her bir döngü sonunda her bir kalıp DNA iki katına çıkar. Dolayısıyla bu basamaklar 30-40 kez tekrarlandığında kalıp DNA 2^{30} - 2^{40} kez çoğaltılmış olur. Böylece araştırılacak

bölgenin milyarlarca kez çoğaltılmasıyla oluşan PCR ürününün kolayca analiz edilmesi olanaklı hale gelir. PCR yöntemi ile 50-100 bp kadar kısa ve 2,5 kbp kadar uzun DNA dizileri çoğaltılabilmektedir (Kubista ve ark., 2006; Bozkurt ve ark., 2000; Nelson, 1991; Siqueira, 2003; Butler, 2005) (Şekil 1.33).

Standart bir PCR reaksiyonu için ortamda bulunması gereken bileşenler; kalıp DNA örneği, sentetik oligonükleotid primerler, dNTP'ler (A,T,C,G), Taq DNA Polimeraz enzimi ve tampon çözeltilerden oluşur (Wilson, 1997) (Çizelge 1.9).

1.6.2. Standart PCR Bileşenleri

1) Kalıp DNA örneği: PCR'da kullanılan DNA nükleer, mitokondriyal, bakteriyal ve plazmid DNA olabilir.

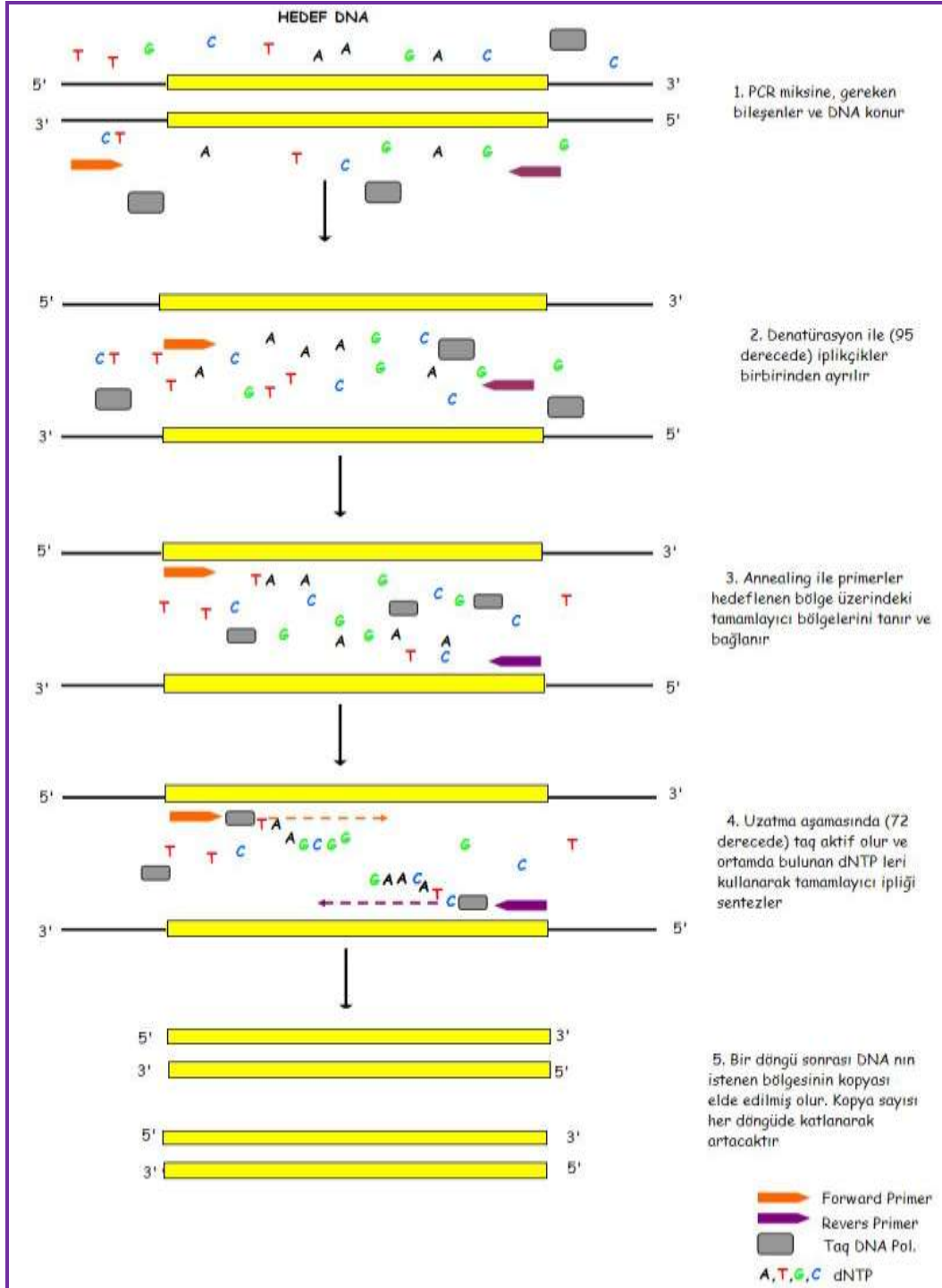
2) Sentetik oligonükleotid primerler: DNA üzerindeki çoğaltılacak her bir bölge için özgün bir çift (Forward:F ve Reverse:R) primer kullanılmalıdır. Primerler;

- genom üzerinde sadece tek bir bölgeyi komplementer olarak tanımalı ve DNA üzerinde başka bölgeye bağlanmamalı,
- 17-30 nükleotid uzunluğunda ve Tm değerleri birbirine yakın olmalı,
- kendi içerisinde ve birbirleri arasında komplementer yapı oluşturmamalı,
- Primer dizindeki A, T, C, G bazları olabildiğince eşit ve homojen olarak dağılmalıdır (Pusterla ve ark., 2006).

3) dNTP'ler (A, T, G, C): dNTP karışımındaki A, T, G ve C bazları eşit yoğunlukta olmalıdır.

4) Taq DNA Polimeraz enzimi: *Thermus aquaticus* adlı bakteriden elde edilen ısıya dayanıklı bir enzim olup maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 72°C'dir. dNTP'leri tanıyarak ayırt edebilme ve saniyede yaklaşık 100 dNTP'yi diziyeye ekleyebilme yeteneğindedir. Denatürasyon aşaması uzun süren PCR'lerde Hot Start Taq DNA Polimeraz enzimleri tercih edilmelidir (Şekil 1.34).

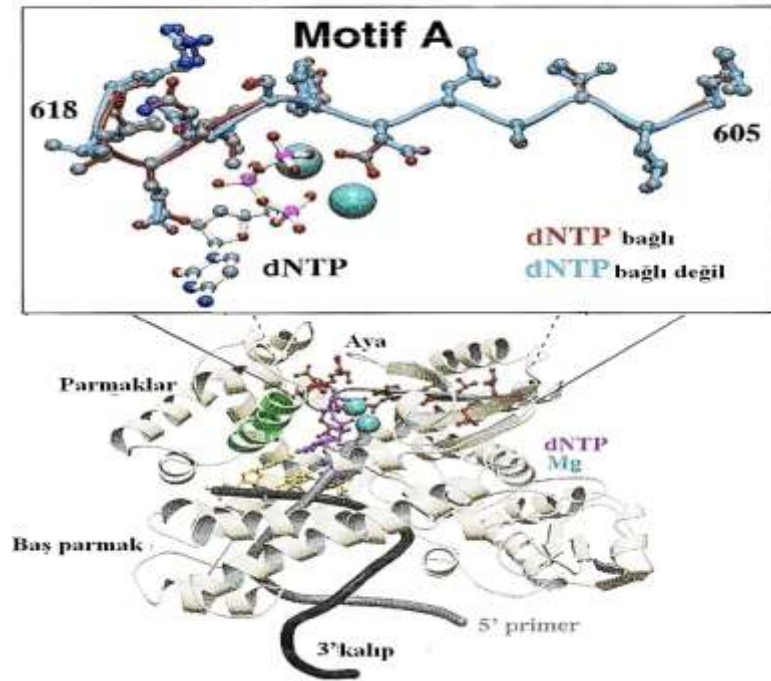
5) Tampon karışımı: Tampon içerisinde Tris, magnezyum (Mg), KCl, çeşitli deterjanlar ve tuzlar bulunmaktadır. Reaksiyon tamponunda kullanılan $MgCl_2$ spesifik olmayan amplifikasyonu nötralize ederken; KCl, Taq DNA polimeraz'ın sentez hızını artırmaktadır.



Şekil 1.33. PCR'in aşamaları (<http://www.drzeydanli.com.tr/index.php?page=icerikgoster&menuID=30>)

Çizelge 1.9. Standart bir PCR’da bulunması gereken bileşenler ve miktarları

Bileşen	50 µl’lik Reaksiyon Tüpündeki Konsantrasyon
10X PCR Buffer	1X
MgCl ₂ (25 mM stok çözelti)	1-5mM
dNTP mix	Her birinden 0,2 mM
Primer 1	0,2-0,5 µM
Primer 2	0,2-0,5 µM
Taq DNA Polimeraz	1,25-2,5 Unit
Genomik DNA	200 ng



Şekil 1.34. Taq-DNA polimeraz 1 enziminin yapısı (Premal ve ark., 2000)

1.7. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP) Yöntemi

Restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri, çift iplikçikli DNA'nın spesifik bölgelerinden kesim yaparak DNA'dan bir genin veya gen taşıyan bir DNA parçasının çıkarılmasında etkin fonksiyonları olan ve 4-6 baz uzunluğundaki DNA

parçalarını tanıyarak bu dizilimlere yakın bölgelerden veya bu dizilimler içerisindeki spesifik yerlerden DNA'yı kesen enzimlerdir (Murray, 2000; Pearson, 1985).

Restriksiyon enzimi ilk kez 1970 yılında Hamilton Smith ve Kent Wilcox tarafından izole edilmiş (Roberts ve Macelis, 1991) ve bu yıldan sonra yoğun olarak rekombinant DNA teknolojisinde, gen dizilerinin belirlenmesinde, protein ve polimorfizm çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde 200'den fazla farklı DNA dizilimini tanıyan, yaklaşık 3000'den fazla restriksiyon enzimi bulunmakta ve bunların büyük bir kısmı bakterilerden çok az bir kısmı da virüs ve ökaryotlardan izole edilmektedir (Aggarwal, 1995; Pingoud ve Jeltsch, 1997; Murray, 2000).

1.7.1. Restriksiyon Endonükleaz (RE) Enzimlerinin Sınıflandırılması

Tip I (RE)'ler hem metilasyon hem de modifikasyon yapabilen hedef dizilimlere bağlanmalarına rağmen kesim işlemini dizilim dışında ve rasgele gerçekleştirirler. Enzimin metilasyon aktivitesi kesim işleminde belirleyici faktördür.

Tip II (RE)'ler moleküler biyoloji alanında restriksiyon enzimlerinden bahsedildiğinde kastedilen enzimler bu tiplerdir. Tip II RE'ler dizilimdeki bir bölgeyi tanıyarak tam hedef nükleotidden kesim yapabilme özelliğine sahiptirler (Pingoud ve Jeltsch, 1997). Bu özelliklerinden dolayı moleküler biyoloji ve klonlama araştırmaları için oldukça idealdirler.

Tip III (RE)'ler de tip I'ler gibi metilasyon ve modifikasyon yapabilen restriksiyon enzimler olup dizilimi tanımalarına rağmen rasgele ve yakın yerden kesim işlemini gerçekleştirirler. Dolayısı ile tip III enzimleri klonlamada ve moleküler genetik çalışmalarında tercih edilmemektedir (Meisel ve ark., 1995).

RE ile kesim yapıldıktan sonra agaroz jelde görüntülenebilen farklı uzunluktaki oligonükleotidlere göre polimorfizmler, nokta mutasyonlar, insersiyon ve delesyonlar

belirlenebilmekte ve RE'ler sadece o bölgeye özgü olduklarından güvenilir ve doğru sonuçlarla alel tiplmeleri yapılabilmektedir.

Sonuçlar agaroz jelde görüntülenecekse ve kesim sonucunda birbirine yakın uzunlukta oligonükleotidler oluşuyorsa bu yöntemle ayırım yapmak oldukça zorlaşmakta ve analiz için kaliteli ve fazla miktarda DNA'ya gereksinim duyulmaktadır. Enzim kesiminde inkübasyon süresi nedeniyle uzun laboratuvar çalışması gereksinimi ve kullanılan enzimlerin pahalı olması gibi dezavantajları da vardır (Dowling ve ark., 1996).

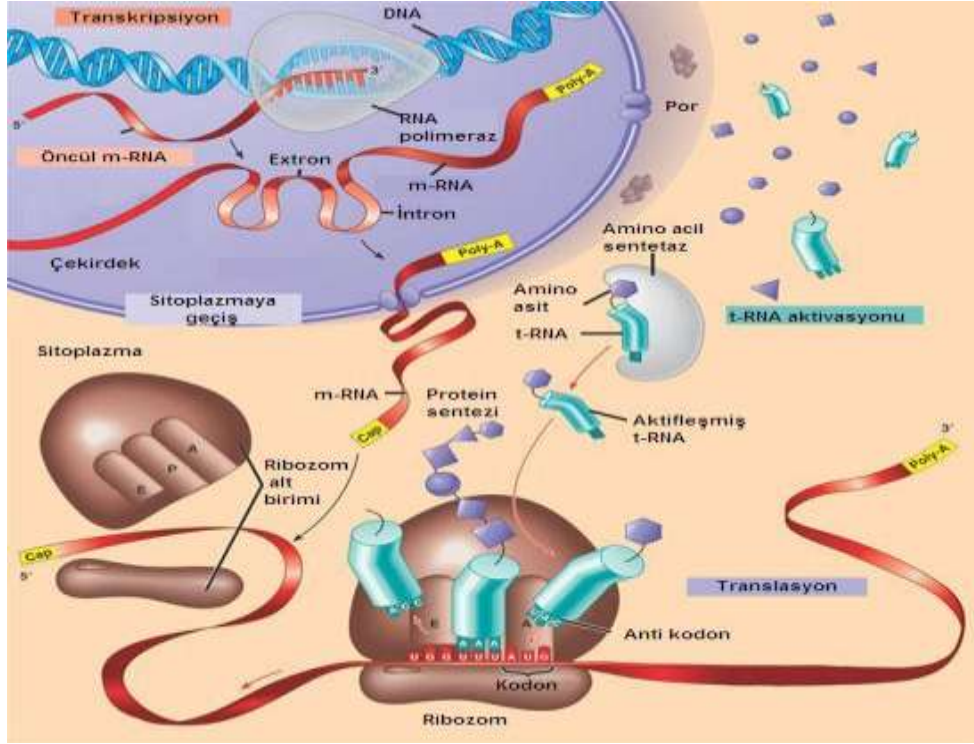
1.8. Gen Ekspresyonu

Gen ekspresyonu DNA üzerinde kodlanmış olan kalıtsal bilginin, özgün yapı ve işlevleri olan proteinlere dönüştürülmesine denilmekte ve replikasyon, transkripsiyon ve translasyon olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır. Replikasyon ve transkripsiyon işlemleri çekirdekte meydana gelirken translasyon işlemi ise sitoplazmada gerçekleşmektedir.

1. Replikasyon DNA'nın taşıdığı kalıtsal bilgileri sonraki nesillere aktarabilmesi için kendi kopyasını oluşturmasıdır. Bu aşamada görev alan enzimler DNA polimeraz, DNA ligaz, topoizomeraz şeklinde sıralanabilir. DNA'nın replikasyonu semikonservatif olup bir DNA molekülünün iki ipliğinden her biri yeni bir DNA ipliği sentezi için bir kalıp olarak görev görür ve sentez sonunda meydana gelen iki yeni DNA molekülü yeni ve eski ipliği içerirler.

2. Transkripsiyon DNA'da kodlanan genetik bilgilerin RNA polimeraz II enzimi ile bir RNA molekülü (mRNA, tRNA, rRNA) şeklinde yazılması olayıdır ve burada genetik bilginin RNA'ya aktarılması sözkonusudur. Bu aşamada öncelikle DNA öncül mRNA'yı kodlar, daha sonra splicing (uç uca birleştirme) işlemi ile intronlar (protein sentezine katılmayan DNA dizileri) çıkarılır ve ekzonlar (proteine dönüştürülen DNA dizileri) olgun mRNA'yı oluştururlar.

3. Translasyon transkripsiyonla DNA'dan RNA'ya aktarılan genetik bilginin bir protein veya polipeptit zinciri şekline dönüştürülmesi olayıdır ve bu işlem sitoplazmada bulunan ribozomlarda gerçekleşmektedir (Conaway ve Conaway, 1993; Butler ve Kadonaga, 2002) (Şekil 1.35).



Şekil 1.35. Protein sentezi (<http://www.lisebiyoloji.com/protein%20sentezi.html>)

1.9. Biyolojik Materyallerde Metal Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

1.9.1. Atomik Absorbsiyon Spektrometresi (AAS)

Atomik absorpsiyon yöntemi, temel enerji seviyesinde oluşturulmuş serbest analit atomlarının meydana gelmesine ve bu atomlara özgü dalga boyundaki ışığın kullanılması esasına dayanır. Atomların absorpsiyonunun ölçülmesi için uygun şekilde getirilmesini sağlayan yöntem atomlaştırma yöntemidir. Diğer spektrokimyasal yöntemler gibi atomik absorpsiyon spektrometresi de genellikle analit sıvı halde olmak üzere elementlerin düzeyinin belirlenmesini sağlar. AAS sulu çözeltilerin, seyreltilmiş örneklerin veya organik çözücü gibi diğer çözücülerle seyreltilmiş elementlerin analizi için kullanılan en uygun yöntemdir. Atomik absorpsiyon spektrometresinde kullanılan alevli ve grafit fırınlı AAS olmak üzere iki çeşidi vardır.

1.9.1.1. Alevli Atomik Absorbsiyon Spektrometresi (AAAS)

Alev en çok kullanılan atomlaştırıcı hücre tipidir. Alev, kullanılan gaz, gazın akışı, gazın boyutu ve biçimi, alevin kendi sıcaklığı ve karıştırılma şekli ile değişik özellik gösterir (Ramirez-Munoz, 1968). Cihazın çalışma prensibi, bir absorbsiyon tekniği olduğundan elemente özgü ışık, örneğin içinden geçirilmelidir. Bu durum düşük basınçta, bir soy gazla doldurulmuş camdan oluşan ve *oyuk katot lambası* olarak adlandırılan özel bir lamba ile meydana getirilir (Ewing, 1985). Çözeltideki örnek aleve püskürtüldüğünde uçucunun buharlaşma sıcaklığına kadar ısıtılırken yeterince yüksek sıcaklığa kadar ısıtılan katılar bileşiklerine ayrılırlar ve sonunda elementel forma geçerler. Bu durumda gaz halindeki atomlar ışık kaynağından gelen elektromanyetik radyasyonu absorbe ederler (Bennett ve Rothery, 1983). AAAS ile yapılan ölçümler genellikle ppm seviyesindedir (Varian Australia Ltd., 1997).

1.9.1.2. Grafit Fırınlı Atomik Absorbsiyon Spektrometresi (GFAAS)

Grafit Fırınlı metod; yüksek sıcaklıkta gaz halinde bulunan element atomlarının elektromanyetik ışınları absorblaması ilkesine dayanır. Grafit fırınlı atomlaştırıcıda, alev yerine bir argon yatağında bulunan elektrikle ısıtılan grafit tüp geçer. Az miktarda örneğin grafit tüpüne yerleştirilmesiyle argon gazı, grafit tüpün hızla yüksek sıcaklığa ulaşması ile kurutma ve külleme aşamalarıyla matriks bileşenlerinin ve diğer engelleyici maddelerin ışık yolundan uzaklaştırılmasını sağlar. Grafit tüpe verilen analit atomlaşır ve atomlar grafit tüp içinde tutulur. Gaz fazında serbest analit atomlarından dolayı oluşan absorbans ölçülür (Holcombe ve Borges, 2006). Burada hassasiyet ve tanımlama sınırları ppb seviyesine kadar düşmektedir (Varian Australia Ltd., 1997).

Bu çalışmada; Toplumumuzdaki DMT1 gen bölgesindeki polimorfizm oranı, bu polimorfizmin toplumumuzda bilinen bir toksik metal maruziyeti olan bireylerdeki toksik metal birikiminde ve esansiyel metal düzeyinde ne ölçüde rol oynadığı araştırılacaktır. Bu amaçla; bireylere ait örneklerde DMT1 geni IVS4+44 C/A bölgesindeki polimorfizm belirlenerek tam kan örneklerindeki metal düzeyleri tespit edilecek ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olup olmadığı araştırılacaktır. Bu verilerin sonuçları ile toplumumuzdaki bireylerin metallere maruz kalma sonucunda ortaya çıkabilecek sağlık sorunlarına dikkat çekilebileceği düşünülmektedir.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

100 bp ladder	Fermentaz
6X loading çözeltisi	Qiagen
Agaroz	Prona
Ammonyum dihidrojen fosfat	Merck
Asetik asit	Merc (Germany)
Borik asit	Merck
delta-Aminolevülinik asit	Merc 1.24802
DNA's RNA's free water (DNA, RNA içermeyen su)	Qiagen
EDTA	Merck
Etanol	Merck
Etidyum Bromür	Applichem
Etil asetat	Sigma-Aldrich (USA)
Fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1)	Applichem
Hidroklorik asit	Merc-3142504
Hot Star Taq DNA polimeraz	Qiagen
Kan DNA izolasyon kiti	Qiagen
Metil asetoasetat	Sigma M-4376
Nitrik asit (HNO ₃) (%65'lik)	Merck
Pb/Fe Standart Çözeltisi	AA Standart Etanol pour SCP
p-Dimetilaminobenzaldehit	Sigma D-8904
Primerler	Alpha DNA, Montreal
Proteinaz K	Merck
Restriksiyon Enzimi (MnII)	Neb (New England Biolab)
Saf etanol	Scharlau, Dop

Sodyum asetat.3 H ₂ O	Sigma-Aldrich (25022)
Trizma Base	Merck
Uroporfirin-I standart	Frontier Scientific (USA)

2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Argon tüpü	
Asetilen tüpü	
Atomik Absorbsiyon Spektrometresi	Varian AA24OFS Fast Sequential
Elektrikli hassas terazi	Schimadzu Libror
Ependorf tüp (steril;1,5 ml ve 0,2 ml)	Axygen Genuine
Etüv	Memmert
Grafit Komponent Tüpler	Varian GTA
Grafit Tüp Atomizer	Varian GTA 120
Güç Kaynağı	Bio-Rad
Hassas terazi	Mettler Toledo 4 Digit
Hava kompresörü	Altus
Jel Görüntüleme cihazı	Syngene
Kreatinin	Ectachem DT60 11
Laminar Flow kabin	Esco
Laptop Cooler (-20°C)	Sigma
Manyetik Karıştırıcı	Mirak
Mikrodalga fırın	Arçelik
Mikrodalga fırın	Mars X Press
Otoklav	Nüve
Otomatik mikropipet (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Ependorf, Thermo, Tipor-V
pH metre	Seven Multi Mettler Toledo
Pipet uçları (pirojen free filtreli)	Finntip
Santrifüj	Heraeus Sepatech Labofyge 200
Soğutmalı santrifüj cihazı	Hettich

Spektrofotometre	Cintra303
Mikrosantrifüj	NüveNF1215
Florimetre	Perkin Elmer LS 55
Su banyosu	Nüve Bm 402
Su Purifikasyon Sistem	Human Up 900
Thermal Cycle PCR cihazı	Techne Tc 512
Vial (2 ml)	Pothtech Elkay
Vorteks karıştırıcı	Biosan
Yatay elektroforez cihazı	Scie-Plas
Zeeman Absorbsiyon Spektrometrisi	Varian AA240Z

2.1.3. Deney Protokolü

2.1.3.1. Sıvı Kan ve İdrar Örneklerinin Toplanması

Ttoplumumuzda mesleki olarak Pb maruziyeti olan ve 2009 yılı içerisinde Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesine başvuran erkek bireylerden antikoagulan olarak K₂EDTA içeren mor kapaklı vakumlu tüpler içerisinde 4,5 ml kan örneği alındı ve üzerleri etiketlenerek çalışma yapılana kadar +4°C'de muhafaza edildi. İdrar örnekleri, sabah idrarı olmak üzere herhangi bir kontaminasyonu önlemek için kapaklı/steril 50 ml'lik polipropilen kaplara alınarak analiz yapılınca kadar -20°C de korundu. Sonuçlar kan için mikrogram/l, idrar için mikrogram/g kreatinin olarak değerlendirildi. Çalışmada her gönüllü için belirlenen sağlık sorunu yanında; boy, kilo, yaş, çalışma süresi, yaşadıkları bölge, sigara kullanım durumu, miktarı ve süresi kaydedildi. Bu çalışma; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurulunun 20.10.2008 tarih, 139-4071 sayılı kararı ile yürütülmüştür.

2.1.4. Yöntem

Çalışmamız iki bölümden oluşmakta olup ilk bölümde toplumumuzdaki bireylerin DMT1 geninin IVS4+44 bölgesinde bulunan C→A polimorfizmi belirlenmiş, ikinci bölümde ise polimorfizm belirlenmiş bireylere ait tam kan örneklerinde Fe, Pb ve EP

konsantrasyonları ile idrar örneklerinde ALA ve total porfirin düzeyleri ölçülerek aralarında korelasyon olup olmadığı araştırılmıştır.

2.1.4.1. DMT1 geninin IVS4+44 bölgesinde bulunan C/A SNP'sinin belirlenmesi

2.1.4.1.1. DNA İzolasyonu

2.1.4.1.1.1. Sıvı Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Sıvı kan örneklerindeki nükleer DNA'yı açığa çıkarabilmek amacıyla, "Qiagen Blood" izolasyon kiti kullanıldı.

1. Sıvı kan örneklerinden 200 µl 1,5 ml'lik eppendorf tüp içerisine alınarak üzerine 180 µl ATL Buffer ve 20 µl Proteinaz K eklendi.
2. 56°C'lik su banyosunda 2-2,5 saat süre ile inkübe edilirken her yarım saatte bir örnekler vorteks yardımı ile karıştırıldı.
3. Üzerine 200 µl AL Buffer eklenerek 70°C'lik su banyosunda 10 dakika inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrasında örnek üzerine oda sıcaklığında bulunan 200 µl saf etanol ilave edildi.
5. Kısa bir karıştırmadan sonra solüsyonun tamamı filtreli kolona aktarılarak 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi, toplama tüpü atılarak yerine yenisi konuldu.
6. 500 µl AW1 Buffer eklenerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi, yine yıkama sonrası toplama tüpü atılarak yerine yenisi konuldu.
7. 500 µl AW2 Buffer eklenerek 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpü atıldı.
8. Kolonun altına bu kez toplama tüpü yerine 1,5 ml'lik ependorf tüp konuldu ve kolon içerisine 150 µl RNase-DNase free (RNA, DNA içermeyen) su ilave edildi.
9. Kolon ve ependorf tüp iç içe geçmiş şekilde 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek kolondan suda çözülmüş saf DNA'nın ependorf tüpe geçmesi sağlandı ve kolon atıldı. Ependorf tüpte yaklaşık 100 µl DNA örneği toplandı.
10. İzole edilen DNA örnekleri analiz edilinceye kadar -20°C'de muhafaza edildi.

2.1.4.1.2. Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi

Sıvı kan örneklerinden genomik DNA'nın izole edilip edilmediğinin analizi %0,5'lik agaroz jel elektroforezi ile belirlendi.

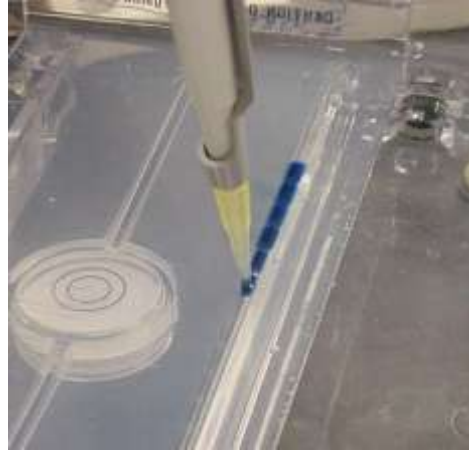
2.1.4.1.2.1. %0,5'lik Agaroz Jelin Hazırlanması

1. 0,6 gr agaroz tartılarak 120 ml 1X TBE çözeltisi içerisinde çözüldü.
2. Mikrodalga fırında agaroz bulunan erlen mayerin ağzı alimünyum folyo ile kaplanarak taşmayı önlemek için üzerinde delikler açıldı ve en yüksek ısıda kaynatıldı.
3. Çözelti ısısı oda sıcaklığında 50–60°C'ye düşünceye kadar beklendi.
4. Agaroz çözeltisi üzerine 10 µl EtBr (10 mg/ml) eklendi ve çözelti pembeleşip homojen bir görünüm oluşuncaya kadar erlen mayer hafifce çalkalandı.
5. Jel kalıbı monte edilerek jel tarakları uygun şekilde yerleştirildi ve agar hava kabarcıkları oluşmayacak şekilde kalıba döküldü. Jel üzerinde hava kabarcıkları oluşmuş ise jel katılaşmaya başlamadan hemen pipet ucu yardımı ile uzaklaştırıldı.
6. Jelin katılaşması için oda sıcaklığında 30-45 dakika kadar bekletildi.
7. Agaroz jel kalıbında taraklar ve bariyerler çıkarılarak katılaştıran jel elektroforez tankına yerleştirildi. Jel kuyucuklarının, elektroforez yürüme tankının katot elektrot (-) tarafına yerleştirilmesine dikkat edildi.
8. 1X TBE çözeltisi, jelin üzerini 2-3 mm kadar kaplayacak miktarda tank içerisine eklendi.

2.1.4.1.2.2. Agaroz Jel'e Yükleme İçin Örnek Hazırlanması ve Yürütme Koşulları

1. 15 cm uzunluğunda parafilm alınarak buz kalıbı üzerine yerleştirildi.
2. 1µl 6X Jel Loading Buffer ve 5 µl DNA örneği parafilm üzerine konularak mikropipet ile yavaşça karıştırıldı ve homojenizasyonu sağlandı.
3. Oluşturulan toplam 6 µl homojen karışım dikkatli bir şekilde jeli parçalamadan jel kuyucuklarına yerleştirildi (Şekil 2.1).

4. Elektroforez tankının kapağı kapatılarak güç kaynağının anot ve katot uçlarının bağlantıları takıldı.
5. Güç kaynağı 100 volt ve 70 ampere ayarlanarak jel içerisindeki numuneler 45 dakika süre ile elektroforeze tabii tutuldu.
6. UV ışığı altında, Jel görüntüleme cihazında elektroforez sonucu değerlendirildi.



Şekil 2.1. Agaroz jel kuyucuklarına örneklerin yüklenmesi

2.1.4.1.3. PCR

PCR işlemi TECHNE TC 512 Thermal Cycle cihazında yapıldı ve aşağıda belirtilen işlemler uygulanarak hedeflenen DNA bölgesinin her biri 2^{35} defa çoğaltıldı. Her PCR analizinin kontrolü, pozitif ve negatif örnekler kullanılarak yapıldı.

PCR işlemi sırasında olası kontaminasyonu önlemek amacıyla;

- ✓ DNA izolasyonu ve PCR farklı ortamlarda yapıldı,
- ✓ Her analiz öncesi ve sonrasında çalışma ortamı, otomatik pipetler ve kullanılan araçlar %70'lik alkol ile temizlendi,
- ✓ Steril eppendorf tüpler ile filtreli pipet uçları kullanıldı,
- ✓ Amplifikasyon ve enzim kesim işlemleri hava sirkülasyonu olan laminar kabin içerisinde yapıldı, işlem öncesi ve sonrasında en az 45 dakika süre ile UV sterilizasyonu yapıldı,
- ✓ Analizler sırasında steril ve pudrasız eldivenler kullanıldı, çalışma sırasında eldivenler sık sık yenileri ile değiştirildi.

2.1.4.1.3.1. Primerler

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

Primerlerin sentezi High Performance Salt Free (HPSF) yöntemi ile Montreal'deki Alpha DNA firmasına tarafından gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan primerler ve özellikleri aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir (Çizelge 2.1) (Kelleher ve ark., 2004).

2.1.4.1.3.2. PCR Bileşenleri ve PCR Programı

Standart bir PCR reaksiyonunda PCR Buffer, MgCl₂, dNTP karışımı, Hot Start Taq DNA Polimeraz, F Primer, R Primer ve DNA bileşenleri bulunur.

Çalışmada kullanılan 50 µl'lik PCR reaksiyonunun bileşenleri, bileşenlerin stok konsantrasyonları, reaksiyondaki miktarları ile reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonlarına ait bilgiler Çizelge 2.2 'de verilmiştir.

PCR programı aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

- + 94 °C'de 10 dakika
 - + 94 °C'de 1 dakika
 - + 60 °C'de 1 dakika
 - + 72 °C'de 1 dakika
 - + 72 °C'de 5 dakika
 - + 4 °C'de ∞ dakika
- } 35 döngü

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

Çizelge 2.1. Amplifikasyonda kullanılan primerler, özellikleri, çoğaltılan DMT1 geni IVS4+44 C/A bölgesinin kromozom üzerindeki lokalizasyonları ve amplifiye edilen bölgenin nükleotid dizilimleri. Koyu ve altı çizili olan “a” bazı 51399050. noktada bulunan ve A→C değişimini gösteren polimorfik nükleotiddir.

ÖZELLİKLER	F PRİMER 5'-gacacatgcaatatctgacattg-3' (Kro.12:51399007-51399031)	R PRİMER 5'-ctgcatgttgatagtagcct-3' (Kro.12:51399335-51399357)
Uzunluk	23 bp	21 bp
GC içeriği	%39,1	%47,6
Erime Sıcaklığı (T _m)	58,0 °C	57,0 °C
Primerler arası T _m farkı	1,0 °C	
PCR ürününün uzunluğu (51399007-51399357) bazlar arasındaki sekansı	<p style="text-align: center;">351 bp</p> <p>5'<u>GACACATGCAATATCTGACATTG</u>taaactctttttctgtgaggctggat ttgttgcttcatatgtgataacagaccaattatatacagtagtcaatggatggtcagtttaact cttttcctctctgtacagtagtctgttttagcttcgtaaactctgggcttcaccggaccaggttt cttatgagcattgectactggatccaggaatattgaatccgatttgcagtctggagcagtggt ggatttaaggtgaacatctagctaccctgtcctttaagcacataatac<u>actctcacatccttt</u> ctccacc<u>CTGCATGTTGGATAGTAGCCT</u>-3'</p>	

Çizelge 2.2. PCR bileşenleri ile stoktaki ve reaksiyondaki konsantrasyonları.

BİLEŞEN	Stok Konsantrasyon	Reaksiyona Konulan Miktar	50 µl'lik Reaksiyon Karışımındaki Final Konsantrasyon
10 X PCR Buffer	10X	5 µl	1X
MgCl ₂	25 mM	3	1,5 mM
dNTP karışımı	2mM	5	200 µM
F Primer	10 pmol/ µl	1 µl	10 pmol
R Primer	10 pmol/ µl	1 µl	10 pmol
Hot Star Taq DNA Polimeraz	5 U/ µl	0,25 µl	1,25 U
DNA			~200 ng
Steril H ₂ O		50 µl'ye tamamla	

2.1.4.1.3.3. PCR Ürünü İçin Agaroz Jel Hazırlanması

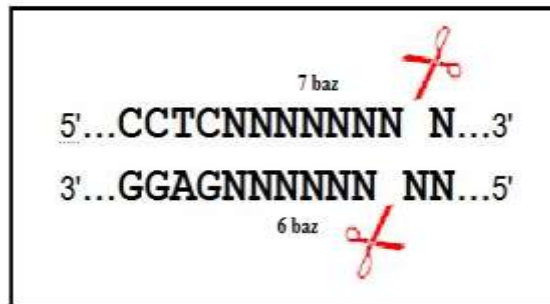
İstenilen DNA bölgesinin çoğaltılıp çoğaltılmadığı PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforezi ile belirlendi. Bunun için 2,4 gr agaroz tartılarak 120 ml 1XTBE buffer içerisinde çözüldü ve bölüm 2.1.4.1.2.1'de anlatıldığı şekilde jel hazırlandı. 7 µl PCR ürünü ile 1µl 6X Jel Loading Buffer karıştırılarak jelin kuyucuklarına yüklendi. Her 6 numuneden sonra 100 bp DNA Ladder'ı kullanıldı. 1µl DNA ladder'ının, 1µl 6X Jel Loading Buffer ve 6 µl distile su ile seyreltilerek yüklemesi yapıldı. Elektroforez, 100 Volt ve 70 Amperde 1 saat gerçekleştirildikten sonra sonuçlar UV ışığı altında, jel görüntüleme sistemi ile değerlendirildi.

2.1.4.1.4. PCR Ürününün RFLP Yöntemi ile Kesimi

Çalışmamızda, DMT1 geninin IVS4+44 bölgesinde bulunan C→A polimorfizmini belirlemek için, amplifikasyon sonucunda oluşan PCR ürünü, MnlI RE ile kesildi. PCR ürününün RFLP yöntemi ile kesim işleminde negatif ve pozitif örnekler de kontrol amacıyla analizlere alındı.

2.1.4.1.4.1. MnlI RE'nin Özellikleri

MnlI, *Moraxella nonliquefaciens*'den klonlanmış mnlIR geni taşıyan *E. coli* bakterisinden elde edilmiş bir restriksiyon endonükleaz II enzimidir. MnlI enzimi 5' ucundan CCTC sekansını tanıyarak 7. bazdan, 3' ucundan da GGAG sekansını tanıyarak 6. bazdan diziyi keser (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. MnlI RE'nin tanıma bölgesi ile kesim noktasının şematik gösterimi.

2.1.4.1.4.2. MnlI Enzimi ile Kesim İşlemi

Amplifikasyon ürününün kesimi için 30 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon bileşenleri, bileşenlerin stok ve final konsantrasyonları Çizelge 2.3'de belirtildiği şekilde yapıldı.

Çizelge 2.3. MnlI enzimi ile kesim işlemindeki bileşenler ve reaksiyondaki konsantrasyonları.

BİLEŞEN	Stok Konsantrasyon	30 µllik Reaksiyon Karışımındaki Final Konsantrasyon
NEB4 Buffer	10X	2 µl
Bovin Serum Albumin(BSA)	100X	0,2 µl
MnlI Enzim	3 U/ µl	1 µl
PCR ürünü		15 µl
dH ₂ O		30 µl'ye tamamla

İnkübasyon 37°C'de 16 saat yapılmış ve ürünler analizlerde kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

2.1.4.1.4.3. MnlI Enzimi ile İnkübasyondan Sonra Agaroz Jelin Hazırlanması

MnlI enzimi ile kesim işleminden sonra oluşan oligonükleotidlerin analizleri, bölüm 2.1.4.1.3.3'de anlatıldığı şekilde %2'lik agaroz jel hazırlanarak elektroforez işleminin yapılması ile gerçekleştirildi. Sonuçlar UV ışığında, jel görüntüleme cihazı ile değerlendirildi.

2.1.4.2. Tam Kanda Fe ve Pb Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Tam kan örneklerinde Fe ve Pb konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla AAS kullanıldı. Tam kanda Pb konsantrasyonunun belirlenmesi, grafit fırınlı atomik absorpsiyon tekniği ile ve ortam gazı olarak argon kullanılarak yapıldı, Fe konsantrasyonunun belirlenmesinde ise alevli atomik absorpsiyon tekniği ile asetilen gazı kullanıldı.

2.1.4.2.1. Tam Kanın Ön Analiz İşlemleri

Tam kan örneklerinden 1'er ml alınarak üzerine 9 ml %65'lik HNO₃ eklenerek mikrodalga fırına ait yüksek ısıya dayanıklı teflon tüplere kondu. Yakma işlemine ait mikrodalga fırın programı incelenen elemente göre Çizelge 2.4'de verilmiştir. Asitle yakma işlemi tamamlanan kan örnekleri kapaklı 50 ml'lik polipropilen tüplere alınarak toplam hacim deiyonize su ile 20 ml'ye tamamlandı. Karışım vorteksle homojenize edildikten sonra örnekler analiz işlemine kadar kapaklı polipropilen tüplerin içinde +4°C' de saklandı.

Çizelge 2.4. Mikrodalga fırına ait tam kan yakma programı.

Max. Güç (Watt)	Güç %	Zaman (dak.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme (dak.)
800	100	15:00	200	5:00

Yakılmış olan örneklerin metal konsantrasyonları demir iz elementi için Alevli Atomik Absorbsiyon Spektrometre (Varian AA240FS Fast Sequential Flame Atomic Absorption Spectrometry) cihazı kullanılarak kurşun ağır metali için ise Grafit Fırınlı Atomik Absorbsiyon Spektrometre (Varian AA240Z Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry) kullanılarak belirlenmiştir.

2.1.4.2.2. Tam Kanda Metal Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

2.1.4.2.2.1. Tam Kanda Pb Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Tam kanda kurşun analizi sırasında kalibrasyon eğrisi oluşturmak amacıyla konsantrasyonu 1000 ppm olan kurşun ana stok çözeltisinden 15 ppb'lik ara stok hazırlandı. Bu stok 5, 10 ve 15 ppb'lik konsantrasyonlarda standart çözeltiler olarak belirlenerek kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Hazırlanan standartlara piklerin düzgün çıkmasını sağlamak amacıyla 5 ml %65 saflıkta HNO₃ ilave edildi. Pb konsantrasyonunun belirlenmesinde, keskin pikler elde etmek amacıyla % 1'lik ortofosforik asid içeren modifayr kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için her bir standart çözelti için ölçüm 3 kez tekrarlandı. 40 örnekte bir kalibrasyon tekrarı yapıldı. 20 örnekte bir kalibrasyon eğrisi düzeltildi ve düzeltme işlemi için standart 2

(10 ppb'lik standart) kullanıldı. Pik yüksekliğinin ölçümü ile kurşun konsantrasyonu belirlendi. Kurşun analizine ait program Çizelge 2.5'de, kalibrasyon grafiği ve kalibrasyon standartlarına ait veriler Çizelge 2.6'de gösterilmiştir.

Kurşun analizi için dalga boyu 283,3 nm olarak ayarlandı, absorbans verisi 2150°C'de toplandı. Atomlaştırıcı olarak grafit fırın, ortam gazı olarak Argon gazı kullanıldı. Kurşun analizi için GFAAS'de uygulanan metod Çizelge 2.7'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.5. Tam kanda Pb konsantrasyonunun belirlenmesi için uygulanan grafit fırın ayarları.

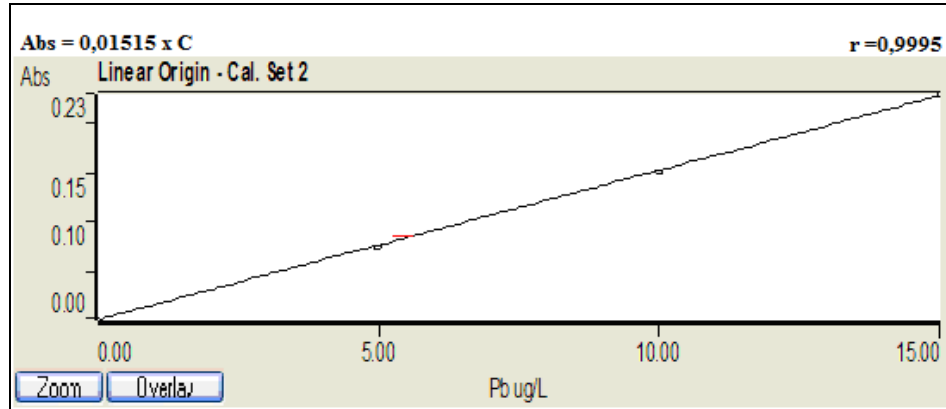
Step	Sıcaklık (°C)	Zaman (s)	Akış (L/min)	Sinyal Toplama	Okuma
1	85	5	0,3	× Hayır	× Hayır
2	95	50	0,3	× Hayır	× Hayır
3	120	15	0,3	× Hayır	× Hayır
4	550	5	0,3	× Hayır	× Hayır
5	550	5	0,3	× Hayır	× Hayır
6	550	2	0,3	× Hayır	× Hayır
7	200	6,1	0,3	× Hayır	× Hayır
8	200	10	0,0	√ Evet	√ Evet
9	2150	0,9	0,0	√ Evet	√ Evet
10	2150	2	0,0	√ Evet	√ Evet
11	2150	2	0,3	× Hayır	√ Evet
12	2600	2	0,3	× Hayır	× Hayır
13	2600	2	0,3	× Hayır	× Hayır

2.1.4.2.2.2. Tam Kanda Fe Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Tam kanda demir analizi sırasında kalibrasyon eğrisi oluşturmak amacıyla konsantrasyonu 1000 ppm olan demir ana stok çözeltisinden 5, 10, 20 ve 40 ppm'lik konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan standartlara piklerin düzgün çıkmasını sağlamak amacıyla 5 ml %65 saflıkta HNO₃ eklendi. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak amacıyla her bir standart çözelti için ölçüm 3 kez tekrarlandı. Demir analizine ait kalibrasyon grafiği ve kalibrasyon standartlarına ait veriler Çizelge 2.8'de özetlenmiştir.

Alevli AAS cihazı ile demir analizi için Hava/Asetilen alev tipi kullanıldı ve hava akışı 13,50 l/dak, asetilen akışı 2,00 l/dak, dalga boyu 372,0 nm olarak ayarlandı. Piklerin ölçümü integrasyon modu ile kalibrasyon hesabı ise konsantrasyon ile yapılarak kalibrasyon 20 örnekte bir tekrarlandı. Her bir örnek 3 kez ölçüldü. Demir analizi için kullanılan metod Çizelge 2.9’de özetlenmiştir.

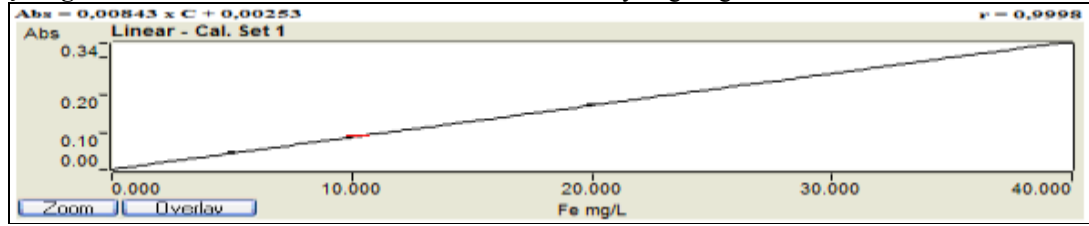
Çizelge 2.6. Tam kanda kurşun analizine ait örnek kalibrasyon grafiği.



	Konsantrasyon	Absorbans	%RSD
CAL ZERO	0,000 ppb	0,0034	9,6
STANDART 1	5,000 ppb	0,0723	1,9
STANDART 2	10,00 ppb	0,1487	1,8
STANDART 3	15,00 ppb	0,2301	2,4

Çizelge 2.7. Kurşun analizi için grafit fırın teknikli atomik absorpsiyon cihazında uygulanan metod.

Element - matriks	: Pb - Kan	Gain	: % 45
Enstrüman	: Zeeman	Akım	: 10,0 mA
Konsantrasyon birimi	: ug/L	Background	: BC on
Enstrüman modu	: Absorbans	Lamba Pozisyonu	: 1
Örnekleme	: Otomatik	Standart 1	: 5,00 ug/L
Kalibrasyon modu	:Konsantrasyon	Standart 2	: 10,00 ug/L
Ölçüm modu	:Pik yüksekliği	Standart 3	: 15,00 ug/L
Standart tekrarı	: 3	Reslope standardı	: Standart 2
Örnek tekrarı	: 3	Reslope alt limit	: % 75
Ekspansiyon faktör	:1,0	Reslope üst limit	: % 125
Eğri çizimi	: 7 noktali	Rekalibrasyon	:20 örnekte bir
Konsantrasyon ondalık aralığı	: 2 basamak	Kalibrasyon algoritması	:Doğrusal orijin
Dalga boyu	: 283,3 nm	Kalibrasyon alt limit	: % 20,0
Slit genişliği	: 0,5 nm	Kalibrasyon üst limit	: % 150

Çizelge 2.8. Tam kanda demir analizine ait örnek kalibrasyon grafiği.

	Konsantrasyon	Absorbans	%RSD
CAL ZERO	0,000 ppm	- 0,0007	7,6
STANDART 1	5,000 ppm	0,0470	0,1
STANDART 2	10,000 ppm	0,0867	1,0
STANDART 3	20,000 ppm	0,1736	1,2
STANDART 4	40,000 ppm	0,3381	0,7

Çizelge 2.9. Demir analizi için alevli atomik absorpsiyon cihazında uygulanan metod.

Element - matriks	: Fe - Kan	Lamba Pozisyonu	: 1
Enstrüman	: Flame	Standart 1	: 5,000 mg/L
Konsantrasyon birimi	: mg/L	Standart 2	: 10,000 mg/L
Enstrüman modu	: Absorbans	Standart 3	: 20,000 mg/L
Örnekleme	: Manuel	Standart 4	: 40,000 mg/L
Kalibrasyon modu	: Konsantrasyon	Reslope standardı	: Standart 2
Ölçüm modu	: İntegrasyon	Reslope alt limit	: % 75
Standart tekrarı	: 3	Reslope üst limit	: % 125
Örnek tekrarı	: 3	Rekalibrasyon	: 20 Örnekte bir
Ekspansiyon faktör	: 1,0	Kalibrasyon algoritması	: Linear
Eğri çizimi	: 7 noktalı	Kalibrasyon alt limit	: % 20,0
Konsantrasyon ondalık aralığı	: 3 basamak	Kalibrasyon üst limit	: % 150
Dalga boyu	: 372,0 nm	Ölçüm Zamanı	: 5s
Slit genişliği	: 0,2 nm	Okuma öncesi bekleme	: 10s
Gain	: % 58	Alev tipi	: Hava / Asetilen
Akım	: 5,0 mA	Asetilen akışı	: 2.00L/dak
Background	: BC on	Hava akışı	: 13,50L/dak

2.1.4.3. Tam Kanda Total Porfirin (Eritrosit Protoporfirin, EP) Değerinin Belirlenmesi

Alyuvarlarda total porfirinleri (serbest+çinko-protoporfirin) ölçmek amacıyla protoporfirinler ve hem içeren bileşikler, tam kandan etilasetat-asetik asit karışımı ile ekstre edildi. Daha sonra porfirinler hidroklorik asit çözeltisinde yeniden ekstre edilip (hem içeren bileşikler etil asetat fazında kalarak) moleküler florimetri ile

saptandı (Parsons, 1991). Kan örneği ve standartlar işlemler sırasında mümkün olduğunca ışıktan korundu. Kullanılan Reaktifler:

a-) Etil asetat/ glacial asetik asit (4/1 hacim/hacim)

b-) Hidroklorik asit, 1,5 M/l

c-) Standart: Uroporfirin I (Frontier Scientific, UFS-1), 0,6 µmol/l 1M-HCl de

a-) **Hemolizatın hazırlaması:** 200 µl su + 50 µl kan örneği mikropipet ile 5 kez çekip bırakılarak alyuvarlar hemoliz edildi.

b-) **İşlem:** 3 tane 5 ml'lik cam tüpe;

	Test	Standart	Kör
	100 µl hemolizat	50 µl St	50 µl (HCl; 1,5 M)
	--	50 µl Su	50 µl Su
Etil asetat/Asetik asit, ml	1	1	1
HCl (1,5 M/l), ml	1	1	1

oranlarında hacimler hazırlanarak karışım vortekslendi. Mikrofüjde 5000 rpm x 10 dk santrifuj edildi. Fluorimetrede, exitasyon dalga boyu 408 nm'ye ayarlanarak 607 nm emisyon dalga boyunda her bir örneğin floresan intensitesi okundu. Tam kan total porfirin değeri, µmol /l RBC =(Ftest/ Fst) x 5,3 olarak hesaplandı. Referans aralık <1,4 µmol/l RBC (alyuvar) olarak alındı.

2.1.4.4. İdrarda Delta-Aminolevülinik Asit (ALA) Değerinin Belirlenmesi

Bu metotta Delta-Aminolevülinik asit (ALA), metil asetoasetat ile kondanse edilerek ALA-pirol oluşturuldu. Oluşan kompleks Ehrlich reaktifi ile renklendirilerek oluşan renk spektrofotometrede ölçüldü (Buttery, 1995).

Reaktifler: Asetat tampon, 1 M/l, pH=4,6; Ehrlich Reaktifi: %0,5 p-dimetil amino benzaldehit (HCl/Asetik asit; 1/3 hacim/hacim); Metil asetoasetat; ALA standart (76,3 µmol/l deionize suda). İşlem kısaca;

	Kör	Örnek-kör	Test	Standart
Su,µl	100	150	50	--
İdrar,µl	--	50	50	50
Standart,µl	--	--	--	50
Asetat tampon,ml	1	1	1	1
Metil asetoasetat, µl	100	--	100	100

şeklinde hazırlanarak 100°C’de 10 dk süreliğine inkübe edildi. Daha sonra,

Ehrlich Reak., ml 1 1 1 1

oranında eklenerek spektrofotometrede, 553 nm’de köre karşı test, örnek-kör, standardın absorbansları okundu.

Delta-Aminolevülinik asit (ALA) miktarı; İdrar ALA, $\mu\text{mol/l} = [(A_{\text{test}} - A_{\text{sample kör}}) / (A_{\text{st}} - A_{\text{test}})] \times 76,3$ şeklinde hesaplandı. İdrar kreatinin, klasik Jaffe metodu ile otoanalizörde ölçüldü. Sonuçlar mmol/l olarak verildi. Spot idrar ALA sonuçları, $\mu\text{mol ALA/mmol kreatinin}$ olarak ifade edildi. Referans değer $< 3,8 \mu\text{mol ALA/mmol kreatinin}$ olarak alındı.

2.1.4.5. İdrarda Total Porfirin Değerinin Belirlenmesi

Spot idrar, 7M-HCl ile karıştırıldıktan sonra taramalı spektrofotometrede 350-450 nm arasında tarandı. 390-450 nm arası oluşan pikin yüksekliğinin absorbans değeri 14 500 ile çarpılarak idrar total porfirin sonucu nmol/l olarak bulundu. Çıkan sonuç, idrar kreatinin konsantrasyonuna göre düzeltilerek, idrar total porfirin sonuçları, nmol/mmol kreatinin olarak ifade edildi (With ve Pedersen, 1978). Normal değer $< 35 \text{ nmol/mmol kreatinin}$ olarak alındı.

2.1.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS V16 kullanılarak yapılmıştır. DMT1 geni IVS4+44 C/A SNP’sinin frekansları direkt olarak hesaplanmış ve Hardy-Weinberg eşitliği “Haldane exact” testi ile belirlenmiştir. Ölçümle elde edilen değişkenler bakımından bağımsız iki grubun karşılaştırılmasında “Student T” testi, bağımsız ikiden fazla grubun karşılaştırılmasında ise “Kruskal-Wallis” varyans analizi kullanılmıştır. Kategorik değişkenler bakımından ilişki ya da gruplar arası farklılık incelemesinde χ^2 (ki-kare) testi uygulanmıştır. Korelasyon analizlerinde “Pearson Korelasyonu” kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistik olarak nitel değişkenlerde oran, nicel değişkenlerde ise ortalama \pm standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerleri verilmiştir. $p < 0,05$ ve $p < 0,01$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.BULGULAR

3.1. Toplumumuz Bireylerinde DMT1 IVS4+44 Pozisyonunda Bulunan C/A Polimorfizm Sonuçları

Çalışmada toplumumuzda endüstri alanında çalışan ve Pb maruziyeti olduğu bilinen gönüllü 82 erkek bireyden alınan sıvı kan ve idrar örnekleri kullanıldı. Hastaların yaşları 21 ile 60 arasında değişmekteydi. Hastaların yaş ortalaması 36,24±8,98 yıl (Minimum=21, Maksimum=60) olarak hesaplandı.

3.1.1. Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Belirlenmesinin Sonuçları

Çalışmada kullanılan 82 kan örneğinin tamamı, DNA izolasyon işleminden sonra agaroz jel elektroforezinde belirlendi. Her bir örneğin DNA'larının izole edildiğinden emin olundu.

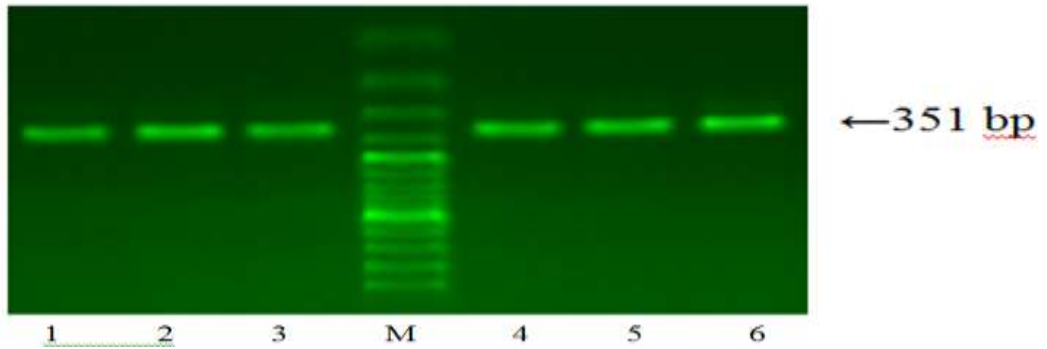
3.1.2. PCR Reaksiyonu ile DMT1 IVS4+44 Bölgesinin Amplifikasyon Sonuçları

DMT1, 1671 bp uzunluğunda ve 3002 SNP noktası bulunan, 12. kromozomun 12q13 bölgesinde lokalize olmuş bir gen bölgesidir. Bu gende bulunan SNP'lerden biri de 12. kromozom üzerindeki 51399050. noktada yer alan nükleotiddir. Bu noktadaki, DMT1 IVS4+44 C/A Tek Nükleotid Polimorfizminde tipik bireylerde nükleotid C iken, atipik bireylerde A nükleotidine değişim göstermektedir.

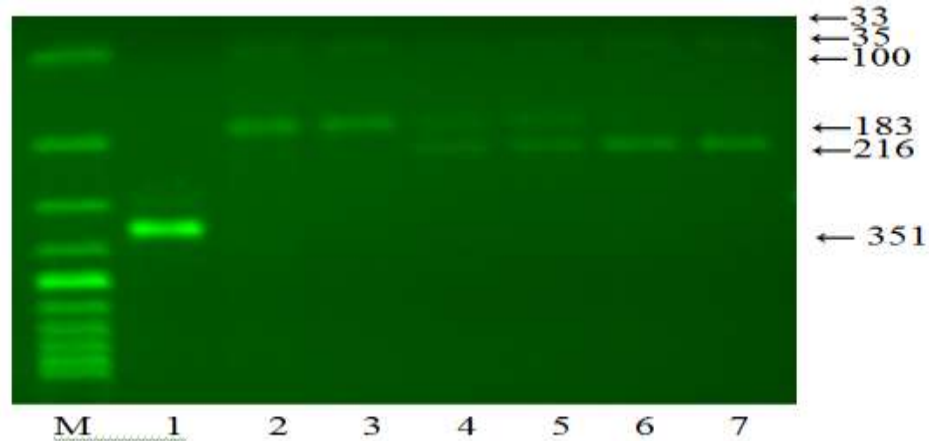
Kullanılan primerler ile amplifiye edilen bölgenin baz dizilimi aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Çizelge 3.1). Toplumumuz bireylerinde DMT1 geni IVS4+44 pozisyonundaki C→A polimorfizmini göstermek amacıyla, bu noktayı da içeren 351 bp'lik bölge amplifiye edildi ve sonuçlar jel görüntüleme sisteminde, UV ışık altında değerlendirilerek fotoğraflandı (Şekil 3.1 ve 3.2)

Çizelge 3.1. PCR’da kullanılan primerler, kromozom üzerindeki lokalizasyonları ve amplifiye edilen bölgenin nükleotid dizilimleri. Koyu ve altı çizili olan “a” bazı, 12. kromozomun 12q13 bölgesinde lokalize olmuş, 1671 bp uzunluğunda ve 3002 SNP noktası bulunan DMT1 gen bölgesinde 51399050. noktada bulunan ve C→A değişimini gösteren polimorfik nükleotiddir.

Primerler	12. Kromozomda Primerlerin Bağlandığı Nokta	Amplifiye Edilen Bölge
F PRİMER	5’ GACACATGCAATATCTGACATTG 3’ (51399007-51399031)	(51399007-51399357) (351 bp) 5’ GACACATGCAATATCTG ACATTG taaatcctttttcttctgtgagg ctggattttgtgctcatatgtgataacaga ccaattatatcagtagtcaatggatgatt cagtttaatctctttctctctgtacagtac tcttgttttagcttctgtaaactctggcttc accggaccaggtttcttatgagcattgcct acctggatccaggaaatattgaatccgatt tgcagtctggagcagtgctggatttaagg tgaacatctagctctaccctgtccttttaag cacataatacactctcacatcctttctccac c CTGCATGTTGGATAGTAG CCT 3’
R PRİMER	5’ AGGCTACTATCCAACATGCAG 3’ (51399335-51399357)	



Şekil 3.1. DMT1 geni IVS 4+44 bölgesinin amplifikasyonunun jel görüntüsü. (M=100 bp Ladder; 1, 2, 3, 4, 5 ve 6= 351 bp PCR ürünü)



Şekil 3.2. 351 bp’lik amplifikasyon ürününün MnlI enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotid uzunlukları: M=100 bp Ladder; 1= 351 bp; 2 ve 3= Homozigot tipik genotipli bireyler (CC genotip) (183, 100, 35, 33), 4 ve 5=Heterozigot genotipli bireyler (CA genotip) (216, 183, 100, 35 ve 33 bp), 6 ve 7= Homozigot atipik genotipli birey AA genotip (216, 100 ve 35 bp).

3.1.3. MnlI RE ile Amplifiye Edilen DMT1 geni IVS4+44 Bölgesinin Kesim Sonuçları

DMT1 geni IVS4+44 bölgesini kapsayacak şekilde çoğaltılan 351 bp'lik PCR ürünü, C→A polimorfizmini belirlemek amacıyla; MnlI enzimi ile 37°C'de 1,5–2 saat inkübe edildi. MnlI enzimi 351 bp'lik PCR ürünü; 5' ucundan CCTC sekansını tanıyarak 7. bazdan, 3' ucundan da GGAG sekansını tanıyarak 6. bazdan keser.

5'-C C T C (N)7^X-3'

3'-G G A G (N)6^X-5'

3.1.4. DNA Örneklerinin Tiplendirilmesi

DNA örneklerinin tiplendirilmesi kesme sonrası jel analizi sonuçlarına göre yapıldı ve jel analizlerinde üç farklı sonuç gözlemlendi. Bunlardan CC ve AA genotipleri homozigot olarak değerlendirilirken CC genotipi, her iki allelinde de polimorfizm taşıması açısından homozigot tipik; AA genotipi, her iki allelinde de polimorfizm taşıması bakımından homozigot atipik olarak değerlendirildi. CA genotipi ise bir allelinde mutasyon taşıyıp diğer allelinde taşımayan tip olması bakımından heterozigot olarak değerlendirildi.

Bireyler DMT1 IVS4+44 bölgesinde homozigot tipik genotipli: "C/C" ise; MnlI enzimi, 351 bp'lik bölgeyi hem 5' ucundan CCTC dizilimini tanıyarak 7. bazdan, hem de 3' ucundan GGAG dizilimini tanıyarak 6. bazdan kesimini yapar. Böylece 351 bp'lik amplifikasyon ürünü; 183 bp, 100 bp, 35 bp ve 33 bp'lik dört oligonükleotid parçasına ayrılmış olup sonuçlar jel görüntüleme cihazında UV ışık altında fotoğflanarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.2'de 2-3, Şekil 3.3 ve 3.4).

Bireyler DMT1 IVS4+44 bölgesinde homozigot atipik genotipli: "A/A" ise; MnlI enzimi 351 bp'lik bölgeyi 5' ucundan CCTC dizilimini tanıyarak 7. bazdan keser ancak polimorfizm sonucunda C bazı A olduğunda, MnlI enzimi 3' ucundan ACTC dizilimine bağlanamaz ve bu bölgedeki kesim işlemini gerçekleştiremez. Dolayısı ile "A"lı bireylerde MnlI enzimi, sadece iki noktadan kesim yapabilir.

Bunun sonucu olarak da 351 bp'lik amplifikasyon ürünü; 216 bp, 100 bp ve 35 bp'lik üç oligonükleotid parçasına ayrılmış olur. Sonuçlar jel görüntüleme cihazında UV ışık altında fotoğraflanarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.2'de 6-7, Şekil 3.5 ve 3.6).

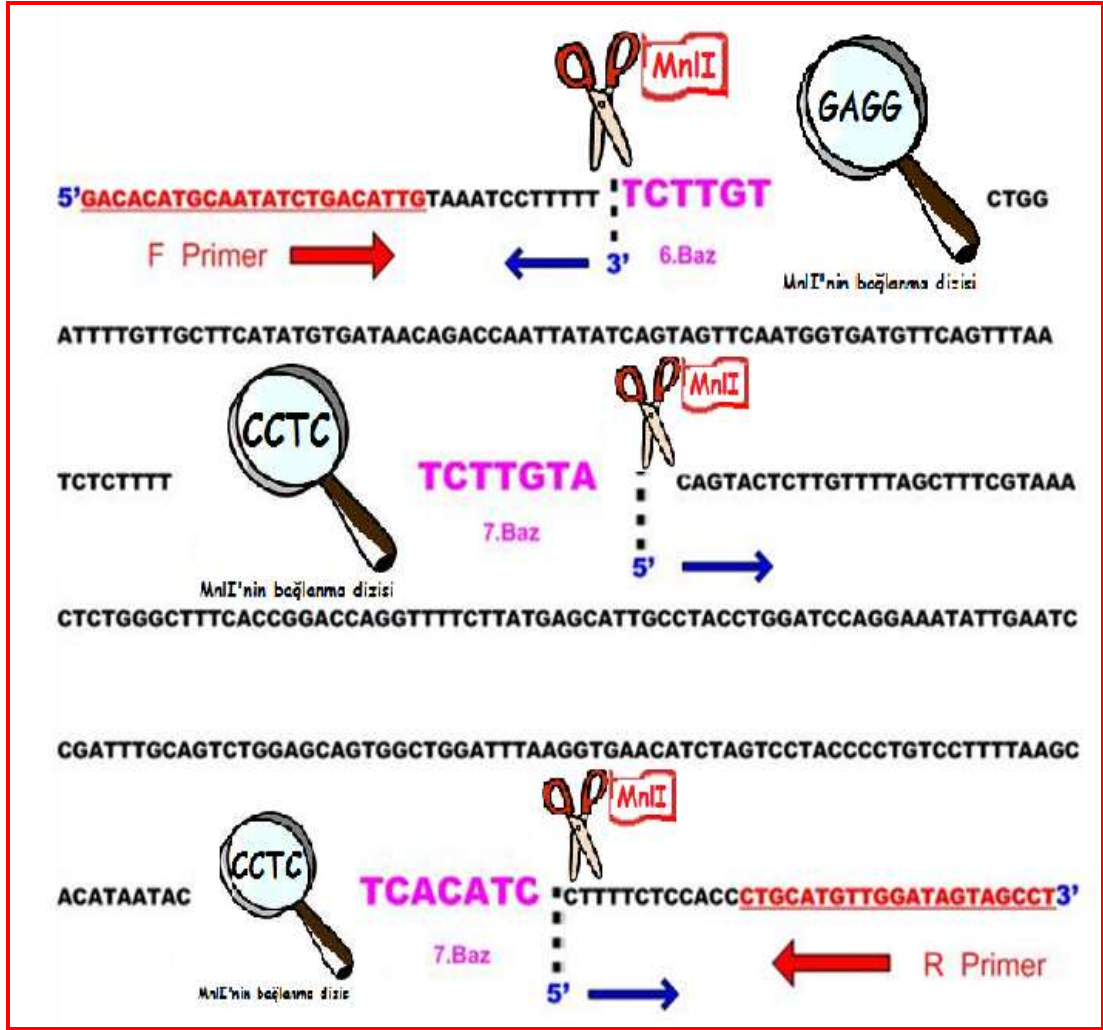
Bireyler DMT1 IVS4+44 bölgesinde *heterozigot genotipli ise (C/A) ise*; bu genotipe sahip bireylerin tek DNA ipliğinde "C", diğer DNA ipliğinde "A" olduğundan; MnlI enzimi ile kesim sonucunda; bir DNA ipliği, "C" genotipli bireylerde olduğu gibi, 183 bp, 100 bp, 35 bp ve 33 bp olarak dört oligonükleotide ayrılır. Diğer DNA ipliği ise "A" genotipli bireylerde olduğu gibi, 216 bp, 100 bp ve 35 bp olarak üç oligonükleotide parçalanır. Dolayısı ile jel üzerinde ve UV ışık altında heterozigot genotiplilerin oligonükleotid bantları; 216 bp, 183 bp, 100 bp, 35 bp ve 33 bp olarak görülmektedir (Şekil 3.2'de 4-5).

DMT1 IVS4+44 bölgesindeki C→A polimorfizmi ile oluşan genotipler ve MnlI enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotidlerin uzunlukları aşağıdaki çizelgede belirtilmiştir (Çizelge 3.2 ve Şekil 3.7).

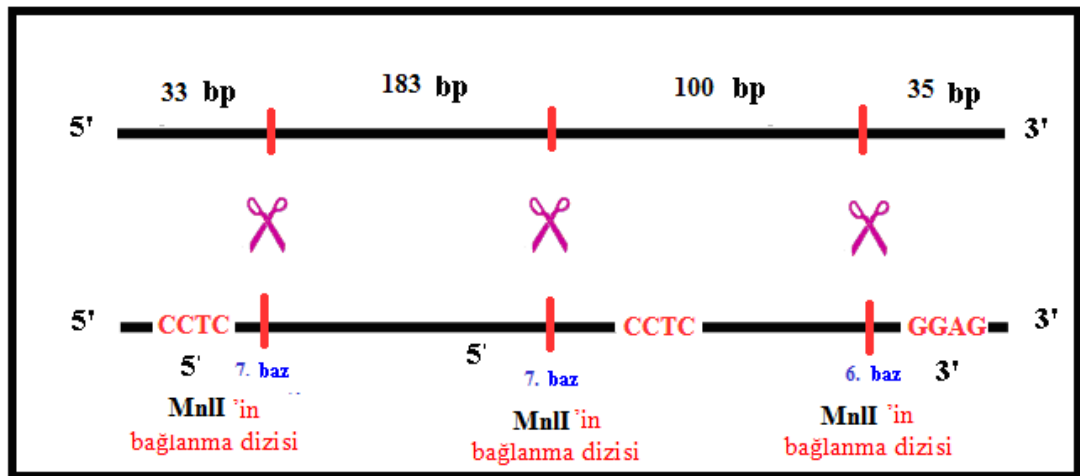
Çizelge 3.2. DMT1 IVS4+44 bölgesinde polimorfizm ile oluşan genotipler ve MnlI enzimi ile kesim sonucundaki oligonükleotid uzunlukları.

GENOTİP	MnlI enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotid uzunlukları
Homozigot tipik (C/C)	183 bp, 100 bp, 35 bp ve 33 bp
Homozigot atipik (A/A)	216 bp, 100 bp ve 35 bp
Heterozigot (C/A)	216 bp, 183 bp, 100 bp, 35 bp ve 33 bp

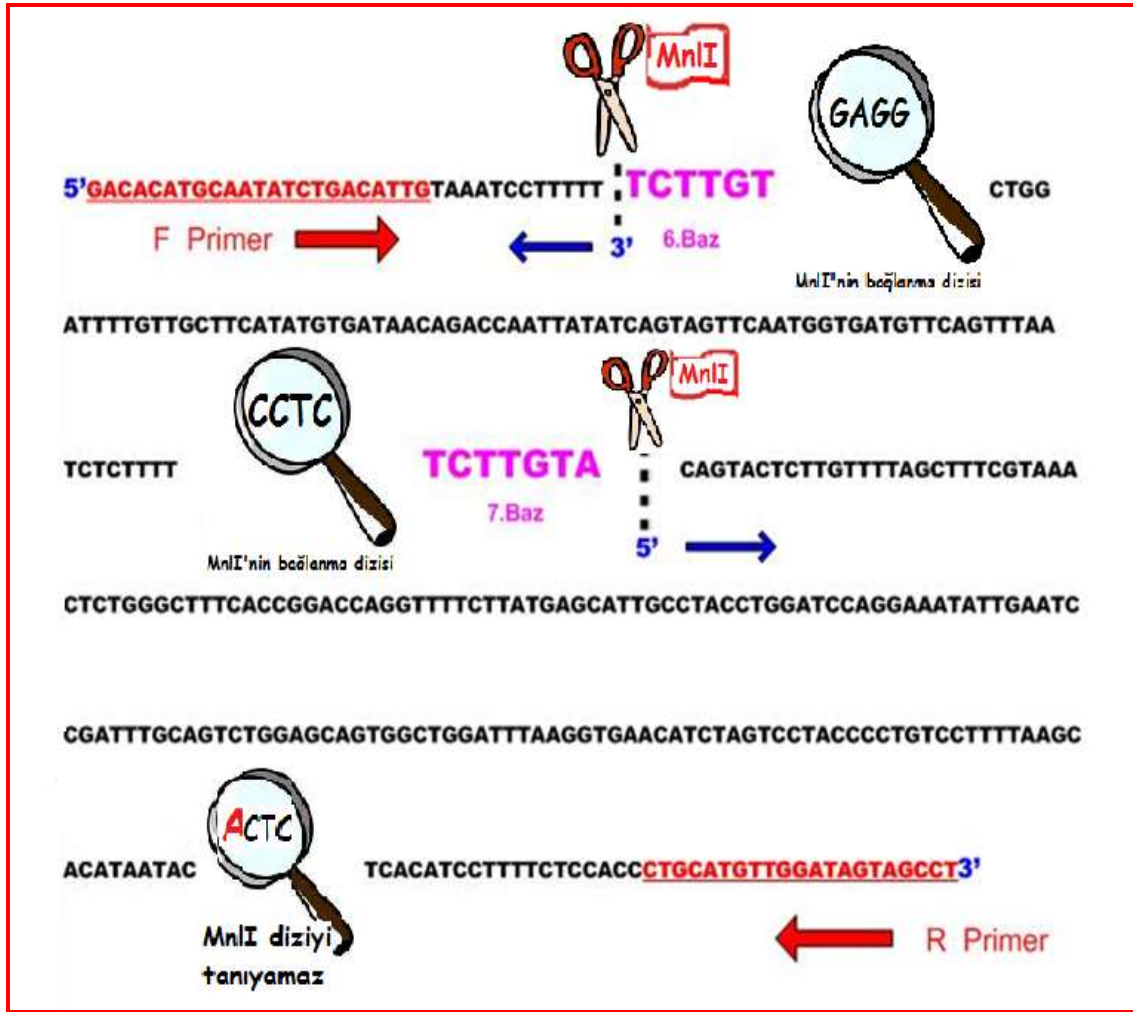
DMT1 IVS4+44 C/A SNP Çalışmasının Genotip Frekansı; Çalışmamız sonucunda; toplumumuz bireylerinde (n:82), DMT1 geni IVS4+44 bölgesi polimorfizminin; %42,68'i homozigot tipik (CC), %45,12'si heterozigot (CA) ve %12,20'si homozigot atipik genotip (AA) olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.3).



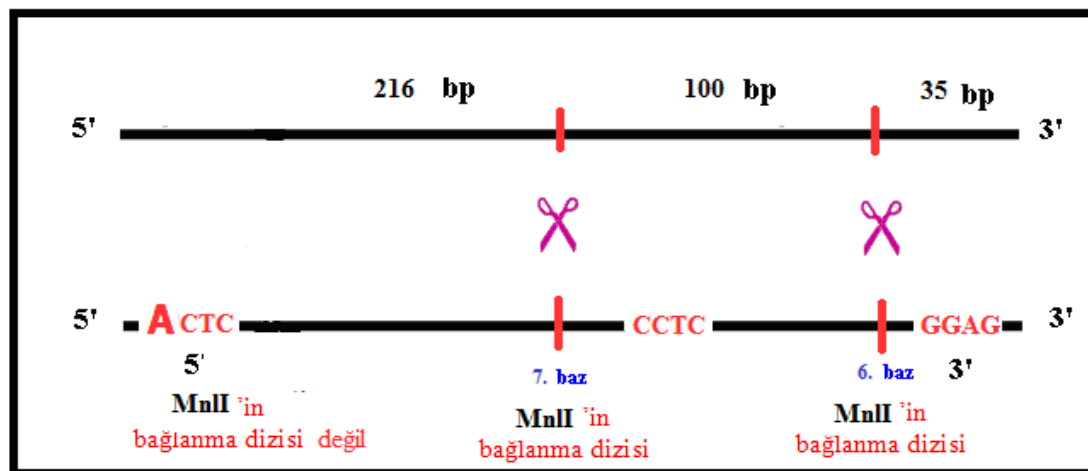
Şekil 3.3. 351 bp uzunluğundaki PCR ürününün “DMT1 IVS4+44 C/A SNP'nin” homozigot tipik C/C bireylerde MnlI enzimi ile kesiminin şematik gösterimi.



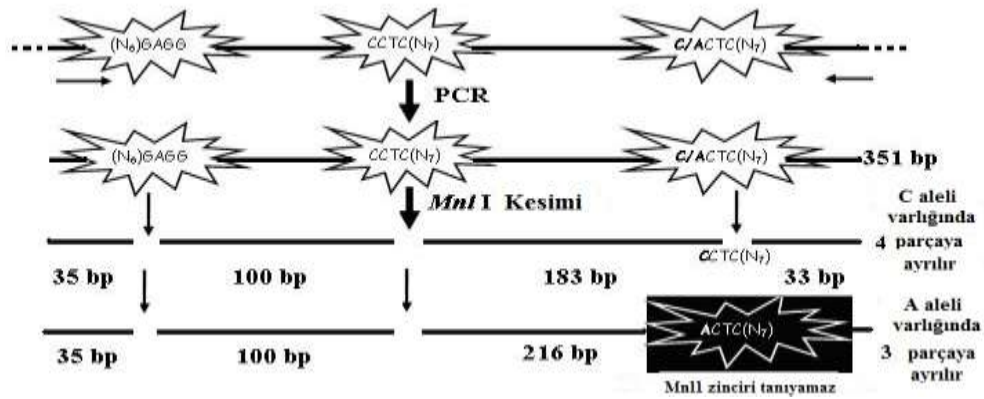
Şekil 3.4. 351 bp uzunluğundaki PCR ürününün “DMT1 IVS4+44 C/A SNP'nin” homozigot tipik C/C genotipli bireylerde MnlI enzimi ile kesimi sonucu ayrılan oligonükleotid uzunluklarının şematik gösterimi.



Şekil 3.5. 351 bp uzunluğundaki PCR ürününün “DMT1 IVS4+44 C/A SNP'nin” homozigot atipik A/A” genotipli bireylerde MnlI enzimi ile kesiminin şematik gösterimi.



Şekil 3.6. 351 bp uzunluğundaki PCR ürününün “DMT1 IVS4+44 C/A SNP'nin” homozigot atipik A/A genotipli bireylerde MnlI enzimi ile kesimi sonucu oluşan oligonükleotid uzunluklarının şematik gösterimi.



Şekil 3.7. 351 bp.lik PCR ürününün A aleli ve C aleli varlığında MnlI enzimi ile kesim sonucu oluşan oligonükleotid uzunluklarının şematik gösterimi (Kayaalti ve ark., 2011).

Çizelge 3.3. Toplumumuz bireylerinde DMT1 IVS4+44 bölgesi polimorfizmi ile oluşan genotiplerin frekansı.

Polimorfizm	Genotip Frekansı (n:82)	
	n	%
CC (Homozigot tipik)	35	42,68
CA (Heterozigot)	37	45,12
AA (Homozigot atipik)	10	12,20

Toplumumuz bireylerinde DMT1 geni IVS4+44 bölgesi polimorfizmi ile oluşan alel frekansları ise (n:164); C alel frekansı; %65,24 (n:107), A alel frekansı ise %34,76 (n:57) olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Toplumumuz bireylerinde DMT1 IVS4+44 bölgesinde polimorfizmi ile oluşan alellerin frekansı.

Alel (IVS4+44 C/A)	Alel Frekansı (n:164)	
	n	%
C	107	65,24
A	57	34,76

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda çalıştığımız popülasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Çalıştığımız populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti.

	CC (Homozigot tipik) (n)	CA (Heterozigot) (n)	AA (Homozigot atipik) (n)	Toplam (n)
Gözlenen	35	37	10	82
Beklenen	34,91	37,19	9,91	82,01
Serbestlik Derecesi	χ^2			p>0,05
2	0,002			

Elde edilen verilere göre, χ^2 cetvel değeri, $\alpha=0,05$ önem düzeyinde ve $df = 2$ serbestlik derecesinde $\chi^2 = 3,84$ olup $\chi^2_{\text{hesap}} \leq \chi^2_{\text{cetvel}}$ yani $0,002 < 3,84$ olduğundan populasyon gen bakımından Hardy-Weinberg dengesindedir.

3.2. Tam Kanda Pb ve Fe Konsantrasyon Sonuçları ile DMT1 Geni IVS4+44 Bölgesindeki Polimorfizm Sonuçlarının Karşılaştırılması

DMT1 Geni IVS4+44 bölgesinde bulunan C→A polimorfizmi belirlenen 82 tam kan örneğinin, Pb ve Fe konsantrasyonları da belirlendi ve DMT1'deki bu polimorfizm ile metal düzeyleri arasında ilişki olup olmadığı araştırıldı.

Çalışmada kullanılan ve metal konsantrasyonları belirlenen 82 kan örneğinin tamamı erkek bireye ait olup yaş ortalamaları $36,24 \pm 8,98$ olarak belirlendi. 82 bireyin DMT1 Geni IVS4+44 pozisyonunda bulunan C→A polimorfizminin; %42,68'inin homozigot tipik (CC), %45,12'sinin heterozigot (CA) ve %12,20'sinin homozigot atipik genotip (AA) olduğu saptandı (Çizelge 3.3). Alel frekansları ise; C alel frekansı %65,24, A alel frekansı %34,76 olarak hesaplandı (Çizelge 3.4). Çalışmada kullanılan 82 kan örneğinde belirlenen;

Ortalama metal konsantrasyonları; Pb= $372,37 \pm 145,20$ ppb; Fe= $463,91 \pm 83,44$ ppm;

Homozigot tipik (CC) bireylerde (n:35); Pb= $317,02 \pm 122,39$ ppb; Fe= $447,33 \pm 71,58$ ppm;

Heterozigot (CA) bireylerde (n:37); Pb=399,22±121,85 ppb; Fe=474,14±88,02 ppm ve Homozigot atipik (AA) bireyde ise (n:10); Pb=466,79±221,34 ppb; Fe=484,12±101,75 ppm olarak ölçüldü.

Atipik aleli taşıyanlar (AA ve CA genotipleri) A (+), bu aleli taşımayan bireyler ise (CC genotip) A (-) olarak adlandırılmıştır. A (+) ve A (-) bireylere ait sonuçlar;

A(+)(AC+AA)bireylerde (n=47); Pb=413,60±148,28 ppb; Fe=476,26±90,03 ppm ve

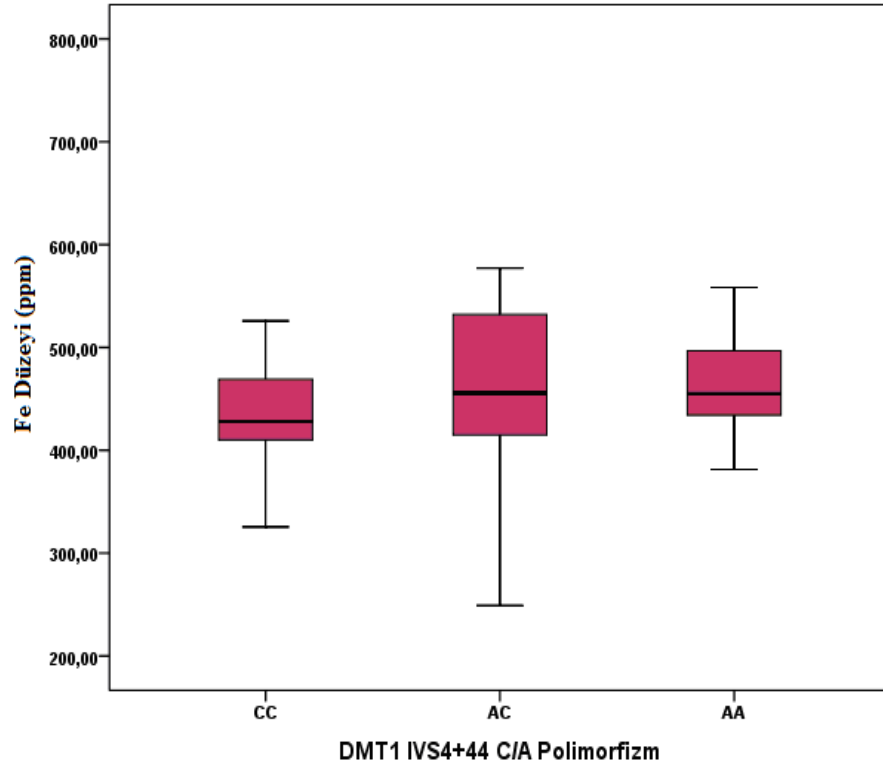
A(-)(CC)bireylerde (n=35); Pb=317,02±122,39 ppb; Fe=447,33±71,58 ppm olarak belirlenmiştir.

Bu sonuçlara göre; 82 bireyin DMT1 geni IVS4+44 pozisyonunda bulunan C→A polimorfizmi ile tam kan Pb konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu tespit edildi (p<0,005). Ancak DMT1 geni IVS4+44 pozisyonunda bulunan C→A polimorfizmi ile tam kan Fe konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı (Çizelge 3.6) (Şekil 3.8).

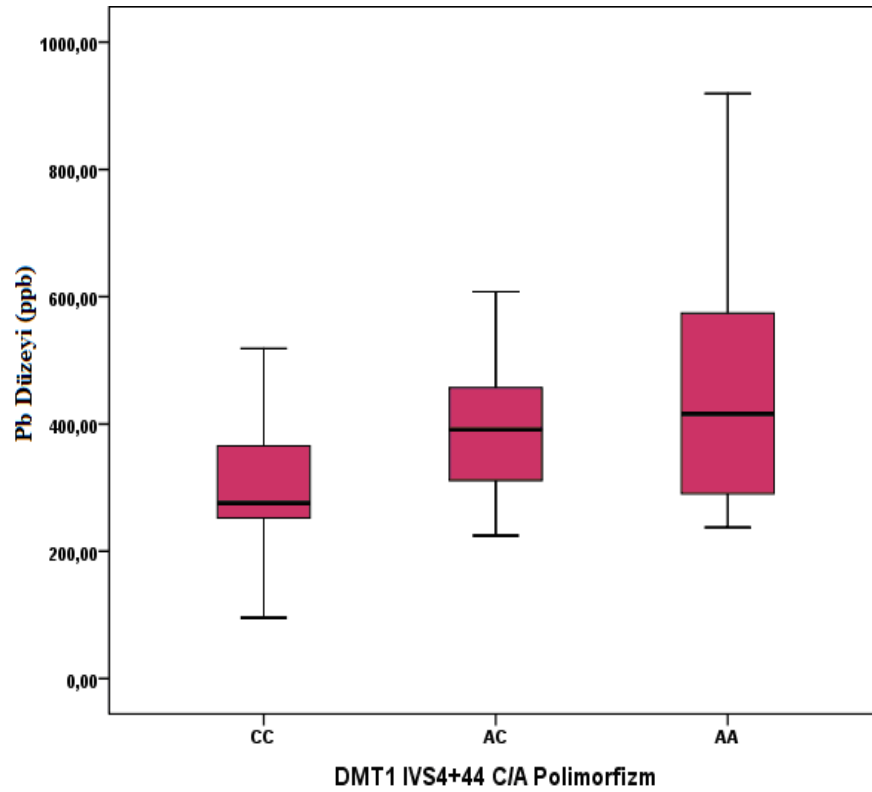
DMT1 geni IVS4+44 bölgesi homozigot atipik genotipe (AA) sahip birey ile heterozigot genotipe (CA) sahip bireylerde, homozigot tipik (CC) bireylere göre, Pb konsantrasyonunun oldukça yüksek olduğu belirlendi (Şekil 3.9 ve Çizelge 3.6).

3.3. Tam Kan EP Sonuçları ile DMT1 Geni IVS4+44 Bölgesindeki Polimorfizm Sonuçlarının Karşılaştırılması

DMT1 IVS4+44 C/A tek gen polimorfizm genotipleri ve tam kan EP düzeyleri istatistiksel olarak değerlendirildi. Sonuçlar Çizelge 3.7'de gösterilmiştir.



Şekil 3.8. DMT1 geni IVS4+44 bölge polimorfizmi ile tam kan Fe konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren sütun grafiği.



Şekil 3.9. DMT1 geni IVS4+44 bölge polimorfizmi ile tam kan Pb konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren sütun grafiği.

3.4. İdrar ALA ve Total Porfirin Sonuçları ile DMT1 Geni IVS4+44 Bölgesindeki Polimorfizm Sonuçlarının Karşılaştırılması

DMT1 IVS4+44 C/A tek gen polimorfizm genotipleri ve idrar Total Porfirin ve ALA düzeyleri istatistiksel olarak değerlendirildi. Sonuçlar Çizelge 3.8’de gösterilmiştir.

Alel frekanslarına A (+)(AC+AA) ve A (-)(CC) göre gruplar değerlendirildiğinde tam kanda Pb konsantrasyonu ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuş ($p=0,002$), bunun dışında tam kan Fe ve analiz edilen diğer parametrelerden tam kan EP, idrar ALA ve Total porfirin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır.

Yapılan çalışmada elde edilen tüm verilerin korelasyonlarına bakıldığında (Çizelge 3.9);

Tam kan Fe ve idrar ALA düzeyleri arasında, istatistiksel olarak anlamlı olan negatif korelasyon bulunmuştur ($r=-0,332^*$; $p=0,010$),

Tam kan Pb ve sigara kullanım miktarları arasında pozitif korelasyon bulunmuş olup istatistiksel olarak anlamlıdır ($r=0,274^*$; $p=0,013$),

Tam kan Pb ve idrar ALA düzeyi arasında pozitif korelasyon bulunmuş olup istatistiksel olarak anlamlıdır ($r=0,264^*$; $p=0,043$),

İdrar ALA düzeyi ve sigara kullanım miktarları arasında pozitif korelasyon bulunmuş olup istatistiksel olarak anlamlıdır ($r=0,283^*$; $p=0,030$),

Çizelge 3.6. DMT1 geni IVS4+44 bölge polimorfizmi ile tam kan Pb ve Fe konsantrasyonlarına ait istatistiksel veriler.

DMT1 gene polimorfizmi	n %	METALLER							
		Pb (ppb)				Fe (ppm)			
		Ortalama±S.S.	Minimum	Maksimum	Ortanca	Ortalama ±S.S.	Minimum	Maksimum	Ortanca
CC genotip	35 42,68%	317,02±122,39	95,60	599,99	275,72	447,33±71,58	325,45	693,36	427,94
AC genotip	37 45,12%	399,22±121,85	224,67	761,30	391,34	474,14±88,02	248,94	782,38	455,71
AA genotip	10 12,20%	466,79±221,34	237,32	917,35	415,90	484,12±101,75	381,38	738,36	455,08
p		0,005**				0,213			
A (+)(AC+AA)	47 57,32%	413,60±148,28	224,67	919,35	395,54	476,26±90,04	248,94	782,38	455,71
A (-)(CC)	35 42,68 %	317,02±122,39	95,60	599,99	275,72	447,33±71,58	325,45	693,36	427,94
p		0.002**				0,121			

**p<0,01

Çizelge 3.7. DMT1 geni IVS4+44 bölge polimorfizmi ile tam kan EP düzeylerine ait istatistiksel veriler.

DMT1 gene polimorfizmi	n %	EP (µmol /l RBC)			
		Ortalama±S.S.	Minimum	Maksimum	Ortanca
CC genotip	35 43,21%	4,07±3,82	0,70	18,50	2,90
AC genotip	36 44,44%	5,26±4,30	0,90	24,50	3,90
AA genotip	10 12,35%	5,24±3,27	0,80	10,80	5,55
p	0,160				
A (+)(AC+AA)	46 56,79%	5,25±4,07	0,80	24,50	4,70
A (-)(CC)	35 43,21 %	4,07±3,82	0,70	18,50	2,90
p	0,185				

*p<0,05

**p<0,01

Çizelge 3.8. DMT1 geni IVS4+44 bölge polimorfizmi ile idrar Total Porfirin ve ALA düzeylerine ait istatistiksel veriler.

DMT1 gene polimorfizmi	n %	İdrarda							
		Total Porfirin (nmol/mmol kreatinin)				ALA (µmol ALA/mmol kreatinin)			
		Ortalama±S.S.	Minimum	Maksimum	Ortanca	Ortalama ±S.S.	Minimum	Maksimum	Ortanca
CC genotip	23 38,98%	12,35±8,74	2,70	38,47	10,53	2,51±1,15	0,60	6,18	2,22
AC genotip	30 50,84%	13,46±13,36	0,00	63,78	9,18	2,64±1,73	0,94	9,80	2,17
AA genotip	6 10,17%	10,27±3,97	2,89	14,88	11,13	3,05±1,45	0,91	4,69	3,00
p		0,981				0,449			
A (+)(AC+AA)	36 61,02%	12,93±12,31	0,00	63,78	10,53	2,71±1,68	0,91	9,80	2,26
A (-)(CC)	23 38,98 %	12,35±8,74	2,70	38,47	10,53	2,51±1,15	0,60	6,18	2,22
p		0,846				0,623			

Tam kan EP düzeyi ile yaş ve sigara kullanım süresi arasında pozitif korelasyon bulunmuş olup istatistiksel olarak anlamlıdır (sırası ile $r=0,219^*$; $p=0,049$ ve $r=0,282^*$; $p=0,011$),

Çalışma süresi ile sigara kullanım süresi arasında pozitif korelasyon bulunmuş olup istatistiksel olarak anlamlıdır ($r=0,273^*$; $p=0,013$),

Sigara kullanım süresi ile sigara miktarı arasında pozitif korelasyon bulunmuş olup istatistiksel olarak anlamlıdır ($r=0,595^{**}$; $p=0,000$),

Sigara kullanım süresi ile tam kan EP düzeyi arasında pozitif korelasyon bulunmuş olup istatistiksel olarak anlamlıdır ($r=0,282^*$; $p=0,011$),

Sigara kullanan ve kullanmayanlar ile ölçülen parametreler arasında (Pb, Fe, EP, ALA, Total porfirin) istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır. Bu durumun da mesleki maruziyetle alınan Pb düzeyinin sigara ile alınan Pb düzeyinden fazla olması nedeniyle sigara kullanımının değerlendirmeye alınan parametreleri istatistiksel olarak anlamlı derecede etkilemediği düşünülmektedir.

DMT1 Geni IVS4+44 pozisyonunda bulunan C→A polimorfizmi ile boy, kilo ve yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$).

DMT1 Geni IVS4+44 pozisyonunda bulunan C→A polimorfizmi, genotiplerine göre ayrıldığında, ölçümle elde edilen parametreler (Pb, Fe, EP, ALA, Total porfirin) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$).

Bireylerin yaşadıkları bölge ile ALA düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunurken ($p=0,019$) ölçümle elde edilen parametreler (Pb, Fe, EP, Total porfirin) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$).

Bireylerin yaşadıkları bölge ile sigara içimi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$).

*** $p<0,05$,** $p<0,01$**

4.TARTIŞMA

Beslenme bozukluğunun yanı sıra toksik metallere maruziyet sonucunda da iz elementlerin canlıdaki düzeyi sağlık sorunlarına neden olacak derecede değişebilir. Bu değişimde genetik faktörlerin de etkili olduğu uzun süredir bilinmekle birlikte genetik araştırmaların önem kazanması sonucu metal taşıyıcı proteinlerle ilgili bilgiler de artmaktadır. Bu proteinler, hücresel düzeyde membranda taşıma görevini gerçekleştirirler. Örneğin anormal demir alımı; anemi ve aterosklerozis, Parkinson, Alzheimer, Huntington, Friedreich Ataxia ve Pica gibi diğer nörolojik hastalıklarda olduğu gibi en yaygın kalıtsal hemokromatozis hastalığı ile karıştırılır. Buna benzer bir hastalığı önlemek için hücreler metal iyon homeostasisini sağlamak zorundadır ve bu durum yüksek derecede düzenlenmiş alım, depolama ve salgılama işlemleri ile gerçekleştirilir (Nelson 1999, Nevo ve ark., 2006). Hücresel metal iyon düzeyindeki herhangi bir değişiklik metabolik bir olayın gerçekleşmemesine ya da hücre ölümüne neden olacak hasara neden olabilir (Nelson, 1999).

Literatürde şimdiye kadar toplumumuz bireylerinde DMT1 gen polimorfizmi ile ilgili bir çalışma henüz bulunmamakla birlikte, diğer toplumlarda söz konusu gen ile ilgili insan, hayvan ve hücre kültürü ile yapılan birçok çalışma mevcuttur. Yaptığımız çalışmada DMT1 gen polimorfizmi tam kanda Fe, Pb metali ve EP konsantrasyonları ile idrarda ALA ve Total Porfirin parametreleri açısından ilk kez değerlendirilmiştir. Bu nedenle yaptığımız çalışmanın bundan sonra toplumumuzda yapılacak mesleki maruziyet ve polimorfizmlerin araştırılacağı diğer çalışmalara ışık tutabileceği düşünülmektedir.

Metallerin toplumumuzdaki bireylerin kan ve idrarlarında normal ortalama değerlerinin ve aynı zamanda çevresel ve mesleki maruziyet sonucu biriken metal düzeylerinin belirlenmesi halk sağlığı açısından önem taşımaktadır. Bu veriler genetik farklılıkların metal maruziyetinde ne derece etkili olabileceğini düşündürdüğünden metallerle doğrudan veya dolaylı etkileşen proteinlerin polimorfik yapısının belirlenmesinin önemli olduğu düşünülmektedir. Mesleki maruziyet söz konusu olan ya da olabilecek bireylerin metallerle etkileşen ve önemli

fonksiyonu olduğu bilinen proteini kodlayan DMT1 geni polimorfizmi ve biyolojik örneklerinde metal düzeylerinin ve ilgili parametrelerin analizleri bu bireylerin iş tercihleri konusunda bilgilendirilmesi açısından önem taşımaktadır. Ayrıca, bu bireylerde toksik metallerle maruziyet nedeniyle iz elementlerin yeterince alınmaması ya da fazla alınması sonucu farklı sağlık sorunları da ortaya çıkabilmektedir.

DMT1 vücuda non-hem demir alımını sağlayan en önemli proteindir (Fleming ve ark., 2005). DMT1 özellikle ince barsağın ilk kısımlarında çok miktarda üretilir ve barsak lümeninden demirin emilimini sağlar (Zoller ve ark., 1999). Fe^{++} olgun enterositin lümenine bakan yüzeyinde bulunan DMT1 proteini ile enterosit içine alınır. DMT1'in sentezi demir eksikliğinde artmaktadır. DMT1, aynı zamanda Nramp-2, DCT-1 ve SLC11A2 gibi farklı isimlerle de bilinir. İnsanda DMT1 geninin dört tane izoformu bulunmakta (1A/+IRE, 1A/-IRE, 2/+IRE ve 2/-IRE), 12. kromozomun 12q13 bölgesinde yer almakta, 1671 bp uzunluğunda, 557 aminoasitten oluşan, 17 ekzon ve 3002 SNP noktası bulunan 3,6 kb'lık bir gen olduğu bilinmektedir (Gunshin ve ark., 1997).

DMT1 geni çok polimorfiktir ve bu polimorfizmler demir metabolizmasında görev alan proteinlerin yapısını etkilemektedir. Proteinlerin yapısını etkileyen mutasyonlar/polimorfizmler insan sağlığında önemli olan demir metabolizmasının rolünü önemli derecede etkileyebilir. DMT1 geninin düzeninin bozulması demir eksikliğini tetikler. DMT1 genindeki bu SNP'lerden biri de 12. kromozom üzerindeki 51399050. noktaya denk gelen nükleotiddir ki bu IVS4+44C/A tek nükleotid polimorfizmi olarak bilinir ve intron 2 üzerinde yer almaktadır. Polimorfizmler genellikle genlerin kodlanan ve kodlanmayan bölgelerinde bulunabilirler.

Metal taşıyıcılarının işlevinin daha da aydınlatılması demir eksikliği sırasında artan kurşun emilimini mümkün kılan biyolojik mekanizmaları açıklığa kavuşturmuştur. DMT1 proteininin ekspresyonu insanlarda emilen demir ve kurşunun seviyesi ile tutarlı olarak duedonumda yüksektir (Gunshin ve ark., 1997).

Demir eksikliğinde demir redüktaz ve DMT1 proteininin sentezi artarken demir fazlalığında bu durumun tersi söz konusudur (West ve ark., 2008). Düşük demir depoları varlığı sırasında duodenumda DMT1'in ekspresyonu, sadece demir emilimini sağlayacak şekilde değil aynı zamanda kurşun emilimine de izin verecek şekilde büyük oranda artar (Gunshin ve ark., 1997). Yapılan bir çalışmada, insan hücrelerinde DMT1'in aşırı ekspresyonu kontrollere kıyasla kurşun taşınmasında 7 katdan daha fazla bir artışla sonuçlanmıştır (Bannon ve ark., 2002). Bu durum DMT1'in yüksek düzeyde ekspresyonunun kurşun emiliminde önemli bir artış için gerekli olduğunu göstermektedir. Watson ve arkadaşları (1986) kurşun emiliminin, demir emilimi normalin üzerinde yeterince uygun değerlere ulaşmaya kadar artmadığını gözlemişlerdir. Bannon ve arkadaşları (2003) DMT1'in düşükten normal düzeylere kadar olan ekspresyonunda kurşun emiliminin DMT1 ekspresyonundaki değişiklikler tarafından etkilenmediğini, bu nedenle normal oranda demir depolarındaki çeşitlilikte uygun bir sistemin varlığının kurşun emiliminde önemli düzeyde artışa engel olduğunu, fakat demir eksikliği sırasında engel olamayabileceğini ve DMT1'in düzeyinin artan kurşun emilimine neden olacak kadar yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yeterli miktarda demir emilimi kurşun emilimini önleyen ikili bir fonksiyon olarak düşünülebilir (Bannon ve ark., 2002).

Öncelikle, duodenumdaki DMT1 geni düzenleme mekanizması demir düzeyine karşı hassas olduğundan demir alımı bağırsaktaki kurşun taşıyıcıların sayısını azaltır (Tallkvist ve ark., 2000; Morgan ve Oates, 2002). İkinci olarak, DMT1 proteini demire karşı kurşundan daha fazla affiniteye sahiptir. Bağırsakta demirin var olması yarışmalı olarak kurşun alımını engeller. Demirin DMT1 tarafından tamamen kurşun alımını inhibe etme yeteneği gösterilmiştir (Bannon ve ark., 2002). Demirin kurşun alımını yarışmalı olarak engelleyebilmesine karşın kurşunun demir alımına karşı aynı etkiyi yapabildiği konusu açık değildir (Ituri ve Nuez, 1998).

Eritropoezis hızı da demir emiliminde rol oynar (Brittenham, 2000). Eritropoezin efektif veya ineffectif olması eritroid regülatör olarak adlandırılır ve kırmızı hücre yapımı arttığında bağırsaktan demir emilimi de artar (Ganong, 1991;

Beutler ve ark., 2000 ve 2006). Hemoglobin sentezi için demir olmadığından, eritrosit protoporfirini (EP) olarak adlandırılan Hem prekürsörlerinde artış görülür (Ağaoğlu, 2002).

Çalışmaların çoğunda, Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time (RT)-PCR) yöntemi kullanılarak DMT1 proteininin hücre ve dokulardaki gen ekspresyonları araştırılmıştır (Gunshin ve ark., 1997; Tallkvist ve ark., 2000; Tallkvist ve ark., 2001; Morgan ve Oates, 2002; Bannon ve ark., 2002; Bannon ve ark., 2003; West ve ark., 2008). Ancak DMT1 genindeki polimorfizm ve bu polimorfizmin DMT1 sentezi üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar son birkaç yıldır araştırılmakta olup oldukça az sayıdadır (Kelleher ve ark., 2004, Kayaalti ve ark., 2011).

Çalışmamızın ilk aşamasında toplumumuzda metal maruziyeti olduğu bilinen 82 bireyin DMT1 gen IVS4+44 bölgesinde bulunan C/A SNP'si araştırılmış, ikinci aşamasında ise polimorfizmi belirlenmiş 82 tam kan örneğinde Pb, Fe ve EP konsantrasyonları ile idrarda ALA ve Total Porfirin düzeyleri de belirlenerek aralarındaki olası ilişki araştırılmıştır.

Çalışmamızda Pb maruziyeti olan bireylerden alınan kan örneklerinde DMT1 geni IVS4+44 bölgesinde bulunan C/A polimorfizmi ile tam kanda Pb konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu tespit edildi ($p < 0,005$). Ancak DMT1 geni IVS4+44 pozisyonunda bulunan C/A polimorfizmi ile Fe konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı. Pb ve Fe konsantrasyonları ve DMT1 geni IVS4+44 bölgesi polimorfizmi arasındaki ilişki; homozigot atipik (AA) bireylerde, heterozigot (CA) ve homozigot tipik (CC) bireylere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu verilere göre DMT1 atipik polimorfik bir genotipe sahip bireyde ince bağırsaktan kurşun ve demir emilimi artmaktadır. Böylece, homozigot tipik ve heterozigot genotiplere sahip olan bireyler, homozigot atipik genotipli bireylere göre Pb konsantrasyonunun az olması ile daha avantajlı durumdadırlar.

DMT1 geni IVS4+44 C/A bölgesindeki polimorfizmle ilgili populasyon çalışması toplumumuzda (Kayaalti ve ark., 2011) ve İrlanda'da hemokromatozis hastalarında ve kontrollerinde (Kelleher ve ark., 2004) yapılmış ve alel frekansları sırası ile; C alel frekansı %65,5 ve % 74, A alel frekansı %32,5 ve %26 olarak bulunmuştur. Yapılan bu çalışmada da benzer olarak C alel frekansı %65,24 ve A alel frekansı %34,76 olarak bulunmuştur. Homozigot tipik %42,68, heterozigot %45,12, homozigot atipik genotip de %12,20 olarak hesaplanmıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda çalıştığımız populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olduğu saptanmış, beklenen ve gözlenen değerler arasında fark bulunmamıştır ($\chi^2=0,002$, $p>0,05$). Toplumumuzdaki DMT1 geni IVS4+44C/A bölgesindeki polimorfizm sonuçları, bu polimorfizmin çalışıldığı tek toplum olan İrlanda populasyonuna göre biraz daha düşük bulunmuştur (Kelleher ve ark., 2004).

Çalışmamızın ikinci bölümünde, 82 tam kan örneğinin Pb ve Fe konsantrasyonları belirlenerek DMT1 geni IVS4+44C/A bölgesindeki polimorfizmin, metal birikimine olan etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak; DMT1 geni IVS4+44C/A bölgesindeki polimorfizm ile tam kan Pb konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir ($p=0,005$), ancak DMT1 geni IVS4+44C/A bölgesindeki polimorfizm ile tam kan örneğindeki Fe konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p=0,213$).

Çalışmada, toplumumuzdaki 82 bireye ait tam kan örneğindeki ortalama Pb konsantrasyonları; $372,37 \pm 145,20$ ppb iken, homozigot tipik bireylerde; $317,02 \pm 122,39$ ppb, heterozigot bireylerde; $399,22 \pm 121,85$ ppb ve homozigot atipik bireyde ise $466,79 \pm 221,34$ ppb olarak belirlenmiştir. Alel frekanslarına göre değerlendirildiğinde; A(+)(AC+AA) bireylerde ($n=47$) $413,60 \pm 148,28$ ppb ve A(-)(CC) bireylerde ($n=35$) $317,02 \pm 122,39$ ppb olarak belirlenmiştir. Tam kan Pb ve idrar ALA düzeyi arasında beklendiği gibi pozitif korelasyon bulunmuş olup istatistiksel olarak anlamlıdır ($r=0,264^*$; $p=0,043$) ve Pb maruziyetinin belirlenmesinde indirekt gösterge olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır. Tam kan Pb ve EP düzeyi arasında korelasyon bulunamamıştır ($r=0,205$).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda toplumumuzun Pb maruziyeti olduğu bilinen 82 bireyinde DMT1 geni IVS4+44C/A bölgesindeki polimorfizm araştırılmış ve bu bireylerin tam kan Pb ve Fe konsantrasyonları ile EP düzeyi ve idrar ALA ve Total Porfirin düzeyleri ölçülerek aralarındaki ilişki belirlenmiştir. Toplumumuz bireylerinin (n:82) %42,68'i homozigot tipik (n:35), %45,12'si heterozigot (n:37) ve %12,20'si ise homozigot atipik (n:10) genotipik özellik göstermiştir. Ortalama tam kan Pb konsantrasyonu (n:82) $372,37 \pm 145,20$ ppb iken; homozigot tipik bireylerde (n:35) $317,02 \pm 122,39$ ppb; heterozigot bireylerde (n:37) $399,22 \pm 121,85$ ppb ve homozigot atipik bireyde (n:10) ise $466,79 \pm 221,34$ ppb olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlara göre DMT1 geni IVS4+44C/A bölgesindeki polimorfizm ile tam kan Pb konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir ($p=0,005$). 82 bireyin DMT1 geni IVS4+44C/A bölgesindeki polimorfizm ile tam kan Fe ve EP düzeyleri; idrar ALA ile Total Porfirin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Yürüttüğümüz çalışma, daha önce başka toplumlarda yapılmamış olması nedeniyle önemli olup toplumumuzdaki bireylerin metallerle maruz kalması sonucunda ortaya çıkabilecek sağlık sorunlarına dikkat çekilebileceği düşünülmektedir. Çalışma grubumuzla ileride yapılacak çalışmalarda, bireylerin DMT1 geni IVS4+44 C/A bölgesindeki polimorfizmin ve metal düzeylerinin belirlenmesinin yanı sıra DMT1 proteininin ekspresyon hızı belirlenerek aralarında ilişki olup olmadığının saptanması planlanmaktadır.

ÖZET

Divalan Metal Taşıyıcısı Gen Polimorfizminin Metal Maruziyetinde Kurşun ve Demir Düzeylerine Etkisi

Bu çalışmanın amacı, biyolojik örneklerde metal düzeylerine çevresel faktörler kadar genetik yapının da etkili olabileceği düşüncesi ile toplumumuz bireylerinde **divalan metal taşıyıcı** (DMT1) geni IVS4+44C/A Tek Nükleotid Polimorfizmini (SNP) belirlemek ve bu polimorfizmin tam kan Fe, Pb ve EP ile idrar ALA ve Total Porfirin düzeyleri ile ilişkisinin olup olmadığını tespit etmektir.

Çalışmanın ilk bölümünde, Pb maruziyeti olduğu bilinen 82 erkek bireyde DMT1 geni IVS4+44C/A SNP'si araştırıldı. İzole edilen DNA'ların DMT1 gen bölgesi, PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tekniği ile 351 bp uzunluğundaki oligonükleotid çoğaltıldı. PCR ürünü RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) tekniği ve MnlI restriksiyon enzimi kullanılarak kesildi. Çalışılan grupta IVS4+44 C/A SNP'sinin genotip frekansları; %42,68 homozigot tipik (CC), %45,12 heterozigot (CA), %12,20 homozigot atipik (AA) genotip olarak belirlendi. Alel frekansları ise A aleline sahip bireylerde A(+) (AC+AA) %65,24; A aleline sahip olmayan bireylerde A(-) (CC) %34,76 olarak belirlendi.

İkinci bölümde ise; DMT1 geni IVS4+44C/A SNP'si belirlenmiş olan 82 bireyin tam kan Fe, Pb ve EP konsantrasyonları ile idrar ALA ve Total Porfirin düzeyleri ölçülerek polimorfik özellik ile belirlenen parametreler arasında ilişki olup olmadığı araştırıldı. Tam kan Fe analizi için Flame Atomik Absorpsiyon Spektrometresi (FAAS) kullanılırken Pb konsantrasyonunun tespiti için grafit fırınlı AAS (GFAAS) sistemi kullanıldı. Tam kan EP düzeyi moleküler florimetri ve idrar ALA ile Total Porfirin düzeyleri ise spektrofotometrik olarak belirlendi. Sonuç olarak; ortalama metal konsantrasyonları, (n=82) Pb=372,37±145,20 ppb; Fe=463,91±83,45 ppm ve ilgili para metre düzeyleri (n=59) ALA=2,63±1,48 µmol ALA/mmol kreatinin; (n=59) Total Porfirin=12,70±10,98 nmol/mmol kreatinin ve (n=81) EP=4,74±3,98 µmol/l olarak belirlendi. Tam kan Pb konsantrasyonu gruplara göre değerlendirildiğinde homozigot tipik (CC) bireylerde (n:35) 317,02±122,39 ppb; heterozigot (CA) bireylerde (n:37) 399,22±121,85 ppb ve homozigot atipik (AA) bireyde ise (n:10); 466,79±221,34 ppb olarak ölçüldü. Pb konsantrasyonu A(+)(AC+AA)bireylerde (n:47) 413,60±148,28 ppb ve A(-)(CC) bireylerde (n:35) 317,02±122,39 ppb olarak belirlendi. DMT1 geni IVS4+44 pozisyonundaki C/A SNP'si ile Pb konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu tespit edildi (p<0,005). Ancak DMT1 geni IVS4+44 pozisyonundaki C/A SNP'si ile Fe, EP, ALA ve Total Porfirin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı.

Anahtar Kelimeler: Atomik Absorpsiyon Spektrometresi, Divalan metal taşıyıcı protein, Eritrosit protoporfirin, Gen polimorfizmi, Metal düzeyleri

SUMMARY

Effect of Divalent Metal Transporter Gene Polymorphism on Lead and Iron Levels in Individuals Exposed to Metals

The aim of this study; in contemplation of the metal levels in biological samples genetic characteristics are effective as much as environmental factors, is to determine the polymorphism of **divalent metal transporter** (DMT1) IVS4+44C/A SNP in our population and investigate whether this polymorphism has an effect on whole blood Fe, Pb and EP levels and urine ALA and total porphyrin levels.

In the first part of this study; the SNP of the DMT1 gene IVS4+44C/A were analyzed in 82 subjects who are known as exposed to Pb. The DMT1 IVS4+44 region of the isolated DNAs were amplified with the PCR (Polymerase Chain Reaction) technique and 351 bp oligonucleotides were produced. The amplified products were cut with RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) technique by MnlI restriction enzyme. The genotype frequencies of the SNP in our societies' DMT1 IVS4+44C/A region were determined as follows; 42,68% homozygote typical, 45,12% heterozygote and 12,20% homozygote atypical genotype. The allele frequencies of individuals who have A allele A(+)(AC+AA) 65,24%, and individuals who have no A allele A(-)(CC) 34,76% were determined.

In the second part of the study; determined DMT1 IVS4+44C/A SNP's of 82 individuals' whole blood Pb, Fe, EP and urine ALA and Total Porphyrin levels were measured and the association between the polymorphic characteristics and these parameters were investigated. Flame Atomic Absorption Spectrometer (FAAS) was used for whole blood Fe and graphite oven AAS (GFAAS) system was used for Pb analyze. Whole blood EP levels were measured with molecular fluorimeter, and urine ALA and Total Porphyrin levels were measured with spectrophotometer. As a result; mean metal levels were measured as; (n=82) Pb=372,37±145,20 ppb; Fe=463,91±83,45 ppm, and related parameter levels were measured as (n=59) ALA=2,63±1,48 µmol ALA/mmol kreatinin; (n=59) Total Porphyrin=12,70±10,98 nmol/mmol kreatinin and (n=81) EP=4,74±3,98 µmol/l. When whole blood Pb levels were evaluated with groups homozygote typical individuals (CC) (n:35) 317,02±122,39 ppb; heterozygote individuals (CA) (n:37) 399,22±121,85 ppb and homozygote atypical individuals (AA) (n:10) 466,79±221,34 ppb were measured. Whole blood Pb levels were measured in individuals who have A allele A(+)(AC+AA) (n:47) 413,60±148,28 ppb and individuals who haven't A allele A(-)(CC) (n:35) 317,02±122,39 ppb. Statistically significant association (p<0,005) was found between the C/A SNP in the DMT1 gene IVS4+44 region and whole blood Pb levels, but statistically no association were found between the C/A SNP in the DMT1 gene IVS4+44 region and whole blood Fe, EP levels, and urine ALA and Total Porphyrin levels.

Key words; Atomic Absorption Spectrometry, Divalent metal transporter, Erythrocyte protoporphyrin, Gene polymorphism, Metal levels

KAYNAKLAR

- ABOUHAMED, M., GBUREK, J., LIU, W., TORCHALSKI, B., WILHELM, A., WOLFF, N.A., CHRISTENSEN, E.I., THÉVENOD, F., SMITH, C.P. (2006). Divalent metal transporter 1 in the kidney proximal tubule is expressed in late endosomes/lysosomal membranes: implications for renal handling of protein-metal complexes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290(6):F1525-33
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR) (2005). Toxicological profile for lead (Draft for Public Comment). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 63
- AĞAOĞLU, L. (2002). Kan hastalıkları. Anemiler In: Neyzi O, Ertuğrul T. *Pediatrici. Cilt 2.* 16.B. İzmir: *Nobel Tıp Kitapevleri.* 1042-1064
- AKESSON, A., BERGLUND, M., SCHUTZ, A., BJELLERUP, P., BREMME, K., VAHTER, M. (2002). Cadmium exposure in pregnancy and lactation in relation to iron status, *American Journal of Public Health* 92 : 284–287
- ALEXANDER, F.W. (1974). The uptake of lead by children in differing environments. *Environ Health Perspect.*, 7:155-9
- ALFANO, D.P., PETIT, T.L. (1982). Neonatal lead exposure alters the dendritic development of hippocampal dentate granule cells. *Exp Neurol.* 75(2):275–288
- AL-MODHEFER, A.J.A., BRADBURY, M.W.B., SIMMONS, T.J.B. (1991). Observations on the Chemical Nature of Lead in Human Blood Serum. *Clin Sci.*, 81:823-829
- ANDERMANN, G., DIETZ, M. (1982). The bioavailability and pharmacokinetics of three zinc salts: Zinc pantothenate, zinc sulfate, and zinc orotate. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.*, 7:233-239
- ANDERSEN, O., NIELSEN, J.B., SVENDSEN, P. (1988). Oral cadmium chloride intoxication in mice: Effects of dose on tissue damage, intestinal absorption and relative organ distribution. *Toxicology*, 48:225-236
- ANDERSON, G.J., DARSHAN, D., WILKINS, S.J., FRAZER, D.M. (2007). Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand. *Biometals* 20:665-74
- ANDREWS, N.C., BRIDGES, K.R. (1998). Disorders of Iron Metabolism and Sideroblastic Anemia in: Nathan and Oski' s Hematology of Infancy and Childhood W.B. Saunders Company, Philadelphia, 423-438
- ANDREWS, N.C., (1999). Disorders of Iron Metabolism, *The New England Journal of Medicine*, 341(26): 1986-1995
- ANDREWS, N.C. (1999). The iron transporter DMT1. *J Biochem Cell Biol.*, 31(10):991-4
- ANDREWS, N.C. (2008). Forging a field: the golden age of iron biology, *BLOOD*, 112(2): 219-230, doi:10.1182/blood-2007-12-077388
- ATANASIU, V., MANOLESCU, B., STOIAN, I. (2006). Heparin-central regulator of iron metabolism. *European Journal of Haematology Journal Compilation*; 78: 1-10
- ATANASIU, V., MANOLESCU, B., STOIAN, I. (2007). Heparin-central regulator of iron metabolism. *Eur J Haematol.*, 78: 1-10
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (1999) Toxicological Profile for Cadmium. U.S. Department of Health and Human Services. *Public Health Service*
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2005) Toxicological profile for lead. (Draft for Public Comment). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2007). Priority List of Hazardous Substances, Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service
- AYALA, F. J., KIGER, F. J. (1980). Modern Genetics. Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc, California. syf.: 601-605
- AYDEMİR, F., CAVDAR, A.O., SÖYLEMEZ, F., CENGİZ, B. (2003). Plasma zinc levels during pregnancy and its relationship to maternal and neonatal characteristics: a longitudinal study. *Biol Trace Elem Res.*, 91(3):193-202.
- ÇAMURDAN, A. (2007). Turkish Journal of Pediatric Disease, Arşiv, Cilt 1, Sayı 1, Derleme
- BACON, B.R., OLYNYK, J.K., BRUNT, E.M., BRITTON, R.S., WOLFF, R.K. (1999). HFE genotype in patients with hemochromatosis and other liver diseases. *Ann Intern Med.*, 130(12):953-62

- BANNON, D.I., ABOUNADER, R., LEES, P.S., BRESSLER, J.P. (2003). Effect Of DMT1 Knockdown On Iron, Cadmium, And Lead Uptake In Caco-2 Cells. *Am J Physiol Cell Physiol.*, **284**:C44 – C50
- BANNON, I.D., PORTNOY, M.E., OLÍVÍ, L., LEES, P.S., CULOTTA, V.C., BRESSLER, J.P. (2002). Uptake of Lead and Iron by Divalent Metal Transporter 1 in Yeast and Mammalian Cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, **295**:978 –984
- BARLTROP, D., KHOO, H.E. (1975). The influence of nutritional factors on lead absorption. *Postgrad Med J.*, **51**: 795-800.
- BAR-ON, M.E., BOYLE, R.M. (1994). Are pediatricians ready for the new guidelines on lead poisoning? *Pediatrics.*, **93**(2):178-82
- BARRY, P.S.I. (1975). A comparison of concentrations of lead in human tissue. *Br J Ind Med.*, **32**:119-139
- BARRY, P.S.I. (1981). Concentrations of lead in the tissues of children. *Br J Ind Med.*, **38**:61-71
- BEARN, A.G., KUNKEL, H.G. (1955). Metabolic studies in Wilson's disease using Cu64. *J Lab Clin Med.*, **45**:623-631
- BELLINGER, D., LEVITON, A., WATERNAUX, C., NEEDLEMAN, H., RABINOWITZ, M. (1987). Longitudinal analyses of prenatal and postnatal lead exposure and early cognitive development. *N Engl J Med.*, **316**(17):1037-43
- BERGDAHL, I.A., GRUBB, A., SCHÜTZ, A., DESNICK, R.J., WETMUR, J.G., SASSA, S., SKERFVING, S. (1997). Lead binding to δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in human erythrocytes. *Pharmacol Toxicol.*, **81**:153-158
- BERGDAHL, I.A., SHEVELEVA, M., SCHÜTZ, A., ARTAMONOVA, V.G., SKERFVING, S. (1998). Plasma and blood lead in humans: Capacity-limited binding to δ -aminolevulinic acid dehydratase and other lead-binding components. *Toxicol Sci.*, **46**(2):247-253
- BERGDAHL, I.A., VAHTER, M., COUNTER, S.A., SCHÜTZ, A., BUCHANAN, L.H., ORTEGA, F., LAURELL, G., SKERFVING, S. (1999). Lead in plasma and whole blood from lead-exposed children. *Environ Res.*, **80**:25-33
- BEUTLER, E. (2006). Disorders of iron metabolism. In: LICHTMAN MA, BEUTLER E, KIPPS TJ, SELIGSOHN U, KAUSHANSKY K, PRCHAL JT (eds). *Williams Hematology*, 7 nd Ed.; pp. 511–553. New York: McGraw-Hill
- BEUTLER, E., GELBART, T., LEE, P., TREVINO, R., FERNANDEZ, M.A., FAIRBANKS, V.F. (2000). Molecular characterization of a case of atransferrinemia. *Blood*, **96**:4071-4074
- BLACK, R.E. (2001). Micronutrients in pregnancy. *Br J Nutr.*, 85 Suppl **2**:S193-7
- BOGDEN, J.D., GERTNER, S.B., CHRISTAKOS, S., KEMP, F.W., YANG, Z., KATZ, S.R., CHU, C. (1992). Dietary calcium modifies concentrations of lead and other metals and renal calbindin in rats. *J Nutr.*, **122**: 1351-1360
- BOLANOWSKA, W., PIOTROWSKI, J., GARCZYNSKI, H. (1967). Triethyllead in the biological material in cases of acute tetraethyllead poisoning. *Arch Toxicol.*, **22**:278-282
- BOTHWELL, T.H., BAYNES, R.D., MAC, F.B.J., MAC PAİL, A.P. (1989). Nutritional iron requirements and food iron absorption. *J Int Med.*, **226**:357-360
- BOZKURT, G., ALGÜNEŞ, Ç. (2000). "Tıpta Moleküler Genetik Uygulamaları Genel Prensipleri". Trakya Üniversitesi Rektörlüğü Yayınları, Trakya Üniversitesi Matbaa Tesisleri, Edirne, 42-46, 66-69
- BRESS, W.C., BIDANSET, J.H. (1991). Percutaneous in vivo and in vitro absorption of lead. *Vet Hum Toxicol.*, **33**:212-214
- BRESSLER, J., KIM, K.A., CHAKRABORTI, T., GOLDSTEIN, G. (1999). Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. *Neurochem Res.*, **24**: 595-600
- BRITTENHAM G. (2000). Disorders of iron metabolism: iron deficiency and overload. IN HEMATOLOGY, BASIC PRINCIPLES and PRACTICE 3 nd Ed. In: HOFFMAN R, BENZ E, SHATTIL S, FURIE B, COHEN H, SILBERSTEIN L, MCGLAVE P (eds). New York Copyright © 2000 Churchill Livingstone, pp.: 397-428.
- BURDO, J.R., MENZIES, S.L., SIMPSON, I.A., GARRICK, L.M., GARRICK, M.D., DOLAN, K.G., HAILE, D.J., BEARD, J.L., CONNOR, J.R. (2001). Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. *J Neurosci Res.*, **66**(6):1198-207
- BURDON, R.H. (1994). Free radicals and cell proliferation. FREE RADICAL DAMAGE and ITS CONTROL, 28 nd Ed. In: RICE-EVANS CA, BURDON RH (eds)., pp.: 155–185

- BUTTERY, J.E., STUART, S., PANNALL, P.R. (1995). An improved direct method for the measurement of urinary delta-aminolevulinic acid. *Clin Biochem.*, **28**(4):477-80
- BUTLER, J.E., KADONAGA, J.T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.*, **16**(20):2583-92
- BUTLER, J.M. (2005). Forensic DNA typing. *Biology Technology and Genetics of STR Markers*. USA: Elsevier Pres., p.: 33-84
- CADENAS, E., DAVIES, K.J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.*, **29**(3-4):222-30
- CANONNE-HERGAUX, F., GRUENHEID, S., PONKA, P., GROS, P. (1999). Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood*, **93**:4406-4417.
- CANONNE-HERGAUX, F., FLEMING, M.D., LEVY, J.E., GAUTHIER, S., RALPH, T., PICARD, V., ANDREWS, N.C., GROS, P. (2000). The Nramp2/DMT1 iron transporter is induced in the duodenum of microcytic anemia mk mice but is not properly targeted to the intestinal brush border. *Blood*, **96**(12):3964-70
- CANONNE-HERGAUX, F., ZHANG, A.S., PONKA, P., GROS, P. (2001). Characterization of the iron transporter DMT1 (NRAMP2/DCT1) in red blood cells of normal and anemic mk/mk mice. *Blood*, **98**(13):3823-30
- CANONNE-HERGAUX, F., GROS, P. (2002). Expression of the iron transporter DMT1 in kidney from normal and anemic mk mice. *Kidney Int.*, **62**:147-156
- CELLIER, M., PRIVE, G., BELOUCHI, A., KWAN, T., RODRIGUES, V., CHIA, W., GROS, P., (1995). Nramp defines a family of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**:10089
- CDC (Centers For Disease Control And Prevention). (2002a). Managing Elevated Blood Lead Levels Among Young Children: Recommendations From The Advisory Committee Of Childhood Lead Poisoning Prevention. Atlanta, Centers For Disease Control
- CHAMBERLAIN, A.C., HEARD, M.J., LITTLE, P., NEWTON, D., WELLS, A.C., WIFFE, R.D. (1978). Investigations into lead from motor vehicles. Harwell, United Kingdom: United Kingdom Atomic Energy Authority. Report no. AERE-9198. 1979. The dispersion of lead from motor exhausts. *Philos Trans R Soc Lond A* **290**:557-589.
- ÇİN, Ş., ÇAVDAR, A., ARCASOY, A. (1978). Değişik sosyo- ekonomik koşullarda çocuk ve gençlerde İz elementlerin incelenmesi (Çinko, demir, bakır ve magnezyum) Nuray Matbaası, Ankara
- COURVILLE, P., CHALOUPKA, R., CELLIER, M.F. (2006). Recent progress in structure-function analyses of Nramp proton-dependent metal-ion transporters. *Biochem Cell Biol.*, **84**(6):960-78
- CONNER, S.D., SCHMID, S.L. (2003). Differential requirements for AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol.*, **162**(5):773-9.
- COSTA, C.A., TRIVELATO, G.C., PINTO, A.M., BECHARA, E.J. (1997). Correlation between plasma 5-aminolevulinic acid concentrations and indicators of oxidative stress in lead-exposed workers. *Clin Chem.*, **43**: 1196-1202.
- ÇAYLAK, E., HALİFEOĞLU, İ. (2010). Kurşunun çocuklardaki antioksidan enzimler üzerine etkileri ve antioksidanların tedavi edici/koruyucu rolü, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, **53**:159-173
- DALLMAN, P.R. (1990). Progress in the prevention of iron deficiency in infants. *Acta Paediatr.*, **365**: 28-37
- DAMERON, C.T, HARRISON M.D. (1998). Mechanisms for protection against copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* **67** (5):1091-97
- DDM ÖİK (Demir Dışı Metaller Özel İzleme Komisyonu), 1992
- De BURBURE, C., BUCHET, J.P., LEROYER, A., NISSE, C., HAGUENOER, J.M., MUTTI, A., SMERHOVSKY, Z., CIKRT, M., TRZCINKA-OCHOCKA, M., RAZNIEWSKA, G., JAKUBOWSKI, M., BERNARD, A. (2006). Renal and neurologic effects of cadmium, lead, mercury, and arsenic in children: evidence of early effects and multiple interactions at environmental exposure levels. *Environ Health Perspect.*, **114**: 584-590
- DEARTH, R.K., HINEY, J.K., SRIVASTAVA, V., BURDICK, S.B., BRATTON, G.R., DEES, W.L. (2002). Effects of lead (Pb) exposure during gestation and lactation on female pubertal development in the rat. *Reprod Toxicol.*, **16**:343-352
- DEMİR DIŞI METALLER ÖİK (1992)

- DHAWAN, D., SINGH, B., CHAND, B., SINGH, N., MANGAL, P.C. (1995). X-ray fluorescence in the assessment of inter-elemental interactions in rat liver following lead treatment. *Biometals*, **8**: 105–10
- DIETRICH, K.N., KRAFFT, K.M., BORNSCHEIN, R.L., HAMMOND, P.B., BERGER, O., SUCCOP, P.A., BIER, M. (1987) Low-level fetal lead exposure effect on neurobehavioral development in early infancy. *Pediatrics*, **80**(5):721–730
- DIETRICH, K.N. (1991). Lead Toxicity, Mineral Intake And Child Development. *Clin. Appl. Nutr.* **1**: 27–38
- DING, Y., GONICK, H.C., VAZIRI, N.D. (2000). Lead promotes hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in cultured aortic endothelial cells. *Am J Hypertens.*, **13**: 552-555
- DMT1'in 3 boyutlu yapısı. Erişim: [http://www.uscnk.com/directory/Solute-Carrier-Family-11-Member-2\(SLC11A2\)-4426.htm](http://www.uscnk.com/directory/Solute-Carrier-Family-11-Member-2(SLC11A2)-4426.htm), Erişim tarihi: 01.07.2011.
- DMT1 geninin 12. kromozom üzerindeki yeri. Erişim: <http://www.genecards.org>, Erişim tarihi: 05.07.2011.
- DMT1 proteininin hücre membranındaki konumu. Erişim: www.med.nus.edu.sg, Erişim tarihi: 24.07.2011.
- DMT1'in OMIM numarası. Erişim: www.omim.org, Erişim tarihi: 25.07.2011.
- DOWLING, T.E., MORITZ, C., PALMER, J.D., AND RIESEBERG, L.H. (1996). Nucleic acids III: analysis of fragments and restriction sites. *Molecular Systematics*. 249-320
- DUPIC, F., FRUCHON, S., BENSALD, M., LOREAL, O., BRISSOT, P., BOROT, N., ROTH M.P., COPPIN, H. (2002). Duodenal mRNA expression of iron related genes in response to iron loading and iron deficiency in four strains of mice. *Gut*, **51**(5):648-53
- DUTHIE, G.G., WAHLE, K.W.J., JAMES, W.P.T. (1989). Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. *Nutr. Res. Rev.* **2**: 51-62
- DUTKIEWICZ, B., DUTKIEWICZ, T., MILKOWSKA, G. (1979). The effect of mixed exposures to lead and zinc on ALA level in urine. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **42**: 341–48
- DONOVAN, A., ROY, C.N., ANDREWS, N.C. (2006). The ins and outs of iron homeostasis. *Physiology* (Bethesda), **21**:115-23.
- EPA (Environmental Protection Agency). (2008). Elevated Lead in D.C. Drinking Water-A Study of Potential Causative Events, *Final Summary Report*; EPA-815-R-07-021
- EMİR, F. ve ÖZDEN, A. (2006). Genetik polimorfizm ve polimorfizm çalışmaları. *Güncel Gastroenteroloji.*, **10** (1): 24-28
- ELLENHORN, M.J. (1997). technical associate, Sylvia Syma Ellenhorn, *Ellenhorn's medical toxicology diagnosis and treatment of human poisoning*, 2nd ed., Published by Williams & Wilkins in Baltimore
- ERCAL, N., GURER-ORHAN, H., AYKİN-BURNS, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Chem.*, **1**: 529-539
- FANNING, D. (1988). A mortality study of lead workers, 1926-1985. *Arch Environ Health*, **43**: 247-251
- FERGUSON, C.J., WAREING, M., WARD, D.T., GREEN, R., SMITH, C.P., RICCARDI, D. (2001). Cellular localization of divalent metal transporter DMT-1 in rat kidney, *Am J Physiol Renal Physiol.*, **280**(5):F803-14
- FERGUSON, C.J., WAREING, M., DELANNOY, M., FENTON, R., MCLARNON, S.J., ASHTON, N., COX, A.G., MCMAHON, R.F., GARRICK, L.M., GREEN, R., SMITH, C.P., RICCARDI, D. 2003, Iron handling and gene expression of the divalent metal transporter, DMT1, in the kidney of the anemic Belgrade (b) rat. *Kidney Int.*, **64**(5):1755-64
- FLANAGAN, P.R. (1989). Mechanisms And Regulation of Intestinal Uptake and Transfer of Iron. *Acta Paediatr. Scand. Suppl.*, **361**: 21–30
- FLEMING, M.D., TRENOR, C.C.3rd, SU, M.A., FOERNZLER, D., BEIER, D.R., DIETRICH, W.F., ANDREWS, N.C. (1997). Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet.*, **16**:383-386
- FLEMING, M.D., ROMANO, M.A., SU, M.A., GARRICK, L.M., GARRICK, M.D., ANDREWS, N.C. (1998). Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: Evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**:1148-53
- FLEMING, R.E., BACON, B.R. (2005). Orchestration of Iron Homeostasis. *New England Journal of Medicine.*, **352**(17):1741-4
- FORBES, J.R., GROS, P. (2003). Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane, *Blood*, **102**: 1884-1892

- FORBES, J., LAM-YUK-TSEUNG, S., GROS, P., Erişim: <http://winstgsrv.fch.aptaracorp.com>, Erişim tarihi: 24.07.2011.
- FOX, B.G. (1997). Catalysis by non-heme iron-containing enzymes. In: Sinnott M, editor. *Comprehensive biological catalysis*. Vol. 3. London: *Academic Press*; p 266-348
- FRANKLIN, C.A., INSKIP, M.J., BACCANALE, C.L., EDWARDS, C.M., MANTON, W.I., EDWARDS, E., O'FLAHERTY, E.J. (1997). Use of sequentially administered stable lead isotopes to investigate changes in blood lead during pregnancy in a nonhuman primate (*Macaca fascicularis*). *Fundam Appl Toxicol.*, **39**:109-119
- FRAZER, D.M., WILKINS, S.J., BECKER, E.M., VULPE, C.D., MCKIE, A.T., TRINDER, D., ANDERSON, G.J. (2002). Hcpidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology*. **123**(3):835-44
- FU, H., BOFFETTA, P. (1995). Cancer and occupational exposure to inorganic lead compounds: a meta-analysis of published data. *Occup Environ Med.*, **52**: 73-81
- GANONG, W.F. (1991). *Digestion and Absorption*. Review of Medical Phyorology. 15th Edition. USA: Prentice-Hall International Inc, pp 437-447
- GANZ, T. (2004). Hcpidin in iron metabolism. *Current Opinion in Hematology*, **11**:251-4
- GANZ, T. (2005). Hcpidin-a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Practice & Research Clinical Haematology*; **18** (2):171-82
- GANZ, T. (2006). Hcpidin and Its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology*, 29-35
- GARRICK, M.D., DOLAN, K.G., HORBINSKI, C., GHIO, A. J., HIGGINS, D., PORUBCIN, M., MOORE, E.G., HAINSWORTH, L.N., UMBREIT, J.N., CONRAD, M.E., FENG, L., LIS, A., ROTH, J.A., SINGLETON, S., GARRICK, L.M., (2003). DMT1: a mammalian transporter for multiple metals. *Biometals*, **16**: 41-54
- GARRICK, M.D., SINGLETON, S.T., VARGAS, F., KUO, H-C, ZHAO, L., KNÖPFEL, M., DAVIDSON, T., COSTA, M., PARADKAR, P., ROTH, J.A., GARRICK, L.M. (2006). DMT1: Which metals does it transport?, *Biol Res.*, **39**: 79-85
- GARZA, A., VEGA, R., SOTO, E. (2006). Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Med Sci Monit.*, **12**: RA57-65
- GERHARDSSON, L., ENGLYST, V., LUNDSTRÖM, N.G., SANDBERG, S., NORDBERG, G. (2002). Cadmium, copper and zinc in tissues of deceased copper smelter workers. *J Trace Elem Med Biol.*, **16**(4):261-6
- GILBERT, DL, COLTON, CA. (2002). *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach*. *Kluwer Academic Publishers*
- GONZALEZ, F. J. (1999). Polymorphisms in xenobiotic metabolism. In *Molecular and Applied Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes*. *Life Sciences Pharmacogenetics*, **303**: 91-110
- GOYER, R.A. (1997). Toxic And Essential Metal Interactions. *Annu Rev Nutr.*, **17**:37-50
- RHYNE, B.C., GOYER, R.A. (1971). Cytochrome content of kidney mitochondria in experimental lead poisoning. *Exp Mol Pathol.*, **14**(3):386-91.
- GOYER, R.A. (1995). Nutrition and metal toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.*, **61**(Suppl.): 646- 50S
- GRANDJEAN, P. (1992). Health significance of metals-lead. *Maxcy-Rosenau-Last Public Health and Preventive Medicine*, 389-391
- GRANT, L.D., KIMMEL, C.A., WEST, G.L., MARTINEZ-VARGAS, C.M., HOWARD, J.L. (1980). Chronic low-level lead toxicity in the rat: II. Effects on postnatal physical and behavioral development. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **56**:42-58
- GRIFFIN, T.B., COULSTON, F., WILLS, H. (1975). Biological And Clinical Effects Of Continuous Exposure To Airborne Particulate Lead. *Arh Hig Toksikol.*, **26**:191-208
- GRIFFIN, K.P., WARD, D.T., LIU, W., STEWART, G., MORRIS, I.D., SMITH, C.P. (2005). Differential expression of divalent metal transporter DMT1 (Slc11a2) in the spermatogenic epithelium of the developing and adult rat testis. *Am J Physiol Cell Physiol.*, **288**(1):C176-84
- GRIFFITHS, W.J., KELLY, A.L., COX, T.M. (1999). Inherited disorders of iron storage and transport. *Mol Med Today*. **5**(10):431-8.
- GROSS, S.B., PFITZER, E.A., YEAGER, D.W., KEHOE, R.A. (1975). Lead in Human Tissues. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **32**:638-651
- GRUENHEID, S., CELLIER, M., VIDAL, S., GROS, P. (1995). Identification and characterization of a second mouse Nramp gene. *Genomics*, **25**(2):514-25

- GULSON, B.L., JAMESON, C.W., MAHAFFEY, K.R., MIZON, K.J., KORSCH, M.J., VIMPANI, G. (1997). Pregnancy increases mobilization of lead from maternal skeleton. *J Lab Clin Med.*, **130**(1):51-62
- GULSON, B.L., POUNDS, J.G., MUSHAK, P., THOMAS, B.J., GRAY, B., KORSCH, M.J. (1999). Estimation of cumulative lead releases (lead flux) from the maternal skeleton during pregnancy and lactation. *J Lab Clin Med.*, **134**(6):631-640
- GULSON, B.L., MIZON, K.J., KORSCH, M.J., PALMER, J.M., DONNELLY, J.B. (2003). Mobilization of lead from human bone tissue during pregnancy and lactation - a summary of long-term research. *Sci Total Environ.*, **303**:79-104
- GULSON, B.L., MIZON, K.J., PALMER, J.M., KORSCH, M.J., TAYLOR, A.J., MAHAFFEY, K.R. (2004) Blood lead changes during pregnancy and postpartum with calcium supplementation. *Environ Health Perspect.*, **112**:1499-1507
- GUNSHIN, H., MACKENZIE, B., BERGER, U.V., GUNSHIN, Y., ROMERO, M.F., BORON, W.F., NUSSBERGER, S., GOLLAN, J.L., HEDIGER, M.A. (1997). Cloning and Characterization of a Mammalian Proton-Coupled Metal-Ion Transporter. *Nature*, **388**:482-488
- GUNSHIN, H., ALLERSON, C.R., POLYCARPOU-SCHWARZ, M., ROFTS, A., ROGERS, J.T., KISHI, F., HENTZE, M.W., ROUAULT, T.A., ANDREWS, N.C., HEDIGER, M.A. (2001). Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter. *FEBS Lett.*, **509**(2):309-16
- GUNSHIN, H., FUJIWARA, Y., CUSTODIO, A.O., DIRENZO, C., ROBINE, S., ANDREWS, N.C. (2005). Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *J Clin Invest.*, **115**(5):1258-66
- GURER, H., ERCAL, N. (2000). Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic Biol Med.*, **29**: 927-945
- GÜMRÜK, F., ALTAY, Ç. (1995). Demir metabolizması ve demir eksikliği anemisi. *Katkı Pediatri Dergisi*, **16**(3):265-287
- GÜMÜŞ, A. (1979). Metalik Maden Yatakları, *Çağlayan Basımevi*, İstanbul
- HAGAR, W., THEIL, E.C., VICHINSKY, E.P. (2002). Diseases of iron metabolism. *Pediatr Clin North Am.*, **49**(5):893-909
- HALLBERG, L. (1981). Bioavailability of dietary iron in men. *Ann Rev Nutr.*, **1**:123-147
- HALLIWELL, B. (1989). Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med.*, **82**: 747-752
- HAMMAD, T.A., SEXTON, M., LANGENBERG, P. (1996). Relationship Between Blood Lead and Dietary Iron Intake in Preschool Children. A Cross-Sectional Study. *Ann Epidemiol.*, **6**:30-33
- HEARD, M.J., CHAMBERLAIN, A.C. (1982). Effect of Minerals And Food on Uptake of Lead From The Gastrointestinal Tract in Humans. *Hum Toxicol.*, **1**:411-416.
- HEARD, M.J., WELLS, A.C., NEWTON, D. (1979). Human uptake and metabolism of tetra ethyl and tetramethyl lead vapour labelled with 203Pb. In: International Conference on Management and Control of Heavy Metals in the Environment, London, England, September. Edinburgh, United Kingdom: *CEP Consultants, Ltd.*, 103-108.
- HENTZE, M.W., KÜHN, L.C. (1996). Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**(16):8175-82
- HERNANDEZ-AVILA, M., SMITH, D., MENESES, F., SANIN, L.H., HU, H. (1998). The Influence of Bone and Blood Lead on Plasma Lead Levels in Environmentally Exposed Adults. *Environ Health Perspect.*, **106**(8):473-477
- HERNÁNDEZ-AVILA, M., PETERSON, K.E., GONZALEZ-COSSIO, T., SANIN, L.H., ARO, A., SCHNAAS, L., HU, H. (2002). Effect of maternal bone lead on length and head circumference of newborns and 1-month-old infants. *Arch Environ Health*, **57**(5):482-488
- HHS (U.S. Department of Health and Human Services), 1991
- HSU, P.C., GUO, Y.L. (2002). Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology*, **180**: 18-22
- HU, H., HERNANDEZ-AVILA, M. (2002). Invited commentary: lead, bones, women, and pregnancy—the poison within? *Am J Epidemiol.*, **156**(12):1088-1091.
- HU, H., TÉLLEZ-ROJO, M.M., BELLINGER, D., SMITH, D., ETTINGER, A.S., LAMADRID-FIGUEROA, H., SCHWARTZ, J., SCHNAAS, L., MERCADO-GARCÍA, A., HERNÁNDEZ-AVILA, M. (2006). Fetal lead exposure at each stage of pregnancy as a predictor of infant mental development. *Environ Health Perspect.*, **114**(11):1730-5
- HUBERT, N., HENTZE, M.W. (2002). Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **99**(19):12345-50

- ILZSG (The International Lead and Zinc Study Group). (2005)
- INSKIP, M.J., FRANKLIN, C.A., BACCANALE, C.L., MANTON, W.I., O'FLAHERTY, E.J., EDWARDS, C.M., BLENKINSOP, J.B., EDWARDS, E.B. (1996). Measurement of the flux of lead from bone to blood in a nonhuman primate (*Macaca fascicularis*) by sequential administration of stable lead isotopes. *Fundam Appl Toxicol.*, **33**:235-245
- ITURRI, S., NUNEZ, M.T. (1998). Effect Of Copper, Cadmium, Mercury, Manganese And Lead on Fe²⁺ And Fe³⁺ Absorption in Perfused Mouse Intestine. *Digestion*, **59**:671–675
- İNORGANİK kurşunun toksikokinetiği. Erişim: <http://com-med.ikalogic.com>, Erişim tarihi: 15.07.2011.
- JACOB, C., MARET, W., VALLEE, B.L. (1998). Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 95(7):3489-94
- JACOB, R.A., SKALA, J.H., OMAE, S.T., TURNLUND, J.R. (1987). Effect of varying ascorbic acid intakes on copper absorption and ceruloplasmin levels of young men. *J Nutr.*, **117**:2109-2115
- JAMES, A.C., STAHLHOFEN, W., RUDOLF, G., BRIANT, J.K., EGAN, M.J., NIXON, W., BIRCHALL, A. (1994). Deposition of inhaled particles. *Ann ICRP*, **24**(13): 231-299
- JANAKIRAMAN, V., ETTINGER, A., MERCADO-GARCIA, A., HU, H., HERNANDEZ-AVILA, M. (2003). Calcium supplements and bone resorption in pregnancy: a randomized crossover trial. *Am J Prev Med.*, **24**(3):260–264
- JARUP, L. (2003). Hazards of Heavy Metal Contamination. *Br Med Bull.*, **68**:167-82
- JELLIFFE-PAWLOWSKI, LL, MILES, SQ, COURTNEY, JG, MATERNA, B., CHARLTON, V. (2006). Effect of magnitude and timing of maternal pregnancy blood lead (Pb) levels on birth outcomes. *J Perinatol.*, **26**(3):154-162
- JOHNSON, D.M., YAMAJI, S., TENNANT, J., SRAI, S.K., SHARP, P.A. (2005). Regulation of divalent metal transporter expression in human intestinal epithelial cells following exposure to non-haem iron. *FEBS Lett.*, **579**(9):1923-9
- JOHNSTON, M.V., GOLDSTEIN, G.W. (1998) Selective vulnerability of the developing brain to lead. *Curr Opin Neurol.*, **11**(6):689–693
- KALIA, K., FLORA, S.J. (2005). Strategies for safe and effective therapeutic measures for chronic arsenic and lead poisoning. *J Occup Health.*, **47**: 1-27
- KARIHTALA, P., SOINI, Y. (2007). Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS*; **115**: 81-103
- KAYA, S., AKAR, F. (1998). Metaller ve diğer inorganik ve radyoaktif maddeler. İçinde: Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A (ed). Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji (İkinci baskı). Ankara: *Medisan Yayınları*, 134-138
- KAYAALTI, Z., ODABAŞI, M., SÖYLEMEZOĞLU, T. (2011). Genotype and allele frequencies of divalent metal transporter 1 polymorphism in Turkish population. *Mol Biol Rep.*, **38**(4):2679-84
- KEHOE, R.A. (1987). Studies of lead administration and elimination in adult volunteers under natural and experimentally induced conditions over extended periods of time. *Food Chem Toxicol.*, **25**:425-493
- KELLEHER, T., RYAN, E., BARRETT, S., O'KEANE, C., CROWE, J. (2004). DMT1 genetic variability is not responsible for phenotype variability in hereditary hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis.*, **33**(1):35-9
- KEMNA, E.H., TJALSMA, H., WILLEMS, H.L., SWINKELS, D.W. (2008). Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica*, **93**(1):90-7
- KIES, C., UMOREN, J. (1989). Inhibitors of copper bioutilization: fiber, lead phytate and tannins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 258: 81– 92
- KIM, H.S., LEE, S.S., HWANGBO, Y., AHN, K.D., LEE, B.K. (2003). Cr Ossectional Study of Blood Lead Effects on Iron Status in Korean Lead Workers. *Nutrition*, **19**:571–576
- KNÖPFEL, M., SCHULTHESS, G., FUNK, F., HAUSER, H. (2000). Characterization of an integral protein of the brush border membrane mediating the transport of divalent metal ions. *Biophys J.*, **79**(2):874-84
- KNUTSON, M., MENZIES, S., CONNOR, J., WESSLING-RESNICK, M. (2004). Developmental, regional, and cellular expression of SFT/Ubch5A and DMT1 mRNA in brain. *J Neurosci Res.*, **76**(5):633-41
- KOCHEN, J., GREENER, Y. (1975). Interaction of Ferritin with Lead and Cadmium. *Pediatr. Res.* **9**: 323

- KUBISTA, M., ANDRADE, J.M., BENGTSSON, M., FOROOTAN, A., JONÁK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJÖBACK, R., SJÖGREEN, B., STRÖMBOM, L., STÅHLBERG, A., ZORIC, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 27(2-3):95-125
- FEWTRELL, L.J., PRÜSS-ÜSTÜN, A., LANDRIGAN, P., AYUSO-MATEOS, J.L. (2004). Estimating the global burden of disease of mild mental retardation and cardiovascular diseases from environmental lead exposure, *Environmental Research* 94:120-133
- LAUG, E.P., KUNZE, F.M. (1948). The penetration of lead through the skin. *J Ind Hyg Toxicol.*, 30:256-259
- LAM-YUK-TSEUNG, S., GOVONI, G., FORBES, J., GROS, P. (2003). Iron transport by Nramp2/DMT1: pH regulation of transport by 2 histidines in transmembrane domain 6. *Blood*, 101(9):3699-707
- LANPHEAR, B.P., WEITZMAN, M., EBERLY, S. (1996). Racial differences in Urban children's environmental exposures to lead. *Am J Public Health.* 86(10):1460-3
- LEE, P.L., GELBART, T., WEST, C., HALLORAN, C., BEUTLER, E. (1998). The human Nramp2 gene: characterization of the gene structure, alternative splicing, promoter region and polymorphisms. *Blood Cells Mol Dis.*, 24(2):199-215
- LI, H., LI, F., KWAN, M., HE, Q.Y., SUN, H. (2005a). NMR structures and orientation of the fourth transmembrane domain of the rat divalent metal transporter (DMT1) with G185D mutation in SDS micelles. *Biopolymers*, 77(4):173-83
- LI, F., LI, H., HU, L., KWAN, M., CHEN, G., HE, Q.Y., SUN, H. (2005b). Structure, assembly, and topology of the G185R mutant of the fourth transmembrane domain of divalent metal transporter. *J Am Chem Soc.*, 127(5):1414-23
- LIN, J.L., LIN-TAN, D.T., YEN, T.H., HSU, C.W., JENQ, C.C., CHEN, K.H., HSU, K.H., HUANG, Y.L. (2008). Blood lead levels, malnutrition, inflammation, and mortality in patients with diabetes treated by long-term hemodialysis. *Am J Kidney Dis.*, 51: 107-115
- LOGHMAN-ADHAM, M. (1997). Renal effects of environmental and occupational lead exposure. *Environ Health Perspect.*, 105(9):928-38
- LORELLA Steyn Graphic Design Studio-Pretoria. Erişim: <http://mythwiki.pbworks.com/f/1263999508/PeriodicTable.jpg>, Erişim tarihi: 20.07.2011
- LUDWICZEK, S., AIGNER, E., THEURL, I., WEISS, G. (2003). Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood.* 101(10):4148-54
- MANTON, W.I., ROTHENBERG, S.J., MANALO, M. (2001). The Lead Content of Blood Serum. *Environ Res.*, 86:263273
- MARCHARTOVA, V., RACEK, J., KOHOUT, J., SENFT, V., TREFİL, L. (2000). Effect of antioxidant therapy on indicators of free radical activity in workers at risk of lead exposure. *Vnitr Lek.*, 46: 444-446
- MARET, W., VALLEE, B.L. (1998). Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95(7):3478-82
- MARKOWITZ M. (2000). Lead poisoning. *Pediatr Rev.*, 21: 327-335.
- McCORD JM. (1998). Iron, Free Radicals, and Oxidative Injury seminars in Hematology, 35 (1):5-12
- McKIE, A.T., MARCIANI, P., ROLFS, A., BRENNAN, K., WEHR, K., BARROW, D., MIRET, S., BOMFORD, A., PETERS, T.J., FARZANEH, F., HEDIGER, M.A., HENTZE, M.W., SIMPSON, R.J. (2000). A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell*, 5: 299-309
- McKIE, A.T., BARROW, D., LATUNDE-DADA, G.O., ROLFS, A., SAGER, G., MUDALY, E., MUDALY, M., RICHARDSON, C., BARLOW, D., BOMFORD, A., PETERS, T.J., RAJA, K.B., SHIRALI, S., HEDIGER, M.A., FARZANEH, F., SIMPSON, R.J. (2001). An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*, 291(5509):1755-9
- MACKENZIE, B., TAKANAGA, H., HUBERT, N., ROLFS, A., HEDIGER, M.A. (2007). Functional properties of multiple isoforms of human divalent metal-ion transporter 1 (DMT1). *Biochem J.*, 403(1):59-69
- MEISEL, A., MACKELDANZ, P., BICKLE, T.A., KRUGER, D.H., SCHROEDER, C. (1995). Type III restriction endonucleases translocate DNA in a reaction driven by recognition site-specific ATP hydrolysis. 14(12):2958-66
- MENDOLA, P., SELEVAN, S.G., GUTTER, S., RICE, D. (2002). Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.*, 8(3):188-97

- MIMS, M.P., PRCHAL, J.T. (2005a). Divalent Metal Transporter 1, Iron Metabolism, *Hematology*, **10**(4); 339-345
- MIMS, M.P., GUAN, Y., POSPÍŠILOVA, D., PRŮWITZEROVA, M., INDRAK, K., PONKA, P., DÍVOKY, V., PRCHAL, J.T. (2005b). Identification of a human mutation of DMT1 in a patient with microcytic anemia and iron overload. *Blood*. **105**(3):1337-42.
- MOORE, M.R., GRAHAM, D.J. (1980). Monopyrroles in porphyria, psychosis and lead exposure. *Int J Biochem.*, **12**(5-6):827-32
- MOOS, T., MORGAN, E.H. (2004a). The significance of the mutated divalent metal transporter (DMT1) on iron transport into the Belgrade rat brain. *J Neurochem.*, **88**(1):233-45
- MOOS, T., MORGAN, E.H. (2004b). The metabolism of neuronal iron and its pathogenic role in neurological disease: review. *Ann N Y Acad Sci.*, **1012**:14-26
- MORGAN, E.H., OATES, P.S. (2002). Mechanisms and Regulation of Intestinal Iron Absorption. *Blood Cells Mol Dis.*, **29**:384-399
- MORIYA, M., LINDER, M.C. (2006). Vesicular transport and apotransferrin in intestinal iron absorption, as shown in the Caco-2 cell model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, **290**: 301-309
- MUCKENTHALER, M.U., GALY, B., HENTZE, M.W. (2008). Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr.*, **28**:197-213
- MURRAY, N.E. (2000). Type I Restriction Systems: Sophisticated Molecular Machines (a Legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**. 412-434
- NELSON, N. (1999). Metal ion transporters and homeostasis. EMBO MEMBER'S REVIEW. *The EMBO Journal*, **18**(16)4361-4371
- NEMETH, E., VALORE, E.V., TERRITO, M., SCHILLER, G., LICHTENSTEIN, A., GANZ, T. (2003). Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood.*, **101**(7):2461-3
- NEMETH E, GANZ T. (2006). Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu. Rev. Nutr.*, **26**:323-42
- NEVO, Y., NELSON, N. (2006). *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1763, 609-620
- NEYZÍ, O., ERTUĞRUL, T. (2000). *Pediatrici*, Cilt 2, 3.Baskı, İstanbul, Nobel, 1042- 1064
- NICOLAS, G., VIATTE, L., BENNOUN, M., BEAUMONT, C., KAHN, A., VAULONT, S. (2002). Hepcidin, A New Iron Regulatory Peptide. *Blood Cells, Molecules, and Diseases.*, **29**(3):327-335
- NIELSEN, H., GREGERSEN, P. (1978). Occupational diseases reported to the Industrial Injuries Security Office 1961-70. Recognition and rejection. Is the data applied toward prevention? *Ugeskr Laeger.*, **140**(26):1573-9
- NORDSTROM, S., BECKMAN, L., NORDENSEN, I. (1979). Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden: V. Spontaneous abortion among female employees and decreased birth weight in their offspring. *Hereditas.*, **90**:291-296
- O'FLAHERTY, E.J., HAMMOND, P.B., LERNER, S.I. (1982). Dependence of apparent blood lead half-life on the length of previous lead exposure in humans. *Fundam Appl Toxicol.*, **2**:49-54
- ONG, C.N., LEE, W.R. (1980). Distribution Of Lead-203 in Human Peripheral Blood *In Vitro*. *Br J Ind Med.*, **37**:78-84
- OSKI, F.A. (1993). Iron deficiency in infancy and childhood, *N Engl J Med.*, **329**(3):190-193
- PAGLIA, D.E., VALENTINE, W.N., FINK, K. (1977). Lead poisoning. Further observations on erythrocyte pyrimidine-nucleotidase deficiency and intracellular accumulation of pyrimidine nucleotides. *J Clin Invest.*, **60**: 1362-1366
- PARKKILA, S., WAHEED, A., BRITTON, R.S., BACON, B.R., ZHOU, X.Y., TOMATSU, S., FLEMING, R.E., SLY, W.S. (1997). Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **94**(24):13198-202
- PAPANIKOLAOU, N.C., HATZIDAKI, E.G., BELIVANIS, S., TZANAKAKIS, G.N., TSATSAKIS, A.M. (2005). Lead toxicity update. A brief review. *Med Sci Monit.*, **11**: RA329-336
- PRADEEP, G., DOUGLAS, R.R., DOROTHY, J. T., YUKITAKA, S. (2010). Iron Overload Cardiomyopathy: Better Understanding of an Increasing Disorder, *J Am Coll Cardiol.*, **56**(13):1001-1012

- PARSONS, P.J., REILLY, A.A., HUSSAIN, A. (1991). Observational study of erythrocyte protoporphyrin screening test for detecting low lead exposure in children: impact of lowering the blood lead action threshold. *Clin Chem.*, **37**(2):216-25
- PCR programı. Erişim: http://www.genetiklab.com/altsayfa.php?giris_ID=1&tablo=tbl_yontemler, Erişim tarihi: 25.07.2011.
- PCR'in aşamaları. Erişim: <http://www.drzeydanli.com.tr/index.php?page=icerikgoster&menuID=30>, Erişim tarihi: 25.07.2011.
- PEARSON, P.L. (1985). Restriction fragment length polymorphisms (RFLP's) and their use in mapping the human genome. *Prog.Clin.Biol.Res.*, **177**:23-36
- PETERING, H.G. (1974). The effect of cadmium and lead on copper and zinc metabolism. In Trace Element Metabolism in Animals-2, ed. W.G. Hoekstra, J.W. Suttie, H.E. Ganther, W. Mertz, **1**: 311-25. Baltimore: University Park
- PETIT, T.L., LeBOUTILLIER, J.C. (1979) Effects of lead exposure during development on neocortical dendritic and synaptic structure. *Exp Neurol.*, **64**(3):482-492
- PETRONE, L.R. (2007). Iron deficiency, lead poisoning, and development. *Arch Pediatr Adolesc Med.*, **161**(5): 523; author reply 523-524
- PHILIP, A.T., GERSON, B. (1994a). Lead poisoning-Part I. Incidence, etiology, and toxicokinetics. *Clin Lab Med.*, **14**: 423-444
- PHILIP, A.T., GERSON, B. (1994b). Lead poisoning-Part II. Effects and assay. *Clin Lab Med.*, **14**: 651-670.
- PIGEON, C., ILYIN, G., COURSELAUD, B. (2001). A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *Journal of Biological Chemistry*, **276**:7811-9
- PINGOUD, A., JELTSCH, A. (1997). Recognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases. *Eur. J. Biochem.*, **246**(1):1-22
- POLLOCK, C.A., IBELS, L.S. (1988). Lead nephropathy-a preventable cause of renal failure. *Int J Artif Organs*, **11**: 75-78
- PONKA, P., BEAUMONT, C., RICHARDSON, R. (1988). Function and Regulation of Transferrin and Ferritin in Hematology, **35**: 1, 35-54
- PONKA, P. (1997). Tissue Specific Regulation of Iron Metabolism and Heme Synthesis: Distinct Control Mechanisms in Erythroid Cells. *Blood*. **89**.(1)1-25
- PREMAL, H.P., LAWRENCE, A.L. (2000). DNA polymerase active site is highly mutable: Evolutionary consequences. *PNAS*, **97**(10) 5095-5100
- Protein sentezi. Erişim: <http://www.lisebiyoloji.com/protein%20sentezi.html> , Erişim tarihi: 26.07.2011.
- PUSTERLA, N., MADIGAN, J.E., LEUTENEGGER, C.M.. (2006). Real-Time Polymerase Chain Reaction: A Novel Molecular Diagnostic Tool for Equine Infectious Diseases N. *J Vet Intern Med.*, **20**:3-12
- RABINOWITZ, M.B., WETHERILL, G.W., KOPPLE, J.D. (1976). Kinetic Analysis of Lead Metabolism in Healthy Humans. *J Clin Invest.*, **58**:260-270
- RABINOWITZ, M.B., KOPPLE, J.D., WETHERILL, G.W. (1980). Effect of Food Intake on Fasting Gastrointestinal Lead Absorption in Humans. *Am J Clin Nutr.*, **33**:1784-1788
- ROBERTS, R.J., MACELIS, D. (1991). Restriction enzymes and their isoschizomers. *Nucleic Acids Res.* **19**:2077-2109
- RONIS, MJ, ARONSON, J, GAO, GG., HOGUE, W., SKINNER, R.A., BADGER, T.M., LUMPKIN, C.K. (2001). Skeletal effects of developmental lead exposure in rats. *Toxicol Sci.*, **62**(2):321-329
- ROSEN, J.F., CHESNEY, R.W., HAMSTRA, A., DELUCA, H.F., MAHAFFEY, K.R. (1980). Reduction in 1,25-dihydroxyvitamin D in children with increased lead absorption. *N Engl J Med.*, **302**: 1128-1131
- ROSTAN, E.F., DEBUYS, H.V., MADEY, D.L., PINNELL, S.R. (2002). Evidence supporting zinc as an important antioxidant for skin. *Int J Dermatol.* **41** (9):606-11
- ROTH, J.A., HORBİNSKİ, C., FENG, L., DOLAN, K.G., HİGGİNS, D., GARRİCK, M.D. (2000). Differential localization of divalent metal transporter 1 with and without iron response element in rat PC12 and sympathetic neuronal cells. *J Neurosci.*, **20**(20):7595-601
- ROUAULT, T., KLAUSNER, R. (1997). Regulation of iron metabolism in eukaryotes. *Curr Top Cell Regul.*, **35**:1-19

- ROUSSEAU, M.C., STRAIF, K., SIEMIATYCKI, J. (2005). IARC carcinogen update. *Environ Health Perspect.*, **113**: A580-581
- ROY, C., ENNS, C. (2000). Iron homeostasis: New tales from the crypt. *Blood.*, **96**(13): 420-427
- SALTMAN P. (1989). Oxidative stress: A radical view. *Scrum i lemalol.*, **26**:249-50
- SANÍN, L.H., GONZALEZ-COSSIO, T., ROMIEU, I., PETERSON, K.E., RUÍZ, S., PALAZUELOS, E., HERNANDEZ-AVILA, M., HU, H. (2001). Effect of maternal lead burden on infant weight and weight gain at one month of age among breastfed infants. *Pediatrics*, **107**(5):1016-1023
- SCHOBER, S.E., MIREL, L.B., GRAUBARD, B.I., BRODY, D.J., FLEGAL, K.M. (2006). Blood lead levels and death from all causes, cardiovascular disease, and cancer: results from the NHANES III mortality study. *Environ Health Perspect.*, **114**: 1538-1541
- SCHROEDER, H.A., TIPTON, I.H. (1968). The human body burden of lead. *Arch Environ Health*, **17**:965-978
- SCHÜTZ, A., BERGDAHL, I.A., EKHOLM, A., SKERFVING, S. (1996). Measurement By ICP-MS of Lead in Plasma and Whole Blood of Lead Workers and Controls. *Occup Environ Med.*, **53**:736-740
- SCHWARTZ, J., ANGLE, C., PITCHCR, H. (1986). Relationship between childhood blood lead levels and stature. *Pediatrics*, **77**:281-288
- SELEVAN, S.G., RICE, D.C., HOGAN, K.A., EULING, S.Y., PFAHLES-HUTCHENS, A., BETHEL, J. (2003). Blood lead concentration and delayed puberty in girls. *N Engl J Med.*, **348**(16):1527-1536
- SHEN, X.M., YAN, C.H., GUO, D., WU, S.M., LI, R.Q., HUANG, H., AO, L.M., ZHOU, J.D., HONG, Z.Y., XU, J.D., JIN, X.M., TANG, J.M. (1998). Low-level prenatal lead exposure and neurobehavioral development of children in the first year of life: a prospective study in Shanghai. *Environ Res.*, **79**(1):1-8
- SHINDO, M., TORIMOTO, Y., SAITO, H., MOTOMURA, W., IKUTA, K., SATO, K., FUJIMOTO, Y., KOHGO, Y. (2006). Functional role of DMT1 in transferrin-independent iron uptake by human hepatocyte and hepatocellular carcinoma cell, HLF. *Hepatol Res.*, **35**(3):152-62.
- SIX, K.M., GOYER, R.A. (1970). Experimental enhancement of lead toxicity by low dietary calcium. *J. Lab. Clin. Med.* **83**: 933- 42
- SIX, K.M., GOYER, R.A. (1972). The Influence of Iron Deficiency on Tissue Content and Toxicity of Ingested Lead in The Rat. *J. Lab. Clin. Med.*, **79**: 128- 36
- SMITH, D., OSTERLOH, J.D., FLEGAL, A.R. (1996). Use of endogenous, stable lead isotopes to determine release of lead from the skeleton. *Environ Health Perspect*, **104**(1):60-66
- SMITH, D., HERNANDEZ-AVILA, M., TÉLLEZ-ROJO, M.M., MERCADO, A., HU, H. (2002). The Relationship Between Lead in Plasma and Whole Blood in Women. *Environ Health Perspect*, **110**(3):263-268
- SOEMANTRI, A.C., POLLIT, E., KIM, I. (1985). Iron deficiency anemia and educational achievement. *Am J. Clin Nutr.*, **42**:1111-1228
- SOLLIWAY, B.M., SCHAFFER, A., PRATT, H., YANNAL, S. (1996). Effects of exposure to lead on selected biochemical and haematological variables. *Pharmacol Toxicol.*, **78**: 18-22
- SOMASHEKARAIHAH, B.V., VENKAIHAH, B., PRASAD, A.R. (1990). Biochemical diagnosis of occupational exposure to lead toxicity. *Bull Environ Contam Toxicol.*, **44**: 268-275
- STAUBER, J.L., FLORENCE, T.M., GULSON, B.L., DALE, L.S. (1994). Percutaneous absorption of inorganic lead compounds. *Sci Total Environ.*, **145**:55-70
- STOCKMAN, J.A. (1981). Infections and iron. Too much of a good thing? *Am J Dis Child.*, **135**(1):18-20.
- STAESSEN, J.A., BULPITT, C.J., FAGARD, R., LAUWERYS, R.R., ROELS, H., THIJS, L., AMERY, A. (1994). Hypertension caused by low-level lead exposure: myth or fact? *J Cardiovasc Risk.*, **1**(1):87-97
- SU, M.A., TRENOR, C.C., FLEMING, J.C., FLEMING, M.D., ANDREWS, N.C. (1998). The G185R mutation disrupts function of the iron transporter Nramp2. *Blood*, **92**:2157
- T.C.S.B. (T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI) REFİK SAYDAM HIFZISSIHHA MERKEZİ BAŞKANLIĞI HIFZISSIHHA MEKTEBİ MÜDÜRLÜĞÜ. (2006). Birinci Basamağa Yönelik Zehirlenmeler Tanı ve Tedavi Rehberleri. Saha Uygulaması Çalışması, sf: 186-188

- TABUCHI, M., TANAKA, N., NISHIDA-KITAYAMA, J., OHNO, H., KISHI, F. (2002). Alternative splicing regulates the subcellular localization of divalent metal transporter 1 isoforms. *Mol Biol Cell*, **13**(12):4371-87
- TALLKVIST, J., BOWLUS, C.L., LONNERDAL, B. (2000). Functional And Molecular Responses of Human Intestinal Caco-2 Cells To Iron Treatment. *Am J Clin Nutr.*, **72**:770-775
- TALLKVIST, J., BOWLUS, C.L., LONNERDAL, B. (2001). DMT1 Gene Expression And Cadmium Absorption In Human Absorptive Enterocytes. *Toxicol Lett.*, **122**:171-177
- TCHERNITCHKO, D., BOURGEOIS, M., MARTIN, M.E., BEAUMONT, C. (2002). Expression of the two mRNA isoforms of the iron transporter Nramp2/DMT1 in mice and function of the iron responsive element. *Biochem J.*, **363**(Pt 3):449-55
- TEMUR, S. (1997). Metalik Maden Yatakları, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya
- TEMUR, S. (2000). Metalik Maden Yatakları, Nobel Yayın Dağıtım Ltd., Ankara
- TOM WALZ, Endostatik Transferrin Döngüsü, Erişim: http://walz.med.harvard.edu/Research/Iron_Transport/Tfirtf.php, Erişim tarihi: 18.07.2011.
- TRACHTENBARG, D.E. (1996). Getting the lead out: when is treatment necessary? *Postgrad Med.*, **99**(3):201-2, 207-18
- Transisyonla tek nükleotid değişiminin gösterilmesi. Erişim: <http://www.mygenetree.com/images/img-snps.jpg> , Erişim tarihi: 04.07.2011.
- TRENOR, C.C., CAMPAGNA, D.R., SELLERS, V.M., ANDREWS, N.C., FLEMING, M.D. (2000). The molecular defect in hypotransferrinemic mice, *Blood*, **96**(3):1113-8
- TRINDER, D., OATES, P.S., THOMAS, C., SADLEIR, J., MORGAN, E.H. (2000). Localisation of divalent metal transporter 1 (DMT1) to the microvillus membrane of rat duodenal enterocytes in iron deficiency, but to hepatocytes in iron overload. *Gut*. **46**(2):270-6
- TURLAKIEWICZ, Z., CHMIELNICKA, J. (1985). Diethyllead as a specific indicator of occupational exposure to tetraethyllead. *Br J Ind Med.*, **42**:682-685
- Türkiye'nin Kurşun-Çinko maden yatakları. Erişim: http://www.mta.gov.tr/v1.0/images/turkiye_maden/maden_yataklari/b_h/kur_cin.jpg, Erişim tarihi: 15.07.2011.
- Türkiye'de kurşunun 2008 yılında dağılımı. Erişim: <http://www.msceast.org/Turkey>, Erişim tarihi: 25.06.2011.
- HHS (U.S. Department of Health and Human Services). (1991)
- UMBREIT, J.N., CONRAD, M.E., MOORE, E.G., LATOUR, L. (1998). Iron absorption and cellular transport: The mobilferrin/paraferritin paradigm. *Semin Hematol.*, **35**: 13-26
- UMBREIT J. (2005). Iron deficiency: a concise review. *Am J Hematol.*, **78**: 225-31
- UYSAL, Z. (1999). Demir Metabolizmasında, Demir Eksikliğinde ve Demir Fazlalığında Yenilikler, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası Cilt 52, Sayı 3
- UZEL, C., CONRAD, M.E. (1998). Absorption of Heme Iron, Seminars in Hematology, **35**: 1 27 – 34
- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T., MAZUR, M., TELSER, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.*, **39**: 44-84
- VARIAN Basic Atomic Absorbance Theory Australia Pty Ltd (A.C.N. 004 559 540) (1997)
- FAIRBANKS, V.F. (1994). Iron in medicine and nutrition. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, eds. Modern Nutrition in Health and Disease. Philadelphia: Lea & Febiger, 185-213
- VICTERY, W., THOMAS, D., SHOEPS, P., VANDER, A.J. (1982). Lead increases urinary zinc excretion in rats. *Biol. Tr. Elem. Res.* **4**: 211– 19
- VON SONNTAG, C. (2006). Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- VURAL, N., DUYDU, Y. (1995). Biological, monitoring of lead in workers exposed to tetraethyllead. *Sci Total Environ.*, **171**:183-187
- VURAL, N. (2005). “Toksikoloji”, *Ankara Üniversitesi Basımevi*, Ankara, 504, 508-509, 555
- WAHEED, A., PARKKILA, S., ZHOU, X.Y., TOMATSU, S., TSUCHIHASHI, Z., FEDER, J.N., SCHATZMAN, R.C., BRITTON, R.S., BACON, B.R., SLY, W.S. (1997). Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with beta2-microglobulin intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**:12384-9
- WALTER, T., D ANDRACA, I., CHADUT, P. (1989). Adverse effects of iron deficiency anemia on infant psychomotor development. *Pediatrics*, **84**:7-17

- WARREN, M.J., COOPER, J.B., WOOD, S.P., SHOOLINGIN-JORDAN, P.M. (1998). Lead poisoning, haem synthesis and 5-aminolevulinic acid dehydratase. *Trends Biochem Sci.*, **23**: 217-221
- WANG, X.S., ONG, W.Y., CONNOR, J.R. (2001). A light and electron microscopic study of the iron transporter protein DMT-1 in the monkey cerebral neocortex and hippocampus. *J Neurocytol.*, **30**(4):353-60
- WATSON, W.S., MORRISON, J., BETHEL, M.I., BALDWIN, N.M., LYON, D.T., DOBSON, H., MOORE, M.R., HUME, R. (1986). Food Iron and Lead Absorption in Humans. *Am J Clin Nutr.*, **44**:248-256
- WATSON, J.D. (1968). The double helix. Athenum, New York
- WATSON, J.D., TOOZE, J., KURTZ, D.T. (1993). Recombinant DNA, a short course. Scientific American Books, WH Freeman, New York
- WHO (World Health Organisation). (1989). Preventing and Controlling Iron Deficiency Anemia through Primary Health Care. Geneva
- WHO (World Health Organisation). (1992). A Guide to the Development of on-Site Sanitation
- WHO (World Health Organization). (1995). Environmental Health Criteria 165-Inorganic lead. Geneva
- WHO (World Health Organization). (1996). Trace elements in human nutrition and health. Geneva, WHO press, 72-104
- WALZ T., Laboratory of Molecular Electron Microscopy, Harvard Medical School, http://walz.med.harvard.edu/Research/Iron_Transport/Tftrf.php, Erişim tarihi: 22.07.2011
- WILLIAMS, S.J., HAYWARD, N.K. (2001). The impact of the human genome project on medical genetics. *Trends in Molecular Medicine*, **7**(5). 187-231
- WILSON, I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**:3741-3751
- WITH, T.K., PEDERSEN, J.S. (1978). Ion exchange analysis of porphyrins in urine. *Scand J Clin Lab Invest.*, **38**(3):279-89
- WITTMERS, L.E., AUFDERHEIDE, A.C., WALLGREN, J., RAPP, G., ALICH, A. (1988). Lead in bone. IV. Distribution of lead in the human skeleton. *Arch Environ Health.*, **43**: 381-391
- WOLF, A.W., JIMENEZ, E., LOZOFF, B. (2003). Effects of Iron Therapy on Infant Blood Lead Levels. *J Pediatr.*, **143**:789-795
- WRIGHT, P.A., WYNFORD-THOMAS, D. (1990). The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. *J Pathol.*, **162**(2):99-117
- WRIGHT, R.O., TSAIH, S.W., SCHWARTZ, J., WRIGHT, R.J., HU, H. (2003). Association Between Iron Deficiency and Blood Lead Level in a Longitudinal Analysis of Children Followed in an Urban Primary Care Clinic. *J Pediatr.*, **142**:9-14
- WU, M.T., KELSEY, K., SCHWARTZ, J. (2003). A δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism may modify the relationship of low-level lead exposure to uricemia and renal function: The Normative Aging Study. *Environ Health Perspect.*, **111**(3):335-340
- YAMAJI, S., SHARP, P., RAMESH, B., SRAI, S.K. (2004). Inhibition of iron transport across human intestinal epithelial cells by hepcidin. *Blood*, **104**(7):2178-80
- YEH, K., YEH, M., WATKINS, J.A., RODRIGUEZ-PARIS, J., GLASS, J. (2000). Dietary iron induces rapid changes in rat intestinal divalent metal transporter expression, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, **279**: G1070–G1079
- YEN, A.W., FANCHER, T.L., BOWLUS, C.L. (2006). Revisiting Hereditary Hemochromatosis: Current Concepts and Progress. *The American Journal of Medicine.*, **119** (5): 391–399
- ZHANG, W., ZHANG, G.G., HE, H.Z., BOLT, H.M. (1994). Early health effects and biological monitoring in persons occupationally exposed to tetraethyllead. *Int Arch Occup Environ Health.*, **65**:395-399
- ZIEGLER, E.E., EDWARDS, B.B., JENSEN, R.L., MAHAFFEY, K.R., FOMON, S.J. (1978). Absorption and Retention of Lead by Infants. *Pediatr Res.*, **12**:29-34
- ZOLLER, H., PIETRANGELO, A., VOGEL, W., WEISS, G. (1999). Duodenal metal-transporter (DMT-1, NRAMP-2) expression in patients with hereditary haemochromatosis. *Lancet.*, **353**(9170):2120-3
- ZOLLER, H., KOCH, R.O., THEURL, I., OBRIST, P., PIETRANGELO, A., MONTOSI, G., HAILE, D.J., VOGEL, W., WEISS, G. (2001). Expression of the duodenal iron transporters divalent-metal transporter 1 and ferroportin 1 in iron deficiency and iron overload. *Gastroenterology*, **120**(6):1412-9
- ZOLLER, H., DECRISTOFORO, C., WEISS, G. (2002). Erythroid 5-aminolevulinic acid synthase, ferrochelatase and DMT1 expression in erythroid progenitors: differential pathways for erythropoietin and iron-dependent regulation. *Br J Haematol.*, **118**(2):619-26

EKLER

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURULU
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, ANKARA UNIVERSITY
ANKARA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU.ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	
	PROTOKOL ADI	Metal maruziyeti olan bireylerin kan, idrar, saç ve tırnak örneklerinde toksik metal ve iz element düzeyleri ile metal bağlayan proteinlerin polimorfizmi arasındaki ilişki
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Prof.Dr.Tülin Söylemezoğlu
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü
	DESTEKLEYİCİ FİRMA	

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BİLGİLER	Belge Adı	Değişiklik No. / Tarihi	Dili
	PROTOKOL		
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLURU		
	OLGU RAPOR FORMU		

ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALARI KLAVUZU
---------------	---------------------------------

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 139-4071	Tarih: 20 Ekim 2008
	Araştırma protokolüne tamamen uyulmak, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Yönergesinde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve Yönergenin 11/h maddesi gereği sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere bütçesi temin edildiği takdirde araştırmanın yürütülmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan öğretim üyelerinin oybirliği ile karar verildi	

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ayhan Başkan	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	<i>[İmza]</i>
Prof. Dr. Efser Kerimoğlu Başkan Yardımcısı	Çocuk Psikiyatrisi	Ankara Tıp Fakültesi	K	<i>[İmza]</i>
Prof. Dr. Özden Palaoglu Sekreter	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	Yurtdışında

ACI GIBİDİR

03...
Hasan...
A.Ü. Tıp Fakültesi
İdari Personel Bürosu Şefi

Prof. Dr. Ragıp Çam Üye	Genel Cerrahi	Ankara Tıp Fakültesi	E	<i>Ragıp Çam</i>
Prof. Dr. Handan Onur Üye	Tıbbi Onkoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	<i>Handan Onur</i>
Prof. Dr. Ajlan Tükün Üye	Tıbbi Genetik	Ankara Tıp Fakültesi	K	<i>Ajlan Tükün</i>
Prof. Dr. Esra Erden Üye	Patoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	İzinli
Prof. Dr. Aydan İkinciogulları Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Ankara Tıp Fakültesi	K	Kongrede
Prof. Dr. Erdal Onar Üye	Hukuk	Ankara Üniv. Hukuk Fakültesi	E	<i>Erdal Onar</i>
Prof. Dr. Yasemin Oğuz Üye	Deontoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	<i>Yasemin Oğuz</i>
Prof. Dr. Bülent Gümüşel Üye	Farmakoloji-Eczacı	Hacettepe Üniv. Eczacılık Fakültesi	E	<i>Bülent Gümüşel</i>
Doç. Dr. Ashhan Avcı Üye	Biyokimya	Ankara Tıp Fakültesi	K	<i>Ashhan Avcı</i>
Gülsüm Aslan	Sağlık Mesleği Dışı	Emekli	K	<i>Gülsüm Aslan</i>

Hasan TUNA
A. Ü. Tıp Fakültesi
İdari Personel



T.C
SAĞLIK BAKANLIĞI
ANKARA MESLEK HASTALIKLARI HASTANESİ
BAŞHEKİMLİĞİ

ŞUBE : B.10.4.İSM.4.06.23.36/
KONU :

4686 C1.08.2008

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
ADLI TIP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

İlgi : 30.07.2008 tarih ve 476 sayılı yazınız.

İlgili yazınızda belirtildiği şekilde Enstitünüzde yürütülmekte olan "Metal maruziyeti olan işçilerin biyolojik materyallerinde toksik metal ve iz element düzeyleri ile metal bağlayan proteinlerin polimorfizmi arasındaki ilişki" konulu çalışma çatısı altında yapılacak olan tez ve araştırmalarda değerlendirilmek amacıyla metal maruziyeti olan ve kontrol grubu olarak kullanılmak amacıyla metal maruziyeti olmayan işyerleri çalışanlarından alınacak olan biyolojik materyaller, etik kurul kararı alındıktan sonra, etik kurallar doğrultusunda hastanemizden sağlanabilecektir.

Bu amaçla yapılacak olan araştırmalar kurumumuzun ilgi ve görev alanına girdiğinden hastalarımıza sağlık verilerin de verilmesi mümkündür.

Gereğini bilgilerinize arz / rica ederim.

Dr. Hıry YILMAZ
Başhekim

Adres : Osman Gazi Mah. Atlılar Sok. No:45 06280 Keçiören /ANKARA
Tel : 0 312 580 83 95 / 1160 Fax : 0 312 580 84 04
Web : www.ankarameslekhastanesi.gov.tr Email: bilgi@ankarameslekhastanesi.gov.tr

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Miyase

Soyadı: ODABAŞI

Doğum Tarihi ve Yeri: 1979, KAYSERİ

Uyruğu: T.C.

Medeni Durumu: Bekar

İletişim Adresi ve Telefonu: Güventepe Mah. Güventepe Cad. 38/1, PK. 06720, Yenimahalle/ANKARA, Tel: 0505 543 02 41

II- Eğitimi

2001-2004 Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı (Yüksek Lisans; Tez Konusu: Bazı Kekik Türlerinin Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Bir Araştırma)

1997 – 2001 Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fak., Biyoloji Bölümü (Lisans)

1994 – 1997 Melikgazi Süper Lisesi -KAYSERİ

1991 – 1994 Talas Lisesi (Ortaokul)- KAYSERİ

1987 – 1991 Anayurt İlkokulu- KAYSERİ

Yabancı Dili: İngilizce, Almanca

III- Ünvanları

2006-Uzman Biyolog

2002-Asistan Biyolog

IV- Mesleki Deneyimi

2002-2007 Uzman Biyolog. Emniyet Genel Müdürlüğü, Ankara Kriminal Polis Laboratuvarı Müdürlüğü, Biyolojik İncelemeler Şubesi

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Toksikoloji Derneği-2009'dan beri

Türk Biyokimya Derneği-2011

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında (Proceedings) Basılan Bildiriler:

- Z. Kayaaltı, N. Cantürk, L. Sahiner, **M. Odabası**, T. Söylemezoglu (2009). Detection of common mitochondrial DNA deletions in heart autopsy tissue after acute myocardial infarction. 4th Mediterranean Academy of Forensic Sciences Meeting, Antalya, TURKEY. PP35. S15-16.
- Zeliha Kayaaltı, Nergis Cantürk, Levent Sahiner, **Miyase Odabası**, Tülin Söylemezoglu. (2009) Detection of Mitochondrial DNA Deletions in Heart Tissue with Acute Myocardial Infarction. **Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası**. 62:15-19.
- **M. Odabası**, Z. Kayaaltı, D.Tekin, A. Karakus, T. Söylemezoglu (2010). Divalent metal transporter 1 polymorphism frequencies in Turkish population. XII International Congress of Toxicology, 19-23 July 2010 Barcelona, Spain. Poster özeti Toxicology Letters (Abstract Adenda) yayınlamıştır. 2010, p25.
- Z. Kayaaltı, D. Tekin, G. Mergen, **M. Odabası**, G. Kurtay, T. Soylemezoglu, (2010) Effect Of Dmt1 Gene Polymorphism on Placental Metal Levels XII International Congress of Toxicology, 19-23 July, Barcelona, Spain. Poster özeti Toxicology Letters, 196: 85, Supplement 1'de yayınlamıştır.
- T. Soylemezoglu, **M. Odabası**, H. Yılmaz, G. Mergen, Z. Kayaaltı (2010). Effectiveness of calcium disodium versenate chelation therapy on chronic lead intoxication. XII International

Congress of Toxicology, 17 July 2010, Barcelona, Spain. Poster özeti Toxicology Letters, 196: 85, Supplement 1'de yayınlanmıştır.

- Zeliha Kayaalti, **Miyase Odabaşı**, Tülin Söylemezoğlu (2011), Genotype and allele frequencies of divalent metal transporter 1 polymorphism in Turkish population, Molecular Biology Reports Volume 38, Number 4, 2679-2684,
- N. Dalgic, D. Tekin, Z. Kayaalti, T. Soylemezoglu, E. Cakir, B. A. Kilic, B. I. Kutlubay, M. Sancar, **M. Odabasi**, (2011) Arg753Gln Polymorphism of the Human Toll-likeReceptor-2 Gene in Pediatric Tuberculosis Disease Human Immunology, Volume 72, Issue 5, Pages 440-445
- Tülin SÖYLEMEZOĞLU, Zeliha KAYAALTI, Hınç YILMAZ, **Miyase ODABASI**. (2010) Effectiveness of Calcium Disodium Ethylenediamine Tetraacetate Chelation Therapy on Chronic Lead Intoxication. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi, Accepted.
- **M. Odabası**, Z. Kayaalti, V. Aliyev, H. Yılmaz and T. Söylemezoğlu (2011). Association between a polymorphism of divalent metal transporter gene and blood lead and iron levels in Turkish metallurgy workers, 36th FEBS Congress 25-30 June 2011, Torino, Italy. Poster özeti 36th FEBS Abstract Book, Supplement 1'de yayınlanmıştır.

VII- Bilimsel Etkinlikleri (Aldığı Kurslar, Katıldığı Seminerler ve Diğer Programlar)

- 2011 Haziran: 36. FEBS Kongresi, Torino, İtalya
- 2011 Mayıs: Klinik Toksikoloji Derneği 16. Kongresi, Erciyes, Kayseri
- 2010 Aralık: Türkiye'de Adli Toksikolojinin Bugünü ve Geleceği, Hacettepe Üniversitesi, Ankara
- 2010 Kasım: POP (Kalıcı Organik Kirleticiler) İzleme: Uluslararası Katılımlı Çevre ve Sağlık Çalıştayı, 3-5 Kasım, Papillon Zeugma Hotel, Antalya
- 2010 Temmuz: IUTOX 2010 (XII International Congress of Toxicology), Barselona, İspanya
- 2009 Haziran: VII Uluslararası Katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresi, ODTÜ, Ankara
- 2009 Mart: Nano Particles and The Gastrointestinal Tract, Düseldorf, Almanya
- 2008: Erasmus Öğrenci Değişim Programı kapsamında Doktora Tez Araştırması, Heinrich-Heine Üniversitesi, IUF Moleküler Toksikoloji Enstitüsü, Düseldorf, Almanya
- 2008 Şubat: EMBO Moleküler Biyoloji Kongresi, Boğaziçi Üniversitesi, İstanbul
- 2008: Ankara Üniversitesi 15. Ulusal Biyoteknoloji Sempozyumu, Ankara
- 2008: DNA Hasarı ve DNA Onarımı, A.Ü. Adli Tıp Enstitüsü, Doktora Semineri, Ankara
- 2008: Kanser Oluşumunun Genotoksik Mekanizması, A.Ü. Adli Tıp Enstitüsü, Doktora Semineri, Ankara
- 2007: GENOMED Gene Mapper Programı Eğitim Sertifikası
- 2006: Emniyet Genel Müdürlüğü, Kriminal Polis Laboratuvarı, Adli Biyoloji Uzmanlık Sertifikası
- 2003: Bazı Kekik Distilatlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması, G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Semineri, Ankara
- 2003: Emniyet Genel Müdürlüğü, Kriminal Polis Laboratuvarı, Meselek içi Eğitim Kursu (1 ay)
- 2001: TÜBİTAK Biyoteknoloji Kongresi, Ankara

VIII- Diğer Bilgiler

Aldığı Dereceler: Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bölüm Birinciliği.

Aldığı Burslar ve Ödüller:

- 1998-2001: Gazi Üniversitesi Sağlık, Kültür ve Spor Dairesi Başkanlığı Bursu
- 2001: TÜBİTAK-Bayg (Bilim Adamı Yetiştirme Grubu) Yurt İçi Yüksek Lisans Bursiyeri
- 2006: TÜBİTAK-BİDEB (Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı) Yurt İçi Doktora Bursiyeri
- 2007: Emniyet Genel Müdürlüğü, Takdir Belgesi.