GAZİ ÜNİVERSİTESİ

Gazi

1926

İÇME SULARINDA ARSENİK KİRLİLİĞİ OLAN BÖLGELERDE YAŞAYAN BİREYLERİN SAÇ ÖRNEKLERİNDEKİ ARSENİK DÜZEYLERİNİN VE YANAK EPİTEL HÜCRELERİNDE OLASI GENOTOKSİK HASARIN BELİRLENMESİ

Ecz.Beril ALTUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEMMUZ 2014

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Beril ALTUN

22/07/2014

Soma Faciası'nda hayatını kaybeden maden işçilerinin anısına....

İÇME SULARINDA ARSENİK KİRLİLİĞİ OLAN BÖLGELERDE YAŞAYAN BİREYLERİN SAÇ ÖRNEKLERİNDEKİ ARSENİK DÜZEYLERİNİN VE YANAK EPİTEL HÜCRELERİNDE OLASI GENOTOKSİK HASARIN BELİRLENMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Beril ALTUN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2014

ÖZET

İçme suyu arsenik (As) kontaminasyonu, dünya genelinde milyonlarca insanı etkilemekte ve kanser, kardiyovasküler, solunum hastalıkları sıklığında ve bu hastalıklara bağlı ölüm oranında artışa neden olmaktadır. Son yıllarda yapılan jeolojik çalışmalar, Nevşehir Bölgesi'nde içme suyu As konsantrasyonunun 11-500 µg/l aralığında olduğunu göstermiştir. Ancak bu bölgede yaşayan bireylerin, As maruziyeti ile ilgili herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada, Nevşehir Bölgesi'nde yaşayan ve içme suyu ile kronik olarak As'e maruz kalan bireylerin saç örneklerindeki As düzeylerinin ve yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek (MÇ) sıklığı ve diğer çekirdek anomalilerinin (nükleer tomurcuk, binükleer, kondanse kromatin, karyohektik, piknotik ve karyolitik) sıklığının belirlenmesi amaçlanmıştır. İçme suyu As konsantrasyonu 50 µg/l'den fazla olan bölgede yaşayan 99 birey deney grubu olarak ve 10 µg/l'den az olan bölgede yaşayan 95 birey ise kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çalışmada, içme suyu zaman ağırlıklı As (TWA-As) değerleri, diğer bir maruziyet göstergesi olarak kullanılmıştır. Deney grubundaki bireylerin içme suyu ortalama TWA-As değeri 112 µg/l iken, kontrol grubundaki bireylerin ise 0,81 µg/l'dır. Deney grubundaki bireylerin saç As konsantrasyonu [ortanca (min-maks)] [1,17 µg/g (0,35-6,48 µg/g)], kontrol grubundaki bireylerinkinden [0,14 µg/g (0,01-0,98 µg/g)] anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Çalışma grubundaki bireylerin saç As konsantrasyonları ile içme suyu TWA-As değerleri arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Deney grubundaki bireylerin %61'inin saç As konsantrasyonu, toksik karar seviyesi (cut off) olan 1 µg/g'ın üzerindedir. Deney grubundaki bireylerin yanak epitel hücrelerindeki MÇ sıklığı [ortanca (min-maks)] [1 (0-8)], kontrol grubununki ile [1 (0-5)] benzer bulunmuştur. Öte yandan, diğer çekirdek anomalilerinden sadece nükleer tomurcuk (NT) ve piknotik hücre (PK) sıklığı, deney grubunda anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak, deney grubundaki bireylerin saç As düzeyi, bu bireylerin As'e kronik olarak maruz kaldığını göstermektedir. Bundan da öte, saç As konsantrasyonları göz önüne alındığında, bu bireylerin %61'i, As'in indüklediği toksik etkiler (dermal lezyonlar gibi) açısından risk altındadır. Bu çalışmadaki içme suyu As düzeyleri, deney grubundaki bireylerin yanak epitel hücrelerinde, MÇ sıklığı açısından anlamlı bir genotoksik hasar artışına neden olmamıştır. Deney grubu bireylerin yanak epitel hücrelerindeki NT sıklığındaki artış ise, gen amplifikasyonları ile ilişkili olarak As'in indüklediği DNA hasarı ile ilişkili olabilir. Ancak, bu bulgunun daha sonraki çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir. Bunun yanı sıra, periferal lenfosit ve mesane epitel hücreleri gibi As'in indüklediği toksik etkiler açısından daha uygun olan doku tiplerinde ve daha fazla sayıda bireyde yapılacak çalışmalar önemli olacaktır.

Bilim Kodu : 1021
Anahtar Kelimeler : İçme suyu arsenik, Saç, Yanak epiteli, Mikroçekirdek, Nükleer tomurcuk
Sayfa Sayısı : 138
Danışman : Prof.Dr.Sema BURGAZ
İkinci Danışman : Prof.Dr.Nusret ERTAŞ

DETERMINATION OF ARSENIC CONCENTRATIONS IN HAIR SAMPLES AND POSSIBLE GENOTOXIC DAMAGE IN BUCCAL EPITHELIAL CELLS OF INDIVIDUALS LIVING IN REGIONS WITH ARSENIC CONTAMINATION IN DRINKING WATER
(M. Sc. Thesis)

Beril ALTUN

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

July 2014

ABSTRACT

Arsenic (As)-contaminated drinking water affects millions of people worldwide, causing substantial mortality and morbidity from cancers, cardiovascular and respiratory diseases. Geological studies have recently shown that As levels in drinking water ranged from 11 to 500 µg/l in Nevsehir province. However, no data is available on As exposure in this area. In this study, we aimed to determine hair As concentrations and frequency of micronucleus (MN) and other nuclear anomalies (nuclear bud (NB), binuclear (BN), condanse chromatine (KK), kharryohektic (KH), pyknotic (PK) and karyolytic (KL)) in buccal epithelial cells of individuals exposed to As chronically via drinking water. 99 subjects living with more than 50 µg/l in drinking water as an exposed group and 95 subjects living with less than 10 µg/l as a control group were included. Time-weighted average drinking water As (TWA-As) values were also used as an another As exposure indicator. Mean values of TWA-As were 112 µg/l and 0,81 µg/l in exposed and control group, respectively. Median (min-max) value of hair As in exposed group [1,17 µg/g (0,35-6,48 µg/g)] was significantly higher than those of control subjects [0,14 µg/g (0,01-0,98 µg/g)]. Hair As concentrations were significantly correlated with TWA-As values in our study population. Hair arsenic concentrations of %61 of exposed subjects exceeded the cut off value; 1,00 µg/g, indicating toxic effects, and thus, may be considered as a risk group. Median (min-max) value of MN frequency in exposed group [1(0-8)] was similar with those of control subjects [1(0-5)]. Among the other nuclear anomalies, only NB and PK cell frequencies were significantly higher in exposed group. In conclusion, hair As levels in exposed group indicate that these individuals have been exposed to As chronically. We think that As levels in drinking water in our study did not cause to induce the genotoxic damage in buccal epithelial cells of individuals. However, significant increase of NB frequency might be associated with As induced DNA damage related with gene amplification process. But it needs to be confirmed with other studies. Moreover, it will be important to study As-induced toxic effects with large number of subjects and also in more suitable tissues such as lymphocytes and bladder cells.

Science Code :1021
Key Words :Arsenic in drinking water, Hair, Buccal epithelial cells, Micronucleus, Nuclear bud
Page Number :138
Supervisor :Prof.Dr.Sema BURGAZ
Co-Superviser :Prof.Dr.Nusret ERTAS

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel katkıları ile yardımlarını esirgemeyen, mesleğime olan sevgimin bir kat daha artmasına vesile olan, birlikte çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Sema BURGAZ başta olmak üzere, gösterdiği yardımseverlik, hoşgörü ve sabrından ötürü yardımcı danışman hocam sayın Prof. Dr. Nusret ERTAŞ'a,

Değerli bilgileri, deneyimi ve bakış açısı ile yönlendirici desteğini esirgemeyen sevgili hocam Doç. Dr. Gonca ÇAKMAK DEMİRCİGİL'e,

Deneylerimin yürütülmesi sırasındaki yardımları için Doç. Dr. Ela KADIOĞLU'na,

Huzurlu ve sevgi dolu bir iş ortamı sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Ali Esat KARAKAYA, Prof. Dr. İsmet ÇOK, Prof. Dr. Bensu KARAHALİL ve Doç. Dr. Ayşe Başak ENGİN'e,

İlgi ve desteklerini esirgemeyen tüm diğer çalışma arkadaşlarıma,

Hücrelerin fotoğraflandırılma aşamasındaki katkıları için, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim dalı üyelerine,

Akademik eğitim süreci boyunca en iyi şekilde yetişmem için gerekli desteği sağlayan T.C. Yükseköğretim Kurulu'na ve Gazi Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Koordinatörlüğü'ne ve TÜBİTAK'a,

Beni bugünlere getiren, sevgi ve ilgileriyle, yüreklendirici destekleri ile her zaman yanımda olan, herşeyimi borçlu olduğum canım aileme,

Samimiyetleriyle güven veren dostlarıma ve diğer tüm arkadaşlarıma,

Tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET..... v

ABSTRACT vi

TEŞEKKÜR vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ xi

ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....xiii

HARİTALARIN LİSTESİ.....xiv

RESİMLERİN LİSTESİ xv

SİMGELER VE KISALTMALAR.....xvi

1. GİRİŞ..... 1

2. GENEL BİLGİLER 5

2.1. Arseniğin Genel Özellikleri ve Çevrede Bulunuşu 5

2.1.1. Dünya'da ve Türkiye'de arsenik yönünden zengin coğrafi bölgeler ve doğal maruziyet kaynakları 11

2.1.2. Antropojenik kaynaklı arsenik..... 13

2.1.3. Tıbbi amaçlı kullanım 14

2.2. Toksikokinetik 15

2.2.1. İnorganik arsenik toksikokinetiği 15

2.2.2. Organik arsenik toksikokinetiği 22

2.3. Arsenik Maruziyetinin Biyogöstergeleri..... 24

2.3.1. Maruziyet biyogöstergeleri 27

2.3.2. Etki biyogöstergeleri 30

2.3.3. Arsenik maruziyetinin belirlenmesinde OMIC teknolojilerinin kullanımı.... 31

2.4. Arseniğin Deney Hayvanları ve İn vitro Sistem Üzerindeki Toksik Etkileri 35

2.4.1. İnorganik arsenik toksisitesi 35

2.4.2. Organik arsenik toksisitesi 38

2.5. Arseniğin İnsanlar Üzerindeki Toksik Etkileri 40

2.5.1. Akut toksisite 41

2.5.2. Kronik toksisite 42

2.6. Arsenik ve Bileşiklerinin Muhtemel Toksik Etki Mekanizmaları ve Duyarlılığı Etkileyen Faktörler 50

2.7. İçme Suyu Arsenik Düzeyleri ile İlgili Yapılmış Yasal Düzenlemeler 55

2.8. Türkiye'de Arsenikle İlgili Yapılmış Çalışmalar 56

2.9. Saç Örneklerinde Arsenik Tayininde Kullanılan Analitik Yöntemler 59

2.9.1. Atomik floresans spektroskopisi 60

2.10. Genotoksisite Testleri 66

2.10.1. Yanak epitel (bukkal) hücrelerinde mikroçekirdek yöntemi 66

2.10.2.Yanak epitel hücrelerinde mikroçekirdek dışındaki diğer çekirdek anomalilerinin analizi 73

3. GEREÇ VE YÖNTEM 77

3.1. Deney ve Kontrol Grubunun Seçimi 77

3.2. Biyolojik Örneklerin Toplanması 78

3.3. Saç Örneklerinin Analizi 78

3.3.1. Analiz öncesi ön işlemler 80

3.3.2. Tayin işlemi 81

3.3.3. Yöntem validasyonu 85

3.4. Yanak Epiteli Hücrelerinde Mikroçekirdek Yöntemi 90

3.4.1. Preparatların hazırlanması ve boyanması 92

3.4.2. Mikroskobik değerlendirme 92

3.5. İstatistiksel Analiz 92

4. BULGULAR 95

4.1. Demografik Bilgiler 95

4.2. Deney ve Kontrol Grubu Bireylerin Saç Arsenik Düzeylerinin Karşılaştırılması 96

4.3. Deney ve Kontrol Grubu Bireylerin Yanak Epiteli Hücrelerindeki Mikroçekirdek Sıklıklarının Karşılaştırılması 100

4.4. Deney ve Kontrol Grubu Bireylerin Yanak Epiteli Hücrelerinde Diğer Çekirdek Anomalilerinin Sıklığının Karşılaştırılması 102

4.5. Korelasyon Analizleri 104

5. TARTIŞMA 105

5.1. Saç Arsenik Düzeylerinin Değerlendirilmesi 107

5.2. Yanak Epitel Hücrelerinde Mikroçekirdek Sıklığının Değerlendirilmesi 112

5.3. Yanak Epitel Hücrelerinde Diğer Çekirdek Anomalilerinin (NT, BN, KK, KH, PK, KL) Sıklığının Değerlendirilmesi 116

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 119

KAYNAKLAR 121

EKLER 131

EK-1. Etik Kurul Onayı 132

EK-2. Anket Formu 133

ÖZGEÇMİŞ 137

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. Suda çözünebilen arsenik bileşikleri 6

Çizelge 2.2. Biyolojik örneklerde bulunan arsenik türleri..... 10

Çizelge 2.3. Epidemiyolojik çalışmalarda kullanılan biyogöstergeler 25

Çizelge 2.4. Saç örneklerinde Astayininde kullanılan analitik yöntemlerin karşılaştırılmalı incelenmesi 60

Çizelge 2.5. Yanak epitel hücrelerinin morfolojik özelliklerine göre sınıflandırılması.....71

Çizelge 3.1. Arsenik analizinde AFS cihazında uygulanan metod karakteristikleri..... 83

Çizelge 3.2. Yıkılama işleminde kullanılacak asit karışımının belirlenmesi amacıyla yapılan SRM analizi verileri..... 86

Çizelge 3.3. Yıkılama işlemindeki asit karışımının hacimsel yeterliliğinin belirlenmesi için yapılan SRM analizi verileri 87

Çizelge 3.4. Sertifikalı referans materyal ile yapılan doğruluk çalışmasının özeti..... 88

Çizelge 3.5. Tekrarlanabilirlik verileri 88

Çizelge 4.1. Deney ve Kontrol grubundak bireylerin temel demografik özellikleri..... 95

Çizelge 4.2. Deney ve kontrol gruplarındaki bireylerin saç arsenik konsantrasyonları ve tüm çalışma grubunun yaş, cinsiyet, sigara öyküsü, sigara içme sıklığı ve diyabet öyküsüne göre saç arsenik düzeyleri tanımlayıcı istatistikleri 97

Çizelge 4.3. Deney grubundaki bireylerin saç arsenik düzeylerinin, toksik karar seviyesine (cut-off); 1 µg/g göre gruplandırılması 98

Çizelge 4.4. Tüm çalışma popülasyonunda, çoklu değişkenli doğrusal regresyon analizi ile diğer olası risk faktörlerine göre düzeltme yapıldığında, içme suyu arsenik maruziyetinin, saç arsenik düzeyleri üzerine etkisinin incelenmesi 100

Çizelge 4.5. Deney ve kontrol gruplarındaki bireylerin yanak epitel hücrelerindeki MÇ ve MÇ'li hücre sıklıklarına (‰) ait tanımlayıcı istatistikler 100

Çizelge 4.6. Tüm çalışma grubunun yaş, cinsiyet, sigara öyküsü, sigara içme sıklığı ve diyabet öyküsüne göre MÇ sıklığı (‰).....101

Çizelge 4.7. Deney grubundaki bireylerin yanak epitel hücrelerindeki MÇ ve MÇ'li hücre sıklıkları ortalamalarının, saç arsenik düzeyleri 1µg/g değerine göre karşılaştırılması..... 101

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.8. Deney ve kontrol grubu bireylerin yanak epiteli hücrelerindeki diğer çekirdek anomalileri sıklıklarına (‰) ait tanımlayıcı istatistikler 102

Çizelge 4.9. Tüm çalışma grubunun saç As ve MÇ düzeylerinin, yaş ve TWA-As değerleri ile korelasyonu ve önemlilik düzeyleri..... 104

Çizelge 5.1. Dünya ’da ve Türkiye’de yapılmış çalışmalardaki saç arsenik düzeyleri 109

Çizelge 5.2. İçme suyu As maruziyeti açısından Dünya’da ve Türkiye’de yapılmış çalışmalara ait yanak epitel hücrelerinde MÇ sıklığı anlamlılık düzeyleri..... 114

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Arseniğin karasal ve sucul ekosistemdeki major kaynakları 7

Şekil 2.2. Doğada arsenik döngüsü 8

Şekil 2.3. İnorganik arsenik biyotrasformasyonu..... 20

Şekil 2.4. Arsenik toksisitesinde reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve etkileri..... 51

Şekil 2.5. SAM sentezi, As ve DNA metilasyonu basitleştirilmiş şeması..... 54

Şekil 2.6. Atomik floresansta temel enerji geçişleri 61

Şekil 2.7. Atomik floresans spektrometresinin blok diyagramı 62

Şekil 2.8. Güçlendirilmiş oyuk katod lambası 63

Şekil 2.9. Foton katlayıcı tüp dedektör 65

Şekil 2.10. Mikroçekirdek formasyonu 66

Şekil 2.11. Bukkal mukoza yatay kesitinin şematik gösterimi 68

Şekil 2.12. Yanak epitel dokusundaki çeşitli hücre tiplerinin birbirini takip eden kökenleri ve zaman uzamsal dizilişleri 69

Şekil 2.13. Yanak epiteli mikroçekirdek yönteminde değerlendirilen hücre tipleri ve oluşum mekanizması 70

Şekil 3.1. PSA 10.055 Millenium Excalibur cihazının şematik gösterimi..... 81

Şekil 3.2. AFS cihazının optik kısmı 82

Şekil 3.3. Kontrol grubu için kalibrasyon grafiği örneği 84

Şekil 3.4. Deney grubu için kalibrasyon grafiği örneği..... 85

Şekil 4.1. Deney ve kontrol gruplarına göre bireylerin saç As düzeyleri 98

Şekil 4.2. Deney grubu bireylerin 1 µg/g saç As konsantrasyonuna göre % dağılımı 99

Şekil 4.3. Kontrol grubu bireylerin 1 µg/g saç As konsantrasyonuna göre % dağılımı 99

Şekil 4.4. Saç As ve TWA-As değerleri yönünden olguların noktasal saçılımı..... 104

HARİTALARIN LİSTESİ

Harita **Sayfa**

Harita 2.1. Dünya üzerinde As kirliliği olan coğrafi bölgeler 12

Harita 2.2. Ülkemizde yeraltı sularında As saptanan yöreler ve As oluşumlu alanlar.....13

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 2.1. Arsenik maruziyetine bağlı tırnakta karakteristik Mee çizgileri 41

Resim 2.2. Ön göğüs bölgesinde bilateral yağmur damlası pigmentasyonu..... 43

Resim 2.3. Her iki avuç içerisinde arseniğe bağlı keratoz..... 43

Resim 2.4. Ayak üzerinde arseniğe bağlı deri kanseri ve nodüler keratoz 44

Resim 2.5. Arseniğe bağlı Karaayak hastalığı (gangren ve amputasyonlar) 45

Resim 2.6. Mikroçekirdek yöntemi Yanak epitel hücrelerinde ile değerlendirilen çekirdek anomalilerinin ışık mikroskobu ve floresans mikroskop altındaki görüntüleri... 75

Resim 4.1. Çalışma grubundaki bireylerin yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek ve diğer çekirdek anomalilerinin mikroskobik görüntüleri..... 103

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simge	Açıklamalar
Pb	Kurşun
Hg	Cıva
Cr	Krom
Mn	Mangan
Cd	Kadmiyum
As	Arsenik
iAs	İnorganik arsenik
µg/l	Mikrogram/ litre
As (III)	Arsenit
As (V)	Arsenat
µg/g	Mikrogram/gram
AsH_3	Arsin gazı
ng/m^3	Nanogram/metreküp
Fe	Demir
Al	Aluminyum
Ca	Kalsiyum
Mg	Magnezyum
Ni	Nikel
$H_2PO_2^-$	Hipofosfit iyonu
FeAsS	Arsenopirit
FeOOH	Ferrik oksihidroksit
µM	Mikromolar
ng	Nanogram
GaAs	Galyum arsenik
Zn	Çinko
Se	Selenyum

Simge	Açıklamalar
kDa	Kilodalton
LD_{50}	Medyan letal doz
As_2O_3	Arsenik trioksit
$NaBH_4$	Sodyumborohidrür
Ar	Argon
Ne	Neon
nm	Nanometre
a/h	Ağırlık/hacim
NaOH	Sodyum hidroksit
KI	Potasyum iyodür
HCl	Hidroklorik asit
HNO_3	Nitrik asit
H_2O_2	Hidrojen peroksit
H_2SO_4	Sülfürik asit
‰	Binde

Kısaltmalar	Açıklamalar
AAAS	Alevli Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi
AAS	Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi
AFS	Atomik Floresans Spektroskopisi
APL	Akut Premiyelositik Lösemi
As3MT	Arsenik (III) Metil Transferaz
AsB	Arsenobetain
AsC	Arsenokolin
AsL	Arsenolipit
ATG	Arseniktriglutatyon
ATP	Adenozin Trifosfat
ATSDR	The Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BN	Binükleer
CRM	Sertifikalı Referans Materyal

Kısaltmalar	Açıklamalar
DMA(III)	Dimetilarsinöz asit
DMA(V)	Dimetilarsinik asit
DMAG	Dimetilarsenikglutatyon
DMMTA(III)	Dimetilmonotiyoarsinik asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNMT	DNA Metil Transferaz
EBL	Elektrodsuz Boşalım Lambası
EFSA	European Food Safety Authority
EKG	Elektrokardiyografi
EPA	Environmental Protection Agency
ET-AAS	Elektrotermal Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi
FDA	Food and Drug Administration
GSH	Glutatyon
GSTO1	Glutatyon *S*-Transferaz Omega
HBD1	Human β defensin 1 peptid
HG-AAS	Hidrür Oluşturmalı Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi
HG-AFS	Hidrür Oluşturmalı Atomik Floresans Spektroskopisi
hTERT	Telomeraz Revers Transkriptaz geni
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma- Optical Emission Spectrometry
JMP	Joint Monitoring Programme
KA	Kromozomal Aberasyon
KH	Karyohektik
KK	Kondanse Kromatin
KKD	Kardeş Kromatid Değişimi
KL	Karyolitik
LOD	Limit of Dedection
LOQ	Limit of Quantification
MADG	Monometilarsenikdiglutatyon

Kısaltmalar	Açıklamalar
MCL	Maximum Contaminant Level
MÇ	Mikroçekirdek
MMA(III)	Monometilarsinöz asit
MMA(V)	Monometilarsinik asit
MMMTA(V)	Monometilmonotiyoarsonik asit
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MTA	Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü
NOAEL	No Observable Advers Effect Level
NRC	National Researh Council
NT	Nükleer Tomurcuk
OKL	Oyuk Katod Lambası
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
PK	Piknotik
PNP	Pürin Nükleotid Fosforilaz
ppb	Parts per billion (milyarda bir)
ppm	Parts per million (milyonda bir)
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
RSD	Rölatif (bağıl) standart sapma
SAM	S-Adenozil Metiyonin
SÖO	Standart Ölüm Oranı
SS	Standart sapma
TLV	Treshold Limit Value
TMAO	Trimetilarsinoksit
TNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
TWA	Time Weighted Average
UNICEF	United Nations International Children's Emergency Fund
WHO	World Health Organization

1. GİRİŞ

Su ve yaşam birbirinin ayrılmaz parçalarıdır, o kadar ki; ne zaman yeryüzünde veya dünya dışında bir yaşam belirtisi arasak, o bölgede su olup olmadığına bakarız. Dünya yüzeyinin yaklaşık %70'i suyla kaplıdır. Ancak, insanlar bu suyun yalnızca %0,007'lik bir kısmını (göller, nehirler, kaynaklar ve yer altı suları) kullanabilmektedir (Pal Singh ve Sharma, 2014:7-8).

Güvenilir içme suyu kaynakları, toplum sağlığı açısından oldukça önemlidir. Çünkü suyun kullanılabilirliği ve kalitesi, insan sağlığını önemli derecede etkileyebilmektedir. Dünya genelinde her 20 saniyede bir çocuk, su ile ilişki herhangi bir hastalık yüzünden ölmektedir ve 2020 yılına kadar 76 milyon insanın su ile ilişkili hastalıklar nedeniyle öleceği tahmin edilmektedir (Pal Singh ve Sharma, 2014:7-8). Su Temini ve Sanitasyonu için WHO/UNICEF işbirliğine dayalı Ortak İzleme Programı (JMP) verilerine göre, 2008 yılı sonunda 884 milyon insanın (dünya nüfusunun yaklaşık %13'ü) halen iyileştirilmiş içme suyu kaynaklarına ulaşamadığı belirlenmiştir (UNICEF ve WHO, 2011). Bundan da öte, dünya genelindeki tüm hastalıkların yaklaşık %10'unun, sadece içme suyu kaynaklarının iyileştirilmesi ile önlenebileceği tahmin edilmektedir (Prüss-Üstün, Bos, Gore ve Bartram, 2008).

İçme suyundaki mikrobiyal kirlenmenin yanı sıra çeşitli kimyasal kirleticiler, özellikle uzun dönem maruziyette ciddi sağlık riskleri oluşturabilmektedir (Villanueva ve diğerleri, 2014). Kurşun (Pb), cıva (Hg), krom (Cr), manganez (Mn), kadmiyum (Cd), arsenik (As) gibi metaller, çeşitli biyolojik parçalanmaya dayanıklı organik kirleticiler; özellikle organik klorlu tarım ilaçları, insan ve hayvan sağlığında kullanılan ilaçlar, endokrin bozucular, nanopartiküller ve kişisel hijyen için kullanılan çeşitli kimyasallar içme suyuna karışabilmekte ve nörolojik, kardiyovasküler, üreme, endokrin, immun sistem bozuklukları, deri hastalıkları ve kanser gibi çeşitli hastalıklara yol açabilmektedir (Pal Singh ve Sharma, 2014:7-8).

İnorganik arsenik (iAs), içme suyundaki en tehlikeli kimyasal kirleticilerden biridir. Çünkü epidemiyolojik çalışmalara göre kronik As maruziyeti, akciğer, deri, mesane, karaciğer ve böbrek kanserine ve yanı sıra deri lezyonları, kardiyovasküler hastalıklar, kronik

akciğer hastalıkları, karaciğer hasarı ve periferal nöropatiye yol açmaktadır (NRC, 2001; IARC, 2004, 2012).

Dünya genelinde milyonlarca insan, doğal veya antropojenik kaynaklardan içme suyuna karışan arseniğe maruz kalmaktadır (Steinmaus, Ferreccio, Romo ve Yuan, 2013). Yer altı sularındaki arsenik konsantrasyonu birçok ülkede 10 µg/l'nin altında hatta bazen önemsenmeyecek derecede düşük iken, literatürlerdeki değerler dünya genelinde 0,5 - 7550 µg/l aralığında değişen çok geniş bir yelpazeye işaret etmektedir. Yer altı sularındaki yüksek As seviyeleri büyük ölçüde doğal olayların sonucudur ve çeşitli jeolojik faaliyetlerle içme suyuna karışmaktadır (IARC, 2004). Bangladeş'te yaklaşık 50 milyon, Hindistan'da yaklaşık 30 milyon, Çin'de yaklaşık 15 milyon ve Tayland, Şili, Arjantin, Amerika ve Avrupa' da ise birkaç milyon insan arsenik tehdidi altındadır (Steinmaus ve diğerleri, 2013).

Kronik arsenik maruziyeti ile kanser ve diğer kanser dışı hastalıklar arasındaki ilişki, dünya genelinde farklı coğrafi bölgelerde yapılan pek çok epidemiyolojik çalışmayla gösterilmiştir. Bu çalışmalara göre, arseniğin neden olduğu hastalıkların prevalansı, çevresel faktörler (coğrafi konum, maruziyet düzeyi), genetik farklılıklar ve diğer bazı faktörlere (yaş, cinsiyet, sigara içiciliği, beslenme alışkanlığı vs…) bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir. Dahası, arsenik maruziyetine bağlı toksik etkiler, benzer seviyede kronik arsenik maruziyetine sahip aynı aile üyeleri arasında bile bireyler arası farklılık gösterebilmektedir (Bhattacharjee, Chatterjee, Singh ve Giri, 2013).

Epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen veriler, 150 µg/l'nin üzerindeki arsenik konsantrasyonlarına maruziyetle, iç organlardaki kanser riski arasındaki güçlü ilişkiyi kanıtlamaktadır. Ancak düşük konsantrasyonlardaki (<100µg/l) maruziyetlerde, açık ve kesin insan verisi olmadığı için, yüksek konsantrasyonlardan elde edilen veriler, düşük doz bölgesine uyarlanarak risk tahmininde kullanılmıştır (Cantor ve Lubin, 2007).

İnsanlardaki toksikokinetik çalışmalara göre, oral yolla absorbe olan As'in çoğu - inorganik As [As(III), As(V)] ve metabolitleri (MMA, DMA)- idrar ile hızlıca atılır. Ancak, bir kısmı keratince zengin dokularda (deri, saç, tırnaklar) birikme eğilimindedir. Bu nedenle, saç ve tırnaklardaki arsenik düzeylerinin, geçmiş maruziyeti (1-12 ay) ortaya koyan kullanışlı

birer biyogösterge olduğu kabul edilmektedir (ATSDR, 2007*).* Arnold, Odam ve James (1990), >1 µg/g saç As konsantrasyonunu, toksik etkilerin görülebileceği düzey olarak önermişlerdir.

İnorganik As'in neden olduğu olumsuz sağlık etkilerinin temel mekanizmaları; genotoksisitenin indüksiyonu, oksidatif stres ve DNA onarımının inhibisyonu şeklindedir. Ayrıca As'in indüklediği hastalıklarda epigenetik değişikliklerin rolü olduğuna ilişkin veriler de giderek artmaktadır (Bhattacharjee ve diğerleri, 2013).

Arseniğin genotoksik etkileri, hem klastojenik hem de anojenik olarak hareket ettiği çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir (Bustaffa, Stoccoro, Bianchi, Migliore, 2014). Karsinojenik maddelerin risk değerlendirilmesinde ilk basamak olan tehlikenin belirlenmesinde, sitogenetik yöntemlerin rolü önemlidir. Bu nedenle çeşitli genotoksik son noktalar [mikroçekirdek (MÇ), kromozomal aberasyon (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) gibi], arsenik maruziyetine bağlı biyolojik etkileri anlamada iyi birer biyogösterge olarak kullanılmaktadır (Ghosh, Basu, Singh ve Giri, 2008).

Mikroçekirdek oluşumu, hem klastojenik hem de anojenik etkili kimyasalların teşhisinde önemli bir biyogöstergedir (Fenech, 1998). Lenfositlerdeki mikroçekirdek sıklığının, sağlıklı bireylerde kanser riskini öngörmede etkin olduğu gösterilmiştir (Bonassi ve diğerleri, 2007). Mikroçekirdek yönteminin eksfoliye epitel hücrelere (yanak, mesane ve nazal epiteli gibi) uyarlanması ile birlikte, karsinojenlere kronik maruziyette hedef dokulardaki genotoksik etkilerin teşhis edilmesi amacıyla epidemiyolojik çalışmalarda artan popülerlikte kullanılmaktadır (Majer, Laky, Knasmüller ve Kassie, 2001).

Son yıllarda, yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığının yanı sıra DNA hasarını gösteren nükleer tomurcuk (NT) ve sitokinetik bozukluklar ile hücre ölümü biyogöstergeleri olan binükleer (BN), kondanse kromatin (KK), karyorhektik (KH), piknotik (PK) ve karyolitik (KL) hücreler gibi çekirdek anomalilerinin, yaşlanma, kanser ve nörodejeneratif hastalık riskindeki artış ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Thomas ve diğerleri, 2009).

Türkiye'de yeraltı sularındaki arsenik kirliliğinin büyük ölçüde jeolojik kaynaklı olduğuna ilişkin ilk veriler, Kütahya-Emet Bölgesi'ne aittir. Bu bölgedeki As kirliliğinin (içme

suyu As konsantrasyonu 140-1700 µg/l arasında değişmektedir) insanlardaki etkilerine ilişkin bulgular son derece kısıtlı ve genelde ekolojik verilere dayandırılmıştır (Dağıstanlı, 1995; Çöl, Çöl, Soran, Şaylı ve Öztürk, 1999; Doğan, Doğan, Çelebi ve Barış, 2005; Yıldız ve diğerleri, 2008).

Orta Anadolu Bölgesi'nde, Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü (MTA) tarafından yapılan son jeolojik çalışmalarda, Nevşehir ili kapsamındaki yerleşim alanlarında da içme sularındaki arsenik düzeylerinin yüksek olduğu ortaya konmuştur (Atabey ve Ünal, 2008). Nitekim, Ekim 2008'de Nevşehir Valiliği'nce yapılan 45 belediye ve 133 köyün içme ve kullanma suyu analizlerinde, 11 - > 500 µg/l arasında değişen arsenik konsantrasyonları tespit edilmiştir (Atabey, 2009:51). Bu konsantrasyonlar, ülkemizde içme sularında bulunmasına izin verilen maksimum kontaminasyon değeri olan 10 µg/l 'nin çok üzerindedir.

Bu yörede yaşayan bireylerde içme sularındaki As kirliliğine bağlı maruziyetler ve olası sağlık etkileri konusunda hiçbir veri bulunmamaktadır. Bu nedenle yapılan bu çalışmada;

- İçme ve kullanma sularında As konsantrasyonu yüksek olan Nevşehir Bölgesi'nde yaşayan bireylerin kümülatif arsenik maruziyetini değerlendirmek için, saç örneklerindeki As düzeylerinin belirlenmesi,

- İçme sularında As konsantrasyonu yüksek olan Nevşehir Bölgesi'nde yaşayan bireylerin bukkal (yanak) epitel hücrelerinde olası genotoksik hasar göstergesi olarak MÇ sıklığının yanı sıra diğer hücre anomalilerinin (NT, BN, KK, KH, PL ve KL) sıklıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Arseniğin Genel Özellikleri ve Çevrede Bulunuşu

Arsenik (As), bilinen en toksik metallerden biridir ve yerkabuğunda en yaygın olarak bulunan 20. elementtir (IARC, 2012). Kimyasal olarak hem metal hem de ametal özelliği gösterdiği için, yarı metal (metalloid) olarak sınıflandırılır (ATSDR, 2007).

Arsenik, 200'den fazla mineralin içerisinde bulunur. En yaygın olan arsenik minerali, arsenopirittir. Bakır, gümüş, kurşun, nikel, kobalt, antimon madenlerinde, sülfit formunda bulunmaktadır (WHO, 2001).

Arsenik, yerkabuğunda doğal olarak bulunur (arsenik mineral kaynakları) ve çevreye hem doğal hem de antropojenik süreçler sonucu salınır (Mahimairaja, Bolan, Adriano ve Robinson, 2005). Doğadaki As tahrip edilemez, sadece formu değiştirilebilir veya başka moleküllere bağlanabilir ya da ayrıştırılabilir. Küçük partiküllere bağlı As, günlerce havada asılı kalabilir ve uzun mesafelere taşınabilir (ATSDR, 2007). Arsenik bileşikleri, kayalar, toprak, su ve havada, yanı sıra biyoakümülasyonla bitki ve hayvanlarda da bulunur (IARC, 2004).

Arsenik, temel olarak bileşiklerinde -3, 0, +3, +5 olmak üzere dört farklı oksidasyon basamağındadır. Arsenik bileşikleri üç grupta sınıflandırılabilir: İnorganik arsenik (iAs) bileşikleri, organik arsenik bileşikleri ve arsin gazı (IARC, 2012).

Arsin gazı (AsH_3), arsenikle hidrojenin reaksiyonu sonucu oluşan, yüksek konsantrasyonlarda sarımsak ya da balıksı kokan bir gazdır. Akut toksisitesi en fazla olan arsenik bileşiğidir (ATSDR, 2007).

İnorganik arsenik bileşikleri, arseniğin oksijen, klor ve sülfürle yaptığı bileşiklerdir (WHO,2011). İnorganik arsenik, genellikle bileşiklerinde trivalent (+3, arsenit) ve pentavalent (+5, arsenat) formda bulunur. En yaygın bilinen inorganik arsenik bileşikleri; arsenik trioksit, sodyum arsenat, sodyum arsenit, arsenik triklorid, arsenik pentoksit, arsenit (arsinöz asit) ve arsenat (arsenik asit)'tır (IARC, 2012).

Organik arsenik bileşikleri ise, arseniğin karbon atomu ile yaptığı bileşiklerdir. Arsenobetain, arsenokolin, tetrametilarsonyum tuzları, arsenoşekerler ve arsenolipitler, organik arsenik bileşiklerine örnektir ve temel olarak denizde yaşayan organizmalarda bulunurlar (WHO, 2001).

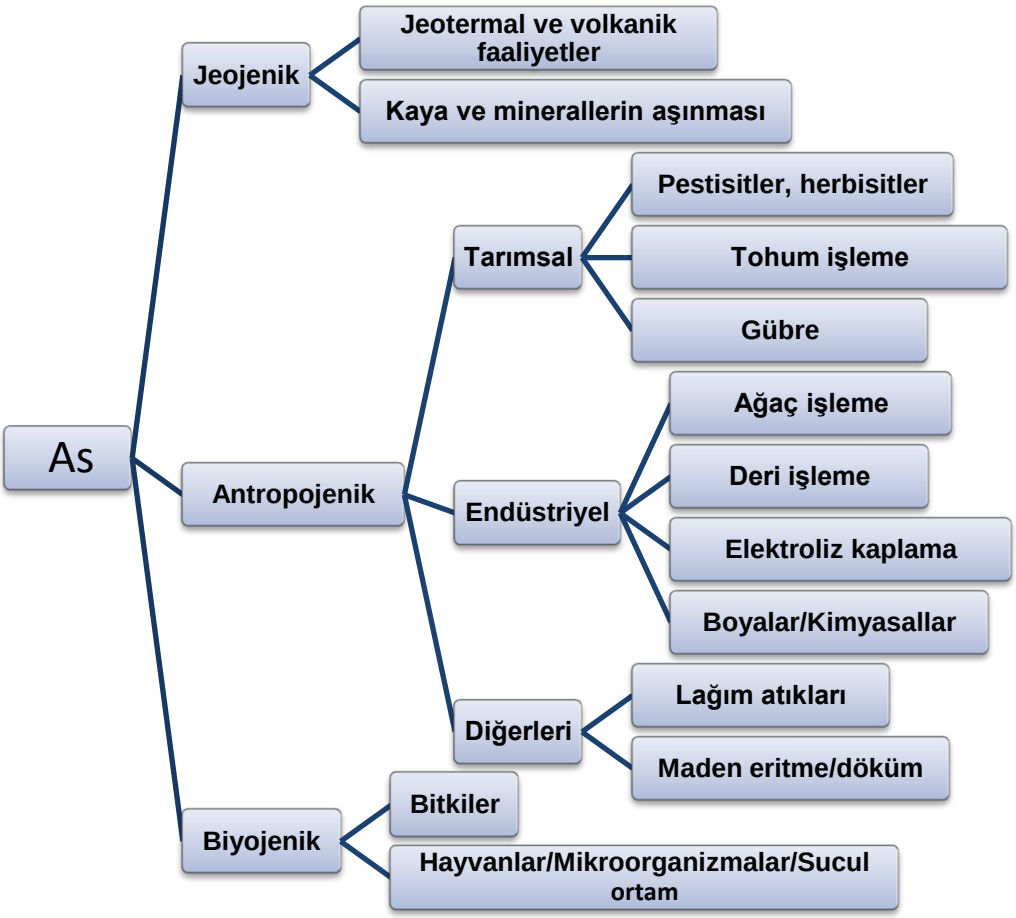
Çevrede en yaygın bulunan arsenik formları, inorganik As(III) ve inorganik As(V) oksianyonlarıdır (Mahimairaja ve diğerleri, 2005). Yüzeyel sularda (oksitleyici koşullarda) As(V) daha çok bulunurken, derin sularda As(III) daha fazladır (IARC, 2012). Arseniğin sudaki çözünürlüğü ve transportu kimyasal formuna bağlıdır (ATSDR, 2007). Elementel arsenik suda çözünmemesine karşın, arsenik tuzları pH'ya ve ortamın iyon derişimine bağlı olarak suda yüksek çözünürlüğe sahip olabilir. Suda çözünebilen arsenik türleri Çizelge 2.1' de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Suda çözünebilen arsenik bileşikleri (Hindmarsh, 2002)

Arsenik trioksit	As_2O_3	
Arsinöz asit	H_3AsO_3	
Arsinit	$H_2AsO_3^{1-}$, $HAsO_4^{2-}$, AsO_3^{3-}	
Arsenik pentoksit	As_2O_5	
Arsenik asit	H_3AsO_4	
Arsenat	$H_2AsO_4^{1-}$, $HAsO_4^{2-}$, AsO_4^{3-}	
Metilarsinik asit (MMA)	$CH_3AsO(OH)_2$	İnorganik As metabolitleri
Dimetilarsinik asit (DMA)	$(CH_3)_2AsO(OH)$	
Arsenobetain	$(CH_3)_3As^+CH_2COOH$	Balıkta bulunan arsenik
Arsenokolin	$(CH_3)_3As^+CH_2CH_2OH$	
Arsanilik asit	$C_6H_4NH_2AsO(OH)_2$	Hayvanlarda büyümeyi başlatır

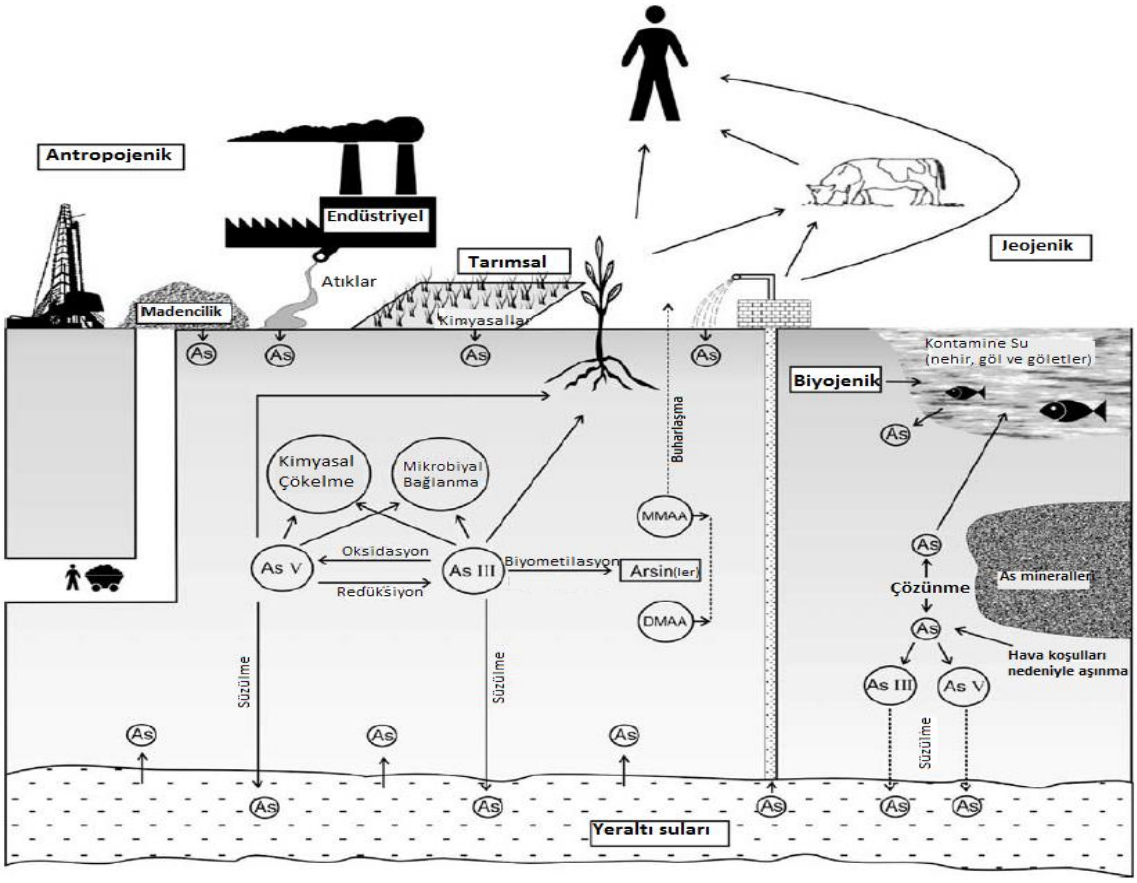
Kayalarda, tortullarda, toprak, su ve havada bulunan arsenik, karasal ve sucul ekosisteme, iklimsel olaylarla, volkanik emisyonlarla, biyolojik aktiviteler ve yanısıra çeşitli antropojenik faaliyetlerle karışır (Şekil 2.1; Mahimairaja ve diğerleri, 2005). Atmosferdeki arseniğin 1/3'ünün doğal kaynaklardan yayıldığı tahmin edilmektedir (her yıl yaklaşık 7900 ton). Volkanik faaliyetler ve ardından düşük sıcaklıkta buharlaşma, arseniğin en önemli

yayılma kaynağıdır. Her yıl antropojenik kaynaklardan atmosfere 24000 ton arsenik yayıldığı tahmin edilmektedir. Atmosferdeki As konsantrasyonu, kırsal alanlarda 0,02-4 ng/m^3 arasında iken kentsel bölgelerde 3-200 ng/m^3 aralığında değişmektedir (IARC, 2012).



Şekil 2.1. Arseniğin karasal ve sucul ekosistemdeki major kaynakları

Biyolojik kaynaklar da ekosisteme düşük konsantrasyonlarda arsenik girişine katkı sağlar. Bitkiler, mikro ve makro organizmalar, arseniğin ekosistemdeki dağılımını biyoakümülasyon (biyosorpsiyon), biyotransformasyon (biyometilasyon) ve volatilizasyon yoluyla etkilemektedir. Arsenik, protein, lipit ve hücresel bileşenlerine yüksek afinitesi nedeniyle canlı organizmalara kolaylıkla akümüle olabilir. İçinde yaşadığı sucul ortamdan daha yüksek konsantrasyonlarda arsenik içeren organizmaların (biyomagnifikasyon) arsenik akümülasyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Arsenik topraktan bitkilere ardından besin zinciri yoluyla hayvan ve insanlara transfer olur (Şekil 2.2 ; Mahimairaja ve diğerleri, 2005).



Şekil 2.2. Doğada arsenik döngüsü

Topraktaki organik ve inorganik As bileşikleri çeşitli formlarda bulunur. Topraktaki arsenik, demir (Fe), aluminyum (Al), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg) ve nikelle (Ni) katı çökeltiler oluşturur. Topraktaki çözünebilir As konsantrasyonunu, büyük ölçüde redoks koşulları, pH, biyolojik olaylar ve adsorbsiyon reaksiyonları belirler. Arseniğin topraktaki adsorbsiyon ve mobilitesi, büyük ölçüde $H_2PO_2^-$ (hipofosfit) iyonunun varlığından etkilenir. Arsenikle kontamine olmayan bölgelerde, topraktaki As konsantrasyonu nadiren 10 mg/kg'ı aşar. Jeojenik ve antropojenik kaynaklara bağlı olarak topraktaki As seviyesi <1 - 250 000 mg/kg aralığında değişmektedir (Mahimairaja ve diğerleri, 2005).

Doğal sulardaki yükselen arsenik düzeyleri, genellikle arsenikçe zengin tortul kayalardan, volkanik kayalardan, fosil yakıtlardan, mineral kaynaklarından, maden atıklarından, tarımsal uygulamalardan, jeotermal bölgelerden ve sulama işlemlerinden kaynaklanmaktadır (Mahimairaja ve diğerleri, 2005).

Arseniğin yer altısularına karışmasında 3 muhtemel mekanizma vardır:

i) Birinci mekanizma, arsenik minerallerinin oksidasyonuna bağlı olarak gerçekleşir. Suda çözünemeyen arsenopirit (FeAsS) gibi arsenik mineralleri okside olur. Reaksiyon sonucunda suda çözünebilen arsenat [As(V)], sülfat (SO_4^{2-}) ve demir [(Fe (II)] iyonu oluşur.

$$FeAsS + 13Fe^{3+} + 8H_2O \text{ ------ } 14Fe^{2+} + SO_4^{2-} + 13H^+ + H_3AsO_{4\,(suda)}$$

ii) İkinci mekanizmada, inorganik As türleri, oksitleyici koşullar altında ve Fe iyonu varlığında, FeOOH ile etkileşerek katı fazda kalır. Yeraltındaki bataklık kömürlerinin fermantasyonu sonucu yüzeye çıkan organik moleküller, Fe(II), As(III) ve As(V) oluşmasına yol açar. Bu reaksiyon, yeraltı sularına arsenik akümülasyonunun en büyük sebebidir.

$$8FeOOH\text{-}As_{(s)} + CH_3COOH + 14H_2CO_3 \text{ --- } 8Fe^{2+} + As_{(ç)} + 16HCO_3^- + 12H_2O$$

iii) Üçüncü mekanizma, toprağın gübrelenmesiyle akiferlere göç eden fosfat iyonu ($H_2PO_4^-$) ile akiferlere emilmiş As arasında yarışmalı bir yer değiştirme sonucu, akiferlerden arsenik salınmasıdır (Mahimairaja ve diğerleri, 2005).

Arseniğin sudaki formu ve konsantrasyonu, redoks koşulları, biyolojik aktivite oranı, su kaynağının tipi (okyanusa açılan deniz suyu veya yeraltı suyu) ve su kaynağının arsenikçe zengin jeolojik oluşumlara ve antropojenik kaynaklara yakınlığı gibi faktörlere bağlıdır. Göller ve nehirler gibi yüzeysel tatlı su kaynaklarında genellikle 10 µg/l'den daha az As bulunur. Ancak antropojenik kaynaklara yakınsa, As seviyesi 5 mg/l'ye kadar çıkabilmektedir. Okyanusa açılan deniz sularında ve yeraltı sularında As konsantrasyonu ortalama 1-2 µg/l'dır. Ancak yeraltı suları volkanik oluşumlar ve sülfit mineral kaynakların yakınsa, As seviyesi 3 mg/l'ye kadar yükselebilmektedir (IARC, 2012).

Çizelge 2.2. Biyolojik örneklerde bulunan arsenik türleri (WHO, 2001; Rahman ve Hasegawa, 2012; Sele ve diğerleri, 2012 'den uyarlanmıştır)

Adı	Kısaltma
İnorganik arsenik türleri	
Arsenit (Arsinöz asit)	As (III)
Arsenat (Arsenik asit)	As (V)
Organik arsenik türleri	
Monometilarsinöz asit	MMA (III)
Monometilarsinik asit	MMA (V)
Dimetil arsinöz asit	DMA (III)
Dimetil arsinik asit (Kakodilik asit)	DMA (V)
Arsenobetain	AsB
Arsenokolin	AsC
Trimetilarsin oksit	TMAO
Tetrametilarsonyum iyonu	Me_4As^+
Arseno-şekerler	AsS
Arseno-lipitler	AsL

İçme suyundaki arsenik, başlıca As(V) formunda bulunur. Metillenmiş arsenik türlerine (DMA ve MMA), içme suyunda az miktarda, biyolojik örneklerde ise yüksek miktarlarda rastlanmaktadır. Biyolojik örneklerde bulunan arsenik türleri Çizelge 2.2'de özetlenmiştir.

As türlerinin bilinmesi, sadece farklı ekosistemlerdeki As'in biyojeokimyasal döngüsünün, As akümülasyonunun ve detoksifikasyon mekanizmasının anlaşılması için değil, aynı zamanda As yönünden zengin biyokütlelerdeki güvenli uzaklaştırma yöntemlerinin tasarlanması için de oldukça önemlidir (Mahimairaja ve diğerleri, 2005).

2.1.1. Dünya'da ve Türkiye'de arsenik yönünden zengin coğrafi bölgeler ve doğal maruziyet kaynakları

Atmosferik As, hem volkanik faaliyetler ve orman yangınları gibi doğal kaynaklardan hem de fosil yakıtların yakılması, egzos gazları ve sigara dumanı gibi antropojenik kaynaklardan yayılır (Cascio, 2011).

Arsenik, pek çok besinde farklı türlerde ve konsantrasyonlarda bulunabilir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), besinlerdeki arseniğin risk değerlendirmesi için, total arsenik konsantrasyonu yerine sadece inorganik As konsantrasyonunun baz alınmasını tavsiye etmiştir. Diğer besinlerle karşılaştırıldığında genellikle balık en yüksek total arsenik konsantrasyonuna sahiptir. Tahıllar içerisinde ise pirinç, özellikle arsenikçe zengin sularla sulandığı ya da arsenikçe zengin toprakta yetiştirildiğinde, hem inorganik hem de organik arsenik akümülasyonuna uygun olduğundan yüksek konsantrasyonlarda arsenik taşıyabilir (Cascio, 2011). Pirinçteki total arsenik konsantrasyonu yetiştirildiği coğrafi bölgeye göre farklılık göstermekle birlikte, sulama suyundaki kontaminasyona bağlı olarak 1830 µg/kg konsantrasyonlara kadar ulaşabilmektedir. 82-202 µg/kg aralığı, pirinçteki 'normal' total arsenik konsantrasyon aralığı olarak önerilmektedir (Sofuoğlu ve diğerleri, 2014).

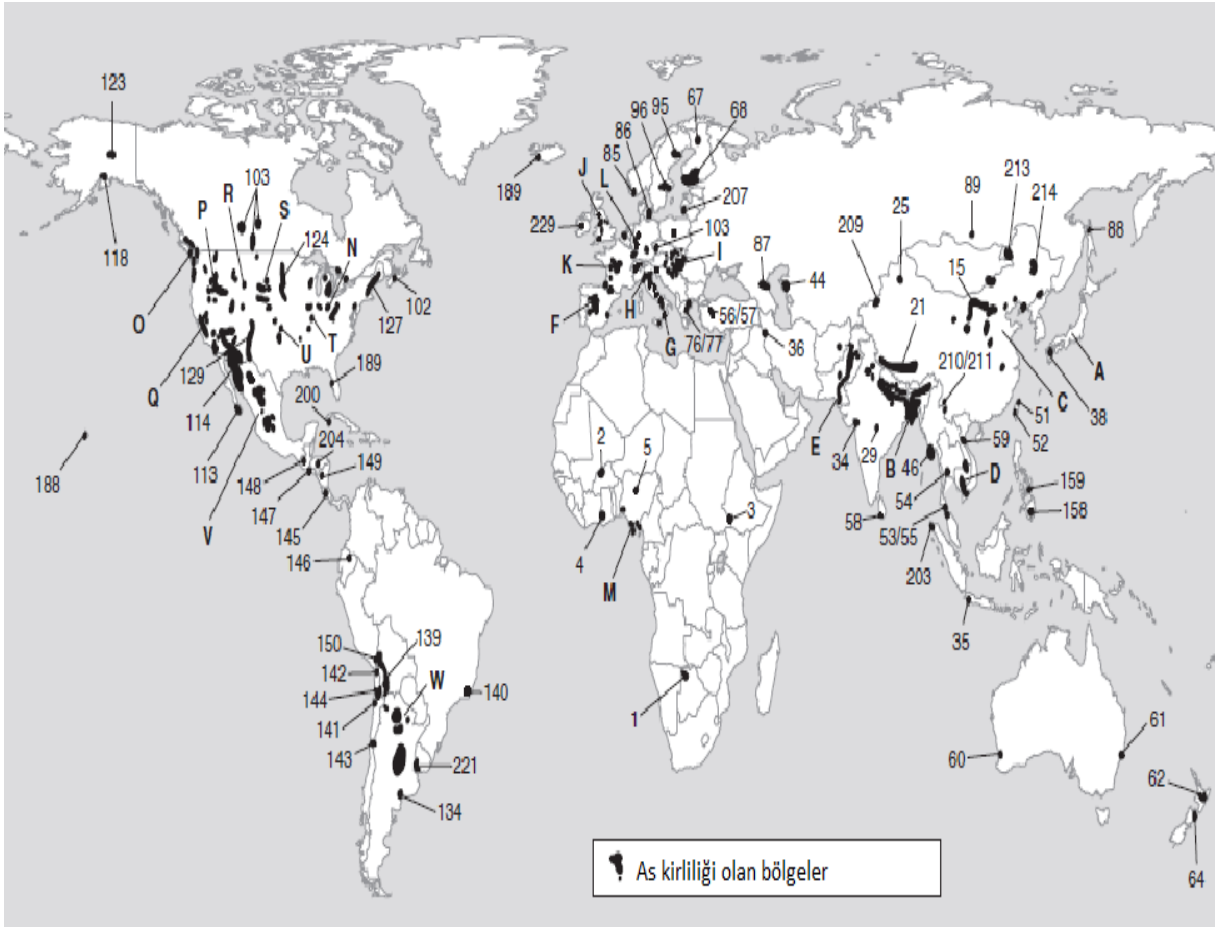
Çevredeki pek çok arsenik maruziyet kaynağı arasından içme suyu, insan sağlığı açısından en büyük riski oluşturmaktadır (Mahimairaja ve diğerleri, 2005).

Dünya genelinde, limit değerin (10 µg/l) üzerinde As içeren içme suları, 5 kıtada, 70 ülkede, 150 milyondan fazla insan için bir felaket oluşturmaktadır (Bhattacharjee ve diğerleri, 2013). Yeryüzeyinin ve yer altı sularının arsenikle kontaminasyonu, dünya üzerindeki birkaç bölgede sosyopolitik bir konu haline gelmiştir. Batı Bengal (Hindistan) ve Bangladeş'te milyonlarca insan arsenikle kontamine içme suyu nedeniyle risk altındadır. Ayrıca Çin, Tayvan, Şile, Vietnam, Arjantin ve Meksika'da da içme suyu As düzeyleri pek çok insan için risk oluşturmaktadır (Harita 2.1; Mahimairaja ve diğerleri, 2005).

Himalaya Dağları'nın kar ve buzullarından beslenen Ganj Nehri'nin yatağında bulunan arsenikli kayaçlardan içme suyuna salınan arsenik, Güneydoğu Asya'daki As kirliliğinin en önemli sebebidir. Bangladeş'te artezyen kuyulardan temin edilen arsenikli suyu,

20-30 milyon insan kullanmaktadır. Bu ülkedeki 84 bölgenin 43'ünde ise arsenik seviyesi çok yüksektir (Atabey, 2009:70-71).

Avrupa kıtasında ise, Romanya, Slovakya ve Macaristan'da içme suyu As düzeyleri, limit değer olan 10 µg/l'nin üzerindedir (WHO, 2001).



Harita 2.1. Dünya üzerinde As kirliliği olan coğrafi bölgeler (Ravenscroft, Brammer ve Richards, 2009:4)

Türkiye'de, yeraltı sularındaki arsenik büyük ölçüde jeolojik kaynaklıdır. Senozoik zamanda, Batı Anadolu'da en göze çarpan jeolojik olay olan Messiniyen tuzluluk krizi, buharlaşma ile çok yüksek miktarda arsenik ve bor içeren minerallerin oluşmasına neden olmuştur (Doğan ve Doğan, 2007).

Ülkemizde arsenikle kontamine alanlar genelde jeotermal kaynaklar ve madencilik faaliyetlerinin bulunduğu yerlerdir. Bu anlamda, arsenik açısından en önemli iki yöre; Emet-Hisarcık (Kütahya) Havzası ile Nevşehir yöresidir (Atabey, 2009:38).

Özellikle Batı Anadolu'daki jeolojik formasyonlar ve jeotermal aktiviteler, yer üstü ve yer altı su kaynaklarının kontaminasyonu için uygun koşullar oluşturmaktadır Metamorfik kayalardan köken alan yüksek sıcaklıktaki jeotermal akışkanlar, sülfür mineralizasyonunu kolaylaştırmakta ve Batı Anadolu'da 594 µg/l'ye kadar çıkan arsenik konsantrasyonuna neden olmaktadır (Gündüz, Şimşek ve Hasöbek, 2010). Nevşehir Bölgesi'ndeki volkanik kayaçlar ve siyah şeyller, iAs içermektedir. Bu kayaçlardaki iAs, kimyasal olarak yer altı sularına karışmakta ve zenginleşmektedir. Bu bölgedeki içme ve kullanma suları ise genellikle kuyulardan sağlanmaktadır (Atabey, 2009:47).

Harita 2.2. Ülkemizde yeralti sularında As saptanan yöreler ve As oluşumlu alanlar (Atabey, 2009: 40)

Çanakkale, Balıkesir, İzmir, İzmir-Manisa havzası, Uşak, Kütahya-Emet, Isparta, Konya, Ankara, Kastamonu, Amasya, Tokat, Nevşehir bölgesi, Kayseri, Niğde, Malatya, Elazığ, Sivas, Ordu, Giresun, Trabzon, Rize, Artvin ve Kars ülkemizde yeraltı sularında arsenik saptanan illerdir (Harita 2.2; Atabey, 2009:40).

2.1.2. Antropojenik kaynaklı arsenik

Metal eritme ve inceltme, mikroelektronik işçileri, pil üreticileri, kömür yakıtlı enerji santralleri çalışanları gibi endüstriyel sektör çalışanları, mesleksel olarak arseniğe maruz kalmaktadırlar (ATSDR, 2007).

Mesleksel maruziyet temel olarak inorganik As içeren toz ve dumanların inhalasyonu ile olur (ATSDR, 2007). Amerikan İş Güvenliği ve Sağlığı Kuruluşu (OSHA), iş yeri ortamında bulunmasına izin verilen maksimum arsenik konsantrasyonunu (TLV); 0,01 mg/m^3 olarak belirlemiştir. Bazı durumlarda oral ya da dermal maruziyet de olabilir. Mesleksel maruziyet genellikle başka metallerle birlikte olur (ATSDR, 2007). Günümüzde ahşap koruyucuların bileşeni olarak bakır arsenat kullanılmaktadır (Cascio, 2011).

Geçmiş yıllarda inorganik arsenik bileşikleri (kurşun arsenat), pestisit olarak kullanılmıştır. Ancak günümüzde bu kullanımı yasaklanmıştır (ATSDR, 2007). Arsenik, cam endüstrisi ve seramik yapımında, boya üretiminde kullanılmaktadır (Vuyyuri, Ishaq, Kuppal, Grover ve Ahuja, 2006).

Tütün bitkisi, özellikle kurşun arsenat pestisiti ile yetiştirildiğinde yüksek miktarda arsenik içerebilmektedir. Dolayısıyla sigara kullanımı As maruziyetine neden olmaktadır. Arsenik içeren pestisitler günümüzde pek çok ülkede yasak olmasına rağmen, tütünde doğal olarak arsenik bulunabilmektedir. Her bir sigaradaki arsenik miktarı, 40-120 ng arasında değişmektedir. Günde 20 sigara içen bir kişi yaklaşık 0,8-2,4 µg arseniğe maruz kalmaktadır (WHO, 2000).

2.1.3. Tıbbi amaçlı kullanım

Arseniğin tıbbi amaçla kullanımı, Hipokrat ve Galen gibi Yunan hekimler zamanında popüler olmuştur. 19. yy'da, %1 arseniktrioksit içeren solüsyonlar (Fowler's solüsyonu), lösemi, sedef hastalığı, dermatit, egzema, mukoza ve diş eti iltihabı gibi çeşitli rahatsızlıklarda kullanılmıştır. Ancak Fowler’s solüsyonunun kronik kullanımının hemanjiyosarkom, karaciğer anjiyosarkomu ve nazofarengal karsinoma neden olduğu görülmüştür (Ratnaike, 2003). 1878 yılında, Fowler's solüsyonunun, lösemi hastalarında beyaz kan hücrelerinin sayısını düşürdüğü gözlenmiştir. Fowler's solüsyonunun kullanımı zamanla azalsa da, arseniktrioksitin etkili bir kemoterapötik ilaç olarak keşfedilmesine sebep olmuştur (Hughes, Beck, Chen, Lewis ve Thomas, 2011). Günümüzde, arsenik trioksit (Trisenox®), akut Promiyelositik Lösemi (APL) hastalarında semptomların hafifletilmesinde kullanılmaktadır (Ratnaike, 2003). *Trans*-retinoid terapisi, hastaların %95'inde etkilidir. Ancak

diğer %5'lik kısımda tedaviye direnç gelişebilmektedir (Senior, 2002). Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) tarafından 2000 yılında onay alan ilaç, özellikle *trans*-retinoid terapisine dirençli bireylerde etkindir (Sumi ve Himeno, 2012).

Amerika'da Memorial Sloan-Kettering Kanser Merkezi'nde, löseminin nüks ettiği 40 hastada, arsenik trioksitin etkinliği ve güvenilirliği araştırılmıştır. Tedavinin ilk periyodunda 34 hastada hafifleme görülmüş ve 18 ay sonra hastaların %66'sı halen hayatta iken, %56'sında hastalığın nüksü tamamen ortadan kalkmıştır. Daha sonra APL hastalarından alınan lösemi hücreleri üzerinde arseniğin etki mekanizması araştırılmış ve arsenik ile telomeraz arasında bağlantı bulunmuştur. 3 hafta boyunca 0,75 µM arsenik uygulanan hücrelerde, kromozomların uç uca birleştiği farkedilmiş ve bu birleşmenin telomer uzunluğunun kısalması veya yok olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. Ancak kontrol deneyleri arseniğin telomeraz enzimini doğrudan etkilemediğini göstermiştir. Daha sonra yapılan mRNA seviyelerinin analizi, telomeraz aktivitesinin baskılanması ile ilişkili olarak, telomeraz revers transkriptaz enziminin alt ünitesini kodlayan *hTERT* geni mRNA seviyesinde değişiklik meydana geldiğini göstermiştir. Doksorubisin ve vinkristin gibi kemoterapötiklerle tedavi edilen hücrelerde bu etki gözlenmemiştir (Senior, 2002).

2.2. Toksikokinetik

2.2.1. İnorganik arsenik toksikokinetiği

Absorpsiyon

Gastrointestinal absorpsiyon

As, besinler, su ve ilaçlar yoluyla gastrointestinal bölgeden ve mukosiliyer açıklıktan (inhalasyonla içeri alınan) absorbe olabilir. As(III) ve As(V) bileşikleri, deney hayvanlarında yapılan çalışmalara göre, oral uygulamadan sonra süratle ve yüksek miktarda absorbe olmaktadır.

İnsanlarda da, hem As(III)'ün hem de As(V)'ın gastrointestinal kanaldan absorbe olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (WHO, 2001). Sağlıklı erkek gönüllülerde

yapılan bir çalışmada, uygulanan As(V)'in 7 gün boyunca %62'sinin idrarla, %6'sının da feçesle atıldığı gözlenmiştir. Genel olarak, oral yoldan uygulanan arsenik(III) dozunun %45 ila %75'inin idrarla atıldığı gözlenmektedir (WHO, 2001).

Arseniğin gastrointestinal sisteme salınması (biyoerişebilirlik) ve biyoyararlanımı, oluşabilecek sağlık risklerini öngörmek açısından önemlidir (Alava ve diğerleri, 2013). Arseniğin biyoyararlanımı, içinde bulunduğu matriks ortamına (besin, su), çözünürlüğüne ve gastrointestinal bölgede bulunan diğer gıda bileşenlerine göre değişkenlik gösterebilmektedir (WHO, 2001).

pH ve safra konsantrasyonu gibi sindirim parametrelerinin ayrıca besin içeriğinin As biyoyararlanımındaki rolünün araştırıldığı bir çalışmada, 8 arsenik türünün [arsenit As(III), arsenat As(V), monometilarsinik asit MMA(V), dimetilarsinik asit DMA(V), monometilarsinöz asit MMA(III), dimetilarsinöz asit DMA(III), monometilmonotiyoarsonik asit MMMTA(V), dimetilmonotiyoarsinik asit DMMTA(III)] biyoyararlanımı incelenmiştir. Bütün As standartlarının, mide pH değeri 1,8 olduğu koşuldaki biyoyararlanımları % 85 ile %90 arasında değişirken, pH değeri 4'e yükseldiğinde metil ve tiyo grubu taşıyan As türlerinin biyoyararlanımı %50 ile %85 aralığına düşmüştür. Safra tuzu konsantrasyonu 30 mg/l'ye çıktığında, iAs türlerinin biyoyararlanımının %70 ile %85 aralığına düştüğü gözlenmiştir. Besindeki lif içeriğinin ise As biyoyararlanımını etkilemediği ancak yağ içeriğinin hem organik hem iAs türlerinin biyoyararlanımını artırdığı gözlenmiştir. iAs ile ilgili olarak, gastrointestinal bölgede Fe(III) varlığının, iAs-Fe kompleksine neden olarak arseniğin biyoyararlanımını düşürdüğü sonucuna ulaşılmıştır (Alava ve diğerleri, 2013).

İntraperitonel ve oral As absorpsiyonunun araştırıldığı diğer bir çalışmada, hamsterlara GaAs (Galyumarsenik; sodyum arsenit ve sodyum arsenat ile kıyaslandığında çözünürlüğü düşük) uygulanmış ve 5. günün sonunda fekal eliminasyonu, oral yoldan 10, 100 ve 1000 mg/kg GaAs için sırasıyla %87,5; %79,4 ve %77,9 olarak ölçülmüştür. Bu süre içerisinde uygulama yolu ne olursa olsun, uygulanan dozun %1'den daha azının idrarla elimine edildiği gözlenmiştir ki bu da, GaAs'in gastrointestinal bölgeden minimal düzeyde absorbe olduğunu göstermektedir. Ancak, intraperitonel uygulama boyunca, oral uygulamaya göre çok daha fazla miktarda idrarla DMA atılımı gözlenmiştir (WHO, 2001).

Solunum yolu ile absorpsiyon

İnhalasyonla As maruziyeti, endüstriyel aktiviteler, enerji üretimi ve sigara dumanı ile oluşabilmektedir. Havadaki As partiküler haldedir ve bu yüzden arseniğin solunum yolu ile absorpsiyonu iki basamaklı bir süreci kapsamaktadır: partiküllerin hava yolu ve akciğer yüzeyinde depolanması, depolanan partiküllerden arseniğin absorpsiyonu (WHO, 2001).

Depolanmış arseniğin absorpsiyonu, büyük ölçüde As'in çözünebilirliğine bağlıdır. İntratrakeal damlatma yöntemi ile hamsterlara uygulanan inorganik arseniğin akciğerlerden absorpsiyonunun, in-vivo çözünürlüğü ile doğrusal olduğu bulunmuştur (WHO, 2001).

İnsanlarda idrar As ve metabolitlerinin ve soluk borusundaki iAs konsantrasyonunun ölçüldüğü bazı mesleksel maruziyet çalışmaları, As absorpsiyonuna dair bilgi sağlayabilmektedir. Bu çalışmalara göre, inhalasyonla As'e maruz kalan işçilerde, idrarla As atılımı anlamlı derecede yüksektir. Bu sonuç, arseniğin solunum bölgesinden absorbe olduğuna işaret etmektedir. Ancak ne kadarının absorbe olduğuna dair tahmin yürütmek için yeterli veri yoktur. Çünkü ağız yoluyla mukosiliyer açıklıktan alınan As ve bazı durumlarda da besinler ve içme suyu ile alınan As sonuçlara girişim yapabilmektedir (WHO, 2001).

Dermal absorpsiyon

İn-vitro dermal iAs absorpsiyonuna dair sınırlı veriye göre, As'in kimyasal formuna ve türüne göre dermal absorpsiyonu değişmektedir (WHO, 2001).

Plasental geçiş

As zehirlenmesi geçiren hamile kadınlara ait vaka raporlarına göre; ölen fötusun hayati organ ve dokularında yüksek seviyelerde As bulunmaktadır (WHO, 2001). Anne ve yeni doğanların içme suyuyla yüksek konsantrasyonlarda (200 µg/l) As'e maruz kaldığı bir çalışmada ise, annenin kanında ve kordon kanında benzer As seviyeleri rapor

edilmiştir. Bu sonuç, As'in plasentayı kolayca aşabildiğini göstermektedir (Concha, Vogler, Lezcano, Nermell ve Vahter, 1998).

Dağılım

iAs, GI bölgeden absorbe olur olmaz kan dolaşımına geçer, organ ve doku kompartmanlarına dağılır. As(III), fizyolojik pH'da çözünmediği için hücre membranlarından difüze olma yeteneği As(V)'e göre daha fazladır. Aktif transport mekanizmaları, hem As(III)'ün (akuaglikoporinler aracılığıyla) hem de As(V) 'in (fosfat transportu) hücre içine taşınmasını sağlamaktadır. As, fonksiyonel ya da yapısal moleküllere tutunarak kimyasal olarak etkileşir veya biyokimyasal reaksiyonlarla moleküler yapıların değişmesine neden olur (Cascio, 2011).

Tavşan, sıçan, fare, hamster ve maymunlarda yapılan çalışmalarda, oral ve parenteral uygulanan As(III) ve As(V) türlerinin süratle dokulara dağıldığı gösterilmiştir. Sadece dikkate değer bir istisna olarak; iAs, sıçanlarda eritrositlere akümülasyonu nedeniyle, kanda daha uzun süre varlığını sürdürebilmektedir. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada, sıçan ve tavşanlara intraperitonel yoldan, aynı dozda As(III) uygulanmış ve sıçan eritrositlerinde, tavşanlara kıyasla, uygulamadan 1, 16 ve 48 saat sonra, sırasıyla 2, 102 ve 268 kat fazla arsenik bulunmuştur (Plazma arsenik konsantrasyonu sıçan/tavşan=1 değerini geçmediği halde) (WHO, 2001).

İnsanlarda ise, iAs kandan süratle temizlenir. Çalışmalara göre, arseniğin eritrositlerden ve plazmadan temizlenme kinetiği benzerdir ve maruziyetten birkaç saat sonra, eritrositler, plazmaya göre 3 kat fazla As içermektedir. Arseniğin plazma konsantrasyon eğrisi, 3 kompartmanlı model özelliği göstermektedir ve ilk yarı ömrü oldukça kısadır. Uygulamadan 24 saat sonra, dozun sadece %0,1'den daha azı kanda varlığını sürdürmektedir (WHO, 2001).

İnsan dokularının postmortem analizi, hem düşük doz kronik maruziyette hem de akut zehirlenmelerden sonra arseniğin vücutta geniş dağılım gösterdiğini ortaya çıkarmaktadır. Pek çok çalışmada, arseniğin saç, deri ve skuamöz epitel hücreli dokulara (oral kavite, özofagus, mide) akümülasyonunun güçlü olduğu ve bu durumun arseniğin keratin

proteinine bağlanma özelliğinden kaynaklandığı gösterilmiştir. Ayrıca As, kan-beyin bariyerini de aşabilmektedir (WHO, 2001).

Metabolizma

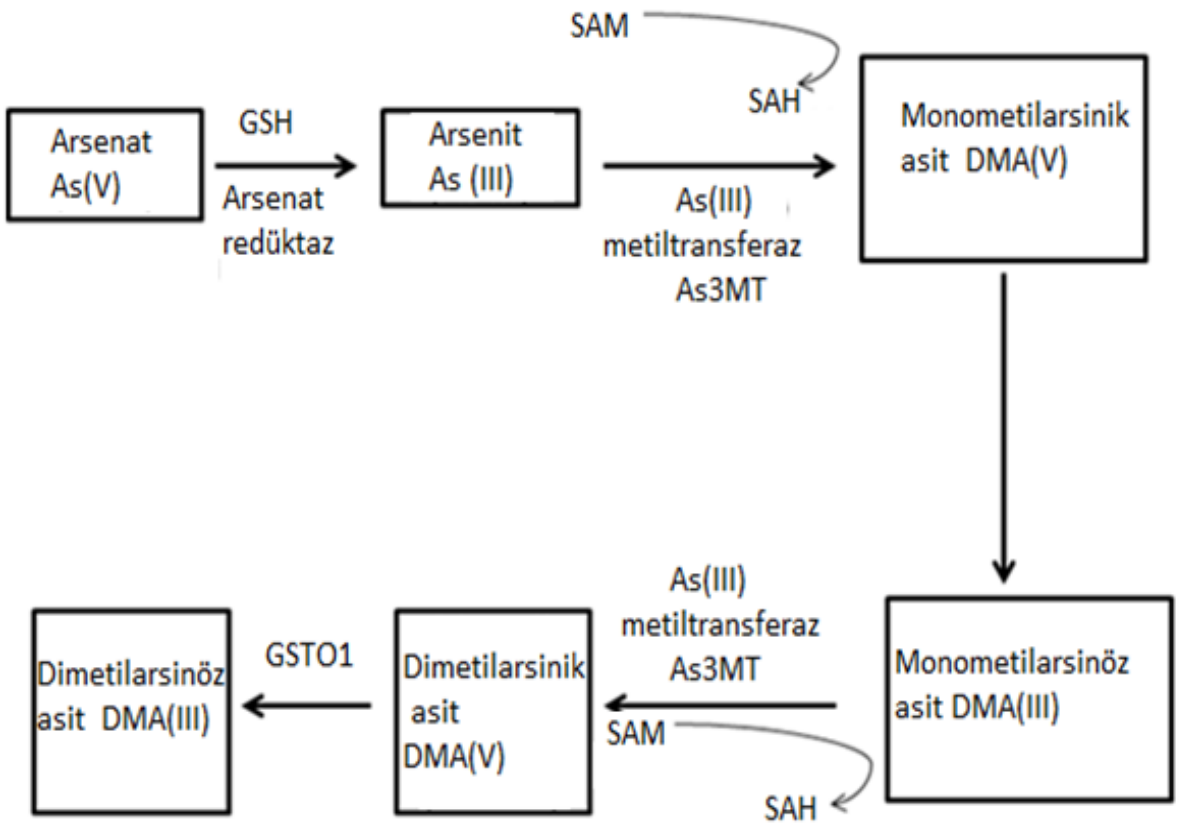
Arsenik metabolizması, toksik etkileri açısından oldukça önemlidir. Çünkü As toksisitesi, arseniğin kimyasal formuna ve oksidasyon basamağına bağlıdır. Metabolitlerin çoğu metillenmiş iAs türleridir (Marchiset-Ferlay, Savanovitch ve Sauvant-Rochat, 2012).

Arsenik metabolizması temel olarak iki mekanizmayla karakterizedir: (1) ***As (V)'in, As (III)'e redüksiyonu***. (2) ***As(III)'in, metil kaynağı olarak S- adenozil metiyonin (SAM) ve esansiyel kofaktör olarak GSH kullanılarak, -mono, -di ve trimetil formlara dönüştürüldüğü oksidatif metilasyon reaksiyonları*** (Şekil 2.3; WHO, 2001).

Glutatyon *S*-transferaz enziminin omega izoformu (GSTO) ve pürin nükleotid fosforilaz (PNP) enzimleri, As(V)'in As(III)' e indirgenmesini katalizleyen enzimlerdir. Son yıllarda, polinükleotid fosforilaz ve mitokondriyal ATP sentetazın da, glutatyon (GSH) varlığında bu reaksiyonu katalizledikleri rapor edilmiştir (Sumi ve Himeno, 2012).

As(III) metilasyonu, metil kaynağı olarak S-adenozil metiyonin (SAM) gerektirir ve reaksiyon sonucunda; MMA(V), MMA(III), DMA(V) ve DMA(III) oluşur (Sumi ve Himeno, 2012). Predominant metabolit DMA(V)'tir ve süratle elimine olur (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012).

Kemirgenlerde, özellikle sıçanlarda, kandaki iAs'in önemli miktarı TMAO(V)'ya dönüştürülür ve idrarla atılır. Tüm türlerde, az miktarda As, iAs (özellikle As(III) formunda) olarak atılır. İnsanlarda da DMA(V)'in TMAO(V)'ya metilasyonu vardır ancak, çok yüksek miktarlarda As maruziyetinde görülür ve çoğunlukla idrarda tespit edilemeyecek kadar az miktarlarda oluşur. DMA(V)'in indirgenmesiyle oluşan DMA(III)'ün çoğu, spontan oksidasyon ile tekrar DMA(V)'e dönüşür ve idrarla atılır (Cohen, Arnold, Beck, Lewis ve Eldan, 2013).



Şekil 2.3. İnorganik arsenik biyotrasformasyonu (GST01; Glutatyon S-transferaz omega, SAM; S-adenozil metiyonin, SAH; S-adenozil homosistein. Aposhian, Zakharyan, Avram, Sapayo-Reyes ve Wollenberg, 2004; Sams II ve diğerleri, 2007'den uyarlanmıştır)

Genel olarak, iAs toksisitesinin organik arsenik bileşiklerinin toksisitesinden fazla olması, iAs metilasyonunun detoksifikasyon süreci olduğunu düşündürmüştür. Bu dogmayı inorganik arseniğin ana metaboliti olan DMA(V)' in, iAs'den daha az toksik olması desteklemiştir (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, trivalent metil arsenik türlerinin [MMA(III) ve DMA(III)], iAs'den daha toksik olduğuna işaret etmektedir (Sumi ve Himeno, 2012). Ayrıca DMA(III) 'in de en az As(III) kadar sitotoksik olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla metillenmiş As türlerinin, yüksek akut toksisiteye sahip olması, As metilasyonunun detoksifikasyon yolağı olmadığını göstermektedir (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012).

Arsenik metil transferaz enzimi (As3MT), memeli türlerinde metilasyon reaksiyonlarını katalizleyen major enzimdir (Cohen ve diğerleri, 2013). Bu nedenle As

metilasyonunda esas rolü üstlenen arsenik metil transferaz enziminin ekspresyonu ve fonksiyonu, As metabolizması ve toksisitesi açısından oldukça önemlidir (Sumi ve Himeno, 2012).

As3MT enziminin As metabolizması ve toksisitesindeki rolünün anlaşılması açısından, *As3MT* geninin over-ekspresyonu veya etkisiz hale getirilmesi durumları önemli birer değerlendirme kriteridir (Sumi ve Himeno, 2012). *As3MT* genindeki polimorfizmler, çeşitli metil As türlerinin miktarsal oranlarını etkileyebilmektedir (Cohen ve diğerleri, 2013).

Geçtiğimiz yıllarda, As metabolizmasındaki türler arasındaki farklılıkları açıklayabilecek iki alternatif mekanizma öne sürülmüştür: (a) glutatyon konjugasyonu, (b) tiyollenmiş analoglar (Cohen ve diğerleri, 2013).

Glutatyon konjugasyonu hipotezi: As bileşiklerinin metilasyonunun, arsenik-glutatyon konjugatları (in-vitro safra sıvısında tespit edilmiştir) üzerinden oluşması ve glutatyonun, metiltransferaz aktivasyonu için gerekli olduğu görüşüne dayanır. Arsenik-glutatyon komplekslerinin (ATG, MADG ve DMAG), iAs bileşikleri ile [iAs(III), MMA(III) ve DMA(III)] glutatyon varlığına bağlı olarak denge halinde olduğu öne sürülmektedir (Cohen ve diğerleri, 2013).

Klasik As metabolizma yolağında, pentavalent As metabolitleri daha toksik olan trivalent formlara indirgenmektedir. Ancak Cohen ve diğerleri (2013)'ne göre, alternatif yolakta trivalent As bileşikleri daha az toksik olan pentavalent formlara dönüşmektedir. DMA(V) ve MMA(V), klasik yolakta ara ürünken, bu yolakta son ürün olarak görünmektedir (Bhattacharjee ve diğerleri, 2013). Ancak glutatyon bağımlı bu yolağın metilasyon reaksiyonu gerçekleştiği sürece gerçekleşmediği düşünülmektedir (Thomas, 2007, 2009, 2010). Ayrıca klasik yolaktaki ara ürünlerin hepsi idrarda tespit edilebilirken, arsenik-glutatyon komplekslerinin idrarda varlığına dair şimdiye dek bir kanıt elde edilememiştir (Bhattacharjee ve diğerleri, 2013).

Tiyollenmiş analoglar: Son yıllarda keşfedilen bu biyokimyasal süreç, arseniğin metabolizması, kinetiği ve yanısıra etkilerinin anlaşılması açısından kritik önemdedir. Bu mekanizma, arseniğin oksijen içeren metillenmiş metabolitlerinin tiyol analoglarının

oluşumasına dayanır. Bu tiyollenmiş As bileşiklerinin, MMA(V) ve DMA(V)'in mono ve di tiyol formları, ayrıca inorganik arseniğin tiyollenmiş analogları olduğu belirlenmiştir. Bu analogların, trivalent arseniğin protein ya da glutatyon gibi daha küçük molekül gruplarındaki sülfidril grupları ile etkileşmesinin ardından oluştuğu fikrine dayanır. Peptid molekülündeki sülfidril gruplarının ayrılarak, tiyol metabolitlerini oluşturduğu düşünülmektedir. Bazı tiyollenmiş arsenik bileşiklerinin in-vitro mesane epitel hücrelerine, akciğer epitel hücrelerine ve epidermal keratinositlere sitotoksik olduğu gösterilmiştir (Cohen ve diğerleri, 2013).

Cinsiyetlere göre As metabolizmasındaki farklılıklar, Şili ve Tayvan'da yürütülen çalışmalarda rapor edilmiştir. Bu çalışmalarda, kadınlarda idrarla DMA atılımının erkeklere göre daha fazla olduğu bulunmuştur. Arjantinli hamile kadınlarda da idrarla DMA atılımındaki anlamlı artış rapor edilmiştir (WHO, 2001).

Eliminasyon

iAs, insan vücudunda temel olarak böbrekler aracılığı ile elimine edilir. Yetişkin erkek gönüllülerde yapılan çalışmalarda, doz miktarları bilinen As(III) ve As(V)'ın, birkaç gün-bir hafta içerisinde, idrarla %45-75 oranında elimine edildiği gözlenmiştir (WHO, 2001). DMA, idrarla atılan major metabolittir. İdrar MMA/DMA oranı bireyler arasında farklılık göstermektedir (Cohen ve diğerleri, 2013).

As, idrar ve feçesin yanısıra diğer minör yolaklarla da elimine edilmektedir. Bir miktar As ter yolu ile de atılabilmektedir. Keratin içeren dokulara akümülasyon yeteneği nedeniyle saç, deri ve tırnaklar da potansiyel atılım yollarıdır (WHO, 2001).

2.2.2. Organik arsenik toksikokinetiği

Genel olarak hem deney hayvanlarında hem de insanlarda, organik As bileşikleri inorganik türlere göre daha az metabolize olmakta ve daha hızlı bir şekilde atılmaktadır (WHO, 2001).

Absorpsiyon

İnsanlarda ve deney hayvanlarında organik arsenik bileşiklerinin solunum yolu ile absorpsiyonu ve depolanması ile ilgili değerlendirilebilir veriler yoktur. Ancak, monosodyum metilarsonat (herbisit) spreyi ile çalışan işçilerin artan idrar As düzeylerinin haftasonları normal seviyelere düşmesi, mesleksel maruziyet durumlarında organik arsenik bileşiklerinin solunum yolu ile absorpsiyonunun olduğuna işaret etmektedir (WHO, 2001).

Gönüllü bireylerde yapılan sınırlı deneysel çalışmalar, hem monometilarseniğin (MMA) hem de dimetilarseniğin (DMA), gastrointestinal bölgeden benzer miktarlarda absorbe olduğunu göstermektedir. Oral yoldan verilen 500 µg monometilarseniğin (MMA) %78'inin ve 500 µg dimetilarseniğin (DMA) %75'inin 4 gün içinde idrarla atıldığı belirlenmiştir (WHO, 2001).

Deniz ürünleriyle alınan organik As bileşiklerinin metabolizmasına dair yapılan çalışmada, 10 µg/kg trimetil arsenik içeren karides tüketen Japon yetişkin gönüllülerde, sindirilen arseniğin %90'ının 72 saat içerisinde idrarla atıldığı gözlenmiştir. Dil balığı [çoğunlukta bulunan organik As bileşiği: arsenobetain (AsB)] tüketen gönüllülerde yapılan diğer bir çalışmada, 2 gün içerisinde, organik As dozunun %60'dan fazlasının atıldığı gözlenmiştir. Bu çalışmalar arsenobetainin gastrointestinal bölgeden kolayca ve hızlı bir şekilde absorbe olduğuna işaret etmektedir (WHO, 2001).

İnsanlarda organik As bileşiklerinin dermal absorpsiyonuna dair endişe verici veriler yoktur. Herbisit olarak kullanılan As bileşiklerinin deney hayvanlarında, hem in-vivo hem in-vitro dermal absorpsiyon verileri rapor edilmiştir. DMA ve MMA tuzları ile Fischer sıçanlarda yapılan çalışmada, her iki bileşik de benzer absorpsiyon göstermesine rağmen, genç sıçanlarda absorpsiyonun anlamlı derecede daha az olduğu gözlenmiştir. Total perkutanöz absorpsiyon yaşlı sıçanlarda %15 iken, genç sıçanlarda %3 seviyesinde kalmıştır (WHO, 2001).

Dağılım

İnsanlarda kandaki organik As bileşiklerinin oranı ile ilgili çalışmalar yetersizdir. 10 µg/kg dozda trimetilarseniğin (%99 arsenobetain) sindiriminden sonra eritrositlerdeki trimetilarsenik seviyeleri plazmadan 2,5 kat fazla bulunmuştur (WHO, 2001). Organik As bileşiklerinin dokulara dağılımı, gönüllü bireylere radyoaktif etiketli organik As bileşiklerinin uygulanmasıyla yapılan sınırlı çalışmalardan ibarettir. Diğer bir çalışmada, arsenobetainin süratle yumuşak dokulara dağıldığı, ancak, hiçbir bölge ve organda major konsantrasyonda bulunmadığı gösterilmiştir. %99'dan fazla miktarının ise 24 gün içerisinde elimine edildiği gözlenmiştir (WHO, 2001).

Metabolizma

Deney hayvanları ve insanlarda yapılan çalışmalara dayanılarak, MMA ve DMA'in benzer oranda metabolize oldukları söylenebilir. Oral, tek doz (500 µg As) uygulanan MMA'in 4 gün boyunca idrardaki metabolitlerinin, %87'si MMA , %13'ü DMA formundadır. Aynı çalışmada uygulanan DMA'in (500 µg As) idrarla atılan tüm metaboliti DMA formundadır. Ancak daha sonraki bir çalışmada oral yoldan uygulanan tek doz DMA (0,1 mg/kg As)'in, %4 oranında idrarla TMAO formunda atıldığı bildirilmiştir (WHO, 2001). Deney hayvanı çalışmalarına benzer şekilde, insanlarda da deniz ürünleri ile alınan arsenobetainin idrarla değişmeden atıldığı gözlenmiştir. Bu sonuç arsenobetainin metabolize olmadığını göstermektedir (WHO, 2001).

Eliminasyon

Deney hayvanı çalışmalarıyla birlikte insanlarda oral yoldan alınan MMA ve DMA 'in, en fazla idrar yoluyla elimine olduğu düşünülmektedir. Oral yoldan verilen 500 µg MMA'in %78'inin ve 500 µg DMA'in ise %75'inin 4 gün içinde idrarla atıldığı gözlenmiştir (WHO, 2001).

2.3. Arsenik Maruziyetinin Biyogöstergeleri

Kimyasal maruziyetini belirlemede biyolojik materyalin doğru seçilmesi, o kimyasala ait ADME sürecinin çok iyi bilinmesinden geçer. Özellikle büyük popülasyon

çalışmalarında en az invaziv ve en kolay alınabilen biyolojik materyali seçmek önemlidir (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012). Maruziyetin değerlendirilmesinde uygun biyogösterge seçimi, sonuçların doğru yorumlanması bakımından en az biyolojik örnek seçimi kadar önemlidir.

Epidemiyolojik çalışmalarda, As maruziyetini belirlemede ve maruziyet düzeyini ölçmede en yaygın kullanılan *maruziyet biyogöstergeleri*; saç ve tırnakta total As ölçümü, kanda total As ölçümü, idrarda total As ve As metabolitlerinin ölçümüdür (Çizelge 2.3; WHO, 2001). Ayrıca lenfosit, mesane epiteli ve oral mukoza hücrelerindeki kromozomal değişikliklerin değerlendirilmesi de *etki biyogöstergesi* olarak değerlidir (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012). Ancak epidemiyolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılan saç, tırnak, kan ve idrar gibi biyolojik örneklerin herbirinin ayrı ayrı yetersiz tarafları bulunmaktadır (Bhowmick ve diğerleri, 2013).

Kan örneklerinin alınması, damardan kan alma işlemi sırasında katılımcıları hem huzursuz eden hem de acı veren bir yöntemdir. Diğer kısıtlamaları örneklerin saklanması aşamasındadır. İlaveten, kan yoluyla bulaşan hastalıklarla ilgili bilinç düzeyi yüksek olan katılımcılar, kan örneği verme konusunda isteksiz davranabilmektedir (Bhowmick ve diğerleri, 2013).

Tırnak ve saç örneklerinin non-invaziv yöntemlerle alınabilmesi bir avantajken, diğer taraftan dış kaynaklı As'in kontaminasyon riski bir dezavantaj oluşturmaktadır. Saç ve tırnağa adsorbe olmuş dış ve iç kaynaklı arseniğin ayırt edilememesi, hatalı sonuçlara neden olabilmektedir. Arsenik tayini için örneklere yıkılama işleminin yapılması ve bu numunenin ölçülmesi gerekmektedir. Ancak bu işlem esnasında türlerin değişmesi söz konusu olmaktadır. Dahası, yüksek konsantrasyonlarda As maruziyetinin ölçüldüğü popülasyon çalışmalarında, saç ve tırnak örneklerinin uygunluğu tartışmalıdır (Bhowmick ve diğerleri, 2013). Çünkü, Schmitt ve diğerlerinin (2005) yaptığı bir çalışmada, içme suyu As düzeylerinde 50 kat artış gözlenirken, saç ve tırnak örneklerinde sadece 20 kat artış tespit edilmiştir. Bu sonuçlar saç ve tırnak örneklerinin arsenikle doygunluk sınırı olduğunu düşündürmektedir.

Çizelge 2.3. Epidemiyolojik çalışmalarda kullanılan biyogöstergeler (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012)

Yöntem	Avantajlar	Sınırlamalar	Biyogösterge Türü
Kan total As ve/veya As türlerinin ölçümü	Erken biyolojik etkilerin belirlenebilmesi	- İnvaziv yöntem - Numune hazırlama zor	Maruziyet
Kromozomal değişikliklerin belirlenmesi (MÇ, KKD, KA)	MÇ ve KA ile etkinin tahmin edilebilmesi	- İnvaziv yöntem - Matriks hazırlama zor -Maliyet	Maruziyet/Etki
İdrar total As ve/veya As türlerinin (iAs, MMA, DMA) ölçümü	- Non-invaziv - Yüksek güvenirlilik	- Girişim yapabilecek parametrelerin (yaş, cinsiyet, vs...) dikkate alınması - Numunelerin aynı koşulda olması	Maruziyet Metabolizma Etki (As türleri)
İdrar tiyoarsenik türlerinin ölçümü	Non-invaziv	- Sınırlı veri - Yeni analitik teknikler ve biyogöstergelerin kullanılması - Girişim yapabilecek parametrelerin dikkate alınması (yaş, cinsiyet, vs...)	Maruziyet Metabolizma Etki (As türleri)
İdrar Porfirinlerin ölçümü	Non-invaziv	-Az sayıda analitik teknik -Geçerliliği kesin değil -Maliyet	Erken Etki
Epitel hücrelerde mikroçekirdek sıklığının belirlenmesi	-Yüksek duyarlılık - Non-invaziv - Erken etkilerin öngörülebilmesi	-	Maruziyet/Etki
Saç total As ve/veya As türlerinin (iAs,MMA, DMA) ölçümü	- Non-invaziv - Örneklerin kolay hazırlanması, saklanması ve taşınabilirliği	Dış kaynaklı kontaminasyon riski	Maruziyet
Tırnak total As ve/veya As türlerinin (iAs,MMA, DMA) ölçümü	- Non-invaziv - Örneklerin kolay hazırlanması, saklanması ve taşınabilirliği - Saç örneklerinin yerine tercih edilebilmesi - Yüksek güvenirlilik	Dış kaynaklı kontaminasyon riski	Maruziyet

Son yıllarda yapılan sınırlı sayıda çalışmada tükürük örneklerindeki As düzeyi kullanılmıştır. Tükürük, kan ve idrarla kıyaslandığında daha basit bir içeriğe sahiptir. Saklama probleminin olmaması, non-invaziv olması, kolay örnek alınabilmesi nedeniyle özellikle çocukları da kapsayan büyük popülasyon çalışmalarında kullanışlı bir biyogösterge olarak kullanılabilmektedir. Ancak düşük konsantrasyonda As maruziyetinde, epidemiyolojik çalışmalarda biyogösterge olarak tükürük kullanımının uygun olmadığına dair çalışmalar mevcuttur. Diğer taraftan oral yoldan alınan günlük As konsantrasyonunun (µg/gün) logaritması ile tükürük As konsantrasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Yanısıra, idrar ve tükürükteki As konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon elde edilmiştir. Ayrıca erkek katılımcılarda, sigara içenlerde ve deri lezyonu vakalarında, tükürük As seviyeleri anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. As gibi metal iyonları, plazmadan aktif transportla tükürük sıvısına taşınır. Dolayısıyla tükürükteki As konsantrasyonunun hem As'in metabolik işleyişi konusunda hem de internal doz hakkında fikir verebileceği düşünülmektedir (Bhowmick ve diğerleri, 2013).

2.3.1. Maruziyet biyogöstergeleri

Saç ve tırnakta arsenik

Saç ve tırnak As konsantrasyonu, kümülatif As maruziyetine dair iyi bir biyogöstergedir. Çünkü As ve türleri, sülfidril gruplarına yüksek afinitesi nedeniyle saç, tırnak ve deri gibi keratin proteinince zengin dokularda birikme eğilimindedir. Dolayısıyla saç ve tırnak As konsantrasyonları, geçmişe yönelik As maruziyetine dair fikir verebilmektedir (WHO, 2001). Geçmiş yıllarda tırnak ve saç As konsantrasyonları, akut As zehirlenmesi vakalarında, ölümden sonraki 10-14 güne kadar saç ve tırnak diplerinde tespit edilebildiği için adli araştırmalarda kullanılmıştır (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012).

Pek çok çalışmada, içme suyu As konsatrasyonuyla, saç As konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Ancak arseniğin iç (besinler veya içme suyu) ya da dış kaynakli (toz, şampuan, kozmetik prosedürler ve yıkamak için kullanılan su) olduğunu belirlemek en büyük problemdir. Dahası bireyin genel sağlık durumu ve medikal tedavi, saçtaki As oranını ve dağılımını etkileyebilmektedir. Dolayısıyla dış kaynaklı kontaminasyon

nedeniyle, saçtaki As konsantrasyonu ile dokulardaki As konsantrasyonu (internal doz) arasında ilişki kurulması zordur. Bu kritik nokta, saç As düzeylerinin, internal dozun indikatörü olarak kullanılabilirliğini azaltmakta ve benzer saç As konsantrasyonuna sahip popülasyonların kıyaslanabilirliğini güçleştirmektedir. Ayrıca farklı As türlerinin saça akümülasyonu, dağılımı, arsenik maruziyetine dair diğer parametrelerle korelasyonu ve saç foliküllerinin metabolizmasının etkileri hakkındaki bilgiler sınırlıdır (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012).

Saçın yüksek konsantrasyonlarda As içeren su ile yıkanması arseniğin saça adsorbe olmasına neden olur ve bu dış kaynaklı kontaminasyonun giderilmesi için yapılan 'ön yıkama' işlemleri ile ortadan kaldırılamayabilir. Saç örneklerinin daha az kontamine olan boynun ense veya art kafa kısmından ve saç derisine yakın bölgelerden alınması dış kaynaklı kontaminasyon riskini minimize edebilmektedir (WHO, 2001). Bunun yanında, son yıllarda saç As türlemesi gibi yeni bir olasılık ortaya çıkmıştır. Ancak analitik zorluklar bu yöntemin epidemiyolojik çalışmalarda uygulanabilirliğini kısıtlamaktadır. Saç ve el tırnağı yerine ayak tırnağı As seviyeleri tercih edilebilmektedir. Çünkü hava ve su kaynaklı kontaminasyon riski daha azdır (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012).

Tırnak As konsantrasyonu ile saç As konsantrasyonu arasındaki korelasyon pek çok çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca As maruziyeti ile mesane kanseri arasındaki ilişkinin incelendiği çalışmalarda, içme suyu, hava ve besinlerdeki As konsantrasyonu ile tırnak As konsantrasyonu arasındaki güçlü ilişki gösterilmiştir. Tırnak As konsantrasyonu, son 2-12 aylık dönemdeki As maruziyetinin ortalama seviyesini göstermektedir (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012).

İn-vitro çalışmalar, saçın, As(III)'in %9-13 ve As(V)'ın %12-16'sını, tırnağın ise As(III)'in %1-2 ve As(V)'ın %1-1,5'unu adsorbladığını göstermiştir. Bu nedenle, tırnaktaki dış kaynaklı kontaminasyon ihmal edilebilmektedir (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012).

As metabolizması üzerinde etnisitenin rolünün araştırıldığı çalışmada, aynı şehirde yaşayan, yüksek iAs maruziyeti olan 3 ayrı etnik gruptan (Asyalı, Somali-siyahi Afrikalı, Kafkasyalı) bireylerin saç, tırnak ve idrar As seviyeleri arasındaki fark incelenmiştir.

Somali-siyahi Afrikalı topluluğun tırnak ve idrar As seviyelerinin anlamlı derecede farklı olduğu bulunmuştur. Ancak bu farklılıkları açıklamak için, etnisitenin As metabolizması üzerindeki etkisinin araştırıldığı daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Ayrıca, düşük çinko (Zn) ve selenyum (Se) seviyeleri, As toksisitesini şiddetlendirebilmektedir (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012).

Kanda arsenik

Son günlere ait As maruziyetinin belirlenmesinde kan, en uygun biyogöstergedir. İnsanlarda kan As seviyesi 0,5-2 µg/l aralığında değişmektedir. İçme suyu As düzeyleri ile kan As düzeyi arasında makul bir ilişki gözlenmiştir (WHO, 2000). Yapılan çalışmalarda, içme suyu As kontaminasyonu 5-410 µg/l arasındayken, kan arsenik kosantrasyonunun 2-41 µg/l arasında değiştiği gözlenmiştir (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012).

As, kandan süratle temizlenir. Düşük doz maruziyetlerde kan As seviyelerinin, içme suyuyla alınan iAs veya besinlerle alınan organik As olup olmadığını ayırt etmek zordur (WHO, 2001). Eğer son günlerde deniz ürünleri tüketilmişse, kan total As düzeylerine girişim yapabilir. Bu problem çeşitli As metabolitlerinin ölçülmesiyle giderilebilir (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012).

Sonuç olarak, kan çok iyi bir maruziyet biyogöstergesi değildir. Ancak hastalık ortaya çıkmadan erken biyolojik etkilerin belirlenmesi açısından yararlı olabilir (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012).

İdrarda arsenik

İdrar As konsantrasyonu, epidemiyolojik çalışmalarda en fazla kullanılan biyogöstergedir. İdrar total As konsantrasyonu, son günlerdeki (3-5 gün) As maruziyetinin göstergesi olarak kullanılır. Epidemiyolojik çalışmalarda, maruziyet biyogöstergesi olarak genellikle total idrar As konsantrasyonu kullanılmaktadır (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012).

Kontrollü deneylerde, deniz ürünleri tüketiminin idrar arsenik düzeyini arttırdığı gösterilmiştir. Bu gibi durumlarda, idrar total As konsantrasyonunun kullanılması, iAs maruziyetinin olduğundan fazla ölçülmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla dikkatli bir beslenme öyküsü alımı ve idrar örneği alınmadan önceki son 2-3 gün içerisinde deniz ürünlerinin tüketiminin yasaklanması önemlidir (WHO, 2001).

Sonraki çalışmalarda As türleri (MMA ve DMA) de maruziyet biyogöstergesi olarak kulanılmaya başlanmıştır. Bu tercihin temel sebebi, bu türlerin en iyi maruziyet biyogöstergesi olmasıdır. İdrar As metabolitlerinin ölçümü, As metabolizma kapasitesinin tahmin edilmesi ve toksisite riskinin belirlenmesi açısından da ayrıca önemlidir (Chen ve diğerleri, 2005). Son yıllarda gelişen teknikler, oksidasyon basamağına göre As türlemesine olanak sağlamaktadır (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012).

İndirgenmiş As türleri [MMA(III) ve DMA(III)] düşük sıcaklıklarda bile (<0°C) süratle okside olabilmektedir. İdrar örneklerinin erken analizi MMA(III) ve DMA (III)'in oksidasyon riskini minimize etmektedir (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012).

2.3.2. Etki biyogöstergeleri

Kan ve idrar porfirinleri

As, vücutta yaklaşık 200 enzimi etkilemektedir. Bunlardan biri de heme metabolizmasında rol alan enzimlerdir. Kan ve idrar heme metabolizma ürünlerinin ölçülmesi, kronik As zehirlenmesinin klinik belirtileri ortaya çıkmadan tespit edilmesini sağlayabilir. Arseniğin heme üzerinde yarattığı değişikliklerin mekanizması henüz net değildir. Ancak en önemli etkileri, heme biyosentezi ve degredasyonunda rol alan bir grup enzimin fonksiyonlarını bozduğu ve idrar porfirin profilini değiştirdiği yönündedir. İçme suyu As maruziyeti ile porfirinler arasındaki ilişkinin incelendiği çalışmalarda, idrar üroporfirin düzeylerinin anlamlı oranda arttığı ve bu artışın büyük oranda koproporfirinden kaynaklandığı belirlenmiştir.

Tüm çalışmalar göz önüne alındığında, As maruziyeti ile idrar üroporfirini arasında korelasyon vardır ve bu ilişki arseniğin heme metabolizması üzerindeki erken

biyolojik etkilerini yansıtmaktadır. Ancak idrar üroporfirinlerinin epidemiyolojik çalışmalarda biyogösterge olarak kullanılabilmesi için daha fazla araştırmaya gereksinim vardır (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012).

Genotoksisite biyogöstergeleri

Genotoksisite biyogöstergeleri, karsinojen maruziyetinin erken biyolojik etkisini ortaya çıkarmak amacıyla kullanılabilmektedir. İçme suyuyla As maruziyeti bulunan popülasyonlarda MÇ, KA, KKD ve anöploid oluşumların yüksek insidansta olduğu, çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Basu, Ghosh ve Das, 2004).

Arseniğin indüklediği karsinojenik etkilerin mekanizması henüz tam olarak bilinmemesine rağmen, nokta mutasyonları indüklemediği, klastojenik etkisinden dolayı KA ve MÇ formasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla mikroçekirdek tekniği ile değerlendirme için uygun bir karsinojendir (Basu ve diğerleri, 2004). Mikroçekirdek oluşumu, genomik instabilite ve kromozomal hasarın en duyarlı biyogöstergelerinden biridir (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012).

Lenfosit hücrelerinde sitokinezisin bloke edildiği mikroçekirdek tekniği, kromozomal hasarın belirlenmesinde duyarlı ve güvenilir bir yöntemdir (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012). Yanısıra, eksfoliye yanak ve mesane epitel hücreleri, arsenikle doğrudan temas halinde olduklarından, arsenik genotoksisitesini belirlemek için uygundur (Basu ve diğerleri, 2004). Ayrıca yine bu hücreler, diğer tüm karsinojenik ajanlarla da doğrudan temas halinde olduklarından yanlış pozitif sonuçlar da görülebilir. Mesabe epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığı, mesane epitel dokusundaki genotoksik hasarı yansıtır ve idrarda eksfoliye hücrelerin görülmesinden 1-3 hafta önce oluşmaya başlar (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012).

2.3.3. Arsenik maruziyetinin belirlenmesinde OMIC teknolojilerinin kullanımı

Arseniğe duyarlı popülasyonların tespit edilmesi, risk değerlendirmesi açısından oldukça önemlidir. Ancak arseniğin moleküler düzeydeki toksik etki mekanizmaları halen belirsizliğini sürdürmektedir (Moore, Karami, Steinmaus ve Cantor, 2013).

OMIC teknolojileri, As maruziyeti, metabolizması ve hastalıkların araştırıldığı epidemiyolojik çalışmalarda yeni biyogöstergelerin kulanılması için iyi bir araçtır. OMIC merkezli yöntemlerin, duyarlılığının ve ayırma gücünün iyileştirilmesi, maaliyetinin azaltılması yanısıra çalışma tasarımı ve veri analizinde yeni yaklaşımların geliştirilmesiyle epidemiyolojik çalışmalarda kullanımı uygun hale gelmiştir. OMIC merkezli teknolojiler, arsenikle ilişkili duyarlılık biyogöstergelerinin araştırılması, maruziyet ve erken etki biyogöstergelerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Moore ve diğerleri, 2013).

Arsenikle ilişkili toksisite ve kanser riskini belirlemeye yönelik ilk genetik duyarlılık çalışmalarında, doğrudan arseniğin metabolizması ve atılımındaki genetik farklılıklara odaklanılmıştır. Bu çalışmalarda ilk olarak, glutatyon konjugasyonu, metilasyon enzimleri ve folat, B_6, B_{12} gibi kofaktörler üzerine yoğunlaşılmıştır. Metillenmiş metabolitlerin idrardaki düzeyleri ve idrar total As içerisindeki yüzdeleri (oranları), bireyler arasında farklılık göstermektedir. Epidemiyolojik çalışmalara göre metilasyon kapasitesindeki farklılıklar, kanser riskini etkileyebilmektedir. Şimdiye dek As metabolizması ve As maruziyetine bağlı fenotip ile ilgili 2 genom analiz çalışması (Genome- Wide Association Study) yapılmıştır. Bu çalışmalarda As maruziyeti olan Bangladeşli 1313 bireyin DNA örneklerindeki 300000 tek nükleotid polimorfizmi (TNP) incelenmiş ve As metiltransferaz *(AS3MT)* geninin yanındaki bölgede yer alan tek nükleotid polimorfizmlerinin, idrar MMA ve DMA yüzdeleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. 5 tane genetik varyans, metilasyon kapasitesi ile bağımsız ilişki göstermiştir. Arseniğin indüklediği premalign deri lezyonlu 1085 birey ve 1794 kontrol arasında yapılan çalışma sonucunda, 5 varyanttan birinin deri kanseri riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çalışmalar sonunda idrarla atılan MMA ve DMA oranlarının, *AS3MT* gen lokusundaki spesifik varyanslara bağlı olduğu sonucuna varılmıştır (Moore ve diğerleri, 2013).

Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon, mesane tümör heterojenitesi çalışması için uygulanan ilk OMIC teknolojisidir. As maruziyeti olan ve olmayan bireylerin tümör dokularındaki genetik farklılıklar karşılaştırılmıştır. İlk yayınlanan çalışmada, Arjantin ve Şili'de yaşayan ve geniş bir konsantrasyon aralığında As maruziyeti olan mesane kanseri bireylerin tümör dokusu incelenmiştir (Moore ve diğerleri, 2002). Kromozomal kopya sayısındaki değişikliklerin içme suyu As maruziyeti ile ilişkisi değerlendirilmiştir. İçme suyu As düzeyi en yüksek konsantrasyonda olan hastaların tümör dokusundaki kromozomal değişikliklerin

sayısı, diğerlerine kıyasla çok daha fazla bulunmuştur. Bu sonuç, yüksek maruziyetlerde daha fazla kromozomal instabiliteye işaret etmektedir. 17. kromozomun (p) bir kısmının ya da tamamındaki delesyonun As maruziyeti ile güçlü ilişki gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgular, As maruziyeti olan hastalardaki mesane tümörünün, maruziyeti olmayanlara kıyasla daha agresif olabilme ihtimalini yükseltmektedir (Moore ve diğerleri, 2013).

Transkriptomik teknikleriyle, mRNA transkripsiyon sayısının ölçülmesi ile dokulardaki gen ekspresyon düzeyleri belirlenebilmektedir. Arseniğe maruz ve maruz olmayan bireylerin RNA ekspresyonları karşılaştırılabilmektedir. Transkriptomik teknikleriyle ilk çalışmalar, akciğer hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Çünkü akciğer dokusu hem oral hem de inhalasyon yoluyla maruziyetlerde, arseniğe bağlı hastalıkların geliştiği major organdır. Arsenikle birlikte diğer birkaç toksik metal maruziyetine bağlı olarak insan bronşiyal BEAS-2B hücrelerinde gen ekspresyonundaki farklılıkların hem genomik hem de proteomik yöntemlerle belirlendiği çalışmada, arseniğe maruz hücrelerin, kadmiyum, nikel ve krom maruziyetine kıyasla, farklı bir grup geni eksprese ettiği gözlenmiştir. Dahası bu özel gen kümesi, hücrelerin hem düşük doz (5 µM) hem de yüksek doz As maruziyetlerinde (50 µM-sitotoksik) eksprese olmuştur (Moore ve diğerleri, 2013).

As maruziyetine bağlı olarak inflamasyonda görev alan sitokin ve büyüme faktörü genlerinin transkripsiyonundaki değişiklikler ve bu proteinlerin aşırı eksprese edilmesi, arseniğin endemik olduğu bölgelerdeki artan ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalık riskini açıklayabilmektedir. As maruziyeti ilişkili deri lezyonları taşıyan bireylerde yapılan bir çalışmada, Se takviyesinden önce ve sonra gen ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler araştırılmıştır. As maruziyeti olan bireylerde down-regüle olan çeşitli genlerin, Se varlığında up-regüle olduğu gözlenmiştir. Bu sonuca göre, Se takviyesi, As maruziyetine bağlı deri lezyonlu bireylerde kronik As maruziyetinin indüklediği gen ekspresyonlarını tersine çevirebilmektedir (Moore ve diğerleri, 2013).

Deney hayvanı çalışmalarında, arseniğin epigenetik mekanizmalarla da genomda değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Epigenetik mekanizmalar, DNA sekansında değişiklik olmadan DNA ve gen ekspresyonlarını değiştirir. Tümör baskılayıcı genleri ve DNA onarım genlerini susturarak, DNA dizisi boyunca sitozin metilasyonunu

değiştirerek, histon ve kromatin modifikasyonlarıyla, histon olmayan kromatine bağlanan proteinlerde ve protein kodlamayan RNA'larda değişiklikler meydana getirerek metallerin karsinojenik potansiyellerine katkıda bulunur. Sıçan karaciğer epitel hücre dizisi kullanılarak yapılan bir çalışmada, kronik düşük doz As maruziyetine bağlı malign oluşumların, SAM düzeyleri, genomik DNA metilasyonu ve DNA metiltransferaz aktivitesinin baskılanması ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Hindistanda yürütülen diğer bir çalışmada, kan DNA örneklerindeki iki önemli tümör baskılayıcı genin (*p53* ve *p16)* promoter bölgesi değerlendirilmiş, her bir promoter bölgesinin, yüksek konsantrasyonlarda As maruziyetinde düşük dozlara kıyasla çok daha fazla metillenmiş olduğu gözlenmiştir.

Diğer bir hipotez ise, As maruziyeti ile üriner bölge kanserleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi için, idrar proteom analizidir. Nevada'da yürütülen kesitsel bir çalışmada, yüksek konsantrasyonlarda (>100 µg/l) ve düşük-orta düzeydeki konsantrasyonlarda (<100 µg/l) As maruziyeti olan bireylerin idrar örnekleri analiz edilmiş ve 2 polipeptid düzeyinin, yüksek konsantrasyonlarda As'e maruz grupta anlamlı oranda azaldığı gözlenmiştir. Bu bulguların tekrarlandığı başka bir çalışmada, yüksek konsantrasyonlarda arseniğe maruz erkeklerin idrar örneklerinde 4,37 ve 4,76 KDa polipeptid seviyelerindeki azalma doğrulanmıştır. Her iki çalışmada da bir protein pikindeki farklılık belirlenmiş ve human β defensin-1 peptidi (HBD1) olduğu görülmüştür. Bu bulgularla birlikte, HBD1 mRNA düzeylerindeki azalma in-vitro gen analizi ile de desteklenmiştir. Bu sonuçlar idrar HBD1 peptid düzeylerindeki azalmanın, maruziyetle doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir (Moore ve diğerleri, 2013).

Arsenik maruziyetine bağlı toksik etkiler hem oldukça karışık hem de çok yönlüdür. Çünkü, As doğrudan DNA ile etkileşmemektedir. As maruziyeti olan popülasyonlardaki OMIC teknolojileri uygulamaları *maruziyet, etki ve duyarlılık biyogöstergeleri* yoluyla arsenikle ilişkili sağlık problemlerinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunabilir (Moore ve diğerleri, 2013).

2.4. Arseniğin Deney Hayvanları ve in-vitro Sistem Üzerindeki Toksik Etkileri

2.4.1. İnorganik arsenik toksisitesi

Akut toksisite

iAs maruziyeti ile ilgili yapılan çalışmalarda, arseniğin neden olduğu advers etkilerin şiddetinin oksidasyon basamağına bağlı olduğu gösterilmiştir (Styblo ve diğerleri, 2000). Genel olarak akut toksisite açısından, trivalent arsenik; As(III) türleri, pentavalent arsenik; As(V) türlerinden daha potenttir (Ratnaike, 2003).

Yapılan çalışmalara göre fare ve sıçanlarda, iAs bileşiklerinin akut oral LD_{50} değerleri, 20 mg/kg (As_2O_3; arseniktrioksit) ve 1050 mg/kg (kurşunarsenat; insektisit) arasında değişmektedir. Pentavalent As türlerinin (kalsiyum arsenat ve kurşun arsenat), sıçanlardaki akut dermal LD_{50} değerleri >2400 mg/kg'dır. Akut letalite açısından, sodyum arsenit, sodyum arsenata göre sıçanlarda 3-4 kat, farelerde ise 2-3 kat daha potent bulunmuştur (WHO, 2001).

Kronik toksisite

10 ve 18 ay boyunca 50 mg/l konsantrasyonda As(III) içeren içme suyu verilen erkek ve dişi Yeni Zelanda tavşanlarında, kardiyak output ve stroke hacminde anlamlı oranda azalma tespit edilmiştir. Diğer taraftan, 18 ay boyunca aynı konsantrasyonda As(V) içeren içme suyu verilen sıçanlarda, kardiyak fonksiyon üzerinde herhangi bir etki gözlenmemiştir (WHO, 2011).

Deri ve göz sensitizasyonu / irritasyonu

Sodyum arsenit ve sodyum arsenatın, Guinea Pig Maksimizasyon testi ile alerjen olmadıkları gösterilmiştir (WHO, 2001).

Gelişimsel toksisite, embriyotoksisite ve teratojenite

iAs, fare ve hamster embriyo ve fetuslarına toksik etkilidir. As(III), As(V)'a göre bu etki açısından göre 3-10 kat daha potenttir. Hamster embriyo ve fetusu, bu etki açısından daha duyarlıdır. Arseniğin indüklediği letalite, doza ve gebeliğin gününe bağlıdır. Toksisite, ölüm ağırlığında azalma, embriyonun protein içeriğinde azalma, baş-anüs uzunluğunda kısalma, somitlerin sayısında azalma, gelişim geriliği ve ölümle karakterizedir. As(V)'ın gelişimsel toksisitesinin incelendiği bir araştırma, Yeni Zelanda beyaz tavşanlar ve CD-1 farelerde gerçekleştirilmiştir. Tavşanlara gebeliğin 6. ve 18. günleri arasında 0; 0,19; 0,75 ve 3 mg/kg dozlarda, farelere ise gebeliğin 6. ve 15. günleri arasında 0; 7,5; 24 ve 48 mg/kg dozlarda As(V) uygulanmıştır. Advers etkinin gözlenmediği en yüksek dozun belirlendiği bu çalışmada tavşanlardaki NOAEL=0,75 mg/kg, farelerdeki NOAEL=7,5 mg/kg bulunmuştur. Bu sonuç, tavşanların, As(V)'ın etkilerine daha duyarlı olduğu anlamına gelmektedir (WHO, 2001).

Hayvanlarda iAs’in teratojenik etkilerini araştıran pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların pek çoğunda intravenöz ve intraperitonel yollar kullanılmıştır Ancak, fetusun As maruziyeti açısından uygun yollar değildir. Genel olarak arseniğin teratojenik etkisi, maternal toksisite gösterdiği seviyelerde görülmektedir. Oral, parenteral ve inhalasyon yoluyla uygulanan iAs, fare ve hamsterda teratojenik etki meydana getirmektedir. Parenteral uygulama, oral uygulamadan daha etkilidir (WHO, 2001).

Genotoksisite

As, bakteri ve memeli hücrelerinde nokta mutasyonları indüklememektedir. Ancak insan hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre kültürlerinde, kromozom kırıklarını, kromozomal aberasyonları ve kardeş kromatidler arasında parça değişimini doza bağımlı-lineer olarak indüklediği gözlenmiştir. Bu etkinin büyüklüğü açısından, As(III), As(V)’e göre daha potenttir (WHO, 2011).

Nokta mutasyonlara sebep olmamasına rağmen, As, geniş delesyon mutasyonları (çok lokuslu) indüklemektedir. Bu tip genotoksik etkinin gözlenebilmesi oldukça zordur. Çünkü arseniğin indüklediği bu etkiyle birlikte hücre canlılığı devam edemez. İnsan-

hamster hibrit hücrelerine (hamster kromozomunun tamamı + insan 11. kromozomu) sodyum arsenit uygulanan bir çalışmada, insan kromozom parçasındaki (11. kromozom) delesyon mutasyonların, doz bağımlı ve zaman bağımlı artış gösterdiği gözlenmiştir (WHO, 2001).

Şimdiye dek yapılan çalışmalara göre, arseniğin bakteriyel ve standart memeli hücrelerinde yapılan testlerle, non-mutajenik olduğu görülmektedir. Ancak, iAs, UV radyasyon ve diğer pek çok mutajenik ajanın etkisini potansiyelize etmektedir (ko-mutajen) (Tokar ve diğerleri, 2010).

iAs, insan lenfosit ve fibroblast hücrelerinde kardeş kromatid değişimini, kromozomal aberasyonları ve DNA-protein çapraz bağlanmasını indüklemektedir. Memeli hücrelerinde olduğu gibi As insan hücre dizilerinde de kimyasal ve elektromanyetik radyasyonla ko-genotoksiktir (WHO, 2001).

Karsinojenite

Deney hayvanlarında iAs'in karsinojenik etkilerine dair net ve anlaşılabilir veriler yoktur. Çünkü As, geleneksel deney hayvanı çalışmalarında karsinojenik bulunmamaktadır (WHO, 2011). Pek çok çalışma, As'in diğer karsinojenlerle birlikte onkojenezisi arttırdığını göstermektedir (arsenik ile ikinci karsinojenik ajanın uygulanması arasında önemli derecede zamansal boşluk olsa bile) (Tokar ve diğerleri, 2010). Arseniğin başlatıcı etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, Wistar sıçanlara dietilnitrözamin ile birlikte enjekte edilmiş ve böbrek tümörlerinin anlamlı artışı rapor edilmiştir (WHO, 2011).

As'in deney hayvanlarındaki ve insanlardaki biyokinetiği oldukça farklıdır. Bazı fare karsinojenezis çalışmalarında, insanlarla benzer kan As konsantrasyonuna ulaşabilmek için farelere uygulanan arsenik dozu, insan maruziyet dozunun 100-200 kat fazlasıdır. Dolayısıyla türler arasında kıyaslama yapabilmek için, bazı kritik faktörler (toksikokinetik farklılıklardan kaynaklanan doku dozimetresi) göz önüne alınmalıdır (Tokar ve diğerleri, 2010).

Son yıllarda, doğal olarak kansere duyarlı veya genetik olarak duyarlılaştırılmış farelerde karsinojenik potansiyeli gösterilmiştir. Oral yoldan 18 ay boyunca sodyum arsenat uygulanan A/J farelerde (pulmoner karsinojenlere duyarlı tür), As maruziyetine bağlı olarak akciğer tümörlerinin sayısındaki ve büyüklüğündeki artış rapor edilmiştir (Tokar ve diğerleri, 2010).

2.4.2. Organik arsenik toksisitesi

Akut toksisite

Çalışmalara göre organik As bileşiklerinin kemirgenlerdeki akut oral LD_{50} değerleri, 580 mg/kg (tetrametilarsonyumklorid) ile ›10 000 mg/kg (arsenobetain ve TMAO) aralığında değişmektedir (WHO, 2001).

Organik As bileşiklerinin farelerdeki temel toksisite belirtileri, motilite ve solunum depresyonu, irritabilite, ataksi ve konvülsiyondur. Ölümler solunum depresyonu nedeniyle oluşmaktadır (WHO, 2001).

Kronik toksisite

Roxarson® (4-hidroksi-3-nitrofenilarsonik asit), kümes hayvanlarında, büyümeyi başlatmak ve bazı hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır. Sıçan ve farelere 13 hafta boyunca diyetle birlikte Roxarson® (50-800 mg/kg) uygulanmış ve vücut ağırlıklarında anlamlı azalma tespit edilmiştir. Yine diğer bir çalışmada, farelere oral yoldan, 10 hafta boyunca MMA uygulanmış ve özellikle yüksek doz alan grubun vücut ağırlığında düşüş tespit edilmiştir (WHO, 2001).

Deri ve göz irritasyonu/sensitizasyonu

Organik As bileşiklerinin deri ve göz irritasyonu/sensitizasyonu ile ilgili yeterli bilgi yoktur. Ancak MMA, erkek tavşanlarda dermal irritasyon testi ile test edilmiş ve orta derecede irritan olarak sınıflandırılmıştır (WHO, 2001).

Gelişimsel toksisite, embriyotoksisite ve teratojenite

Hamile hamsterlara gebeliğin 8. gününde intravenöz yoldan MMA (disodyum tuzu, 20-100 mg/kg) ve DMA (sodyum tuzu, 20-100 mg/kg) uygulanmış ve düşük oranda da olsa (≤%6) malformasyonu indüklediği gözlenmiştir. Toksik etkiler; ekstremite bozukluğu, renal ajenez (sadece DMA uygulanan grupta), ensefalosel ile karakterizedir. Annelerde ise herhangi bir toksik etki gözlenmemiştir (WHO, 2001).

Diğer bir çalışmada, fare ve sıçanlara gebeliğin 7. ve 16. günleri arasında oral yoldan DMA uygulanmış ve yeni doğan ağırlığında doza bağımlı azalma gözlenmiştir. Farelerde DMA'nın birincil teratojenik etkisinin, yarık damak olduğu tespit edilmiştir. Ölüm oranında da doza bağımlı artış gözlenmiştir (WHO, 2001).

Genotoksisite

DMA, *E. Coli* suşunda, en az 3 saat inkübasyondan sonra mutajenik bulunmuştur. DMA içeren hücre süspansiyonunda dimetilarsin ve trimetilarsin tespit edilmiştir. Bu iki organik arsenik bileşiği, bakteri ile inkübe dildiğinde, sadece dimetilarsin mutajenik bulunmuş ve dimetilarsin ile oksijenin reaksiyonu sonucu oluşan reaktif oksijen türlerinin mutajenik etkiyi yarattığı düşünülmüştür (WHO, 2001).

Organik As bileşikleri, fare lenfoma hücrelerinde, sitotoksik ve klastojenik bulunmuştur. MMA, bu etki açısından DMA'ya göre daha fazla, iAs bileşiklerine göre daha az potenttir. AsC ve AsB, hamster akciğer hücrelerinde genotoksik bulunmamıştır (WHO, 2001).

Karsinojenite

Geçtiğimiz yıllarda yapılan bir çalışmada, erkek sıçanlara içme suyuyla artan dozlarda DMA (0; 12,5; 50 ve 200 mg/l) uygulanmış ve kontrol grubunda mesane tümörü oluşumu gözlenmemiştir. Maruz gruptaki mesane tümörü insidansı ise doz bağımlı bulunmuştur (sırasıyla tümör insidansı; 0/33, 8/31, 12/31). Ancak DMA'nın sıçanlardaki kinetiği, diğer deney hayvanlarından ve insanlardan farklıdır (WHO, 2001).

Oral yoldan DMA(V) uygulanan Ogg -/- farelerde, Ogg +/+ farelere göre akciğer kanseri artışı bildirilmiştir. Bu bulgular, kansere duyarlı ya da genetik olarak duyarlı hale getirilmiş deney hayvanları kullanılmış olsa bile, As'in insanlardaki karsinojenik potansiyelinin anlaşılması açısından oldukça önemlidir. Çünkü iAs ve bileşiklerinin, insanlarda oral yoldan akciğer kanserine neden olduğu bilinmektedir ve arseniğin insanlardaki en önemli maruziyet kaynağı içme suyu, yani oral yoldur. DMA(V) içme suyunda nadiren bulunsa bile, iAs'in metabolizma ürünü olarak, dolaşımda çoğunlukla sirküle olan türdür (Tokar ve diğerleri, 2010).

Erkek sıçanların 2 yıl boyunca oral yoldan DMA(V)'e maruz bırakılması, mesane karsinomu veya mesane karsinomu+papillomuna neden olmuştur. Tümörler, mesane epitel hücre karsinomudur ve mesane epitel hücre karsinomu, arseniğe maruz insan popülasyonlarda görülen tümör tipidir. Bu çalışma, arseniğin tek başına ve hedef bölgesinde (mesane) kansere neden olduğu gösterilen ilk deney hayvanı çalışması olması açısından önemlidir (Wei ve diğerleri, 2002).

2.5. Arseniğin İnsanlar Üzerindeki Toksik Etkileri

Arseniğin akut ve uzun dönem maruziyetlerindeki toksik etkileri yıllardan beri bilinmektedir. Orta Çağ'da, As, intihar ve suikast vakalarında kullanılmış ve arseniğe kötü şöhret kazandırmıştır. Bu dönemde 'zehirlerin kralı' olarak adlandırılmıştır (Hughes, Beck, Chen, Lewis ve Thomas, 2011).

Toksisitesine rağmen- belki de bu yüzden- As, tarihte çeşitli hastalıkların tedavisinde (malarya, sifiliz, pröriyazis, dermatit, egzema, mide ve diş eti iltihapları) kullanılmıştır (Hughes ve diğerleri, 2011). 19. yy'ın başlarında arseniğin medikal amaçla kullanımı sırasında bazı deri hastalıkları olguları bildirilmiştir. 1900'lü yıllarda, içme suyu ile As maruziyetine bağlı olarak, Arjantin, Şili, Meksika ve Tayvan'da çeşitli deri kanseri vakaları bildirilmiştir (WHO, 2001). Daha sonraki yıllarda, yüksek konsantrasyonlarda arsenik içeren içme suyu tüketen popülasyonlardaki epidemiyolojik araştırmalarda, kronik arsenik maruziyetinin belirtileri olan dermal lezyonlar (hiperpigmentasyon-hipopigmentasyon),

periferal nöropati, deri kanseri, mesane ve akciğer kanserleri ve periferal vasküler hastalıkların insidansındaki artış rapor edilmiştir (WHO, 2011).

2.5.1. Akut toksisite

Arseniğin insanlardaki akut toksisite şiddeti, ağırlıklı olarak vücuttan uzaklaştırılma hızı ile ilgilidir. As bileşiklerinin insanlardaki toksik etki oluşturma potansiyeli sırasıyla; arsin> arsenit; As(III) > arsenat; As(V) > organik arsenik bileşikleri şeklindedir. Arsenik ve bileşiklerinin insanlardaki öldürücü dozu, 1,5 $\frac{mg}{kg\ x\ va}$ (diarsintrioksit) ile 500 $\frac{mg}{kg\ x\ va}$ (DMA) arasında değişmektedir (WHO, 2011).

Resim 2.1. Arsenik maruziyetine bağlı tırnakta karakteristik Mee çizgileri (Usatine, Smith, Mayeaux, Chumley ve Tysinger, 2013:184)

Akut As intoksikasyonuna bağlı ilk klinik semptomlar; karın ağrısı, kusma, diyare, kas ağrısı ve zayıflığı, yüz kızarması şeklindedir. Bu semptomların ardından, ekstremitelerde karıncalanma ve uyuşukluk, kas krampları ve kırmızı kabarcıklı kaşıntılar görülür. Bir ay içerisinde, ekstremitelerde parestezi, avuç içi ve ayak tabanlarında hiperkeratozis, tırnaklarda karakteristik Mee çizgileri (Resim 2.1), motor ve duyusal fonksiyonlarda progresif bozulma meydana gelir (WHO, 2011).

2.5.2. Kronik toksisite

Kronik As maruziyetinde görülen toksik etkiler, başta en yaygın görülen semptom olan hiper/hipopigmentasyon gibi dermal lezyonlar olmak üzere, periferal nöropati, periferal vasküler hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, deri kanseri, mesane kanseri, akciğer kanseri, karaciğer kanseri ve böbrek kanserini kapsamaktadır (WHO, 2011; Ferreccio ve diğerleri, 2013).

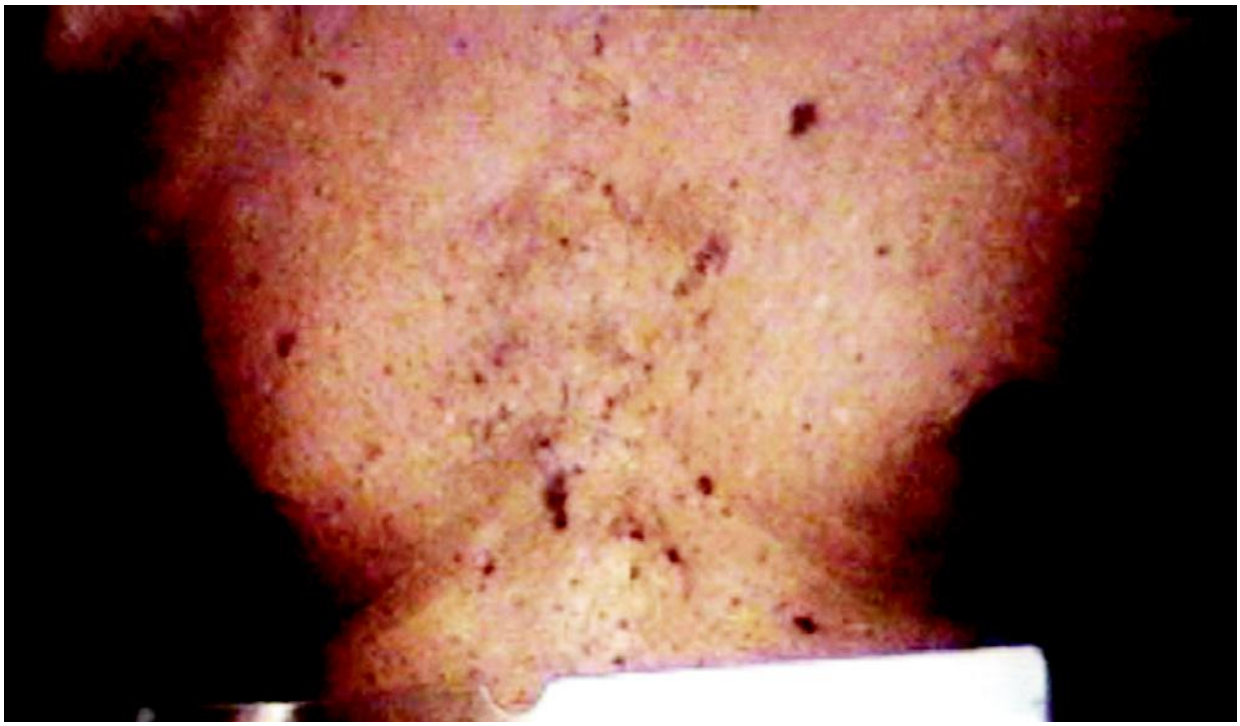
Dermal etkiler

Dermal lezyonlar kronik As maruziyetine bağlı ilk olarak oluşan ve en sık görülen semptomlardır ve yaklaşık 5 yıl gibi minimum bir maruziyet süresi sonunda bile oluşabilmektedir (WHO, 2011; Cohen ve diğerleri, 2013).

As, epidermal proteinlerdeki özellikle keratindeki, sülfidril gruplarına yüksek afinitesi nedeniyle deride birikme eğilimindedir. Ancak arseniğin keratin proteini ile etkileşiminin sonuçları bilinmemektedir. Deriye fazla miktarda As akümülasyonunun, hücre ölümüne giden toksik cevabı başlattığı düşünülmektedir (Cohen ve diğerleri, 2013).

Deri, kronik As maruziyetine en duyarlı organdır. Yağmur damlası pigmentasyonu, palmar ve plantar hiperkeratozis ve hiper/ hipopigmentasyon As toksisitesinin en önemli ayırıcı toksik etkileridir. Bu deri lezyonları arasında, palmar ve plantar keratozis, premalign lezyonlar olarak bilinmektedir ve daha sonra bazal hücreli karsinom, skuamöz hücreli karsinom ve Bowen's hastalığına dönüşmektedir (Banerjee, Bhattacharjee ve Giri, 2011).

Pigmentasyon ve keratozis, kronik As toksisitesine karakteristiktir. Gövde ve ekstremitelerde, bilateral ve simetrik, ince, çilli bir görüntü şeklindedir ve *'yağmur damlası pigmentasyonu'* olarak isimlendirilir. Yağmur damlası görüntüsü, vücut üzerinde geniş bir alana yayılmış hiperpigmente maküllerden kaynaklanmaktadır. Pigmentasyon, dilaltı veya yanak içi gibi muköz bölgelerde de meydana gelebilmektedir (Resim 2.2; Mazumder, 2008).



Resim 2.2. Ön göğüs bölgesinde bilateral yağmur damlası pigmentasyonu (Mazumder, 2008)

As ve deri kanseri arasındaki ilişki, ilk olarak tedavi amaçlı As kullanan bireylerde farkedilmiş, ancak, bundan yıllar sonra içme suyu As konsantrasyonu ile arasındaki ilişki keşfedilmiştir (Cohen ve diğerleri, 2013).

Arsenik maruziyeti ile keratoz /hiperpigmentasyon prevalansı arasındaki ilişkinin anlaşılması için yapılan ilk çalışma, Batı Bengal'de içme suyu ile arseniğe maruz bireylerde gerçekleştirilmiştir. 7683 kişinin dahil edildiği çalışmada, keratoz/ hiperpigmentasyon prevalansı ile içme suyu As düzeyi arasında ilişki gözlenmiştir (Resim 2.3 ve Resim 2.4; Mazumder, 2008).

Resim 2.3. Her iki avuç içerisinde arseniğe bağlı keratoz (Mazumder, 2008)

Bangladeş'te yapılan kesitsel bir çalışmada, içme suyu As düzeyleri 10-2010 µg/l arasında değişen bölgelerde yaşayan bireylerde, deri lezyonları prevalansı %29 olarak bulunmuştur (Mazumder ve Dasgupta, 2011).

Resim 2.4. Ayak üzerinde arseniğe bağlı deri kanseri ve nodüler keratoz (Mazumder, 2008)

Hipopigmentasyon, derinin epidermis tabakasındaki melanin pigmentinin azalmasına bağlıdır ve melanin pigmenti, özellikle UV radyasyona maruziyetin ardından oluşan serbest radikallere karşı, cildin en önemli koruyucusudur. Bu yüzden açık tenli kişiler özellikle albinolar, koyu tenli kişilere göre UV radyasyonun neden olduğu DNA hasarına çok daha duyarlıdır. iAs, derideki melanin pigmentinin azalmasına yol açarak cildi güneş ışınlarının neden olduğu DNA hasarına daha açık hale getirmektedir (Cohen ve diğerleri, 2013).

Sigara içenler, arseniğin neden olduğu dermal etkilere daha duyarlıdır. Sigara içiciliğinin As metilasyonu üzerindeki etkilerinin bu durumun sebebi olduğu düşünülmektedir (Cohen ve diğerleri, 2013).

As maruziyetine bağlı bazı dermal değişiklikler, kanser oluşmadan önce geri dönebilmektedir. Ancak bu benign oluşumların hangilerinin geri dönüşümlü olduğu, hangilerinin ise olmadığı bilinmemektedir. Arseniğe bağlı deri kanseri, uzun dönem ve yüksek konsantrasyonlarda arseniğe maruziyetin ardından oluşmaktadır. Deri kanseri insidansındaki artış, 100 µg/l'yi aşan konsantrasyonlarda oluşmaktadır. Buna rağmen son yıllarda daha düşük konsantrasyonlarda arseniğe maruz popülasyonlarda da deri lezyonları gözlenmiştir (Cohen ve diğerleri, 2013).

Kardiyovasküler etkiler

90'lı yıllardan beri, yüksek konsantrasyonlarda As'e maruziyetin iskemik kalp hastalıkları insidansında ve kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölüm oranında artışa neden olduğu öne sürülmektedir. İçme suyuyla kronik As maruziyetinde, akut zehirlenme vakalarında ve APL hastalarında tedavi amaçlı As uygulamalarında, kardiyovasküler anomaliler görülmüştür (Bianchi, Cori ve Sicari, 2013). Ancak Karaayak Hastalığı dışında (Resim 2.5), As maruziyeti ile diğer kardiyovasküler hastalıklar arasındaki ilişkinin rapor edildiği çalışmalar, nedensellik anlamında halen yeterli değildir (WHO, 2011).

Resim 2.5. Arseniğe bağlı Karaayak hastalığı (gangren ve amputasyonlar) (Ekstremitelerde gangren; *(A)* 17 yaşındaki erkek hastada sağ ayak gangreni ve sol ayak parmağı ampütasyonu: *(B)* 62 yaşındaki erkek hastada sol ayak gangreni: *(C)* 54 yaşındaki erkek hastada sağ ayak birinci ve ikinci parmağın kaybı, sol ayak başparmağı ülserasyonu: *(D)* 53 yaşındaki kadın hastada sol el 2. ve 3. parmak gangreni; Tseng, 1977)

Karaayak hastalığı, As'in indüklediği periferal vasküler hastalıklardan biridir. Şiddetli sistemik ateroskleroz ile karakterize periferal arteryel bir hastalıktır. Son evrelerinde, ekstremitelerde gangren ve spontan amputasyonlar görülür. Tayvan'da yapılan bir

çalışmada, 40421 kişide karaayak hastalığı prevalansı ‰8,9 olarak rapor edilmiştir. Ayrıca, arseniğe maruz popülasyonlarda, Raynoud's sendromu ve akrosiyanozis gibi periferal vasküler hastalıklar bildirilmiştir (Mazumder; 2008, 2011).

Karaayak hastalığı da dahil olmak üzere, kronik As maruziyetine bağlı kardiyovasküler etkiler, koroner kalp hastalıkları prevalansı ve mortalitesindeki artış, periferal arteryel hastalıklar, miyokard infarktüsü, felç, kan basıncındaki artış ve elektrokardiyogramda QT aralığında uzama diğer kardiyovasküler son noktalardır (WHO, 2011).

Hem in-vivo/in-vitro çalışmalar, hem de epidemiyolojik çalışmalar, arseniğin endotel disfonksiyonuna neden olduğuna işaret etmektedir. Terapötik müdahalelerin (C vitamini, B_9 ve B_{12} vitamini, alfa-tokoferol ve resveratrol), arseniğin neden olduğu kardiyovasküler toksisiteyi yavaşlattığı ya da engellediği öne sürülmektedir (Bianchi ve diğerleri, 2013).

As'in indüklediği kardiyovasküler hastalıkların mekanizmasının tam olarak aydınlatılması için daha fazla araştırmaya gerek duyulmaktadır. Bu konuyla ilgili, İtalya'da insan biyolojik izleme çalışması devam etmektedir. Çalışma kapsamında, doğal kaynaklardan As kontaminasyonu olan iki bölge ve endüstriyel kaynaklı olarak As düzeyleri yüksek olan iki bölge seçilmiştir. Çalışma protokolü, EKG, intima medya kalınlığının ölçümü, ekokardiyografi, kalsifikasyon skor indeksi ölçümü gibi parametreleri kapsamaktadır. Bu sonuçların arseniğin indüklediği kardiyovasküler hastalık göstergelerine yeni bir bakış açısı sağlayacağı düşünülmektedir (Bianchi ve diğerleri, 2013).

Nörolojik etkiler

Epidemiyolojik çalışmalara göre, yüksek konsantrasyonlarda iAs'e maruziyetle, periferal ve merkezi nörotoksisite arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır. Çocuklarda orta düzeyde (>50 µg/l) As maruziyetinin ardından kognitif performansta değişiklikler olduğu ile ilgili bilgiler olsa da şimdilik çok kesin değildir (WHO, 2011).

Diyabet

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2011 yılı raporuna göre, dünyada yaklaşık 346 milyon insan diyabetle mücadele etmekte, tüm diyabet vakalarının %90-95'ini Tip-2 diyabet oluşturmaktadır. 2030 yılına kadar 366 milyon insanın Tip-2 diyabet olacağı tahmin edilmektedir (Wang, Xie, Lin ve Zhang, 2013).

Diyabet gelişiminde As de dahil olmak üzere bazı toksik metaller risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. Tip-2 diyabet riski ile As maruziyeti arasındaki ilişkinin değerlendirildiği birkaç tane popülasyon çalışması vardır. As maruziyetinin endemik olduğu Tayvan ve Sırbistan gibi ülkelerde yapılan bu çalışmalarda, As, Tip-2 diyabet riskindeki artışla ilişkili bulunmuştur. Çin ve Kıbrıs'ta yürütülen çalışmalarda ise ilişkili bulunmamıştır. İdrar total As konsantrasyonu ile Tip-2 diyabet arasındaki ilişki ise tartışmalıdır.

Hepsi birlikte değerlendirildiğinde, As maruziyeti ile Tip-2 diyabet riski arasında ilişki olup olmadığı konusunda epidemiyolojik çalışmalar yetersizdir. Bu yüzden, 2013 yılında, arsenikle Tip-2 diyabet riski arasındaki ilişkinin ve muhtemel doz-cevap eğrisinin, çalışmalar arasındaki farklılıkların ve küçük grupların etkilerinin değerlendirmesi amacıyla bir meta analiz yapılmıştır (Wang ve diğerleri, 2013). Bu amaçla, iki farklı araştırmacı tarafından 1 Ocak 1990 ve 5 Haziran 2013 tarihleri arasında yayınlanan İngilizce ve Çince makaleler bağımsız olarak taranmıştır. Literatür taramasının ardından 17 makale meta analize dahil edilmek için uygun nitelikte ve güvenilirlilikte bulunmuştur. 2243745 katılımcının içme suyu As düzeyleri, 21083 katılımcının da idrar total As değerleri açısından maruziyet değerlendirilmiş ve iAs maruziyeti ile Tip-2 diyabet riski arasında artış gözlenmiştir. Doz- cevap analizine göre, içme suyundaki her 100 µg/l 'lik artış, Tip-2 diyabet riskinde %13'lük bir artışa karşılık gelmektedir (Wang ve diğerleri, 2013).

Kanser

Epidemiyolojik çalışmalara göre kronik As maruziyeti, akciğer, deri, mesane, karaciğer ve böbrek kanserine neden olmaktadır (IARC, 2012; Ferreccio ve diğerleri, 2013).

Arseniğin karsinojen olduğuna dair ilk farkındalık, arsenikle tedavi edilen bazı hastalarda ve arsenik içeren pestisitlere maruz kalan bireylerde görülen deri kanseri vakaları ile olmuştur. Arseniğin indüklediği tümörler, skuamoz hücreli ve bazal hücreli deri kanserleridir (IARC, 2012).

Tayvan'da 40421 kişide yapılan prevalans çalışmasında, yüksek konsantrasyonda (>600 µg/l) arseniğe maruziyet durumunda, daha düşük konsantrasyonlara (<300 µg/l) kıyasla, deri kanseri lezyonu prevalansında 8 kat artış gözlenmiştir (IARC, 2012).

Tayvan'da Karaayak hastalığı olan 789 kişide yapılan retrospektif kohort çalışmada, deri kanseri açısından standart ölüm oranı (SÖO) 28 olarak bulunmuştur (Referans olarak Tayvan bölgesel verileri kullanılmıştır). Şili'de, 1970 yılında arıtma tesisi kurulduktan sonra, kutanöz lezyon insidansında (lökoderma, melanoderma, hiperkeratoz, skuamoz hücreli karsinom) azalma gözlenmiştir. Şili'de 1989 ve 1993 yılları arasında, deri kanseri açısından standart ölüm oranı erkeklerde 7,7 ve kadınlarda 3,2 olarak bulunmuştur (Referans olarak ulusal ölüm oranı verileri kullanılmıştır). Çalışma ekibi, deri kanseri ölüm oranının çeşitli faktörler tarafından etkilenebildiğini ancak bulunan SÖO 'nın, girişim yapabilecek hiçbir faktörle açıklanamayacak kadar yüksek olduğunu belirtmişlerdir (IARC, 2012).

Deri kanserinin yanısıra As maruziyetine bağlı mesane ve böbrek kanseri riski de pek çok çalışmayla araştırılmıştır. Bu çalışmalarda, As maruziyetine bağlı olarak mesane ve böbrek kanseri mortalitesinde artış gözlenmiştir. Yüksek As konsanrasyonlarına maruziyetten 10 yıl sonra, erkeklerde 6,10; kadınlarda ise 13,8 rölatif risk artışı rapor edilmiştir. Arjantin’de böbrek ve mesane kanseri standart ölüm oranındaki artış gösterilmiştir (IARC, 2012).

As maruziyetine bağlı görülen böbrek kanseri tipleri, hem renal hücreli karsinom hem de renal pelvisin ürotelyal hücreli karsinomudur. Ürotelyal hücreli karsinom, genellikle mesane kanseri ile aynı etiyolojiye sahiptir. Dolayısıyla, arseniğin indüklediği ürotelyal hücreli mesane karsinomu, böbrek kanseri tipleri açısından da hesaba katıldığı için, total böbrek kanseri risk tahminini etkileyebilmektedir (IARC, 2012).

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), As maruziyeti ile akciğer, karaciğer, deri ve mesane kanseri arasındaki ilişki için yeterli kanıt olduğu sonucuna varırken, böbrek kanseri açısından aynı durum söz konusu olmamıştır (Bireysel maruziyet temelli doz-cevap ilişkisi çalışması olmadığı için). Son yıllardaki çalışmalardan biri, Şili'de 122 böbrek kanseri vakası ve 640 kontrolde yapılmış ve bu vaka-kontrol çalışması sonuçlarına göre odds oranı, çalışma grubu ortalama günlük As alımına göre gruplandırıldığında (<400, 400–1 000 ve >1 000 µg/gün), sırasıyla 1,00; 5,71 ve 11,09 olarak bulunmuştur. Ancak renal hücreli kanserler açısından odds oranında bir artış gözlenmemiştir. Bu doz-cevap ilişkili bulgular değerlendirildiğinde, arseniğin renal pelvis ve üreter kanserine neden olması açısından yeterli kanıta ulaşıldığı düşünülmektedir (Ferreccio ve diğerleri, 2013).

Mesane kanseri bireylerde yapılan vaka-kontrol çalışmasında, idrarda As türleri ölçülmüş ve idrar MMA/DMA oranındaki artış, mesane kanseri riskindeki artışla ilişkili bulunmuştur (IARC, 2012).

Tayvan'da, içme suyu As maruziyeti ile karaciğer kanseri riski arasındaki ilişki pek çok çalışmayla gösterilmiştir. Şili'de, As maruziyetine bağlı karaciğer kanseri mortalitesindeki rölatif risk: 1,2 olarak bulunmuştur. Arjantin'de ise SÖO, As maruziyeti ile ilişkili bulunmamıştır. Tayvan'da As maruziyeti, karaciğer kanseri ile ilişkili bulunurken, Kuzey Amerika'da bulunmamasının sebebi, Tayvan popülasyonunda endemik hepatit B'ye bağlı olarak daha duyarlı olmasına bağlanmaktadır (IARC, 2012).

Akciğer kanseri açısından, Tayvan'da mortalite oranlarına göre pek çok çalışma yürütülmüştür. Bu çalışmaların hepsinde, artan As konsantrasyonlarına maruziyetle artan akciğer kanseri riski bulmuştur. Şili'de 151 vaka ve 419 kontrolde yapılan çalışmada, odds oranı 7,1 olarak bulunmuştur (IARC, 2012).

2003 ve 2006 yılları arasında Bangladeş'te yapılan vaka-kontrol çalışmasında, 101–400 µg/l kuyu suyu tüketen ve sigara kullanan erkek bireylerde risk artışı 1,65 (%95 CI) bulunmuştur. Sigara içmeyenlerde As maruziyetine bağlı akciğer kanseri artışı rapor edilmemiştir. Sigara içenlerin kısmen daha duyarlı olması ve buna bağlı olarak latent

periyodun daha kısa olması ve kuyu suyularının 1990 ve sonrasında kullanılmaya başlandığı not edilmiştir (IARC, 2012).

2.6. Arsenik ve Bileşiklerinin Muhtemel Toksik Etki Mekanizmaları ve Duyarlılığı Etkileyen Faktörler

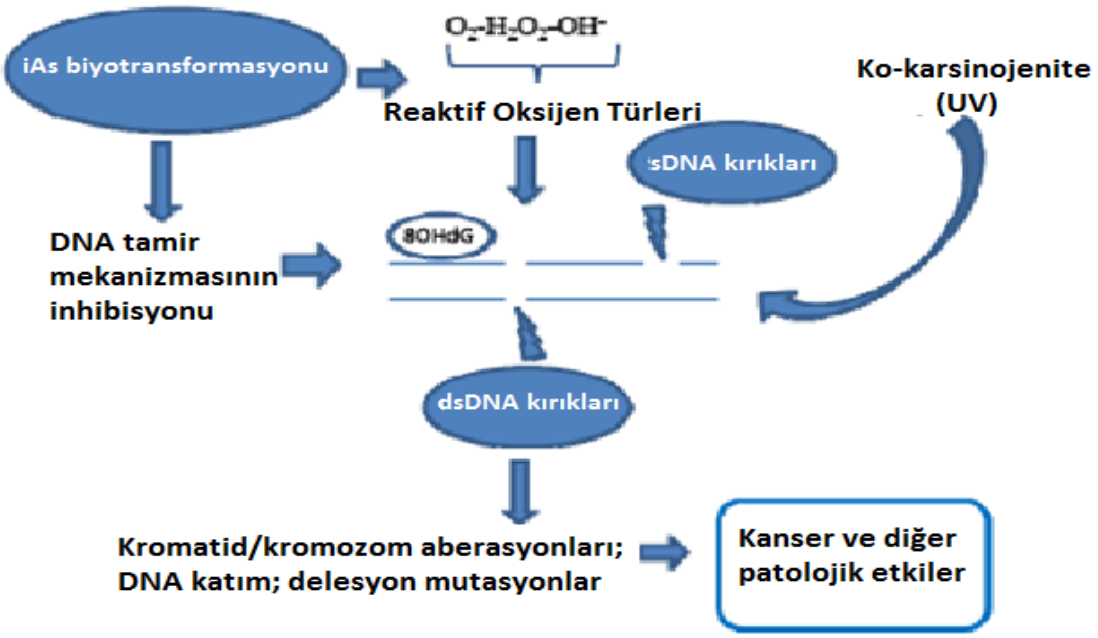
Arsenik ile ilişkili patojenik mekanizmalar oldukça karışık ve çok yönlüdür. Çünkü arsenik metabolizması 5'den fazla metabolit oluşumunu kapsamaktadır ve bu metabolitlerin hepsi toksik etki gösterebilmektedir (Bustaffa ve diğerleri, 2014; Faita, Cori, Bianchi ve Andreassi, 2013).

Arsenik toksisitesine ilişkin bilinen temel mekanizma; güçlü ***oksidatif stres indüksiyonu*** ve ***reaktif oksijen türlerinin (ROT)*** oluşumudur. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun arsenik toksisitesindeki önemine dair kanıtlar giderek artmaktadır. Çeşitli çalışmalarda, kronik olarak arseniğe maruz kalan popülasyonlarda oksidatif stres artışı yanısıra DNA hasarı indüksiyonu, lipit peroksidasyonundaki artış ve glutatyon seviyelerindeki azalma gözlenmiştir. Dolayısıyla kronik arsenik maruziyetinin indüklediği oksidatif stres, arsenik genotoksisitesi ve sitotoksisitesi ile ilişkilidir ve kanser başta olmak üzere diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve sinir sistemi hastalıklarının gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Şekil 2.4; Faita ve diğerleri, 2013).

Reaktif oksijen türleri, DNA'da yapısal değişikliklere, baz çifti mutasyonlarına, delesyon, insersiyon ve sekans amplifikansyonlarına neden olabilmektedir. Ayrıca, lipit peroksidasyonu, DNA, protein modifikasyonu ile hücrelere zarar verebilmektedirler. Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu DNA hasarı ve mutajenik etki, kanserin başlamasına katkı sağlamaktadır.

İnorganik arseniğin yanısıra, As metabolitleri de nitrik oksit (NO^-) ve süperoksit anyonu (O_2^-) gibi reaktif oksijen türleri oluşumunu indükleyebilmektedir. Transkripsiyon aktive edici protein (AP-1) ve nükleer faktör kappa B (NFkB) ekspresyonunu arttırarak, hücre sinyal iletimini, transkipsiyon faktörün DNA'ya bağlanmasını, hücresel çoğalmayı, apoptozisi ve gelişimini etkileyebilmektedir. Artan serbest radikal seviyesi, mitokondriyal membran hasarına neden olmakta ve buna bağlı olarak sitokrom C'nin salınması ve ***apoptotik hücre***

ölümüne yol açabilmektedir. Arseniğin indüklediği sitotoksisiteye katkı sağlayan bir mekanizmadır (Bhattacharjee ve diğerleri, 2013).



Şekil 2.4. Arsenik toksisitesinde reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve etkileri (Faita ve diğerleri, 2013)

Arseniğin indüklediği kromozomal instabilite, tüm kromozomun ya da kromozomal fragmentlerinin kaybı ya da kazanımı ile karakterizedir. Yanısıra, ***büyük delesyonlara, kromozomal abnormaliteye ve gen amplifikasyonlarına*** neden olmaktadır. Dolayısıyla arseniğin indüklediği kromozomal aberasyonlar, yapısal ve sayısal olabilmektedir. Bu anomaliler, hem kromozomal aberasyon testiyle hem de mikroçekirdek yöntemiyle belirlenebilmektedir (Bhattacharjee ve diğerleri, 2013).

As(III), hücre içerisine başlıca akuaglikolporinler yoluyla girerken; As(V), fosfatı taklit ederek, fosfat taşıyıcıları aracılığıyla hücre içerisine girer, kararsız As(V) esterine dönüşür ve oksidatif fosforilasyona müdahele eder. Arsenik türleri pek çok biyokimyasal reaksiyona katılmaktadır: oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları, asit-baz tepkimeleri, kovalent etkileşimler, metilasyon-demetilasyon, tiyol ve sülfidril grupları ile etkileşim gibi... (Bhattacharjee ve diğerleri, 2013).

Arsenik türleri, tiyol reaktiftir. Arsenik, tirozin fosfataz gibi enzimlerin sisteinil bölgesine bağlanarak enzim aktivitesini etkileyebilmektedir (Bhattacharjee ve diğerleri, 2013).

Mitokondri, arseniğin indüklediği genotoksik cevabın birincil hedefidir Doymamış lipit içeren iç ve dış mitokondriyal membranlar, diğer organeller ile kıyaslandığında mitokondrinin, arseniğe karşı daha duyarlı olmasının nedenidir. Ayrıca sülfidril grubu taşıyan mitokondriyal enzimler, arsenik türlerinin hedefidir. Biyolojik sistemlerde mitokondriyal disfonksiyon, apoptotik sinyal transdüksiyonuna vasıta olması açısından kritiktir (Bhattacharjee ve diğerleri, 2013).

Çelişkili olarak arseniğin hücresel savunma mekanizması olan ***Nrf2 yolağını aktive ettiği*** bulunmuştur. Bu savunma yolağı, hücresel hasara neden olan oksidatif stresi indükleyen toksik kimyasallar tarafından da indüklenebilmektedir. İlginç biçimde, arseniğin dozu, 'koruma' ve 'hücresel hasar' arasındaki dengede kırılmaya neden olması açısından oldukça önemlidir (Bhattacharjee ve diğerleri, 2013).

Hücre dizilerinde yürütülen çeşitli çalışmalara göre, arsenik trioksit, ***telomer uzunluğunu, telomeraz aktivitesini, telomeraz revers transkriptaz ve yanısıra telomer bağlayıcı protein ekspresyonunu*** değiştirmektedir. Düşük konsantrasyonlarda As(III) (1 µM), telomeraz aktivitesinde artış, telomer uzunluğunda artış ya da uzunluğunun korunması ve hücre çoğalmasını desteklemektedir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda, telomeraz aktivitesini ve telomer uzunluğunu azaltmakta ve apoptozisi indüklemektedir. Telomeraz aktivitesinin depresyonu, arseniğin anti-tümör etki mekanizmalarından biri olabileceği ve arseniktrioksitle telomeraz inhibitörlerinin kombine kullanılması kanser tedavisinde etkin olabileceği öne sürülmektedir (Bhattacharjee ve diğerleri, 2013).

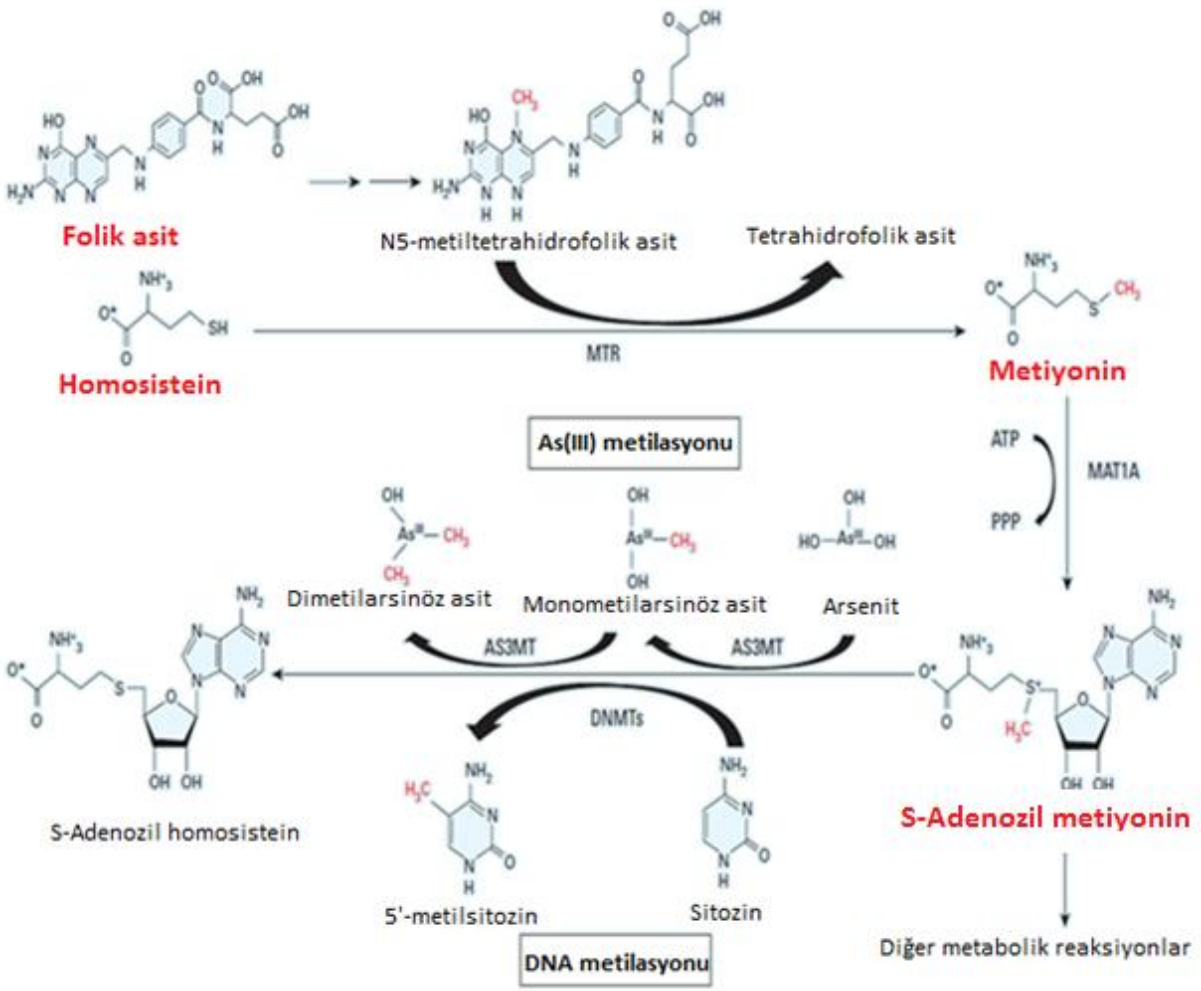
Genetik değişikliklerin yanında, anormal epigenetik değişiklikler, genomu malign süreçlere eğilimli hale getirebilmektedir. Bu epigenetik mekanizalardan DNA metilasyonu, gen transkripsiyonu, kromozomal stabilite, X- kromozomu inaktivasyonu, doku farklılaşması açısından önemli role sahiptir (Bhattacharjee ve diğerleri, 2013). Memeli sistemlerinde, DNA metilasyonu özellikle sitozince zengin gen bölgelerinde gerçekleşmekte

ve gen ekspresyonu ve genom stabilitesi korunmaktadır. DNA metiltransferaz enzimi (DNMT), S- adenozil metiyonin kofaktöründen metil grubunu, sitozin nükleotidine transfer etmekle sorumludur. Arseniğin indüklediği karsinojenik etki ile DNA metilasyonunun ilişkilisi, arsenik metilasyonu ile DNA metilasyonunda aynı metil donörü (SAM) kullanıldığı için öne sürülmüştür (Şekil 2.5). Dolayısıyla, kronik arsenik maruziyeti, ***SAM yetersizliği*** ve ***DNA hipometilasyonuna*** neden olmaktadır. İlaveten, As, DNA metiltransferaz enzimi ile doğrudan etkileşip, aktivitesini de inhibe edebilmektedir (Bhattacharjee ve diğerleri, 2013).

SAM sentezi, metiyonin aminoasiti gerektirdiği için, diyetle metiyonin aminoasitinin yetersiz alınması, arseniğin DNA metilasyonu üzerindeki negatif etkilerini şiddetlendirebilmektedir (Ren ve diğerleri, 2011). Metiyoninin yanı sıra folat eksikliği olan bireyler de, arsenik toksisitesine daha duyarlıdır. Çünkü folat, As metilasyonu için gerekli olan SAM üretiminde rol sahibidir (Şekil 2.5, Bhattacharjee ve diğerleri, 2013).

Arseniğin indüklediği toksik etkiler açısından popülasyonların ve bireylerin duyarlılıkları çok farklı olabilmektedir. Genetik ve beslenmenin duyarlılığı etkileyen önemli birer parametre olduğu düşünülmektedir (Vahter, 2007).

Bazı genetik faktörlerin bireyler arasında As metilasyon farklılıklarına neden olduğu bilinmektedir. Sağlıklı gönüllülerden alınan insan birincil hepatosit hücrelerindeki metilasyon oranında, 8 donör arasında bile 7 kat farklılık gözlenmiştir (Sumi ve Himeno, 2012). Arsenik metilasyonundaki azalmaya bağlı olarak idrarda artan MMA oranlarının, mesane kanseri, deri kanseri, deri lezyonları, kardiyovasküler etkiler ve kromozomal aberasyon prevalansındaki artışla ilişkili olduğu gösterilmiştir. İdrarda artan MMA oranı, arseniğin DMA'ya metilasyonunun azaldığını ve arseniğin vücuttaki kalış süresindeki uzadığını göstermektedir. Metilasyon kapasitesinin düşük olması ve artan MMA oranları, arseniğin sağlık üzerine etkilerinde önemli bir risk faktörüdür (Vahter, 2007). Dolayısıyla bireylerin arsenik toksisitesine duyarlılıklarının farklılığı, arsenik metilasyonundaki farklılıklardan kaynaklanabilmektedir ve metabolik genlerdeki polimorfizmler bu duruma katkı sağlamaktadır (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012).



Şekil 2.5. SAM sentezi, As ve DNA metilasyonu basitleştirilmiş şeması (Ren ve diğerleri, 2011)

Arseniğin indüklediği sağlık etkilerinin şiddeti ve prevalansı ile beslenme durumu arasındaki ilişkinin araştırıldığı pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar beslenme yönünden yetersiz olan bireylerin daha duyarlı olduğunu ortaya koymuştur.

Arseniğin beslenme ile olan ilişkisi 3 farklı mekanizmaya dayanmaktadır:

i) İlki arseniğin indüklediği oksidatif stres, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin oluşumuna bağlı oksidatif DNA hasarı ile ilişkilidir. Bu gibi toksik etkilerin şiddeti, genellikle vücudun savunma mekanizmasına ve beslenme ile antioksidan alımına bağlı olarak değişebilmektedir. Vücuttaki antioksidan seviyelerindeki artış, As toksisitesini azaltmaya yardımcı olabilmektedir. Askorbik asit, α-tokoferol, bazı bitkisel ekstraktlar, flavonoidler, polifenoller ve selenyum gibi antioksidanların arseniğin indüklediği toksisiteyi azalttığı gözlenmiştir (Vahter, 2007).

ii) İkincisi, düşük As metilasyonunun çeşitli toksik etki risklerini artırması ile ilgilidir. Arsenik, tek karbon metabolizması yoluyla, bir dizi indirgenme ve metilasyon reaksiyonları ile metabolize olmaktadır. Reaksiyon metil donörü olarak SAM ve yanısıra arseniğin indirgenmesi için glutatyon ve diğer tiyollerin varlığını gerektirmektedir. Tek karbon metabolizmasının etkin bir şekilde gerçekleşebilmesi, diyetle yeterli folik asit, B_{12} ve kolin alımını gerektirmektedir (Vahter, 2007).

iii) Üçüncü mekanizma, As'in indüklediği epigenetik değişiklikler ile ilgilidir. Arsenik, hem metil depolarını tüketerek hem de DNA metil transferazı inhibe ederek DNA'nın hipometilasyonuna neden olmaktadır. Folat ve metil eksikliği arseniğin bu etkilerini şiddetlendirebilmektedir (Vahter, 2007).

Dolayısıyla yetersiz beslenme ve bazı vitamin ve antioksidanların vücuttaki eskikliği, arseniğin toksik etkilerini şiddetlendirebilmektedir. Gelir düzeyi düşük ve beslenme yönünden yetersiz toplumlarda, arseniğin toksik etkileri daha şiddetli görülebilmektedir (Vahter, 2007).

2.7. İçme Suyu Arsenik Düzeyleri ile İlgili Yapılmış Yasal Düzenlemeler

iAs maruziyetinin potansiyel sağlık riskleri, özellikle düşük-orta maruziyet düzeylerinde, bilimsel açıdan tartışmalı bir konudur (Schoen, Beck, Sharma ve Dube, 2004).

Dünyanın arsenik tehdidi konusundaki farkındalığının giderek artmasıyla, ülkeler yasal düzenlemelerle var olan limitleri gözden geçirerek maruziyeti en aza indirmeye çalışmışlardır. 1993'de Dünya Sağlık Örgütü (WHO), içme suyundaki As sınır değerini 50 µg/l'den 10 µg/l'ye geçici olarak indirmiştir.

Avrupa Birliği 1998, Japonya 1993, Kanada 1999, Avustralya 1996, Güney Afrika ve Suriye 1994 yılında içme suyunda bulunmasına izin verilen maksimum As konsantrasyonunu 10 µg/l'ye indirmiştir (Atabey, 2009: 64-65). Çin, Nepal, Bangladeş, Hindistan gibi Asya ülkeleri ile Şili, Arjantin, Meksika ise 50 µg/l arsenik limitini düşürememiştir. Çünkü bu ülkelerin yer altı su kaynaklarında aşırı miktarda As bulunmaktadır (İkizoğlu, 2008).

Amerikan Ulusal Araştırma Konseyi (NRC) ise, Çevre Koruma Örgütü (EPA) tarafından gelen talebe bağlı olarak, 2 yıl içerisinde arseniği toksikolojik ve epidemiyolojik olarak değerlendirmek amacıyla 2 uzman heyet toplamıştır. Panelin amacı, mevcut içme suyu arsenik limit değerini değerlendirmek ve eğer gerekliyse yeni bir limit belirlemek için kurulan metodolojileri geliştirmektir. Heyet, arsenik için maksimum kontaminasyon limitinin (MCL), EPA'nın toplum sağlığını koruma hedefine ulaşamadığını, dolayısıyla mümkün olan en kısa sürede daha aşağı limitlere çekilmesi gerektiği sonucuna varmıştır. Yeni çalışmalar ve analizler de gözden geçirildikten sonra, NRC 2001 raporunu geliştirmiş ve ilk rapordaki öneriler güncellemiştir. Arsenik kanser riskine dair hesaplamalar sunulmuştur. NRC analizi ve kendi değerlendirmelerinden sonra, EPA içme suyu arsenik maksimum kontaminasyon limitini 10 µg/l'ye düşürmüştür (Schoen ve diğerleri, 2004).

Türkiye'de ise 1997 yılı itibariyle 23144 nolu Resmi Gazete'de, 'İçilebilir Nitelikte Suların Üretimi, Ambalajlanması, Satışı ve Denetlenmesi Hakkındaki Yönetmelik' ve 2005 yılında yayınlanan 'İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik' ile 'Yüzeysel Suların Kalitesine Dair Yönetmelik' teki kategorilere göre kalite standartları bakımından içme suyu As konsantrasyonu (MCL) 10 µg/l'yi geçemez.

2.8. Türkiye'de Arsenikle İlgili Yapılmış Çalışmalar

Türkiye'de yer altı sularındaki As kirliliği ile ilgili farkındalık ilk olarak 1993 yılında Kütahya'nın Emet ilçesi-İğdeköy köyünün çeşme sularındaki arsenik kontaminasyonuna (140-1700 µg/l) bağlı olarak ortaya çıkan kronik zehirlenme vakaları ile olmuştur (Atabey, 2009: 71-72). 1999 yılında, Kütahya'da kolemanit madeninde çalışan (15 yıldır 1 g/kg As içeren kolemanite dermal maruziyeti olan) ve yüksek konsantrasyonlarda arsenik içeren (45-1210 µg/l) içme suyu kullanan 35 yaşındaki erkek hastada, ayak tabanında Bowenoid lezyonlar ve sol el avuç içi bölgesinde skuamoz hücreli deri kanseri vakası rapor edilmiştir (Çöl ve diğerleri, 1999).

İzmir'de yaşayan anne ve bebeklerin arsenik maruziyetinin ve arseniğin anne sütüne geçişinin değerlendirildiği çalışmada, laktasyon döneminde olan 35 kadında, anne

sütü arsenik düzeyleri ortalama 4,21 µg/l olarak bulunmuştur (Ulman, Gezer, Anal, Töre ve Kırca, 1998).

Kütahya- İğdeköy'de yapılan bir çalışmada, bireylerin kan ve saç örnekleri arsenik konsantrasyonu tayin edilmiş, 9 kişide kronik zehirlenmeye bağlı dermal lezyonlar (hiperkeratoz, hiperpigmentasyon) tespit edilmiştir ve bu bireylerdeki genetik hasarın artışı kardeş kromatid değişimi ile gösterilmiştir (Dağıstanlı, 1995).

Kütahya'nın Emet ilçesi, İğdeköy ve Dulkadir köylerinde yapılan diğer bir çalışmada, bölgedeki jeolojik As kaynakları ve As maruziyetinin dermatolojik etkileri değerlendirilmiştir. Çeşitli jeolojik ve mineralojik analizlerin yapıldığı çalışmada, maruziyet kaynağının içme suyu olduğu bulunmuştur (İğdeköy, 300-500µg/l; Dulkadir 890-930 µg/l). Bu iki köyde yaşayan toplam 153 kişide, çeşitli klinik semptomlara göre yapılan dermatolojik değerlendirmeye göre; İğdeköy'de yaşayan 30 bireyde ve Dulkadir köyünde yaşayan 3 bireyde arsenikle ilişkili deri hastalığı tespit edilmiştir (Doğan ve diğerleri, 2005).

Ankara'da yaşayan ve bilinen bir arsenik maruziyeti olmayan sağlıklı bireylerin saç örneklerindeki As düzeyi belirlenmiştir. Ankara ve çevresinde yaşayan 53 kişide yapılan bu çalışmada, ortalama saç arsenik seviyeleri 0,139 µg/g olarak bulunmuştur (Yüksel, 2008).

Manisa ilinin üç farklı yerleşim yerinde yaşayan 100 bireyin saç örneklerinde bazı ağır metallerin ICP-OES yöntemi ile tayin edildiği çalışmada, tüm deneklerin saç analiz sonuçları ICP-OES yönteminin belirtme alt sınırının (As için belirtme alt sınırı 1,20 µg/g) altında kalmıştır (Çelik, Abalı, Edgünlü, Uzunoğlu ve Tirtom, 2009).

2011 yılında plasenta ve anne biyolojik örneklerinde As düzeylerinin ve glutatyon *S*-transferaz enziminin As düzeyine etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, 113 gönüllü annenin kan, saç, idrar, plasenta ve kordon kanı ortalama As düzeyleri tespit edilmiş ve sırasıyla; 25 µg/l; 0,16 µg/g; 5 µg/l; 62 µg/l ve 28 µg/l olarak bulunmuştur. Annenin kanında görülen As düzeylerindeki artışa paralel olarak plasentada anlamlı artışlar gözlenmiş ve plasentanın As geçirgenliğinin, kordon kanı As seviyesindeki azalma ile ilişkili olduğu bulunmuştur. GSTO1 ve GSTO2 polimorfizmlerinin de, bireyler arasındaki As metabolizma farklılıkları açısından oldukça önemli role sahip olduğu gözlenmiştir (Aliyev, 2011).

Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne başvuran, meme kanseri III. evrede olan 52 kadın gönüllünün biyolojik örneklerindeki çeşitli ağır metallerin yanısıra ICP-MS yöntemi ile saç As düzeyleri ölçülmüş ve ortalama 1,52 µg/g bulunmuştur. Kontrol grubuna (ortalama saç As düzeyi=0,23 µg/g) kıyasla kanserli hastalardaki saç As düzeylerindeki artışın anlamlı olduğu gözlenmiştir (Cihan, Sözen ve Yıldırım, 2011).

Ankara Meslek Hastanesi'ne başvuran 95 metal işçisinde yapılan diğer bir çalışmada, mesleksel As maruziyeti değerlendirilmiş ve bireylerin kan, idrar ve saç arsenik düzeyleri ölçülmüştür. Çalışmada, As düzeyleri kanda ortalama 21 µg/l, idrarda ortalama 6 µg/l ve saçta ortalama 1,81 µg/g olarak bulunmuştur (Yüksel, 2013).

Kronik As maruziyeti nedeniyle, 2011 ve 2012 yıllarında Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesi'ne başvuran erkek hastaların As maruziyeti ile kemik mineralizasyon yoğunluğundaki azalma arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Arsenik üretimi ve kullanımı olan iş sahalarında (pestisit üretimi, uygulaması, ahşap işleme, bakır ve kurşun dökümü) çalışan ve kronik olarak arseniğe maruz kalan bu bireylerin saç örneklerindeki As düzeyleri tayin edilmiş ve ortalama 1,01 µg/g (0,06 - 25,71) olarak bulunmuştur (Akbal, Yılmaz ve Tutkun, 2013).

Akyüzlü ve diğerleri (2013), 95 metal işçisinde, metallotiyonin 2A geninin promoter bölgesindeki -5 A/G tek nükleotid polimorfizmi ile kan, idrar ve saç arsenik düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. Bireylerin kan, idrar ve saç arsenik düzeyleri sırasıyla 21 µg/l, 6 µg/l ve 1,8 µg/g olarak bulunmuştur. Tek nükleotid polimorfizmi ile idrar ve saç As düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunurken, kan As düzeyleri arasında bir ilişki bulunmamıştır.

Diğer bir çalışmada, metalürji işçilerinin saç As düzeyleri belirlenmiş ve ortalama 2,53 µg/g olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda ortalama saç As düzeyi toksik karar seviyesi; 1 µg/g'ın altında bulunurken, işçi grubunda iki kat yüksek bulunması iş yerinde maruziyetle ilgili olarak daha fazla önlem alınması gerektiği şeklinde yorumlanmıştır (Türksoy, Kaya, Yılmaz ve Söylemezoğlu, 2013).

2.9. Saç Örneklerinde Arsenik Tayininde Kullanılan Analitik Yöntemler

Tarihsel açıdan ilk olarak biyolojik örneklerde total As konsantrasyonunu belirlemek üzere kolorimetrik/spektrofotometrik yöntemler geliştirilmiştir. Çeşitli ticari test kitlerinin prensibi de bu yönteme dayanmaktadır. Ancak günümüzde daha duyarlı yöntemlerin kullanımı tercih edilmektedir (IARC, 2004).

Atomik absorbsiyon spektroskopisi (AAS), biyolojik örneklerde As analizinde en fazla kullanılan analitik yöntemlerden biridir. Bu amaçla, 3 tip AAS tekniği kullanılmaktadır: Alevli AAS (AAAS), Elektrotermal AAS (ETAAS; grafit fırınlı AAS olarak da bilinir), Hidrür oluşturmalı AAS (HG-AAS) (IARC, 2004).

Alevli AAS, yüksek dedeksiyon limiti nedeniyle (LOD=1mg/l), saç örneklerinin analizinde genellikle tercih edilmeyen bir yöntemdir (IARC, 2004).

ET-AAS'de ise, 1-50 µl hacminde numune, mikropipet veya otoörnekleyici yardımıyla in-situ mineralize edildiği bir grafit tüp içerisine yerleştirilir. Numune enjeksiyonundan sonra numuneye kurutma, piroliz (külleme) ve atomlaştırma basamaklarını içeren sıcaklık programı uygulanır. Sinyal, atomlaştırma basamağında ölçülür. Atomlaştırma basamağından sonra kalıntıları temizlemek ve grafit tüp yüzeyini bir sonraki ölçüme hazırlamak amacıyla atomlaştırma sıcaklığından daha yüksek sıcaklıktaki temizleme basamağı tercihen eklenir. Matriks modifiye edicilerle, analitin termal kararlılığı arttırılarak piroliz basamağındaki analitin erken uçuculuğu engellenir.

HG-AFS, çeşitli dedeksiyon sistemleri ile kolayca kombine edilebilen ve tüm metodlar içerisinde en mükemmel dedeksiyon limitine ulaşılabilen bir tekniktir. Çinko/HCl veya sodyumborohidrür($NaBH_4$)/asit karışımlarıyla uçucu hidrür türlerinin oluşturulması temeline dayanır. İnert bir gaz içerisinde dedeksiyon sistemine taşınır (IARC, 2004).

Saç örneklerinde As tayininde kullanılan analitik yöntemlerin karşılaştırılmalı incelenmesi Çizelge 2.4' de özetlenmiştir.

Çizelge 2.4. Saç örneklerinde As tayininde kullanılan analitik yöntemlerin karşılaştırılmalı incelenmesi (IARC, 2004 ve Vandecasteele ve Block, 1997:169)

Method	Dedeksiyon Limiti (LOD)	Avantaj	Dezavantaj
Alevli AAS	1 mg/l	-	-Yeteri kadar duyarlı değil
ET-AAS	~0,02 µg/l	-Düşük örnek hacmi -Duyarlılık	-yavaş
HG-AAS	0,1 µg/l	-Duyarlılık	-hızlı -ucuz
HG-AFS	~0,010 µg/l	-Duyarlılık	-
ICP-MS	~0,010 µg/l	-Duyarlılık AFS ile benzer -Aynı anda pek çok element analizi	-pahalı cihaz -işletim maliyeti yüksek

Saç örneklerinde total As konsantrasyonunun belirlenmesi için, organik matrisin tamamen tahrip edilmesi gerekmektedir. Bu işlem esnasında tüm organik As bileşikleri, oksidatif yıkılama işlemi ile inorganik arseniğe dönüştürülür. Asit yıkılama (yaş külleştirme) ve kuru külleştirme, analizden önceki örneklerin oksidatif yıkılama aşamasında, geniş çapta kullanılan iki metoddur. Ayrıca daha sonradan geliştirilen mikrodalga asit yıkılama işlemi de, örneklerin hızlı bir şekilde ölçüme hazırlanması gerektiği durumlarda tercih edilebilmektedir (IARC, 2004).

2.9.1. Atomik floresans spektroskopisi

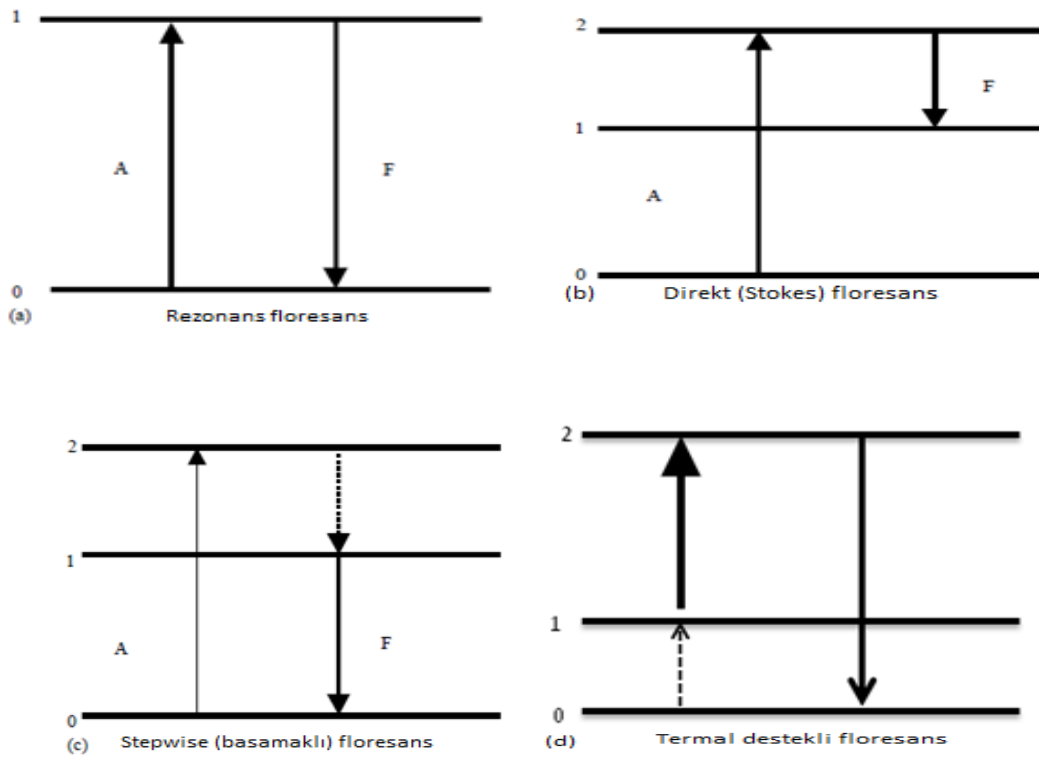
Atomik floresans, ışın (foton) absorbsiyonu ile uyarılan atomik buharın, foton emisyonudur (Ingle ve Crouch, 1988: 307). İlk olarak 1964 yılında, Winefordner tarafından yeni bir analitik metod olarak öne sürülmüştür. Daha sonraki araştırmalarda uygulanmış ve özellikle floresans spektroskopisinde kullanılmak üzere yoğun ışık kaynağı geliştirilmeye çalışılmıştır (Vandecasteele ve Block, 1997:159).

Floresansta uyarılmış tür, fazladan enerjisini fotonlar halinde geri salarak temel haline durulur ve bu süreç, uyarılma anını izleyen 10^{-9} saniyede veya daha kısa sürede tamamlanır (Skoog, West, Holler ve Crouch, 2004/2007).

Temel çalışma prensibi

Atomik floresans spektroskopisinde, atomların daha yüksek seviyelere uyarılmasında sürekli veya çizgi tipi ışık kaynağı kullanılır. Uyarılmış atomların temel hale geçerken yaydığı floresans emisyon ölçülür. Temel floresans tipleri, Şekil 2.6'da gösterilmiştir (Vandecasteele ve Block, 1997:160).

Rezonans floresansta, absorbe edilmiş radyasyonla floresans radyasyon aynı dalga boyundadır (Şekil 2.6;a). Bu tip floresans, genellikle kantitatif analizlerde kullanılır. **Direkt floresans**, uyarılmış haldeki elektronun, radyasyonu absorbladığı temel seviyenin üzerindeki daha yüksek bir elektron seviyesine dönerken yaptığı ışımadır (Şekil 2.6;b). **Stepwise (basamaklı) floresans**, eksitasyon-deeksitasyon sürecinin farklı üst seviyelerde gerçekleşmesidir (Şekil 2.6;c). Uyarılma süreci ışık ile uyarılmanın ardından termal uyarılmayı da içeriyorsa, bu süreç **termal destekli floresans** olarak isimlendirilir (Şekil 2.6;d). Direkt floresans ve stepwise floresansta yayılan radyasyon dalga boyu, absorbe edilenden daha büyüktür ve bu floresans tipleri '*Stokes floresansı*' na örnektir (Vandecasteele ve Block, 1997:160).



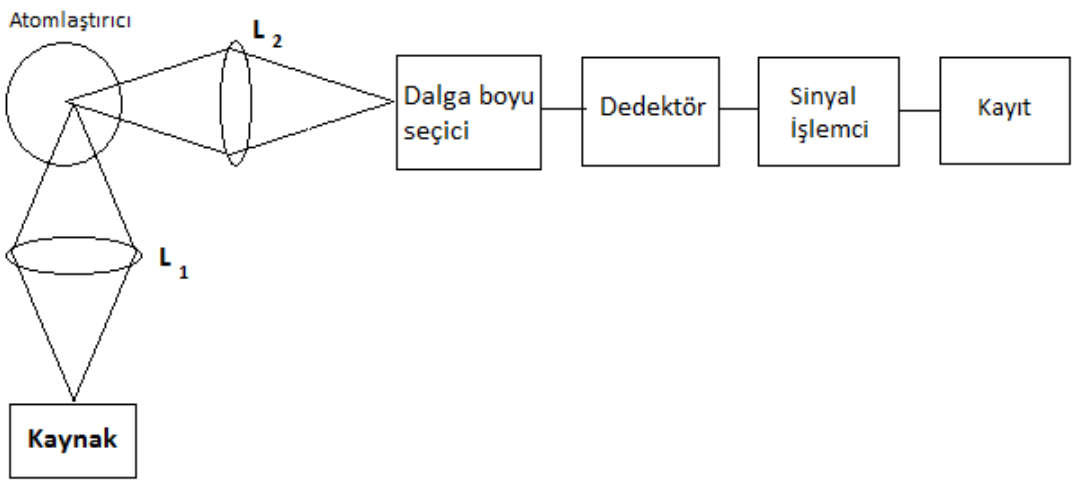
Şekil 2.6. Atomik floresansta temel enerji geçişleri (Vandecasteele ve Block, 1997:160)

Atomik floresans ışımasının şiddeti, absorbe edilen ışık yoğunluğuna ve analit atomlarının konsantrasyonuna bağlıdır. Şiddetli ışıma yapan ışık kaynağı kullanılarak dedeksiyon limiti (LOD) daha iyi seviyelere çekilebilir (Vandecasteele ve Block, 1997:160-161).

Atomik floresansın şiddeti, uyarılmış atomlar ile diğer moleküller arasındaki çarpışmadan dolayı azalabilir. Bu durum *'quenching'* (sönümleme) olarak adlandırılır (Vandecasteele ve Block, 1997:161).

Enstrümentasyon

AFS'nin tipik blok diyagramı Şekil 2.7'de gösterilmiştir. Bileşenler, atomik absorbsiyon spektroskopisi (AAS) ile aynıdır. Işık kaynağı ile rezonans floresans aynı dalga boyunda olduğu için, ışık kaynağı dedektörle dik pozisyondadır (Vandecasteele ve Block, 1997:161).



Şekil 2.7. Atomik floresans spektrometresinin blok diyagramı (Ingle ve Crouch, 1988:309)

Işık Kaynakları

AFS için ideal ışık kaynağı stabil olmalı ve analit elementinin eksitasyon dalga boyunda şiddetli emisyon sağlamalıdır. En çok kullanılan çizgi tipi ışık kaynakları; Güçlendirilmiş Oyuk katod lambası (OKL), Elektrodsuz boşalım lambaları (EBL) ve Buhar boşalım lambalarıdır (Vandecasteele ve Block, 1997:161).

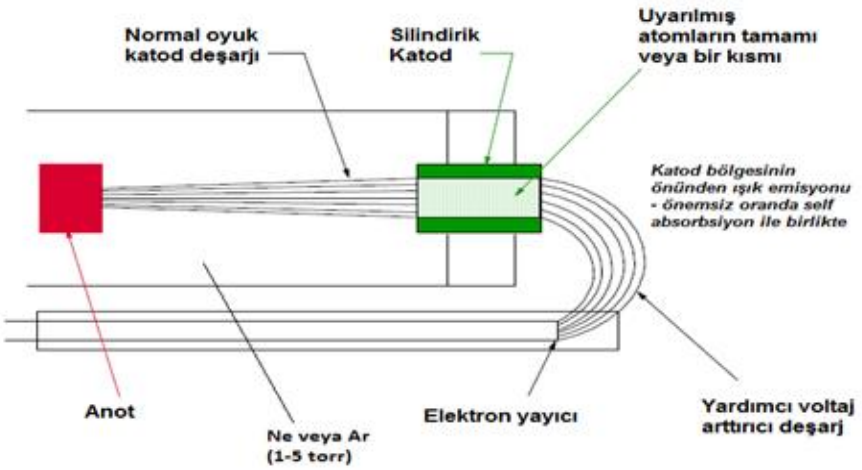
Elektrodsuz boşalım lambaları, AFS'de en popüler eksitasyon kaynağı olmuştur. Çünkü, diğer çizgi tipi kaynaklara göre kısmen daha yoğun bir ışık ve daha temiz bir spektra sağlar. Ancak, elektrodsuz boşalım lambaları sadece bir kaç element için mevcuttur (Vandecasteele ve Block, 1997:161). Ayrıca sinyal kararlılığı düşük ve kısa ömürlüdür.

AFS'de sürekli ışık kaynakları da kullanılabilmektedir. Ancak AFS için gerekli olan dalga boyu bölgesinde yeterli radyasyon yoğunluğu sağlayabilecek sürekli bir ışık kaynağı yoktur. En çok kullanılan sürekli ışık kaynağı 150-500 W Xe yüksek basınçlı ark lambasıdır (Vandecasteele ve Block, 1997:161). AFS'de sürekli ışık kaynağı kullanıldığında çok iyi bir monokromatör kullanmak gerekir. Çünkü analit dışındaki pek çok element de floresans yapabilir; elementlerin emisyonu çakışabilir veya birbirine çok yakın olabilir.

Oyuk katod lambası

Oyuk katod lambasının ışık yoğunluğu diğer kaynaklara göre daha az olduğundan, AFS'de genellikle güçlendirilmiş oyuk katod lambaları kullanılmaktadır. Pek çok element için uygundur (Vandecasteele ve Block, 1997:161).

Oyuk katod lambaları, 1-5 torr basınçta argon (Ar) veya neon (Ne) ile doldurulmuş bir cam tüp içinde, bir tarafı kapalı silindirik katod ve bir tungsten anottan ibarettir. Katod, analiz edilecek metalden imal edilir (Şekil 2.8; Skoog, Holler ve Nieman, 1998/2000).



Şekil 2.8. Güçlendirilmiş oyuk katod lambası

Elektrodlar arasına 300 V civarında bir potansiyel uygulanınca, inert gaz atomları iyonlaşır. Yüksek hızla katoda çarpan katyonlar (Ar^+), katod yüzeyindeki atomlardan bazılarını koparıp gaz fazına geçirir. Bu süreç *'sıçratma'* adını alır. Sıçratılan metal atomlarının çoğu uyarılmış haldedir ve temel hale dönerken karakteristik ışıma yaparlar (Skoog, Holler ve Nieman, 1998/2000).

Atomlaştırıcılar

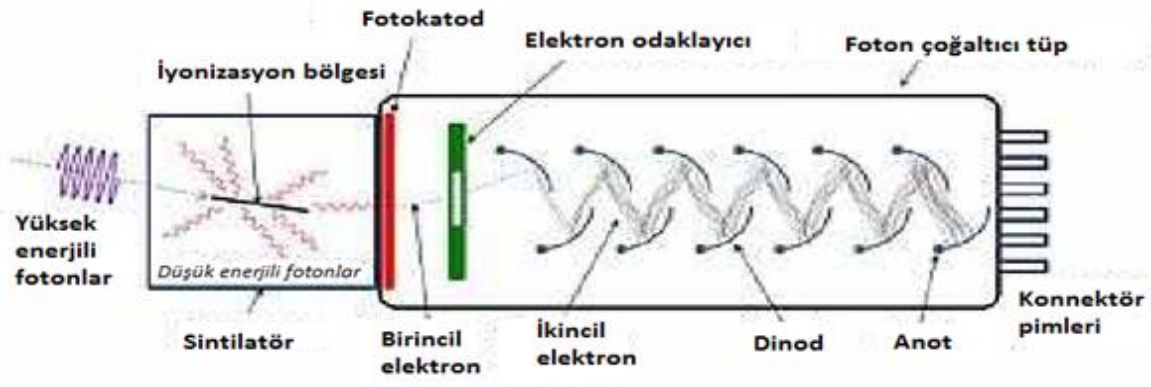
AFS'de genellikle alevli atomlaştırıcılar kullanılır. Alev oluşturmak için, elementlerin atomlaşma sıcaklığına göre çeşitli yakıtlar kullanılır. En çok kullanılan alevler; H_2 difüzyon alevi, hava-asetilen alevi ve N_2O-asetilen alevidir. Alev, genellikle zemin sinyalini ve yanma ürünlerinin *quenching* etkisini azaltmak için inert bir gaz (Ar) ile izole edilir. H_2 alevi, AFS'de tercih edilen bir alevdir . Çünkü yanma ürünlerinin sinyali bastırma olasılığı azdır . Meydana gelen sıcaklık , arseniğin atomlaşması (~2000 °C) için yeterlidir. Sadece hidrür oluşturabilen elementlerin atomlaşmasını sağlar. Dolayısıyla seçiciliği yüksektir.

Dedektörler

Dedektör, ışın enerjisini elektrik sinyaline veya diğer bir fiziksel boyuta (ısı, rezistans) dönüştüren elektronik birimdir. İdeal bir dedektör, geniş bir dalga boyu aralığında sabit orantılı cevap vermeli ve duyarlılığı yüksek olmalıdır.

Foton katlayıcı tüp dedektör

Foton katlayıcı tüpler, düşük ışık şiddetinin ölçümünde, normal fototüplere kıyasla üstündür. Şekil 2.9, bu tip bir cihazın şemasını göstermektedir. Fotokatodun yüzeyi ışın düşünce elektron salmaktadır. Bu tüp, dinod adı verilen ek elektrotlar (9 elektrot) içerir. Dinod-1, katoda oranla 90 V pozitif tutulur ve bunun sonucunda elektronlar dinoda doğru hızlandırılır. Dinoda çarpan her bir fotoelektron ilave elektronların oluşmasına yol açarak dinod-1'den daha pozitif olan dinod-2'ye yönelir. Bu işlem 9 kez tekrarlandığında, her bir foton için 10^6-10^7 elektron oluşur ve sonuçta akım, elektronik yolla yükseltilmiş olur. Dolayısıyla sinyal arttırılmış ve kolay ölçülebilir hale gelmiştir.



Şekil 2.9. Foton katlayıcı tüp dedektör

Foton katlayıcı tüpler, ışık şiddetindeki çok küçük değişikliklere bile duyarlıdır. Uygun dış devrelerin yardımıyla, fotokatoda ulaşan tek bir fotonu bile ölçebilmektedir (Skoog, Holler ve Nieman, 1998/2000).

Atomik floresans spektroskopisinde girişimler

Atomik floresans spektroskopisinde gözlenen girişimler, atomik absorbsiyon spektroskopisi ile aynı büyüklük ve tiptedir (Skoog, Holler ve Nieman, 1998/2000).

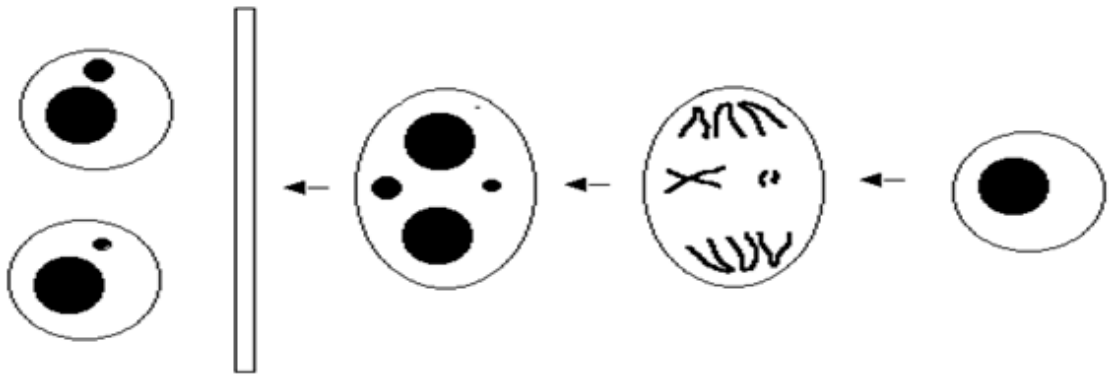
AFS'de çizgi tipi ışık kaynağı kullanıldığında spektral girişim olasılığı düşüktür. Ancak sürekli ışık kaynağı kullanıldığında, monokramatörün dalga boyu aralığında analit dışındaki elementlerin yapacağı floresans emisyon riski fazladır. Ayrıca rezonans floresansta, ışık kaynağı ile aynı dalga boyunda emisyon ölçüldüğü için, floresans ile saçılmayı ayırmak zordur (Vandecasteele ve Block, 1997:166).

AFS’de matriks girişimleri, matriks bileşenlerinin moleküler floresansı veya atomlaştırıcıdaki partiküllerin ışık saçımlarından kaynaklanabilmektedir. *Quenching,* floresans şiddetini azaltabilir (Vandecasteele ve Block, 1997:166). Hidrür olışturmalı AFS'de, hidrür oluşturma sırasında analit seçici olarak gaz fazına geçirilmekte ve numuneden ayrılmaktadır. Bu nedenle matriks girişimlerinden göreceli olarak bağımsızdır. HG-AFS’de, hidrür oluşturma kinetiğini etkileyen faktörler ölçümü etkileyebilmektedir. Ortamdaki kuvvetli oksidanların varlığı, hidrür oluşturma kinetiğini azaltabilmektedir.

2.10. Genotoksisite Testleri

2.10.1. Yanak epitel (bukkal) hücrelerinde mikroçekirdek yöntemi

Literatürde Mikroçekirdek (MÇ), küçük çekirdek anlamındadır ve *'Howell-Jolly'* cisimcikleri olarak da bilinir. Bu küçük çekirdek, mitozun metafaz-anafaz geçişi esnasında, iki kardeş hücrenin içine katılamayan asentrik fragmentlerden veya tam kromozomdan oluşur (Şekil 2.10). İlerleyen aşamalarda interfaz hücresinin sitoplazmasında bir membranla çevrili kromatin materyali içeren küçük bir çekirdek ortaya çıkar. Bu olay, oksidatif stresle, anojenlere maruziyetle, hücre siklusunu kontrol eden ve/veya DNA onarımından sorumlu genlerdeki defektlerle tetiklenebilir. Anöploidi uyaran ajanlar, iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına ve sentromer bölünme hatalarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MÇ oluşumuna neden olur (Thomas ve diğerleri, 2009). Sentromerik bölgedeki kromozom hasarı veya kinetokor ve iğ iplikçiği protein hasarı, kromozomun sağlıklı bir şekilde iğ ipliklerine tutunmasını engeller. Dolayısıyla kromozomun anafazda geride kalmasına ve mikroçekirdek oluşumuna neden olur (Fenech, 1998).



Şekil 2.10. Mikroçekirdek formasyonu

Mikroçekirdek yöntemi, DNA hasarı ve hücre ölümünde; beslenme, yaşam tarzı, genotip ve genotoksin maruziyetinin rolünün araştırıldığı çalışmalarda, sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. DNA hasarı, mikroçekirdek sıklığının ölçülmesi ile veya kromozom kırıklarının, anöploid oluşumların ve telomer uzunluğundaki değişikliklerin floresans problarla belirlenmesiyle değerlendirilir (Thomas ve diğerleri, 2009).

Eksfoliye hücrelerde mikroçekirdek yöntemi, ilk defa 1983 yılında Stich ve Rosin tarafından kullanılmıştır. Feulgen ve fast green boyalarıyla eksfoliye hücrelerin çekirdek ve sitoplazmalarını boyamışlardır. Hızlı ve non-invaziv örneklemeyle alınabilen çok sayıda eksfoliye hücre, mikroskobik lamlara fikse edilir ve aylar hatta yıllar sonrasına kadar saklanabilir (Moore, Warner, Smith, Kalman ve Smith, 1996).

Eksfoliye hücreler, canlı olmadıkları için interfaz aşamasında değerlendirilmelidir. Dolayısıyla bu hücreler için hücre kültürü gerektiren geleneksel sitogenetik teknikleri kullanmak mümkün değildir (Moore ve diğerleri, 1996).

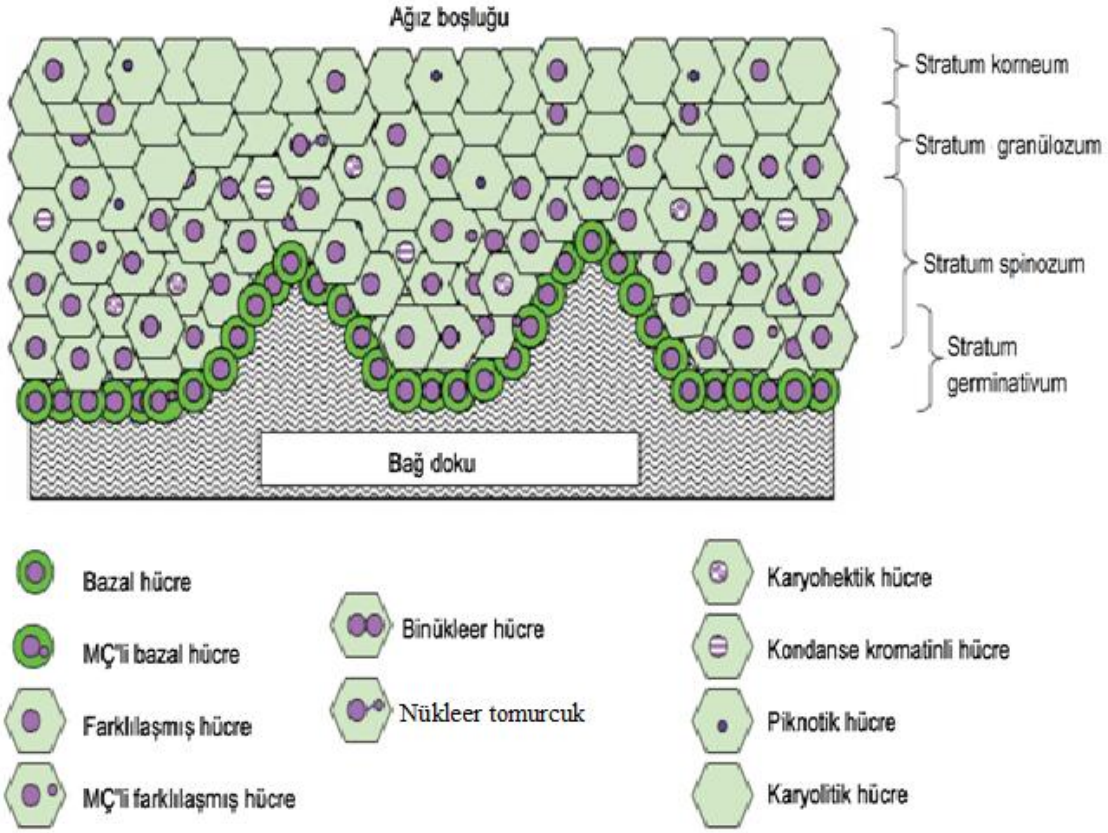
Doku ve organların yenilenme kapasitesi sağlıklı yaşlanmanın temelidir. Yenilenme kapasitesi; çoğalabilen (bazal) hücre sayısına, mitoz bölünme oranına, hücrelerin genomik dayanıklılığına ve hücre ölümü eğilimlerine bağlıdır. Bazal hücre sayısının, ölüme doğru giden hücre sayısına oranı, dokunun yenilenme kapasitesinin göstergesidir. Bu gibi durumların tespit edilmesinde, örnek alımında strese neden olmayan eksfoliye yanak epiteli idealdir.

Bukkal mukoza, potansiyel karsinojenlere karşı bariyer sağlar. Ayrıca tüm kanserlerin %90'dan fazlası epitel hücre kökenlidir. Dolayısıyla bukkal mukoza, vücuda ağız ve inhalasyon yoluyla giren potansiyel karsinojenlerin erken genotoksik etkilerinin belirlenmesi için uygundur (Thomas ve diğerleri, 2009). Radyasyon maruziyeti ile ilgili olarak oral foton tedavisi alan kanser hastalarının yanak epitel hücrelerinde, 16 kat artmış mikroçekirdek sıklığı belirlenmiştir (Moore ve diğerleri, 1996).

Bukkal mukoza 4 katmanlı, skuamöz epitel hücrelerden oluşur. En dışta kalan *stratum korneum*, keratinize tabakadır ve dokunun yıpranıp, dökülen hücrelerini oluşturur. Bu tabakanın altında *stratum granülozum* ve *stratum spinozum* yer alır. Bu tabakalarda, farklılaşmış apoptotik ve nekrotik hücreler bulunur. Bu tabakaların altındaki *stratum germinativum* da ise aktif olarak bölünebilen bazal hücreler ve bazal kök hücreler bulunur (Şekil 2.11; Thomas ve diğerleri, 2009).

Bu yöntemde, hastanın ağız boşluğundan (yanakların iç kısmından) küçük başlı diş fırçası yardımıyla hücreler alınır. Abeslang ve metal spatül de kullanılabilir, ancak diş

fırçasına kıyasla daha az sayıda hücre elde edilir. Örnekleme yapılırken her iki yanaktan ve geniş bir alandan örnek alınmalıdır. Aynı alanda tekrarlayan sürüntüler daha az sayıda farklılaşmış hücrelerin toplanmasına neden olur (Thomas ve diğerleri, 2009).

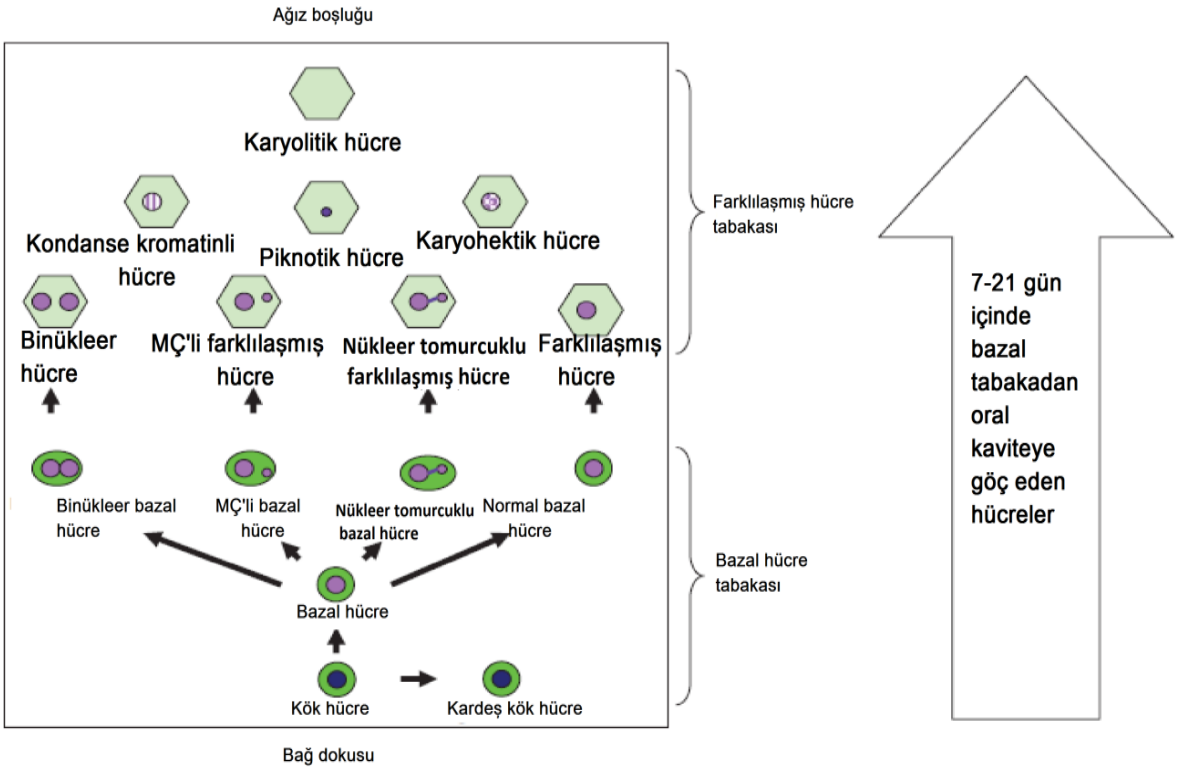


Şekil 2.11. Bukkal mukoza yatay kesitinin şematik gösterimi (Thomas ve diğerleri, 2009)

Bukkal hücreler her 7-21 günde kendini yeniler ve teorik olarak genotoksik etkiyi, akut maruziyetten 7-21 gün sonra gözleyebilmek mümkündür (Şekil 2.12; Thomas ve diğerleri, 2009). Akut maruziyetten sonra, her 7 günde bir en az bir örnek alınması ve örneklemenin 28. günde veya daha sonra tekrar yapılması, hücre kinetiğinin ve biyogösterge indüksiyonunun baştan sona incelenebilmesi için idealdir. Kronik maruziyet durumunda ise (beslenme alışkanlığı, alkol tüketimi ve sigara içiciliği gibi...), her 3 ayda en az bir kez olmak üzere birden fazla örnekleme yapılması tavsiye edilmektedir (Thomas ve diğerleri, 2009).

Örnek alındıktan sonra hücrelerin lamlara sabitlenmesi için alternatif fiksasyon çözeltileri (metanol: glasiyel asetik asit (3:1) veya %80 metanol) kullanmak mümkündür. Birkaç tane farklı yanak epitel hücresi boyama yöntemi mevcuttur. Ancak, Romanowsky boyalarında sıklıkla görülen yanlış pozitif sonuçların minimize edilmesi açısından Giemsa ve

Leishmann's gibi Romanowsky boyaları ile yerine, DNA spesifik boyalarla (feulgen-fast green) boyanması tavsiye edilmektedir. Feulgen boyamasının en mükemmel özelliklerinden biri de, 580-620 nm dalga boyu aralığında, DNA materyalinin parlak kırmızı renkte floresans ışıma göstermesidir (Resim 2.6). Romanowsky tipi boyalar (Giemsa, May-Grunwald Giemsa, Leishmann's) DNA materyali yanında keratin cisimciklerini de boyadığı için hatalı pozitif sonuçlara yol açar. DNA spesifik olmayan Romanowsky boyaları kullanıldığı bir çalışmada, sigara içen bireylerde içmeyenlere göre mikroçekirdek sıklığında 4-5 kat artış gözlenmiştir. DNA spesifik boyalar kullanıldığında ise gruplar arasında anlamlı farklılık olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (Thomas ve diğerleri, 2009).

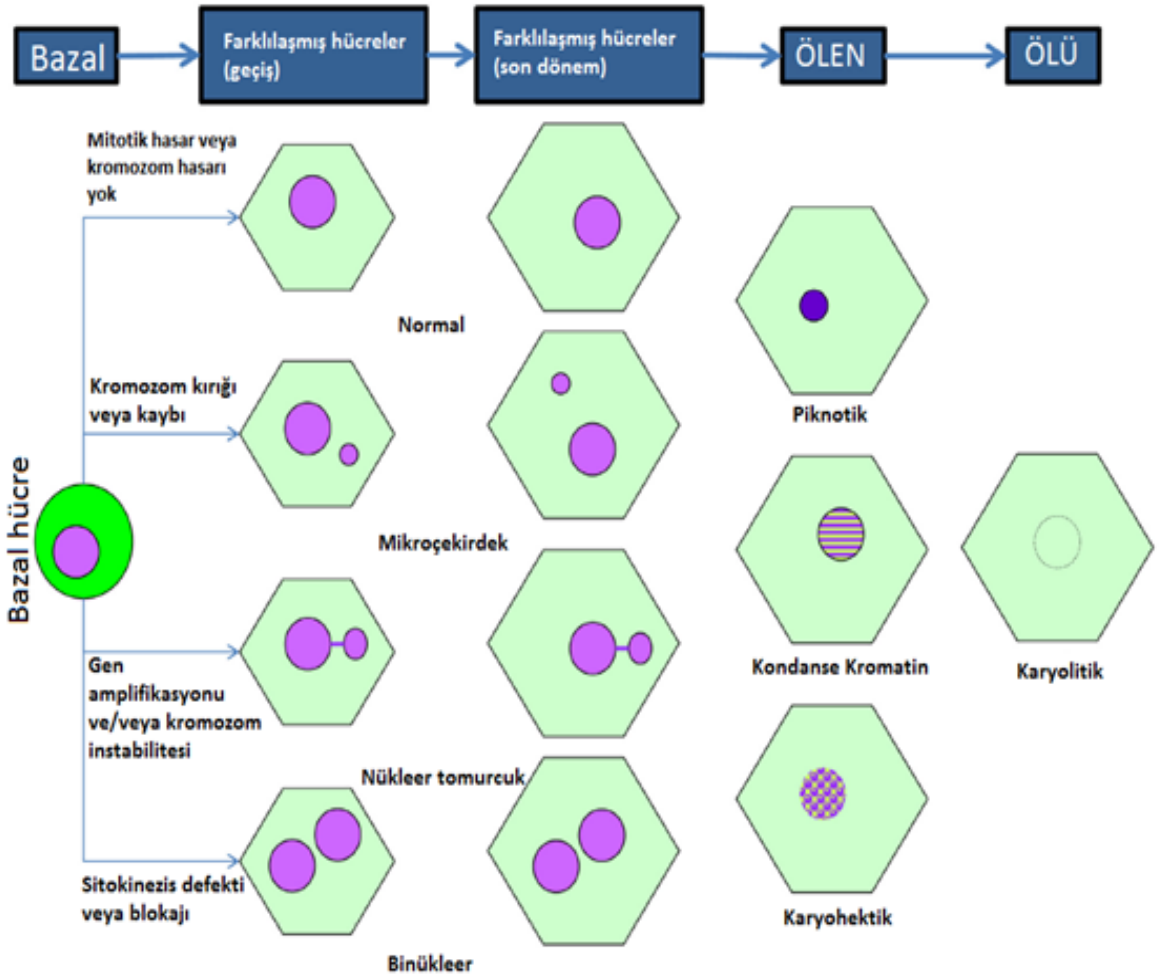


Şekil 2.12. Yanak epitel dokusundaki çeşitli hücre tiplerinin birbirini takip eden kökenleri ve zaman-uzamsal dizilişleri (Thomas ve diğerleri, 2009)

Bukkal mikroçekirdek yöntemindeki çeşitli hücre tiplerinin ve çekirdek anomalilerinin skorlamasında, Tolbert ve diğerlerinin (1992) tanımladığı kriterler baz alınmakla birlikte, hücreler sitolojik ve nükleer özelliklerine göre 'normal hücreler' ve 'anomalili hücreler' olmak üzere 2 kategoride incelenmektedir. Çekirdek anomalilerinin morfolojik özellikleri ve mikroskopik görüntüleri Çizelge 2.5 ve Resim 2.7'de gösterilmektedir.

Bukkal mikroçekirdek yöntemi, DNA hasarının (mikroçekirdek ve/veya nükleer tomurcuk), sitokinetik defektlerin (binükleer), proliferasyon potansiyelinin (bazal hücre sıklığı) ve/veya hücre ölümünün (kondanse kromatin, karyohektik, piknotik ve karyolitik hücreler) biyogöstergelerinin ölçümüne de imkan sağlamaktadır (Şekil 2.13; Thomas ve diğerleri, 2009).

Normal bazal hücreler, farklılaşmış hücrelere kıyasla daha büyük çekirdek / sitoplâzma oranına sahiptir, daha küçük ve ovaldir. Farklılaşmış hücreler, bazal hücrelerden daha büyük yapıdadır ve daha küçük çekirdek/sitoplâzma oranına sahiptir. Normal bazal ve farklılaşmış hücrelerde, çekirdek dışında DNA içeren yapılar gözlenmez (Resim 2.6; a, Thomas ve diğerleri, 2009).



Şekil 2.13. Yanak epiteli mikroçekirdek yönteminde değerlendirilen hücre tipleri ve oluşum mekanizması (Bolognesi, Knasmueller, Nersesyan, Thomas ve Fenech, 2013)

Çizelge 2.5. Yanak epitel hücrelerinin morfolojik özelliklerine göre sınıflandırılması (Thomas ve diğerleri, 2009)

Bukkal Hücre Tipleri	Morfolojik Yapısı
Bazal hücre [a,a']	* Çekirdek /sitoplâzma oranı farklılaşmış hücrelere kıyasla daha büyüktür. * Farklılaşmış hücrelerden daha küçük ve ovaldir. * Çekirdekleri muntazam boyanır ve sitoplâzmaları farklılaşmış hücrelere kıyasla daha koyu boyanır.
Farklılaşmış hücre [b,b']	* Daha küçük çekirdek/ sitoplâzma oranına sahiptir. * Bazal hücrelere göre daha düz, yassı ve köşelidir.
Mikroçekirdekli hücre[c,c']	* Ana çekirdeği ve ana çekirdek çapının 1/3 -1/16'sı aralığındaki boyutta küçük çekirdeği içerir. * MÇ, sadece bazal ve farklılaşmış hücrelerde bulunur, sitoplazmada lokalize olur ve yuvarlak/oval yapıdadır. * Ana çekirdekle benzer yoğunlukta boyanır ve aynı düzlemdedir.
Nükleer tomurcuk[d,d'] **'broken egg'**	* Ana çekirdek, tomurcuk şeklinde biçimlenmiş yapıya dar bir geçitle bağlıdır. * Tomurcuk ana çekirdeğe tutunmuştur ve benzer yoğunlukta boyanır. * Tomurcuğun çapı, ana çekirdeğin çapının 4'te biri kadardır.
Binükleer hücre [e,e']	* Hücre, iki ana çekirdek içerir. * Çekirdekler benzer çaptadır ve benzer yoğunlukta boyanır.
Kondanse kromatinli hücre [f,f']	* Çekirdek agrege olmuş kromatinlerden oluşur. * Çekirdeğin belirli bölgeleri daha şiddetli boyanır. * Çekirdek çizgili bir model sergiler.
Karyohektik hücre[g,g']	* Çekirdek yoğun bir şekilde agrege olmuş kromatinlerden oluşur ve çekirdek parçalanması daha belirgindir.
Piknotik hücre [h,h']	* Çekirdek büzülmüş, küçülmüştür. * Normal çekirdek çapının 1/3'ü ya da 2/3'ü kadardır. * Çekirdek muntazam ve şiddetli boyanır.
Karyolitik hücre [ı,ı']	* Çekirdek, DNA'sını boşaltmıştır. * Çekirdek Feulgen ile boyanmaz.

Mikroçekirdekli hücre, ana çekirdek ile birlikte 'mikroçekirdek' olarak adlandırılan ana çekirdekten daha küçük çapta çekirdek yapılarının varlığı ile karakterizedir. Mikroçekirdek, oval veya yuvarlak yapıdadır ve ana çekirdek çapının 1/3 -1/16'sı aralığındaki bir boyuttadır. Ana çekirdekle benzer dokudadır ve aynı yoğunlukta boyanır (Resim 2.6;b, Thomas ve diğerleri, 2009).

Pek çok hücre sadece bir mikroçekirdek içerir. Ancak bir hücrenin içerisinde iki veya daha fazla mikroçekirdek gözlemek mümkündür. Bukkal mukozadaki MÇ sıklığının alt sınırı; 0,5-2,5 MÇ/1000 hücredir. Birden fazla mikroçekirdek içeren hücreler, sağlıklı bireylerde nadirdir, ancak, radyasyona ve genotoksik ajanlara maruz bireylerde daha yaygındır. Mikroçekirdek, hücrenin sitoplazmasında lokalize olur. MÇ, farklılaşmış hücrelerde sayılır. Bazal hücrelerde de görülebilir. Ancak düşük frekansta olduğu için değerlendirilmesi pratik değildir. Piknotik, kondanse kromatin, karyohektik ve karyolitik hücreler, MÇ açısından değerlendirilmez (Thomas ve diğerleri, 2009).

Bir kimyasal bileşik, düşük derecede sitotoksisite gösterdiği veya sitotoksisite göstermediği konsantrasyonlarda genetik hasara yol açıyorsa 'genotoksik' olarak adlandırılır. Genotoksik etkiler, ayrıca alt-sitotoksisite doz aralığında da görülebilir. Sitotoksik dozlarda, DNA hasarı da indüklenebilir. Çünkü hücreler nekrotikleşir ve DNA'ları degrade olur. Ancak bu süreç kimyasalın genotoksik olduğu anlamına gelmez (Gebel, 2001). Dolayısıyla mikroçekirdek sıklığında artan konsantrasyonda genotoksin maruziyetine bağlı olarak artış görülmemesinin muhtemel sebepleri, maruz dokuda yüksek sitotoksisite bulguları olabilir. İkincisi, azalan hücre proliferasyon oranı, mikroçekirdek sıklığını negatif etkiler.

i) Genotoksik hasar, hücrenin çoğalarak mikroçekirdek üretimini gerektirir.

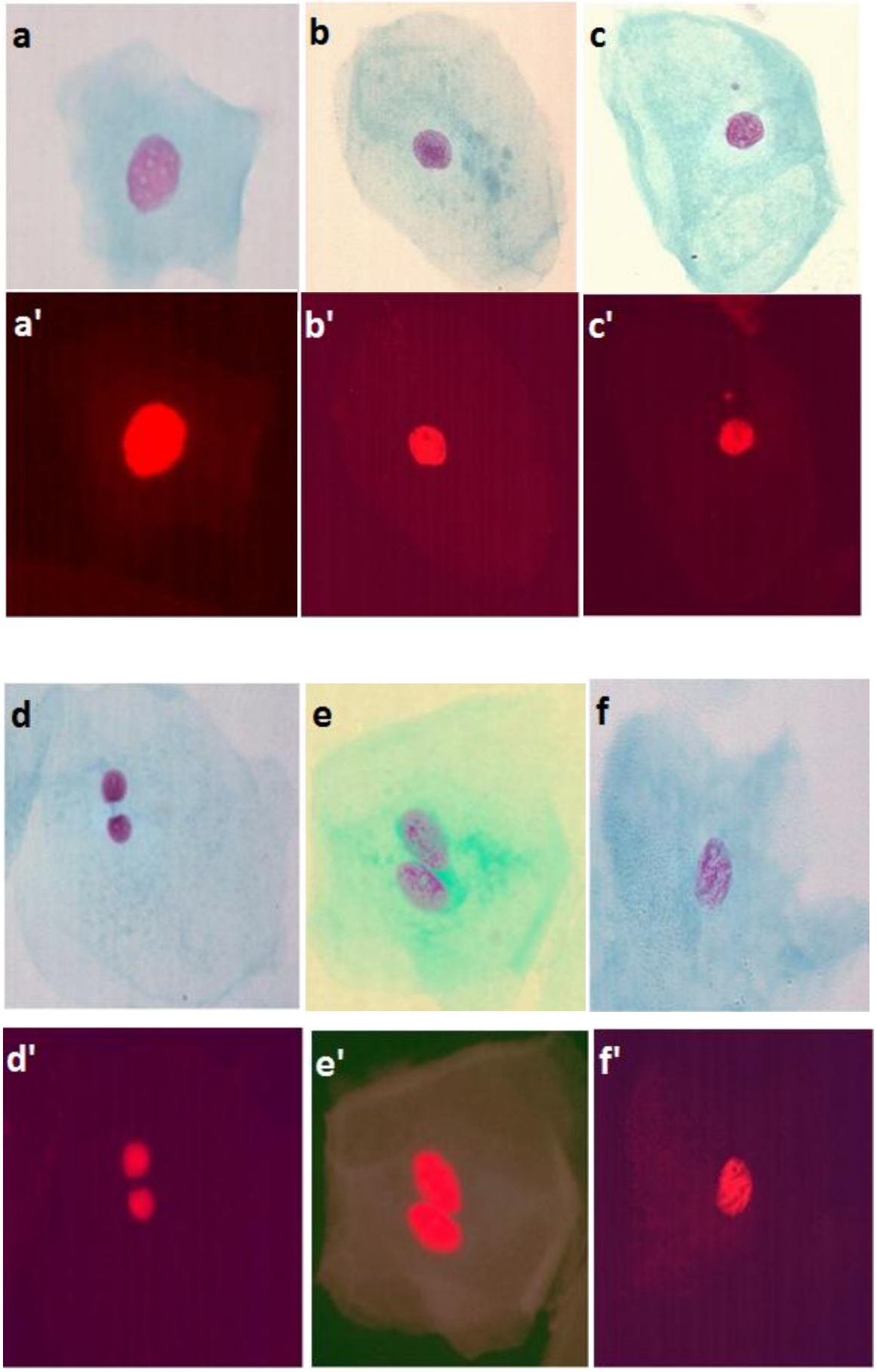
ii) Azalmış hücre proliferasyonu hücrelere kendini tamir etmek için zaman tanır (Moore ve diğerleri, 1996).

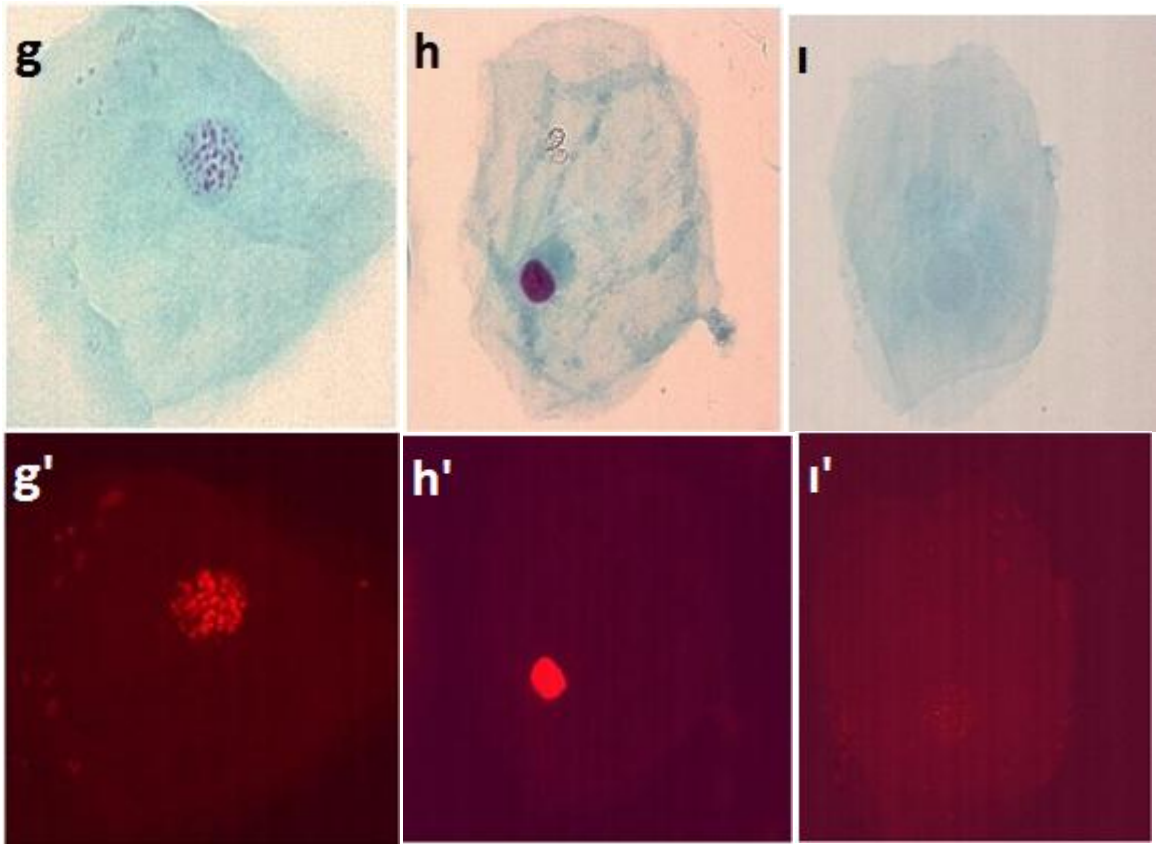
2.10.2. Yanak epitel hücrelerinde mikroçekirdek dışındaki diğer çekirdek anomalilerinin analizi

Yanak epiteli mikroçekirdek yöntemi, kromozomal değişiklikleri, gen amplifikasyonlarını (nükleer tomurcuk), sitokinezis defekti ile anöploid oluşumları (binükleer) ve çeşitli hücre ölümü olaylarını (karyohektik, piknotik, karyolitik) değerlendirmeye de olanak sağlayan bir yöntemdir (Bonassi ve diğerleri, 2011). Bukkal mukozadaki mikroçekirdek dışındaki diğer anomalili hücreler ve karakteristikleri Çizelge 2.5'de özetlenmiştir.

Nükleer tomurcuk (Resim 2.6;d), ana çekirdeğin uç kısmında yer alan daha ince ve belirgin bir yapıdır ve tomurcuklanma ile çekirdek materyalinin kaybı olarak değerlendirilir. Ayrıca 'kırık yumurta' (broken egg) olarak da isimlendirilebilmektedir. NT ve ana çekirdek çok yakın mesafede bulunurlar ve birbirlerine bağlı görünürler. NT, çekirdekle aynı morfolojidedir ve aynı boyanma özellikleri gösterir. Ancak boyutları ana çekirdek boyutunun yarısı ile 4'te 1'i arasında değişmektedir (Thomas ve diğerleri, 2009). Nükleer tomurcuklanmanın genomik instabilite ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Fenech ve diğerleri, 2011). Genomik instabilite, hücrenin yaşam döngüsü sürecinde genomik değişikliklere eğilimininin artması olarak tanımlanır ve tümör oluşumuna giden itici bir güçtür (Shen, 2011).

NT oluşumuna neden olan mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Ancak yanlış DNA tamiri veya amplifiye olmuş DNA'nın kaybı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Thomas ve diğerleri, 2009). Çeşitli özel koşullarda gen amplifikasyonları indüklenmiş yanısıra orta derecede folik asit eksikliği olan hücre kültürlerinde NT oluşumu gözlenmiştir. Shimizu ve diğerleri (1998), memeli hücrelerinde amplifiye olmuş DNA'nın çekirdek periferinde spesifik bir bölgede lokalize olduğunu ve hücre döngüsünün *S* fazında tomurcuklanma ile atıldığını göstermiştir. Amplifiye olmuş DNA, asentrik ve atelomerik mini halkalara (double minute) dönüşerek kromozomlardan elimine edilebilir. NT, mikroçekirdek (MÇ) ile aynı morfolojidedir. Ancak, mikroçekirdekten farklı olarak tomurcuklanma sürecinin evresine göre dar veya geniş bir sap ile çekirdeğe bağlıdır (Fenech ve diğerleri, 2011).


a
b
c
a'
b'
c'
d
e
f
d'
e'
f'



Resim 2.6. Mikroçekirdek yöntemi Yanak epitel hücrelerinde ile değerlendirilen çekirdek anomalilerinin ışık mikroskobu ve floresans mikroskop altındaki görüntüleri *a,a')Bazal hücre, b,b')Normal farklılaşmış hücre, c,c')Mikroçekirdekli farklılaşmış hücre, d,d')Nükleer tomurcuk, e,e')Binükleer, f,f')Kondanse Kromatin, g,g')Karyohektik, h,h')Piknotik, ı,ı')Karyolitik* (Bolognesi ve diğerleri, 2013)

Lindberg ve diğerleri (2007), folik asit eksikliği olan hücrelerde, sentromer ve telomer probları kullanarak MÇ ve NT oluşum mekanizmasını araştırmış ve bu iki oluşumun kısmen farklı mekanistik kökenlere sahip olduğunu bulmuştur. Telomerik ve sentromerik DNA'nın, MÇ oluşumunda (%62 ve %22, sırasıyla) , nükleer tomurcuğa (%44 ve %10, sırasıyla) göre daha sık bulunduğunu gözlemişlerdir. Folat eksikliği ise, hem NT hem de MÇ oluşumunu arttırmaktadır.

Binükleer hücreler (Resim 2.6;e), bir hücre içerisinde iki ana çekirdek içerir. Genellikle birbirlerine çok yakındırlar, hatta birbirlerine dokunabilirler ve genellikle normal hücrelerde olduğu gibi benzer morfolojidedirler. Bu hücrelerin önemi bilinmemektedir. Fakat sitokinezis defektine işaret ettiği düşünülmektedir. Hızlı yaşlanma gösteren, kanser ile nörodenejeneratif hastalıklar açısından risk taşıyan Down sendromlu hastalarda, binükleer hücre sıklığında anlamlı artış gözlenmiştir (Bonassi ve diğerleri, 2011).

Kondanse kromatinli hücreler (Resim 2.6;f), agrege olmuş kromatinlerin yoğun boyandığı kabaca çizgili bir desen gösterir. Bu hücrelerde çekirdeğin bazı bölgelerinde kromatinler agrege olurken, bazı bölgelerde ise kaybolmuştur. Kromatin agregasyonu yoğun olduğu zaman, çekirdek parçalanması (fragmentasyon) görülebilir. Bu hücreler apoptozisin erken evresine işaret ediyor olabilir. Bu hücreler, karyohektik hücreler gibi, çekirdek parçalanması ile sonuçlanır ve bazen hücre içerisinde mikroçekirdeğe benzer yapılar görülebilir. Ancak bu yapılar MÇ olarak sayılmaz (Thomas ve diğerleri, 2009).

Karyohektik hücreler (Resim 2.6;g), kondanse kromatinli hücrelere kıyasla daha yoğun agrege olmuş kromatinli çekirdeğe sahiptir. Çekirdek parçalanmasını gösteren yoğun benekli bir yapı sergiler ve ilerleyen aşamalarda çekirdek dağılır. Apoptozisin ileri evrelerine işaret ediyor olabilir. Bu hücreler, MÇ oluşumu açısından değerlendirilmez (Thomas ve diğerleri, 2009).

Piknotik hücreler (Resim 2.6;h), küçük, büzüşmüş çekirdekle karakterizedir, yoğun dansitedeki çekirdek materyali homojen ve şiddetli boyanır. Boyutları, normal farklılaşmış hücre çekirdeği çapının 1/3'ü ile 2/3'ü arasındadır. Piknotik hücrelerin oluşumuna yol açan mekanizma ve bu hücrelerin biyolojik önemi henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak, bir çeşit hücre ölümüne giden hücreler olduğu düşünülmektedir (Thomas ve diğerleri, 2009).

Karyolitik hücreler (Resim 2.6;ı), hücre ölümü sürecinin çok ileri bir evresini göstermektedir ve çekirdekleri tamamen kaybolmuştur. Feulgen boyaması ile çekirdeğin sadece gölgesi görülür ve çekirdek DNA'sı tamamen dağılmıştır (Thomas ve diğerleri, 2009).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney ve Kontrol Grubunun Seçimi

Bu tez çalışmasında yer alan bireyler, Nevşehir ili kapsamında yürütülmekte olan TÜBİTAK Projesinde (*İçme Sularında Arsenik Kirliliği Olan Bölgelerde yaşayan Bireylerdeki Sağlık Risklerinin Moleküler Epidemiyolojik Yöntemlerle Araştırılması,109S419; G.Ü. Yerel Etik Kurulu, 15.06.2009, No.340;* EK-1) yer alan 10 köyden 4 'ünde yaşayan bireylerden oluşmaktadır.

Bu çalışmada içme suyu As konsantrasyonu, >50 µg/l olan Küçükayhan (139,4-159,2 µg/l) ve Emmiler (52,1-72,1 µg/l) köyünde yaşayan bireyler (n=99) deney grubu olarak, içme suyu As konsantrasyonu <10 µg/l olan Eskiyaylacık (0,9- 1,5 µg/l) ve Alkan köyünde (<0,4 µg/l) yaşayan bireyler (n=95) kontrol grubu olarak seçilmiştir.

İnceleme bölgesinde en az 1 yıldır oturan bireyler çalışma kapsamına alınmıştır. Kanser hastası ve hepatitli bireyler kapsam dışı bırakılmıştır. Katılımcılara, 1 hafta boyunca balık tüketmemeleri bildirilmiştir. Tüm bireylere gönüllü onam formları imzalatıldıktan sonra, yaş, cinsiyet, eğitim durumu, boy, vücut ağırlığı, sigara, alkol (evet/hayır) ve beslenme alışkanlıkları, genel sağlık durumu, ilaç ve vitamin alımı, içme, yemek pişirme için kullanılan su kaynakları, ikamet süresi, meslek ve akrabalık derecesi gibi soruları içeren anket formlarının doldurulması sağlanmıştır (EK-2). En az 1 yıldır sigara içen bireyler, sigara içen olarak, 1 yıldan fazladır sigara içmeyenler sigara içmeyi bırakmış olarak kabul edilmiştir (Burgaz ve diğerleri, 2011).

Bireylerden saç ve yanak epitel hücre örnekleri eş zamanlı olarak toplanmıştır. Alınan biyolojik örnekler, özelliklerine uygun koşullarda analiz edilinceye kadar saklanmıştır. Tez kapsamındaki köylere ait içme suyu As konsantrasyonları ve bireylerin idrar total As konsantrasyonları için TÜBİTAK projesinde elde edilen veriler kullanılmıştır.

3.2. Biyolojik Örneklerin Toplanması

Saç örneklerinin alınması

Her bireyin mümkün olduğunca aynı bölgesinden olmak üzere, kulak arkasından veya enseden, mümkün olduğunca deriye yakın bölgeden (1 cm çapında) 300-500 mg saç örneği makasla kesilerek alınmıştır. Kesilen saçlar, önceden nitrik asit-su (1:1) karışımında yıkanmış kapaklı polietilen kaplarda, buzdolabında (+4 °C) tayin işlemine kadar saklanmıştır. Her bir numuneye kod verilmiş ve üzeri etiketlenmiştir.

Yanak epitel hücrelerinin alınması

Bireylerin ağzının su ile çalkalanarak temizlenmesinden sonra, ıslak abeslang yardımıyla her iki yanağın iç kısmına sürtülerek alınan süründü, distile su ile ıslatılmış ikişer lam üzerine yayılıp oda sıcaklığında kurutulmuştur. Lamlar, %80 metanol içinde 10 dk tutularak hücreler lama sabitlenmiş (fiksasyon) ve ardından oda sıcaklığında kurutulmuştur.

3.3. Saç Örneklerinin Analizi

Analiz için kullanılan kimyasal maddeler

* Aseton (C_3H_6O) *(TEKNİK)*
* Nitrik asit (HNO_3) *(MERCK®)*
* Hidrojen Peroksit (H_2O_2) *(MERCK®)*
* Sülfürik Asit (H_2SO_4) *(MERCK®)*
* Sodyumborohidrür ($NaBH_4$) *(SİGMA®)*
* Sodyum Hidroksit (NaOH) *(SİGMA®)*
* Potasyum iyodür (KI) *(SİGMA®)*
* Askorbik asit ($C_6H_8O_6$) *(SİGMA®)*
* Hidroklorik asit (HCl) *(MERCK®)*
* Arsenik standart çözeltisi [0,5 mol/l HNO_3 içerisinde H_3AsO_4 (arsenik asit) -1000 mg/l (ppm) As] *(MERCK®)*

Analiz için kullanılan çözeltiler

- KI-Askorbik asit çözeltisi
- $NaBH_4$ - NaOH çözeltisi
- 1,5 M HCl

Analiz için kullanılan alet ve malzemeler

- Çalkalayıcı
- Etüv
- Laminar akış ünitesi
- Kuyucuklu hot plate
- Hassas terazi
- Mikropipet *(EPPENDORF®)*
- Özel yapım cam yıkılama tüpü (20 ml)
- Kapaklı plastik kap
- Kapaklı polipropilen deney tüpü
- Balonjoje
- Beher
- Pipet ucu
- Tüplük
- Pens
- Piset
- Metal spatül
- Eldiven

KI-Askorbik asit çözeltisi: Çözelti, %50 a/h KI ve %10 a/h askorbik asit olacak şekilde hazırlanmıştır. 50 gr KI ve 10 gr askorbik asit tartılıp, deiyonize suda çözülmüş ve deiyonize su ile 100 ml hacme tamamlanmıştır.

$NaBH_4$ - NaOH çözeltisi: Çözelti, %1,4 a/h $NaBH_4$ ve %0,8 a/h NaOH olacak şekilde hazırlanmıştır. 8 gr NaOH tartılıp, deiyonize suda çözülmüş ve üzerine 14 gr $NaBH_4$ ilave edilip deiyonize su ile 1000 ml hacme tamamlanmıştır.

1,5 M HCl: Konsantre HCl stok çözeltisinden 125 ml alınıp, deiyonize su ile 1000 ml hacme tamamlanmıştır.

3.3.1. Analiz öncesi ön işlemler

Ön yıkama işlemi

Analiz işleminden önce havadan, yıkama suyundan veya kozmetiklerden saç yüzeyine adsorbe olmuş eksternal arsenik kontaminasyonunu elimine etmek amacıyla 'ön yıkama işlemi' yapılmıştır. İlk olarak saç örnekleri deiyonize su ile çalkalayıcıda 15 dk bekletildikten sonra, aseton:deiyonize su (1:1) karışımında 10'ar dk 2 kez yıkanmıştır. Etüvde, 55 °C' de bir gece boyunca kurutulmuştur.

Asit yıkılama işlemi

Her numuneden iki paralel olmak üzere, 30-100 mg arasında saç örneği tartılmış ve yıkılama tüplerine alınmıştır. Her bir saç örneği üzerine 3,0 ml konsantre nitrik asit (HNO_3) ve 1,0 ml hidrojen peroksit (H_2O_2) eklendikten sonra, çeker ocak altında, kuyucuklu hot plate üzerinde köpürene kadar ısıtılmıştır. Saç numuneleri, 50 °C civarında köpürmeye başlamış, köpüren numunelerin taşmaması için sıcaklığın 80 °C'yi aşmamasına dikkat edilmiştir. Köpüklenme sonlandığında sıcaklık 130-140 °C'ye çıkarılarak 20 dk. bekletildikten sonra soğutulmuş ve üzerine 0,5 ml konsantre sülfürik asit (H_2SO_4) eklenmiştir. Tekrar hot plate üzerine alınan tüpler, sırasıyla, 170 °C'de 20 dk ve 220 °C'de 20 dk ve 280 °C'de yarım saat bekletilmiştir. Tüpler, beherde soğuk su içerisinde soğutulduktan sonra, kapaklı polipropilen deney tüplerine, toplam hacim 10 ml olacak şekilde deiyonize su ile seyreltilerek alınmış ve analize kadar buzdolabinda (4 °C) saklanmıştır.

Asit yıkılama işlemi ile saç numunesindeki organik bileşiklerin tahrip edilmesi ve arseniğin inorganik ortamda elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu işlemde tüm organik arsenik bileşikleri (DMA, MMA, arsenoşekerler vs...) parçalanmış ve tüm As türleri, inorganik As(V)'e oksitlenmiştir. Her bir numuneden iki ayrı tüpe 2,5 ml numune, 1,25 ml der. HCl ve 200 µl KI-askorbik asit çözeltisi konup, 10 ml'ye deiyonize su ile tamamlanmıştır. KI- askorbik asit ilavesiyle, As(V)'in As(III)'e indirgenme basamağının tamamlanması için, en az 2 saat

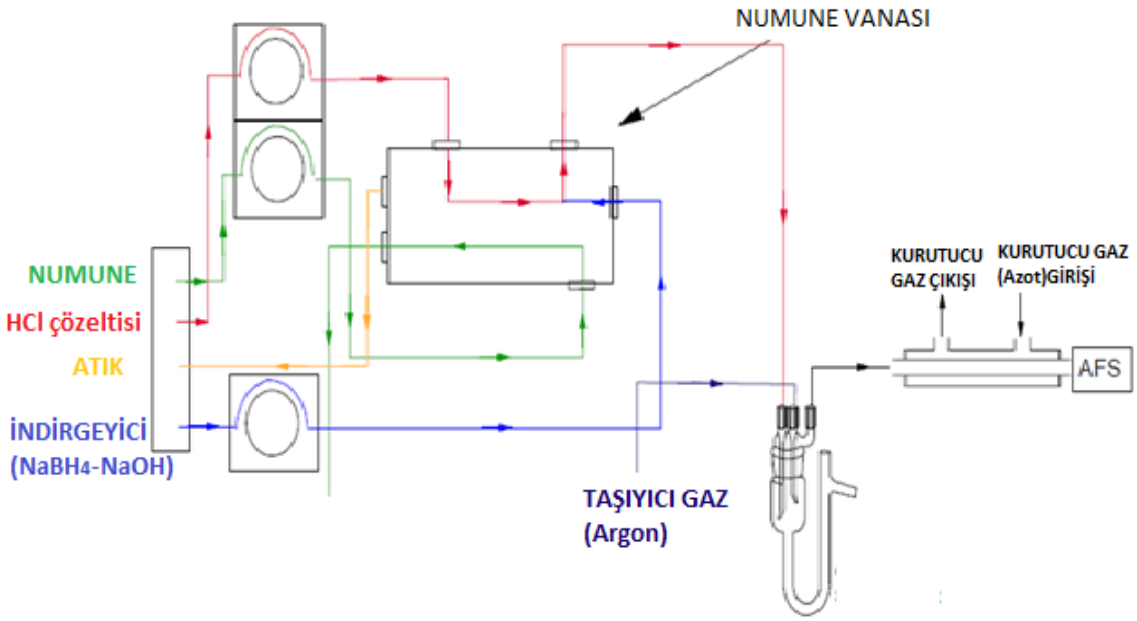
beklenmiştir. Bekleme işleminden sonra her bir saç numunesinden 4 paralel çözelti olmak üzere, numuneler total As tayini için hazır hale gelmiştir.

3.3.2. Tayin işlemi

Analiz için uygun duruma getirilmiş saç örneklerindeki total arsenik tayini için, PSA 10.055 Millenium Excalibur Atomik Floresans Spektrometre cihazı (AFS) kullanılmıştır. Arsenik tayininde, hidrür oluşturma tekniği kullanılmıştır ve mekanizması aşağıdaki gibidir.

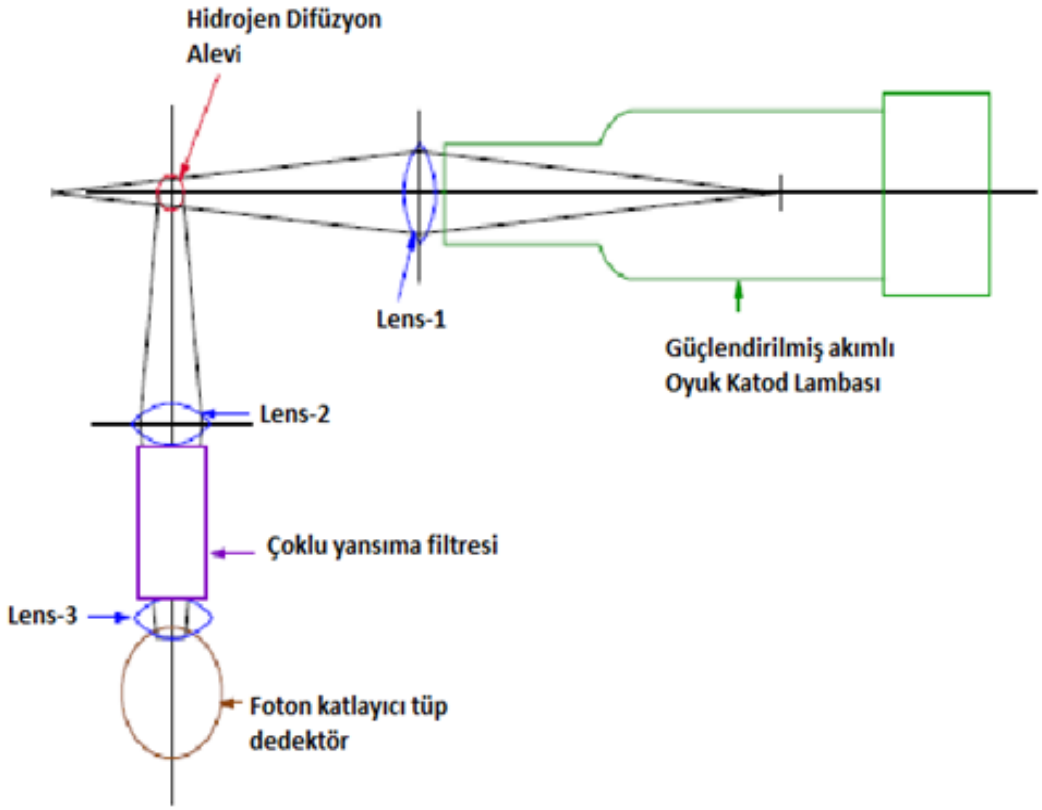
$$NaBH_4 + 3H_2O + HCl \longrightarrow H_3BO_3 + NaCl + 8H \longrightarrow \mathbf{AsH_{3(g)}} + H_2$$

$NaBH_4$ ve HCl çözeltisi peristaltik pompa yardımıyla dakikada ve 4,5 ml akış hızında basılarak T bağlantısı vasıtasıyla karıştırılmaktadır. Yukarıda verilen reaksiyon ile açığa çıkan hidrojen gazı, gaz-sıvı ayırıcısında sıvı kısımdan ayrılıp taşıyıcı olarak kullanılan argon gazı (250 ml/dk akış hızı) vasıtasıyla kurutucudan geçmekte ve alev başlığında yakılarak atomlaştırıcı görevi görmektedir. Ölçüm komutu verildiğinde bilgisayar kontrollü selonoid vana, HCl çözeltisinin akışını yine aynı HCl derişiminde hazırlanmış numune ile değiştirir ve yukarıda verilen reaksiyonda gösterildiği gibi numunedeki arsenik, **$AsH_{3(g)}$**'e dönüştürülür.



Şekil 3.1. PSA 10.055 Millenium Excalibur cihazının şematik gösterimi

Hidrür haline gelen arsenik (AsH_3) ve hidrojen (H_2), Ar gazı vasıtasıyla kurutucudan geçirilerek hidrojen difüzyon alevine taşınır ve AsH_3, alevde elemental (As^0) hale geçer, yani atomlaşır. Atomlaştırılan arsenik, arsenik oyuk katot lambasından aleve odaklanmış 193,7 nm dalga boyundaki ışığı absorblayarak uyarılmış hale geçer. Uyarılmış haldeki arsenik atomlarının temel hale dönerken yaptığı 193,7 nm dalgaboyundaki floresans ışıma şiddeti dedektör tarafından kaydedilir.



Şekil 3.2. AFS cihazının optik kısmı

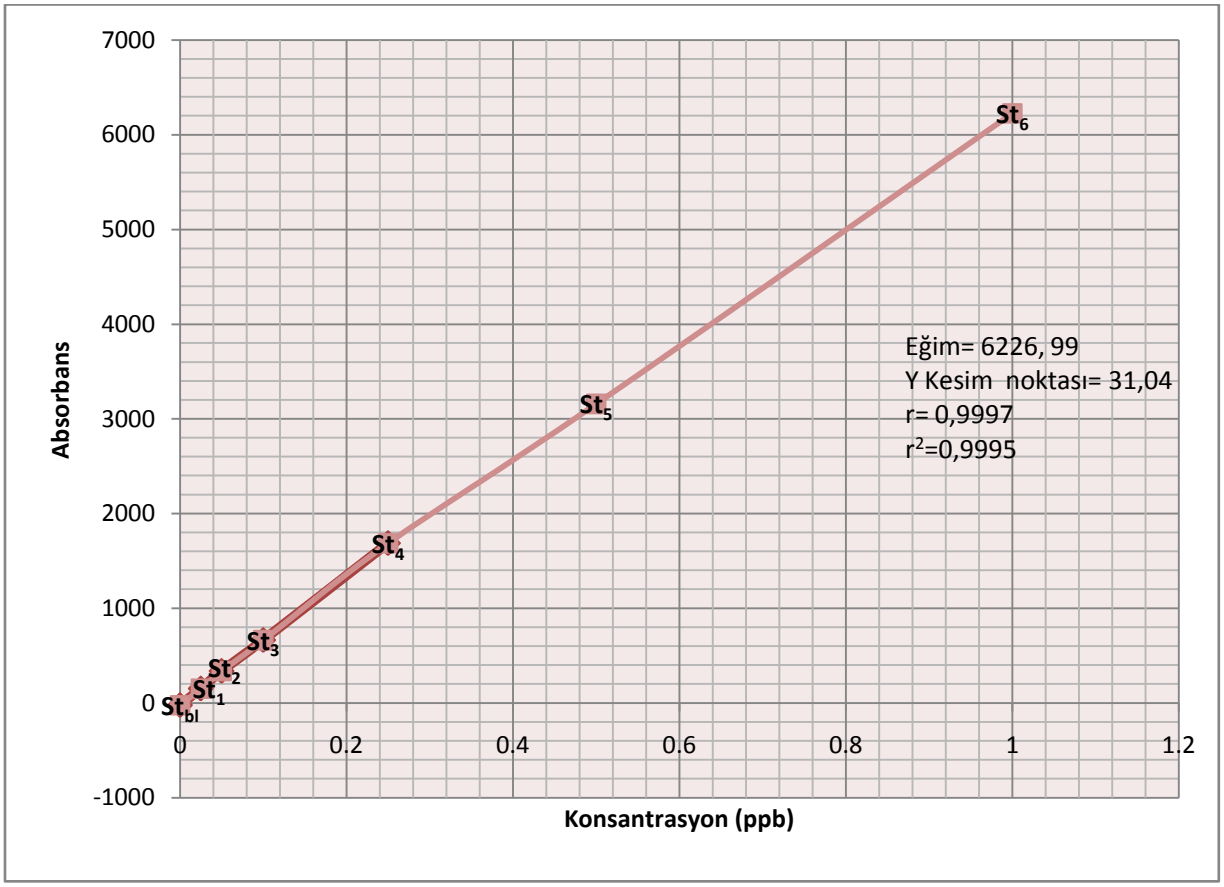
Çizelge 3.1. Arsenik analizinde AFS cihazında uygulanan metod karakteristikleri

Element- Matriks	As- Saç	
Enstrüman	PSA 10.005 Millenium Excalibur Floresans Spektrometre cihazı	
Ölçüm modu	Pik alanı	
Dalga Boyu	193,7 nm	
Standart/örnek tekrarı	2	
Amplifikasyon	10 ve 100	
Birincil lamba akımı (mA)	27,5	
Güçlendirilmiş akım (mA)	35	
Taşıyıcı gaz (argon) akış hızı	250 ml/dk	
Kurutucu gaz (azot) akış hızı	2,5 l/dk	
Numune akış hızı	4,5 ml/dk	
$NaBH_4$ akış hızı	4,5 ml/dk	
Reslope	10/numune	
Standart konsantrasyonları	Kontrol grubu (ppb)	➢ St_{bl} = 0 ➢ St_1 =0,025 ➢ St_2=0,05 ➢ St_3=0,10 ➢ St_4=0,25 ➢ St_5=0,50 ➢ St_6=1,0
	Deney grubu (ppb)	➢ St_{bl}=0 ➢ St_1=0,10 ➢ St_2=0,25 ➢ St_3=0,50 ➢ St_4=1,0 ➢ St_5=2,5 ➢ St_6=5,0

Standartların hazırlanması ve kalibrasyon

Standart arsenik çözeltileri, As(V) formunda arsenik içeren stok arsenik çözeltisinden *(Merck®)* hazırlanmıştır. Standart ve numune çözeltilerine aynı oranda KI:askorbik asit karışımı eklenerek çözeltideki tüm As(V), As(III)'e indirgenmiştir.

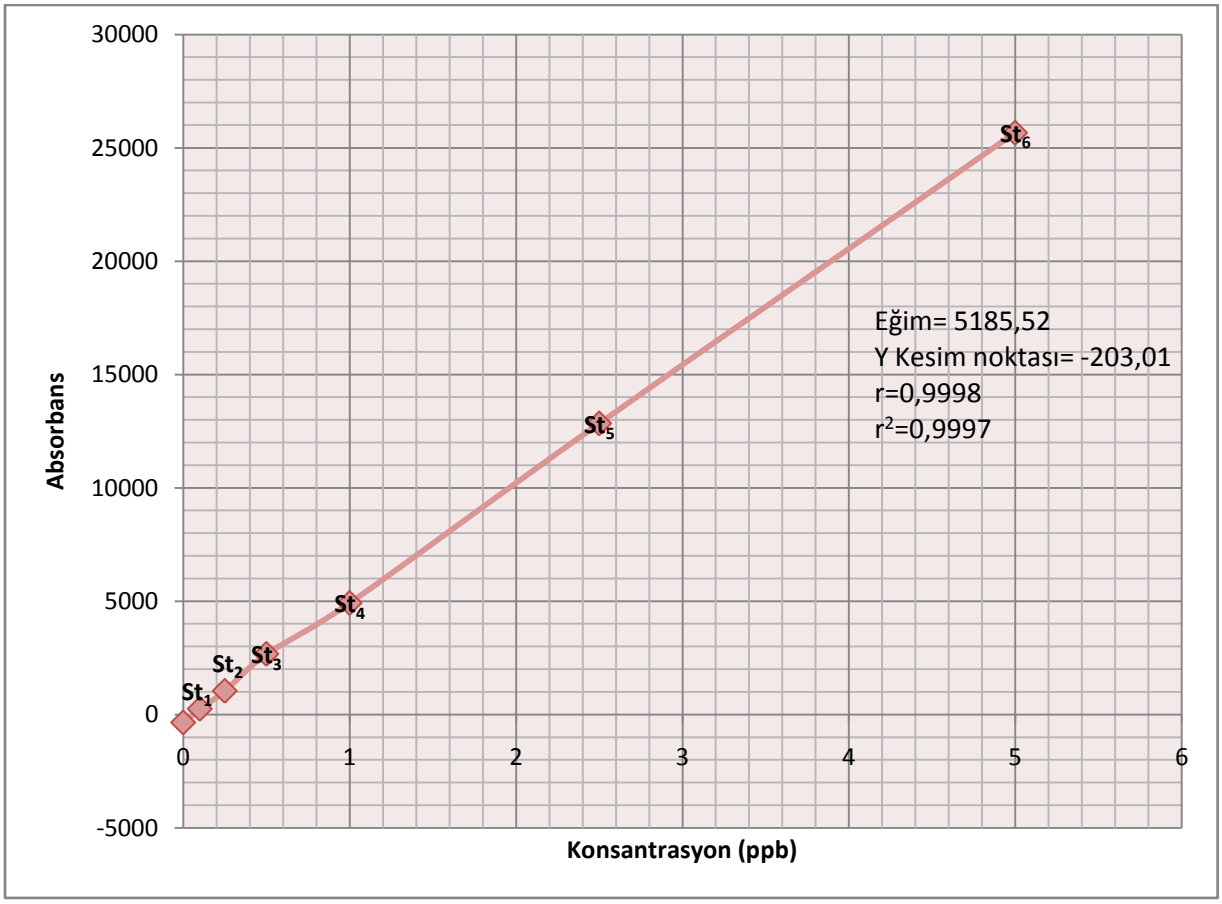
Ölçüm sonuçlarının doğrusal aralık içerisinde kalması açısından kontrol ve deney grubu ayrı ayrı iki farklı kalibrasyon eğrisi tasarlanmıştır. Kontrol grubu için arsenik standart konsantrasyonları; 0 - 0,025 ppb - 0,05 ppb - 0,10 ppb - 0,25 ppb - 0,50 ppb - 1,0 ppb As'dır. Bu değerlere, çalışmada ölçülebilecek en düşük ve en yüksek arsenik konsantrasyonuna literatür taraması yapılarak karar verilmiştir. Çok düşük hacimlerle çalışmaktan kaynaklanan hata payını azaltmak amacıyla kontrol grubu için standart çözeltiler, 10 ppb As (ara stok) üzerinden hazırlanmıştır. Kontrol grubuna ait kalibrasyon grafiği örneği Şekil 3.3'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Kontrol grubuna ait kalibrasyon grafiği örneği (546-556 kodlu numunelere aittir)

Kontrol grubunun ölçüm sürecinde, 0,025 ppb As standart çözeltisinin (St_1) floresans şiddetinin, blank çözeltisinin floresans şiddetine yakın olduğu görülmüştür. Ancak ölçüm sonuçlarının 0,025 ppb As düzeyinin üzerinde çıkmasından dolayı, St_1 'e gerek olmadığına karar verilmiş ve kalibrasyon grafiğinden çıkarılmıştır.

Deney grubu için arsenik standart konsantrasyonları; 0 - 0,10 ppb - 0,25 ppb - 0,50 ppb - 1,0 ppb - 2,5 ppb - 5,0 ppb As 'dır. Deney grubu için standart konsantrasyonları, 50 ppb As (ara stok) çözeltisi üzerinden hazırlanmıştır. Kontrol grubuna ait kalibrasyon grafiği örneği Şekil 3.4'de gösterilmiştir.



Şekil 3.4.Deney grubna ait kalibrasyon grafiği örneği (218-227 numaralı numunelere aittir)

3.3.3. Yöntem validasyonu

Bu yöntemin geçerliliği, doğruluk (accuracy), kesinlik ve tekrarlanabilirlik (precision- reproducibilty), teşhis sınırı ve tayin sınırı (LOD, LOQ), seçicilik (specificity) ve duyarlılık (sensitivity) ve doğrusal ölçüm aralığı parametrelerine göre değerlendirilmiştir.

Doğruluk (accuracy): Analitik yöntemin doğruluğu, yöntem ile elde edilen deneme sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır. Atomik floresans spektroskopisinde hidrür oluşturma yöntemi ile saç örneklerinde arsenik analizi yönteminin doğruluğu SRM NCS DC73347a Human hair (Beijing, China) referans materyal ile valide edilmiştir. Kullanılan sertifikalı referans materyalde As için sertifika değeri 0,28±0,05 µg/g'dır.

Öncelikle yıkılama işleminde kullanılacak en iyi asit karışımını bulmak için, referans materyal (SRM) kullanılarak bir dizi ölçüm işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. Yıkılama işleminde kullanılacak asit karışımının belirlenmesi amacıyla yapılan SRM analizi verileri

Kulanılan Asit Karışımı	Bulunan değer (ppm As)
$HNO_3 + H_2O_2 + H_2SO_4$	0,27±0,01
$HNO_3 + HClO_4 + H_2SO_4$	0,22±0,01
$HNO_3 + H_2SO_4$	0,23±0,01
$HNO_3 + HCl$	0,23±0,01
Sertifika Değeri	0,28±0,05

Yapılan ön çalışmada, nitrik asit-hidrojen peroksit-sülfürik asit karışımının, referans materyalin sertifika değerine en yakın sonucu verdiği ve kabul edilebilen aralık (0,23-0,33) içerisinde yer aldığı tespit edilmiş ve bu asit karışımının kullanılmasına karar verilmiştir.

Daha sonraki analiz işleminde, farklı miktarlarda tartılan saç numuneleri için kullanılan asit miktarlarının hacimsel yeterliliği test edilmiştir. Bunun için 30 mg ve 120 mg referans saç numunesi tartılmış (2'şer adet), aynı miktarda asitlerle yıkılama işlemi gerçekleştirildikten sonra tayin edilmiştir. Her bir tartımdan 2 paralel olmak üzere ölçüm sonuçları aşağıdaki gibidir.

Çizelge 3.3. Yıkılama işleminde kullanılan asit karışımının hacimsel yeterliliğinin belirlenmesi amacıyla yapılan SRM analizi verileri

SRM-1 (30 mg)	As değeri (ppm)	SRM-2 (120 mg)	As değeri (ppm)
1. paralel (1-1)	0,2787	1. paralel (1-1)	0,2756
2. paralel (1-2)	0,2841	2. paralel (1-2)	0,2775
3. paralel (2-1)	0,2865	3. paralel (2-1)	0,2812
4. paralel (2-2)	0,2812	4. paralel (2-2)	0,2809
ORT	0,2826 ± 0,003	*ORT*	0,2788 ± 0,002

Her iki sonuç da sertifikalı değere (0,28±0,05 ppm) oldukça yakındır ve yıkılama işleminde kullanılan asit miktarı, farklı ağırlıkta tartılan (30-120 mg aralığı için) saç numuneleri için yeterlidir. Yöntemin doğruluğunu tayini için yukarıdaki analizlerle birlikte belirli aralıklarla toplam 5 kez SRM analizi yapılmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Sertifikalı referans materyal (SRM) ile yapılan doğruluk çalışmasının özeti

Analiz No	*Hesaplanan Değer* (ppm As; Ort±SS)
SRM Analiz-1	0,2724 ± 0,0052
SRM Analiz-2	0,2826 ± 0,0030
SRM Analiz-3	0,2728 ± 0,0027
SRM Analiz-4	0,2832 ± 0,0016
SRM Analiz-5	0,2774 ± 0,0059
ORT	0,2776 ± 0,0036 (0,28±0,01)
Sertifika Değeri	0,28 ± 0,05

Kesinlik ve tekrarlanabilirlik (precision- reproducibilty): Bu çalışmada, ardışık ölçümler için % RSD<5 ve paralel çözeltiler için ise %RSD<10 sınır değer olarak kabul edilmiştir. %RSD>20 olan numuneler tekrar analiz edilmiştir.

Çizelge 3.5. Tekrarlanabilirlik verileri

Analiz No	Floresans şiddeti (pik alanı)
SRM-1-1	1,413948
SRM-1-2	1,470515
SRM-2-1	1,464422
SRM-2-2	1,454629
Standart Sapma (SS)	0,02
Relatif Standart Sapma (%RSD)	1,75

Teşhis sınırı ve tayin sınırı (LOD, LOQ):Teşhis sınırı, zemin gürültüsünden farklı olarak tespit edilebilen en düşük analit derişimidir. Tayin sınırı ise, uygun doğruluk ve kesinlikle miktarı saptanabilen en düşük derişimdir.

LOD= $\frac{3\ Sb}{m}$ *Sb*= Blank çözeltilerinin standart sapması

m= Kalibrasyon doğrusunun eğimi

LOD= 0,01 µg/g (50 mg tartım için hesaplanmıştır.)

LOQ= $\frac{10\ Sb}{m}$

LOQ= 0,033 µg/g (50 mg tartım için hesaplanmıştır.)

Seçicilik ve duyarlılık (specificity- sensitivity): Analitik yöntemin seçiciliği, örnekte varlığı tespit edilmiş, analit ile girişim yapabilen diğer bileşenlerden farklı olarak sadece analiti ölçme yeteneğidir. HG-AFS yöntemi doğası gereği oldukça seçicidir. Çünkü;

i) Hidrür düzeneklerinde, analit seçici olarak uçucu hale geçirilmekte ve matriksten ayrılmaktadır.

ii) Arsenik oyuk katod lambasından elde edilen ve durulma sırasında ve izlenen 193,7 nm dalga boyundaki floresans ışıma, arseniğe spesifiktir.

Dolayısıyla filtreden geçerek dedektöre ulaşabilen radyasyon, sadece uyarılmış arsenik atomlarının yaptığı floresans ışımadan kaynaklanmaktadır.

iii) Işık kaynağından gelen floresans dalga boyundaki ışıkların dedektöre ulaşarak girişim yapmaması için, dedektör ve ışık kaynağı birbirine dik pozisyonda (90°) yerleştirilmiştir (Şekil 3.2).

Dolayısıyla, yöntem yüksek seçiciliğe sahiptir.

3.4. Yanak Epiteli Hücrelerinde Mikroçekirdek Yöntemi

Analiz için kullanılan kimyasal maddeler

* Metanol (CH_3OH) *(MERCK®)*
* Hidroklorik asit (HCl) *(MERCK®)*
* Pararosanilin *(MERCK®)*
* Sodyumbisülfit ($NaHSO_3$) *(SİGMA-ALDRİCH®)*
* Aktif kömür *(MERCK®)*
* Etanol (C_2H_6O) *(MERCK®)*
* Fast green *(MERCK®)*
* Ksilen *(MERCK®)*
* Distile su

Analiz için kullanılan çözeltiler

- % 80 metanol çözeltisi
- 1M HCl çözeltisi
- Feulgen boyası
- Fast green boyası
- %10 Ksilen

Analiz için kullanılan alet ve malzemeler

- Tahta spatül (abeslang)
- Lam
- Lam saklama kutusu
- Şale
- Erlen
- Beher
- Mezür
- Balonjoje

- Huni
- Renkli, kapaklı şişe
- Termometre
- Hassas terazi
- Porselen spatül
- Cam baget
- Süzgeç kağıdı
- Alüminyum folyo

%80 metanol çözeltisinin hazırlanması: 80 ml metanol, distile su ile 100 ml hacme tamamlanmış ve iyice karışması sağlanmıştır.

5M HCl çözeltisinin hazırlanması: 415 ml konsantre HCl (%37 a/h), çeker ocak altında, buz banyosunda, distile su ile 1000 ml hacme tamamlanmıştır.

Feulgen boyasının hazırlanması: 1 gr pararosanilin, laminar akış altında, 100 ml kaynamış distile suda çözülmüştür. Sıcaklığın 60 °C'ye düşmesi beklenmiş ve bir termometre yardımıyla sıcaklık kontrol edilmiştir. Sıcaklığın 60 °C'nin altına düşmesi boyanın çökmesine neden olacağı için bu aşamada hassas davranılmıştır. Sıcaklık 60 °C'ye düştüğünde, süzgeç kağıdından süzülmüştür. Çözeltiye 2 gr sodyumbisülfit (sodyum metabisülfit) ve 20 ml 1M HCl çözeltisi eklenmiş ve iyice karışması sağlanmıştır. Çözelti alüminyum folyo kaplı bir şişeye alınmış ve oda sıcaklığında, karanlıkta 24 saat bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda, 300 mg aktif kömür tartılıp çözeltiye eklenmiş ve 1 dk boyunca kuvvetle çalkalanmıştır. Çözelti koyu renkli bir şişeye, süzgeç kağıdından süzülerek alınmış ve bu aşamada renginin şeffaf olduğu gözlenmiştir. Feulgen boyası ışıktan etkilendiği için hazırlama işlemi mümkün olduğunca karanlıkta yapılmış ve kullanılan cam malzemeler alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Çözelti, +4 °C'de buzdolabında saklanmış, kullanımı esnasında su ile temas etmemesine dikkat edilmiştir.

Fast Green boyasının hazırlanması: 0,5 gr fast green tartılıp, 100 ml %95 etanolde çözülmüştür. Whatman kağıdı kullanılarak süzülmüş ve kahverengi şişede, oda sıcaklığında, karanlıkta saklanmıştır.

3.4.1. Preparatların hazırlanması ve boyanması

Fiksasyon işleminin ardından, lamlar şaleler içerisine yerleştirilmiş ve Feulgen-fast green boyaması (Thomas ve Fenech, 2011) modifiye edilerek uygulanmıştır. 5M HCl içerisinde oda sıcaklığında 30 dk tutulduktan sonra 3 dk çeşme suyu altında yıkanmıştır. Tamamen kurutulan lamlar, alüminyum folyo kaplı, kuru ve temiz şalelerin içine alınmış ve 90 dk Feulgen boyasının içerisinde, oda sıcaklığında, karanlıkta bekletilmiştir. Bekleme işlemi sonunda, lamlar distile su içerisinde 10-15 dk bekletilmiş ve daha sonra kurutulmuştur. Kurutulan lamlar, fast green çözeltisinde 5-10 saniye tutulmuş ve sonra %50 etanolden daha sonra %20 etanolden geçirilerek fazla fast green boyası uzaklaştırılmıştır. Boyama işlemi tamamlanan lamlar iyice kurutulmuş ve çeker ocak altında, %10 ksilen içerisinde 10 dk bekletilerek boyanın sabitlenmesi sağlanmıştır.

3.4.2. Mikroskobik değerlendirme

Mikroskobik değerlendirmede, tüm lamlar değerlendirmeyi yapan araştırıcı dışında iki araştırıcı tarafından yeniden kodlanmıştır. Boyanan preparatlarda her birey için toplam 2000 hücreki mikroçekirdek (MÇ), mikroçekirdekli hücre ve nükleer tomurcuk (NT) sıklıkları, x400 büyütmede ışık mikroskobu (ZEİSS® Primostar binoküler ışık mikroskobu) altında değerlendirilmiştir. Nükleer tomurcuk dışındaki diğer çekirdek anomalileri; binükleer, kondanse kromatin, karyohektik, piknotik, karyolitik hücre sıklıkları, 1000 hücrede, x400 büyütmede ışık mikroskobu altında değerlendirilmiştir. Bu parametrelere ait değerlendirme, Tolbert ve diğerlerinin (1992) kriterlerine göre yapılmıştır. Teknik yetersizlik nedeniyle 34 kişide MÇ, MÇ'li hücre ve nükleer tomurcuk 1000 hücrede değerlendirilmiştir. Ayrıca aynı 34 kişi, diğer çekirdek anomalileri açısından da değerlendirilememiştir. Sonuçlar ‰ sıklık cinsinden ifade edilmiştir.

3.5. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi, SPSS for Windows 11.5 paket programında yapılmıştır. Sürekli ve kesikli sayısal değişkenlerin normal dağılıma uygun dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov Smirnov testiyle, varyansların homojenliğiyse Levene testiyle araştırılmıştır. Sürekli ve kesikli sayısal değişkenler için veriler ortalama ± standart sapma veya medyan

(minimum - maksimum) şeklinde, kategorik değişkenler ise olgu sayısı ve (%) biçiminde gösterilmiştir.

Gruplar arasında ortalama değerler yönünden farkın anlamlılığı Student's t testi ile değerlendirilmiştir. Gruplar arasında medyan değerler yönünden farkın anlamlılığı bağımsız grup sayısı iki olduğunda Mann Whitney U testi ile ikiden fazla grup arasındaki farkın önemliliği ise Kruskal Wallis testiyle araştırılmıştır. Kategorik değişkenler Pearson'un Ki-Kare, Olabilirlik Oran veya Fisher'in kesin sonuçlu testiyle değerlendirildi. Sürekli ve kesikli sayısal değişkenler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olup olmadığı ise Spearman'ın sıra sayıları korelasyon testiyle araştırılmıştır.

Saç As ve MÇ ölçümlerindeki değişim üzerinde arsenik maruziyetinin istatistiksel olarak anlamlı bir belirleyiciliğinin olup olmadığı yaş, cinsiyet, sigara öyküsü ve diyabet öyküsü gibi diğer olası risk faktörlerine göre düzeltme yapılarak Çoklu Değişkenli Doğrusal Regresyon Analizi ile araştırılmıştır. Her bir değişkene ait regresyon katsayısı, %95 güven aralıkları ve t-istatistikleri hesaplanmıştır. Saç As ve MÇ ölçümleri normale yakın dağılmadığı için doğrusal regresyon analizlerinde logaritmik dönüşüm yapılmıştır.

$p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Demografik Bilgiler

Deney ve kontrol grubundaki bireylerin temel demografik özellikleri Çizelge 4.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Deney ve Kontrol grubundaki bireylerin temel demografik özellikleri

	Kontrol Grubu (n=95)	Deney Grubu (n=99)	*p-değeri*
Yaş (yıl)[a]	49,9±14,0	44,8±13,5	***0,010***
Yaş Grupları			***0,007***
≤50 yıl	46 (%48,4)	67 (%67,7)	
>50 yıl	49 (%51,6)	32 (%32,3)	
Cinsiyet			***0,015***
Erkek	44 (%46,3)	63 (%63,6)	
Kadın	51 (%53,7)	36 (%36,4)	
İkamet Süresi (yıl)[a]	39,5±20,0	36,8±15,0	*0,286*
Sigara Öyküsü			*0,278*
Yok	71 (%74,7)	67 (%67,7)	
Var	24 (%25,3)	32 (%32,3)	
Sigara (adet/gün)			*0,815*
1-10	3 (%12,5)	5 (%15,6)	
11-20	11 (%45,8)	12 (%37,5)	
>20	10 (%41,7)	15 (%46,9)	
Diyabet Öyküsü			*0,748*
Yok	91 (%95,8)	93 (%93,9)	
Var	4 (%4,2)	6 (%6,1)	
TWA- As (µg/l) [a,b]	0,8 ±3,2	112 ±34	***<0,001***
İdrar total As(µg/l)[c]	11 (0,9-109)	162 (6,5-457)	***<0,001***

[a]**Ortalama ± Standart sapma (SS),** [c]**Ortanca (minimum-maksimum)**

[b] **TWA (ug/l)=** $\frac{\sum C_i \times T_i}{\sum T_i}$ **C_i = şebeke, çeşme ya da özel kuyudaki As konsantrasyonu; T_i =içme süresi**

Çizelge 4.1'de de görüleceği üzere, deney grubu, kontrol grubu ile kıyaslandığında daha genç ***(p=0,010)*** ve cinsiyet açısından erkek ağırlıklıdır ***(p=0,015).*** Deney ve kontrol grubundaki bireyler, ikamet süresi, sigara öyküsü, sigara içme sıklığı ve diyabet öyküsü açısından benzer bulunmuştur ***(p>0,05).***

Çizelge 4.1'den de anlaşılacağı üzere, zaman ağırlıklı içme suyu As konsantrasyonları (TWA-As) ve idrar total As değerleri, deney ve kontrol grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur ***(p<0,001).*** Bu bulgular, deney grubundaki bireylerin yakın dönem As maruziyetinin olduğunu göstermektedir.

4.2. Deney ve Kontrol Grubu Bireylerin Saç Arsenik Düzeylerinin Karşılaştırılması

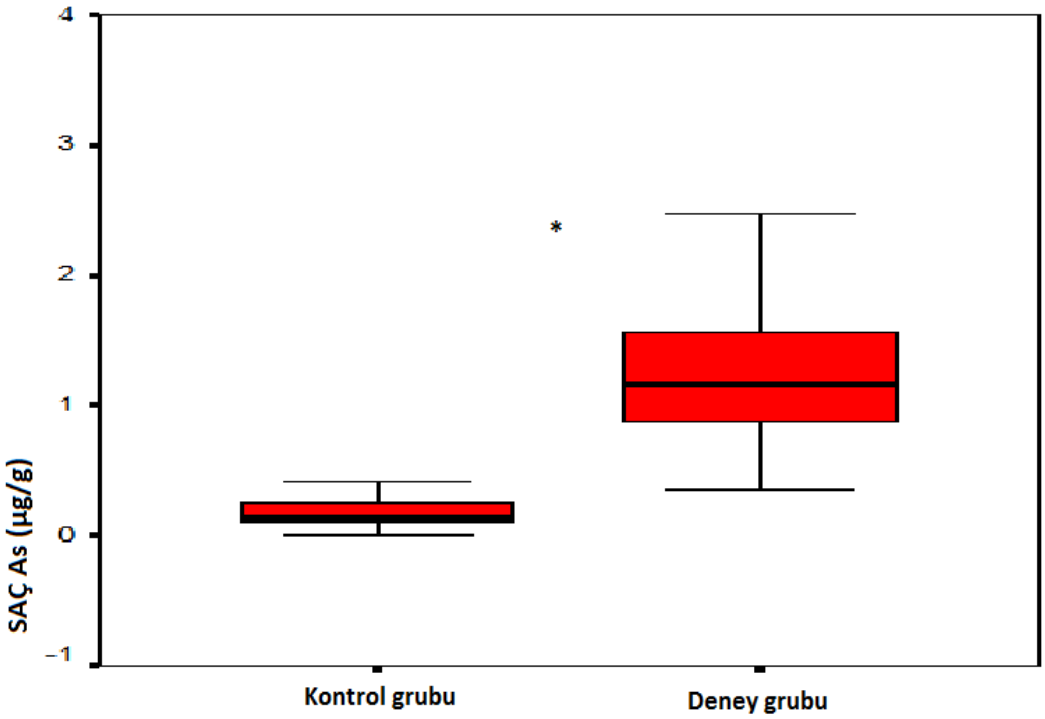
Çizelge 4.2.'de deney ve kontrol gruplarındaki bireylerin ortalama saç As konsantrasyonları ve tüm çalışma grubunun yaş, cinsiyet, sigara öyküsü, sigara içme sıklığı ve diyabet öyküsüne göre saç As düzeylerinin karşılaştırılması yer almaktadır.

Çizelge 4.2. Deney ve kontrol gruplarındaki bireylerin saç arsenik konsantrasyonları ve tüm çalışma grubunun yaş, cinsiyet, sigara öyküsü, sigara içme sıklığı ve diyabet öyküsüne göre saç arsenik düzeyleri tanımlayıcı istatistikleri

	Saç As* (µg/g) **Ortanca (min-maks)**	***p-değeri***
		<0,001
Kontrol Grubu*(n=95)*	**0,14** (0,01-0,98)	
Deney Grubu *(n=99)*	**1,17** (0,35-6,48)	
Tüm popülasyon *(n=194)*		
Yaş Grupları		*0,378*
≤50 yıl	0,59 (0,03-6,48)	
>50 yıl	0,29 (0,01-4,14)	
Cinsiyet		*0,089*
Erkek	0,59 (0,05-6,48)	
Kadın	0,29 (0,01-4,14)	
Sigara Öyküsü		*0,730*
Yok	0,40 (0,01-6,48)	
Var	0,54 (0,05-5,58)	
Sigara (adet/gün)		*0,648*
1-10	0,54 (0,18-5,58)	
11-20	0,59 (0,05-2,90)	
>20	0,49 (0,08-2,32)	
Diyabet Öyküsü		*0,187*
Yok	0,44 (0,01-6,48)	
Var	1,05 (0,10-3,49)	

Deney grubu ortalama saç As düzeyleri, kontrol grubuna kıyasla 8 kat yüksek olup, istatistiksel açıdan anlamlıdır (Çizelge 4.2, Şekil 4.1, ***p<0,001).*** Bu bulgular, yörede yaşayan bireylerin geçmişe yönelik arsenik maruziyetini göstermesi açısından önemlidir.

Çizelge 4.2'den de anlaşılacağı üzere, tüm çalışma grubundaki saç As düzeyleri, yaş grupları, cinsiyet, sigara öyküsü, sigara içme sıklığı ve diyabet öyküsü açısından farklılık göstermemiştir ***(p>0,05).***

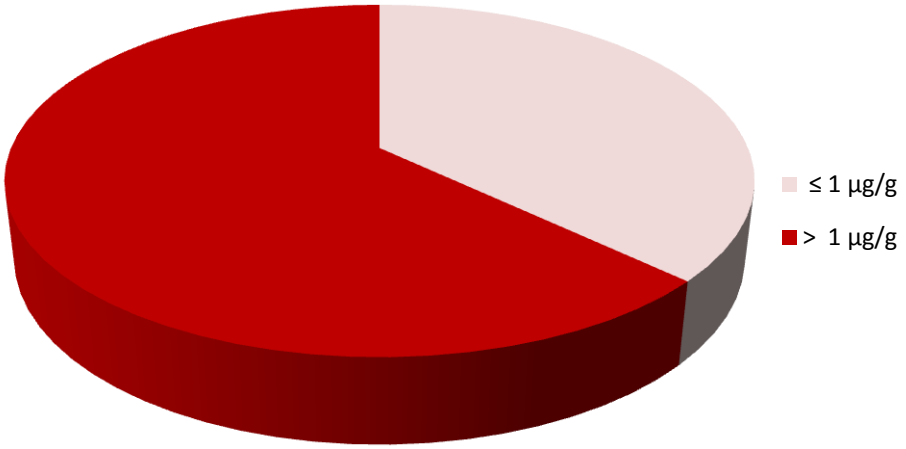


Şekil 4.1. Deney ve kontrol gruplarındaki bireylerin saç As düzeyleri **(****p<0,001*****; ⊥minimum, ⊤ maksimum)**

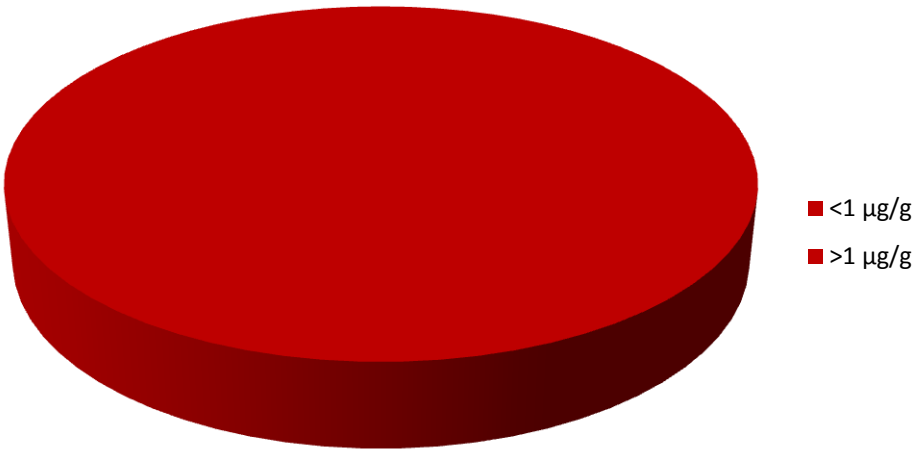
Saç As düzeylerinin, toksik etkilerin görülmeye başladığı toksik karar seviyesi olarak önerilen 1 µg/g değerine (Arnold ve diğerleri, 1990) göre gruplandırılması Çizelge 4.3'deki gibidir. Çizelge 4.3'e göre, deney grubundaki bireylerin %61'inin saç As düzeyleri 1 µg/g değerinin üzerinde iken, kontrol grubu bireylerin hiçbirinde saç As düzeyi 1 µg/g değerinin üzerinde değildir (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).

Çizelge 4.3. Deney grubundaki bireylerin saç As düzeylerinin, toksik karar seviyesine (cut-off); 1 µg/g göre gruplandırılması

	Kontrol Grubu *(n=95)*	**Deney Grubu** *(n=99)*	***p-değeri***
Saç As Düzeyleri			***<0,001***
≤1 µg/g	95 (%100,0)	39 (%39,4)	
>1 µg/g	-	60 (%60,6)	



Şekil 4.2. Deney grubu bireylerin 1 µg/g saç arsenik konsantrasyonuna göre % dağılımı



Şekil 4.3. Kontrol grubu bireylerin 1 µg/g saç arsenik konsantrasyonuna göre % dağılımı

Tüm çalışma popülasyonunda, saç As düzeylerini etkileyebilecek maruziyet dışındaki parametrelerin (yaş, cinsiyet, sigara gibi) etkisi, çoklu değişkenli doğrusal regresyon analizi ile elimine edildiğinde (düzeltildiğinde), saç As düzeylerindeki artışın en önemli sebebinin içme suyu arsenik maruziyeti olduğu, yaş, cinsiyet ve sigara öyküsünün saç As düzeylerini etkilemediği görülmektedir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Tüm çalışma popülasyonunda, çoklu değişkenli doğrusal regresyon analizi ile diğer olası risk faktörlerine göre düzeltme yapıldığında, içme suyu arsenik maruziyetinin, saç arsenik düzeyleri üzerine etkisinin incelenmesi

	Regresyon Katsayısı	**%95 Güven Aralığı**		**t-istatistiği**	***p-değeri***
		Alt Sınır	*Üst Sınır*		
Maruziyet *(Var/Yok)*	2,047	1,856	2,239	21,122	***<0,001***
>50 yaş	0,196	-0,0001	0,393	1,972	*0,050*
Cinsiyet	-0,030	-0,245	0,185	-0,276	*0,783*
Sigara Öyküsü	-0,038	-0,277	0,201	-0,313	*0,755*

4.3. Deney ve Kontrol Grubu Bireylerin Yanak Epiteli Hücrelerindeki Mikroçekirdek Sıklıklarının Karşılaştırılması

Deney ve kontrol grubu bireylerin yanak epitelyum hücrelerindekimikroçekirdek (MÇ) ve mikroçekirdekli hücre sıklıkları (‰) Çizelge 4.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Deney ve kontrol gruplarındaki bireylerin yanak epitel hücrelerindeki MÇ ve MÇ'li hücre sıklıklarına (‰) ait tanımlayıcı istatistikler

	Kontrol Grubu *(n=95)*		**Deney Grubu** *(n=99)*		***p-değeri***
MÇ sıklığı	1 (0-5)*	0,99 ± 1,03#	1 (0-8)	1,36 ± 1,46#	*0,104*
MÇ'li hücre sıklığı	1 (0-5)*	0,92 ± 0,96#	1 (0-5)	0,99 ± 0,97#	*0,547*

***Ortanca (minimum-maksimum)**
 # Ortalama ± SS

Çizelge 4.5'de de görüldüğü üzere, mikroçekirdek ve mikroçekirdekli hücre sıklığı açısından deney ve kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde fark gözlenmemiştir ***(p>0,05).***

Tüm olgular, yaş, cinsiyet, sigara öyküsü, sigara içme yoğunluğu ve diyabet öyküsü gibi temel demografik özelliklere göre sınıflandırıldığında, hiçbir parametrenin mikroçekirdek sıklığını etkilemediği gözlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Tüm çalışma grubunun yaş, cinsiyet, sigara öyküsü, sigara içme sıklığı ve diyabet öyküsüne göre MÇ sıklığı (‰)

	MÇ*	***p-değeri***
Yaş Grupları		*0,925*
≤50 yıl	1 (0-8)	
>50 yıl	1 (0-5)	
Cinsiyet		*0,185*
Erkek	1 (0-5)	
Kadın	1 (0-8)	
Sigara Öyküsü		*0,137*
Yok	1 (0-8)	
Var	0,5 (0-5)	
Sigara içme sıklığı (adet/gün)		*0,842*
1-10	0,5 (0-1,5)	
11-20	0,5 (0-4)	
>20	0,5 (0-5)	
Diyabet Öyküsü		*0,082*
Yok	1 (0-8)	
Var	0,25 (0-2,5)	

* Ortanca (minimum- maksimum)

Çizelge 4.7. Deney grubundaki bireylerin yanak epitel hücrelerindeki MÇ ve MÇ'li hücre sıklıkları ortalamalarının, saç arsenik düzeyleri 1µg/g değerine göre karşılaştırılması

	Saç As ≤1 µg/g *(n=39)*	**Saç As >1 µg/g** *(n=60)*	***p-değeri***
	Ortanca (min-maks)	Ortanca (min-maks)	
MÇ (‰)	1 (0-5)	1 (0-8)	*0,788*
MÇ'li hücre sıklığı (‰)	1 (0-3)	0,75 (0-5)	*0,767*

Deney grubundaki bireylerin saç As düzeyleri, toksik karar seviyesine (1 µg/g) göre sınıflandırıldığında, gruplar arasında mikroçekirdek ve mikroçekirdekli hücre sıklığı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir ***(p>0,05;*** Çizelge 4.7)

4.4. Deney ve Kontrol Grubu Bireylerin Yanak Epiteli Hücrelerinde Diğer Çekirdek Anomalilerinin Sıklığının Karşılaştırılması

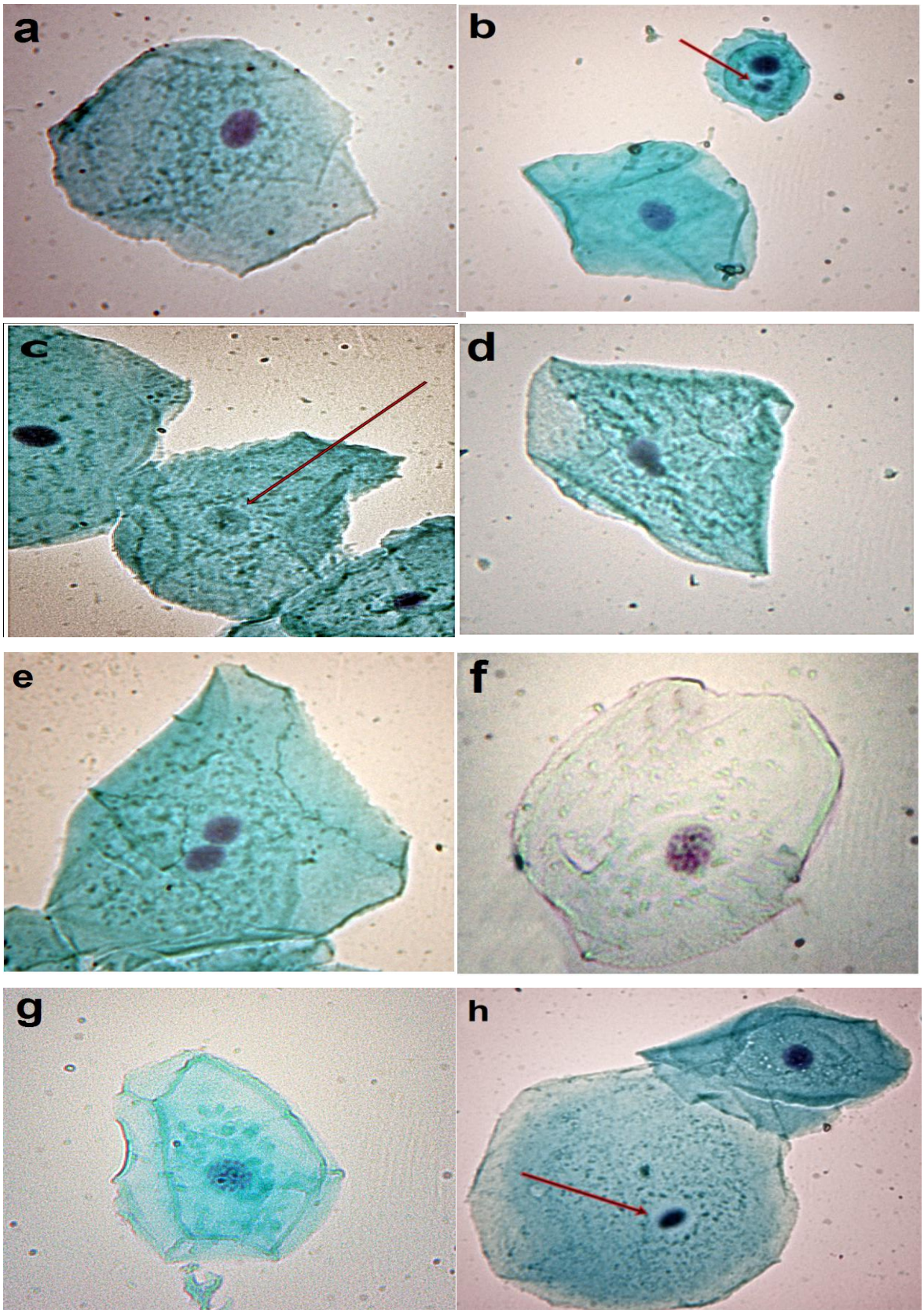
Deney ve kontrol grubuna ait mikroçekirdek dışındaki, nükleer tomurcuk (NT), binükleer (BN), kondanse kromatin (KK), karyohektik (KH), piknotik (PK), karyolitik (KL) hücre gibi diğer çekirdek anomalilerinin sıklıklarının ortanca değerleri Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Deney ve kontrol grubu bireylerin yanak epiteli hücrelerindeki diğer çekirdek anomalileri sıklıklarına (‰) ait tanımlayıcı istatistikler

Çekirdek anomalileri	**Kontrol Grubu** *(n=61)*	**Deney Grubu** *(n=99)*	***p-değeri***
	Ortanca (min-maks)	Ortanca (min-maks)	
Nükleer tomurcuk	1,5 (0-19)	3 (0-26)	***<0,001***
Binükleer	7 (0-18)	8 (1-45)	*0,197*
Kondanse Kromatin	21 (0-193)	11 (0-365)	***0,010***
Karyohektik	6 (0-328)	5 (0-54)	***0,047***
Piknotik	1 (0-13)	12 (0-150)	***<0,001***
Karyolitik	58 (6-182)	34 (3-288)	***0,002***

Çekirdek anomalilerinden, nükleer tomurcuk ve piknotik çekirdek sıklıkları, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında deney grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ***(p<0,001)***. Binükleer çekirdek sıklığı deney ve kontrol grubunda benzerdir ***(p=0,197)***. Kondanse kromatin, karyohektik ve karyolitik çekirdek sıklıkları ise deney grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşüktür ***(p<0,05***; Çizelge 4.8)

Çalışma grubumuzun yanak epiteli hücrelerinde gözlenen mikroçekirdek ve diğer çekirdek anomalilerinin fotoğrafları Resim 4.1'de gösterilmiştir.



Resim 4.1. Çalışma grubundaki bireylerin yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek ve diğer çekirdek anomalilerinin mikroskobik görüntüleri *a)*Normal farklılaşmış hücre; *b)*2 MÇ'li bazal hücre (ok); *c)*Karyolitik (ok); *d)*Nükleer tomurcuk; *e)*Binükleer; *f)*Kondanse kromatin; *g)*Karyohektik; *h)*Piknotik

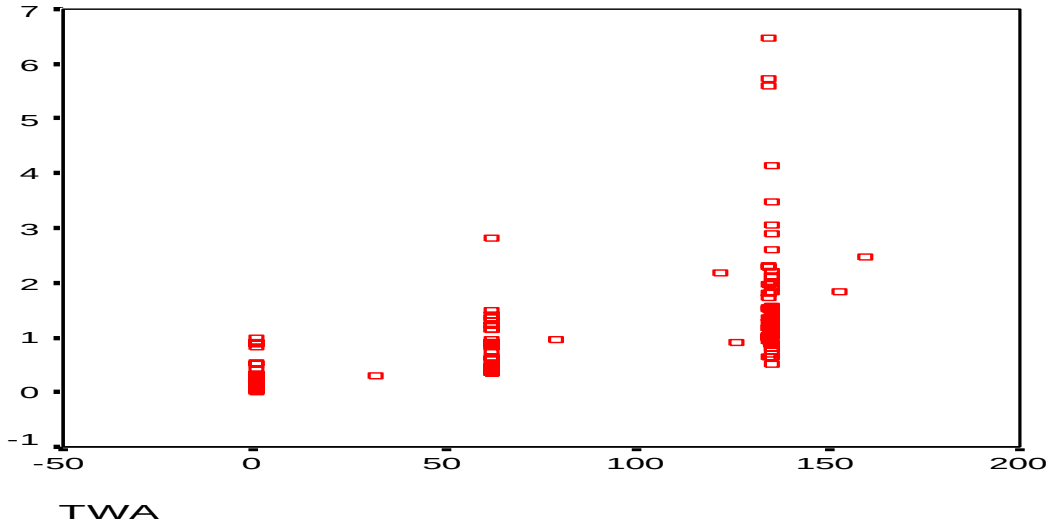
4.5. Korelasyon Analizleri

Bireylerin saç As değerlerinin ve MÇ sıklıklarının, yaş ve TWA değerleri ile korelasyonu incelenmiş ve Çizelge 4.9'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. Tüm çalışma grubunun saç As ve MÇ düzeylerinin, yaş ve TWA-As değerleri ile korelasyonu ve önemlilik düzeyleri

	Saç As	**MÇ**
Yaş		
r	*-0,047*	-0,033
p-değeri	*0,519*	0,650
İçme suyu TWA-As (µg/l)		
r	*0,822*	0,023
p-değeri	***<0,001***	0,751

Saç As düzeyleri ile içme suyu TWA-As değerleri arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir ***(p<0,001)***. Aşağıdaki grafikte de görüldüğü gibi, bireylerin içme suyu TWA-As değerleri arttıkça saç As düzeyleri de artmaktadır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Saç As ve TWA-As değerleri yönünden olguların noktasal saçılımı

Saç As düzeyleri ile MÇ sıklığı arasında korelasyon gözlenmemiştir ***(r=0,089; p=0,216)***. İdrar As düzeyleri ile MÇ sıklığı arasında da korelasyon gözlenmemiştir ***(r=0,062; p=0,390)***.

5. TARTIŞMA

Su, yeryüzünde yaşamın temeli ve medeniyetin dayanağıdır. Yaşam için çok gerekli olmasına rağmen, diğer taraftan da pek çok hastalığın sebebidir. Su kaynaklarındaki, özellikle yer altı sularındaki kirlilikler, sağlık açısından tehdit oluşturabilmektedir (Baba ve Tayfur, 2011).

İçme suyundaki arsenik (As) kirliliği, pek çok ülkede, toplum sağlığı açısından en büyük problemdir; özellikle düşük gelirli ülkelerde çok daha ciddi sorunlara yol açabilmektedir. Dünyada yer altı suları As düzeyleri yüksek olan risk altındaki ülkeler; Bangladeş (<0,5-2500 µg/l), Hindistan (<10-3200 µg/l), Tayvan (10-1820 µg/l), Çin (<1-2400 µg/l), Meksika (8-620 µg/l), Arjantin (<1-7550 µg/l), Şili (100-1000 µg/l) ve Amerika (<2600 µg/l)'dır (IARC, 2004). Arseniğin insan sağlığı üzerindeki etkileri; çeşitli kanser (akciğer, deri, mesane, karaciğer, böbrek kanseri) ve diğer pek çok hastalık (deri lezyonları, diyabet, karaciğer ve böbrek toksisitesi, kardiyovasküler hastalıklar, periferal nörolojik hastalıklar) riskindeki artışı kapsamaktadır (Vahter, 2007; IARC, 2010; Ferreccio ve diğerleri 2013, Bustaffa ve diğerleri, 2014).

Biyoizleme çalışmaları, insanlarda kimyasal maruziyetinin sağlık üzerine etkilerini ölçmede oldukça etkindir. Çünkü biyoizleme çalışmaları ile, kimyasalların sağlık üzerine etkileri, maruziyetteki artışlar veya değişiklikler, genel popülasyon içerisinde maruziyetin dağılımı, duyarlı alt gruplar/popülasyonlar ve çevresel risk faktörleri belirlenebilmektedir (Angerer, Ewers ve Wilhelm, 2007).

Arseniğin insanlardaki karsinojenik etkileri ile ilgili dünya genelinden gelen raporlar, içme suyu ile arseniğe maruz kalan bireylerdeki genotoksik etkilerin biyoizlenmesi gerekliliğinin fark edilmesini sağlamıştır (Basu ve diğerleri, 2002). Kronik As maruziyetinin tüm belirtilerinin yıllar süren latent periyodun ardından görülmesi, bu süreç içerisinde biyoizlemenin önemini daha da arttırmaktadır (Bartolotta, Pacskowski, Hick ve Carballo, 2011).

Ülkemizde As ile kontamine alanlar genelde jeolojik kaynakların ve madencilik faaliyetlerinin bulunduğu yerlerdir. Bu anlamda, en önemli iki yöre; Emet-Hisarcık (Kütahya) Havzası ile Nevşehir yöresidir (Atabey, 2009: 38). Daha önceki yıllarda, Kütahya-İğdeköy'de yaşayan bireylerin saç ve kan örnekleri analiz edilmiş ve bireylerdeki As maruziyetine bağlı genotoksik hasar artışı, kardeş kromatid değişimi yöntemi ile gösterilmiştir (Dağıstanlı, 1995). Nevşehir Bölgesi'nde As kirliliğine bağlı olarak bu bölgede yaşayan bireylerde herhangi bir biyoizleme verisi bulunmamaktadır. Bu nedenle, çalışmamızın önemi artmaktadır.

As, vücutta saç, tırnak ve deri gibi keratince zengin dokularda birikme eğilimindedir. Bu yüzden popülasyon çalışmalarında, geçmişe yönelik (6-12 ay) As maruziyetinin biyogöstergesi olarak, saç ve tırnak örnekleri kullanılabilmektedir. Yanısıra idrar As düzeyleri, son günlerdeki (3-5 gün) maruziyetin değerlendirilmesi için iyi bir parametredir. Ayrıca, etki biyogöstergesi olarak, hedef hücre ve dokulardaki kromozomal aberasyonlar, mikroçekirdek sıklığı gibi çeşitli genotoksik son noktalar da kullanılabilmektedir (Basu ve diğerleri, 2002).

Mikroçekirdek (MÇ) yöntemi, insan biyoizleme çalışmalarında genetik hasarın ölçülmesinde uygulama kolaylığı nedeniyle yaygın kullanılan bir tekniktir. Diğer bir avantajı, aynı anda birden fazla toksikolojik son noktanın değerlendirilmesine imkan vermesidir. Bu toksikolojik son noktalar; mikroçekirdek oluşumu (MÇ, mitoz bölünme esnasında kromozom hasarı ve kaybının biyogöstergesi), mikroçekirdeğin dışındaki diğer çekirdek anomalileri; nükleer tomurcuk (gen amplifikasyonlarının indikatörü), binükleer hücreler (sitokinezis defekti), ve kondanse kromatin, karyohektik, piknotik, karyolitik gibi çeşitli hücre ölümü ile ilgili biyogöstergelerdir (Bonassi ve diğerleri, 2011). Mikroçekirdek ve diğer çekirdek anomalilerinin, genom bütünlüğündeki defektler, yaşlanma, genotoksik hasar ve bazı dejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bartolotta ve diğerleri, 2011).

Periferal lenfosit hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığının kanser riskindeki artışla ilişkili olduğu geçerlenmiştir (Bonassi ve diğerleri, 2007). Bunun yanında pek çok çalışmada, lenfositlerdeki mikroçekirdek sıklığı ile yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığı arasında güçlü korelasyon tespit edilmiştir. Bu nedenle, sistemik toksik etkilerin yanak epitel hücrelerinde de tespit edilebileceği ve yanak epitelinin kanser riskini öngörebilecek bir

doku olabileceği düşünülmektedir (Bonassi ve diğerleri, 2011). Ayrıca, kanserlerin pek çoğu epitel hücre kökenlidir ve karsinojen maruziyetinde potansiyel hedef dokulardır. As toksisitesinin değerlendirilmesinde yanak epitel hücrelerin kullanımı duyarlı olabilir, çünkü bu hücreler arsenikle doğrudan temas halindedir (Bartolotta ve diğerleri, 2011).

As, mikroçekirdek yöntemi ile değerlendirilebilecek ideal genotoksik ajandır. Çünkü MÇ oluşumu, arsenik gibi kromozom kırıklarına yol açan (klastojen) ve iğ iplikleri etkileyen (anojen) ajanlar tarafından indüklenmektedir (Bartolotta ve diğerleri, 2011).

Arseniğin anojenik ve klastojenik etkileri, pek çok in-vitro ve in-vivo çalışma ile gösterilmiştir (Bustaffa ve diğerleri, 2014). Yanısıra, As'e kronik olarak maruz kalan popülasyonlarda yapılan pek çok biyoizleme çalışmasında, insan lenfosit ve mesane epitel hücrelerindeki arsenik maruziyetine bağlı genetik hasar artışı, mikroçekirdek, kromozamal aberasyon ve kardeş kromatid değişimi gibi yöntemler ile ortaya konmuştur (Faita ve diğerleri, 2013; Bustaffa ve diğerleri, 2014).

Bu nedenle, çalışma bölgemizde yaşayan bireylerin içme sularındaki arsenik kirliliğine bağlı olarak saç örneklerindeki arsenik düzeylerinin belirlenmesi ve yanısıra yanak epitel hücrelerindeki genotoksik hasarın tespit edilmesi önem taşımaktadır.

5.1. Saç Arsenik Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Deney grubunun arsenik maruziyeti, idrar arsenik konsantrasyonlarından ve TWA-As değerlerinden anlaşılmaktadır (Bkz. Çizelge 4.1). Çalışma bölgelerimizdeki içme suyu kaynaklarının ve bireylerin tüketim sürelerinin çeşitliliği nedeniyle, diğer bir As maruziyet göstergesi olarak her birey için hesaplanan zaman ağırlıklı içme suyu As konsantrasyonları (TWA-As, µg/l) kullanılmıştır (Ahsan ve diğerleri, 2006; Chen ve diğerleri, 2011).

Deney grubu saç As konsantrasyonu, kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 8 kat yüksek ve istatistiksel açıdan anlamlıdır ***($p<0,001$;*** Bkz.Çizelge 4.2). Bu sonuç, deney grubundaki bireylerin As'e kronik olarak maruz kaldığını ortaya koymaktadır. Ancak, çeşitli endojen (cinsiyet, etnik köken, genetik polimorfizmler) ve ekzojen faktörler (beslenme alışkanlığı, sigara içiciliği, bazı hastalıklar) saç arsenik düzeyini değiştirebildiği bilinmektedir.

Bunun yanı sıra arseniğin saça bağlanma kapasitesi, bireyler arasında farklılık gösterebilmektedir (Marchiset- Ferlay ve diğerleri, 2012).

Bireylerin genel sağlık durumu ve medikasyon, arseniğin saçtaki oranını ve dağılımını değiştirebilmektedir. Diyabet, kanser, oküler hastalıklar, böbrek hastalığı ve kardiyovasküler hastalıkları olan bireylerin saç As düzeyleri yüksek bulunmaktadır (Çizelge 5.1; Wolowiec, Michalak, Chojnacka ve Mikulewicz, 2013). Ancak, bu hastalıkların As maruziyetine bağlı olarak oluşup oluşmadığı ya da hastalık durumunda vücuttaki çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler nedeniyle arseniğin saçtaki miktarının arttığı bilinmemektedir. Dolayısıyla, saç As düzeyini etkileyen bu faktörler nedeniyle, epidemiyolojik çalışmalarda, saç As konsantrasyonu ile dokularda arsenik konsantrasyonu (internal doz) arasında bir ilişki kurmak güçtür. Bu kritik nokta, saç As konsantrasyonunun, absorbe olan dozun indikatörü olarak kullanılabilirliğini azaltmaktadır ve benzer saç As konsantrasyonuna sahip popülasyonların toksik etkiler açısından karşılaştırmasını zorlaştırmaktadır (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012). Çalışmamızda ise, sigara öyküsü ve sıklığının, yaş ve cinsiyet gibi faktörlerin ve diyabet öyküsünün saç As düzeylerine anlamlı bir etkisi bulunmamaktadır ***(p>0,05;*** Bkz. Çizelge 4.2).

Dünya'da ve Türkiye'de yapılan çalışmalardan elde edilen saç As düzeyleri ve içme suyu As konsantrasyonları ve bazı mesleksel maruziyet çalışmalarındaki saç As düzeyleri Çizelge 5.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 5.1'den de anlaşılacağı üzere, araştırmamızda elde ettiğimiz saç As düzeyleri, literatürde, benzer içme suyu As konsantrasyonlarındaki saç As düzeyleri ile paralellik göstermektedir (Chakraborty, Das, Poddar, Sengupta ve De, 2006; Concha, Nermell ve Vahter, 2006; Gault ve diğerleri, 2008; Phan, Sthiannopkao ve Kim, 2011; Normadin ve diğerleri, 2014).

Çizelge 5.1. Dünya ’da ve Türkiye’de yapılmış çalışmalardaki saç arsenik düzeyleri

Çalışma yapılan bölge	İçme suyu toplam As ortalaması (µg/l)	Saç toplam As ortalaması (µg/g)	Referanslar
Kanada- Quebec	<1,0 >1,0-10 >10 (11-140)	0,018 (0,006-0,16)* 0,034 (0,006-0,14)* 0,15 (0,012-1,0)*	Normadin ve diğerleri, 2014
Kamboçya -*Kandal* Kamboçya -*Kratie* Kamboçya -*Cham*	846,14 22,22 1,28	6,40 (0,27-57,21)* 0,29 (0,05-1,42)* 0,12 (0,01-1,01)*	Phan ve diğerleri, 2011
Kamboçya- Kandal	153±40	1,41±0,32#	Gault ve diğerleri, 2008
Arjantin -*Puna* -*Rosario de Lerma* -*San Antonio de los Cobres*	<1 <1 186	0,16 (0,042- 1,5)* 0,033 (0,024-0,072)* 0,65 (0,515-1,241)*	Concha ve diğerleri, 2006
Hindistan- *Batı Bengal*	2,78 30,7 118	0,13±0,30# 1,39±1,22# 4,71±3,93#	Uchino ve diğerleri, 2006
Hindistan- *Batı Bengal*	66,75 6,44	1,45 0,33	Chakraborty ve diğerleri, 2006
Şili- *Atacama çölü*	75 1250	0,7 6,1	Yànez ve diğerleri, 2005
Iran	180 (0-455)	0,53 (0,012-3,41)	Mosaferi ve diğerleri, 2005
Hindistan- *Batı Bengal*	368 5,5	6,97 0,34	Basu ve diğerleri, 2002
Bangladeş	10-900	(1,10-19,84)	Karim ve diğerleri, 2000
Tayvan	615 53	0,41±0,24# 0,22±0,08#	Lin ve Huang, 1998
Meksika- *Zimapàn*	14 1090	6,19±2,98# 10,05±2,50#	Armienta ve diğerleri, 1997
Türkiye- *Nevşehir Bölgesi*	<10 (0,81) >50 (112)	0,14 (0,01-0,98)* 1,17 (0,35-6,48)*	Bu çalışma
Ankara Meslek Hastanesi'ne başvuran ve mesleksel As maruziyeti olan hastalar	-	1,01 (0,06-25,71)	Akbal ve diğerleri, 2013
Ankara Meslek Hastanesi'ne başvuran gümüş fabrikası işçileri	-	1,81 (0,06-7,90)	Yüksel, 2013
Ankara ili ve çevresi- *sağlıklı bireyler*	-	0,139 (0,041-0,336)	Yüksel, 2008
Meme kanserli hastalar *(3. seviye)*	-	1,52±1,98 (0,04-9,81)	Cihan ve diğerleri,2011

*Ortanca (min-maks)
#Ortalama ± SS

Öte yandan, içme suyu As konsantrasyonları çalışmamızdaki içme suyu konsantrasyonları ile benzer olmasına karşın, bazı çalışmalarda daha yüksek saç As düzeyleri elde edilmiştir (Armienta, Rodríguez ve Cruz 1997; Uchino, Roychowdhury, Ando ve Tokunaga, 2006). Bu farklılığın nedeni, içme suyunun yanında gıdalar yoluyla alınan As maruziyeti ve eksternal As kontaminasyonu olduğu düşünülebilir. Bunlardan Hindistan'da yapılan çalışmada, araştırmacılar, Hint popülasyonunun besinlerle de As maruziyetinin olduğunu, pirinç, tahıl ve sebzenin ana besin kaynakları olduğunu ve 3 öğünde de tüketildiğini belirtmişlerdir. Bu popülasyonda günlük total As alımının sadece % 6 - %58 'lik kısmının içme suyu ile alındığını belirtmişlerdir (Uchino ve diğerleri, 2006). Dolayısıyla, gıdalardan alınan önemli miktardaki arseniğin, çalışmalardaki farklılığın nedeni olduğu düşünülebilir.

Besinlerle As maruziyeti, özellikle içme suyu As konsantrasyonu 50 µg/l'den düşük olan toplumlar için önemlidir. Hindistan'da temel besin maddesi olarak pirinç tüketen (540-600 g/gün) 400 kişide yapılan kesitsel bir çalışmada, bireylerin içme suyu ile arsenik maruziyeti (3-6 µg/l) olmamasına rağmen mesane epitel hücrelerinde MÇ sıklığında artış ve idrarda yüksek As düzeyleri tespit edilmiştir. Pirinçteki As içeriği ile idrar As düzeyleri ve mesane epitel hücrelerindeki MÇ sıklığı arasında güçlü korelasyon gözlenmiştir (Banerjee ve diğerleri, 2013).

Türkiye'de yapılan bir çalışmada ise, pirinç tüketimi Asya toplumlarına kıyasla daha az, Avrupa toplumlarına kıyasla daha fazla bulunmuştur. Yine aynı çalışmada, pirinçteki As içeriğinin, bulgura kıyasla fazla olduğu ve dolayısıyla bulgur tüketiminin teşvik edilmesi gerektiği ve pirinçteki As içeriğinin pişirme tekniğine göre farklılık gösterdiği belirtilmiştir (Sofuoğlu ve diğerleri, 2014). Çalışmamızda, bireylerin pirinç ve bulgur tüketimi konusunda herhangi bir veri bulunmamaktadır.

Diğer çalışmada ise, kontrol grubunda normal-üstü (>1µg/g) saç As konsantrasyonu tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu durumu, Meksika 'daki hava kirliliğine bağlamışlar ve eksternal kontaminasyon olabileceğini belirtmişlerdir (Armienta ve diğerleri, 1997). Kronik As maruziyetinde biyogösterge olarak saç As konsantrasyonları kullanıldığında, maruziyet kaynağını (internal/eksternal) belirlemek zordur. Çünkü saçın As içeren hava veya

su ile teması, arseniğin saç yüzeyine adsorbe olmasına ve yanlış değerlendirmelere neden olabilmektedir (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012). Çalışmamızda saç örnekleri, saçın daha az kontamine olan bölgesinden-boynun ense veya art kafa kısmından ve saç derisine yakın bölgelerden- alınmış ve 'ön yıkama işlemi' ile eksternal kontaminasyon riski minimize edilmiştir.

Sağlıklı bireylerdeki saç As konsantrasyon aralığı konusunda bazı tartışmalar mevcuttur. Ancak Dünya Sağlık Örgütü, As'e maruz kalmayan bireylerin saç As düzeyinin, genelde 1µg/g'dan düşük olduğunu bildirmektedir (WHO, 2001). Arnold ve diğerleri, saçtaki As düzeyinin 1 µg/g'ın üzerinde olması durumunu, toksisite belirtisi (deri lezyonları) olarak önermiştir. Çalışmamızdaki saç As düzeylerini toksik karar seviyesine; 1 µg/g *(cut-off)* göre gruplandırdığımızda, deney grubundaki bireylerin %61'i, 1 µg/g'ın üzerinde saç As düzeyine sahip iken, kontrol grubu bireylerin hiçbirinin saç As düzeyi, 1 µg/g değerinin üzerinde bulunmamıştır (Bkz. Şekil 4.2 ve Şekil 4.3). Bu nedenle, deney grubundaki bireylerin %61'inin toksik etkiler açısından risk altında olduğu söylenebilir. Bu riskli gruptaki bireylerde, detaylı sağlık incelemelerinin yapılması yerinde olacaktır.

Çalışmamızda, 10 µg/l 'den düşük konsantrasyonlarda As maruziyetine bağlı olarak saç As konsantrasyonu 0,14 µg/g iken, 50 µg/l'den yüksek konsantrasyonlarda saç As düzeyi 1,17 µg/g olarak bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar, Nevşehir Bölgesi'nde içme suyu konsantrasyonları yüksek olan bölgelerde yaşayan bireylerin (>50 µg/l), mesleksel olarak arsenik maruziyeti olan (bakır-kurşun dökümü, tahta işleme, pestisit uygulama gibi mesleklerde çalışan işçiler ve gümüş fabrikası işçileri) ve kronik arsenizm nedeniyle meslek hastanesine başvuran bireylerle (Akbal ve diğerleri, 2013; Yüksel, 2013) benzer saç As düzeylerine sahip olduğunu göstermektedir.

Pek çok çalışmada, içme suyu As konsantrasyonu ile saç As konsantrasyonunun birbirine paralel olduğu gösterilmiştir (Marchiset-Ferlay ve diğerleri, 2012). Çalışmamızda da, bireylerin saç As düzeyleri ile içme suyu As-TWA değerleri arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ***(r=0,822; p<0,001;*** Bkz. Çizelge 4.9). Bu durum, içme suyundaki arseniğin, saç As düzeylerindeki artışa neden olan önemli bir faktör olduğunu göstermektedir.

5.2. Yanak Epitel Hücrelerinde Mikroçekirdek Sıklığının Değerlendirilmesi

Yanak epitel hücrelerinde mikroçekirdek yöntemi, moleküler epidemiyolojik çalışmalarda, genetik hasarın tespit edilmesinde kullanılan ve uygulanması kolay bir yöntemdir (Ghosh ve diğerleri, 2008). İnsan popülasyonlarında, sigara, alkol, betel quid kullanımı gibi yaşam tarzı ile ilgili faktörlerin yanı sıra, çevresel ve mesleksel olarak maruz kalınan polisiklik aromatik hidrokarbonlar, dioksin, formaldehit, toluen, benzen, kurşun ve radyasyon gibi mutajenik ve karsinojenik kimyasal ve fiziksel ajanların sitogenetik etkilerinin biyoizlenmesinde, son 30-35 yılda giderek artan yaygınlıkta kullanılmaktadır (Holland ve diğerleri, 2008). Eksfoliye epitel hücreleri her 7-21 günde kendini yenilemektedir ve bu yüzden, teorik olarak bu hücrelerdeki genotoksik etkiyi, maruziyetten 7-21 gün sonra gözleyebilmek mümkündür (Thomas ve diğerleri, 2009). Bu nedenle, Çizelge 4.1'de de belirtildiği üzere idrar As düzeylerine göre yakın dönem (3-5 günlük) As maruziyeti olduğu anlaşılan bu bireylerin yanak epitel hücrelerinde, arseniğe bağlı muhtemel genotoksik etkilerin mikroçekirdek yöntemi ile tespit edilmesi amaçlanmıştır**.**

Çalışmamızda, As'e maruz bireylerin yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığı ve mikroçekirdekli hücre sıklığı ile kontrol grubundaki bireylerin hücrelerindeki sıklıklar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir **(*p*>0,05;** Bkz. Çizelge 4.5).

Epidemiyolojik çalışmalarda, genotoksik etkinin ölçütü olarak, her 1000 hücredeki mikroçekirdek sıklığı (‰ MÇ) veya her 1000 hücredeki en az bir mikroçekirdek içeren mikroçekirdekli hücre sıklığı (‰ MÇ'li hücre) sıklıkla kullanılan iki parametredir. Her iki parametre de benzer performansta olmasına karşın, mikroçekirdek sıklığının potansiyel olarak daha duyarlı, mikroçekirdekli hücre sıklığının ise daha stabl olduğu düşünülmektedir (Ceppi, Biasotti, Fenech ve Bonassi, 2010). Çalışmamızda ise, her iki parametre de değerlendirmeye alınmıştır.

Yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığı, yaşam tarzı, beslenme, mesleksel etkiler, hastalık durumu gibi faktörlerden etkilenebilmektedir (Bonassi ve diğerleri, 2011).

Çünkü, genomik instabilite ve hasar, kanser de dahil olmak üzere pek çok hastalığın gelişiminde, temelde yatan olaydır (Müllner ve diğerleri, 2013). Dolayısıyla çeşitli hastalık durumlarında yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığında artış gözlenebilmektedir. Bunlardan biri olan diyabette, fazla miktarda serbest radikal üretimi söz konusudur. Bu serbest radikaller, mikroçekirdek sıklığında artışa neden olmaktadır (Coronado-Gonzalez, Del Razo, García-Vargas, Sanmiguel-Salazar ve Peña, 2007).

Sigara içme durumunun, yanak epitel hücrelerinde mikroçekirdek ve diğer çekirdek anomalilerinin oluşumunu indüklediği bilinmektedir. Mikroçekirdek ve diğer çekirdek anomalilerinin sıklığının, sigara içme sıklığına (>20 tane/gün) ve sigaradaki nikotin ve katran içeriğine bağlı olduğu gözlenmiştir (Nersesyan, Muradyan, Kundi ve Knasmueller, 2011).

Çalışma grubumuzu oluşturan tüm bireyler, mikroçekirdek sıklığını etkileyebilecek yaş, cinsiyet, sigara öyküsü, sigara içme sıklığı ve diyabet öyküsü gibi parametrelere göre sınıflandırıldığında, hiçbir parametrenin mikroçekirdek sıklığını etkilemediği görülmektedir ***(p>0,05;*** Bkz. Çizelge 4.6). Bu nedenle çalışmamızda, içme suyuyla As maruziyetinin, deney grubundaki bireylerin yanak epitel hücrelerinde mikroçekirdek sıklığında anlamlı bir katkıda bulunmadığı düşünülebilir.

Literatürde içme suyu As maruziyetine bağlı etkilerin yanak epitel hücrelerinde mikroçekirdek yöntemi ile değerlendirildiği diğer çalışmalar karşılaştırmalı olarak Çizelge 5.2'de incelenmiştir***.*** Bu çalışmaların bir kısmında As maruziyetine bağlı olarak yanak epitel hücrelerinde MÇ sıklığında artış gözlenirken (Aposhian ve diğerleri, 1997; Gonsebatt ve diğerleri, 1997; Tian ve diğerleri, 2001; Basu ve diğerleri, 2002; Basu ve diğerleri, 2004; Chakraborty ve diğerleri, 2006; Ghosh ve diğerleri, 2006; Bartolotta ve diğerleri, 2011), diğer iki çalışmada ise (Warner, Moore ve Smith, 1994; Martinez ve diğerleri, 2005), anlamlı artış gözlenmemiştir.

Çizelge 5.2. İçme suyu As maruziyeti açısından Dünya'da ve Türkiye'de yapılmış çalışmalara ait yanak epitel hücrelerinde MÇ sıklığı anlamlılık düzeyleri

Çalışma Grubu *(n)*	Ortalama içme suyu As düzeyleri	Ülke	Sonuçlar	*p* *değeri*	Referanslar
18 kişi- maruz 18 kişi- kontrol	1312 µg/l 16 µg/l	Amerika (Nevada)	MÇ sıklığı↔	*p=0,5*	Warner ve diğerleri, 1994
10 kişi- maruz 8 kişi- kontrol	593 µg/l 21 µg/l	Şili	MÇ sıklığı 5 kat↗	*<0,05*	Aposhian ve diğerleri, 1997
33 kişi-maruz 32 kişi-kontrol	408,17 µg/l 29,88 µg/l	Amerika	MÇ sıklığı↗	*<0,05*	Gonsebatt ve diğerleri, 1997
19 kişi-maruz 13 kişi-kontrol	527,5 µg/l 4,4 µg/l	Çin (Mongolia)	MÇ sıklığında **3.4** kat ↗	*<0,001*	Tian ve diğerleri, 2001
45 kişi-maruz 21 kişi-kontrol	368,11 µg/l 5,49 µg/l	Hindistan	MÇ sıklığında ↗	*<0,01*	Basu ve diğerleri, 2002
163 kişi-maruz 154 kişi -kontrol	214,7 µg/l 9,2 µg/l	Hindistan	MÇ sıklığında **4.6** kat ↗	*<0,01*	Basu ve diğerleri,2004
99 kişi- maruz 95 kişi- kontrol	**> 50 µg/l < 10 µg/l**	**Türkiye (Nevşehir Bölgesi)**	**MÇ sıklığında ↗**	*p=0,104*	**Bu çalışma**
105 kişi-maruz 102 kişi-kontrol	750 µg/l 0,2 µg/l	Şili	MÇ sıklığı ↗	*p=0,313*	Martinez ve diğerleri, 2005
45 kişi-maruz 25 kişi-kontrol	66,75 µg/l 6,44 µg/l	Hindistan (Batı Bengal)	MÇ sıklığında **3.34** kat ↗	*<0,01*	Chakraborty ve diğerleri, 2006
105 kişi-maruz 102 kişi-maruz 102 kişi-kontrol	242,06 µg/l 202,33 µg/l 7,16 µg/l	Hindistan (Batı Bengal)	MÇ sıklığında **3,36** kat ↗ MÇ sıklığında **2,13** kat ↗	*<0,001*	Ghosh ve diğerleri, 2006
8 kişi-maruz 10 kişi- kontrol 19 kişi-maruz 22 kişi- kontrol	40-400 µg/l 10-25,3 µg/l 84,8 µg/l 4,4 µg/l	Arjantin	MÇ sıklığı ↗	*<0,001*	Bartolotta ve diğerleri, 2011

Çizelge 5.2'ye göre, içme suyu As konsantrasyonu 200 µg/l'den yüksek olan çalışmaların büyük bir kısmında, yanak epitel hücrelerindeki MÇ sıklığında 5 kata kadar artış gözlenmektedir (Aposhian ve diğerleri, 1994; Gonsebatt ve diğerleri, 1997; Tian ve diğerleri, 2001; Basu ve diğerleri, 2002; Basu ve diğerleri, 2004; Ghosh ve diğerleri, 2006; Bartolotta ve diğerleri, 2011). Ancak içme suyu As konsantrasyonu 1312 µg/l ve 750 µg/l olan iki çalışmada ise, yanak epitel hücrelerinde MÇ sıklığında anlamlı bir artış tespit edilmemiştir (Warner ve diğerleri, 1994; Martinez ve diğerleri, 2005). Öte yandan, artan As maruziyeti ile MÇ sıklığı arasında doğrusal bir ilişki olduğu in-vitro çalışmalarda gösterilmesine rağmen, çok yüksek dozlardaki As maruziyetinin, MÇ oluşumunu inhibe etiği ve sitotoksik /sitostatik etki nedeniyle MÇ seviyesini tekrar bazal seviyeye düşürdüğü bilinmektedir (Ghosh ve diğerleri, 2008).

İçme suyu As konsantrasyonu 67 µg/l ve 85 µg/l olan bölgelerde yaşayan 45 ve 19 kişide yapılan iki çalışmada, As maruziyetine bağlı olarak yanak epitel hücrelerinde MÇ sıklığında anlamlı artış gözlenmiştir (Chakraborty ve diğerleri, 2006; Bartolotta ve diğerleri, 2011). Bu çalışmalardaki içme suyu As konsantrasyonları, çalışmamızdaki ile benzerlik göstermektedir. Ancak çalışmamızda literatürden farklı olarak elde ettiğimiz sonuçların, çeşitli nedenleri olabilir. Bu nedenler; yaşam tarzı, beslenme alışkanlığı, genetik farklılıklar ve deney protokolündeki farklılıklar (boyama yöntemindeki farklılıklar, skorlanan hücre sayısı gibi) olarak sıralanabilir (Basu ve diğerleri, 2004; Bonassi ve diğerleri, 2011).

Yanak epitel hücrelerinde mikroçekirdek yönteminde, çeşitli hücre boyama yöntemleri (Feulgen-fast green, Giemsa, Akridin oranj) kullanılmaktadır. Ancak Giemsa boyası hatalı pozitif sonuçlara yol açmaktadır. Öte yandan Feulgen-fast green boyaması en spesifik boyama yöntemi olarak önerilmektedir (Bonassi ve diğerleri, 2011). Çalışmamızdakine benzer içme suyu As konsantrasyonlarında, yanak epitel hücrelerinde MÇ sıklığında artış bulunan Chakraborty ve diğerleri, boyama yöntemi olarak Giemsa kullanmıştır. Bizim çalışmamızda ise DNA spesifik boyama (Feulgen-fast gren) yöntemi tercih edilmiştir.

Çalışmalardaki farklı sonuçların bir diğer sebebi, As'in indüklediği toksik etkiler açısından, popülasyonların/bireylerin duyarlılıklarının farklı olabilmesidir. Genetik ve beslenme, duyarlılığı etkileyen iki önemli parametredir (Vahter, 2007). Yetersiz beslenme ve

bazı vitamin (B_6, B_{12}) ve antioksidanların (folik asit, C vitamini, selenyum) eksikliği, As'in toksik etkilerini şiddetlendirebilmektedir. Gelir düzeyi düşük ve beslenme yönünden yetersiz toplumlarda, As'in toksik etkileri daha şiddetli görülebilmektedir (Vahter, 2007). Bartolotta ve diğerleri, içme suyu ile As'e maruz kalan sosyoekonomik düzeyi düşük ve beslenme yönünden yetersiz bireylerin yanak epitel hücrelerindeki MÇ sıklığında artışta, As maruziyetinin yanı sıra beslenme ve bireysel duyarlılıkların da etkili olmuş olabileceğini ifade etmişlerdir (Bartolotta ve diğerleri, 2011). As'in indüklediği genotoksik etkiler açısından periferal lenfositler, yanak ve idrar epitel hücrelerinde karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği çalışmalarda, periferal lenfositlerin en uygun doku olduğu öne sürülmektedir (Ghosh ve diğerleri,2008).

5.3. Yanak Epitel Hücrelerinde Diğer Çekirdek Anomalilerinin (NT, BN, KK, KH, PK, KL) Sıklığının Değerlendirilmesi

Yanak epitel hücrelerinde mikroçekirdek yöntemi, MÇ oluşumunun yanısıra, kromozomal değişiklikleri, gen amplifikasyonlarını (nükleer tomurcuk), sitokinezis defekti ile anöploid oluşumları (binükleer) ve çeşitli hücre ölümü olaylarını da (karyohektik, piknotik, karyolitik) değerlendirmeye de olanak sağlayan bir yöntemdir (Bonassi ve diğerleri, 2011).

Nükleer tomurcuk oluşumuna neden olan mekanizma bilinmemektedir ancak DNA tamiri veya amplifiye olmuş DNA'nın kaybı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Thomas ve diğerleri, 2009).

Binükleer hücre sıklığı ile kanser ve nörodejeneratif hastalıklar arasındaki ilişki, olduğu düşünülmektedir. Hızlı yaşlanma gösteren ve kanser ile nörodenejeneratif hastalıklar açısından risk taşıyan Down sendromlu hastalarda, binükleer hücrelerin anlamlı orandaki artışı, bu bulguyu güçlendirmektedir (Bonassi ve diğerleri, 2011).

Kondanse kromatin (erken evre), karyohektik (geç evre) ve karyolitik hücreler (ileri evre) , hücre ölümü sürecinin çeşitli evrelerindeki hücre tipleridir (Thomas ve diğerleri, 2009).

Piknotik hücre oluşumuna neden olan mekanizma ve bu hücrelerin biyolojik açıdan önemi henüz bilinmemektedir. Ancak hücre ölümüne giden bir hücre tipi olduğu düşünülmektedir. Kondanse kromatin, karyohektik, karyolitik hücre ölümü mekanizmalarından farklı olarak, çekirdek parçalanmasını gösteren alternatif bir mekanizma olduğu öne sürülmektedir (Thomas ve diğerleri, 2009).

Çeşitli insan ve hayvan hücre kültürlerinin kullanıldığı in-vitro çalışmalarda, arseniğin; ***büyük delesyonlara, kromozomal abnormaliteye ve gen amplifikasyonlarına*** neden olduğu, ***mitoz bölünmeyi inhibe ettiği ve apoptotik hücre ölümünü indüklediği*** gösterilmiştir (Bhattacharjee ve diğerleri, 2013). Bu nedenden ötürü çalışmamızda, MÇ sıklığının yanı sıra diğer çekirdek anomalilerinin sıklığı da değerlendirilmiştir.

Literatürde, yanak epitel hücrelerinde As maruziyetine bağlı MÇ sıklığı yanında diğer çekirdek anomalilerinin sıklığının da değerlendirildiği iki çalışma bulunmaktadır. Ancak araştırmacılar, As maruziyeti ile diğer çekirdek anomalileri arasında herhangi bir ilişki gözlemedikleri için verileri yayınlamadıklarını ifade etmişlerdir (Warner ve diğerleri,1994; Bartolotta ve diğerleri, 2011).

Çalışmamızda, deney grubundaki bireylerin yanak epitel hücrelerinde nükleer tomurcuk (NT) ve piknotik hücre (PK) sıklığı, kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ***(p<0,001***; Bkz. Çizelge 4.8).

Arseniğin indüklediği gen amplifikasyonlarının mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak çeşitli test sistemlerinde kromozomal aberasyonlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Rudel, Slayton ve Beck, 1996). Lee ve diğerleri (1988), fare hücre kültüründe, arseniğin indüklediği DNA amplifikasyonlarını araştırmış ve 0,8 µM ve 1,6 µM As(III) konsantrasyon aralığında lineer doz-cevap artışı gözlemişlerdir. Dolayısıyla, deney grubunda, gen amplifikasyonlarının biyogöstergesi olan nükleer tomurcuk sıklığının fazla olması, literatürdeki in-vitro çalışma ile paralellik göstermektedir.

Hücre ölümü biyogöstergesi olarak öne sürülen piknotik hücre sıklığının da deney grubunda yüksek bulunması, literatürdeki in-vitro çalışmalarla paralellik göstermektedir. Çünkü arseniğin adaptif yanıtların ve advers etkilerinin araştırıldığı pek çok

in-vitro çalışmaya göre, arsenik, düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığını artırırken, yüksek konsantrasyonlarda sitotoksisiteyi indüklemektedir (Rudel ve diğerleri, 1996).

Öte yandan, diğer hücre ölümü göstergeleri olan kondanse kromatin, karyohektik ve karyolitik hücre sıklıkları, deney grubunda anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ***(p<0,05;*** Bkz. Çizelge 4.8). Bu sonuçların nedeni konusunda herhangi bir yorum yapılamamıştır. As'in yüksek konsantrasyonlarda kondanse kromatin, karyohektik ve karyolitik hücre oluşumuna neden olan mekanizmadan farklı bir mekanizma ile hücre ölümünü indüklediğini söyleyebilmek için bu konuda araştırma yapılması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Çalışma sonuçlarımıza göre, Nevşehir Bölgesi'nde içme suyu As düzeyleri yüksek olan iki köyde (Küçükayhan ve Emmiler) yaşayan bireylerin saç As düzeyleri, bireylerin As'e kümülatif maruziyetinin olduğunu ortaya koymaktadır. Dahası, bireylerin %61'inin saç As düzeyi, toksik karar seviyesi (cut-off) olarak önerilen 1 µg/g seviyesinin üzerindedir. Bu nedenle, bu bireylerin As'e bağlı toksik etkiler (deri lezyonları gibi) açısından riskli grupta olduğu söylenebilir. Dolayısıyla daha sonraki araştırmalarda bu bireylerin, toksik etkiler açısından incelenmesi uygun olacaktır.

- Çalışmamızda, içme suyu TWA-As değerlerine göre ortalama 112 µg/l düzeyde As'e maruz kaldığı belirlenen bireylerin yanak epitel hücrelerinde, mikroçekirdek sıklığı açısından anlamlı düzeyde genotoksik hasar artışı bulunmamıştır**.** Arseniğin indüklediği genotoksik etkiler açısından, dokular arasında farklılık olduğu göz önüne alındığında, daha sonraki çalışmalarda bu bireylerin periferal lenfosit ve mesane epitel hücrelerindeki genotoksik etkilerin de değerlendirilmesi yerinde olacaktır. Bunun dışında, oluşum mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, deney grubundaki bireylerde, gen amplifikasyonu biyogöstergesi olan nükleer tomurcuk sıklıklarındaki anlamlı artış bulgusunun, As maruziyetine bağlı DNA hasarı ile ilişkili olduğu düşünülebilir. Ancak, bu bulguların denek sayısı arttırılarak doğrulanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2007). Toxicological profile for Arsenic, Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Ahsan H.,Chen Y., Parvez F., Zablotska L., Argos M., Hussain I., Momotaj H., Levy D., Cheng Z., Slavkovich V., Van Geen A., Howe G. R., Graziano J. H. (2006). Arsenic exposure from drinking water and risk of premalignant skin lesions in Bangladesh: baseline results from the Health Effects of Arsenic Longitudinal Study. ***American Journal of Epidemiology,*** 163(12), 1138-48.

Akbal A., Yılmaz H., Tutkun E. (2013). Arsenic exposure associated with decreased bone mineralization inmale. ***The Aging Male***, early online, 1-3.

Akyuzlu D., Kayaaltı Z., Soylemez E.,Turksoy V. A., Tutkun E., Soylemezoglu T. (2013). Genetic variations of MT2A gene are associatedwith arsenic levels in biological samples ofindividuals occupationally exposed to arsenic. ***Toxicology Letters Abstracts***.

Alava P., Du Laing G., Odhiambo M., Verliefde A., Tack F. and Van de Wiele T. R. (2013). Arsenic bioaccessibility upon gastrointestinal digestion is highly determined by its speciation and lipid-bile salt interactions. ***Journal olf Environmental Science and Health*****,** Part A; 48, 656-665.

Aliyev V. (2011). *Plasenta Ve Anne Biyolojik Örneklerinde Arsenik Düzeyinin Belirlenmesi ve Glutatyon S Transferaz Polimorfizminin Arsenik Düzeyine Etkisi,* Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Angerer J., Ewers U., Wilhelm M. (2007). Human biomonitoring: State of the art. ***International Journal of Hygiene and Environmental Health***, 210, 201-228.

Aposhian H. V., Arroyo A., Cebrian M. E., Del Razo L. M., Hurlbut K. M., Dart R. C., Gonzalez-Ramirez D., Kreppel H., Speisky H., Smith A., Gonsebatt M. E., Ostrosky W. P. and Aposhian M. M. (1997). DMPS-Arsenic challenge test. I: Increased urinary excretion of monomethylarsonic acid in humans given dimercaptopropane sulfonate. ***The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics***, 282(1), 192-200.

Aposhian H. V., Zakharyan R. A., Avram M. D., Sapayo-Reyes A., Wollenberg M. L. (2004). A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. ***Toxicology and Applied Pharmacology,*** 198(3), 327-335.

Armienta M. A., Rodríguez R., Cruz O. (1997). Arsenic content in hair of people exposed to natural arsenic polluted groundwater at Zimapán, México. ***Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology***, 59, 583-589.

Arnold H. L., Odam R. B., James W. D. (1990). *Disease of the Skin Clinical Dermatology* (8 th ed). Philadelphia: Sounders W. B. Company, 121.

Atabey E . (2009). *Arsenik ve Etkileri*. Ankara: MTA yayınları, Yerbilimleri ve Kültür Serisi:3, 91.

Atabey E., Ünal H. (2008). *Batı Anadoludaki jeolojik unsurlar ve halk sağlığı projesi 2006-2007 yılı Tıbbi Jeoloji ve Etüt Raporu*, Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü, MTA, Rapor No:11067, Ankara, s.291.

Baba A., Tayfur G. (2011). Groundwater contamination and its effect on health in Turkey. ***Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention,*** 183, 77-94.

Banerjee M., Banerjee N., Bhattacharjee P., Mondal D., Lythoge P. R., Martinez M., Pan J., Polya D. A., Giri A. K. (2013). High arsenic in rice is associated with elevated genotoxic effects in humans. ***Scientific Reports***, 3, 1-8.

Banerjee M., Bhattacharjee P., Giri A. K. (2011). Arsenic-induced cancers: a review with special reference to gene, environment and their interaction. ***Genes and Environment***, 33, 128-140.

Bartolotta S. A., Pacskowski M. G., Hick A., Carballo M. A. (2011). Micronuclei assay in exfoliated buccal cells from individualsexposed to arsenic in Argentina. ***Archieves of Environmental Contamination and Toxicology***, 61, 337-343.

Basu A., Ghosh P., Das J. K. (2004). Micronuclei as a biomarker of carcinogen exposure in populations exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India: A comparative study three cell types. ***Cancer Epidemiology Biomarker & Prevention***, 13, 820-827.

Basu A., Mahata J., Roy A. K., Sarkar J. N., Poddar G., Nandyb A. K., Sarkar P. K., Dutta P. K., Banerjee A., Dasd M., Raya K., Roychaudhury S., Natarajan A. T., Nilsson R. And Giri A. K. (2002). Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. ***Mutation Research***, 516, 29-40.

Bhattacharjee P., Chatterjee D., Singh K. K., Giri A. K. (2012). Systems biology approaches to evaluate arsenic toxicity and carcinogenicity: An overview. ***International Journal of Hygiene and Environmental Health,*** 574- 586.

Bhowmick S., Halder D., Kundu A. K., Debasree S., Iglesias M. and Nriagu J. (2013). Is saliva a potential biomarker of arsenic exposure? A case control study in West Bengal, India. ***Environmental Science & Technology***, 47, 3326-3332.

Bianchi F., Cori L., Sicari R. (2013). *Arsenic and cardiovascular diseases.* Paper presented at the 16th International Conference on Heavy Metals in the Environment, Roma, Italy.

Bolognesi C., Knasmueller S., Nersesyan A., Thomas P., Fenech M. (2013). The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay – An update and expanded photogallery. ***Mutation Research***, 753, 100-113.

Bonassi S., Coşkun E., Ceppi M., Lando C., Bolognesi C., Burgaz S., Holland N., Kirsh-Volders M., Knasmueller S., Zeiger E., Carnesoltas D., Cavallo D., da Silva J., de Andrade V. M., Demircigil G. C., Domínguez Odio A., Donmez-Altuntas H., Gattas G., Giri A., Giri S., Gómez-Meda B., Gómez-Arroyo S., Hadjidekova V., Haveric A., Kamboj M., Kurteshi K., Martino-Roth M. G., Montero Montoya R., Nersesyan A., Pastor-Benito S., Favero Salvadori D. M., Shaposhnikova A., Stopper H., Thomas P., Torres-Bugarín O., Yadav A. S., Zúñiga González G. and Fenech M. (2011). The HUman MicroNucleus project on

exfoliated buccal cells ($HUMN_{XL}$): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status and assay protocol. ***Mutation Research,*** 728, 88-97.

Bonassi S., Znaor A., Ceppi M., Lando C., Chang W. P., Holland N., Kirsch-Volders M., Zeiger E., Ban S. , Barale R., Bigatti M. P., Bolognesi C., Cebulska-Wasilewska A., Fabianova E., Fucic A., Hagmar L., Joksic G., Martelli A., Migliore L.,Mirkova E., Scarfi M. R., Zijno A., Norppa H. and Fenech M. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. ***Carcinogenesis***, 28 (3), 625-631.

Burgaz S., Coskun E., Demircigil G. C., Kocabas N. A., Cetindag F., Sunter O. and Edinsel H. (2011). Micronucleus frequencies in lymphocytes and buccal epithelial cells from patients having head and neck cancer and their first-degree relatives. ***Mutagenesis***, 26(2), 351-356**.**

Bustaffa E., Stoccoro A., Bianchi F., Migliore L. (2014). Genotoxic and epigenetic mechanisms in arsenic carcinogenicity. ***Archives of Toxicology***, 88, 1043-1067.

Cantor K. P., Lubin J. H. (2007). Arsenic, internal cancers and issues in inference from studies of low level exposures in human populations. ***Toxicology and Applied Pharmacol*ogy**, 222(3), 252-257.

Cascio C. (2011). *A Multidisciplinary Study of Human Exposure to Arsenic and Other Trace Elements.* (Doctoral dissertation, De Montford University, 2011). Leicester, UK.

Çelik A., Abalı Y., Edgünlü G., Uzunoğlu S., Tirtom V. N. (2009). İnsan saçında bulunan (Manisa ilinin üç farklı yerleşim bölgesinde) bazı ağır metallerin ICP -OES yöntemi ile tayini. ***Ekoloji***, 19(73), 71-75.

Ceppi M., Biasotti B., Fenech M., Bonassi S. (2010). Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. ***Mutation Research***, 705, 11-19.

Chakraborty T.. Das U., Poddar S., Sengupta B., De M. (2006). Micronuclei and chromosomal aberrations as biomarkers: a study in an arsenic exposed population in West Bengal, India. ***Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology***, 76, 970-976.

Chen C. J., Hsu L. I., Wang C. H., Shih W. L., Hsu Y. H. and Tseng M. P. (2005). Biomarkers of exposure, effect and susceptibility of arsenic induced health hazards in Taiwan. ***Toxicology and Applied Pharmacology,*** 206, 198-206.

Chen Y., Graziano J. H., Parvez F., Liu M., Slavkovich V., Kalra T., Argos M., Islam T., Ahmed A., Rakibuz-Zaman M., Hasan R., Sarwar G., Levy D., Van Geen A. and Ahsan H. (2011). Arsenic exposure from drinking water and mortality from cardiovascular disease in Bangladesh: prospective cohort study. ***British Medical Journal*,** 342, 1-11.

Cihan Y. B., Sözen S., Yıldırım S. Ö. (2011) . Trace elements and heavy metals in hair of stage III breast cancer patients. ***Biological Trace Element Research***, 144, 360-379.

Cohen S. M., Arnold L. L., Beck B. D., Lewis A. S., Eldan M. (2013). Evaluation of the carcinogenicity of inorganic arsenic. ***Critical Reviews in Toxicology,*** 43(9), 711-752.

Concha G., Nermell B., Vahter M. (2006). Spatial and temporal variations in arsenic exposure via drinking-water in Northern Argentina. ***Journal of Health, Population and Nutrition***, 24(3), 317-326.

Concha G., Vogler G., Lezcano D., Nermell B., Vahter M. (1998). Exposure to inorganic arsenic metabolites during early human development. ***Toxiological Sciences,*** 44(2), 185-190.

Coronado-Gonzalez J. A., Del Razo L. M., García-Vargas G., Sanmiguel-Salazar F., Peña J. E. (2007). Inorganic arsenic exposure and type 2 diabetes mellitus in Mexico. ***Environmental Research***, 104(3), 383-389.

Çöl M., Çöl C., Soran A., Şaylı B. S., Öztürk S. (1999). Arsenic related Bowen's disease, palmar keratosis and skin cancer. ***Environmental Health Perspectives***, 107, 687-689.

Dağıstanlı S. (1995). *İçme suyuyla kronik arseniğe maruz kalmış bireylerin periferik kan lenfositlerinde genotoksik hasarın araştırılması.* Yayınlanmamış doktora tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Dogan M., Dogan A. U., Celebi C., Baris Y. I. (2005). Geogenic arsenic and a survey of skin lesions in the Emet Region of Kütahya, Turkey. ***Indoor and Built Environment,*** 14(6), 533-536.

Dogan M., Dogan A. U. (2007). Arsenic mineralization, source, distribution, and abundance in the Kütahya Region of the western Anatolia, Turkey. ***Environmental Geochemistry and Health***, 29, 119-129.

Faita F., Cori L., Bianchi F., Andreassi M. G. (2013). Arsenic-induced genotoxicity and genetic susceptibility to arsenic-related pathologies. ***International Journal of Environmental Research and Public Health***, 10, 1527-1546.

Fenech M. (1998). Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes—a biomarker for DNA damage in human populations. ***Mutatation Research***, 404, 155-165.

Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A. T., Surrales J., Crott J. W., Parry J., Norppa H., Eastmond D. A., Tucker J. D. and Thomas P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. ***Mutagenesis,*** 26(1), 125-132.

Ferreccio C., Smith A. H., Duran V., Barlaro T., Benitez H., Valdes R., Aguirre J. J., Moore E. L., Acevedo J., Vasquez M. I., Prez L., Yuan Y., Liaw J., Cantor K. P. and Steinmaus C. (2013). Case-control study of arsenic in drinking water and kidney cancer in uniquely exposed Northern Chile. ***American Journal of Epidemiology,*** 178(5), 813-818.

Gault A. G., Rowland H. A. L., Charnock J. M., Wogelius R. A., Gomez-Morilla I., Vong S., Leng M., Samreth S., Sampson M. L. and Polya D. A. (2008). Arsenic in hair and nails of individuals exposed to arsenic-rich groundwaters in Kandal Province, Cambodia. ***Science of the Total Environment***, 393, 168-176.

Gebel T. W. (2001). Genotoxicity of arsenical compounds. ***International Journal of Hygiene and Environmental Health***, 203, 249-262.

Gentry P. R., McDonald T. B., Sullivan D. E., Shipp A. M., Yager J. W. and Clewell H. J. (2010). Analysis of genomic dose-response information on arsenic to inform key events in mode of action for carcinogenicity. ***Environmental and Molecular Mutagenesis,*** 51, 1-14.

Ghosh P., Basu A., Mahata J., Basu S., Sengupta M., Das J. K., Mukherjee A., Sarkar A. K., Mondal L., Ray K. and Giri A. K. (2006). Cytogenetic damage and genetic variants in the individuals susceptible to arsenic-induced cancer through drinking water. ***International Journal of Cancer,*** 118, 2470-2478.

Ghosh P., Basu A., Singh K. K., Giri A. K. (2008). Evaluation of cell types for assessment of cytogenetic damage in arsenic exposed population. ***Molecular Cancer***, 7, 45.

Gonsebatt M. E., Vega L., Salazar A. M., Montero R., Guzmiin P., Blas J., Del Razo L. M., Garcia-Vargas G., Albores A., Cebrian M. E., Kelsh M. and Ostrosky-Wegman P. (1997). Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. ***Mutation Research***, 386, 219-228.

Gunduz O., Simsek C., Hasozbek A. (2010). Arsenic pollution in the groundwater of Simav Plain, Turkey: It's impact on water quality and human health. ***Water, Air & Soil Pollution***, 205, 43-62.

Hayakawa T., Kobayashi Y., Cui X., Hirano S. (2005). A new metabolic pathway of arsenite: arsenic–glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. ***Archieves of Toxicology,*** 79, 183-191.

Hindmarsh J. T. (2002). Caveats in hair analysis in chronic arsenic poisoning. ***Clinical Biochemistry***, 35, 1-11.

Holland N., Bolognesi C., Kirsch-Volders M., Bonassi S., Zeiger E., Knasmueller S. and Fenech M. (2008). The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. ***Mutation Research***, 659, 93-108.

Hughes M. F., Beck B. D., Chen Y., Lewis A. S., Thomas D. J. (2011). Arsenic exposure and toxicology: A Historical Perspective. ***Toxicological Sciences***, 123(2), 305-332.

Ingle J. D., Crouch S. R. (1988). Atomic Fluorescence Spectroscopy (Chapter 11). In *Spectrochemical Analysis*. New Jersey. Prentice Hall PTR. pp.319-323.

Internal Agency for Research on Cancer (IARC). (2004). Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. ***IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans***, 84, 1-512.

Internal Agency for Research on Cancer (IARC). (2012). Arsenic, metals, fibres and dusts. ***IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans***, 100C, 41-85.

İçilebilir Nitelikteki Suların İstihsali, Ambalajlanması, Satışı ve Denetlenmesi hakkındaki yönetmelik. (1997). 23144 no'lu Resmi Gazete.

İkizoğlu E. (2008). Sularda arsenik. ***Kimya Mühendisliği Dergisi***, 170, 28-30.

İnsani Tüketim amaçlı sular hakkındaki yönetmelik. (2005). 25730 no'lu Resmi Gazete; Ek- 1.

Karim M. D. 2000). Arsenic in groundwater and health problems in Bangladesh. ***Water Research***, 34(1), 304-310.

Lee T. C., Tanaka N., Lamb P. W., Gilmer T. M., Barrett J. C. (1988). Induction of gene amplification by arsenic. ***Science,*** 241, 79-81.

Lin T., Huang Y. (1998). Arsenic species in drinking water, hair, fingernails, and urine of patients with blackfoot disease. ***Journal of Toxicology and Environmental Health***, Part A, 53, 85-93.

Lindberg H. K., Wang X., Jarventaus H., Falck G. C., Norppa H. and Fenech M. (2007). Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. ***Mutation Research***, 617, 33-45.

Mahimairaja S., Bolan N. S., Adriano D. C., Robinson B. (2005). Arsenic contamination and its risk management in complex environmental settings. ***Advances in Agronomy,*** 86, 1-82.

MajerB. .J., Laky B., Knasmüller S., Kassie F. (2001). Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. ***Mutation Research,*** 489 (2-3), 147-172.

Marchiset-Ferlay N., Savanovitch C., Sauvant-Rochat M. P. (2012). What is the best biomarker to assess arsenic exposure *via* drinking water. ***Environment International***, 39, 150-171.

Martinez V., Creus A., Venegas W., Arroyo A., Beck J. P., Gebel T. W., Surralles J. and Marcos R. (2005). Micronuclei assessment in buccal cells of people environmentally exposed to arsenic in northern Chile. ***Toxicology Letters,*** 155, 319-327.

Mazumder D. G., Dasgupta U. B. (2011). Chronic arsenic toxicity: studies in West Bengal, India. ***Kaohsiung Journal of Medical Sciences***, 27, 360-370.

Mazumder D. G. (2008). Chronic arsenic toxicity & human health. ***Indian Journal of Medical Research***, 128, 436-447.

Moore L. E., Karami S., Steinmaus C., Cantor K. P. (2013). Use of OMIC technologies to study arsenic exposure in human populations. ***Environmental and Molecular Mutagenesis,*** 54, 589-595.

Moore L. E., Smith A. H., Eng C., Kalman D., De Vries S., Bhargava V., Chew K., Moore D., Ferreccio C., Rey O. A. and Waldman F. M. (2002). Arsenic-related chromosomal alterations in bladder cancer. ***Journal of National Cancer İnstitue,*** 94, 1688-1696.

Moore L. E., Warner M. L., Smith A. H., Kalman D., Smith M. T. (1996). Use of the fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells. ***Environmental and Molecular Mutagenesis***, 27(3), 176-184.

Mosaferi M., Yunesian M., Mesdaghinia A. R., Nasseri S., Mahvi A. H. and Nadim H. (2005). Correlation between arsenic concentration in drinking water and human hair. **Iranian *Journal* of *Environmental Health Science* & *Engineering,*** *2(1), 13-21.*

Müllner E., Brath H., Nersesyan A., Nitz M., Petschnig A., Wallner M., Knasmüller S. and Wagner K. H. (2013). Nuclear anomalies in exfoliated buccal cells in healthy and diabetic individuals and the impact of a dietary intervention. ***Mutagenesis***, 29(1), 1-6.

National Research Council (NRC). (2001). *Arsenic in Drinking Water, 2001 Update*. Washington DC: National Academy Press.

Nersesyan A., Muradyan R., Kundi M., Knasmueller S. (2011). Impact of smoking on the frequencies of micronuclei and other nuclear abnormalities in exfoliated oral cells: a comparative study with different cigarette types. ***Mutagenesis***, 26(2), 295-301.

Normadin L., Ayotte P., Levallois P., Ibanez Y., Courteau M., Kennedy G., Chen L., Le X. C. and Bouchard M. (2014). Biomarkers of arsenic exposure and effects in a Canadian rural population exposed through groundwater consumption. ***Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology***, 24(2), 127-34.

Pal Singh P., Sharma V. (Editors). (2014). Water and Health, India: Springer, 7-8.

Phan K., Sthiannopkao S., Kim K. W., (2011). Surveillance on chronic arsenic exposure in the Mekong River basin of Cambodia using different biomarkers. ***International Journal of Hygiene and Environmental Health***, 215, 51-58.

Prüss-Üstün A., Bos R., Gore F., Bartram J. (2008). *Safer Water, Better Health: costs, benefits and sustainability of interventions to protect and promote health.* World Health Organization (WHO), Geneva.

Rahman M. A., Hasegawa H. (2012). Arsenic in freshwater systems: Influence of eutrophication on occurrence, distribution, speciation and bioaccumulation. ***Applied Geochemistry,*** 27(1), 304-314.

Ratnaike R. N. (2003). Acute and chronic arsenic toxicity. ***Postgraduate Medical Journal,*** 79, 391-396.

Ravenscroft P., Brammer H., Richards K. (2009). *Arsenic Pollution Global Synthesis.* (1. edition). UK: Wiley-Blackwell, 4.

Ren X., McHale C. M., Skibola C. F., Smith A. H., Smith M. T., Zhang L. (2011). An emerging role for epigenetic dysregulation in arsenic toxicity and carcinogenesis. ***Enviromental Health Perspectives***, 119, 11-19.

Rudel R., Slayton T. M., Beck B. D. (1996). Implications of arsenic genotoxicity for dose response of carcinogenic effects. ***Regulatory Toxicology and Pharmacology***, 23, 87-105.

Sams II R., Wolf D. C., Ramasamv S., Ohanian E., Chen J. And Lowit A. (2007). Workshop overview: Arsenic research and risk assessment. ***Toxicology and Applied Pharmacology,*** 222(3), 245-251.

Schmitt M. T., Schreinemachers D., Wu K., Ning Z., Zhao B., Le X. C., Mumford J. L. (2005). Human nails as a biomarker of arsenic exposure from well water in Inner Mongolia: comparing atomic fluorescence spectrometry and neutron activation analysis. ***Biomarkers,*** 10, 95−104.

Schoen A., Beck B., Sharma R., Dube E. (2004). Arsenic toxicity at low doses: epidemiological and mode of action considerations. ***Toxicology and Applied Pharmacology***, 198, 253-267.

Sele V., Sloth J. J., Lundebye A. K., Larsen E. H., Berntssen M. H. G. and Amlund H. (2012). Arsenolipids in marine oils and fats: A review of occurrence, chemistry and future research needs. ***Food Chemistry***, 133, 618-630.

Senior K. (2002). Arsenic: carcinogen or cancer therapy?. ***Drug Discovery Today***, 7(3), 156-157.

Shen Z. (2011). Genomic instability and cancer: an introduction. ***Journal of Molecular Cell Biology,*** 3(1), 1-3.

Shimizu N., Itoh N., Utiyama H., Wahl G. M. (1998). Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. ***Journal of Cell Biology***, 140, 1307-1320.

Skoog D. A., Holler F. .J., Nieman T. A. (2000). *Enstrümental Analiz İlkeleri* (Çev. E. Kılıç, F. Köseoğlu ve H. Yılmaz). Bilim Yayıncılık. (Eserin orjinali 1998'de yayımlandı), 5. baskı, 206-230.

Skoog D. A., West D. M., Holler F. .J., Crouch S. R. (2007). *Analitik Kimya Temel İlkeler* (Çev. E. Kılıç ve H. Yılmaz). Bilim Yayıncılık. (Eserin orjinali 2004'te yayımlandı), 8. Baskı, 710-739.

Snow E. T., Sykora P., Durham T. R., Klein C. B. (2005). Arsenic: mode of action at biologically plausible low doses: What are the implications for low dose cancer risk?. ***Toxicology and Applied Pharmacology***, 207, 557- 564.

Sofuoğlu S. C., Güzelkaya H., Akgül Ö., Kavcar P., Kurucaovali F. and Sofuoğlu A. (2014). Speciated arsenic concentrations, exposure and associated health risks for rice and bulgur. ***Food and Chemical Toxicology***, 64, 184-191.

Steinmaus C. M., Ferreccio C., Romo J. A., Yuan Y., Cortes S., Marshall G., Moore L. E., Balmes J. R., Liaw J., Golden T. and Smith A. H. (2013). Drinking water arsenic in Northern Chile: high cancer risks 40 years after exposure cessation. ***Cancer Epidemiology, Biomarkers & Preventation,*** 22(4), 623-630.

Stick H. F., Rosi M. P. (1983). Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. ***International Journal of Cancer***, 31 (3), 305-308.

Styblo M., Del Razo L. M., Vega L., Germolec D. R., Lecluyse E. L., Hamilton G. A., Reed W., Wang C., Cullen W. R., Thomas D. J. (2000). Comparative toxicity of trivalent and pentavalent

inorganic arsenic and methylated arsenicals in rat and human cells. ***Archieves of Toxicology,*** 74, 289-299.

Sumi D., Himeno S. (2012). Role of arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase in arsenic metabolism and toxicity. ***Biological Pharmaceutical Bulletin,*** 35(11), 1870-1875.

Thomas D. J. (2007). Molecular processes in cellular arsenic metabolism. ***Toxicology and Applied Pharmacology***, 222, 365-373.

Thomas D. J. (2009). Unraveling arsenic–glutathione connections. ***Toxicological Sciences***, 107, 309-311.

Thomas D. J. (2010). Arsenolysis and thiol-dependent arsenate reduction. ***Toxicological Sciences***, 117, 249-252.

Thomas P., Holland N., Bolognesi C., Kirsch-Volders M., Bonassi S., Zeiger E., Knasmueller S. and Fenech M. (2009). Buccal micronucleus cytome assay. ***Nature***, 4(6), 825-837.

Thomas P., Fenech M. (2011). Buccal micronucleus cytome assay. ***DNA Damage Detection In Situ, Ex Vivo, and In VivoMethods in Molecular Biology***, 682, 235-248.

Tian D., Hengzhi M. A., Feng Z., Xia Y., Le X. C., Ni Z., Allen J., Collins B., Schreinemachers D. and Mumford J. L. (2001). Analyses of micronuclei in exfoliated epithelial cells from individuals chronically exposed to arsenic via drinking water in Inner Mongolia, China. .***Journal of Toxicology and Environmental Health***, 64(6), 473-484.

Tokar E. J., Benbrahim-Tallaa L., Ward J. M., Lunn R., Sams II R. L. and Waalkes M.P. (2010). Cancer in experimental animals exposed to arsenic and arsenic compounds. ***Critical Reviews in Toxicology***, 40(10), 912-927.

Tolbert P. E, Shy C. M, Allen J. W. (1992). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. ***Mutation Research***, 271(1), 69-77**.**

Tseng W. P. (1977). Effects and dose response relationships of skin cancer and blackfoot disease with arsenic. ***Environmental Health Perspectives***, 19, 109-119.

Türksoy V. A., Kaya D., Yılmaz H. Ö., Söylemezoğlu T. (2013). Metalurji işçilerinin saç örneklerinden tespit edilen arsenik düzeyleri. ***Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi***, 70(1), 15-20.

Uchino T., Roychowdhury T., Ando M., Tokunaga H. (2006). Intake of arsenic from water, food composites and excretion through urine, hair from a studied population in West Bengal, India. ***Food and Chemical Toxicology***, 44, 455-461.

Ulman C., Gezer S., Anal O., Tore I. R., Kırca U. (1998). Arsenic in human and cow's milk: a reflection of environmental pollution. ***Water, Air and Soil Pollution,*** 101, 411-416.

Usatine R. P., Smith M. A., Mayeaux E. J., Chumley H. and Tysinger J. (Editors). (2013). *The Color Atlas of Family Medicine*, USA: McGraw-Hill Companies, 184.

Vahter M. E. (2007). Interactions between arsenic-induced toxicity and nutrition in early life, ***Journal of Nutrition***, 137, 2798-2804.

Vandecasteele C. and Block C. B. (1997). Atomic Fluorescence Spectroscopy (Chapter 7) and Comparison of Atomic Spectrometric Analytical Techniques (Chapter 8). In *Modern Methods for Trace Element Determination*. England. John Wiley& Sons Ltd. pp. 159-173.

Villanueva C. M., Kogevinas M., Cordier S., Templeton M. R., Vermeulen R., Nuckols J. R., Nieuwenhuijsen M. J. and Levallois P. (2014). Assessing exposure and health consequences of chemicals in drinking water: current state of knowledge and research needs. ***Environmental Health Perspectives***, 122, 213-221.

Vuyyuri S. B., Ishaq M., Kuppala D., Grover P., Ahuja Y. R. (2006). Evaluation of micronucleus frequencies and DNA damage in glass workers exposed to arsenic. ***Environmental and Molecular Mutagenesis,*** 47, 562-570.

Wang W., Xie Z., Lin Y., Zhang D. (in press). Association of inorganic arsenic exposure with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. ***Jounal of Epidemiology & Community Health***, 1–9.

Warner M. L., Moore L. E., Smith M. T., Kalman D. A., Fanning E. and Smith A. H. (1994). Increased micronuclei in exfoliated bladder cells of individuals who chronically ingest arsenic-contaminated water in Nevada. ***Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention***, 3, 583-590.

Wei M., Wanibuchi H., Morimura K., Iwai S., Yoshida K., Endo G., Nakae D. and Fukushima S. (2002). Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats and genetic alterations in induced urinary bladder tumors. ***Carcinogenesis***, 23(8), 1387-1397.

Wołowiec P., Michalak I., Chojnacka K., Mikulewicz M. (2013). Hair analysis in health assessment. ***Clinica Chimica Acta***, 419, 139-171.

World Health Organization (2001). *Arsenic and Arsenic Compounds*. Environmental Health Criteria. Geneva: World Health Organization.

World Health Organization. (2011). *Arsenic in drinking-water, background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality*. Geneva, WHO Press, 1-4.

Yanez J., Fierro V.,Mansilla H.,Figueroa L.,Cornejo L.and Barnes R. M. (2005). Arsenic speciation in human hair: a new perspective for epidemiological assessment in chronic arsenicism. .***Journal of Environmental Monitoring***,7, 1335-1341.

Yıldız A., Karaca, M., Biçeroğlu S., Nalbantçılar MT., Coşkun U., Arık F., Aliyev F., Yiğiner O., Türkoğlu C. (2008). Effect of chronic arsenic exposure from drinking waters on the QT interval and transmural dispersion of repolarization. ***The Journal of International Medical Research,*** 36, 471-478.

Yüksel B. (2008). *Saç Örneklerinde Arsenik Düzeyinin Belirlenmesi,* Yüksek Lisans Tezi*,* Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Yüksel B. (2013). *Mesleki Olarak Metallere Maruz Kalan İşçilerin Biyolojik Örneklerinde Arsenik Düzeyleri*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURULU
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, GAZİ UNIVERSTY
ANKARA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI
İLAÇ DIŞI KLİNİK ÇALIŞMALAR

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL ADI	"İçme Sularında Arsenik Kirliliği Olan Bölgelerde Yaşayan Bireylerdeki Sağlık Risklerinin Moleküler Epidemiyolojik Yöntemlerle Araştırılması"	
	SORUMLU ARAŞTIRICI UNVANI, / ADI	**Prof.Dr.Sema Burgaz**	
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	**Belge Adı**	**Tarihi / değişiklik No.su**	**Dili Türkçe**
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 340	**Tarih : 15 Haziran 2009**	
	G.Ü. Eczacılık Fakültesinde yapılması tasarlanan ve yukarıdaki künyede kayıtlı araştırma projesine ait dosya; amaç, gerekçe, yaklaşım, yöntemler ve aydınlatılmış onamın yeterliliği yönünden incelenmiş, bütçe dışında uygun olduğuna karar verilmiş olup, çalışmanın gerçekleştirilmesinde, Etik açıdan sakınca yoktur. Etik Kurul kararı; projenin bütçesi TÜBİTAK tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, TÜBİTAK kararının Etik Kurul'a bildirilmesi gerekmektedir.		

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	**İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KILAVUZU, HELSİNKİ BELGESİ, BİYOETİK SÖZLEŞMESİ**

ÜYELER

Ünvanı / Adı / Soyadı Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)		Katılım (**)		İmza
Prof.Dr.Necla BUYAN BAŞKAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları - Nefroloji	G.Ü.T.F Çocuk Sağ.ve Hast.A.D.	K		E	xx	E	
				x	H		H	
Prof. Dr.Firdevs Aktaş ÜYE	Enfeksiyon	G.Ü.T.F Enfeksiyon Hast. A.D.	K		E	xx	E	
				x	H		H	
Prof. Dr.Aysel ARICIOĞLU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F Tıbbi Biyokimya A.D.	K		E	xx	E	
				x	H		H	
Prof.Dr.Fatma ATALAY ÜYE	Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon	G.Ü.T.F Fiziksel Tıp ve Reha.A.D.	K		E		E	Katılmadı
				x	H	X	H	
Prof.Dr.Çağatay ÇİFTER ÜYE	Genel Cerrahi	G.Ü.T.F Genel Cerrahi A.D	E		E	xx	E	
				x	H		H	
Prof.Dr.Seyhan ERSAN ÜYE	Farmasötik Kimya Ecz. Fak.	G.Ü.E.F (Ecz.Fak.) Farmasötik Kimya	K		E		E	Katılmadı
				x	H	X	H	
Prof.Dr.Reha KURUOĞLU ÜYE	Nöroloji	G.Ü.T.F Nöroloji A.D.	E		E	xx	E	
				x	H		H	
Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Etiği ve Tıp Tarihi	G.Ü.T.F Tıp Etiği ve Tıp tarihi A.D.	K		E	xx	E	
				x	H		H	
Doç.Dr.Mehmet Ali Ergün ÜYE	Tıbbi Genetik	G.Ü.T.F Tıbbi Genetik A.D.	E		E	xx	E	
				x	H		H	
Doç.Dr.Aylar POYRAZ ÜYE	Tıbbi Patoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Patoloji A.D	K		E	xx	E	
				x	H		H	
Doç.Dr.Canan ULUOĞLU ÜYE	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D.	K		E	xx	E	
				x	H		H	
Doç.Dr.Münci YAĞCI ÜYE	İç Hastalıkları - Hematoloji	G.Ü.T.F İç Hastalıkları A.D.	E		E	xx	E	
				x	H		H	
Doç.Dr.Birol DEMIREL ÜYE	Adli Tıp	G.Ü.T.F Adli Tıp A.D.	E		E	xx	E	
				x	H		H	
Hukuk Müşaviri Adem GELIR ÜYE	Hukuk Müşavirliği	Rektörlük Hukuk Müşavirliği	E		E	xx	E	
				x	H		H	

* Araştırma İle İlişki
** Toplantıda Bulunma

EK-2. Anket Formu

Tarih: Kod No:

Anketi Yapan:

Köy Adı

1.Ev adresi:

Tel. (Ev veya iş):

2.Kaç yıldır bu bölgede (köy-ilçe-il) yaşıyorsunuz?

3.Adı, Soyadı:

4.Yaşı

5.Eğitim Durumu:

İlk Orta Lise Yüksek

6.Vücut Ağırlığı (kg):

7.Boyu (cm):

8.Mesleği:

Kaç yıldır bu mesleği yapıyorsunuz?

Mesleğinizle ilgili olarak herhangi bir tarım ilacı kullanıyormusunuz?

Varsa adı:

Mesleğinizle ilgili olarak uzun süre güneş altında kalıyor musunuz?

Evet Hayır

9.Medeni Hali:

10.Kaç çocuğu var?

Kadın bireyler için gebelik sayısı: Canlı? Ölü? Düşük?

11.Ev halkı <u>içme suyunu</u> nerden temin ediyor?

Şebeke suyu (ev içi) Hangi tarihten beri?

Çeşme (ismi) Hangi tarihten beri?

Özel kuyu Hangi tarihten beri?

Diğer (belirtiniz)

12.Ev halkı <u>yemek pişirmek</u> için suyu nereden temin ediyor?

Şebeke suyu Hangi tarihten beri?

Çeşme (ismi) Hangi tarihten beri?

Özel kuyu Hangi tarihten beri?

Diğer (belirtiniz)

13.Günde kaç bardak su içersiniz?

14.Evde ısınma aracı olarak ne kullanılıyor?

Soba (kömür) Soba (odun) Kalorifer (Kömür/Fuel oil/Doğal gaz) Diğer

15.Sigara İçme alışkanlığı:

Hiç içmedim

Eskiden içerdim

1 yıldır içiyorum

2-5 yıldır içiyorum

6-10 yıldır içiyorum

11-15 yıldır içiyorum

16-20 yıldır içiyorum

21 ve daha fazla yıldır içiyorum

1-10 sigara/gün

11-20 sigara/gün

20 ve daha fazla sigara/gün

16.Ev/ iş yeri ortamınızda sigara içiliyor mu?

Evet Hayır

17.Çay içme alışkanlığınız var mı?

Evet 1 bardak /gün 2 bardak/gün 3 ve daha fazla bardak/gün

Hayır

18.Kahve içme alışkanlığınız var mı?

Evet 1 fincan/gün 2 fincan/gün 3 ve daha fazla fincan/gün

Hayır

19.Toprak yeme alışkanlığınız var mı?

Evet Hayır

20. Alkol kullanıyor musunuz?

Evet Hayır Nadiren

1 kez/hafta 2-3 kez/hafta 4-5 kez/hafta

21.Son 3 günde herhangi bir balık ürünü tükettiniz mi?

Evet Hayır

22.Beslenme alışkanlığınızda size en fazla uyan tanım aşağıdakilerden hangisidir?

a)Et ağırlıklı beslenme

b)Sebze ve meyve ağırlıklı beslenme

c)Kuru bakliyat ağırlıklı beslenme

d)Balık ve diğer deniz ürünleri ağırlıklı beslenme

e)Karışık

23.Şu anda herhangi bir tanımlanmış sağlık sorununuz var mı?

Evet Nedir? Hayır

24.Şu anda karaciğerinizde tanımlanmış bir sorun var mı? (siroz vb.) var mı?

Evet Hayır

25.Aile bireylerinizde ve sizde herhangi bir genetik hastalık var mı? (Şeker hastalığı, kanser gibi)

Evet Nedir? Hayır

26.Son 2 yılda herhangi bir viral enfeksiyon geçirdiniz mi?(Sarılık, kızamık, kızamıkçık, suçiçeği, kabakulak, menenjit gibi)

Evet Nedir? Hayır

27.Son bir yılda herhangi bir aşı oldunuz mu?

Evet Nedir? Hayır

28.Son bir yılda hiç röntgen (diş dahil) çektirdiniz mi?

Evet Nedir? Hayır

29.Son bir yılda her hangi bir ilaç (vitaminler dahil) kullanıyor musunuz?

Evet Nedir? Hayır

Ne kadar süredir alıyorsunuz?

30.Şu anda bu köyde yaşayan akrabalarınız var mı?

Evet Hayır

Kimler?

a) Anne Adı, Soyadı:

b) Baba Adı, Soyadı:

c) Kardeş Adı, Soyadı:

d) Çocuk Adı, Soyadı:

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, adı	: ALTUN, Beril
Uyruğu	: T.C
Doğum tarihi ve yeri	: 27/07/1987 Konya
Medeni hali	: Bekar
Telefon	: 0 (312) 202 30 82
Faks	: 0 (312) 222 23 26
e-posta	berilaltun@gmail.com
	berilaltun@yahoo.com
	berilaltun@gazi.edu.tr

Eğitim Derecesi	**Okul/Program**	**Mezuniyet yılı**
Ortaöğrenim	Selçuklu Anadolu Lisesi	2005
Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2011
Yüksek lisans	GaziÜniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji ABD	Halen

İş Deneyimi, Yıl	**Çalıştığı Yer**	**Görev**
2011	Selçuk Üniversitesi Hastanesi	Eczacı
2011- halen	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji ABD	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dili
İngilizce

Bilimsel Etkinlikler

-GÜDAM Deney Hayvanı Kullanım Kursu - *ANKARA (2013)*

- EUROTOX CEC Course-3D cell models in drug safety:with better tools to better drugs? *Interlaken / İSVİÇRE (2013)*

-Moleküler Epidemiyoloji Kursu- *Prof.Dr. Stefano Bonassi - Ankara (2012)*

-Bilim Akademisi Bahar Konferansları kapsamında 'Oksidatif DNA hasarının mekanizmaları, hücresel onarımı ve biyolojik sonuçları'- *Prof. Dr. Miral Dizdaroğlu - İstanbul (2013)*

-Oksidatif stres, DNA hasarı, DNA onarımı ve hastalıklarla ilişkileri - *İstanbul (2013)*

-II. Toksikoloji Sempozyumu 'Toksikolojide Güncel Konular'- *Eskişehir (2013)*

-Kozmetik Ürünlerde Güvenlilik Değerlendirme Kursu- *Ankara (7-9 Haziran 2013)*

-49th Congress of European Societies of Toxicology (EUROTOX) - *İsviçre (2013)*

GAZİ GELECEKTİR...