Form-1

	T.C. GAZİ ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ PROJE BAŞVURU FORMU

PROJEYE İLİŞKİN İMZALAR

GÖREVİ	UNVANI, ADI SOYADI	BÖLÜMÜ	TARİH	İMZA
PROJE YÖNETİCİSİ	PROF.DR. BENSU KARAHALİL	Meslek Bilimleri Bölümü Toksikoloji Anabilim Dalı		
BÖLÜM / A.D BAŞKANI	Prof. Dr. İsmet Çok	Meslek Bilimleri Bölümü Toksikoloji Anabilim Dalı		

1. GENEL BİLGİLER

1.1. PROJE YÖNETİCİSİ

Unvanı, Adı ve Soyadı	PROF.DR. BENSU KARAHALİL
Bölümü	Eczacılık Meslek Bilimleri
Fakülte, Enstitü veya Yüksekokulu	Eczacılık Fakültesi
Kurum Sicil No	22488
TC Kimlik No	13546071120
e-posta adresi	bensu@gazi.edu.tr
İş Tel	2023085
Cep Tel	2023085

1.2 PROJEDEKİ DİĞER ELEMANLAR

Unvanı, Adı ve Soyadı	Fakülte / Enstitü / Yüksekokulu	Bölüm/AD	Projedeki Görevi	Projedeki Katma Değeri
Uzm. Ecz. Kerem Şentürk	Eczacılık	Meslek Bilimleri Bölümü Toksikoloji Anabilim Dalı	Yardımcı araştırmacı-Doktora tez öğrencisi	Doktora Tezi - Bütün Deneylerden Sorumlu

1.3. PROJENİN ADI

AKARYAKIT İSTASYONUNDA KİMYASALLARA MARUZİYETİN ANALİTİK BİYOİZLENMESİ

1.4. PROJENİN TÜRÜ

Doktora

1.5. PROJENİN SÜRESİ

Teklif(Yönetici)	Teklif(Uzmanlar Gr.)	Kabul(Bap Komisyonu)
24		

1.6. PROJEYİ ÜNİVERSİTE DIŞINDAN DESTEKLEYEN DİĞER KURULUŞLAR

Destek Sağlayan Kuruluşun Adı	Destek Miktarı

1.7. GENEL BÜTÇE TABLOSU (TL)

BAP'tan Talep Edilen	Makine ve Teçhizat Giderleri	Sarf Giderleri	Hizmet Alımları	Seyahat Giderleri	Bursiyer	TOPLAM
1	0,00	47.100,00	0,00	2.900,00	0,00	50.000,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TOPLAM	0,00	47.100,00	0,00	2.900,00	0,00	50.000,00
Yüzdesi	% 0	% 94	% 0	% 6	% 0	% 100

1.8. AYRINTILI GİDER LİSTESİ

Sıra No	Türü	Gider Açıklaması	Gider Birimi	Gider Miktarı	Gider Birim Fiyatı	Toplam Fiyatı
1	Sarf Giderleri	Vial HS crimp FB 20 ml clr cer. size 22.75 x75 mm 100 adet	Paket	10,00	129,80	1.298,00
2	Sarf Giderleri	Headspace Al crmp cap PTFE Si septa 20mm 100 adet	Adet	10,00	472,00	4.720,00
3	Sarf Giderleri	Şırınga Ucu Filtre steril PA membran 0 45 umol 100 adet	Paket	2,00	472,00	944,00
4	Sarf Giderleri	15 ML Şırınga	paket	2,00	177,00	354,00
5	Sarf Giderleri	ODS-2 Hypersil 250 mm x 4.6 mm 5µm HPLC Column	Adet	1,00	2.006,00	2.006,00
6	Sarf Giderleri	Trifluoroacetic acid HPLC Grade > 99 5% ikibuçuk litre	Adet	3,00	306,80	920,40
7	Sarf Giderleri	Acetonitrile Hypergrade For Lc-Ms Lichrosolv®	Adet	3,00	354,00	1.062,00

		UN1648 3 II ikibuçuk L				
8	Sarf Giderleri	SPE Supra Clean SAX Strong Anion Exchange Column 500 mg/3 mL	Adet	3,00	944,00	2.832,00
9	Sarf Giderleri	Phosphate buffer (PH 6.4) 5 LT	Adet	1,00	746,00	746,00
10	Sarf Giderleri	Acetic Acid (Glacial) 100% Extra Pure 2.5 LT	Adet	1,00	76,70	76,70
11	Sarf Giderleri	trans trans Muconic acid analytical standart	Adet	2,00	826,00	1.652,00
12	Sarf Giderleri	S-phenylmercapturic acid (SPMA) analytical standartı	Adet	1,00	1.198,00	1.198,00
13	Sarf Giderleri	Hippuric acid analytical standard	Adet	1,00	944,00	944,00
14	Sarf Giderleri	Mandelic acid analytical Standard	Adet	1,00	1.475,00	1.475,00
15	Sarf Giderleri	Methyl hippuric acid (MHA) standard	Adet	1,00	1.080,00	1.080,00
16	Sarf Giderleri	Ependorf 1.5 ml safe lock kapak steril 1000 adet /PK	Adet	2,00	88,50	177,00
17	Sarf Giderleri	Sarı Pipet Ucu Steril 200 ul 1000 ad/ paket	Paket	12,00	29,50	354,00
18	Sarf Giderleri	Mavi Pipet Ucu Steril 1000 ul 1000 ad/ paket	Paket	15,00	35,40	531,00
19	Sarf Giderleri	Beyaz Pipet Ucu Steril 10 ul 1000 ad/ paket	Paket	10,00	29,50	295,00
20	Sarf Giderleri	Otomatik Pipet	Adet	1,00	4.366,00	4.366,00

		seti				
21	Sarf Giderleri	0.5 ml Tüp steril domed caps 1000 adet/paket	Paket	2,00	61,20	122,40
22	Sarf Giderleri	Eldiven	Adet	10,00	19,44	194,40
23	Sarf Giderleri	Otoklavlanabilir cam şişe 1 lt 10 adet/pk	Adet	5,00	141,60	708,00
24	Sarf Giderleri	Otoklavlanabilir cam erlen 250 ml	Adet	5,00	118,00	590,00
25	Sarf Giderleri	Otoklavlanabilir cam erlen 100 ml	Adet	5,00	94,40	472,00
26	Sarf Giderleri	Otoklavlanabilir cam şişe 500 ml	Adet	3,00	94,40	283,20
27	Sarf Giderleri	Pipet ucu 10 ul steril racklı filtreli 10x96 rack/ paket	Adet	6,00	212,40	1.274,40
28	Sarf Giderleri	Pipet ucu 100 ul steril racklı filtreli 10x96 rack / paket	Adet	5,00	212,40	1.062,00
29	Sarf Giderleri	Pipet ucu 1000 ul steril racklı filtreli 10x96 rack / paket	Adet	7,00	212,40	1.486,80
30	Sarf Giderleri	Falkon tüpü 50 ml steril tek tek ambalajlı 500 adet/PK	Adet	2,00	354,00	708,00
31	Sarf Giderleri	Eluent şişesi ve şişe güvenlik kapak seti 3 yollu	Adet	3,00	401,20	1.203,60
32	Sarf Giderleri	Falkon tüpü 15 ml steril tek tek ambalajlı 500 adet/PK	Adet	2,00	354,00	708,00
33	Sarf Giderleri	Filtre kağıdı kantitatif 125 mm siyah bant hızlı akış hızı 500 adet/PK	Adet	2,00	230,10	460,20

34	Sarf Giderleri	Hydrochloric Acid 30% Suprapur® UN1789 8 II 2 litre	Adet	2,00	354,00	708,00
35	Sarf Giderleri	Sodyum asetat tamponu 5 kg	Adet	2,00	354,00	708,00
36	Sarf Giderleri	β-Glucuronidase/Arylsulfatase from helix pomatia	Adet	1,00	1.198,00	1.198,00
37	Sarf Giderleri	C-18 ekstraksiyon (saflaştırma)(Phenomenex) kartuşu	Adet	1,00	1.062,00	1.062,00
38	Sarf Giderleri	1-hidroksipiren standartı 500 mg	Adet	1,00	1.180,00	1.180,00
39	Sarf Giderleri	Azot gazı 10 litre	Adet	2,00	236,00	472,00
40	Sarf Giderleri	Şırınga Ucu Filtre steril 0.2 umol 100 adet/pk	Paket	2,00	472,00	944,00
41	Sarf Giderleri	Lichosorb rp18 (15 cmx4.6mm) HPLC kolonu (BGB)	Adet	1,00	1.880,70	1.880,70
42	Sarf Giderleri	Creatinine Reference Standard 100MG	Adet	1,00	1.604,80	1.604,80
43	Sarf Giderleri	Pikrik Asit (Applichem A2520)	Adet	2,00	165,20	330,40
44	Sarf Giderleri	Falkon tüpü 50 ml steril tek tek ambalajlı 500 adet/PK	Paket	2,00	354,00	708,00
45	Seyahat Giderleri	Yurtdışı kongre /sempozyum katılım	KEZ	1,00	2.200,00	2.200,00
46	Seyahat Giderleri	Yurtiçi kongre/ sempozyum katılım	KEZ	1,00	700,00	700,00

2. ÖZET

Proje başlığı, özeti ve anahtar kelimeler **Türkçe ve İngilizce** yazılmalıdır. Türkçe özetlerin projenin özgün değeri, yöntemi, yönetimi ve yaygın etkisinin ana hatları özetlenmelidir. (**Proje özeti 250 kelimeyi geçmemelidir.)**

Proje Adı: AKARYAKIT İSTASYONUNDA KİMYASALLARA MARUZİYETİN ANALİTİK BİYOİZLENMESİ

Proje Özeti: Benzin, aralarında benzen, tolüen ve ksilen gibi uçucu organik bileşiklerle polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) gibi fenolik bileşiklerin bulunduğu 150'den fazla kimyasal madde ihtiva etmektedir. Benzindeki bu bileşiklerin birçoğu çevreye yayılıp insan sağlığı için büyük bir risk oluşturmaktadır. Benzinin içerdiği benzen ve benzo[a]piren gibi bazı bileşenlerin insan karsinojeni (Grup 1) olduğu kanıtlandığından, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) benzin buharına maruziyetin de insan karsinojeni olabileceğini öne sürmektedir. Bu amaçla çalışmamızda benzin istasyonlarında çalışan 40 erkek işçiden (maruziyet grubu) ve bu grupla yaş ve sigara kullanımı açısından eşleştirilecek 40 sağlıklı erkek bireyden (kontrol grubu) toplanacak idrar örneklerinde maruziyetin biyogöstergesi olarak 6 idrar metabolitinin (trans trans- merkaptürükasit (tt-MA), S- fenil merkaptürükasit (SPMA), hippurik asit (HA), mandelik asit (MA) and metil hippurik asit, 1-hidroksipiren) miktar tayinleri Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ile yapılacaktır. Ölçülen metabolitler ile benzin istasyonlarında kimyasallara mesleki maruziyetin boyutu tayin edilecektir. Söz konusu kimyasalların karsinojen potansiyele sahip olması nedeniyle insanlardaki sağlık etkileri değerlendirilip mesleki maruziyette önemli olan korunma yöntemleri önerilecektir.

Anahtar Kelimeler: Benzin, Polisiklik Aromatik Hidrokarbon, Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

Title: ANALYTICAL BIOMONITORING OF CHEMICALS EXPOSURE ON GAS STATION

Abstract:

Gasoline contains more than 150 chemical substances including volatile organic compunds such as benzene, toluene and xylene and phenolic compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Many of these compounds in the gasoline diffuse to the environment and pose a great risk to human health. Since some components of gasoline, such as benzene and benzo[a]pyrene, have proven to be human carcinogen (Group 1), the International Agency for Research on Cancer (IARC) suggests that exposure to gasoline may also be a human carcinogen. For this purpose, 6 urinary metabolites, (trans trans- mercapturic acid (tt-MA), S-phenyl mercapturic acid (SPMA), hippuric acid (HA), mandelic acid (MA) and methyl hippuric acid (MHA) and 1-hydroxypyren will be quantitatively analysed by reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC) in the urine samples which will be taken from 40 male workers from gasoline stations (exposure group) and healthy male individuals (control group) to be matched with the exposure group for age and smoking status. The extent of occupational exposure to chemicals will be assessed at gasoline stations attendants by the measured metabolites. Due to the carcinogenic potential of these chemicals, the health effects on humans will be evaluated and occupational protection, especially for occupational exposure, methods will be proposed.

Keywords: Gasoline, Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, High Performance Liquid Chromatography

3. PROJENİN AMACI ve GEREKÇESİ

Projenin Amacı açık, ölçülebilir, gerçekçi ve proje süresince ulaşılabilir nitelikte olacak şekilde açıklanmalıdır.

Benzin, aralarında benzen, toluen, ksilen ve uçucu organik bileşiklerle polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) gibi fenolik bileşiklerin bulunduğu 150'den fazla kimyasal madde ihtiva etmektedir. Benzindeki bu bileşiklerin birçoğu çevreye yayılıp insan sağlığı için büyük bir risk oluşturmaktadır (Shaikh ve ark., 2018). Benzinin içerdiği benzen ve Polisiklik Aromatik hidrokarbonların (PAH)'ların majör bileşeni benzo[a]piren gibi bazı bileşenlerin insan karsinojeni (Grup 1) olduğu kanıtlandığından, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından benzin ve benzin buharına maruziyetin de insan karsinojeni olabileceğini öne sürmektedir (Benbrahim-Tallaa ve ark., 2012; IARC, 2010). Bu amaçla sunulan çalışmamızda benzin istasyonlarında çalışan 40 erkek işçiden ve bu grupla yaş ve sigara kullanımı açısından eşleştirilecek 40 sağlıklı (kontrol) erkek bireyden toplanacak kan örneklerinde olası toksisitenin boyutunun değerlendirilmesi için benzin istasyonlarında maruz kalınan majör kimyasalların (BTX) idrardaki metabolitleri ve egzoz gazlarından gelen ve benzinde bulunan PAH'ların biyogöstergesi olan idrar 1-hidroksi benzopiren (1-OHP) miktar tayinleri Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (High performance Liquid Chromatoraphy; HPLC) yöntemiyle tayin edilecektir.
Ayrıca çalışma ortam havasında BTX ölçümleri ile ölçülmüş metabolit miktarları arasındaki korelasyon istatistiksel olarak analiz edilecektir. Böylece bu çalışma ile benzin istasyonlarında karsinojenik potansiyele sahip kimyasal maddelere maruziyetin yarattığı toksisitenin değerlendirilmesi yapılarak insan sağlığı üzerindeki olası etkilerinin sunulması planlanmaktadır.

4. PROJENİN ÖZGÜN DEĞERİ

Proje önerisinde ele alınan konunun önemi, literatürün eleştirel bir değerlendirmesinin yanı sıra nitel veya nicel verilerle açıklanmalıdır. Konunun arka planı, günümüzde gelinen durum ve güncelliği yorumlanarak literatürün projeyle ilişkisi ortaya konulmalıdır.

Ülkemizde bu proje konusunda yapılan sadece iki tane yayınlanmış çalışma bulunmaktadır; bu iki yayın da aynı araştırma grubuna ait olup genotoksisitenin belirlenmesi üzerinedir. Benzin istasyonlarında maruz kalınacak olası kimyasalların (maruziyetin biyogöstergesinin) tayini üzerine çalışma sınırlı sayıda bulunmaktadır.

5. LİTERATÜR ÖZETİ

Bu bölümde ulusal ve uluslararası literatür analizi verilmelidir.

Benzin istasyonu çalışanları, insanlarda çok sayıda toksikolojik belirtilerden sorumlu olan otomotiv yakıtında bulunan çeşitli toksik bileşiklere maruz kalırlar. Benzin, uçucu polisiklik aromatik hidrokarbonlardan (PAH) oluşan bir karışımdır. Hidrokarbonların aromatik kısmı çok kompleks olup bazıları karsinojenik bileşikleri içerir. Bunlar arasında benzen, antrasen ve benzo[a]piren (BaP) yer almaktadır (IARC, 2010). Benzen ve benzen içeren karışımlara maruziyetin bazı lösemi tipleri ile olan ilişkisi farklı ülkelerde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Aksoy, 1985; Ireland ve ark., 1997; Carletti ve Romano, 2002). BaP'ın herhangi bir doğal kaynağı olmayıp antropojeniktir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) BaP'ı insanlarda ve hayvanlarda kansere neden olan bileşik olarak sınıflandırmıştır (IARC, 2010). Sadece kurşunlu ve kurşunsuz benzinde yer almayıp araçların egzozlarından da salınır ve kalıcıdır. Benzin istasyonu işçileri, yakıt doldurma gibi faaliyetler sırasında kişisel koruyucu ekipmanların kullanılmaması gibi durumları içeren güvenlik aksiyonlarının eksikliği durumunda benzindeki pek çok karsinojenik kimyasala inhalasyon veya dermal yolla maruz kalmaktadır (Butt ve ark., 2017). Benzin buharının solunması sonucunda benzen akciğerlere absorbe olmaktadır. Benzen düzeylerinin self servis (kişisel olarak) benzin istasyonlarında yakıt aldıktan sonra nefeste ve kanında yükseldiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu da sürekli araçlara yakıt dolduran benzin istasyonu çalışanlarının benzenin advers etkilerine karşı yüksek risk altında olduğunu göstermektedir (Pandey ve ark., 2008).

Biyoizleme, benzin istasyonu çalışanları için zorunlu halk sağlığını koruma önlemidir (Moro ve ark., 2017). Benzin istasyonlarında kimyasal maddelere mesleki maruziyet hematotoksisite, genototoksisite ve karsinojenesite gibi sağlık etkileriyle ilişkilendirilmiştir. Benzen petrokimya endüstrisi, kimya sanayi, lastik, ayakkabı ve boya üretiminde yaygın şekilde kullanılmaktadır. Taşımacılık ve yakıt (benzin) doldurma da önemli mesleki benzen kaynakları arasındadır. Benzin istasyonu çalışanları benzen maruziyeti riski ile kategorize edilen bir meslek grubudur. Bu işçiler vardiyalı çalışma saatleri boyunca benzene maruz kalmaktadır. Benzen kromozomal aberasyonlara ve hücre farklılaşmasında değişikliklere yol açarak lösemiye neden olmaktadır. Periferal kan lenfositlerindeki kromozomal aberasyonların özellikle hematolojik maligniteler olmak üzere yüksek kanser riski ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, kromozomal aberasyonlar gelecekte olabilecek lösemi riskinin öngörülmesinde kullanılabilir (Çelik ve ark., 2005).

Benzin istasyonu çalışanları sadece benzinden değil aynı zamanda egzoz dumanından kaynaklanan PAH gibi karsinojen kimyasallara maruz kalmaktadır. İşçiler toz partiküllerine, fiberlere, organik veya inorganik ham madde formunda kimyasallara benzin dumanı son veya yan ürünlerine (hidrokarbonlar, benzen vb.) maruz kalmaktadır. Benzen maruziyeti insan somatik hücrelerinde (lenfositler, kemik iliği hücreleri), in vivo deney hayvanlarında ve in vitro çalışmalarda kromozomal aberasyonları tetikleyebilir. Benzin istasyonu çalışanları için benzen gibi genotoksik bileşiklere maruziyet beklenmektedir ve benzin buharında ölçülebilen kimyasallar arasında halk sağlığı için en çok tehdit oluşturan benzendir (Çelik ve ark., 2005).

Fenol benzenin başlıca metabolitidir. Bu nedenle maruz kalan işçilerin idrarlarındaki fenol konsantrasyonu maruziyetin biyogöstergesi olarak gösterilebilir. Benzin istasyonu çalışanlarında yapılan biyoizleme çalışmaları benzin veya benzene maruziyeti olmayan kontrollerle kıyaslandığında çalışanlarda anlamlı şekilde yüksek idrar fenol düzeyleri olduğunu göstermektedir (Çelik ve ark., 2003). Çalışmamızda benzin istasyonunda çalışanların olası kimyasal maddelere maruziyetinin idrar örneklerinde HPLC yöntemi ile tayin ederek maruziyetin boyutunu ve olası sağlık üzerindeki etkilerini değerlendirmeyi amaç edindik. Çelik ve ark. (2003) Mersin'de 50 benzin istasyonu çalışanı (25'i sigara içen, 25'i sigara içmeyen) ve eşleştirilmiş 50 sağlıklı kontrolde (25'i sigara içen, 25'i sigara içmeyen) benzenin metaboliti fenol miktarları ölçülmüştür. idrar fenol konsantrasyonları benzin istasyonu çalışanlarında (19.85 mg/g/l kreatinin) kontrollere (7.25 mg/g/l kreatinin) kıyasla istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Sigara içenlerde idrar fenol konsantrasyonları kontrol ve çalışanların sigara içmeyenlerine kıyasla daha yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir (Çelik ve ark., 2003).

Çelik ve Akbaş (2005), Mersin'de benzin istasyonu çalışanlarında (30 erkek; 15'i sigara içen, 15'i sigara içmeyen) yaptıkları başka bir çalışmada periferal kan lenfositlerinde kromozomal aberasyon ve kardeş kromatid değişimi sıklıklarını değerlendirmişlerdir. Çalışanlarda sağlıklı kontrollere kıyasla (30 erkek; 15'i sigara içen, 15'i sigara içmeyen) kardeş kromatid değişimi sıklığı anlamlı farklılıklar vardır; ancak sigara içenler ve içmeyenler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Benzen maruziyeti ve sigara kullanımının replikasyon indeksi ve mitotik indeksi düşürdüğü tespit edilmiş. Kromozomal aberasyonlar açısından iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. İdrar fenol düzeyleri benzin istasyonu çalışanlarında kontrollere kıyasla yüksek çıkmıştır (Çelik ve ark., 2005).

Hindistan'da benzin istasyonu çalışanlarında yapılan bir çalışmada (maruz kalan birey sayısı=200; kontrol sayısı=200) (Rekhadavi ve ark., 2011) bukkal epitel hücrelerinde mikroçekirdek testi, periferal kan lenfositlerinde kromozomal aberasyon testi yürütülmüş. Aynı zamanda idrarda benzen ve metabolitleri fenol, trans, trans-mukonik asit ve S-fenil merkaptürik asit analizi GC-MS ile yapılmıştır. Benzin istasyonu çalışanlarında kontrollere kıyasla anlamlı mikroçekirdek sıklığı artışı, kromozomal aberasyon sıklığı artışı kaydedilmiş. Aynı zamanda benzen metabolitleri de anlamlı şekilde yüksek çıkmıştır. Aynı araştırmacıların diğer bir çalışmasında (Rekhadevi ve ark., 2010), 200 benzin istasyonu çalışanı ve 200 kontrolde yürütülen Comet testi ve periferal lenfositlerde mikroçekirdek testi sonucunda mikroçekirdek sıklığı ve DNA hasarı maruz kalan grupta kontrollere kıyasla anlamlı şekilde yüksek çıkmıştır. Aynı zamanda bireylerin kanlarında ve ortam havasında benzen, toluen ve ksilen (BTX) konsantrasyonları GC-MS ile ölçülmüştür. Benzin istasyonu çalışanlarında kontrollere kıyasla kan BTX konstrasyonları ve ortam havasındaki BTX konsantrasyonları oldukça yüksek tespit edilmiştir (Shaikh ve ark., 2018). Mısır'da yapılan bir çalışmada (Salem ve ark., 2018) 62 benzin istasyonu çalışanı ve 62 kontrolde periferal kan lenfositlerinde DNA fragmentasyon testi, periferal kan mononükleer hücrelerinde mikroçekirdek testi yürütülmüştür. Çalışma ortamı havasındaki benzen, toluen, etil benzen ve ksilen konsantrasyonları ölçülmüştür. Maruziyet grubunda DNA fragmentasyonu ve mikroçekirdek sıklığı anlamlı olarak yüksek çıkmıştır. Çalışma ortamındaki benzen, toluen, etil benzen ve ksilen düzeyleri kontrol bölgelerine kıyasla yüksek ve izin verilen limitlerin üzerinde tespit edilmiştir.

6. YÖNTEM

Projede uygulanacak yöntem ve araştırma teknikleri (veri toplama araçları ve analiz yöntemleri dahil) ilgili literatüre atıf yapılarak açıklanmalıdır.

Benzin istasyonlarında çalışan 20-50 yaş arası 40 erkek işçi ile bu işçilerle yaş ve sigara kullanımı eşleştirilmesi yapılmış benzin ve içerisindeki maddelere maruziyeti bulunmayan sağlıklı erkek bireylerden oluşan 40 birey kontrol grubu oluşturulacaktır. Benzin istasyonunda çalışan örnekler günde minimum 8 saat çalışan işçilerden seçilecektir. Spot idrar toplanacak ve analitik öçlümlerden sonra miktar tayinleri için kreatinin düzeltmesi yapılarak sonuçlar bu düzeltme dahil edilerek ifade edilecektir. Planlanan bu çalışma Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı ve Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'nda, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirilecektir. Etik Kurul Kararı ekler kısmında sunulmuştur. Randomize seçilen bireylere araştırma için gerekli bilgilerin elde edileceği anketler uygulanarak idrar örnekleri polipropilen sistem örnek idrar kaplarına alınacaktır. Benzin istasyonunda çalışan bireyler çalışma grubunu oluşturacaktır. Benzin istasyonunda bulunan kimyasallara maruz kalmayan ve trafikten dolayı özellikle yoğun trafik olan bölgelerde yaşamanın neden olduğu PAH maruziyetini göze alarak PAH maruziyetinin minimum olduğu (trafiğin az olduğu) bölgelerdeki gönüllü erkek bireylerden alınacak idrar örnekleri kontrol grubunu oluşturacaktır.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) 1-hidroksipiren Analizi

İdrarda 1-hidroksipiren (1-OHP) atılımının ölçümü, konjuge metabolitlerin katı-faz ekstraksiyonu ile enzimatik hidrolizine dayanarak yapılacaktır. C18 kolonlar kullanılarak katı-sıvı faz ekstraksiyonla ekstraksiyon kolonuna tutunan metabolitler metil alkol yardımıyla alınacaktır. Metabolitler içinde en yüksek miktarda PAH'ların biyogöstergesi 1-OHP sıvı azot altında uçurulduktan sonra çok düşük bir miktarda çözücüyle çözülüp HPLC ile miktar tayinleri yapılacaktır.

Enzimatik Hidroliz: Öncelikle 10-25 ml idrar numunesinin pH'sı 1 M hidroklorik asit ve 0.1 M asetat tamponu (pH 5) ile 5'e ayarlanır ve toplam hacim 30 ml'ye tamamlanır. Bu karışım 12.5 µl β-glukuronidaz/arilsülfataz ile 37°C'de 16 saat boyunca 210 rpm ayarlı çalkalamalı su banyosunda inkübe edilir.

Ekstraksiyon prosedürü: C18 revers-faz saflaştırma kartuşu metabolitlerin ekstraksiyou için kullanılır. Kartuş 5 ml metanolü takiben 10 ml distile sudan geçirilir. Ardından hidroliz edilmiş örnek kartuştan 10 ml/dakika olacak şekilde geçirilir. Kartuştan 8 ml distile su geçirilir. Alıkonan çözünen maddeler 10 ml metanol ile ayrıştırılır. Çözücü 60°C'de yavaş akışlı nitrojen gazı altında 2 ml metanol kalıncaya kadar uçurulur.

Kalibrasyon prosedürü: maruz kalmayan bireylerin hidrolize idrarları (blank idrar) analit ile karıştırılır. Bu kalibrasyon örneklerine ekstraksiyon prosedürüne göre muamele edilir. En az beş farklı konsantrasyon çalışma aralığına karşılık çift olacak şekilde ölçülür. 1-OHP için kalibrasyon eğrisi çalışma aralığına (0, 10, 20, 40, 100 ve 250 nmol/l) karşı metanol içerisinde ayarlanır. Kalibrasyon eğrileri en küçük kareler yöntemine göre hesaplanır. Reajan blankleri girişimleri izlemek için kullanılır. Standart eğrileri en az 0.99 korelasyon katsayısı ile lineerdir.

Ters-faz (reverse phase) HPLC analizi: Kolon sıcaklığı 40°C'ye ayarlanır ve akış hızı 0.8 ml/dakika'dır.
Çözücü gradiyenti:
5 dakika metanol-su (46:54);
35 dakika lineer gradiyent metanol-suya (94:6) karşılık;10 dakika tutulur.
Floresan spektrofotometrisi kullanılır.
Uyarma ve emisyon dalga boyları: 242 nm ve 388 nm'dir.
Pik yükseklikleri miktar tayini için kullanılır. İdrardaki 1-OHP konstrasyonları kreatinin ile düzeltilir. Yöntemin kalitesi gün içi varyasyon ile değerlendirilir. Farklı günlerde tekrarlanan analizlerin varyasyon katsayıları (CV) hesaplanır.
(Karahalil ve ark., 1998; Jongeneelen ve ark., 1987)

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) diğer 5 metabolitin Analizi

Beş idrar metabolitinin (trans trans- merkaptürükasit (tt-MA), S- fenil merkaptürükasit (SPMA), hippurik asit (HA), mandelik asit (MA) and metil hippurik asit) analizleri yapılacaktır.
Günde en az 8 saat haftada 40 saat benzin istasyonunda çalışan erkek bireylerden 8 saat mesai sonrası polipropilen sistem idrar kaplarına 20-100 ml hacimde alınan örnekler analiz yapılıncaya kadar -20^{0}C'de muhafaza edilecektir. Alınan idrar örnekleri güçlü anyon değiştirici (SAX) kolonu ile ekstrakte (katı faz ekstraksiyon) edilecektir. Kolon sistemi üzerinde ekstraksiyonu hızlandırmak için vakum elüsyon sistemi bulunacaktır. Ekstraksiyon öncesinde kolon 2-3 defa metanol ile yıkanır. Devamında pH'sı 6.4 olan fosfat ile kolon temizlenir. Elüsyon oranı 2-3 ml olacak şekilde kolon ayarlanır. 10 ml (1:1) idrar örneği ve fosfat tampon karışımı kolondan geçirilir. Ardından kolon sırasıyla su, fosfat tamponu ve %1 asetik asit (sulu) ile yıkanır ve kurutulur. Kolonda kalan analit 4-5 ml %10 asetik asit (sulu) ile ekstrakte edilip ayrılır.
HPLC analizi ODS-2 Hypersil, 250 mm x 4.6 mm, partikül boyu 5 µm (Thermo) kolonu kullanılarak yapılacaktır.
Mobil faz olarak %0.1 trifloroasetik asit (TFAA) asetonitrilde içinde ve %0.1 trifloroasetik asit (TFAA) suda çözünmüş kullanılacaktır.
Dakikada 1ml akış hızı ile 0-50 dk boyunca analiz gerçekleştirilir

Spesifik beklenen λmax değerleri;

tt-MA	263 nm	HA	228 nm
SPMA	205 nm	MHA	202 nm
MA	202 nm		

Kalibrasyon standartı için kontrol idrar-fosfat tamponu (1:1) karışımı kullanılır. 6.25, 12.5 ve 18.75 ppm olacak şekilde spike edilerek tt-MA, SPMA, MA, HA ve MHA standartları hazırlanır. Tüm standartlar için katı faz ekstraksiyonu işlemi aynen örneklere uygulandığı gibi uygulanır. Standart kalibrasyon eğrileri oluşturulur ve her metabolit için geri kazanım oranları ölçülür (mukherjee ve ark., 2016).

<u>İdrarda Kreatinin Analizi</u>
MS'li hastalardan numune olarak 24 saatlik idrar toplamanın zor bir işlem olması sebebiyle spot idrar örneği kullanılmıştır. İdrardan metal atılımı, bireylerin örneklerinde idrar dilüsyonlarının farklı olması gibi birçok faktörden etkilenirken 24 saatlik kreatinin atılımının her hasta için hemen hemen sabit olması nedeniyle spot idrardaki metal atılımının kreatinin ile oranlanarak değerlendirilir.
Kreatinin; kaslarda enerji kaynağı olarak görev alan kreatin fosfatın yıkım ürünü olup idrarla atılan bir bileşiktir. Bu çalışmada idrar kreatinin düzeyleri spektrofotometrik yöntemle ölçülür. Yöntem; alkali ortamda kreatinin pikrik asit ile renk reaksiyonu vermesi ve bunun spektrofotometri ile 520 nm'de ölçülmesi esasına dayanır.

Çözeltiler: Pikrik asit çözeltisi: 5,875g pikrik asit distile su ile 500ml'ye tamamlanır. Ultrasonik banyoda çözülür.

%10 NaOH: 10g NaOH distile su ile 100ml'ye tamamlanır.

0,1N HCl: 2,13ml HCl distile su ile 250ml'ye tamamlanır.

Stok kreatinin çözeltisi: (1mg/ml) 25mg kreatinin 0,1N HCl ile 25ml'ye tamamlanır.

Seyreltik kreatinin çözeltisi: (1mg/100ml) 1ml stok kreatinin çözeltisi 0,1N HCl ile 100ml'ye tamamlanır.

Kreatinin Standartlarını Hazırlama: Kalibrasyon eğrisi elde etmek amacıyla seyreltik kreatinin çözeltisi (1mg/100ml) kullanılarak 0,2–1 mg/100ml aralığında 5 farklı konsantrasyonda (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/100ml) 5ml çözelti distile su ile hazırlanır.

7. PROJE YÖNETİMİ

7.1.Çalışma Takvimi: İş Paketleri , Görev Dağılımı ve Süreleri: Projede yer alacak başlıca iş paketleri ve bunlar için önerilen zamanlama, belli başlı aşamaları ve bunlardan herbirinin ne zaman gerçekleşeceği, bu aşamalarda görev alacak proje personeli ve iş tanımları ayrıntılı olarak yazılmalıdır

	İş Paketlerinin Adı ve Tanımı	**Kim(ler) Tarafından Gerçekleştirileceği**	**AYLAR**																								
			1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**
1	İdrar örnekleri toplanması ve malzeme alımı prosedürleri	Bensu KARAHALİL,Kerem ŞENTÜRK	x	x	x	x	x	x																			
2	İdrar örneklerinin toplanmasına devam edilmesi metabolitlerin HPLC ile analizi	Kerem ŞENTÜRK							x	x	x	x	x	x													

3	İdrar örneklerinin toplanmasına devam edilmesi 1-OHP miktar tayininin HPLC ile analizi	Kerem ŞENTÜRK													x	x	x	x	x	x							
4	Tüm numunelerin değerlendirilmesinin tamamlanması, çalışmanın istatistiksel analizlerinin yapılması	Bensu KARAHAL İL, Kerem ŞENTÜRK																			x	x	x	x	x	x	x

7.2.BAŞARI ÖLÇÜTLERİ ve B PLANI

Projenin başarısını olumsuz yönde etkileyebilecek riskler ve bu risklerle karşılaşıldığında projenin başarıyla yürütülmesini sağlamak için alınacak tedbirler (B Planı) belirtilmelidir.

Önerilen bu projede yer alan HPLC cihazı Dicle Üniversites Eczacılık Fakültesinde yer almaktadır. Bu cihazın birden çok kullanıcı bulunmakta , her kullanıcı zihazın özelliklerini tam olarak bilmemektedir. Ayrıca sıkça Dicle Üniversitesinde yaşanan elektrik kesintileri cihazın düzenli çalışmasına veya planlanan bu çalışmanın rutin bir şekilde yapılmasıengel teşkil edebilme olasılığına sebep olmaktadır. Dicle Üniversitesi bünyesinde bu cihazdan 2 adet daha bulunmaktadır (DÜPTAM ve Fen Fakültesi). Gerektiği takdirde idari izinler alınarak bu cihazlar da kullanılabilinecektir.

8. YAYGIN ETKİ

Proje gerçekleştirildiği takdirde projeden elde edilmesi öngörülen ve beklenen yaygın etkilerin neler olabileceği, diğer bir ifadeyle projeden ne gibi çıktı, sonuç ve etkilerin elde edileceği bildirilmelidir.

Önerilen bu proje ile benzin istasyonlarında çalışan ve söz konusu olası kimyasal ve çözücülere maruz kaln bireylerin idrarlarında bu kmyasal ve çözücülerin metabolitlerinin tayini ve söz konusu PAH maruziyetinin biyogöstergesi olan 1-OHP miktarlarının tayin edilip maruziyetin biyogöstergesinin tespit edilmesi ile olası maruziyetin boyutu bulunacaktır. Karsinojen olduğu biline bu kmyasal ve çözücülerin insan sağlığı üzerindeki toksisiteleri değerlendirilip, mesleki maruziyetten korunmak için önleyici yöntemler önerilecektir. Metabolitlerin tayini idrar örneklerinde HPLC yöntemi kullanılarak tayin edilecektir. Ayrıca ortam havasındaki BTX konsantrasyonlarının pasif örnekleme ile ölçülmesi sayesinde bu ilişki kuvvetlendirilecektir.

9. **ARAŞTIRMA OLANAKLARI:** Bu bölümde öneren kuruluşta var olup da projede kullanılacak olan altyapı/ekipman olanakları belirtilmelidir.

Kuruluşta Bulunan Altyapı/Ekipman Türü, Modeli (Laboratuvar, Araç, Makine-Teçhizat, vb.)	**Projede Kullanım Amacı**
HPLC Cihazı (Dicle Üni. Eczacılık Fak.)	BTEX metabolitleri ve 1-OH piren tayini
UV Cihazı (Dicle Üni. Eczacılık Fak.)	İdrar Kreatinin tayini
-80 ^{0}C Derin Dondurucu (Dicle Üni. Eczacılık Fak.)	Örneklerin Saklanması

10. HAKEM LİSTESİ

Unvan-Ad-Soyad	**E- mail**	**Tel:**	**Üniversite Adresi**
Prof. Dr. Sevgi AKAYDIN	sevgiy@gazi.edu.tr	(312) 212 31 55	Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 06330, Ankara
Prof. Dr. Onur ERDEM	onur.erdem@sbu.edu.tr	05425635834	Gülhane Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara
Prof. Dr. Sinan SÜZEN	hssuzen@gmail.com	(312) 212 31 55	Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara

NOT: Proje başvuru formu ekler hariç 15 sayfayı geçmemelidir. Projeler A4 formatında, Times New Roman karakterinde, 12 punto büyüklüğünde ve tek satır aralıkla yazılmadır.