

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KURŞUN MARUZİYETİ VE ŞELASYON TEDAVİSİ SONRASI
METABOLOMİK VE LİPİDOMİK ANALİZLER**

Ecz. Tuğçe ÇETİN

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2021

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KURŞUN MARUZİYETİ VE ŞELASYON TEDAVİSİ SONRASI
METABOLOMİK VE LİPİDOMİK ANALİZLER**

Ecz. Tuğçe ÇETİN

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Suna SABUNCUOĞLU**

**ANKARA
2021**

ONAY SAYFASI**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ****KURŞUN MARUZİYETİ VE ŞELASYON TEDAVİSİ SONRASI METABOLOMİK VE
LİPİDOMİK ANALİZLER****Öğrenci: Ecz. Tuğçe Çetin****Danışman: Doç. Dr. Suna Sabuncuoğlu**

Bu tez çalışması 15 Şubat 2021 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Toksikoloji Programı"nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Ülkü Ündeğer BUCURGAT
(Hacettepe Üniversitesi)*

Tez Danışmanı: *Doç. Dr. Suna SABUNCUOĞLU
(Hacettepe Üniversitesi)*

Üye: *Prof. Dr. Ü. Pınar ERKEKOĞLU
(Hacettepe Üniversitesi)*

Üye: *Doç. Dr. Gözde GİRGİN
(Hacettepe Üniversitesi)*

Üye: *Prof. Dr. Ayşe EKEN
(Erciyes Üniversitesi)*

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezimin aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

17/02/2021

Tuğçe ÇETİN

i

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanın önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Suna SABUNCUOĞLU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Tuğçe ÇETİN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini ve bilgisini benden esirgemeyen, her daim yanımda olduğunu hissettiğim ve birlikte çalışabilme fırsatı bulabildiğim için gurur duyduğum çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Suna SABUNCUOĞLU'na,

Farmasötik Toksikoloji'yi bana sevdiren, sabrını ve nazikliğini her daim örnek alacağım değerli hocam Prof. Dr. Hilal ÖZGÜNEŞ'e,

Deney çalışmalarım süresince benden yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Gözde GİRGİN'e,

Yüksek Lisans tez çalışmam için numune toplanmasında katkıları olan Uzm. Dr. Türkan Nadir ÖZİŞ'e,

Deney çalışmalarımda bana yardımcı olan Dr. Afsin SAMADI ve Burcu ESER'e,

Deney sürecimdeki bilimsel destekleri için Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU'ya ve hem bilimsel hem de manevi desteği için Dr. Kim. Tuba REÇBER'e,

Tez çalışmalarım süresince birlikte çalışma fırsatı bulduğum ve manevi desteğini benden esirgemeyen değerli arkadaşım Uzm. Ecz. Aslı Karacan DİNÇER'e,

Bu süreçte yanımdaki varlığını her daim hissettiğim güzel arkadaşım Uzm. Ecz. Büşra AYKANAT'a,

Eğitim-öğretim hayatımın her anında yanımda olan, bana benden çok inanan canım dostum Ecz. Fahriye DEMİR'e,

Maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim çekirdek ailemin güzel üyeleri; ablam Selin ÇETİN, babam Mithat ÇETİN ve çalışkanlığı ile disiplinini her zaman örnek aldığım bir tanecik annem Serpil ÇETİN'e,

Sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Çetin, T., Kurşun Maruziyeti ve Şelasyon Tedavisi Sonrası Metabolomik ve Lipidomik Analizler, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2021. Kurşun, kullanışlı fizikokimyasal özellikleri nedeniyle endüstride yaygın olarak kullanılan ve önemli toksik etkileri bulunan bir ağır metaldir. Tedavisinde şelasyon ajanları uygulanmakta olup, intravenöz sodyum kalsiyum edta tedavide kullanılan önemli şelasyon ajanlarından biridir. Bu tez çalışması ile kurşuna maruz kalan işçilerde şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında metabolomik profilde oluşan değişikliklerin incelenmesi, oto-oksidasyon ile oluşan oksisterol düzeylerinin değerlendirilmesi; bir sfingolipit metaboliti olan sfingozin-1-fosfat (S1P) düzeylerinin ölçümü gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, otooksidasyonla oluşan oksisterol türevlerinden 7-ketokolesterol (7-KC), 3 β , 5 α , 6 β trihidroksi kolestan (triol) ve S1P düzeylerinin belirlenmesi LC-MS/MS ile, metabolomik analizler ise GC-MS/MS ile gerçekleştirilmiştir. Deneyler sonunda, şelasyon öncesinde 7-KC ve triol düzeyleri sırasıyla 37,35 \pm 2,53 ng/ml ve 41,81 \pm 2,54 ng/ml olarak ölçülürken, şelasyon sonrasında sırasıyla 22,91 \pm 4,49 ng/ml ve 17,64 \pm 3,42 ng/ml olarak ölçülmüştür ($p < 0,001$). S1P düzeyleri ise şelasyon öncesi için 60,76 \pm 15,03 ng/ml, sonrası için de 48,79 \pm 10,75 ng/ml olarak ölçülmüştür. Ayrıca yapılan metabolomik analizlerinde belirlenen metabolitlerden yararlanılarak yolak analizi yapılmış, aspartat, glutamat, homosistein metabolizmaları, mitokondriyal elektron transport zinciri gibi önemli yolakların yanı sıra sfingolipit metabolizması ile linolenik ve linoleik asit metabolizma yolaklarının da etkilendiği belirlenmiştir. Yapılan deneylerde, şelasyon tedavisi öncesi ve sonrası kıyaslandığında şelasyon tedavisinin artmış kolesterol oto-oksidasyonunu geri çevirdiği, S1P düzeylerinin ise şelasyon uygulamasıyla azaldığı belirlenmiştir. Metabolomik analiz sonuçlarının gerçekleştirilen hedefli lipidomik analizlerini destekler nitelikte olduğu öngörülmüştür. Yapılan çalışma, kurşun maruziyetinde lipit metabolizmasının etkilendiğini ve olası hasarın geri döndürülmesinde şelasyon tedavisinin etkili olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Kurşun, şelasyon, oksisterol, lipidomik, metabolomik.

ABSTRACT

Çetin, T., Metabolomic and Lipidomic Analysis After Lead Exposure and Chelation Treatment, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Pharmacy Department of Pharmaceutical Toxicology Master of Science Thesis, Ankara, 2021. Lead is a widely preferred heavy metal in the industry due to its useful physicochemical properties and it has important toxic effects. Chelation agents are used in its treatment and intravenous sodium calcium edta is one of the important chelation agents used in the treatment. With this thesis study, examining the changes in the metabolomic profiles before and after chelation therapy, evaluating the oxysterol levels formed by auto-oxidation; Sphingosine-1-phosphate (S1P) levels, a sphingolipid metabolite, were performed. For this purpose, 7-ketocholesterol (7-KC), 3β , 5α , 6β trihydroxy cholestane (triol) and S1P levels of oxysterol derivatives formed by autoxidation were analyzed by LC-MS/MS. Metabolomic analyzes were performed with GC-MS/MS. 7-KC and triol levels before chelation were measured as 37.35 ± 2.53 ng/ml and 41.81 ± 2.54 ng/ml while after chelation they were 22.91 ± 4.49 ng/ml and 17.64 ± 3.42 ng / ml, respectively ($p < 0.001$). S1P levels were measured as 60.76 ± 15.03 ng/ml before chelation and 48.79 ± 10.75 ng/ml for afterwards. In addition, pathway analysis was made using the metabolites determined in the metabolomic studies. The results showed that important pathways such as aspartate, glutamate, homocysteine metabolisms, mitochondrial electron transport chain, as well as sphingolipid metabolism and linolenic and linoleic acid metabolism pathways were affected. In the experiments, it was determined that the chelation treatment reversed the increased cholesterol auto-oxidation when compared before and after chelation treatment, and S1P levels decreased with chelation application. Metabolomic analysis results were also predicted to support the targeted lipidomic analysis performed. The study has shown that lipid metabolism is affected in lead exposure and chelation therapy is effective in reversing possible damage.

Key Words: Lead, chelation, oxysterol, lipidomic, metabolomic.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Kurşunun Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları	6
2.2. Kurşuna Maruziyet Yolları	8
2.2.1. Sindirim Yolu ile Maruziyet	11
2.2.2. İnhalasyon Yolu ile Maruziyet	13
2.2.3. Deriden Emilim Yolu ile Maruziyet	14
2.3. Kurşunun Toksikokinetik Özellikleri	14
2.3.1. Absorpsiyon	14
2.3.2. Dağılım	15
2.3.3. Metabolizma ve İtira	17
2.4. Kurşunun Toksik Etki Mekanizmaları	17
2.5. Kurşunun Toksik Etkileri	21
2.5.1. Hematolojik Sistem Üzerindeki Toksik Etkiler	23
2.5.2. Sinir Sistemi Üzerindeki Toksik Etkiler	25
2.5.3. Renal Sistem Üzerindeki Toksik Etkiler	28
2.5.4. Kardiyovasküler Sistem Üzerindeki Toksik Etkiler	29
2.5.5. İmmün Sistem Üzerindeki Toksik Etkileri	31
2.5.6. İskelet Sistemi Üzerindeki Toksik Etkileri	31
2.5.7. Üreme Sistemi Üzerindeki Toksik Etkileri	32
2.5.8. Karsinojenite	33

2.5.9. Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri	35
2.6. Kurşun Zehirlenmesinde Kullanılan Şelasyon Tedavisi	35
2.6.1. CaNa ₂ EDTA ve Diğer Şelasyon Ajanlarının Karşılaştırılması	38
2.7. Lipitler, Kolesterol Metabolizması ve Oksisteroller	42
2.7.1. Oksisteroller	45
2.7.2. Sfingozin-1-Fosfat	50
2.8. Metabolomik Kavramı ve Kullanımı	53
3. GEREÇ VE YÖNTEM	59
3.1. Kullanılan Kimyasallar Maddeler	59
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	60
3.3. Hazırlanan Çözeltiler	62
3.3.1 LC-MS/MS ile Oksisterol Analizi Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	62
3.3.2. Sfingozin-1-Fosfat Analizi Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	64
3.3.3. Metabolomik Analizi Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	64
3.4. Çalışma Grubunun Seçimi	64
3.5. Çalışma Grubundan Biyolojik Örneklerin Toplanması	65
3.6. Çalışma Grubunun Klinik Parametrelerinin Değerlendirilmesi	65
3.7. 7-Ketokolesterol ve 3 β , 5 α , 6 β Trihidroksi Kolestan Analizi	65
3.7.1. Kromatografik Analiz Koşulları	69
3.7.2. MS/MS Kaynak Ayarlarının Optimizasyonu	70
3.8. Sfingozin-1-Fosfat Analizi	73
3.9. Metabolomik Analizi	76
3.9.1. Numunelerin hazırlanması	77
3.9.2. GC-MS Parametreleri	77
3.9.3. Veri analizi	78
3.9.4. Metabolomik Yöntemlerin Validasyon Çalışmaları	79
4. BULGULAR	80
4.1. Çalışma Grubuna Ait Demografik Bulgular	80
4.2. Çalışma Grubuna Ait Klinik Bulgular	80
4.3. Plazma 7-Ketokolesterol ve 3 β , 5 α , 6 β Trihidroksi Kolestan Düzeyleri	81
4.4. Sfingozin-1-Fosfat LC-MS/MS Yöntemine İlişkin Bulgular	83
4.5. Metabolomik Analizine İlişkin Bulgular	84

4.6. Yolak Analizleri	90
5. TARTIŞMA	94
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	103
7. KAYNAKÇA	105
8. EKLER	
EK-1: Etik Kurul İzin Belgesi	
EK-2: Dijital Makbuz	
EK-3: Orijinallik Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

11β-HSD1	11 β -Hidroksisteroid Dehidrogenaz Tip 1
7-KC	7-Ketokolesterol
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ALA	δ -Aminolevulinik Asit
ALAD	δ -Aminolevulinik Asit Dehidrataz
ALP	Alkalen Fosfatazın
ALT	Alanin Aminotransferaz
AST	Aspartat Aminotransferaz
ATPaz	Adenozin trifosfataz
BAL	Dimerkaprol
BUN	Kan Üre Nitrojeni
Ca	Kalsiyum
CaNa₂EDTA	Kalsiyum Disodyum Etilendiamintetraasetik Asit
CAT	Katalaz
CBC	Kan Hücre Sayımı
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
cGMP	Siklik Guanozin Monofosfat
CYP	Sitokrom
DKK	Metallotionein
DMAP	Yüksek Kalite Kontrol
DMG	4-(Dimetilamino) piridin
DMSA	Süksimer
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EPA	Çevre Koruma Ajansı
ESI	Elektrosprey İyonizasyon
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
Fe	Demir
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon-S-Transferaz
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HCG	İnsan Karyonik Gonadotropin
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HMG-KoA	3-Hidroksi-3-Metil Glutaril Koenzim A
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
Ig	İmmüoglobulin
KAL	Kalibrasyon
KK	Kalite Kontrol

KoA	Asetil Koenzim A
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi
LDL	Düşük Dansiteli Lipoproteinlerin
MÖ	Milattan Önce
m/z	kütle/yük
Mg	Magnezyum
MRM	N,N-Dimetilglisin hidroklorid
MSTFA	N-Metil-N- (Trimetilsilil) Mrifloroasetamid
MT	Metallotionein
Na	Sodyum
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NP-C	Niemann-Pick Tip C
O₂	Süperoksit
OH	Hidroksil
OHC	Hidroksi Kolesterol
OSHA	İş Güvenliği ve Sağlığı İdaresi
Pb	Kurşun
PbS	Kurşun Sülfür
PCA	Temel Bileşenler Analizi
PLS-DA	En Küçük Kareler Farklılaştırma Analizi
PUFA	Poliansatüre Yağ Asitleri
PVC	Polivinil Klorür
QC	Kontrol Numuneleri
RNA	Ribonükleik asit
RNB	Reaktif Azot Bileşikleri
ROB	Reaktif Oksijen Bileşikleri
ROR	Retinoik asit reseptörü ile ilişkili orfan reseptörleri
S1P	Sfingozin-1-Fosfat
SIM	Seçici İyon İzlemi
SOD	Süperoksit Dismutaz
SphK	Sfingozin Kinaz
SPL	Sfingosin-1-Fosfat Liyaz
SREBP	Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein
SS	Standart Sapma
TCA	Trikarboksilik Asit (Sitrat)
Th	T Yardımcı Hücre
TMCS	Çoklu Reaksiyon İzleme
TMCS	Klorotrimetilsilan
Triol	3 β , 5 α , 6 β Trihidroksi Kolesterol
VIP	Projede Önemli Değişken
YKK	Düşük Kalite Kontrol
ZnPP	Alyuvar Protoporfirin

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Kurşunun sağlık üzerine etkileri.	21
2.2. Kurşunun hem biyosentezini inhibe ettiği basamaklar.	24
2.3. CaNa ₂ EDTA ve kurşun ile oluşturduğu şelat kompleksi.	38
2.4. Kolesterol Sentezi.	44
2.5. Enzimatik ve non-enzimatik oksisterol sentezi.	45
2.6. Oksisterol türleri.	47
2.7. Toksikolojide omik teknolojilerinin kullanımı.	53
2.8. Biyolojik sistemlerde omik teknolojilerine genel bakış.	55
2.9. Metabolomik analizlerde genel çalışma yaklaşımları.	57
3.1. LC-MS/MS cihazının temel bileşenleri.	67
3.2. 7-KC'nin DMG türevinin ürün iyon spektrumu ve parçalanma modeli.	72
3.3. Triol'ün DMG türevinin ürün iyon spektrumu ve parçalanma modeli.	73
3.4. Metabolomik analiz basamakları.	76
4.1. Şelasyon öncesi ve sonrasında plazma 7-KC düzeylerinin (ng/ml) karşılaştırılması.	82
4.2. Şelasyon öncesi ve sonrasında plazma triol düzeylerinin (ng/ml) karşılaştırılması.	83
4.3. Kurşun işçilerine ait plazma S1P düzeylerinin (ng/ml) şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında karşılaştırılması.	84
4.4. Şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasına ait metabolomik verilerine ait çok değişkenli veri analiz.	85
4.5. Şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasına ait genel değişen yolaklar.	91
4.6. Şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasına ait anlamlı şekilde değişen bazı belirgin yolaklar.	92

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Kurşunun fizikokimyasal özellikleri.	6
2.2. Kurşun ve bileşiklerinin kullanım alanları.	8
2.3. Kurşun maruziyet yolları ve meslek grupları.	10
2.4. Kurşun zehirlenmesindeki laboratuvar bulguları.	22
2.5. Kurşunun organizma üzerine etkileri.	23
2.6. Kurşun zehirlenmesinin tedavisinde sıklıkla kullanılan ajanlar.	37
2.7. Farklı metallerin EDTA ile oluşturduğu şelatların k sabitleri.	39
2.8. Kurşun zehirlenmesinin tedavisinde kullanılan şelatör ajanların karşılaştırılması.	41
3.1. Kalibrasyon standart çalışma çözeltilerinin hazırlanması (1 L'de).	63
3.2. HPLC Parametreleri.	70
3.3. Kütle Spektrometre Parametreleri.	70
3.4. 7-KC ve triol'ün kütle geçişleri.	71
3.5. Sfingozin-1-Fosfat deney yöntemi.	75
3.6. GC-MS için çalışma koşulları.	78
4.1. Kurşun maruziyeti olan işçilerin çalışma alanları.	80
4.2. Çalışma grubuna ait şelasyon tedavisi öncesi ve sonrası klinik parametrelerindeki değişimler.	81
4.3. Şelasyon öncesi ve sonrasında plazma triol düzeylerinin (ng/ml) karşılaştırılması.	83
4.4. Kurşun işçilerine ait plazma S1P düzeylerinin (ng/ml) şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında karşılaştırılması.	84
4.5. GC-MS analizi sonucunda şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında tanımlanan metabolitler ve bağıl derişimleri.	86
4.6. Şelasyon tedavisine bağılı olarak istatistiksel olarak anlamlı değışen metabolitlerin yer aldıkları yollar.	92

1. GİRİŞ

Kurşun (Pb) insanların hayatına antik çağlarda girmiş olan, elde edilmesi ve üzerinde çalışılması kolay, oldukça yaygın olarak bulunan bir metaldir (1). Pb'nin endüstriyel alanda kullanımının yoğun olması fizikokimyasal özelliklerine, düşük maliyetle elde edilebilmesine ve gözle görülür şekilde kolay işlenebilirliğine bağlıdır. Pb bu özellikleri nedeniyle eritme, madencilik ve pil imalatı dahil olmak üzere 900'den fazla sektöre dahil olmuştur (2). Pb doğada daha çok "galena" adlı inorganik Pb sülfür (PbS) formunda veya demir, bakır, çinko, antimon ve gümüş metalleriyle birleşik olarak inorganik formda bulunur. Daha az sıklıkta olmak üzere organik Pb (IV) formunda da bulunmaktadır (3, 4).

Kurşun; yiyecek, su, toprak ve hava yoluyla insan vücuduna giriş yapabilir. Biyolojik olarak parçalanmadığı ve yavaş bir eliminasyon hızına sahip olduğu için vücutta birikme eğilimindedir (5). Küçük miktarlardaki Pb'nin bile kronik veya akut birikimi, Pb zehirlenmesi ya da *plumbizm* olarak adlandırılan duruma yol açabilir (6). Pb zehirlenmesi, dünya çapında milyonlarca yetişkini ve çocuğu etkileyen tehlikeli bir mesleki ve çevresel hastalıktır (7).

İnsan vücuduna giren Pb'nin %85-90'lık kısmı kanda eritrositlerin zarına bağlanarak, %1'i serbest ve geri kalanı ise albümine bağlı olarak taşınır (8). Erişkinlerde Pb'nin %95'i, çocuklarda ise %74'ü kemiklerde depolanır. Çocuklarda kemik dokudaki Pb oldukça hareketlidir (9). Kan ve yumuşak dokulardaki Pb'nin yarılanma ömrünün çocuklarda 36 güne, erişkinlerde ise kemikte yarılanma ömrünün 20 yıla kadar uzayabildiği bilinmektedir (10).

Kurşun, biyomoleküler düzeyde üç ana toksisite mekanizması ile işlev göstermektedir (1). İlk olarak, biyolojik fonksiyonları çok önemli olan elektron verici ligandlardan özellikle sülfhidril gruplarına olan afinitesi yüksektir ve dolayısıyla çok sayıda enzim, reseptör ve yapısal proteine bağlanıp toksik etki gösterebilir. İkinci olarak Pb, kalsiyuma (Ca) kimyasal olarak benzemektedir ve Ca yerine geçerek özellikle mitokondri içindeki çok sayıda metabolik yolağı ve hücresel enerji metabolizmasını düzenleyen ikincil hücresel haberci sistemlerini engelleyebilir. Ayrıca reaktif oksijen bileşiklerinin (ROB) oluşumunu tetikleyerek oksidatif stres

oluşumuna neden olur. Üçüncü olarak ise, memeli hücrelerinde mutajenik ve mitojenik etkilerin oluşumunu tetikleyebilir (11, 12).

Oksidatif stres, Pb zehirlenmesinin ana mekanizması olarak kabul edilmektedir (3). Pb, kovalent bağ oluşumuna yardımcı olan güçlü bir elektron paylaşım özelliğine sahiptir. Antioksidan enzimlerdeki sülfhidril grupları ile Pb arasında kovalent bağlar oluşur ve sonuçta Pb onları etkisiz hale getirir (13). Pb; δ -aminolevulinik asit dehidrataz (ALAD), glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon-s-transferaz (GST) enzimlerini inaktive eder ve glutatyon (GSH) seviyelerini azaltır (14). Pb zehirlenmesine bağlı oluşan ROS, hücre zarlarından elektron alarak eritrositlerin zarlarında lipid peroksidasyonuna neden olur ve zarı oluşturan lipidi denatüre ederek hücreye zarar verir. Eritrositler, ROS'un etkisine karşı koymak için sınırlı antioksidan enzim rezervuarlarına sahiptirler ve granüler endoplazmik retikulumdan yoksun oldukları için bu enzimleri kendileri oluşturamazlar (3, 15).

Kurşunun hayvan ve insanların organ sistemleri üzerinde önemli toksik etkileri bulunur. Çocuklar erişkinlere göre merkezi sinir sisteminde oluşabilecek toksik etkilere karşı en duyarlı gruptur. Pb; oyun nedeniyle sokak ve ev tozları ile daha fazla temas etmeleri, Pb'nin daha fazla emilmesi ve vücuttan daha az atılması nedeniyle en fazla 0-6 yaş arası çocukları etkiler (6). Yetişkinlerde periferik nöropati, kronik nefropati ve hipertansiyon ortaya çıkan önemli patolojik durumlar arasında yer almaktadır (1, 6). Pb metaline mesleki veya çevresel maruziyet günümüzde özellikle gelişmekte olan ülkeler için halen bir problem olmaya devam etmektedir (16).

Kurşunun en iyi bilinen toksik etkisi, hem biyosentez yolundaki üç enzimin etkilenmesine bağlı olarak gözlemlenen hematolojik değişikliklerdir (17). Pb, ALAD ve ferroşelatazın inhibisyonuna neden olur (11). Ayrıca hücre zarının onarımını bozduğu için eritrositler savunmasız bir hale gelmektedir. Bu iki sürecin birleşik etkisi anemiye yol açmaktadır (11, 16). Pb'nin karaciğer toksisitesi; karaciğer enzimleri olan aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) ve alkalin fosfatazın (ALP) serum düzeylerindeki yükselme ve karaciğer kolesterol metabolizmasındaki değişiklikler ile ilgili bulunmuştur (8).

Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı (IARC), inorganik Pb bileşiklerini insan kanserine neden olması beklendiğinden Grup 2A kanserojen olarak ve organik tetra etil Pb'yi kategori 3 kanserojen olarak sınıflandırmıştır (18).

Ağır metale akut ve kronik maruziyetlerde şelasyon tedavisi uygulanmaktadır ve tedavinin temeli metallere ligantlar arasındaki şelat oluşumuna dayanmaktadır (19). Kronik Pb maruziyeti olan bireylerde en fazla kullanılan şelasyon ajanı kalsiyum disodyum etilendiamintetraasetik asit (CaNa_2EDTA) ve D-penisillamindir. Bu bileşikler ekstraselüler sıvıdaki Pb ile atılabilen kompleksler oluşturarak Pb'nin kan ve yumuşak dokulardan uzaklaşmasını sağlarlar (20).

Çevresel Pb'ye maruz kalmayı takiben CaNa_2EDTA ile tekrarlanan tedavilerin kan Pb düzeyini başarıyla düşürerek kronik böbrek hastalıklarının ilerlemesini geciktirdiği ve CaNa_2EDTA 'nın nefropatiye neden olmadığına dair raporlamalar mevcuttur (21). Şelasyon tedavisi, hedeflenen bölgeden spesifik toksik metalin bağlanarak biyolojik sistemden uzaklaştırılmasını amaçlayan bir tedavi şeklidir. Böylece biyolojik sistemlerin tekrar normal fonksiyonlarına dönmesi sağlanmaktadır (22).

Lipitler, hücre zarlarının önemli bir parçası olan ve yapısal fonksiyonlarının dışında en önemli görevlerinden biri organizmada karbonhidratlardan sonraki yakıt kaynağı olarak kullanımları olan bileşiklerdir (23). Lipitlerin büyük bir kısmı trigliseritler tarafından oluşturulmakta olup fosfolipidler ile serbest ve ester kolesterol de önemli bileşenleridir (24).

Memeli dokularında hücre membranının önemli bir bileşeni olan kolesterol, yapısı nedeniyle oksidasyon reaksiyonlarına duyarlı bir moleküldür. Kolesterolün oksidasyonu sonucunda oluşan ana metabolitleri oksisteroller olarak bilinen oksidasyon ürünleridir. Oksisteroller, kimyasal yapıları itibarıyla kolesterole oldukça benzemekle birlikte farklı olarak A veya B halkaları içerebilmektedir. Ayrıca yan zincirinde bir veya daha fazla oksijen içeren fonksiyonel grup da içermektedirler (25). Oksisteroller enzimatik ve enzimatik olmayan yolla olmak üzere iki farklı yoldan meydana gelebilmektedir. ROB ve reaktif azot bileşikleri (RNB) aracılığı ile meydana gelen oto-oksidasyon reaksiyonları enzimatik olmayan (oto-oksidasyon) yolağı

oluşturmaktadır. Enzimatik olan yolla ise biyolojik fonksiyonu olan oksisterol türevleri oluşmaktadır. Memeli dokularında çok düşük konsantrasyonlarda bulunan oksisteroller, patolojik durumlarda dokularda yüksek düzeylere ulaşabilmektedir (26, 27). Özellikle oto-oksidasyon yolu ile oluşan oksisterollerin ateroskleroz, nörolojik hastalıklar ve kanser gibi hastalıkların patogenezinde rol oynadıkları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Oksisterol türevlerinin mesleki hastalıkları da içeren pek çok inflamatuvar hastalıkla ilişkili olması, belli maruziyetler sonucunda oluşabilecek Pb zehirlenmelerinde biyobelirteç olarak da kullanılabilceğini düşündürmektedir (28).

Bir hücre veya canlıdaki metabolizma elemanlarının ve artıklarının tümü metabolom olarak adlandırılır. Diğer bir deyişle bir organizma içerisindeki küçük moleküllü metabolitlerin tamamı metabolomdur (29). Metabolitler, biyokimyasal reaksiyonların ara ürünleridir ve canlı hücre içerisinde gerçekleşen çok sayıda farklı metabolik kaskadlarda rol alan veya bu metabolik yolların işleyişi sırasında ortaya çıkan önemli kimyasal moleküllerdir. Molekül ağırlıkları 50-1500 Dalton arasında değişmektedir (30). Metabolomik ise metabolomdaki küçük moleküllü metabolitlerin spektroskopi, kromatografi gibi yüksek verimli teknolojiler kullanılarak saptanması, miktarının belirlenmesi ve tanımlanmasıdır (31). Metabolomik çalışmalarında; belirli bir zaman diliminde dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda lipid, karbohidratlar, vitaminler, hormonlar ve diğer hücre bileşenlerinden ortaya çıkan küçük moleküllü metabolitlerin saptanması, miktarının belirlenmesi ve tanımlanması mümkün olmaktadır. Metabolomik analiz, hastalık teşhisi veya toksik ajanların fenotip üzerindeki etkilerini araştırmada en ideal yöntemdir (32).

Bu tez çalışması ile Pb zehirlenmesi görülen hastalarda şelasyon tedavisinin metabolomik profilde oluşturduğu değişikliklerin belirlenmesi, kolesterolün oto-oksidasyonu sonucunda oluşan oksisterol düzeylerinin ölçülerek birlikte ele alınması, sfingolipitlerin metabolizması ile oluşan ve polar bir metabolit olan, hücre zarının akışkanlığının düzenlenmesinde yapısal olarak önemli rol oynayan sfingozin-1-fosfat (S1P) düzeylerinin tespit edilerek şelasyon tedavisinin etkinliğinin incelenmesi planlanmıştır. Yapılan literatür taramasında daha önce bu hasta grubunda metabolomik çalışmalarının ve oksisterol düzeylerinin birlikte değerlendirildiği

bilimsel bir makaleye rastlanmamıştır. Dolayısıyla, çalışmanın bir ön çalışma olması söz konusudur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kurşunun Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları

Kurşun, insanlar tarafından 7000 yıldan uzun süredir bilinen, kullanımda olan, eldesi ve işlenmesi kolay, yaygınlığı yüksek bir metaldir. Oldukça yumuşaktır, iletkenliği zayıftır, kolay şekil alabilir ve kokusu hafiftir (33).

Kurşun, periyodik cetvelin 4A grubunda yer almaktadır. Atom numarası 82 ve atom ağırlığı 207,19 g/mol, özgül ağırlığı 11.34 g/cm³ şeklindedir. 500 °C'nin üzerinde buharlaşarak duman haline dönüşebilmektedir. Doğada, ²⁰⁴Pb, ²⁰⁶Pb, ²⁰⁷Pb, ²⁰⁸Pb olmak üzere 4 dayanıklı ve ²¹⁰Pb, ²¹¹Pb, ²¹²Pb ve ²¹⁴Pb olmak üzere 4 kısa ömürlü izotopu bulunmaktadır (33, 34). Pb'ye ait temel bilgiler ve Pb'nin fizikokimyasal özellikleri Tablo 2.1.'de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Kurşunun fizikokimyasal özellikleri (6, 33).

İsim	Kurşun
Sembol	Pb
Atom Numarası	82
Atom Ağırlığı	207,2 Atomik Kütle Birimi (AKB)
Erime Noktası	327,5 °C (600,65 °K, 621,5 °F)
Kaynama Noktası	1740 °C (2013,15 °K, 3164 °F)
Proton ve Elektron Sayısı	82
Nötron Sayısı	125
Sınıflandırma	Ağır metal
Yoğunluk (293 °K)	11.34 g/cm ³
Renk	Mavimsi

Kurşunun sembolü olan Pb, Latince adı olan *Plumbum*'un bir kısaltmasıdır. Pb, doğada daha çok "galena" adlı PbS formunda veya demir, bakır, çinko, antimon ve gümüş metalleriyle birleşik olarak bulunmaktadır. Pb'nin doğada üç formu bulunmaktadır: Pb(0), Pb(II) ve Pb (IV) (3, 35).

Elementel form (Pb^0) metal veya metal alaşımlarının oksitlenme veya diğer kimyasal etkilerle aşınma durumuna (korozyon) karşı dayanıklıdır ve diğer metallerle alaşımlar oluşturmak için uygun bir yapıya sahiptir. Bu şekilde levha, yapı kaplamaları, tel ve kablo imalatında kullanılmaktadır. Ayrıca bataryalarda, radyasyondan korunmada kalkan olarak, su borularında ve mühimmat yapımında da yaygın şekilde yer almaktadır (3, 36). Pb, oluşturduğu inorganik bileşiklerde ise esas olarak iki değerli formda (Pb^{+2}) bulunur. İnorganik Pb bileşikleri genellikle boya sanayinde kullanılır (37). Organik Pb bileşiklerine ise genel olarak dört değerli form (Pb^{+4}) hakimdir. Organik Pb bileşikleri ise bir dönem benzin katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Pb kullanımının benzin, boya, lehim ve su temin borularından çıkarılması, genel popülasyonda kan Pb düzeylerini önemli ölçüde düşürmüştür (2, 18).

Kurşunun insanoğlunun kullanmayı öğrendiği ilk metallere biri olması nedeniyle mesleki veya çevresel Pb maruziyeti sonucu oluşan toksisite tablosu yüzyıllardan beri bilinmektedir (38). Pb'nin kullanımı MÖ 4000 yıllarına kadar dayanmaktadır (3). En eski Pb madenlerinin Türkiye'de, Çatalhöyük yakınlarında bulunduğu bildirilmiştir. Bu çevrede yapılan kazılarda MÖ 6200 yıllarından kalma Pb takı ve aksesuarlar bulunmuştur. MÖ 3000 yıllarında Sümerler ilk Pb heykelini yapmışlardır. Daha önceki dönemlerde ise inorganik Pb bileşiklerinin makyaj malzemesi olarak kullanıldığı bilinmektedir (38, 39).

Kurşunun endüstriyel alanda yaygın kullanımı; fizikokimyasal özelliklerine, düşük maliyetle elde edilebilmesine ve gözle görülür şekilde kolay işlenebilirliğine bağlıdır. Bu özellikler eritme, madencilik ve pil imalatı dahil 900'den fazla sektöre Pb'nin dahil edilmesine neden olmuştur (2, 4). Tablo 2.2.'de Pb ve bileşiklerinin sanayide en çok kullanıldığı alanlar özetlenmiştir.

Tablo 2.2. Kurşun ve bileşiklerinin kullanım alanları (34, 36).

Pb Bileşiklerinin Kullanım Şekli	Kullanım Alanları
<i>Saf Metal</i>	Boru, levha, Pb üretimi ve işlemleri (eritme, döküm, oksitlenme vs.), çatı malzemesi, tel ve kablo yapımı, mermi, av saçmaları, X ışınları ve radyoaktif maddeden korunma ekranları, reaksiyon kapları, depolama tankları yapımında
<i>Alaşım ve İnorganik Bileşikler</i>	
Pb ve antimon alaşımı	Akümülatör levhaları yapımında
Pb monoksit (PbO, Mürdesenk)	Metal dizi harfleri, lehimcilik, akümülatör yapımı ve bazı boyalarda
Kırmızı Pb (Pb ₃ O ₄ , Sülyen)	Paslanmaya karşı astar boya olarak
Pb Karbonat (PbCO ₃ , Üstübeç)	Boya işlerinde
Pb silikat (PbSiO ₃)	Seramik sanayinde, toprak kapların sırlanmasında
Pb arsenat (PbHAsO ₄)	İnsektisit yapımında
Pb sülfür (PbS, Galena)	Lastik sanayinde
Pb kromat (PbCrO ₄)	Bazı boyaların bileşiminde
<i>Organik Pb Bileşikleri</i>	
Pb stearat (Pb(C ₁₇ H ₃₅ COO) ₂)	Plastik madde yapımında
Pb tetraetil (Pb(C ₂ H ₅) ₄)	Motor benzini içine oktanı artırmak için katkı maddesi olarak
Pb tetrametil (Pb(CH ₃) ₄)	

2.2. Kurşuna Maruziyet Yolları

Kurşun, yiyecek, su, toprak ve hava yoluyla insan vücuduna giriş yapabilir. Esas olarak çevreyi kirleten bir madde olarak kabul edilmektedir. Benzinde Pb tetraetilin oktan sayısını arttırıcı olarak kullanıldığı 1970'lerde Pb kirliliğinin zirvede olduğu kabul edilmiştir (7, 40). O dönemde dünya çapında Pb tetraetil üretimi 500.000 ton civarındayken benzinde Pb tetraetil kullanımının yasaklanmasından bu yana, mevcut Pb tetraetil üretimi 4500 tona kadar düşmüştür (16). Uzmanlar, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) topraklarında sadece Pb içeren benzin nedeniyle 4-5 milyon

tona yakın Pb biriktiğini düşünmektedir (10). Ancak 2005'te dünyada kullanılan Pb miktarı 7,13 milyon ton civarına gerileyebilmiştir (36). Türkiye'de ise Pb metal kullanım miktarı 35 bin ton/yıl olarak verilmektedir. Elde edilmesi ise 10 bin tonu hurdadan, 5-6 bin tonu da geçici olarak yurtdışına gönderilen cevherlerden sağlanmaktadır. Ayrıca ithalat oranı da 15-20 bin ton civarındadır (41).

Kurşun biyolojik olarak parçalanmadığı ve yavaş bir eliminasyon hızına sahip olduğu için vücutta birikme eğilimindedir. Küçük miktarlardaki Pb'nin bile kronik veya akut birikimi, Pb zehirlenmesi ya da *plumbizm* olarak adlandırılan duruma yol açabilir (5, 7). *Plumbizm*, Pb'nin vücutta neden olduğu bir tür metal zehirlenmesidir. Karın ağrısı, kabızlık, baş ağrısı, hafıza sorunları, sinirlilik, kısırlık ve eller ile ayaklarda karıncalanma ile karakterizedir. Pb zehirlenmesi, dünya çapında milyonlarca yetişkini ve çocuğu etkileyen tehlikeli bir mesleki ve çevresel hastalıktır (7, 42).

Korozyonu önlemesi nedeniyle boyalarda eski zamanlarda Pb sıkça kullanılmış ve bu nedenle boyası dökülen veya tadilat altındaki eski binalar günümüze kadar havadaki ve topraktaki Pb tozuna katkıda bulunmuşlardır (3). 1974'den beri iç cephe boyalarında zehirli etkileri nedeniyle artık Pb kullanılmamaktadır. Dış boyalarda da titanyum ve çinko tercih edilmektedir (36, 37). İnşaat ve karayollarında ise paslanma ve korozyona karşı dayanıklılığı nedeniyle Pb boyaları temel malzeme olma özelliğini korumaktadır. Yüksek korozyonun bir sorun oluşturmadığı yeraltı ve haberleşme kablolarında Pb yerine polietilen ve metalik veya organik malzemelerin bileşikleri kullanılmaktadır (36, 43).

Sırlanmış seramik eşyalarda ve Pb'lenmiş kristallerde uzun süre bekletilen zayıf asidik sıvılar, Pb'nin buralardan asidik sıvılara geçerek maruz kalınmasına olanak sağlayabilmektedir (1, 36). Günümüzde aşındırıcı kimyasal ortamlarda Pb yerine, paslanmaz çelik, titanyum, plastikler ve çimento, kalafatlama ve eklemelerde ise plastikler kullanılmaktadır. Tüp ve benzeri kaplarda, plastikler, alüminyum, kalay ve cam tercih edilmektedir. Cephanelerde Pb'nin yerine demir ve çelik kullanımı önem kazanmıştır (18, 36).

Sanitasyonda ve içme suyu kaynaklarının taşınmasında kullanılmış olan polivinil klorür (PVC) borular, yüksek miktarda Pb içerdiğinden, sızıntı nedeniyle Pb

zehirlenmesi tehdidi oluşturmuşlardır (44). Günümüzde plastik borular Pb borularının yerini almıştır (36). Ayrıca rafinasyon, eritme, akü imalatı, geri dönüşüm ve araba tamiri gibi işlerde çalışanlarda mesleki Pb maruziyeti görülmektedir (3).

Önemli diğer Pb toksisitesi kaynakları; Ayurveda ve Çin Tıbbı ilaçları, kozmetikler ve boyalı oyuncaklardır. Kianoush ve ark. (45) çevresel, mesleki ve diğer kaynaklar aracılığıyla Pb'ye maruz kalma yollarını yaptıkları araştırmalar sonucu ortaya koymuşlardır. Pb maruziyetinin yaygın kaynakları Tablo 2.3.'de verilmiştir.

Tablo 2.3. Kurşun maruziyet yolları ve meslek grupları (19).

Mesleki Maruziyet	Pb madenciliği ve arıtma, sıhhi tesisat ve boru tesisatı, oto tamiri, cam imalatı, pil imalatı ve geri dönüşüm, inşaat işi, atış poligon alanı, plastik imalatı ve benzin istasyonu görevlisi
Çevresel Maruziyet	Pb içeren boyalar, yolların veya Pb ile boyanmış evlerin yakınındaki toprak, plastik pencere panjurları, sıhhi tesisattan sulara olan sızıntı (borulardan veya lehimden), seramik ürünler ve Pb içerikli mum fitilleri
Diğer	Sırlı çanak çömlek yapımı, ateş sahalarında hedef atışı, Pb lehimleme, Pb saçma veya balıkçılık platin hazırlama, vitray yapımı, boyama ve araba veya tekne onarımı, halk ilaçları, benzin kokusu, takılar ve kozmetikler

2.2.1. Sindirim Yolu ile Maruziyet

Kurşun biyodegradasyona uğramadığı için toprakta birikerek uzun süreli maruziyet kaynağı oluşturabilmektedir. Havadan toprağa ulaşan Pb, genellikle toprağın en üst 2-5 cm'lik tabakasında yer alır (46). Genel nüfus için ana maruziyet yolunu yiyecek ve su oluşturmaktadır (35). Pb toprakta bulunması nedeniyle meyve ve sebzelerin yetişmesi sırasında su aracılığıyla transfer olur. Kökler, gövde ve yapraklardan daha fazla Pb içerebilir. Havada bulunan Pb, yapraklı sebzeler tarafından alınabilir. Şehir merkezi veya çok yakın bölgelerde bulunan sebzelerde Pb konsantrasyonu daha da artmaktadır. Pb'nin eser miktarları bile sindirim sisteminden absorbe edilerek kan yolu ile dokulara iletilebilir (43, 47).

Eski evlerdeki Pb içeren boyalar ve toprak, çocuklar için önemli bir maruziyet kaynağıdır (48). Toprak, oyuncaklar ve eşyalarda bulunan Pb içeren boyalar, küçük çocuklarda bunları ağızlarına alma ve yutma eğilimi nedeniyle ciddi risk oluşturmaktadır (49). Dört yaşına kadar olan bebekler ve küçük çocuklar için başlıca Pb maruziyet kaynağı, eski konutların zeminlerinden boya parçalarının ya da tozlarının eller aracılığı ile ağız yoluna taşınmasıdır. Erişkin bireyler ise, genellikle ellerin düzgün yıkanmaması sonucu tüketilen gıdalar aracılığı ile Pb'ye oral yoldan maruz kalmaktadırlar (48, 50).

İnsanlarda Pb'ye maruziyetin en azından %20'si yüksek Pb içeriğine sahip olan konserve gıdalardan kaynaklanmaktadır. Pb; gıdaları hasat, nakliye, işleme, paketlenme veya hazırlanma aşamalarından herhangi birinde kontamine edebilir (38, 46). Yerleşim yerlerine yakın olan Pb işleme tesisleri ve madenler de Pb konsantrasyonunu ve maruziyet kaynaklarını artıran etkenler arasında bulunmaktadır. Gıdalarda bulunan Pb'nin başlıca kaynakları, bu işlemlerden herhangi birinde çevrede bulunan toz, Pb ile lehimlenmiş konserve kutuları, bitkinin yetiştiği toprak, hava ve yağmur, gıda işlenmesi ve yapımında Pb kontaminasyonu olabilmektedir (16, 34).

Diğer kaynak ise Pb aerosolleri halinde araba egzozlarından çıkan Pb alkil türevleridir. Bu durum yol kenarının metalle kontamine olmasına neden olur. Yol kenarındaki toprak ve bitkiler genellikle Pb içeriğince zengindirler (40, 43).

Kurşun; Ca, fosfor, demir ve bakır gibi minerallerde olduğu gibi ince bağırsak villuslarından kana hızla emilir. Emilim sırasında villuslar elementler arasında bir

öncelik tanımadıklarından, yeterince kalsiyum alamayan hamilelerin, genç ve çocukların Pb zehirlenmesine daha duyarlı olduğu; dengeli mineral alan bireylerin ise, Pb'ye karşı nispeten korunmuş olduğu düşünülmektedir (51, 52). Çocukların, hipokalsemi durumunda, erişkinlerden %25-40 daha fazla Pb absorbe ettikleri gösterilmiştir (49).

Bitkisel ilaçlar da potansiyel Pb maruziyet kaynakları olabilir (48). Bazı Ayurveda bitkisel ürünlerinin 37 mg/g'a kadar Pb içerdiği tespit edilmiş ve 55'in üzerinde Pb zehirlenmesi vakası bitkisel ilaçların yutulmasıyla ilişkilendirilmiştir (40, 53). Geleneksel Çin tıbbında deri problemlerini, karın ağrısını, epilepsi veya "gözleri güçlendirmeyi" tedavi etmek için halk ilaçlarına bağlı Pb zehirlenmesi vakaları bildirilmiştir. Tarihsel gelişim sürecinde Çin'de kullanılan halk ilaçlarının bileşimleri ve bu ilaçların bulunduğu kaplar tescillense de Ying ve ark.'nın (54) çalışmalarında işaret ettikleri gibi şifacıların hazırladıkları ilaçlara tedavi edeceğine inandıkları için bilinçli olarak Pb katmaları da söz konusu olabilmektedir.

Yeraltı ve yüzey suları Pb içermemesine veya Pb düzeyleri kısmen düşük olmasına rağmen, su dağıtım sistemine girdikten sonra Pb'den yapılmış borular, boruların bağlantı yerlerinde Pb ile kaynak veya kaplama yapılması, su soğutucularının Pb içermesi veya musluk gibi tesisat aksesuarlarında Pb bulunması nedeniyle özellikle gelişmemiş ülkelerde Pb düzeyi artmaktadır (38, 55). İçme suyundaki Pb'nin diyetteki Pb'den daha iyi absorbe edildiği düşünülmektedir. Niceliksel açıdan gıda tüketiminin, suda çözünür olan Pb'nin inorganik formlarının emilimini azalttığı ve niteliksel açıdan ise diyetteki diğer öğelerle etkileşimler nedeniyle içme suyundaki Pb'nin daha iyi absorbe olduğu savunulmaktadır (56). Suda çözünür Pb'nin gastrointestinal absorpsiyon etkinliğinin yaşa bağlı olduğu ve çocuklarda yetişkinlere göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu da iyi bilinmektedir. Yetişkinler, içecekler yoluyla aldıkları Pb'nin %35-50'sini absorbe ederken çocuklar için absorpsiyon oranı %50'den daha fazla olabilir (33, 56).

ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından 2004 yılında yapılan bir inceleme, ABD'deki su sistemlerinin %71'inde Pb seviyelerinin 5 µg/L altında olduğunu göstermiştir (33). Türkiye'de ise Türk Standartları Enstitüsü tarafından belirlenen içme sularında bulunabilecek Pb'nin üst sınır değeri, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün belirlemiş olduğu üst sınır değeri ile uyumlu olup 10 µg/L'dir (57).

2.2.2. İnhalasyon Yolu ile Maruziyet

Hava, çevresel Pb döngüsünün önemli bileşeni ve maruziyet yoludur. Endüstriyel işlemler sırasında oluşan tozlar ve Pb içeren yakıt dumanları havadaki Pb'nin önemli kaynaklarıdır (58).

Havada yoğun olarak bulunmasına rağmen duyularla hissedilemeyen Pb, canlılar tarafından solunum yoluyla vücuda alınır. Çok küçük olan partiküler yapısı, burun ve solunum yollarındaki bariyerlere takılmadan alveoler ortama ulaşmasını sağlamaktadır. Alveoler yüzeyler, oksijene geçirgen olduğu kadar diğer kontaminantlara da geçirgen olması nedeniyle bir risk kapısıdır (1). Solunum yoluyla Pb alınması, Pb konsantrasyonunun yüksek olduğu alçak kesimlerde; hava solumaları ve birim vücut ağırlığı başına düşen solunum hızlarının daha yüksek olması nedeniyle, çocuklarda yetişkinlere göre daha yaygındır. Dolayısıyla, çocuklar yetişkinlere göre daha fazla tehlike altındadır ve Pb'ye solunum yolu ile 1,6 ila 2,7 kat daha duyarlı oldukları bildirilmiştir (59-61).

Kentsel havadaki Pb genellikle kırsal havadakinden daha yüksektir. Pb'nin endüstriyel ürünlerin üretiminde sıkça kullanılması kentsel havadaki Pb oranının yüksek olmasının nedenlerinden biridir. Ev tozu içindeki Pb ise hem yaşanan semtteki Pb kaynakları ile hem de ev içi sigara içiciliği ile ilgili olabilir. (36, 37). ABD'nin doğusundaki kırsal alanlarda havadaki Pb düzeyleri 6 ila 10 ng/m³ arasında değişmektedir. Sadece %3,6'lık kısımda EPA tarafından belirlenen 15 ppb'lik izin verilen üst sınırın aşıldığı bildirilmektedir (33).

Sigara kullanımının da solunum yoluyla Pb maruziyeti için bir kaynak olabileceği belirtilmiştir (34). Sigara içme alışkanlığının kan Pb düzeyine olan etkisine yönelik çeşitli araştırmalar yapılmış ve farklı sonuçlar bulunmuştur. Sigaranın kan Pb düzeyini arttırıcı etkisinin sigaranın içinde pestisit olarak kullanılan Pb arsenat bulunması ve bunun sigara dumanıyla vücuda girişi sebebiyle olduğu düşünülmektedir. Ayrıca işçilerin parmaklarında bulunan Pb'nin ağız yolu ile vücuda girme olasılığı da önemli bir faktör olarak öne sürülmektedir (36). Sigara dumanı, diğer toksik maddelerin yanı sıra radyoaktif ²¹⁰Pb içerir (42).

İş Güvenliği ve Sağlığı İdaresi (OSHA), işyeri havasındaki Pb maruziyeti için $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (8 saatlik zaman ağırlıklı ortalama) bir izin verilebilir maruz kalma sınırı belirlemiştir (33).

2.2.3. Deriden Emilim Yolu ile Maruziyet

Deriden emilim yoluyla maruziyet daha çok organik Pb bileşikleri için etkin bir maruziyet yoludur. Dermal yolla maruziyetin diğer yollara nazaran daha az önemli bir maruziyet yolu olduğu düşünülmektedir (16, 38).

Organik bileşiklerin hücre zarının lipit içeriğinde çözünebilmesi deriden emilimde büyük bir rol oynamaktadır (56). İnorganik Pb bileşiklerinin deriden emilmediği ileri sürülmesine rağmen boyalara katılan Pb oksit ve Pb karbonat bileşiklerinin, temas yoluyla işçilere geçtiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, çalışma koşulları sağlıklı olmayan kişilerin giyecekleri ya da işyerlerinden getirdikleri malzemeler aileler, özellikle de çocuklar için kontaminasyon kaynağı oluşturmaktadır (62).

Kozmetik amaçlı olarak kullanılan geleneksel ürünler de Pb maruziyet kaynağı olabilirler. Göz makyajı için kullanılan “sürme” veya “kohl” adı verilen geleneksel ürünler %16-80 arası oranda Pb içerebilirler (55). Rujlarda bulunan Pb içeriği de önemli bir endişe kaynağıdır. 2010 yılında, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) 400 ruj örneğini test etmiş ve maksimum 7,19 ppm Pb konsantrasyonu bulmuştur (63).

2.3. Kurşunun Toksikokinetik Özellikleri

2.3.1. Absorpsiyon

Kurşun maruziyetinde vücuda giriş için gastrointestinal kanal ana yoldur (3). Küçük çocuklar (9 aydan 3 yaşa kadar), 5-10 kat daha hızlı emilim mekanizmaları nedeniyle en riskli grubu oluşturmaktadır (49). Yetişkinler söz konusu olduğunda, oral yoldan maruz kalınan Pb'nin %20-70'i kana girmektedir. Verilen aralığın geniş olmasının nedeni aç veya tok karna olan absorpsiyonun farklılık göstermesidir. Yetişkinlerde tipik bir yemekten sonra sindirilen inorganik Pb %20'ye kadar emilirken aç karnına sindirilen Pb %60-80'e kadar emilebilir. Çocuklarda ise yemek sonrası

Pb'nin yaklaşık %50'si, aç karna ise %100'e kadar emilebilmektedir. Yutulan organik Pb'nin ise tamamına yakının absorplandığı bilinmektedir (33). Solunum yoluyla maruz kalınan Pb'nin neredeyse %100'ünün absorplandığı gösterilmiştir (1).

Kurşun emilimi, özellikle çocuklarda diyetle düşük içerikli çinko, mangan, demir ve Ca ile artış göstermektedir (64). Pb tuzları ile eş zamanlı olarak D vitamini alımının absorpsiyonu artırdığı bildirilmiştir. Diyetle yeterli Ca alınması ile özellikle hamile ve postmenapozal kadınlarda gastrointestinal kanal Pb absorpsiyonunun ve kemik demineralizasyonunun azaldığı görülmüş ve vücut Pb yükünün düştüğüne dair sonuçlar elde edilmiştir (65).

Mesleki maruziyette havadaki Pb'nin solunum sistemi aracılığı ile alınması absorpsiyon açısından birincil derecede öneme sahiptir (16). Akciğerlerden Pb'nin absorpsiyonu parçacık büyüklüğüne ve konsantrasyona bağlıdır. Solunan ortam havasında bulunan Pb parçacıklarının yaklaşık %90'ı alveollere geçebilecek kadar küçüktür. Dolayısıyla, Pb'nin inhalasyon yoluyla absorpsiyonu oldukça önemlidir (33).

Kurşun plasentadan geçebilir. Bu nedenle kordon kanı genellikle hamilelik dönemi (maternal) kan Pb düzeyi ile doğrusal olarak ilişkilidir ancak genellikle biraz daha düşüktür. Beyin dahil fetüsün diğer dokularında Pb birikimi maternal kan Pb düzeyi ile paralel düzeydedir. (66). Ren ve ark.'nın (67) 60 anne ve bebeğinde yapmış olduğu randomize çalışmada annelerin kordon kanı Pb konsantrasyonları ile bebeklerin nöro-davranışsal gelişimleri arasında kuvvetli korelasyon bulunmuştur.

2.3.2. Dağılım

Organizmada Pb homojen olarak dağılmamaktadır. Kana geçen Pb'nin %99'u eritrositlerle moleküler bağ kurarak tutunmaktadır. %1'lik kısım Pb ise, plazma proteinlerine bağlanır veya serbest halde kan sıvısında dolaşır (1) .

Tam kan ve plazmadaki Pb arasındaki oran 50 µg/dl'ye kadar sabittir ve ilişki neredeyse doğrusaldır (1). Bu konsantrasyondan sonra plazma Pb düzeyi artmaktadır. Pb'nin serum ve eritrositler arasındaki dağılımının incelendiği kinetik çalışmalarda elde edilen sonuçlar, kan Pb düzeyleri çok yüksek konsantrasyonlara ulaştığında

eritrositlerin Pb bağlama yeteneklerinin doygunluğa ulaşması nedeniyle serum Pb düzeylerinde göreceli bir artış olduğu şeklinde yorumlanmaktadır (11, 68). Kandaki Pb'nin yarılanma ömrü yaklaşık 30 gündür. Beyin dokusunda ise kan-beyin bariyerinin zor geçilmesi nedeniyle yarılanma ömrü 1 yıldan fazladır (69).

Dolaşıma giren Pb, öncelikle dalak, kemik iliği ve böbrekler gibi organlar içinde hücreler arası sıvı da dahil retiküloendotelial sistem ortamlarına dağılır. Daha sonra kemikler, iskelet ve kalp kası, merkezi sinir sistemi, saç ve kıllar ile tırnaklara geçerek birikmektedir (17).

Erişkinlerde Pb'nin %95'i, çocuklarda ise %74'ü, kemiklerde depolanır (9). Ancak kronik hastalıklar, menopoz, gebelik ve böbrek yetmezliği gibi olgularda, Pb'nin kemiklerden tekrar kan dolaşımına geçtiği bilinmektedir (70).

Erişkinlerde Pb'nin yarılanma ömrünün kemikte yaklaşık 20 yıl olduğu bilinmektedir. Çocuklarda ise kemik dokudaki Pb oldukça hareketlidir. Başta idrar olmak üzere ter ve dışkı ile atılım plazma Pb düzeyini azalttıkça, depo Pb miktarı düşmektedir (10, 71). Kemiklerden salınan Pb, kandaki Pb'nin hemen hemen %50'sini oluşturmaktadır ve endojen maruz kalmanın önemli bir kaynağıdır. Pb'ye maruz kalan erişkinlerde (özellikle kadınlarda); hamilelik, emzirme ve menopoza bağlı osteoporozdan dolayı kemikten Pb salınımı önemli düzeylerde olabilmektedir. Emzirme kemik yıkımı için güçlü bir uyarandır. Emzirme dönemi boyunca kemik ağırlığının %4'ünün mobilize olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle geçmişteki maruziyetler sonucunda kemikte biriken Pb, kan dolaşımına ve süte geçerek laktasyon döneminde bebek için önemli bir maruziyet kaynağı oluşturmaktadır (72, 73). Buna ilaveten menopoz ve ilerleyen yıllarda azalan östrojen üretimi ile meydana gelen artmış kemik kaybı, kadınlarda ileri yaşlarda potansiyel bir Pb toksisitesi riski oluşturmaktadır (38, 65).

Kan Pb düzeyi, Pb zehirlenmesinin boyutunu ölçmek için en önemli kriterlerden biri olsa da Pb'nin toksisitesini en doğru şekilde tanımlamak için vücuttaki Pb'nin yükü yani vücudun yumuşak dokularında ve kemiklerinde biriken Pb miktarının da tanımlanması gerekmektedir (33).

2.3.3. Metabolizma ve İtrah

Organik Pb bileşiklerinin yağ ve sinir dokusuna afinitesi oldukça fazladır (1). Sitokrom P450 enzim sistemi ile indirgenen organik Pb bileşikleri daha sonrasında ikinci bir ürün olarak inorganik Pb'ye dönüştürülmektedir (33, 38). İnorganik Pb bileşikleri metabolize olmayıp %90 gibi büyük bir oranda kemiklerde birikir (74).

Vücuttaki Pb'nin atılmasının ana yolu böbreklerdir (75). Pb'nin renal itrahi, genellikle bir miktar tübüler reabsorpsiyon ile birlikte glomerüler filtrasyonla olmaktadır. Artmış kan Pb düzeylerinde atılım transtübüler taşınma ile artabilir (16).

Total atılımın üçte biri kadarı safra sistemi aracılığı ile feçesle, daha az oranda ise; tükürük, safra, saç ve tırnak ile olur. Süt ve diğer vücut sıvıları ile de atılımın olduğu bildirilmektedir (33, 76).

2.4. Kurşunun Toksik Etki Mekanizmaları

Oksidatif stres, Pb zehirlenmesinin ana toksiste mekanizması olarak kabul edilmektedir (3).

Oksidatif stres; kısaca oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine kayması olarak tanımlanmaktadır. Bu duruma neden olan serbest radikaller yani ROB oksijen metabolizması sonucu oluşan bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, molekül ağırlığı düşük, kısa ömürlü, kararsız, etkin, aktif ara bileşikler olarak nitelendirilmektedir (14). Bu radikaller; metal-katalizörlü reaksiyonların ürünü olarak, ultraviyole, Xve gama ışınlarının radyasyonu sırasında, atmosferde mevcut olan kirletici maddeler nedeniyle, biyolojik sistemde enfeksiyon sırasında nütrofiller ve makrofajlar tarafından ya da mitokondri katalizli elektron taşıma zinciri reaksiyonları veya diğer mekanizmaların ürünleri olarak meydana gelebilmektedirler. Hidroksil (OH) radikali, süperoksit (O_2) radikali ve hidrojen peroksit (H_2O_2) en önemli serbest radikallerdendir (77, 78).

OH radikali, reaktif oksijen türlerinin en güçlüsüdür. Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyol radikalleri, karbon merkezli organik radikaller, organik peroksitler gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük bir hasara neden olur. O_2 radikali ise kendisi direkt olarak zarar

veremez. Asıl önemi, H₂O₂ kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. H₂O₂ bir serbest radikal olmadığı halde ROB kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar çünkü en reaktif ve zarar verici ROB olan OH radikali oluşumuna neden olur (79-81).

ROB hücrelerin lipit, protein, deoksiribonükleik asit (DNA), karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki eder. O₂ ve OH radikali, sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır (78). Membranlarda lipid peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran geçirgenliği artar. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer amino asit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur. ROB'un tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı oluşur (81).

Lipid peroksidasyonu serbest oksijen radikalleri aracılığıyla meydana gelen tepkimelerin yanı sıra kendisi de ROB üretimine neden olan bir olaydır. Lipid peroksidasyonu hakkında iyi bilinen iki durum vardır. Bunlardan ilki; hücre zarı ve organellerinde oldukça fazla bulunan poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) serbest oksijen radikallerine duyarlı olması, diğeri ise lipid peroksidasyonunun zincir tepkimelerle yürüdüğü gerçeğidir (82). ROB, PUFA ile etkileştiğinde bir hidrojen kopartarak bir lipid radikalini oluşumuna neden olur, PUFA bağ düzenlenmesi ile bir dien konjugatına (lipid peroksidasyon ürünü) dönüşür, buna bir oksijenin eklenmesiyle de lipid peroksil radikali meydana gelir. Oldukça reaktif olan peroksil radikali komşu yağ asidinden bir hidrojen alarak lipid hidroperoksidi ve yeni bir lipid radikali oluşturur. Böylece peroksidasyon zinciri ilerlemeye devam eder. Nihayetinde malondialdehit (MDA) veya 4-hidroksinoneal (4-HNE) gibi ikincil ürünlere ayrışabilen lipid peroksitleri oluşur (82, 83).

Hücre zarının akışkanlığını değiştiren lipid peroksidasyonu, bir veya iki değerlikli iyonlara geçirgenliği artırır ve membrana bağlı enzimler ile reseptörlerin inaktivasyonuna neden olur. Peroksidasyon tüm membran lipidlerinin yıkımına yol açabilir. Lizozomlarda membran yıkımıyla proteolitik enzimler hücre içine bırakılır ve bu enzimlerin aktivasyonu ile hücre hasarları artar. Bu yüzden membranlarda oluşan lipid peroksidasyonunun engellenememesi ile membranların yapı ve işlevlerinde önemli değişiklikler olur. Bu süreç hücre ölümü ile sonuçlanır (84, 85).

Lipid peroksidasyonun artması sonucu GSH konjuge bileşiklerinin oluşması ve glutatyon redüktaz aktivitesinin engellenmesi dokularda GSH düzeylerinin azalmasına sebep olabilir (86). Diğer yandan ksenobiyotikler ve diğer toksik maddelerin oluşturdukları oksidatif hasarlarda oluşan doku GSH seviyeleri ve antioksidan enzim aktivitelerindeki değişiklikler halen tartışılan bir problemdir. Bazı araştırmacılar oksidatif strese bağlı olarak dokularda GSH düzeylerinde azalma gözlemlerken, bazı araştırmacılar ise oluşan hasarın GSH düzeylerini değiştirmedığını ve hatta arttırabileceğini belirlemişlerdir (87). Genel olarak lipid peroksidasyonunun etkileri membran akışkanlığının azalması, normal olarak membranı geçemeyecek maddelere karşı (Ca^{+2} gibi) geçirgenliğin artması ve membrana bağlı enzimlerin inaktivasyonu şeklindedir (88).

Hücre zarı lipitlerinin zarar görmesi, biyolojik fonksiyonları ve hücrelerin stabilitesini büyük ölçüde etkiler. Bu nedenle, oksidasyon ürünleri, oksidatif stresin belirteçleri olarak kullanılabilir. Yağ asitleri ve esterleri üç farklı mekanizma ile ayrıştırılır: (a) enzimatik oksidasyon, (b) serbest radikal oksidasyonu ve (c) enzimatik olmayan ve radikal içermeyen oksidasyon. Her bir oksidasyon yolu ile farklı tipte maddeler üretilmektedir (13). ω -6 ve ω -3 doymamış yağ asitleri, konjuge dienler, alkanlar, aldehitler, doymuş ve doymamış ketonlar yağ asitlerinin oksidasyonu ile oluşur. Yağ asidi oksidasyonu sonucu oluşan bazı ürünler yüksek reaktiviteleriyle sitotoksikite ve genotoksikite göstermektedir (82).

Kurşunun toksisite mekanizması incelendiğinde ilk olarak, biyolojik elektron-verici ligandlar özellikle sülfhidril grupları için olan afinitesi çok sayıda enzimatik reseptör ve yapısal proteine bağlanıp etkilemesine olanak sağlar. Bunun sonucunda Pb çok sayıda enzimatik süreci bozabilmektedir (1). İkinci olarak Pb, kalsiyuma kimyasal olarak benzemektedir ve özellikle mitokondri içindeki çok sayıda metabolik yolağı ve hücrel enerji metabolizmasını düzenleyen ikincil haberci sistemlerini engelleyebilir. Üçüncü olarak ise, Pb'nin in vitro olarak memeli hücrelerine mutajenik ve mitojenik etkiler sergilediği gösterilmiştir (1, 12, 89).

Kurşun, kovalent bağ oluşumuna yardımcı olan güçlü bir elektron paylaşım özelliğine sahiptir. Kovalent bağlar, antioksidan enzimlerdeki sülfhidril grupları ile Pb arasında oluşur ve sonuçta onları etkisiz hale getirir (3). Pb ayrıca indirgenmiş glutatyonun sülfhidril grupları ile de bağlanarak onu da inaktif hale getirir (86). Ayrıca

Pb; ALAD, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz ve GST enzimlerini inaktive eder ve GSH seviyelerini daha da azaltır (14). Pb tarafından etkisiz hale getirilen diğer antioksidan enzimler, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalazdır (CAT). Pb, bu enzimlerin sülfhidril gruplarını da hedef alır. Bu enzimlerin aktivitelerinin azalmasıyla H₂O₂ süpürülerek uzaklaştırılmaz (90). Pb; OH ve O₂ radikali seviyelerini de arttırarak ROB üretimini teşvik eder (91).

Kurşun zehirlenmesine bağlı oluşan ROB, hücre zarlarından elektron alarak eritrosit zarlarında lipit peroksidasyonun indüklenmesine neden olur ve zarı oluşturan lipidi denatüre ederek hücreye zarar verir. Eritrositler, ROB'un etkisine karşı koymak için çok sınırlı antioksidan enzim rezervuarlarına sahiptirler ve granüler endoplazmik retikulumdan yoksun oldukları için bu enzimleri geri takviye edemezler (15).

Aşırı ROB üretimi, Pb'nin neden olduğu üreme toksisitesinin arkasındaki bir nedendir. Erkek üreme sistemi üzerine yapılan bir çalışma, seminal plazma Pb ve spermatozoa ROB seviyeleri arasında pozitif korelasyon olduğunu ortaya koymuştur (92, 93). Uzun süreli Pb maruziyeti olan kişilerde, Pb'ye maruz kalmaya bağlı artan ROB üretiminin yükünü temizleme özelliğinden kaynaklanabilecek SOD aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (94).

Oksidatif stres aynı zamanda çevresel Pb maruziyetinin neden olduğu renal toksisitenin gelişiminde de önemli rol oynamaktadır (95). ROB ayrıca nükleik asitlere zarar verir ve DNA onarımını engeller (91). Birçok çalışma, Pb kaynaklı patolojilerin oksidatif strese bağlanabileceğini bildirmiştir (13).


Plumbizm sırasında biriken δ-aminolevulinik asit (ALA), oto-oksidasyona uğrar ve bir ROB kaynağı olduğu bilinmektedir. Ek olarak, Pb antioksidan savunmayı zayıflatır (13). ROB tüm hücresel yapılara saldırır. Fosfolipitlerin çoklu doymamış yağ asidi kalıntıları, hücresel ve mitokondriyal membran bütünlüğünün kaybıyla sonuçlanan yoğun bir lipit peroksidasyonu işlemine tabi tutulur (82). Bununla birlikte, ROB'un neden olduğu protein modifikasyonları, proteinlerin lizin, arginin, prolin ve histidin yan zincirleri oksitlendiğinde oluşan protein karbonil türevlerinin üretimini de indüklemektedir. Okside proteinler ve lipit molekülleri biyolojik makromoleküllerle çapraz bağlı agregatlar oluşturabilir. Ayrıca, Pb adenzin trifosfatları (ATPazlar), sodyum potasyum-ATP pompalarını ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu etkiler. Pb; Ca, demir ve çinko gibi iki değerli minerallerle etkileşime girer (78, 96, 97).

Kurşunun en iyi bilinen toksik etkisi ALAD ve ferroşelatazın inhibisyonudur ve hematolojik sistem üzerindeki toksisitenin temelini oluşturur (1). ALAD'nin Pb tarafından inhibe edilmesine bağlı olarak kanda artan ALA, H₂O₂ ve O₂ radikali üretir; bu da oksihemoglobin ile etkileşime girerek eritrositleri oksidatif strese karşı oldukça savunmasız hale getiren OH radikali oluşumuna neden olur ve sonuçta hemoliz görülür (97, 98).

2.5. Kurşunun Toksik Etkileri

Kurşun toksisitesine ilk olarak, MÖ 370'de Hipokrat'ın raporlarından birinde rastlanmıştır. Hipokrat'ın Pb madeninde ve sanayisinde çalışan işçilerde Pb koliğini tespit etmesiyle Pb toksisitesi ilk defa dile getirilmiştir (15, 16). Hipokrat'tan sonra Nicander, Dioscorides ve Pliny de Pb toksisitesi ile ilgili tespitlerde bulunmuşlarsa da 16. Yüzyılda Paracelsus'un Pb zehirlenmesini tıp literatürüne "Madenci Hastalığı" olarak bildirmesine kadar Pb zehirlenmesi ile ilgili çalışmalar yetersizdir (35).

Günlük Pb maruziyet düzeyi 1 mg/kg'ı geçerse bir müddet sonra kronik zehirlenme başlamaktadır. Pb, maruz kalma dozu ve süresine bağlı olarak insanlarda pek çok toksik etkiye neden olabilir (33). Kan Pb düzeylerine göre Pb'nin sağlık üzerine olan Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.

KANDA KURŞUN DERİŞİMİ				
ÇOCUKLARDA		µg/dL	YETİŞKİNLERDE	
µg/dL			µg/dL	
80-120	Böbrek: Atrofi ve interstisyel nefrit		Ölüm	>130
80-100	Sinir Sistemi: Ensefalopati		Sinir Sistemi: Ensefalopati	100-120
60-100	Gastrointestinal: Kolik		Böbrek: Atrofi ve interstisyel nefrit	40-100
20-40	Hematolojik Sistem: Anemi		Gastrointestinal: Kolik	40-60
10>	Sinir Sistemi: Duyusal Defisit, IQ ve Öğrenme bozukluğu		Hematolojik Sistem: Anemi	50
			Üreme Sistemi: Testiküler Atrofi, Hipospermi	40-50
		Kalp ve Damar Sistemi: Hipertansiyon	> 7	

Şekil 2.1. Kurşunun sağlık üzerine etkileri (99).

Toksik etkiler; Pb'nin özellikle sülfhidril gruplarına olan afinitesi nedeniyle bozulan enzimatik süreçler ve metabolik yollardan, ağır patoloji oluşumu ve ölüme kadar uzanır (3). Hem biyosentezi üzerindeki etkiler diğer tespit edilebilir etkilerin yokluğunda bile hassas bir biyokimyasal gösterge sağlar. Pb zehirlenmesindeki laboratuvar bulguları Tablo 2.4.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.4. Kurşun zehirlenmesindeki laboratuvar bulguları (100).

Bulgular	Özellikler
Akut Pb zehirlenmesi	↑ BUN (kan üre nitrojeni), serum kreatinin, serum ürik asit ve idrarda aminoasit, glukoz ve fosfat miktarları
↓ Eritrosit ALAD	≥ 3 µg/dl (Kan Pb düzeyi ile ters orantılı)
↑ İdrar ALA	Çocuklarda 25 µg/dl, erişkin kadınlarda 35 µg/dl ve erişkin erkeklerde 45 µg/dl kan Pb düzeyinden sonra artış gösterir.
↑ Alyuvar protoporfirin (ZnPP) seviyesi artar	Yetişkinlerde 30 µg/dl ve çocuklarda ise 15 µg/dl kan Pb düzeyi altında duyarlılığı düşüktür.
CBC (kan hücreleri sayımı)	Bazofilik cisimciklerle karakterize normokromik veya hipokromik anemi, retikülosit miktarında yükselme (tüm değerler 50 µg/dl ve üzerindeki kan Pb düzeyinde görülür)

Kurşunun hayvan ve insanların organ sistemleri üzerinde önemli toksik etkileri bulunur. Çocuklar erişkinlere göre merkezi sinir sisteminde oluşabilecek toksik etkilere karşı en duyarlı gruptur. Oyun nedeniyle sokak ve ev tozları ile daha fazla temas etmeleri, Pb'nin daha fazla emilmesi ve vücuttan daha az atılması nedeniyle en fazla 0-6 yaş arası çocukları etkiler (6, 49). Yetişkinlerde periferik nöropati, kronik nefropati ve hipertansiyon endişe vericidir (1). Pb'nin fizyolojik sistem ve organlar üzerine olan etkileri Tablo 2.5.'de özetlenmiştir.

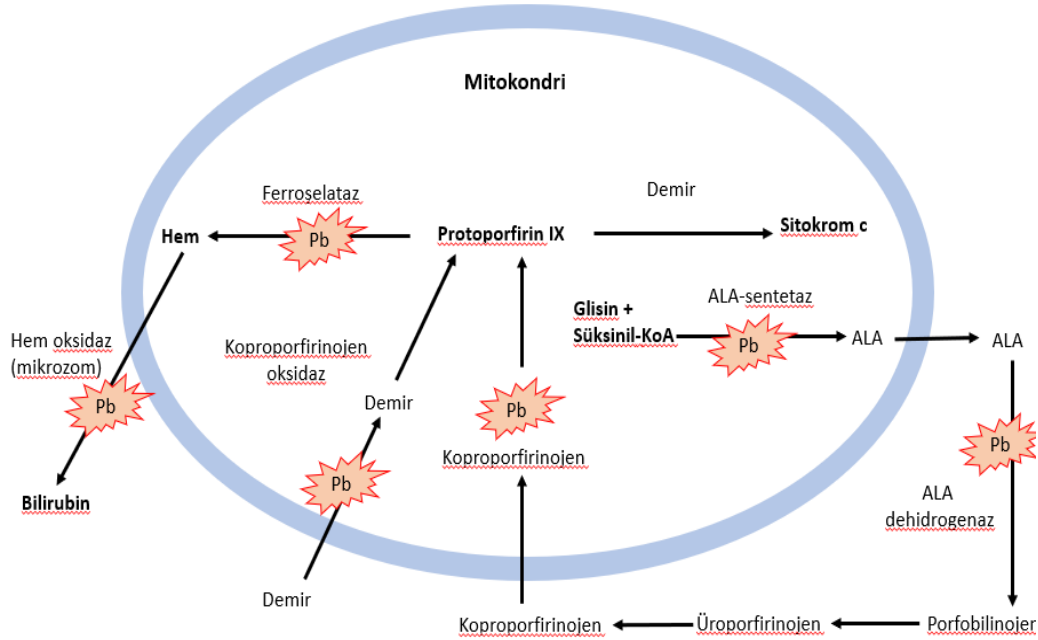
Tablo 2.5. Kurşunun organizma üzerine etkileri (6, 100).

Organ-Sistem	Etkiler
Sinir sistemi	Özellikle çocuklarda akut maruziyette ensefalopati ve genel olarak nefropati, nöropati, kafa içi basınç artışı, konvülsiyon ve ölüm; nöro-elektrofizyolojik testlerde periferik sinir ileti hızında azalma; subklinik olarak zayıf akademik başarı, davranış bozuklukları, işitme azlığı ve zekâ kaybı
Kalp-damar sistemi	Yetişkinlerde hipertansiyon ve sigara içenlerde Pb maruziyeti sonucunda akciğer kanseri
Üreme sistemi	Kadınlarda spontan abortus, ölü doğum ve düşük doğum ağırlığı frekansında artış; erkeklerde sperm ve testisler üzerine toksik etki, hiperspermi, teratospermi, astenospermi ve hipogonadizm
Hematolojik sistem	“Hem” sentezinin çeşitli basamaklarında rol alan enzimlerin inhibe edilmesi sonucu hemoglobin sentezinin azalması (mikrositer anemi)
Karaciğer	Akut Pb maruziyetinde geri dönüşümlü olarak fonksiyonlarda bozukluk (AST ve ALT’de artış)
Böbrekler	Kronik maruziyette hiperürisemi ve kreatin klerensinde azalma, böbrek yetmezliği, renal kanser oluşumu

2.5.1. Hematolojik Sistem Üzerindeki Toksik Etkiler

Kurşun maruziyetinde, en çok etkilenen sistemlerden biri hematolojik sistem olup hem biyosentez yolundaki üç enzimin inhibisyonuna bağlı olarak hematolojik toksik etkiler gözlemlenir. Bu enzimler: ALAD, ferroşelataz ve ALA sentetaz’dır. Ayrıca, Pb hücre zarının onarımını bozduğu için, eritrositleri savunmasız bir hale

getirmektedir. Bu iki sürecin birleşik etkisi anemiye yol açar (11, 16). Hem biyosentez yolağı ve Pb bağlanma bölgeleri Şekil 2.2.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Kurşunun hem biyosentezini inhibe ettiği basamaklar: ALA ve δ -aminolevulinat, kurşun için bağlanma noktalarıdır. Kurşunun başlıca bağlandığı ve inhibe ettiği enzimler ALAD ve ferroşelataz'dır (1).

ALAD, porfobilinojen oluşturmak için iki birim ALA'nın kümelenmesini katalize eder. ALAD'ın inhibisyonu, ALA birikimine neden olur. Pb'ye bağlı toksik etkiler ALAD ve ferroşelatazın inhibisyonu ile karakterizedir (1, 3). Ferroşelataz, hem oluşturmak için protoporfirin halkasına demir eklenmesini katalize eden enzimdir. Ferroşelatazın inhibisyonu; hemoglobin molekülünde hem yerini alan protoporfirin IX'in birikmesiyle sonuçlanır ve protoporfirin IX içeren eritrositler dolaşımda bu sefer çinko ile şelat oluştururlar (101). Çinko protoporfirin (ZnPP) içeren eritrositler yüksek düzeyde floresandır ve Pb maruziyetini teşhis etmek için kullanılabilir. Kişinin beslenme şekli de hem oksidaz aktivitesini yükseltip sonuçta bilirubin oluşumunda artışa neden olabilir (1, 102).

Kurşun zehirlenmesi iki tür anemi ile sonuçlanmaktadır. Bunlar: sadece kronik Pb zehirlenmesinde görülen (a) Frank anemi (hipokromik ve normositik veya retikülositozlu mikrositik) veya (b) akut yüksek seviyelerde Pb maruziyeti ile ilişkili hemolitik anemidir (103).

Kurşun tarafından ALAD inhibisyonu 10–20 µg/dl kan Pb düzeyinde gerçekleşir. Hem biyosentezi, kan Pb düzeyi yaklaşık 50 µg/dl'ye ulaşana kadar azalmaz çünkü bu kadar yüksek seviyelerde bile ALAD'ın etkisi %80-90 ile sınırlıdır. Sadece 50µg/dl'lik yüksek kan Pb düzeyi, daha düşük konsantrasyonlarda hematolojik toksik etkilerin sonucunda aneminin oluşumuna neden olur (1, 15). Plazmada ALA oluşumu ve idrarla atılması, kan Pb düzeyi 10µg/dl civarındayken görülmeye başlar. Bu nedenle idrarda ALA atılımı, kan Pb düzeyi ile ilişkilidir ve Pb maruziyetinin erken biyokimyasal göstergesi olarak işlev görmektedir (60).

Kurşun toksikokinetiğini etkileyebilecek ALAD geninin alelleri için genetik polimorfizmler tanımlanmıştır. Bu polimorfizmin moleküler doğasının, 177. nükleotitteki guaninin sitozine olan dönüşümünden kaynaklandığı gösterilmiştir ve bunun sonucunda 177. nükleotitte asparjin aminoasidi yerine lizin aminoasidi kodlanmaktadır (104). Varyant enzimler ALAD-1 ve ALAD-2 olarak kategorize edilmiştir. Bergdahl ve ark. (105) tarafından yapılan bir çalışmada ALAD-2'nin Pb'ye ALAD-1'e göre daha sıkı ve efektif bağlandığı kanıtlanmıştır. Epidemiyolojik çalışmalarda Pb maruziyeti olan ve ALAD-2 genotipine sahip bireylerin kan Pb düzeylerinin ALAD-1 genotipine sahip kişilerden daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Smith ve ark.'nın (106) çalışmasında ise bu polimorfizmin düşük kan Pb seviyelerine sahip bireylerde bariz bir öneminin olmadığı iddia edilmiştir. Bu nedenle kesin sonuçlar elde etmek amacıyla daha çok ALAD polimorfizmi özelinde populasyon testlerine ihtiyaç duyulmaktadır (101).

2.5.2. Sinir Sistemi Üzerindeki Toksik Etkiler

Beyin Pb maruziyeti açısından oldukça hassas bir organ olup birçok farklı mekanizma ile toksik etkiler ortaya çıkabilmektedir (33, 107). Pb, Ca'nın yerine geçerek Ca homeostazını bozabilir. Protein kinaz C'nin uyarılması, kan-beyin bariyerinin değişmesine ve glutamat ile ilişkili sinaptik yolların inhibisyonuna neden olabilir. Pb; beyindeki glutamaterjik, dopaminerjik ve kolinerjik sistemler dahil, neredeyse her nörotransmitter sistemi etkileyebilmektedir. Nöronlar, ayrıca, Pb'nin ALAD üzerindeki etkisine bağlı olarak ALA gibi hem öncüllerinin birikmesi ile doğrudan veya dolaylı olarak zarar görebilmektedir (108).

Kurşunun; Ca^{+2} , magnezyum (Mg^{+2}), demir (Fe^{+2}) gibi iki değerli katyonlar ve sodyum (Na^{+}) gibi tek değerlikli katyonlar yerine geçerek iyonik mekanizmalara müdahale etmesi nedeniyle hücre içi ve hücreler arası haberleşme, hücre yapışması, protein katlanması ve olgunlaşması, apoptoz, iyonik taşınım, enzim regülasyonu ve nörotransmitterlerin salınımı gibi temel hücresel süreçler önemli ölçüde etkilenmektedir (5, 109).

Kurşun, astroglial hücrelerde birikir ve bu hücrelere zarar vererek miyelin kılıfı oluşumunu bloke eder (110). Miyelin kılıf, sinir hücrelerinde impuls hızını artıran, impuls eşiğini düşüren ve bunları sinir hücresinin çapıyla doğru orantılı olarak yapan, lipit ve proteinden oluşan önemli bir dokudur (111).

Kurşun, nörotransmitter salınımı üzerinde ikili bir etkiye sahiptir: uyarılmış salınım inhibe edilirken, spontan nörotransmitter salınımı artırılır (112). Öğrenme gibi işlevler için önemli olan nörotransmitterlerin (glutamat gibi) salınımı engellenir. Pb toksisitesinin ana hedefinin, Pb onları bloke ederek çalıştığı için N-metil-D-aspartat reseptörleri olduğu varsayılır ve Pb maruziyeti, bu reseptör proteinlerinin ekspresyonunu da azaltır (113).

Klinikte Pb ensefalopatisi, Pb'ye maruz kalan çocuklarda kan Pb düzeyi 80-100 $\mu\text{g}/\text{dl}$ ve yetişkinlerde 100-120 $\mu\text{g}/\text{dl}$ olduğunda ortaya çıkabilmektedir (3, 114). Pb ensefalopatisinin semptomları; uyuşukluk, kusma, sinirlilik, iştahsızlık, baş dönmesi ve bariz ataksiyle başlamaktadır (5). Bilincin azalması sonucunda da koma ve ölüm görülebilir. Ölüm sonrası otopsideki patolojik bulgular, beyin kapillerindeki sıvının ekstrasvazasyonu nedeniyle beyinde ciddi ödem oluşumunu göstermiş, nöronal hücrelerde kayıp ve glial hücrelerde artış belirlenmiştir (5, 12).

Kurşuna doğum öncesi ve erken çocukluk döneminde maruz kalmanın yetişkinlikte şiddet içeren suçlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (3, 58). Tedavi sonrasında epilepsi, zihinsel gerilik ve bazı durumlarda optik nöropati ve körlük de dahil olmak üzere farklı sekeller görülebilir (115, 116). Yetişkinlerde 50 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 'den yaklaşık 100 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 'ye kadar olan kronik Pb maruziyetinin merkezi sinir sisteminde oluşan kalıcı toksik etkiler ile ilişkili olduğu bulunmuştur (3).

Hem periferik hem de merkezi sinir sistemi Pb'ye maruz kalmadan etkilenmektedir. Çocuklarda merkezi sinir sistemi, yetişkinlerde ise periferik sinir sistemi daha fazla etkilenmektedir (16, 117). Kronik olarak yüksek düzeyde Pb maruziyeti, periferik motor nöropatiye neden olur. 30µg/dl kadar düşük kan pb düzeyinde periferik sinir iletim hızında azalma olduğuna dair kanıtlar varken, diğer çalışmalarda 70µg/dl'nin altında bu etkiler görülmemiştir (118, 119).

Mesleki maruziyeti olan yetişkinlerde, kan pb düzeyi 40µg/dl ve daha fazla ise kümülatif maruz kalmalarda nöro-davranışsal bir dizi anormallikler görülebilmektedir (1, 120). Periferik nöropati, yetişkinlerde Pb toksisitesinin klasik bir göstergesi olup segmental demiyelinizasyon ve muhtemelen aksonal dejenerasyon ile karakterizedir. Bu nedenle, sinir impuls transdüksiyonu tamamen bozularak özellikle dış kaslarda azalmış kas koordinasyonu, yorgunluk ve kas güçsüzlüğü gözlemlenir (121). Klinik olarak sinir iletim hızlarının elektrofizyolojik ölçümü ile değerlendirilen motor sinir fonksiyonu bozukluğu, kan pb düzeyi 40 µg/dl olduğunda ortaya çıkmaktadır (115).

Olumsuz nörolojik sonuçların en hassas göstergeleri psikomotor testler ve IQ ölçümleridir. Çoğu çalışmada, kan pb düzeyinde 5 ila 35 µg/dl aralığındaki her µg/dl'lik artış için 2-4 puanlık bir IQ eksikliği olduğu bildirilmiştir. Winneke ve ark. (122) çalışmalarında, kandaki her 10µg/dl artış için 4-7 IQ puanı kaybı olduğunu belirlemiştir.

ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC), 2010 yılında çocuklarda kan Pb düzeylerinin 10 µg/dl'nin altına düşürülmesini hedeflemiştir (35). Ancak, Pb'nin IQ üzerindeki etkileri bu seviyenin altında da gerçekleşebilmektedir (123). Yakın geçmişte yapılan çalışmalar bilişsel ve akademik becerilerdeki eksikliklerin kan Pb düzeyi 5µg/dl'nin altında olduğunda da ortaya çıkabileceğini kanıtlamıştır (124). Bu nedenle, tedavide Pb maruziyetinin güvenli olarak değerlendirildiği doz-yanıt ilişkisi için farklı bir eşik ayarlanması uygun bulunmamıştır (125).

Çocukların anne karnındaki dönemden 10 yaşına kadar izlendiği bir kohort çalışmada, 28 haftalık gebelikte Pb maruziyetinin çocukların sonraki entelektüel gelişimi için kritik bir dönem olduğu ve Pb'nin IQ üzerindeki etkisinin, ilk birkaç mikrogram kan Pb düzeyi ile bile görülebildiğini göstermiştir (126). Bilim insanları

ise, nöro-gelişim konusunda çocuklarda hiçbir Pb maruziyet seviyesinin “güvenli” olmadığını düşünmektedir (124).

Çocukluklarında artan Pb düzeylerine maruz kalan yetişkinlerin manyetik rezonans görüntülemesi özellikle prefrontal kortekste azalmış beyin hacmini göstermektedir (107). Pb asetatin serebellumda depolanması, beyin fizyolojisini bozduğu için nörotoksositeye, hücrel bozulmaya ve muhtemelen hücre ölümüne neden olabilir (3). Pb zehirlenmesi ayrıca nöron sayısını ve nöron büyümesini azaltır. Baker ve ark. (127), kan Pb düzeyindeki azalmadan sonra, gerilim, öfke, depresyon, yorgunluk ve kafa karışıklığında bireysel iyileşme gözlemlendiğini ancak detaylı nörofizyolojik test sonuçlarında önemli bir iyileşme görülmediğini göstermiştir.

2.5.3. Renal Sistem Üzerindeki Toksik Etkiler

Böbrek, özellikle inorganik Pb başta olmak üzere Pb toksisitesinin görüldüğü önemli hedef organlardandır (1). Düşük seviyelerde bile çevresel Pb'ye maruz kalma, kronik böbrek yetmezliğinin ilerlemesi ile ilişkilidir (128). Yüksek düzeyde Pb'ye maruz kalmanın bir sonucu olarak renal tübüler hasarı takiben glikozüri, aminoasidüri ve fosfatüri ile karakterize Fanconi sendromu ortaya çıkabilir (129). Pb mitokondride birikebildiği için tübüler taşıma gibi enerji bağımlı süreçler bozulabilir (16).

Kurşun toksisitesinin neden olduğu akut ve kronik olmak üzere iki tür nefropati bulunmaktadır. Akut nefropatide görülen morfolojik değişiklikler; tübüler epiteldeki dejenerasyon, inklüzyon cisimciklerinin varlığı ve bozulmuş tübüler taşıma şeklindedir. Inklüzyon cisimcikleri, agrezom adı verilen nispeten inert, toksik olmayan ve büyük miktarlarda Pb biriktiren bir formdan köken alır. Bozulmuş tübüler taşıma şelasyon tedavisi ile genellikle tersine çevrilebilir. Kronik Pb nefrotoksitesisi ise; fibrozis ve progresif nefron kaybı, azotemi ve böbrek yetmezliği ile karakterizedir (1, 130). Pb nefropatisi varlığında hiperürisemi daha sık görülür (131). Pb nefropatisi, hipertansiyon nedenlerinden biri olabilir (132).

Metallotionein (MT) içermeyen farelerde, Pb maruziyetinin ardından inklüzyon cisimciklerinin oluşmadığı görülmüştür. Bu durum Pb kaynaklı cisimciklerin oluşumunda katılımcı olarak MT gerektirdiğini göstermektedir. MT,

inklüzyon cisimciklerinin dış yüzeyinde bulunarak Pb'yi inklüzyon cisimciklerinin oluşumu aşamasında içeriye taşır (133).

Kurşun nefrotoksitesisi, böbrekteki hem içeren enzimlerin renal sentezini bozar (134). Eritrositler için sitokin görevi gören eritropoetin üretimi azalır ve sonuçta Pb toksitesisi kaynaklı anemi tablosu kötüleşir (135).

Carmignani ve ark. (136) Pb'ye maruz kalmanın hem erkek hem de hayvanların böbrek sisteminde patolojik değişikliklere neden olduğunu, bunun sebebinin de Pb'nin neden olduğu oksidatif stres olabileceğini belirtmişlerdir. Ancak bazı çalışmalar, böbreklerde klinik olarak önemli hasarın ancak uzun süreli maruziyetten sonra meydana geldiğini ve önemli böbrek hasarının genellikle asemptomatik/akut vakalarda meydana gelmediğini ileri sürmüştür (137).

Farklı bir çalışma, 60µg/dl ve daha yüksek kan Pb düzeylerinin renal fonksiyon bozukluğuna neden olabileceğini, ancak düşük kan Pb düzeylerinde (10µg/dl gibi) bile renal disfonksiyonun görülebileceğini ileri sürmektedir (4). Güney Afrika'da yapılan bir çalışmada ise 40 µg/dl'den küçük ve 70µg/dl'den büyük kan Pb düzeyi ile böbrek fonksiyon bozuklukları arasında doğrusal bir korelasyon görülmüştür ancak döküm işçilerinde yapılan geniş bir çalışmada kan Pb düzeyi ile tübüler ve glomerüler hasar gibi hassas göstergelerle maruziyet düzeyleri arasında hiçbir korelasyon görülememiştir (138, 139). Pb'nin böbrek fonksiyonu üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğu en düşük seviye bu nedenle tam olarak bilinmemektedir (140).

Yapılan kesitsel bir analiz, kan Pb düzeyinde 10µg/dl'lik bir artışın, kreatin klerensinde %9'luk bir düşüş ile ilişkili olduğunu ve başka bir çalışma, kan Pb düzeyinde on kat artış için serum kreatinin düzeylerinde 0.08 mg/dl'lik bir artış öngörüldüğünü göstermiştir (141, 142).

2.5.4. Kardiyovasküler Sistem Üzerindeki Toksik Etkiler

Kurşunun hedef sistemlerinden biri de kardiyovasküler sistem olup, özellikle kan basıncının dengesi üzerine etkileri bildirilmiştir. Nitekim, Pb'ye maruz kalma ve hipertansiyon arasında nedensel bir ilişki olduğuna dair kanıtlar mevcuttur (128, 132).

Kurşun kaynaklı hipertansiyonun patogenezi pek çok faktörden etkilenmektedir (3):

- Pb kaynaklı oksidatif stres nedeniyle endojen nitrik oksit ve siklik guanozin monofosfatın (cGMP) etkisizleştirilmesi.
- Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemindeki değişiklikler ve hipertansiyonun önemli humoral bileşenleri olan sempatik aktivitede artışlar.
- Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinde ve $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ değişim pompasının stimülasyonundaki azalma sonucunda; kasılma dahil olmak üzere vasküler düz kas hücrelerinin fonksiyonlarındaki değişiklikler.
- Endotelin ve tromboksanda muhtemel bir artış (132, 143).

İki yüz yirmi Pb pil fabrikası işçisi üzerinde yapılan bir çalışma, belirli bir ATP1A2 geni tipine sahip çalışma popülasyonunun %30'unda kan Pb ve hipertansiyon arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir (144). ATP1A2, Na^+/K^+ -ATPaz kodlanmasında görev alan bir genidir. Bu gen mutasyonunun hemiplejik migren ve epilepsi ile ilgisi olduğu gösterilmiştir (145).

Hem genel popülasyondan hem de mesleki olarak maruz kalan gruplardan 1980'den 2001'e kadar 58.518 kişinin meta-analizi kullanılarak yapılan bir çalışmada, kan Pb düzeyi ile kan basıncı arasında zayıf, ancak anlamlı bir ilişki olduğu öne sürülmüştür (146).

İnsan verilerinin sistematik olarak gözden geçirilmesi, Pb ve hipertansiyon arasındaki nedensel ilişkiyi gösterse de kan Pb düzeyi $40\mu\text{g}/\text{dl}$ 'nin altında olan çalışanlar üzerinde ortaya çıkan olumsuz etkiye dair net bir gösterge yoktur. Bu nedenle Pb'ye maruz kalmanın kan basıncı üzerindeki etkisi tartışmalı olmaya devam etmektedir (1). Bildirilen çalışmalar nispeten daha küçük popülasyonlar üzerinde yapılmıştır ve elde edilen bulguları daha büyük popülasyonlar ile yapılacak çalışmalarla desteklemek gerekmektedir (1, 147). Araştırmacıların çoğu, kan basıncı üzerinde çok daha büyük bir etkisi olan alkol alımı, hemoglobin, obezite ve sigara gibi değişkenleri hesaba katmamışlardır (148). Irklar arasında Pb'nin hipertansif etkisinin araştırıldığı bir çalışmada siyahi erkekler ve kadınlarda kan Pb düzeyi ile sistolik kan

basıncı arasında bir korelasyon olduğu belirlenirken bu durum beyaz ırkta gözlenmemiştir (149).

2.5.5. İmmün Sistem Üzerindeki Toksik Etkileri

Kurşun immün sistem üzerinde de toksik etkilere neden olmaktadır. Pb kaynaklı immünotoksisitenin en önemli özelliği T yardımcı hücre (Th) fonksiyonundaki dengenin, Th2 yanıtlarına doğru belirgin bir şekilde kayması ve immunoglobulin (Ig) E seviyelerinin yükselmesidir (16). Th2 yanıtı, B hücrelerinin antikorları öldürmesi (nötralize etmesi) için etkinleştirilmesiyle sonuçlanan, interlökin 4 salınımıyla karakterize edilir. Genellikle, Th2 yanıtları hücre dışı bakteriler, parazitler ve toksinler karşısında etkilidir (3, 150). Deney hayvanlarında, Pb'nin makrofajları ve T hücrelerini, özellikle Th'leri hedef aldığı gösterilmiştir. Mesleki maruziyette Pb ile ilişkili değişiklikler arasında; değişmiş T hücre alt popülasyonları, düşük Ig seviyeleri ve düşük polimorfonükleer lökosit kemotaktik aktivitesi bulunur (150, 151).

Gelişmekte olan bağışıklık sistemi Pb'nin toksik etkilerine karşı duyarlıdır (150). Pb'ye maruz kalan neonatal kemirgenlerde artmış IgE seviyeleri ve enflamatuar sitokinler görülmüş ve çocuklarda da kan Pb düzeyi ile yüksek IgE seviyeleri arasında bir ilişki bulunmuştur (151, 152). Bu nedenle Pb immünotoksisitesi, çocukluk çağı astımı için bir risk faktörü olabilir (150).

2.5.6. İskelet Sistemi Üzerindeki Toksik Etkileri

Kemikler, vücudumuzda Pb'nin biriktiği birincil yerdir (153). Pb'nin kemiklerin iki segmentinde de birikebildiği düşünülmektedir. Değiştirilemeyen havuzun biriktirildiği yer olan korteks, kemiğin derinliklerinde bulunur. Değiştirilebilir havuz ise kemik yüzeyindedir. Değiştirilebilir havuzdan Pb aktif olarak kolayca yeniden emilir ve plazmaya erişebilir. Bu mobilizasyondan sonra, değiştirilemez havuzdan gelen Pb yüzeye kaydırılır (97). Pb kemikte oldukça uzun bir yarı ömre sahiptir, yetişkinlerde vücut Pb yükünün %90'ından fazlası kemiklerde bulunur (4).

Kurşun, paratiroid hormonu, kalsitonin, D vitamini ve kalsiyum metabolizmasını etkileyen diğer hormonlar da dahil olmak üzere metabolik ve homeostatik mekanizmalara müdahale edebilir. Kemikte kalsiyum yerine geçer (154).

Kurşunun, osteoblastları, osteoklastları ve kondrositleri etkilediği bilinmektedir. Pb, osteoporoz ve kırık onarımında gecikmelerle ilişkilendirilmiştir (155). Pb'ye maruz kalan çocuklarda daha yüksek kemik mineral yoğunluğu gözlemlenmiştir. Bu durum, peptit ilişkili paratiroid hormonu inhibisyonu nedeniyle hızlandırılmış kemik olgunlaşmasından kaynaklanabilir. Sonuçta genç erişkinlikte düşük kemik mineral yoğunluğu ile sonuçlanır ve kişiler daha sonraki yaşamda osteoporozla yakalanabilir (156). Yapılan araştırmalar, Pb'nin kemik döngüsüne doğrudan ve dolaylı yollarla etki edebileceğini göstermektedir. Pb'nin dolaylı etkileri renal disfonksiyon ve 1,25-dihidroksivitamin D3 aktivitesi inhibisyonu iken, doğrudan etkileri de osteoblast ve osteoklastların hormonal düzene cevap yeteneklerini bozmasıdır (157).

Bazı çalışmalarda Pb maruziyeti ile çocuklarda diş çürüğü arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Pb, dişlerde biriktirilir, mine ve dentin mineralizasyonunu inhibe ederek diş özündeki hücrelerin metabolizmasını bozar (33).

Kemiğin içindeki Pb; hamilelik sırasında olduğu gibi, kemik mobilize edildiğinde de diğer dokuların maruziyeti açısından potansiyel bir kaynak olarak kabul edilir (158). Yetişkinlerde, kandaki reabsorbe edilen Pb'nin yaklaşık %40-70'inin kemiklerden geldiği gösterilmiştir. Pb mobilizasyonu ve kemiklerde depolanması yaş, doz, gebelik dönemi, Pb'ye maruz kalma, ırk ve gebelik gibi faktörlere bağlıdır (110).

İnsanlarda kan Pb yarılanma ömrü yaklaşık 30 gündür ve hamileler ve kemikleri gelişme aşamasında olan çocuklar söz konusu olduğunda yarılanma ömrü uzamaktadır. Büyüme çağındaki çocuklarda gelişmekte olan kemikler, Pb'nin sürekli olarak kan dolaşımına girmesine izin verir (53).

2.5.7. Üreme Sistemi Üzerindeki Toksik Etkileri

Yapılan çalışmalarda Pb'nin üreme sistemi üzerine toksisite potansiyeline sahip olduğu fark edilmiştir. Pb toksisitesinin erkeklerde üreme sistemi üzerindeki

genel etkileri; anormal spermatogenez (azalmış sayı ve motilite), azalmış libido, anormal prostatik fonksiyon, kromozomal hasar, serum testosteronunda değişiklikler ve kısırlık şeklinde sıralanabilir (110). Ayrıca, artmış kan Pb düzeyi, kız çocuklarında gecikmiş ergenlik ile ilişkilendirilmiştir (159). Kan Pb düzeyi 10µg/dl'den büyük olduğunda spontan düşük, erken doğum ve düşük doğum ağırlığı riskinde artış gözlemlenmiştir (16). Başka bir çalışmada, gebelikte 5–9 µg/dl'lik kan Pb düzeyi spontan abortus riskini iki katına çıkarmıştır (160).

Zhang ve ark. (161), insan koryonik gonadotropin (HCG) ile Pb etkileşimini araştırmış ve Pb asetatın, HCG iskeletini gevşeterek veya yok ederek, aynı zamanda hidrofobikliği artırarak HCG'nin ikincil yapısını değiştirdiğini ve bunun da HCG'nin biyoaktivitesinin azalmasına neden olduğunu göstermişlerdir. Bu durumun Pb'nin neden olduğu üreme toksisitesinin olası bir mekanizması olduğu düşünülmektedir.

Doğum öncesi 14µg/dl'lik maternal kan Pb düzeyine sahip olan fetüste, azalmış doğum ağırlığı ve erken doğum olasılığı ortaya çıkabilmektedir. 50 yıl önce çocukken Pb ile zehirlenen biyolojik ebeveynleri olan okul çocuklarında yapılan bir çalışmada öğrenme güçlüğü ve gelişimsel anormallikler olduğu görülmüştür (58, 162).

Üreme kapasitesi üzerindeki önemli etkilerin 50 µg/dl kan Pb düzeyinin altında görülmesi olası değildir, ancak 40µg/dl'den daha büyük kan Pb düzeyleri kandaki sperm morfolojisini ve fonksiyonunu etkileyebilir (16). Pil üretim fabrikası işçilerinden alınan semen ve kan örnekleri üzerinde yapılan bir çalışmada, sperm konsantrasyonu ve hacmi ile kan Pb düzeyi arasında ters bir ilişki olduğu gözlenmiştir (93). Pb doğrudan testis spermatogenezini ve ayrıca epididimisteki spermleri hedef alabilir (93, 134).

2.5.8. Karsinojenite

Epidemiyolojik çalışmalar insanlarda Pb bileşiklerine olan maruziyetin artmış renal tümör, akciğer ve mide kanseri insidansı ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Pb in vivo veya in vitro olarak doğrudan genotoksik olmamakla birlikte; kimyasal karsinojenezi kolaylaştırmak için diğer toksik maddeler ile etkileşime girebilir (163). Pb yetişkin kemirgenlerde bir nefrokarsinojendir (18). Hayvan çalışmaları, esas olarak Pb asetata maruz kalma ile böbrek tümörlerine dair iyi kanıtlar göstermiştir (16). Pb

kaynaklı böbrek tümörleri, kapsamlı kronik nefropatinin yokluğunda bile perinatal maruziyetten sonra ortaya çıkabilir (164).

IARC, inorganik Pb bileşiklerini insan kanserine neden olması beklendiğinden Grup 2A yani insanlar için muhtemel karsinojen olarak ve tetraetil Pb'yi (organik Pb) ise kategori 3 yani insanlar için karsinojen olarak sınıflandırılmayan, daha fazla çalışmayla desteklenmeye ihtiyaç duyulan kategorisine dahil etmiştir (18, 165). Organik Pb'nin karsinojen olarak sınıflandırılmasını desteklemek için şimdiye kadar yayınlanan sınırlı sayıda çalışma vardır ve bu çalışmalar üretim işçilerinde fazlaca görülen rektal kanserlere işaret etmektedir (166). Organik Pb bileşiklerinin karsinojen durumunu doğrulamak için, bu bileşiklerin vücutta, idrarla atılmadan önce inorganik Pb dahil olmak üzere bir dizi metabolit oluşturduğu unutulmamalıdır (18).

Kurşun kaynaklı karsinogenezin birçok mekanizması vardır. Bunlar; DNA sentezinin veya onarımının inhibisyonu, DNA'daki oksidatif hasar sonucunda ROB oluşumu, transkripsiyonel regülatörlerde çinko yerine Pb'nin geçmesi, DNA bağlayıcı proteinler ile etkileşim ve anormal gen kodlanması şeklinde sınıflandırılabilir (163, 167, 168).

Kurşuna ve egzoz gazına maruz kalan 20.700 çalışandan oluşan bir kohort çalışmada; kan Pb düzeyi artmış olanlarda genel kanser insidansında 1,4 kat artış gözlenirken akciğer kanserinde ise 1,8 kat artış gösterilmiştir (169). ABD'de 1984'ten 1992'ye kadar 27.060 beyin kanseri vakası ve malign olmayan hastalıktan ölen 108.240 kontrolün incelendiği bir başka epidemiyolojik çalışmada, Pb'ye mesleki maruz kalma ile beyin kanseri arasında potansiyel bir bağlantı bulunmuştur (111). Pb'ye maruz kalan çeşitli endüstrilerdeki işçiler arasındaki kanser insidansı ile ilgili yayınlanmış verilerin meta-analizinde ise; mide, akciğer ve mesane kanserinden kaynaklanan ölümler olduğu görülmüştür (170). Bununla birlikte, işçilerin tek başına Pb'ye maruz kalmadığı, sigara, arsenik, kadmiyum ve motor egzozları gibi diğer potansiyel karsinojenlere de maruz kaldıkları ifade edildiğinden tek etkenin Pb olmayabileceği belirtilmektedir (171). Aynı zamanda yine *Helicobacter pylori* gibi bakteriler de bu çalışmalarda dikkate alınmamıştır (33, 172).

2.5.9. Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri

Akut Pb maruziyetine bağlı olarak karın ağrısı, bulantı, kusma, kabızlık ve kramplarla karakterize bir gastrointestinal semptom olan “Pb koliği” görülebilmektedir (18, 33). Pb koliğine genellikle solgun deri rengi eşlik etmektedir. Bununla birlikte diş etlerinde PBS çökmesine bağlı olarak diş etinden 1 mm uzaklıkta oluşan koyu gri mavi renkte Burton çizgisi görülebilir fakat bu çizgi daha çok kronik zehirlenmelerde belirgindir (36, 173).

2.6. Kurşun Zehirlenmesinde Kullanılan Şelasyon Tedavisi

Ağır metal maruziyeti genel olarak sadece iş yerlerinde değil, günlük hayatın içinde de sık rastlanan bir durumdur (1). Pb zehirlenmesinin tedavi protokolleri, destekleyici tedavi ve şelatör ajanların kullanılmasını içermektedir. Öncelikle kişinin maruziyet kaynağından uzaklaştırılması ve ardından hastanın klinik parametrelerinin incelenmesini takiben uygun şelatör ajanla tedaviye başlanması esastır (3, 174).

Akut maruziyetlerde şelasyon tedavisi, tedavinin temelini oluşturmaktadır ve metallerle ligantlar arasındaki şelat oluşumuna dayanmaktadır (1). Metal atomlarını bağlayan moleküllere ligand adı verilmektedir. Ligandın iki ya da daha fazla donör atomuna, metal atomunun bağlanması sonucu şelat halkası oluşur (19).

İlaç olarak kullanılacak ideal şelasyon ajanının suda çözünmesi, biyotransformasyona uğramaması, organizmada metal depolarına ulaşabilmesi, metallerle toksik olmayan kompleksler yaparak organizmadan kolaylıkla atılabilmesi ve esansiyel elementlere özellikle Ca ve çinkoya afinitesinin düşük olması beklenir (175, 176).

Biyolojik sistemlerde çeşitli dokuların ve sentetik ligandların ana donör atomları azot (N), oksijen (O), kükürt (S) ve fosfor (P)’dur. Metal atomlarının çoğu bu atomlar ile etkileşmeleri yönünden iki grupta toplanabilir. Birinci grup, “A sınıfı metaller” diye adlandırılır ve en stabil kompleksleri N ve O donör atomları ile yaparlar (Ca, baryum gibi). Aralarında civa, altın ve gümüş gibi metallerin de bulunduğu “B sınıfı metaller” ise en dayanıklı komplekslerini S ve P atomları ile yaparlar. Pb bu

metallerden farklı olarak hem “A sınıfı” hem de “B sınıfı” metal özelliği gösterebilmektedir (20, 38).

Kurşun, CaNa_2EDTA şelatında N ve O atomlarına, dimerkaprol (BAL) ve süksimer (DMSA) ile olan şelatında S atomuna, D-penisilamin şelatında ise S ve N atomlarına bağlanır (177). Sonuç olarak şelatör ajanlarla metaller arasında oluşan bu kompleksler, metallerin vücuttaki reaktif biyolojik gruplara bağlanmasını önler ya da bağlanmayı geri çevirir ve metalin idrarla vücuttan atılımını hızlandırır (178).

Tablo 2.6.’da Pb zehirlenmesinin tedavisinde kullanılan şelasyon ajanları ve uygulama prosedürleri kısaca özetlenmiştir.

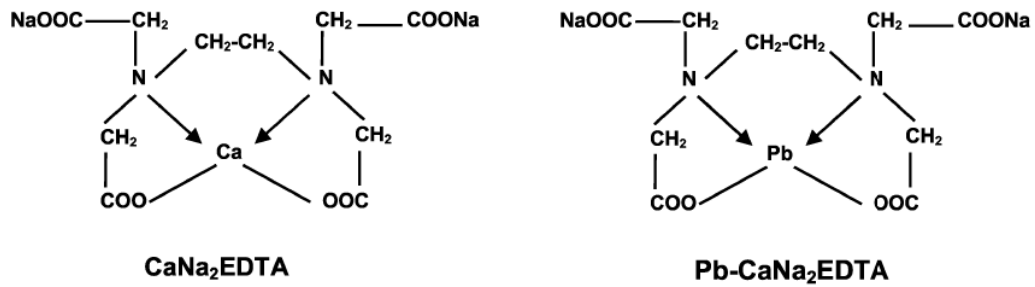
Tablo 2.6. Kurşun zehirlenmesinin tedavisinde sıklıkla kullanılan ajanlar (45).

Şelasyon Ajanı	Gösterge	Dozaj
BAL	Kan Pb Düzeyi $\geq 70\mu\text{g/dl}$ (Eğer Kan Pb Düzeyi $>100\mu\text{g/dl}$ ise ek olarak CaNa_2EDTA)	3-5 gün boyunca her 4 saatte bir 4-5 mg/kg
CaNa_2EDTA	Kan Pb Düzeyi $\geq 45\mu\text{g/dl}$ veya Pb ensefalopatisi varsa	5 gün süreyle $1000\text{ mg/m}^2/\text{gün}$ veya 50 mg/kg (maksimum 1g/gün) IV (normal salin veya %5'lik dekstroz çözeltisi içinde) 8-12 saatten fazla IM Her 8–12 saatte bir 2-4 günlük dinlenme süresinden sonra tekrar edilebilir
D-Penisilamin	Kan Pb Düzeyi 45-69 $\mu\text{g/dl}$	Yetişkinler: 6 saatte bir 250 mg 6 aydan büyük çocuklar: 4-12 hafta boyunca 10-15 mg/kg
DMSA	Kan Pb Düzeyi 45-69 $\mu\text{g/dl}$	5 gün boyunca 8 saatte bir 10mg/kg veya 350mg/m^2 ; daha sonra 14 gün boyunca 12 saatte bir. 2 haftalık dinlenme döneminden sonra tekrar edilebilir. En az 5 gün boyunca en az 1 hafta dinlenme süresi ile 30mg/kg/gün. 12 aydan küçük çocuklar için tavsiye edilmez

Şelasyon tedavisinin, kan Pb düzeyi 60 µg/dl'den fazla olan işçilerde etkinliği kanıtlanmıştır. Kişinin maruziyet süresi ve miktarı, kişisel alışkanlıkları, genel sağlık durumu ve klinik semptomları tedavi yaklaşımında değişikliklere neden olsa da Ülkemizde genellikle kan Pb düzeyi 35 µg/dl'nin üzerinde olan kişilerde CaNa₂EDTA ile şelasyon tedavisine başlanmaktadır. Çocuklar için, bireysel vaka değerlendirmelerinde yardımcı olabilecek kılavuzlar belirlenmiştir (116).

2.6.1. CaNa₂EDTA ve Diğer Şelasyon Ajanlarının Karşılaştırılması

CaNa₂EDTA, ilk kez II. Dünya Savaşı'ndan sonra, deniz kuvvetleri personeline toplu Pb zehirlenmesi vakalarının görülmeye başlanması ve bu maruziyetin gemilerin gövdesinin yeniden boyanma işlemi sırasında gerçekleştiğinin tespit edilmesi üzerine kullanılmaya başlanan bir şelasyon maddesidir (178, 179). 1950'lerden beri çocukluk çağı Pb zehirlenmesinin tedavisinde de tercih edilmektedir (180). Şekil 2.3'de CaNa₂EDTA ve Pb ile oluşturduğu şelat kompleksi gösterilmektedir.



Şekil 2.3. CaNa₂EDTA ve kurşun ile oluşturduğu şelat kompleksi (19).

CaNa₂EDTA'nın 1955'ten beri vasküler hastalıklarda faydalı olduğu da iddia edilmiştir. Şelasyon tedavisinin plak morfolojisini ve hacmini değiştirdiğine ve endotel fonksiyonunu iyileştirdiğine inanılmaktadır (181).

Metal-şelatör kompleksinin kararlılık sabiti (k), oluşan şelatın kararlılığı ve tedavinin başarısı için önemli bir göstergedir. Tablo 2.7'de EDTA'lı farklı metaller için kararlılık sabitleri verilmiştir (182). Daha yüksek k sabitine sahip bir metal, daha düşük kararlılık değerine sahip bir metal ile şelasyon maddesi için yarışarak nihai olarak

sonraki metali bağlanma yerinden kovabilir. Pb ile EDTA arasında oluşan şelatın kararlılık sabitinin yüksekliği dikkat çekmektedir (183, 184).

Tablo 2.7. Farklı metallerin EDTA ile oluşturduğu şelatların k sabitleri.

Metal	k (log)
Sodyum (Na)	1,7
Lityum (Li)	2,8
Baryum (Ba)	7,8
Stronsiyum (Sr)	8,6
Magnezyum (Mg)	8,7
Calsiyum (Ca)	10,6
Manganez (Mn)	13,4
Demir (Fe)	14,4
Kobalt (Co)	16,1
Çinko (Zn)	16,1
Kadmiyum (Cd)	16,4
Kurşun (Pb)	18,3
Nikel (Ni)	18,4

Kronik Pb maruziyeti olan bireylerde en fazla kullanılan şelasyon ajanı CaNa_2EDTA ve D-penisilamindir. Bu bileşikler ekstraselüler sıvıdaki Pb ile kompleksler oluşturarak Pb'nin kan ve yumuşak dokulardan uzaklaşmasını sağlar. CaNa_2EDTA , D-penisilaminden daha güçlü bir şelatör olmakla birlikte sadece parenteral uygulanabilirken, D-penisilamin oral yoldan da verilebilmektedir (20, 175).

Oral şelasyon ajanlarından biri olan DMSA, EDTA'ya göre oral olarak verilebilmesi ve geçici olarak kan pb düzeyini düşürmede daha etkili olması bakımından avantajlara sahiptir. Bununla birlikte, DMSA çocuklarda uzun vadeli kan Pb düzey'ni düşürmede ve beyin Pb seviyelerini azaltmada EDTA'ya kıyasla başarısız bulunmuştur (185, 186). Son yıllarda yapılan bir çalışma DMSA'nın çocuklarda kan Pb düzeyini düşürdüğünü ancak öğrenme ve davranış değişikliği konusunda belirgin bir yararı olmadığını göstermektedir (187, 188). Bu nedenle ensefalopatinin geliştiği durumlarda CaNa₂EDTA'nın tercih edilmesinin daha uygun olacağı sonucuna varılmıştır. Aynı çalışmada CaNa₂EDTA metabolize olmazken, DMSA'nın metabolize olduğu, her iki antidotun da kan beyin bariyerini büyük oranda geçemediği, CaNa₂EDTA kemikteki Pb'ye da etkili olurken DMSA'nın yumuşak dokuda özellikle böbrekte etkili olduğu ileri sürülmüştür (175, 187, 188).

Kurşun maruziyeti olan 34 işçi ile yapılan başka bir çalışmada ise, işçiler iki gruba bölünerek CaNa₂EDTA ile DMSA etkinliği karşılaştırılmış, iki şelasyon ajanının birbirini takip ederek uygulanmasının daha etkili bir tedavi sağlayacağı ileri sürülmüştür (189).

Yapılan çalışmalarda, kronik Pb maruziyeti sonunda CaNa₂EDTA tedavisi uygulanan deney hayvanlarında kemiklerdeki Pb düzeyinin düşmemesine karşın beyin ve böbrek gibi kritik organlarda Pb düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (190-192).

CaNa₂EDTA şelasyon tedavisinin etkilerinin Pb maruziyeti olan çocuklarda incelendiği çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bir çalışmada kan Pb düzeyi 25-55 µg/dl olan çocukların şelasyon tedavisi sonunda Fe⁺² düzeylerinde düşme olabileceği ileri sürülmüştür (193). Bir başka çalışmada ise çocuklarda kan Pb düzeylerini düşürmek amacıyla CaNa₂EDTA ile DMSA veya BAL kombinasyonundan olumlu sonuç alındığı tespit edilmiştir (194).

Tekrarlanan şelasyon tedavilerinin, esansiyel element düzeylerinde kayba yol açacağı göz önüne alınarak, tedavi sonrasında hastaların bu yönden desteklenmesinin gerekliliği unutulmamalıdır (195). Çocuklarda yapılan tedavilerde CaNa₂EDTA yerine Na₂EDTA verilmesi sonucunda kalsiyum eksikliği nedeniyle görülen ölümler Na₂EDTA uygulamasını sonlandırmıştır (134, 196). CaNa₂EDTA'nın ise vücut

depolarındaki Pb'nin mobilize olmasına neden olarak beyinde Pb düzeyini ve gastrointestinal kanaldan Pb absorpsiyonunu artırdığı unutulmamalıdır (22, 191).

Tüm bu bilgiler doğrultusunda Tablo 2.8.'de Pb zehirlenmesi tedavisinde kullanılan şelatör ajanların veriliş yolu, doz, tedavi süresi ve kontrendikasyonları kısaca özetlenmiştir.

Tablo 2.8. Kurşun zehirlenmesinin tedavisinde kullanılan şelatör ajanların karşılaştırılması (181, 197).

Şelatör	Veriliş Yolu	Doz	Tedavi Süresi	Kontrendikasyonlar
BAL	İM	75 mg/m ²	3-5 gün	G6PD eksikliği Fıstık alerjisi Aynı anda demir tedavisi
CaNa ₂ EDTA	İM/İV	1000-1500 mg/m ²	5 gün	Böbrek yetmezliği Dehidretasyon
D-Penisilamin	ORAL	10 mg/kg 1 hf 20-30 mg/kg 2-4 hf	6-20 hf	Penisilin alerjisi Aynı anda demir tedavisi Böbrek yetmezliği
DMSA	ORAL	30 mg/kg 5 gün 20 mg/kg 2 hf	19 gün	Yüksek ALT, AST G6PD eksikliği

CaNa₂EDTA hastane ortamında tercihen yavaş intravenöz infüzyon ile nadiren de kas içine enjeksiyon şeklinde uygulanır. Hastanın renal fonksiyonları normal olmalıdır (19, 175). CaNa₂EDTA kullanımını sırasında kan üre nitrojeni (BUN), kreatinin ve idrar analizleri günlük olarak yapılmalıdır. Tedavi sırasında itrah edilen Pb düzeyini ölçmek üzere 24 saatlik idrar toplanmalıdır. Renal fonksiyon bozukluğu durumunda tedavi kesilmelidir. Tedavinin başlangıcında ve 5 günlük tedaviden sonra kan Pb düzeyi ölçülmelidir. Semptomların devam etmesi veya tekrarlanması durumunda tedavinin 3-4 haftalık periyodlarla tekrarlanması gerekebilir (179, 195).

Kurşun zehirlenmesinin tedavisinde kullanılan EDTA, genellikle vitamin B, C, magnezyum ve çinko ile birlikte verilmelidir. Çocuklarda, tetani ve olası fatal

hipokalsemiye neden olabileceği için kullanılmamalıdır (181, 198). Hipokalsemi riskine karşı CaNa_2EDTA formu tercih edilmelidir. Gebelikte ve laktasyonda uygulanması tavsiye edilmez. Şelasyon tedavisi sırasında kardiyovasküler yan etkilerin görülmemesi için magnezyum takviyesi önem taşımaktadır. Gerekirse heparin takviyesi yapılabilir (199).

EDTA tedavisinin olası yan etkileri aşağıdaki sıralanmıştır (199, 200):

- Bulantı, kusma, dispepsi, diyare
- Baş ağrısı, yorgunluk hissi
- Lokal cilt irritasyonu, venlerde inflamasyon
- Vitamin B, C ve çinko eksikliği
- Hipotansiyon
- Hipertermi
- Hipomagnezemi ve hipokalsemi (kramp, konvülsiyon)
- Grip benzeri semptomlar (eklem ağrısı, miyalji)
- Böbrek ve karaciğer toksisitesi
- Hipoglisemi
- Konjestif kalp yetmezliği
- İmmün sistem hasarı
- Kanama bozuklukları

2.7. Lipitler, Kolesterol Metabolizması ve Oksisteroller

Karbonhidrat ve proteinlerle birlikte organizmanın organik maddelerini oluşturan lipitlerin hücre zarlarında yer almak gibi yapısal fonksiyonlarının dışında organizmadaki en önemli görevlerinden biri de karbonhidratlardan sonra yakıt kaynağı olmalarıdır (23). Alınan besin maddeleri içerisinde lipitlerin bulunması yağda eriyen vitaminler için ve belirli doymamış yağ asitleri yönünden önemlidir (201).

Besinlerle alınan lipitlerin büyük bir kısmını trigliseritler oluşturmaktadır. Daha azını ise fosfolipitler ile serbest ve ester kolesterol oluşturur (24).

Lipit sindirimi ince bağırsaklarda ve ester bağlarının hidrolitik olarak parçalanması şeklinde gerçekleşir. Bu hidrolitik parçalanma lipaz enziminin katalitik

etkisi ile gerçekleşir. Yağların hidrolizi sonucunda trigliseritler, β -monogliseritler ve serbest yağ asitleri oluşur (202).

Bağırsak kanalındaki kolesterol esterleri, kolesterol esteraz enzimi aracılığı ile kolesterol ve serbest yağ asitlerine, fosfolipitler de lipaz katalizörlüğünde fosfolipit ve serbest yağ asitlerine ayrılırlar. Lipitler suda çözünen maddeler olmadıkları için kan yolu ile taşınabilmeleri ancak suda çözünür duruma gelmeleri ile mümkün olur. Bunun için de lipitler özel proteinlere bağlanarak lipoproteinleri oluşturur ve çözünür duruma gelirler. Serbest yağ asitleri albümine bağlanarak taşınırlar. Albumin düzeylerinde olası bir azlık taşınmayı aksatabilir (203).

Kan lipitleri başlıca trigliseritler, lipoproteinler, fosfolipitler, kolesterol ve serbest yağ asitlerinden oluşur. Total lipidin 1/4'ünü trigliseritler oluşturur. Yine total lipidin 1/3'ünü kolesterol meydana getirir (204).

Kolesterol, serbest olarak yüksek konsantrasyonlarda beyinde bulunur, karaciğer ve plazmada ise hem serbest hem de ester kolesterol şeklinde yer alır (201).

Kolesterolün sentezi başlıca 3 safhada gerçekleşir (205).

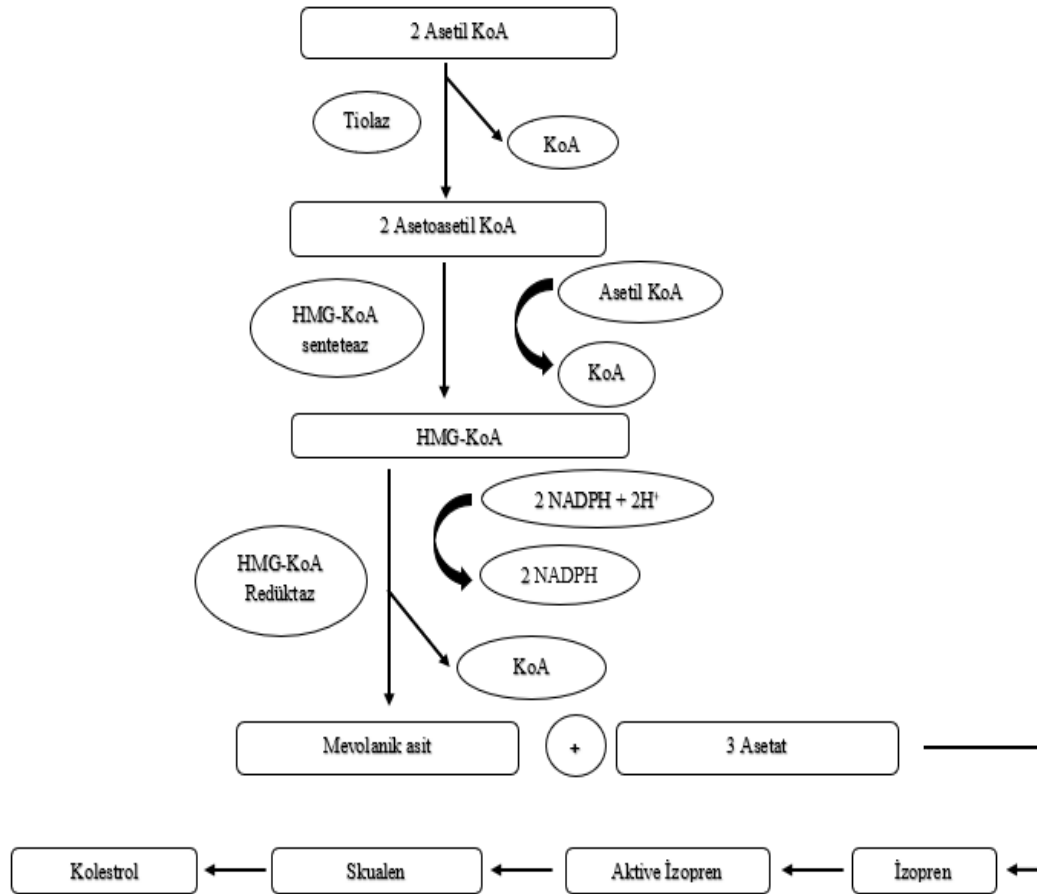
Birinci safha, altı karbonlu mevalonik asit'in meydana gelmesi safhasıdır. Kolesterol sentez reaksiyonları, iki molekül asetil koenzim A (KoA)'nın, iki molekül asetoasetil KoA'yı oluşturması ile başlamaktadır. Bu moleküle üçüncü bir asetil KoA daha eklenir ve 3-hidroksi 3-metil glutaril koenzim A (HMG-KoA) sentetaz enzimi aracılığıyla HMG-KoA oluşur. İki molekül nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) kullanılarak HMG-KoA redüktaz enzimi katalizörlüğünde endoplazmik retikulumda HMG KoA'dan mevalonik asit oluşur. Bu basamak, kolesterol sentezinin sınırlayıcı basamağıdır ve geri dönüşümlü değildir (206-208).

İkinci safha, halka yapısına geçiş olan squalen'in oluşması safhasıdır. Squalen kolesterolün ön maddesi olarak da kabul edilir. Mevalonik asit bir dizi reaksiyona uğratarak 30 karbonlu doymamış bir hidrokarbon olan squalen'e dönüşür (205).

Üçüncü safhada meydana gelen squalen, squalen epoksidaz enzimi aracılığıyla squalen 2,3-oksit'e dönüşür. Bu madde squalen oksit siklaz enzimi tarafından halka oluşumu yolu ile lanosterolü oluşturur. Lanosterol'ün kolesterole dönüşümü için 3. ve 14. karbon atomlarına bağlı üç metil grubunun uzaklaştırılması, yan zincirdeki çift

bağın doyurulması ve β halkasında 8-9. karbon atomları arasında yer alan çift bağın 5-6. karbon atomları arasına kaydırılması gerekmektedir. Lanosterolden, kolesterolün oluşumu ya zimosterol ve desmosterol üzerinden veya 24-25-dihidrolanosterol, metilkolestenol, kolestenol ve 7-dehidrokolesterol üzerinden olmaktadır (206). Kolesterol sentezi Şekil 2.4.'de özetlenmiştir (208).

Karaciğerdeki endojen kolesterol sentezi gıda maddeleri ile alınan eksojen kolesterol miktarı ile ters orantılıdır. Dışarıdan çok miktarda kolesterol alınırsa endojen kolesterol sentezi yavaşlar. Bu olayın düzenlenmesinde en önemli noktayı, HMG-KoA'nın, mevalonik aside dönüşüm basamağı teşkil eder. Besinsel kolesterol bu dönüşüm basamağını inhibe eder ve bu şekilde endojen kolesterol sentezi durur (24, 206).



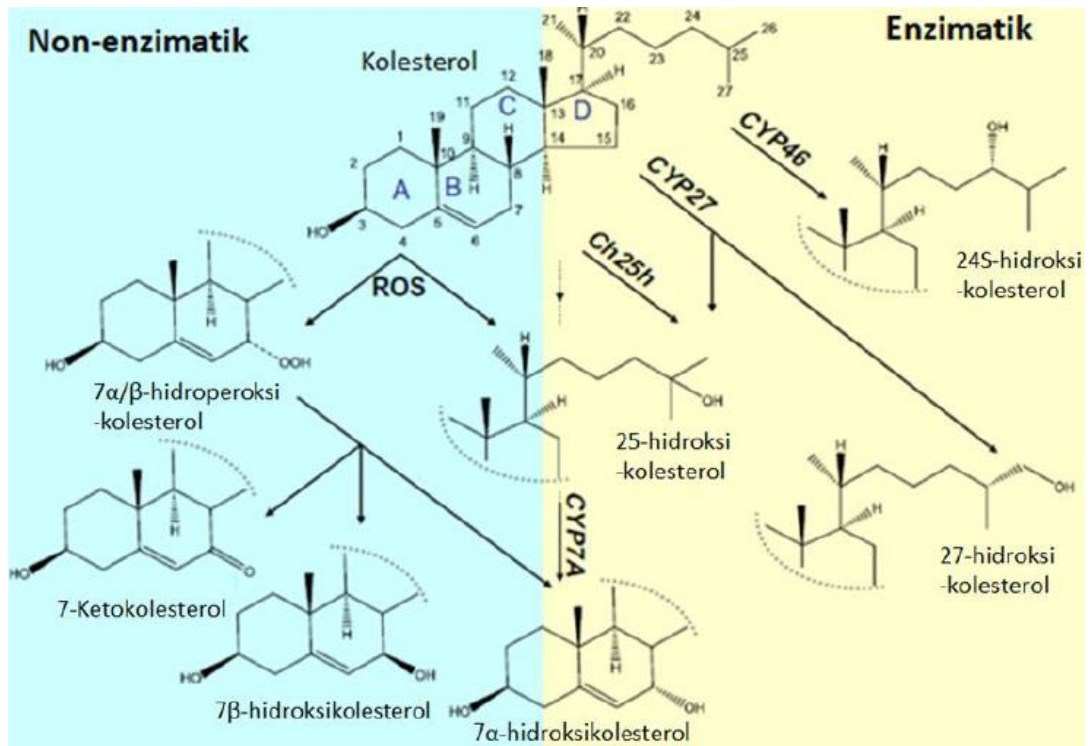
Şekil 2.4. Kolesterol Sentezi (208).

Kolesterol, hücre membranı ve lipoprotein yapılarına katılan önemli bir moleküldür. Safra asitleri, steroid hormonlar ve vitamin D için öncül madde görevi görür (207).

Kolesterol organizmayı safra asitleri ve steroid hormonlarla birlikte safranın bağırsaklara boşalması sonucunda dışkı ile terk eder (209).

2.7.1. Oksisteroller

Oksisteroller, kolesterolün 27 karbonlu oksidasyon ürünleridir. Vücutta iki farklı mekanizma ile oluşturulabilirler. Bunlar; oto-oksidasyon yoluyla, enzimatik olarak veya her iki işlemle birden oluşmalarıdır (143). Kolesterolün enzimatik oksidasyonu birçoğu sitokrom (CYP) P450 ailesine ait olan enzimler tarafından gerçekleştirilir (210). Şekil 2.5.'de oksisterollerin non-enzimatik ve enzimatik oluşumu gösterilmiştir.

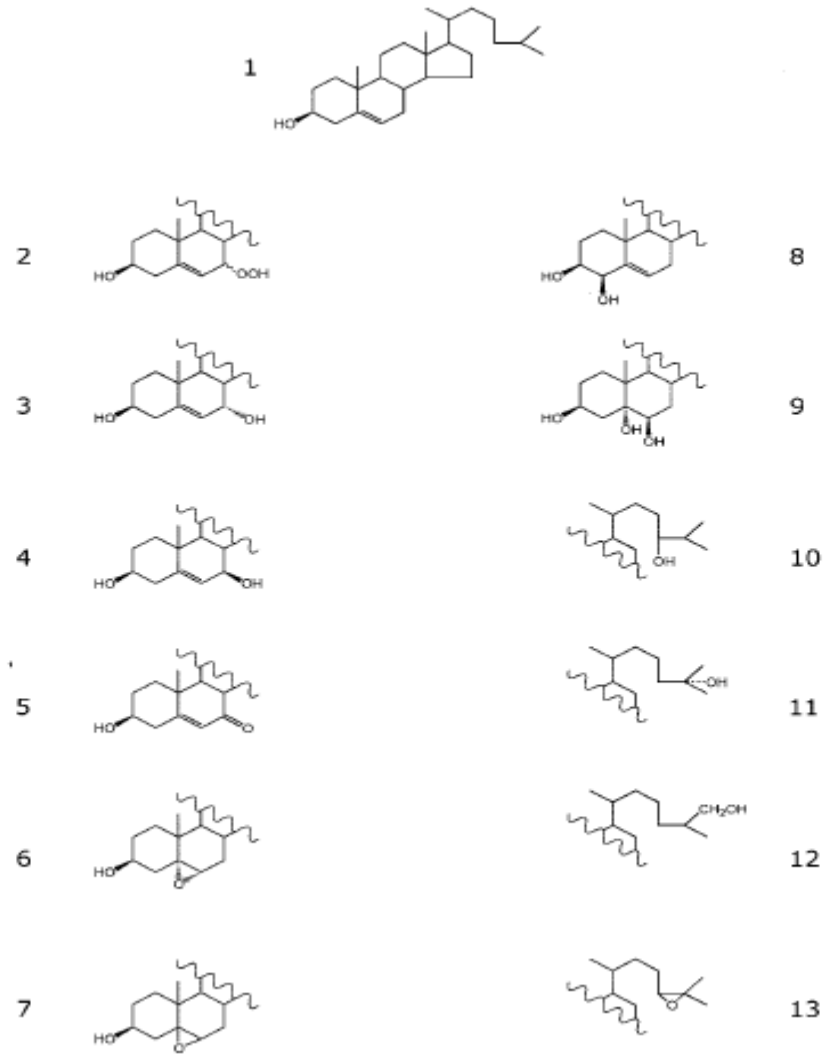


Şekil 2.5. Enzimatik ve non-enzimatik oksisterol sentezi (211).

Bir başka ifade ile oksisteroller; kolesterolün yan zincirine bir veya iki oksijen atomunun OH, keto, epoksit veya peroksit grupları oluşturacak şekilde eklenmesiyle meydana gelirler. (212, 213). Kolesterolün atılım yolundaki son ürünler ya da ara

ürünler olan önemli oksijenli türevleridir (26). Oksisteroller; kolesterol yıkımına aracılık etmenin yanı sıra, birçok önemli biyokimyasal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiş olan düzenleyici büyük moleküller sınıfındadır (214).

Birkaç istisna dışında, oksisteroller kolesterol molekülünün yarı ömrünü büyük ölçüde azaltır. Bu sayede kolesterolün atılımı artar ya da suda çözünen safra asitleri daha fazla oksidasyona yönlendirilir. Molekülün, lipofilik membranları geçmesi kolaylaşır (215). Kolesterolün okside hâli molekülün hücre içinde dağılımının daha hızlı oranda gerçekleşmesini sağlar. Eser miktarda biyolojik membranlarda ve lipoproteinlerde oksisterol bulunur. Farklı kimyasal yapılara sahip çok sayıda oksisterol türevi vardır ve vücutta biyolojik olayların düzenlenmesinde önemli görevler üstlenen moleküllerdir (216, 217). Şekil 2.6.'da önemli bazı oksisterol türevleri gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Oksisterol türleri. **1.** kolesterol, **2.** 7-hidroksikolesterol, **3.** 7 α -hidroksikolesterol, **4.** 7 β -hidroksikolesterol, **5.** 7-oksokolesterol, **6.** kolesterol-5 α ,6 α -epoksit, **7.** kolesterol-5 β ,6 β -epoksit, **8.** 4 β -hidroksikolesterol, **9.** kolestan-3 β ,5 α ,6 α -triol, **10.** 24-hidroksikolesterol, **11.** 25-hidroksikolesterol, **12.** 27-hidroksikolesterol, **13.** 24,25-epoksikolesterol (26).

CYP450 enzimi ile oluşan oksisterol türevleri, diğerlerine oranla dolaşımda daha fazla bulunmaktadır. Enzimatik olmayan yolla oluşan oksisterol türevleri ise kolesterolün ROB ve RNB aracılığı ile oto-oksidasyona uğramasıyla oluşmaktadır (207, 218).

Oto-oksidasyon yoluyla üretilen oksisterol türevleri; 7-ketokolesterol (7-KC), 7 β -hidroksi kolesterol (7 β -OHC), kolestan-5 α ,6 α -epoksi-3 β -ol ve kolestan-5 β ,6 β -epoksi-3 β -ol'dür (219, 220). Oto-oksidasyon yoluyla en çok üretilen oksisteroller

kolesterolün B halkasının yedinci pozisyonunun değişmesi ile oluşur. Bunlar belirgin sitotoksik ve pro-apoptotik özelliklere sahip 7-KC ve 7 β -OHC'yi içerir (216). Oluşan oksisterollerin biyolojik fonksiyonları, aşağıda verildiği gibi sıralanabilir (207):

- Lipit metabolizmasının transkripsiyonel kontrolü,
- Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein (SREBP) düzenlenmesi,
- Retinoik asit reseptörü ile ilişkili orfan reseptörleri (ROR) aktivitesininin modüle edilmesi,
- Hücre ölümünde rolü (apoptoz),
- İnflamasyon sürecini başlatmak ve inflamasyondaki rolü.

Endojen olarak oluşan oksisteroller, önemli sitotoksik özelliklere sahiptir. Hücre ölümüne neden olabilecek mitokondri, lizozomlar ve peroksizomlar gibi organellerin işlev bozukluğuna neden olan güçlü oksidatif stres indükleyicileridirler (221). Bu moleküller genellikle kardiyovasküler hastalıklar, belirli göz rahatsızlıkları, nörodejeneratif bozukluklar ve iltihaplı bağırsak hastalıkları gibi yaygın patolojik durumlarda artan miktarlarda tanımlanır. Bu moleküllerin sitotoksik etkilerine karşı koymak için, biyolojik aktivitelerini ve etkiledikleri sinyal yollarını bilmek önemlidir (221, 222).

Serbest radikallerin ve yüksek reaktif türlerin yarı ömrünün kısa olması sistemlerdeki ölçümlerini zorlaştırmaktadır. Bu nedende geçmiş yıllarda amino asit, karbonhidrat, nükleik asit gibi bileşenlerin oksidasyon ürünleri oksidatif stres göstergesi olarak kullanılmıştır (14). Enzimatik reaksiyonlar ile oluşan ürünlerin in vivo oksidatif stresin güvenilir bir göstergesi olamayacağı göz önünde bulundurularak kolesterolün non-enzimatik yollarla oluşan oksidasyon ürünlerinin bu amaçla kullanılabilmesi düşünülmüştür. Kolesterolün non-enzimatik oksidasyon basamaklarına bakıldığında 7 β -OHC, 7-KC, epoksikolesterol ve 3 β , 5 α , 6 β Trihidroksi Kolestan (triol) zincir reaksiyonunun son ürünleri olmaları nedeniyle in vivo oksidatif stresin güvenilir non-invaziv biyobelirteçleri olarak kullanılabilirler (210, 223).

7-Ketokolesterol

Oto-oksidasyon yoluyla en çok üretilen oksisteroller, kolesterol'ün B halkasının 7. pozisyonunun değişmesi ile oluşmaktadır. Bu grubun önemli üyeleri

arasında belirgin sitotoksik ve pro-apoptotik özelliklere sahip olan 7-KC yer alır. 7-KC oksitlenmiş düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) ana bileşenlerindedir (224, 225).

7-KC, özellikle yaşlanma ile birlikte görülen birçok patoloji ve hastalıkla ilgisi olduğu düşünülen toksik bir oksisteroldür. Kolesterol ve oksijen radikalleri arasındaki reaksiyonun en yaygın ürünüdür ve koroner arter hastalarının kanda ve arteriyel plaklarında bulunan en konsantre oksisteroldür. Yapılan bazı hayvan çalışmalarında kolesterolden daha aterojenik olduğu gösterilmiştir (225).

Kolesterolün aksine, 7-KC devamlı olarak sitotoksik etki gösterir ve vasküler hücrelerde apoptozisi indükleyebilir (226). 7-KC, kolesterol biyosentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan HMG-KoA redüktazı inhibe edebildiği gibi safra asidi biyosentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan 7-alfa-hidroksilazı da inhibe edebilmektedir (226).

7-KC, karaciğerde 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaz tip 1 (11 β -HSD1) gibi enzimler tarafından metabolize edilebilir. 11 β -HSD1 gibi indirgeyici enzimler 7KC'yi indirgeyerek 7 β - ve 7 α - OHC'ye dönüştürürken, sterol sülfotransferazların 7-KC gibi oksisterollerini sülfonatladıkları gösterilmiştir bu da 7-KC'ye göre daha kolay elimine edilebilen suda çözünür metabolitlerin oluşmasını sağlamaktadır (224, 227).

7-KC'nin pro-inflamatuvar sinyaller oluşturduğu ve makrofajlar ve diğer hücre tipleri tarafından interlökin-8 ve monosit kemoatraktan protein-1 gibi inflamatuvar mediatörlerin ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (82, 227). İnflamasyondaki bu artış, aterosklerotik plakların daha da genişlemesiyle sonuçlanır (224).

3 β , 5 α , 6 β Trihidroksi Kolestan

Birçok dokuda, kolesterol hızla kolesterol-5,6-epoksite oksitlenir, ardından kolesterol-5,6-epoksit-hidrolaz ile triole dönüşür. Triol en bol bulunan oksisterollerden biridir (228, 229). Triolün, insanlarda kolesterolün önemli bir metaboliti olduğu kanıtlanmıştır. Hiperkolesterolemik tavşanlarda ve insanlarda triol plazma seviyelerinin yükselmiş olduğu gösterilmiştir (230).

Yakın zamanda yapılan araştırmalar farklı oksisterollerin belirli bölgeler veya organlardaki patolojik süreçleri yansıtabileceğini göstermektedir. Niemann-Pick tip C (NP-C) hastalığında iki spesifik oksisterol triol ve 7-KC teşhis biyobelirteçleri olarak kullanılmaktadır. NP-C, NPC1 (%95 vaka) veya NPC2 genindeki (yaklaşık %5 vaka) mutasyonların neden olduğu, hücre içi lipid trafiğinin bozulmasına yol açan ve kolesterol ve glikolipidlerin birikimiyle sonuçlanan nadir bir otozomal resesif nörovasküler bozukluktur (229, 230). Birçok çalışma ile, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik hastalıklar ve kanser dahil çeşitli hastalıklarda, 7-KC ve triol gibi oksisterollerin patolojiye katkıları olduğu gösterilmiştir (229, 231).

2.7.2. Sfingozin-1-Fosfat

Fosfolipitler ve steroller biyolojik membranların yapı taşlarıdır. Fosfolipitler, yağ asitleri ve alkole ek olarak bir fosforik asit içeren lipit türevleridir (24). Fosfolipitlerin yapılarındaki alkol, bazı fosfolipitlerde gliserol, bazı fosfolipidlerde ise sfingozindir. Fosfotidilkolin, fosfotidiletanolamin, fosfotidilserin ve sfingomiyelin yapılarında taşıdıkları alkol kısmında bulunan moleküllere göre isimlendirilen önemli fosfolipitlerden bazılarıdır (232).

Sfingomiyelin, seramid, sfingozin ve S1P ise hücre zarının akışkanlığının düzenlenmesinde önemli yapısal rol oynayan sfingolipitlerdir (233). Sfingolipitler bütün ökaryotik plazma zarlarının yapısında bulunmaktadır. Lipit tabakanın mekanik olarak stabil ve kimyasal olarak dirençli bir dış yapı oluşturmasını sağlayarak hücre yüzeyini korudukları düşünülür (234). Sfingolipitler, membran bileşimindeki intraselüler (hücre içi) ikincil haberci ve ekstraselüler (hücre dışı) mediyatör gibi çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Hızlı bir şekilde üretilebilir veya birbirlerine dönüştürülebilirler. İnflamasyon ve apoptoz ile büyük oranda ilişkili olan çeşitli hücresel süreçlerde önemli rol oynarlar. Sayısız sfingolipit arasında seramid ve S1P en çok dikkati çekenlerdir. Seramid, kistik fibroz ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan hastaların akciğerlerinde artan bir hidrofobik moleküldür. Bu nedenle, son dönemde yeni farmakolojik hedef olarak kabul edilmektedir (235).

S1P, bir sinyal sfingolipitidir. Aynı zamanda biyoaktif bir lipit mediyatörü olarak da adlandırılır. S1P, sfingozinin amino azotuna bir yağ asidinin bağlanması ile

oluşan seramidden meydana gelir (236). Plazma zarında bulunan bir enzim olan seramidaz, seramidi sfingozine dönüştürür. Sfingozin ise daha sonra sfingozin kinaz (SphK) izoenzimleri tarafından fosforile edilir (237). Tanımlanmış iki izoenzim bulunmaktadır. Bunlar: SphK-1 ve SphK-2'dir. SphK-1, dalak, akciğer ve lökositlerde; SphK-2 ise karaciğer ve böbrekte yüksek oranda eksprese edilir. SphK-2 esas olarak mitokondri, çekirdek ve endoplazmik retikulumda bulunurken SphK-1 daha çok sitoplazma ve hücre zarında bulunur. SphK1'in tümör ilerlemesinde fonksiyonları tanımlanmıştır (232, 238).

S1P, sfingosin fosfatazlar tarafından sfingozine defosforile edilebilir ve sfingozin fosfat liyaz tarafından geri döndürülemez şekilde indirgenebilir. S1P, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) gibi lipoproteinler aracılığıyla kanla taşınır. Doku sıvılarında daha az bulunur (239).

S1P'nin 1998'de G protein-bağlı beş hücre yüzey reseptörlerinden biri olan S1PR1 için hücre dışı bir ligand olduğu keşfedilmiştir. S1P'nin biyolojik etkilerinin çoğuna, hücre yüzeyi reseptörleri aracılığıyla sinyal verme aracılık eder. S1P reseptörleri hücre yüzeyinde, sitoplazmada ve çekirdekte bulunur (234). S1P reseptörlerine bağlanarak büyüme, hücre yaşamının devamı, hücre iskeleti ve hareketi gibi önemli hücre fonksiyonları üzerindeki etkileri nedeniyle S1P'nin kanser patogenezi de rolü olduğu düşünülmektedir (240).

Epidermal büyüme faktörü (EGF), insan meme kanserinin invazyonu ve tümör gelişimin ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. EGF, meme kanseri hücrelerinin plazma membranında SphK-1 translokasyonunu ve aktivasyonunu indüklemektedir (241). S1P'nin hücre içindeki miktarı iki enzim tarafından kontrol edilmektedir. Bunlar: SpHK'ler ve sfingosin-1-fosfat liyaz (SPL)'dir. Bu iki enzim hücre içi S1P miktarını belirleyerek hücre yaşamının devamını etkiler. Özellikle hücre streseyle bu iki enzimin ekspresyonunun artması hücrenin çoğalmasını ve apoptozunu etkileyebilir. SPL'nin aşırı ekspresyonu hücre içi S1P ve sfingozin seviyelerini azaltır ve seramid düzeylerini yükselterek apoptoza neden olur (242).

S1P, vasküler ve bağışıklık sistemlerinin önemli bir düzenleyicisidir. Vasküler sistemde S1P, anjiyogenez, vasküler stabilite ve geçirgenliği düzenler (243). Bağışıklık sisteminde, T ve B hücrelerinin hareketliliğinin ana düzenleyicisi olarak

kabul edilmektedir. S1P'nin S1PR1 ile etkileşimi, bağışıklık hücrelerinin lenfoid organlardan (timus ve lenf düğümleri gibi) lenfatik damarlara çıkışı için gereklidir (244).

Yapılan çalışmalar, yeni kan damarlarının oluşumundaki S1P'nin rolünün insan sağlığı için hayati önem taşıdığını ve kanser gibi bazı hastalıklarda büyük bir öneminin olduğunu göstermiştir. Yumurtalık kanseri hastalarında S1P seviyelerinin 5-10 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. S1P, epitelyal yumurtalık kanseri hücrelerinin migrasyonunu ve invazyonunu uyarır ancak normal yumurtalık yüzey epitel hücrelerinin göçünü engellemektedir (245). Yumurtalık kanserlerinin çoğu (%90'dan fazlası) yumurtalık epitelinden kaynaklanır. Bu nedenle hücre dışı S1P, epitelyal yumurtalık kanseri hücrelerinin göçünü teşvik ederek kanserin ilerlemesinde önemli bir role sahiptir. S1P ayrıca cilt hücrelerinin çoğalmasını da düzenler. Bu durum özellikle keratinositler için geçerlidir (233, 238). Bunun yanında, artan S1P üretimi çoklu skleroz, alerji, ateroskleroz ve otoimmün hastalıklar gibi çeşitli patofizyolojik süreçlerle de ilişkilidir (238). Son zamanlarda, S1P'nin Alzheimer hastalığında önemli hücre içi hedefleri olduğu gösterilmiştir (237).

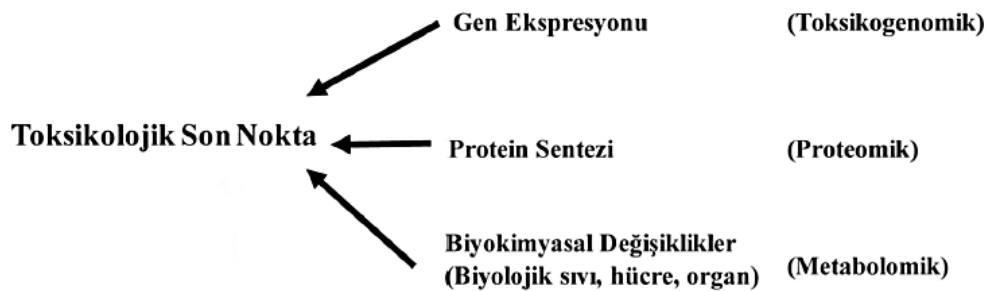
Sfingolipidler hücrelerin çoğalması ve hayatta kalması gibi geniş bir hücresel süreci kontrol ederken sfingolipid metabolitleri, özellikle S1P, nörotransmitter salınımının düzenlenmesi ve nöronal proliferasyon gibi önemli nörona özgü fonksiyonları da kontrol etmektedir (246).

S1P; adenilat siklaz, fosfolipaz C ve D, fosfoinositid 3-kinaz, c-Jun N-terminal kinaz, p38, küçük guanozin trifosfazlar (Rac ve Rho) gibi G reseptör bağımlı sinyal yolları ile reseptörden bağımsız protein-tirozin kinazlar ve tirozin fosfazlar içeren farklı sinyal yollarını uyarır (247). S1P sinyali özellikle prenatal ve neonatal dönemlerde önemlidir ve herhangi bir rahatsızlık ciddi sonuçlar doğurabilir. Embriyonik S1P eksikliği, kan damarlarının gelişim bozukluklarına ve dolayısıyla embriyonik ölüme neden olur. S1P, beyin ve damar yapısının gelişimi için önemlidir. Olgun farklılaşmış nöronlarda artan S1P seviyeleri ölümcül olabilir ve ölüme yol açabilir (246).

2.8. Metabolomik Kavramı ve Kullanımı

“Omik” teknolojileri, bir hücre, doku veya organizmayı oluşturan, tüm evrelerin bütünsel bir görüntüsünü ortaya çıkarmayı hedeflemektedir. Bu teknoloji öncelikle, spesifik olarak genlerin (genomik), m ribonükleik asit (RNA)’ların (transkriptomik), proteinlerin (proteomik) ve metabolitlerin (metabolomik) bir bütün olarak yorumlanmasını amaçlamaktadır (248, 249). Klasik moleküler biyolojinin aksine, farklı kimyasallara ve toksisite tiplerine verilen hücresel cevabın tespit edilmesinde ve hipotez oluşturulamayan, herhangi bir hipotezin bilinmediği ancak tüm verileri elde ettikten sonra daha fazla teste tabi olabilecek bir hipotezi tanımlamak için kullanılan yöntemsel yaklaşımlardır (250).

Omik teknolojileri, çoklu moleküllerin eş zamanlı olarak biyobelirteç keşifleri için araştırılmaları sayesinde ortaya çıkmıştır. Omik araştırmalar, ilaç keşfinde, toksisitenin ve etkinliğin değerlendirilmesinde giderek artan bir şekilde kullanılmaktadır (251). Omik teknolojileri altında genomik, proteomik ve metabolomik teknolojilerinden söz edilmektedir. Tüm bu yeni yaklaşımlar toksisitenin öngörülmesinde, toksisite oluşumunun altında yatan moleküler olayların anlaşılmasında büyük önem taşımaktadır (248). Toksikolojide omik teknolojilerinin kullanımı Şekil 2.7.’de özetlenmiştir (252).



Şekil 2.7. Toksikolojide omik teknolojilerinin kullanımı.

Genom, bir hücre veya organizmanın toplam DNA’sıdır. Genomikler ise bir organizmanın genomunun sistematik bir şekilde çalışılmasıdır. İnsan genomu 3,2 milyar temel ve tahmini 30.000–40.000 protein kodlayıcı gen içerir (253).

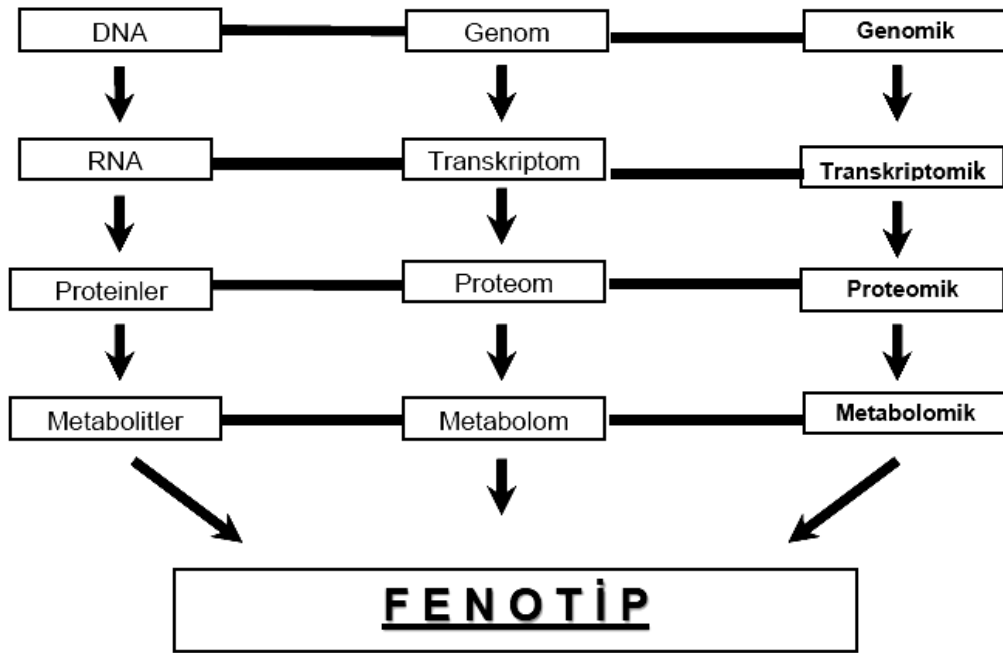
Transkriptomik ise, bir hücre veya organizmadaki toplam mRNA ve translasyon olarak adlandırılan işlemde protein sentezi için oluşturulan şablondur. Genomik ve transkriptomikte herhangi bir gen grubu sınırlamasına gerek kalmadan gen topluluğunun davranışı bütün bir halde sorgulanabilmiştir (253, 254).

Proteomik, bir hücre, doku veya organizmadaki tüm eksprese proteinlerin kümesi olarak tanımlanmaktadır. Proteomiğin biyobelirteç keşfi için özel bir vaat olduğu düşünülmektedir çünkü proteinler, hastalık sürecinde büyük oranda etkilenmektedirler (255).

Metabolomik kavramının önemli bir alt grubu da lipidomiklerdir. Lipidomikler, biyolojik sistemlerdeki hücresel lipit yollarında ve ağlarında rol lipit bileşiklerinin geniş ölçekli çalışmaları olarak tanımlanmıştır. Çok karmaşık bir yapıya sahip olan lipit türleri belirgin kimyasal özellikleri ve önemli biyolojik aktiviteleri dolayısıyla lipidomikler pekçok araştırmaya konu olmaktadır. Lipidomların aydınlatılması patofizyolojik süreçlerdeki rollerinin anlaşılabilmesine katkıda bulunabilecektir (256).

Metabolomik, genel olarak binlerce küçük molekülün aynı anda izlenmesini ele alır ve genomik ile proteomiklere tamamlayıcı bir teknik haline gelerek yeni kanser biyobelirteçlerini tanımlamada hızlı ve etkili bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır (251, 257).

“İnsan Genom Projesi” sayesinde hastalık genleri keşfedilerek hastalıkların kişiler arasında neden farklılık gösterdiği, kişilerin taşıdığı hastalık riskleri ve yine bazı kişilerin neden ilaç tedavisine daha iyi yanıtlar verdiği gibi karmaşık konular aydınlatılmaya başlanmıştır. Bunun görülmesi üzerine, proteomik ve transkriptomik çalışmalarına da ağırlık verilmiş ve bu veriler elektronik ortama aktarılmıştır fakat bu araştırmalar genotip-fenotip ve genotip-çevre arasındaki ilişkileri aydınlatmada yeterli olamamıştır. Bu bilgileri belirleyen biyobelirteçlerin hücrede oluşan metabolitlerde saklı olduğu görülmüştür (253, 258). Omik teknolojilerinin gelişimi Şekil 2.8.’de gösterilmektedir.



Şekil 2.8. Biyolojik sistemlerde omik teknolojilerine genel bakış (259).

Metabolomik, metabolomdaki küçük moleküllü metabolitlerin yüksek verimli tanımlanması, nicelleştirilmesi ve karakterizasyonu ile ilgili ortaya çıkan bir “bilim” araştırmasıdır. Metabolom, belirli bir hücre, organ veya organizmada bulunan tüm küçük moleküllü (<1500 Dalton) metabolitlerin tamamlayıcısı olarak tanımlanabilir (248). Metabolom, bir biyolojik sistemin fizyolojik, gelişimsel ve patolojik durumu ile ilgili bilgileri gösterebilen bir resim olarak düşünülebilir. Metabolitler, canlı vücutlarındaki tepkimeler sonucunda oluşan küçük moleküllü (<1500 Dalton) ara ve son ürünlerdir (253). Metabolomikte incelenen küçük moleküller; peptitler, oligonükleotidler, lipitler, aminler, aminoasitler, streoidler, alkaloidler, ketonlar, nükleozidler, organik asitler, şekerler ve ilaçlardır. İnsandaki metabolitlerin sayısı tam olarak bilinmemekle birlikte 200.000’i aştığı tahmin edilmektedir (253, 260).

Metabolitler, bir hücrenin büyümesi ve normal çalışması için gereklidir ve hücre içerisinde birçok farklı yolağa etki edebildikleri için metabolomik profili önem kazanır. Belirli bir hastalık durumu için, küçük bir genomik değişim metabolit seviyesinde birçok kez çoğaltılabilir ve niceliksel olarak ölçülebilir (261).

Dokular, idrar, tükürük, beyin omurilik sıvısı ve kan plazması gibi biyolojik örneklerde bulunan metabolitler ölçülebilir ve bu da araştırmacıların spesifik metabolik yolları tanımlamasına izin verir. İdrar, kan plazması ve tükürük gibi akıcı maddeler, minimal invazif yollarla elde edilebildikleri için, çalışmak için en uygun örneklerdir (30, 255).

“Metabolom” terimi ilk olarak Olivier ve ark. tarafından 1998 yılında genom ve proteoma benzer bir şekilde tarif edilmiştir fakat bu tanım “belirli bir fizyolojik veya gelişimsel durumdaki hücrelerde bulunan düşük moleküler ağırlıklı moleküllerin tümünün kantitatif tamamlayıcısı” olarak sınırlandırılmıştır. Daha sonra metabolomik, Fiehn tarafından bir biyolojik sistemin tüm metabolitlerinin tanımlandığı ve nicelleştirildiği kapsamlı bir analiz olarak ifade edilmiştir (255, 261). Bununla birlikte, metabolik yolların tek başlarına değil, geniş bir ağına parçası olarak hareket ettiğinin fark edilmesi, metabolit analizinde daha bütünsel bir yaklaşıma duyulan ihtiyacı doğurmuştur (253, 262).

Metabolomik analizler, kimyasal belirteçlerin taranmasında önemli bir role sahiptir. Metabolomik metodlar hedeflenmiş ve hedeflenmemiş olarak iki alt gruba ayrılır (263).

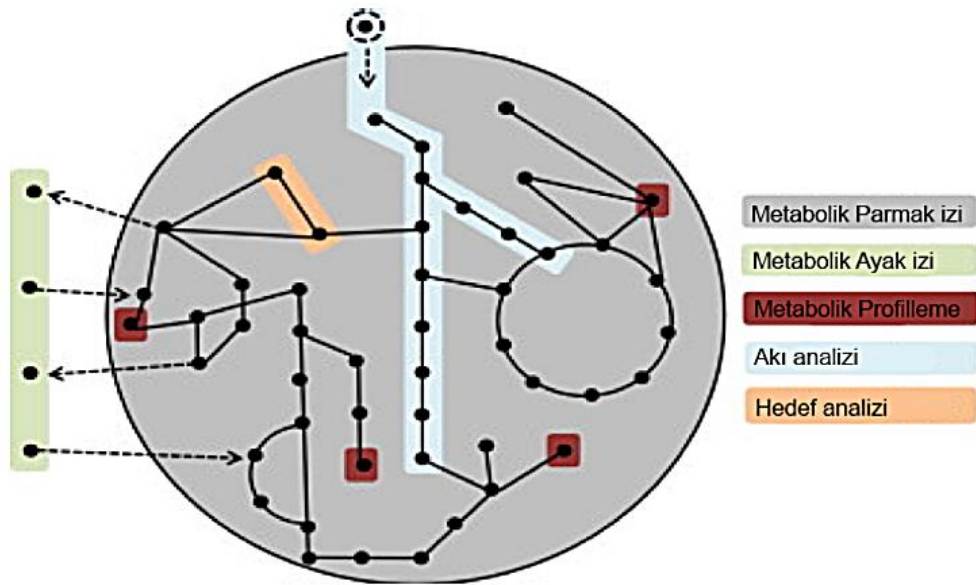
Hedeflenmiş metabolomik analizlerde, sadece belirli bir metabolit veya metabolitlerin niteliksel ve niceliksel analizi söz konusudur. Genel olarak spesifik bir yol veya biyolojik bir aktivite ile ilişkili olan bir dizi bilinen nicel metabolitlerin değişikliklerine odaklanılır. Sonuç olarak, metabolomun sadece çok küçük bir kısmıyla ilgilenilir ve diğer tüm bileşenlerden gelen sinyaller göz ardı edilir. Böylece metabolitin tam olarak ölçülmesi sağlanır (253, 257).

Hedeflenmemiş metabolomik analizlerinde ise, metabolitler hakkında önceden bir bilgi sahibi olmadan, belirli bir örnek grubunda yani hasta ve sağlıklı gruplar veya aynı hastalığın farklı derecelerinde olan iki grubun karşılaştırılması gibi mevcut olan tüm olası metabolitlerin veriye dayalı, yüksek verimli ve hızlı analizi hedeflenir (264). Farklı istatistiksel yöntemler kullanılarak, bireysel metabolitler ayırt edilmeden veya nicelleştirilmeden, çok sayıda örneğin hızla sınıflandırılması amaçlanır. Hedeflenmemiş metabolomik analiz, biyolojik sistemler arasında karşılaştırmalar yapmak için yararlıdır. Tespit edilen metabolitlerin konsantrasyonlarındaki varlık,

yokluk veya fark, deney grupları arasında karşılaştırma yapılabilmesini sağlar (248, 253).

Hedeflenmemiş metabolomik analizlerde fazla sayıda değişkene bağlı olarak nicelleştirilme mümkün değildir ve metabolitlerin kimliği genellikle bilinmemektedir ve bu da yeni metabolizma alanlarının ortaya çıkmasını mümkün kılmaktadır (31). Yani hedeflenmemiş metabolomik çalışmaları yeni biyobelirteç tespiti yapılmasını, farklı metabolomik yolak analizlerini, ilaç aktivite çalışmalarını aydınlatmada oldukça iyidir (264, 265).

Metabolomik analizlerde genel çalışma yaklaşımları Şekil 2.9.'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Metabolomik analizlerde genel çalışma yaklaşımları (255).

Metabolik parmak izi yaklaşımı, sistem içerisindeki tüm saptanabilir metabolitlerin geniş bir yelpazede taranmasını içerir. Hedeflenmemiş analiz yaklaşımlarında yaygın olarak kullanılır (250, 264).

Metabolik ayak izi yaklaşımı, hücreler tarafından metabolit atılımı veya alınımının bir yansıması olan hücre kültür ortamlarında metabolitlerin tabaka analizidir (250, 264).

Metabolik profilleme, spesifik bir metabolik yola ya da bir bileşik sınıfına bağı bir grup metabolitin analizine odaklanır. Analiz için metabolit yolları seçilmiştir ve belirleyicileri için spesifik analitik yöntemler geliştirilmiştir. Bu yaklaşım metabolizmanın kısıtlayıcı olmayan kapsamlı bir görünümünü sağlar. Metabolit profili en eski ve en köklü yaklaşımlardan biridir ve metabolomik için öncü bir analiz yöntemi olarak kabul edilebilir. Metabolik profilin sonuçları kantitatifdir (29, 255).

Akı analiz ise, genellikle bir izotop işaretli karbon içeren bir bileşiğin, akıbetini belirlemek için belirli bir yol veya yollar dizisinin takiben niceliksel veri yorumunun yapılmasıdır (266).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar Maddeler

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Firma Adı
3 β -hidroksi-5-kolesten-7-on-d7 (7 ketokolesterol-D7)	Avanti
3 β -hidroksi-5-kolesten-7-on (7 ketokolesterol)	Avanti
3 β ,5 α ,6 β -Trihidroksikolestan	Toronto
3 β ,5 α ,6 β -Trihidroksikolestan, D7	Toronto
N-(3-Dimetil Amino Propil)-N'-Etil Karbodiimid Hidroklorid (EDC)	Sigma
N,N-Dimetilglisin hidroklorid (DMG)	Sigma
4-(Dimetilamino) piridin, Reaktif Ekli, (DMAP)	Sigma
Kloroform, <i>Chromasolv</i> [®] Ekli, HPLC için, \geq %99,9, Stabilizan olarak %0,5-1,0 Etanol içerir	Merck
Heksan <i>Chromasolv</i> [®] HPLC için $>$ %97,0	Merck
Metanol <i>Chromasolv</i> [®] , Gradyan Sınıfı, HPLC için $>$ %99,9	Merck

Aktif karbon ve dextran ile muamele edilmiş insan plazması antikoagülanı (ACD, EDTA, Heparin)-UNIT, Steril Filtreli	Zenbio
Formik asit LC-MC Ultra, UHPLC-MS için eluent katkı maddesi	Sigma
Amonyum format HPLC için, $\geq\%99,0$	Sigma
Asetonitril, LC-MS Ultra <i>Chromasolv</i> [®]	Sigma
Metoksiamin hidroklorür. Metabolomik için	Sigma-Aldrich
MSTFA (N-metil-N- (trimetilsilil) trifloroasetamid)	Thermo Scientific
Miristik asit-d27 (IS), metabolomik için	Thermo Scientific
Amonyum Asetat, HPLC için	Sigma
Distile su	

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Kullanılan Araç ve Gereçler	Firma Adı, Modeli
LC-MS/MS (Tandem-Kütle Spektrometresi)	Shimadzu model 8040
GC-MS/MS	Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra
GC- MS/MS Kolon	DB5-MS kolon (30 m +10 m ön kolon; 0.25 mm iç çap ve 0.25 µm film kalınlığı)
15 ml ve 50ml'lik konik tabanlı kapaklı tüp	BD Biosciences Discovery Labware

Ependorf santrifüjü	Abott
Su banyosu	Nuve B5
HPLC Cam insert	Sigma, Hettich Universal 30 RF
Santrifüj	Lanofuge 200 Heraeus
Evaporatör	Univapo 150 H
Vakum fırını	Kendro B6420
Cam test tüpleri (10 ml)	Fisher Scientific
Orbital çalkalayıcı	Heidolph tetramax 101
LC-MS/MS Kolon, Simetri C18 (3-5 μ m, 21*50 mm)	WAT 200650
LC-MS/MS Kolon, ACE C18 (50 mm x 4,6 mm x 5 μ m) kolonu	
Hassas terazi	Shimadzu ATX 224
37°C inkübatör	Eastbiopharm ELISA Kit
Hassas otomatik pipetler ve pipet uçları	Gilson, Mettler Toledo
Buz kırma makinası	Skotsman
Buzdolabı	Beko BK 3531 T

Deiyonize su cihazı	Baunstead
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	AS-Polar 530 V
Distile su cihazı	Mes
Etüv	Dedeoğlu
Vorteks	Janke & Kunkel VF 2
Terazi	Schimadzu Libror EB-330D
Ultrasonik Banyo	Transsonic 460/H
Spektrofotometre	Shimadzu UV 1600

3.3. Hazırlanan Çözeltiler

3.3.1 LC-MS/MS ile Oksisterol Analizi Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

7-Ketokolesterol ve 3 β , 5 α , 6 β Trihidroksi Kolesterol Stok Çözeltisinin Hazırlanması:

7-KC ve triol stok çözeltileri, 1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde, toz halindeki maddelerin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) kalitesindeki metanolde çözülmesi ile hazırlanmıştır. Ayrıca, 5 mg/ml konsantrasyonda bir ara stok hazırlamak için HPLC kalitesindeki metanol ve deiyonize distile su kullanılarak 7-KC ve triolun stok çözeltisi 1:200 oranında seyreltilmiştir. Çözeltiler -20°C'de analize kadar saklanmıştır.

7- Ketokolesterol ve Triol Çalışma Standart Çözeltisinin Hazırlanması:

Çözeltiler döteryum içeren internal standartlar kullanılarak hazırlanmıştır. İnternal standardın çalışma çözeltisi ara stoktan metanol ile seyreltilerek 10 µg/ml triol ve 10 µg/ml 7-KC hazırlanmıştır.

Kalibrasyon Standart Çalışma Çözeltisi:

Ticari insan plazma kalibrasyon (KAL) standartlarının hazırlanması için fibrin ve lipidden arındırılmış tanı amaçlı plazma kullanılmıştır. 7-KC ve triol için kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. Kalibrasyon aralığı, normal sağlıklı bir insanda oksisterollerin yaklaşık biyolojik seviyelerine ve oksisterollerin çok yüksek olduğu patolojik seviyelere dayanılarak kararlaştırılmıştır. Sekiz kalibrasyon standardının karışımı Tablo 3.1.'de gösterilen standartların stok çözeltilerinden hazırlanmıştır. Bu standart kalibratörler, ara stok çözeltilerinin tek tek ilaveleri ile elde edilmiştir. Standartlar hazırlandıktan sonra küçük parçalara ayrılmış ve -80°C'de saklanmıştır.

Tüm kalibrasyon eğrileri, x eksenini üzerindeki kalibratör analit konsantrasyonuna karşı y-eksenini üzerindeki analit alanı/IS alanı oranının çizilmesiyle oluşturulmuştur. Kalibrasyon noktaları, 8 kalibratör seviyesi kullanılarak elde edilmiştir ($r^2 = 0.997$) (227).

Tablo 3.1. Kalibrasyon standart çalışma çözeltilerinin hazırlanması (1 L'de) (227).

Kalibratörler	7KC ve Triol	7KC ve Triol 5000 ng/ml	7KC ve Triol 500 ng/ml	7KC ve Triol 50 ng/ml
KAL 1	3,125 ng/ml	-	-	62,5 ml
KAL 2	6,25 ng/ml	-	12,5 ml	-
KAL 3	12,5 ng/ml	-	25 ml	-
KAL 4	25 ng/ml	-	50 ml	-
KAL 5	50 ng/ml	-	100 ml	-
KAL 6	100 ng/ml	20 ml	-	-
KAL 7	200 ng/ml	40 ml	-	-
KAL 8	400 ng/ml	80 ml	-	-

3.3.2. Sfingozin-1-Fosfat Analizi Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

İnternal standartın hazırlanması:

Ticari olarak satın alınan 1 µg/ml'lik döteryumlu S1P stok çözeltisi, HPLC kalitesinde metanol ile 7,5 ng/ml'ye dilue edilmelidir. Bu amaçla, hazır stok içerisinde 375 µl alınmış ve yaklaşık 30 ml metanol bulunan mezürün üzerine eklenmiştir. 50 ml'ye yine metanol ile tamamlanarak istenen ara stok hazırlanmıştır. 0,312 - 40 ng/ml konsantrasyon aralığında standart çözeltileri bu ara stoktan HPLC kalitesinde metanol ile dilue edilerek hazırlanmıştır.

3.3.3. Metabolomik Analizi Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

İnternal standartın hazırlanması:

Ticari olarak satın alınan ve +4°C'de muhafaza edilen miristik asit D27'den 10 mg tartılmış ve bir miktar metanol ile çözüldükten sonra 10 ml'ye tamamlanmıştır. Elde edilen 1000 ppm'lik internal standart çözeltisi analizlere kadar -20°C'de saklanmıştır.

Metanol-su (8:1 h/h) Karışımının Hazırlanması:

Metanol ve distile su oranı 8:1 (h/h) olacak şekilde 160 ml metanol ile 20 ml distile suyun karıştırılması ile hazırlanmıştır.

3.4. Çalışma Grubunun Seçimi

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilebilmesi için çalışma protokolü Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca, Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak 01.10.2019 tarih ve 2019/23-02 karar numarası ile onaylanmıştır (Bkz. EK 1).

Ankara Keçiören Mesleki ve Çevresel Hastalıklar Hastanesi dahiliye bölümüne başvurmuş 42 Pb zehirlenmesi görülen hasta çalışmada yer almıştır. Çalışma grubu içerisinde bulunan hastalar hastanede yatan ve kan kurşun düzeyi 35 µg/dl üzerinde olan 18 yaş üzeri yetişkin hasta grubundan seçilmiştir. İlgili hekim tarafından mesleki öyküsü, maruziyetleri ve sigara öyküsü alındıktan sonra klinik parametreleri değerlendirilmiştir. Pb zehirlenmesinin tedavisinde toplam günlük CaNa₂EDTA dozu,

kurşun zehirlenmesinin derecesine, hastanın ilaca karşı yanıtına ve toleransına bağlı olarak hekim tarafından belirlenmektedir.

Kronik hastalığa sahip, kemoterapi/radyoterapi tedavisi almış, viral enfeksiyon geçirmiş olan ve şelasyon tedavisi alması gerekmeyen (≤ 35 $\mu\text{g}/\text{dl}$ kan Pb düzeyine sahip olan) Pb işçileri araştırmaya dahil edilmemiştir.

3.5. Çalışma Grubundan Biyolojik Örneklerin Toplanması

Kan örnekleri Pb zehirlenmesi tanısı konan 42 hastadan ve yine aynı hasta grubunun şelasyon tedavisi alması sonrasındaki periyodik muayenelerinde toplanmıştır. Her bir kişi için 5 ml kadar heparinize kan örneği aç karna ve sabah saatlerinde hastanede bulunan uzman hekimin kontrolünde alınmıştır. Alınan numuneler kısa sürede hastaneden Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Bölümüne soğuk zincir kurallarına uygun şekilde transfer edilmiştir. Kan örnekleri 2500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen plazma örnekleri endorflara aktarılarak porsiyonlanmış, planlanan deneylere kadar -80°C 'de saklanmak üzere kaldırılmıştır.

3.6. Çalışma Grubunun Klinik Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Biyokimyasal olarak klinik parametrelerin analizi Ankara Keçiören Mesleki ve Çevresel Hastalıklar Hastanesi Biyokimya laboratuvarında gerçekleştirilmiş olup bireylerin klinik verileri dahiliye bölümünde bulunan uzman hekim tarafından sağlanmıştır. İlgili veriler bulgular bölümünde sunulmuştur.

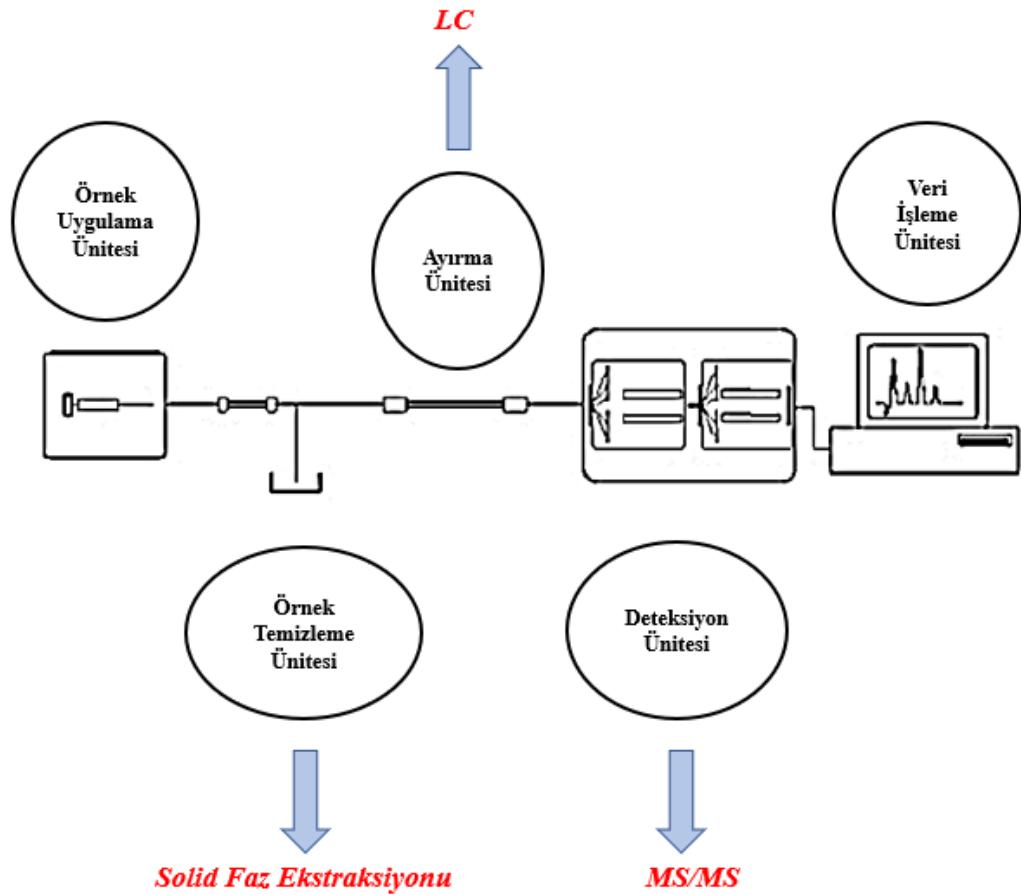
3.7. 7-Ketokolesterol ve 3β , 5α , 6β Trihidroksi Kolesterol Analizi

Oto-oksidasyon yoluyla üretilen oksisterollerden olan 7-KC'lerin sitotoksik ve pro-apoptotik özelliklerinin olduğu ve vücutta enflamasyon sürecine etki ettikleri savunulmaktadır (267). 7-KC, oto-oksidasyonun iyi bir göstergesidir. Hem 7-KC hem de triol otooksidasyonla oluşan oksisteroller arasında biyobelirteç olarak kullanılan ve bu çalışmada da değerlendirilen önemli moleküllerdir (28, 268). Analizler, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı'nda bulunan Sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi (LC-MS/MS) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

LC-MS/MS; bir numunedeki farklı bileşiklerin ayrılması, tanınması ve miktarının belirlenmesi için kullanılan hassas bir analitik tekniktir. Bu teknik, güçlü bir ayırma yöntemi olan HPLC ve MS/MS'i bir arada içermektedir (227, 269). LC'nin çözünürlük gücü ile MS/MS'in hassas ölçüm kombinasyonu bu teknikte bir aradadır. LC, karışımdaki bileşenleri ayırırken MS/MS, her bir bileşenin yapısal olarak tanımlanmasında yardımcı olur (270).

Yüksek özgülük ve duyarlılık sağlayan karmaşık yapıları ve karışımların içeriğini tespit edebilme özelliği LC-MS/MS'in, laboratuvarlarda protein, peptid ve oligonükleotid analizi, ilaç keşfi ve klinik ilaç testleri gibi farklı işlemlerde kesin bir sonuç için tercih edilen bir yöntem olmasını sağlamıştır (271).

LC sistemi sayesinde ayırma gerçekleşmektedir. MS/MS'de ise, bir iyon kaynağı tarafından analit molekülleri iyonlaşmış bir duruma dönüştürülmektedir. İyonlar kütle analizöründeki kütle/yük (m/z) oranına göre ayrılarak analiz edilmektedir ve daha sonra detektör tarafından nicelleştirilmektedir. Veriler, m/z oranının bir fonksiyonu olarak üretilen iyonların kütle spektrumu şeklinde verilmektedir (227, 272). Şekil 3.1.'de LC-MS/MS'in temel bileşenleri şematize edilmiştir.



Şekil 3.1. LC-MS/MS cihazının temel bileşenleri (270).

Çalışmamızda oksisterol analizi, LC-MS/MS sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Plazmada bulunan triol ve 7-KC düzeyleri ölçülmüştür. LC sistemi, yüksek basınçlı bir karıştırma borusu, bir DGU 14A çözücü gaz giderme birimi, bir SIL 20A otomatik örnekleme birimi, bir CTO kolon fırını ve bir seri SPDM10A fotodiyot dizisi (PDA dedektörü) ile birleştirilmiş iki adet çift kafalı LC10 ADVp yüksek basınçlı çözücü pompadan oluşmaktadır. Kütle spektrometreleri, değiştirilebilir elektrosprey iyonizasyona (ESI) sahip olup, 2010A tek kuadropol (dört kutuplu) dedektör ile seri olarak bağlanmıştır. Sistem, kayıtların tutulduğu ve sistem programını içeren bir bilgisayar ile kontrol edilmektedir. MS dedektörü için gerekli azot, sıvı azot tankından düzenlenen bir havalandırma sistemi ile sağlanmaktadır (227).

Kalite Kontrol Örneklerinin Hazırlanması:

Kalite kontrol (KK) örnekleri, toplanmış plazma örneklerinden, sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonizasyon-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi

(LC-ESI-MS/MS) yöntemi ile endojen triol ve 7-KC'nin ortalama konsantrasyonunun belirlenmesi ile hazırlanmıştır. Düşük ve yüksek plazma kalite kontrolü (DKK, YKK) örnekleri, bilinen standart miktarlarında triol ve 7-KC'ye eklenerek sırasıyla 40/40 ng/ml'lik ve 150/150 ng/ml endojen seviyelerinde hazırlanmıştır. Primer 2 KK karışım örnekleri aynı şekilde hazırlanmış olup standartların stok çözeltilerinden bağımsız olarak hazırlanmıştır. KK örnekleri, hazırlamadan sonra ependorf tüplere bölünmüş ve -80°C 'de saklanmıştır.

Örneklerin Hazırlanması:

Örnekler üç aşamada hazırlanmıştır: 1. Aşama, üç adım içermektedir; protein çöktürme, ayırma ve kurutma. 2. aşama, türevlendirme fazı ve 3. aşama, numune temizleme işlemidir. Çalışma örnekleri, KK'ler ve standartlar 2 ml'lik ependorf tüplere ayrılmıştır. LC-MS/MS tayini, sadece serbest veya esterleşmemiş oksisterollerini ölçmek için tasarlanmıştır, toplam oksisterol türlerinin ölçümü için numune hazırlama esnasında gerekli olan plazma örneklerinin esterleştirilmesine gerek kalmamıştır. Bu adımın kaldırılması, yöntemdeki hata olasılığını azaltmıştır. Bu çalışmada Xuntian Jiang ve ark. (273) tarafından geliştirilen protokol kullanılmıştır.

1. Aşama: Kalibrasyon standartları, KK numuneleri ve hasta plazma numuneleri için, 50 μl plazma, 2 ml'lik ependorf tüpüne eklenmiştir. İnternal standart çalışma çözeltilisi (300 μl , 20 ng/ml), kör matris haricinde tüm numunelere ilave edilmiştir. Ependorf tüpleri 30 saniye vortekslenmiş ve sonra oda sıcaklığında 13000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatantlar temiz 2 ml'lik ependorf tüplerine aktarılmış ve daha sonra organik tabaka 35°C 'de Çoklu Kuyu Buharlaştırma Sistemleri (Univapo 150) içinde kuruyana kadar buharlaştırılmıştır.

2. Aşama: Bu aşama türevlendirme fazıdır. Kloroformda 20 μl 0,5 M DMG/2M DMAP ve kloroformda 20 μl 1M EDC, uçurulan örneklerle ilave edilmiştir. Karışımların ağzı kapatılmış ve vortekslenmiştir. Daha sonra bir su banyosu içinde 45°C 'de 1 saat ısıtılmıştır. İnkübasyon sonunda ependorfların rengi koyu sarı olmalıdır. Bu renk iyi türevlendirilmiş olduğunu göstermektedir. 250 μL H_2O ve 500 μl heksan, türevlendirilmiş numunelere ilave edilmiş ve bir orbital çalkalayıcı üzerinde 1000 rpm'de 5 dakika çalkalanmaları sağlanmıştır. Numuneler 10 dakika süreyle 13000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant üzerine 500 μl heksan eklenmiştir.

Numuneler bir orbital çalkalayıcı üzerinde 1000 rpm'de 5 dakika çalkalanmıştır. Tekrar 10 dakika süreyle 13000 rpm'de numuneler santrifüje tabi tutulmuştur. Süpernatantlar (heksan) buharlaştırılmıştır. Buharlandırmadan sonra 300 µl %80 metanol ilave edilmiştir. Numuneler, 20 saniye vortekslenmiş ve 0,25 ml'lik konik viyal ekleme ile 1,5 ml HPLC otomatik numune alma cihazı viyallerine aktarılmış ve LC-MS/MS ile analize edilmiştir.

3. Aşama: LC ile örnek temizleme fazıdır. Bu adım kaynak koni üzerindeki kirli maddeleri azaltmakta ve MS/MS'de sinyali artırmamaktadır.

3.7.1. Kromatografik Analiz Koşulları

Kullanılan oksisterol analiz yönteminde bir ters faz kolonu, Symmetry C18 (3-5 µm, 21*50mm) (C/N 5020-01742) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) kullanılmıştır. Kolon fırın sıcaklığı, analiz boyunca 45°C'de tutulmuştur. Örnek enjeksiyon hacmi 7,5 µl ve analiz süresi, her örnek için 7 dakikadır.

Mobil faz çözücü A ve B olmak üzere iki çözeltiden oluşmuştur:

- Çözücü A: (1 mM amonyum format, pH=3)
- Çözücü B: Asetonitril (ACN): 1 mM amonyum format (95:5), pH=3.

Mobil faz A'nın hazırlanması için 1 mM amonyum format hazırlanmıştır. Bu amaçla, 63 mg amonyum format, 1 L su içinde çözülmüş ve pH, formik asit ile 3'e ayarlanmıştır. Mobil faz B'nin hazırlanması için ise, 50 ml mobil faz A, 950 ml ACN ile karıştırılmış ve daha sonra pH, formik asit ile 3'e ayarlanmıştır. Mobil faz, Çözücü A ve Çözücü B'den oluşmaktadır ve gradient sistemle verilmiştir. Optimize edilmiş HPLC parametreleri Tablo 3.2.'de gösterilmektedir.

Tablo 3.2. HPLC Parametreleri.

Parametre	Değer	Ayar-Ortam	Birim
Toplam Akış	İkili gradyen	İkili gradiyent	ml/dk
Pompa A basıncı	115	-	Bar
Pompa B basıncı	112	-	Bar
Pompa A Gazdan Arındırma	-94	-	kPa
Fırın Sıcaklığı	45	45	C
Nebülize Gaz Akışı	3,0	3,0	L/dk
Kurutma Gaz Akışı	15,0	15,0	L/dk
DL Sıcaklık	250	250	C
Isı Bloğu Sıcaklığı	450	450	C
CID Gaz	230	230	kPa
Oda Sıcaklığı	29	-	C
IG Vakum	7,4e -	003	Pa
PG Vakum	7,3e +	001	Pa

3.7.2. MS/MS Kaynak Ayarlarının Optimizasyonu

MS/MS, pozitif iyon modunda ESI ara yüzünü ve seçici iyon izlemine (SIM) içerir. Optimize edilmiş parametre özetleri Tablo 3.3.'te verilmiştir.

Tablo 3.3. Kütle Spektrometre Parametreleri.

Parametre	Optimize Edilmiş Ayar Değeri
IG vakum	1,4e -
Dedektör voltajı	0,0 kV
Sıcaklık limiti	85°C
DL sıcaklık	250°C
Nebülize gaz akışı	3,0 L/min
Isı bloğu	450°C

MS/MS'de triol ve 7-KC'nin saptanmasını kolaylaştırmak için, oksisteroller DMG esterlerine dönüştürülmüştür. Bu şekilde oksisterollerin cevabının artması ve çarpışma hücrelerinde etkin bir şekilde ayrılmaları söz konusu olmuştur. 7-KC ve K-triolün çoklu reaksiyon izleme (*The multiple reaction monitoring*, MRM) kütle geçişleri Tablo 3.4.'de gösterilmiştir.

7-KC için ana iyon 486,0 (m/z)'dir ve 7-KC-D7 için ana iyon 493,0 (m/z)'dir. Triol ve triol-D7 için ana iyon sırasıyla 591,5 (m/z) ve 598,5 (m/z)'dir.

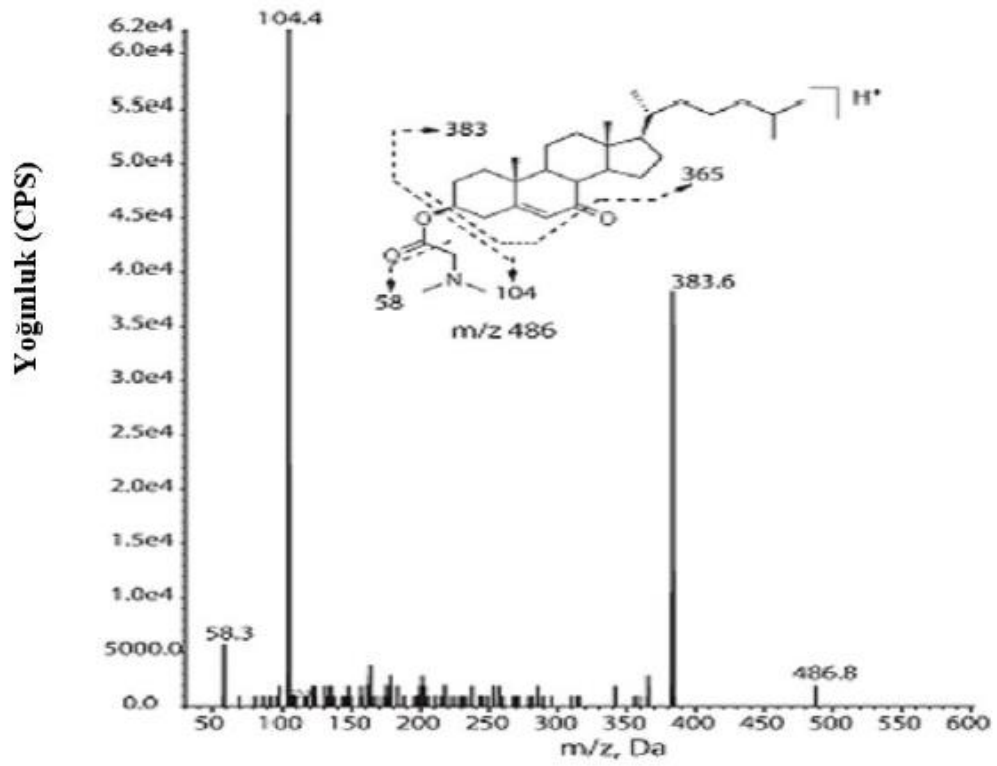
Ürün iyonları aşağıdaki gibidir:

- m/z 104: protonlanmış DMG
- m/z 383: DMG'nin kaybından kaynaklanan oksisterol parçası
- m/z 488,5: DMG'nin kaybından kaynaklanan oksisterol parçası

Tablo 3.4. 7-KC ve triol'ün kütle geçişleri.

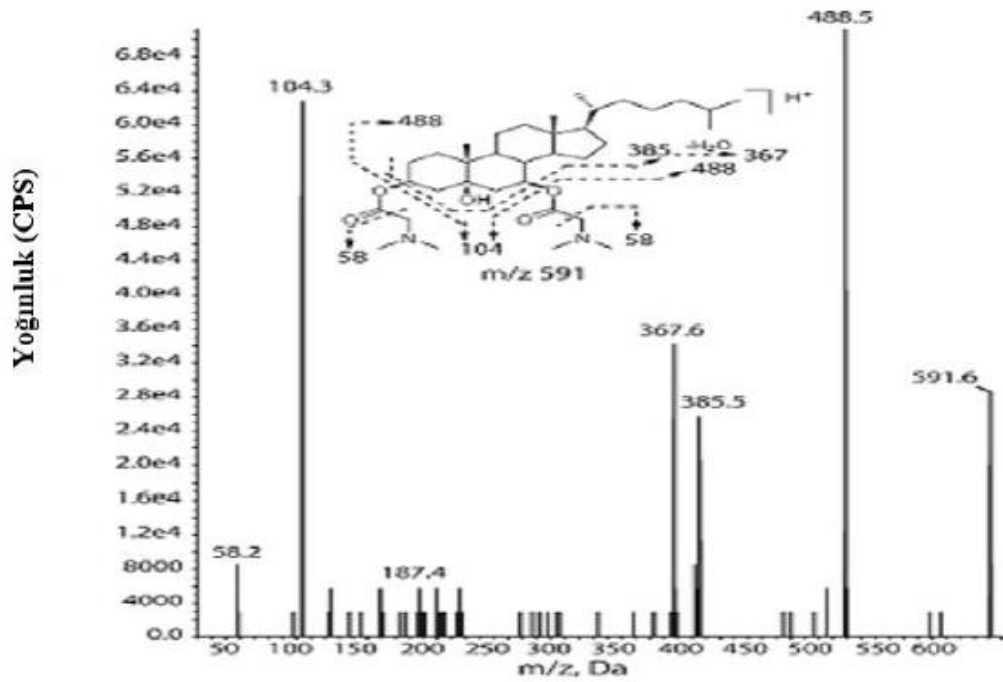
DMG türevlendirmeler	Ana iyon	Ürün iyon
7-KC	486,0	104
	486,0	383
7-KC D7	493,0	104
Triol	591,5	104
	591,5	488,5
Triol D7	598,5	104

Oksisterol-DMG türevleri için MRM kütle geçişleri m/z 591,5 → 104 (nicelikçi) ve triol için m/z 486 için 591,5 → 488,5 (niteleyici) ve 7-KC için m/z 486 → 383 (nicelikçi) ve 486 → 104 (niteleyici) olarak belirlenmiştir. Şekil 3.2. çarpışmayla oluşan 7-KC'nin DMG türevlerinin ürün iyon spektrumlarını ve parçalanma paternini göstermektedir. Tüm plazma örneklerinin analizleri, standartlarla aynı retansiyon süresinde yapılmış ve 7-KC ile triol piklerini vermiştir.



Şekil 3.2. 7-KC'nin DMG türevinin ürün iyon spektrumu ve parçalanma modeli (273).

Şekil 3.3.'de triol'ün çarpışma türevleri DMG'nin ürün iyon spektrumları ve parçalanma modeli gösterilmektedir.



Şekil 3.3. Triol'ün DMG türevinin ürün iyon spektrumu ve parçalanma modeli (273).

3.8. Sfingozin-1-Fosfat Analizi

S1P, plazma zarının oluşumundaki rolünün yanı sıra sayısız fizyolojik ve hücresel süreçte rol oynayan önemli bir sfingolipid metabolitidir. Vasküler gelişim, hücre büyümesi, apoptozis, adezyon, migrasyon, invazyon, enflamasyon ve bağışıklık üzerine etkilerinin olduğu bilinmektedir (238).

S1P'nin hücre büyümesini düzenlemesi ve apoptozisi indüklemesi ile hastalıkların yol açtığı sinyal yolları ve fizyolojik proseslerde rol oynadığının keşfedilmesi, araştırmacıları S1P'i biyoaktif lipid mediyatör olarak araştırmaya sevk etmektedir (236, 237).

Numunelerin Hazırlanması

Temiz ependorflara 100 µl hasta ve kontrol plazmalarından alınmış ve üzerlerine 500 µl hazırlanan internal standarttan eklenmiştir. 1 dakika vortekslendikten sonra 5 dakika 5000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Santrifüjat viallere aktararak kullanılmıştır.

Miktar Tayini Prosedürü

Ekstraksiyon için 100 µl plazma içerisine 500 µl metanol eklenerek vortekslenmiştir. Ardından 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve daha sonra süpernatandan 20 µl cihaza enjekte edilmiştir. S1P ölçümü Agilent 6420 LC-MS/MS cihazı kullanılarak, protein ve peptit karışımlarını iyonlaştırmak için tercih edilen iyonlaştırma sistemi olan ESI metodu ve pozitif iyon modu ile gerçekleştirilmiştir.

- ✓ Çalışmada ACE C18 (50 mm x 4.6 mm x 5 µm) kolonu kullanılmıştır. Kolon fırın sıcaklığı 30°C'ye ayarlanmıştır.
- ✓ Mobil faz olarak çözücü A distile su içinde 10 mM Amonyum Asetat + %0,01 Formik Asit çözeltisi, çözücü B olarak metanol içinde %0,01 Formik Asit çözeltisi kullanılmıştır.
- ✓ Çalışmada gradient metod kullanılmıştır. 0,5 dakika %60, 1, 1-2, 9 dakika arası %90, ve 4-8 dakika arası %60 olacak şekilde düzenlenmiş ve akış 0,5 ml/dk olacak şekilde kullanılmıştır. S1P deney yöntemi özet olarak Tablo 3.5.'de gösterilmektedir.
- ✓ S1P ana m/z değeri 380,2, bundan elde edilen Q3 m/z değeri ise 264,3 olarak bulunmuştur. Fragmentor voltaj 90 V olarak uygulanmıştır.
- ✓ S1P standartı metanol içerisinde seri dilüsyonları ile sekiz seviyeli 0,312 - 0,625 - 1,25- 2,5 - 5 - 10 - 20 - 40 ng/ml kalibrasyonu yapılmıştır. r2 değeri 0,999 olarak saptanmıştır.

Tablo 3.5. Sfingozin-1-Fosfat deney yöntemi.

Cihaz	Agilent 6420 LCMS/MS		
Kolon	ACE C18 (50 mm x 4,6 mm x 5µm)		
Kolon Sıcaklığı	30°C		
Mobil Faz	Çözücü A (distile su içinde 10 mM Amonyum Asetat + %0,01 Formik Asit çözeltisi) Çözücü B (metanol içinde %0,01 Formik Asit çözeltisi)		
Gradyent Tablosu	Zaman (dk)	Çözücü A	Çözücü B
	0	% 40	%60
	0,5	% 40	%60
	1,1	%10	%90
	2,9	%10	%90
	4	%40	%60
	8	%40	%60
	Akış Hızı	0,5 ml/dk	
Enjeksiyon Hacmi	20 µl		
Süre	8 dk		

İstatiksel Analiz

İstatistiksel analizler Windows Sürüm 22.0 için paket program IBM SPSS'de gerçekleştirilmiştir. Değişkenlerin normal dağılıma sahip olup olmadığını incelemek için Kolmogorov Smirnov testi kullanılmıştır. Gruplar arasında sayısal değişkenler arasında fark olup olmadığı belirlemek için Bağımlı Örneklerde T Test (paired samples T test) kullanılmıştır.

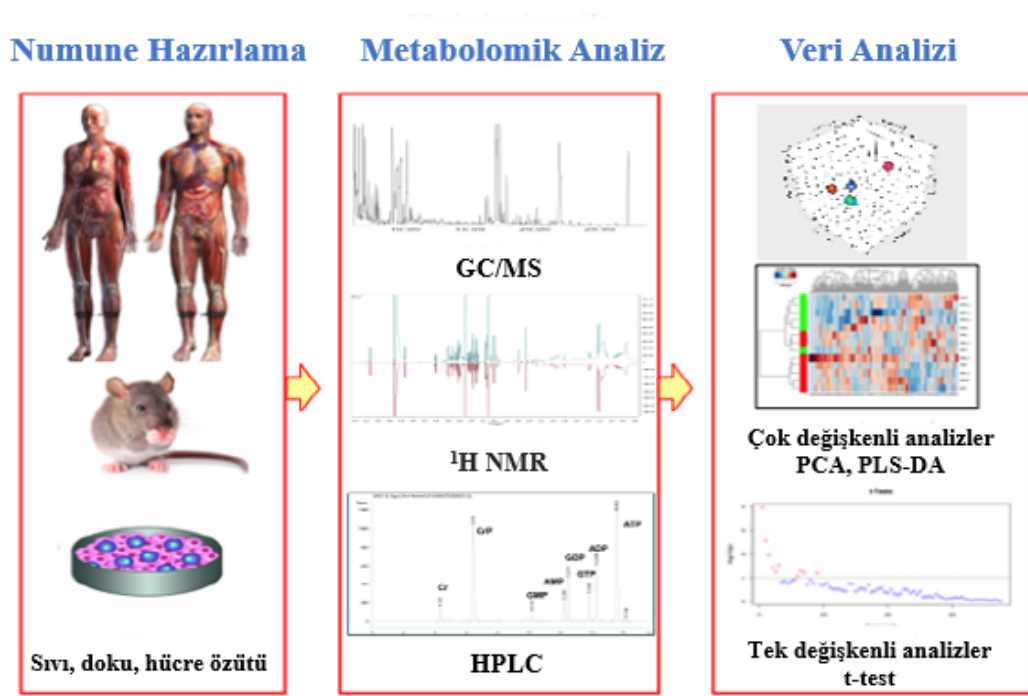
Tüm veriler ortalama \pm standart sapma (SS) olarak ifade edilmiştir. Bütün karşılaştırmalarda, p değerlerinin 0,05'ten küçük olması anlamlı kabul edilmiştir.

3.9. Metabolomik Analizi

Metabolomik analiz, metabolomdaki küçük moleküllü metabolitlerin spektroskopi, kromatografi gibi yüksek verimli teknolojiler kullanılarak saptanması, miktarının belirlenmesi ve tanımlanmasıdır (31).

Organizmanın genetik değişiklik, hastalık ve çevresel değişikliklere verdiği en son yanıt metabolomdaki değişikliklerdir. Bunun sonucu olarak hücrenin veya dokunun fenotipi tanımlanabilir (32). Metabolomik çalışmalar bu özelliği ile kişiselleştirilmiş ve öngürülebilir canlı sağlığına olanak sağlamaktadır (263).

Metabolomik analizler Şekil 3.4.'de gösterildiği gibi numune hazırlama, metabolitlerin analizi ve elde edilen verilerin analizleri olmak üzere başlıca üç aşamadan oluşmaktadır.



Şekil 3.4. Metabolomik analiz basamakları (255).

3.9.1. Numunelerin hazırlanması

Türevlendirme Öncesi

-80°C’de saklanan 100 µL’lik plazma numuneleri, analizden hemen önce derin dondurucudan çıkarılmış ve buz üzerinde çözülmüştür. Ardından üzerlerine önceden hazırlanan miristik asit-D27 iç standartından 5 µl eklenmiştir. Numunelerin üzerine 900 µL soğuk metanol:su karışımı (8:1, h/h) da eklenerek proteinlerin çökmesi sağlanmış ve 1 dakika vortekslenildikten sonra buz üzerinde 10 dakika bekletilmiştir. Bekletilen numuneler daha sonrasında 10000 rpm’de 10 dk santrifüjlenmiş ve 400 µL supernatant her bir numune için ayrı ependorflara alınarak vakumlu santrifüjde kuruluğa kadar uçurulmuştur.

Türevlendirme

Numunelerdeki çözeltilerin tamamen uçurulduğundan emin olunduktan sonra N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroasetamid + %1 Klorotrimetilsilan (MSTFA + %1 TMCS) ile türevlendirme işlemine geçilmiştir.

Numuneler oda sıcaklığına ulaştıktan sonra metoksimasyon reaksiyonu için üzerlerine 20 µl metoksiamin (20 mg/ml piridinde) çözeltisi eklenerek 30°C’lik etüvde 90 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda oda sıcaklığına gelmeleri beklenmiş ve sililasyon reaksiyonu için 80 µl MSTFA + 1% TMCS eklenerek 37°C’lik etüvde 30 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda reaksiyon karışımından alınarak 50 µl analiz için GS-MS viallerine transfer edilmiştir.

3.9.2. GC-MS Parametreleri

Türevlendirilen numunelerin analizi Shimadzu GC-MS-QP2010 cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak Helium 1 ml/dak kullanılmıştır. Analizler DB5-MS (95% dimetil / 5% dimetil polisioksan) kolon (30 m uzunluğunda; 0.25 mm i.d.; 0.25 µm film kalınlığında, Agilent) ile fırını sıcaklık programlanması (1 dakika 60 °C’de tutulduktan sonra dakikada 10°C artarak 325 °C’ye yükselmiş ve 10 dakika bu sıcaklıkta kaldıktan sonra 60 °C’ye soğutulmuştur) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Cihazın toplam çalışma süresi 37,5 dakikadır. Kütle analizleri tarama modunda

gerçekleştirilmiştir. Tarama modu için MS parametreleri: MSD transfer hattı sıcaklığı: 290°C, Elektron impact iyonizasyon 70 eV, Filament sıcaklığı 230 °C, Kuadrupol sıcaklığı 150 °C, tarama aralığı 50-600 dalton ve 2 spektra/s, analizde solvent gecikme zamanı 5.90 dakikadır. GC-MS için çalışma koşulları Tablo 3.6'da ayrıca özetlenmiştir.

Tablo 3.6. GC-MS için çalışma koşulları.

Cihaz	Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra
Kolon	DB5-MS kolon (30 m +10 m ön kolon; 0,25 mm iç çap ve 0,25 µm film kalınlığı)
Fırın sıcaklık programı	60 °C (1 dk), 10 °C/dk ile 325 °C ulaşılır. 10 dk beklenir ve 60 °C'ye soğutulur.
Analiz süresi	37,5 dk
Enjeksiyon hacmi	1 µl (1:10 bölmeli)
Taşıyıcı gaz	Helyum 1 mL/dk
MSD transfer bölmesi sıcaklığı	290°C
Çözücü delay süresi	5,90 dk
Kütle aralığı	50-650 dalton

3.9.3. Veri analizi

Veri toplama Shimadzu LabSolution yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen kompleks kromatogramlar MS-DIAL programı ile ayrıştırılmış ve piklerin alıkonma zamanları düzeltilmiş ve veri matrisleri oluşturulmuştur. Elde edilen metabolit pikleri alıkonma indeksli kütüphaneler kullanılarak (Fiehn ve Golm Database kütüphaneleri) aydınlatılmıştır.

GC-MS temelli metabolomik analizler sonucunda elde edilen veri matrisi iç standarta göre normalize edilmiştir. Data verilerindeki eksik değerler, metabolit grubu içindeki en küçük derişimin yarı değeri ile doldurulmuştur. Daha sonra bu veri matrisleri SIMCA-P+ 13 (İsviçre) programına aktararak temel bileşenler analizi

(PCA) ve en küçük kareler farklılaştırma analizi (PLS-DA) yöntemleri ile grupların ayrılmasında önemli olan metabolitler ve regresyon katsayıları bulunmuştur.

PCA analizler veri setinde herhangi bir sistemik hata ve aykırı bir veri olup olmadığını görselleştirmek için kullanılmıştır. Eğer veride herhangi bir problem yoksa PLS-DA analizlerle veri grupları birbirinden ayrılarak veriler hakkında daha detaylı bilgiler alınmıştır. PLS-DA analizlerindeki farklılaştırmaya neden olan metabolitlerin bulunması için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır. En yüksek VIP değerine sahip metabolit ayırma en büyük etkiye sahip metabolittir. Dolayısıyla belirlenen gruplar arasında istatistiksel olarak en farklılık gösteren metabolittir ve bu metabolitler belirteç olarak değerlendirilmiştir. VIP grafiklerinden önemli olan metabolitler bulunmasına rağmen hangi grup içinde hangi metabolitin derişiminin arttığı veya azaldığı regresyon analizi sonucunda elde edilen katsayılarla verilmiştir.

Farklı bulunan metabolit konsantrasyonlarının istatistiksel karşılaştırmasında parametrik bağımlı *t* test kullanılmıştır. Elde edilen metabolitler ile en son olarak Metaboanalyst 3.0 analiz programı kullanılarak yolak analizleri yapılmıştır.

3.9.4. Metabolomik Yöntemlerin Validasyon Çalışmaları

Hedeflenmemiş metabolomik analizlerde validasyon çalışmaları tüm metabolitler için standart bulunamadığından kalite kontrol numuneleri (QC) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm plazma örnekleri kullanılarak numune havuzu oluşturulmuş, bu numune havuzu eşit parçalara bölünerek QC olarak kullanılmıştır.

Bu çalışmamızda kullanılan tüm plazma örneklerinin hepsinden 100 µl alınarak bir havuz oluşturulmuş ve bu havuzdan toplamda 10 tane QC numunesi hazırlanmıştır. Deney prosedürü aynen bu numunelere de uygulanmış ve elde edilen QC numunelerinin aynı gün ve farklı günlerde analizleri yapılarak yöntemlerin günler içi ve günler arası doğruluk ve tekrarlanabilirlik çalışmaları değerlendirilmiştir. Böylece QC temelli validasyon çalışmaları ile analiz sırasında meydana gelebilecek olası hatalarda en aza indirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grubuna Ait Demografik Bulgular

Çalışmamızda yer alan Pb işçilerinden oluşan hasta grubunun tamamı Ankara ve çevresinde yaşayan, benzer iş kollarında çalışan ve yaşam standartları birbirine benzeyen kişiler arasından seçilmiştir. Çalışma grubumuzun tamamı erkeklerden oluşmaktadır. Çalışmada yer alan hasta grubu akü üretimi, metal endüstrisi, madencilik ve PVC boru üretim alanları gibi Pb maruziyeti açısından risk oluşturan iş sektörlerinde çalışan bireylerden oluşmaktadır.

Çalışma grubunun yaş ortalaması $36 \pm 7,6$ yıl olarak belirlenmiştir. Hasta grubunun %59,5'i (25 kişi) sigara kullanmakta ve %40,5'i (17 kişi) sigara içmemektedir. Bu grupta bulunan bireyler çalışma süresine göre sınıflandırıldığında %48,9'unun 16 yıl veya daha fazla, %23,4'ünün 11-15 yıl, %12,8'inin 6-10 yıl ve %14,9'unun 1-5 yıl süreyle çalıştığı görülmektedir.

Çalışma grubunun %52,4'ü akü sanayisinde, %15'i metal üretim endüstrisinde, %7,1'i PVC fabrikasında ve %4,8'i ise madende çalışmaktadır. Çalışmamızda yer alan bireylerin çalışma alanlarına ait bulgular Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Kurşun maruziyeti olan işçilerin çalışma alanları.

Çalışma Alanları	
Pb İşçisi (n=42)	
Akü Üretim Tesisi	22 (%52,4)
Metal Üretim Endüstrisi	15 (%35,7)
PVC Boru Fabrikası	3 (%7,1)
Madencilik	3 (%4,8)

4.2. Çalışma Grubuna Ait Klinik Bulgular

Kurşun maruziyeti olan işçilerden şelasyon öncesi ve sonrasında toplanan plazma örneklerinde ölçülen kan Pb düzeyleri ve idrar Pb düzeyleri ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiş olup şelasyon tedavisi öncesinde kan Pb düzeyleri

60,7±28,1µg/dl sonrasında ise 24,5±11,4µg/dl olarak; idrar Pb düzeyleri şelasyon tedavisi öncesinde 208,3±247,5µg/dl sonrasında ise 113,02±85,9*µg/dl olarak ölçülmüştür. Ayrıca ALT ve AST düzeylerinin de şelasyon sonrasında yükseldiği görülmüştür. Söz konusu farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (*p<0,05). Aynı zamanda böbrek parametreleri de değerlendirilmiş, şelasyon tedavisi uygulanması ile bir değişiklik saptanmamıştır. Söz konusu klinik parametreler Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Çalışma grubuna ait şelasyon tedavisi öncesi ve sonrası klinik parametrelerindeki değişimler

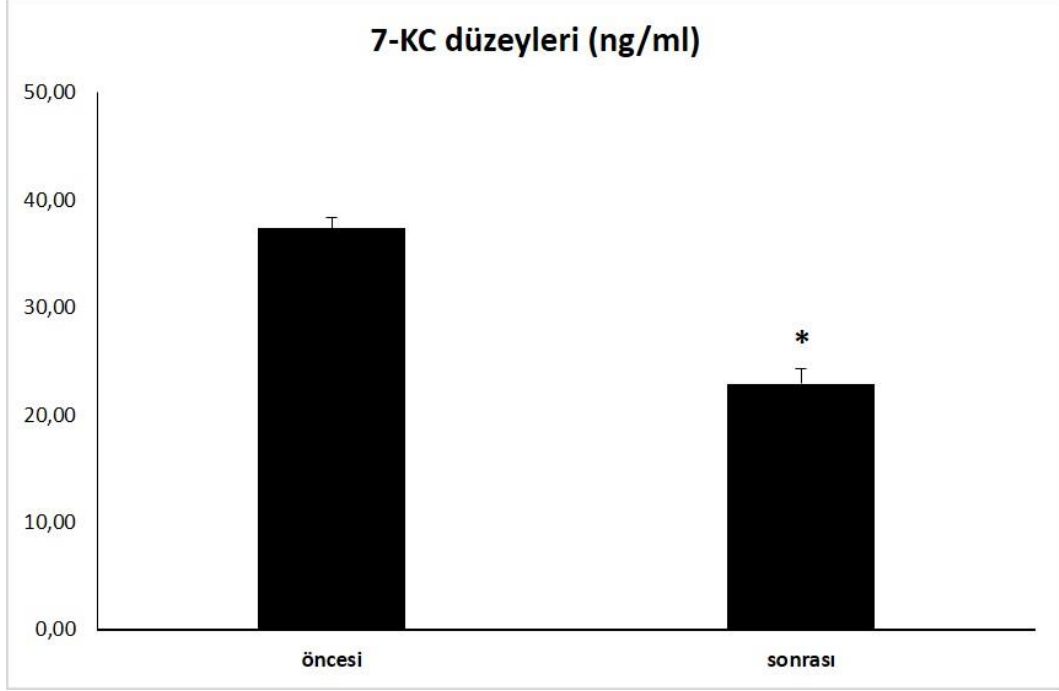
Klinik Parametre	Öncesi	Sonrası
Glomerüler Filtrasyon Hızı (ml/min)	115,0±9,6	114,4±10,1
Kan Üre Azotu (mg/dl)	12,8±3,9	11,2±3,2
Ürik Asit (mg/dl)	5,1±1,0	5,1±1,1
Kreatinin (mg/dl)	0,8±0,1	0,8±0,1
Hemoglobin Düzeyi (g/dl)	15,7±1,2	15,6±0,9
Aspartat Aminotransferaz (AST, U/L)	18,5±4,3	22,8±11,3*
Alanin Aminotransferaz (ALT, U/L)	24±10,1	33,0±21,9*
İdrar Pb Düzeyi (µg/dl)	208,3±247,5	113,02±85,9*
Kan Pb Düzeyi (µg/dl)	60,7±28,1	24,5±11,4*

*p<0.05

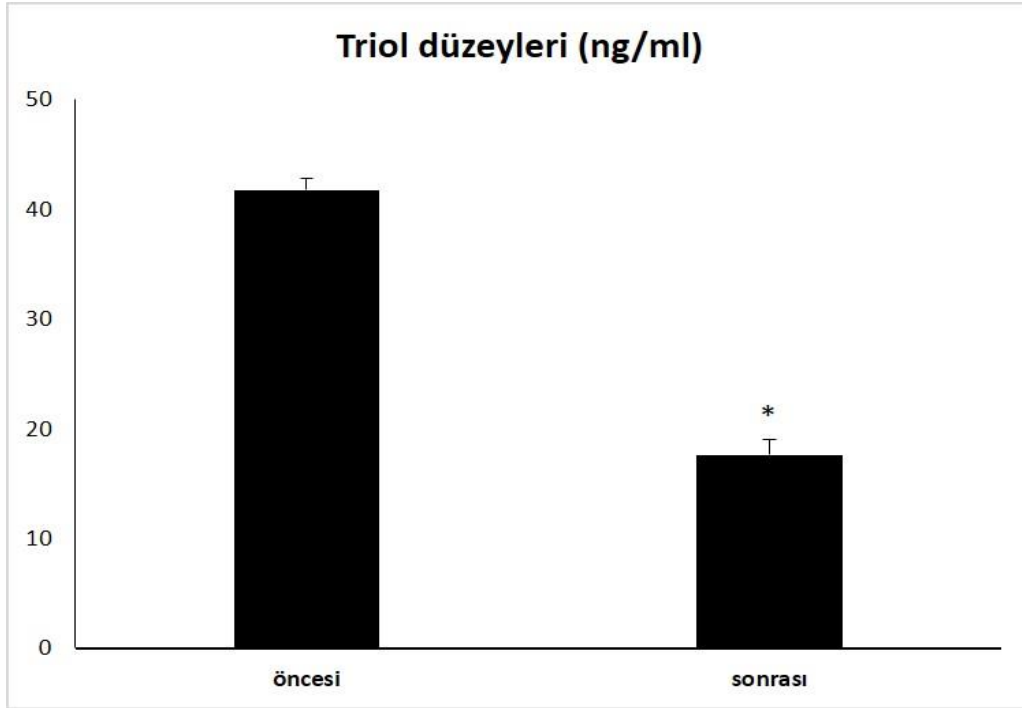
4.3. Plazma 7-Ketokolesterol ve 3β, 5α, 6β Trihidroksi Kolestan Düzeyleri

Kurşun maruziyeti olan işçilerden şelasyon öncesi ve sonrasında toplanan plazma örneklerinde LC-MS/MS ile 7-KC ve triol düzeyleri ölçülmüş ve istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Pb zehirlenmesi görülen hastaların plazma 7-KC düzeyleri ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiş olup şelasyon tedavisi öncesinde 37,35 ± 2,53 ng/ml sonrasında ise 22,91 ± 4,49 ng/ml olarak ölçülmüştür. Hastaların plazma triol düzeyleri de ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiş olup şelasyon tedavisi öncesinde 41,81 ± 2,54 ng/ml sonrasında ise 17,64 ± 3,42 ng/ml şeklinde ölçülmüştür.

Elde edilen sonuçlar, oto-oksidasyonla oluşan her iki oksisterol türevinin de düzeylerinin şelasyon tedavisi alan Pb işçilerinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığını göstermektedir ($p < 0,001$). Sonuçlar, Şekil 4.1., Şekil 4.2. ve Tablo 4.3.'de özetlenmiştir.



Şekil 4.1. Şelasyon öncesi ve sonrasında plazma 7-KC düzeylerinin (ng/ml) karşılaştırılması (* $p < 0,001$).



Şekil 4.2. Şelasyon öncesi ve sonrasında plazma triol düzeylerinin (ng/ml) karşılaştırılması (*p<0,001).

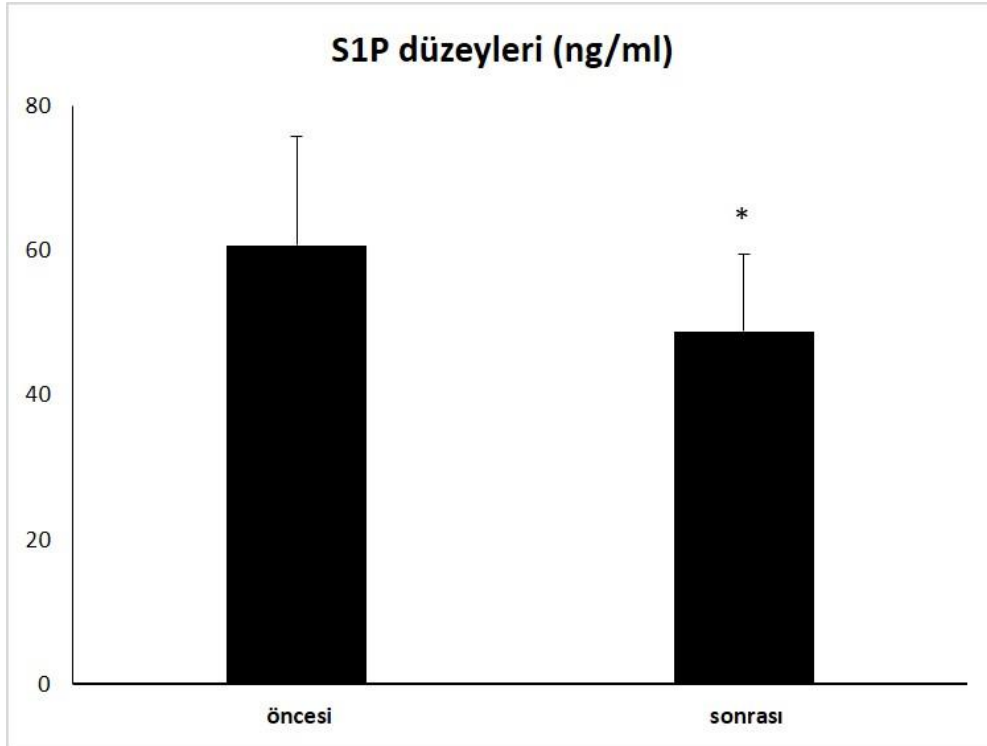
Tablo 4.3. Şelasyon öncesi ve sonrasında plazma triol düzeylerinin (ng/ml) karşılaştırılması (*p<0,001).

	Öncesi	Sonrası
7-KC (ng/ml)	37,35 ± 2,53	*22,91± 4,49
Triol (ng/ml)	41,81 ± 2,54	*17,64 ± 3,42

*p<0,001 (Değişkenler, Ortalama ± SS ile belirtilmiştir).

4.4. Sfingozin-1-Fosfat LC-MS/MS Yöntemine İlişkin Bulgular

Hücre zarının akışkanlığının düzenlenmesinde önemli yapısal rol oynayan sfingolipidlerden biri olan S1P parametresi de bu tez kapsamında değerlendirilmiştir. Pb zehirlenmesi görülen hastaların plazma S1P düzeyleri ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiş olup şelasyon tedavisi öncesinde $60,76 \pm 15,03$ ng/ml sonrasında ise $48,79 \pm 10,75$ ng/ml olarak ölçülmüştür. Söz konusu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. (*p<0,001) Sonuçlar Şekil 4.3 ve Tablo 4.4'de özetlenmiştir.



Şekil 4.3. Kurşun işçilerine ait plazma S1P düzeylerinin (ng/ml) şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında karşılaştırılması, *p<0,001.

Tablo 4.4. Kurşun işçilerine ait plazma S1P düzeylerinin (ng/ml) şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında karşılaştırılması, *p<0,001.

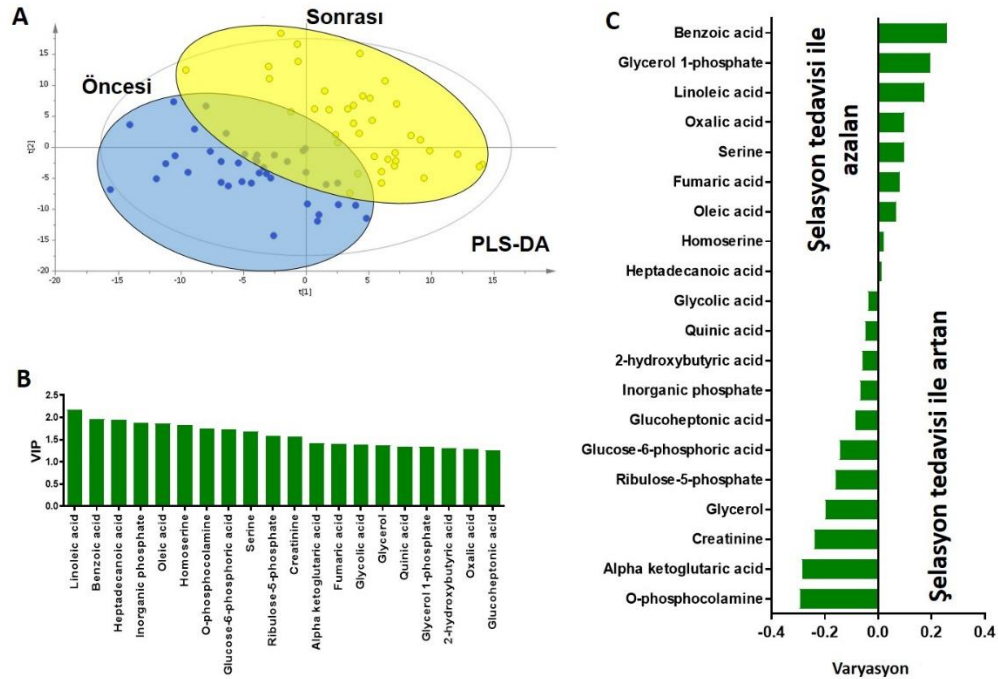
	Öncesi	Sonrası
S1P (NG/ML)	60,76 ± 15,03	*48,79 ± 10,75

* p<0,001 (Değişkenler, Ortalama ± SS ile belirtilmiştir).

4.5. Metabolomik Analizine İlişkin Bulgular

Kurşun maruziyeti olan 42 işçiden oluşan çalışma grubuna ait şelasyon tedavisi uygulaması öncesi ve sonrasına bağlı olarak değişen metabolomik profilleri GC-MS yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen metabolomik veriler birleştirilerek bütünleşik omik (entegre omiks) verisi elde edilmiş ve bu veri matrisi çok değişkenli veri analizleri ile incelenmiştir. Aykırı değerler uzaklaştırıldıktan sonra PLS-DA analizleri her iki hücre hattına ait bütünleşik omik verisinde bir arada ve ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. PLS- DA analizlerindeki farklılaşmaya neden olan metabolitlerin belirlenmesi için VIP (projede önemli değişken) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.4.A,B,C). Elde edilen bulgular şelasyon tedavisinin öncesi ve sonrasında bazı

metabolik profillerin değiştiğini ortaya koymuştur. Bunlar arasında, VIP grafiğinde başlıca bu metabolitlerin 20 tanesi sıralanmıştır. Bunlar arasında linoleik asit, heptadekanoik asit, oleik asit gibi önemli yağ asitlerinin de bulunduğu metabolitler yer almaktadır.



Şekil 4.4. Şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasına ait metabolomik verilerine ait çok değişkenli veri analiz. **A)** PLS-DA skor grafiği **B)** Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği **C)** Şelasyon tedavisi ile artan veya azalan metabolitlerin değişim yönünü gösteren regresyon katsayısı grafiği; PLS-DA: Kısmi En Küçük Kareler Farklılaştırma Analizi, VIP: Projede önemli değişken.

GC-MS yöntemi ile veri tabanında yer alan toplam 152 metabolit tanımlanmıştır. Bu metabolitlerden 17 tanesinin iki grup arasında anlamlı olarak farklı olduğu görülmüştür ($p < 0.05$) (Tablo 4.5.). Bu metabolitler aşağıda verilmiştir:

- Alfa ketoglutarik asit
- Benzoik asit
- Sitrik asit
- Kreatinin
- Fukoz
- Fumarik asit
- Glukoz-6-fosforik asit
- Heptadekanoik asit
- Linoleik asit
- Miyo-inositol
- N-asetil-D-triptofan
- N-asetil-L-glutamik asit
- Oleik asit
- O-fosfokolamin
- Ribitol
- Ribuloz-5-fosfat
- Serin

Tablo 4.5. GC-MS analizi sonucunda şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında tanımlanan metabolitler ve bağıl derişimleri.

	Metabolit	Öncesi (Ortalama*±SS)			Sonrası (Ortalama*±SS)			P değeri**
			±			±		
1	1-heksadekanol	0,066	±	0,001	0,070	±	0,003	0,194
2	2-amino-1-feniletanol	0,719	±	0,041	0,651	±	0,044	0,197
3	2-bütün-1,4-diol	0,058	±	0,004	0,058	±	0,003	0,992
4	2-hidroksibütirik asit	0,476	±	0,025	0,408	±	0,030	0,054
5	2-ketobütirik asit	0,053	±	0,004	0,051	±	0,003	0,695
6	2-ketokaproik asit	0,032	±	0,005	0,059	±	0,022	0,247
7	2-ketoizokaproik asit	0,090	±	0,008	0,090	±	0,007	0,989
8	2-keto-L-gulonik asit	0,104	±	0,018	0,104	±	0,013	0,986
9	3-aminopropiyonitril	0,406	±	0,011	0,374	±	0,014	0,079
10	3-hidroksiopropanoik asit	0,170	±	0,011	0,188	±	0,015	0,059
11	3-indolasetik asit	0,197	±	0,038	0,182	±	0,017	0,618
12	3-indolelaktik asit	0,098	±	0,005	0,092	±	0,006	0,278
13	3-metil-2-oksobutanoik asit	0,044	±	0,002	0,041	±	0,002	0,208
14	3-metil-L-histidin	0,013	±	0,001	0,023	±	0,010	0,315
15	3-metiloksiindol	0,038	±	0,001	0,038	±	0,002	0,896
16	3-fenillaktik asit	0,009	±	0,001	0,009	±	0,001	0,320
17	3-fosfogliserik asit	0,011	±	0,002	0,010	±	0,002	0,557
18	4-hidroksi-L-prolin	0,230	±	0,012	0,252	±	0,026	0,408
19	4-hidroksifenilasetik asit	0,026	±	0,001	0,025	±	0,001	0,653
20	4-piridoksik asit	0,004	±	0,000	0,012	±	0,005	0,164
21	6-deoksi-D-glikoz	0,065	±	0,005	0,062	±	0,004	0,490
22	6-hidroksiheksanoik asit	0,037	±	0,005	0,029	±	0,002	0,114
23	6-fosfoglukonik asit	0,077	±	0,004	0,081	±	0,004	0,459
24	Alanin	0,805	±	0,064	0,765	±	0,056	0,499
25	Alloz	0,617	±	0,008	0,615	±	0,017	0,898
26	Alfa ketoglutarik asit	0,114	±	0,008	0,123	±	0,010	0,045
27	Alfa tokoferol	0,582	±	0,029	0,592	±	0,028	0,728
28	Alfa-glukozamin 1-fosfat	0,741	±	0,034	0,704	±	0,039	0,058
29	Altroz	0,343	±	0,004	0,347	±	0,010	0,575
30	Arabitol	0,028	±	0,001	0,029	±	0,001	0,477
31	Araşidik asit	0,029	±	0,001	0,028	±	0,001	0,222
32	Arbutin	0,003	±	0,001	0,002	±	0,000	0,513
33	Aspartik asit	0,106	±	0,006	0,093	±	0,006	0,093
34	Behenik asit	0,012	±	0,000	0,011	±	0,001	0,111

Tablo 4.5. (Devam) GC-MS analizi sonucunda şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında tanımlanan metabolitler ve bağıl derişimleri.

35	Benzoik asit	0,063	±	0,001	0,056	±	0,002	0,003
36	Beta-alanin	0,053	±	0,007	0,055	±	0,006	0,837
37	Beta-gliserofosfat	0,155	±	0,004	0,145	±	0,005	0,206
38	Kaprik asit	0,056	±	0,003	0,058	±	0,004	0,564
39	Kaprilik asit	0,048	±	0,002	0,049	±	0,003	0,726
40	Selobiyoz	0,018	±	0,001	0,017	±	0,001	0,619
41	Kolesterol	0,879	±	0,012	0,860	±	0,023	0,339
42	Kolik asit	0,001	±	0,000	0,001	±	0,000	0,968
43	Sitrakonik asit	0,034	±	0,001	0,032	±	0,002	0,584
44	Sitrik asit	0,401	±	0,015	0,355	±	0,018	0,036
45	Sitrülin	0,013	±	0,003	0,023	±	0,006	0,131
46	Kreatinin	0,462	±	0,028	0,542	±	0,046	0,038
47	Sistin	0,032	±	0,003	0,036	±	0,002	0,283
48	Sitidin	0,048	±	0,003	0,044	±	0,002	0,184
49	Dehidroaskorbik asit	0,546	±	0,033	0,548	±	0,055	0,980
50	Epsilon-kaprolaktam	0,201	±	0,012	0,200	±	0,014	0,924
51	Fukoz	0,037	±	0,002	0,032	±	0,002	0,038
52	Fumarik asit	0,111	±	0,005	0,094	±	0,005	0,014
53	Galakturonik asit	0,188	±	0,016	0,197	±	0,016	0,538
54	Glukoheptonik asit	0,239	±	0,010	0,266	±	0,013	0,057
55	Glukonik asit	0,112	±	0,012	0,098	±	0,007	0,152
56	Glukonik asit lakton	0,190	±	0,007	0,176	±	0,009	0,177
57	Glukozaminik asit	0,103	±	0,015	0,098	±	0,010	0,625
58	Glukoz	0,341	±	0,005	0,345	±	0,011	0,665
59	Glukoz-6-fosforik asit	0,013	±	0,001	0,016	±	0,001	0,031
60	Glutamik asit	0,528	±	0,031	0,472	±	0,030	0,109
61	Gliseraldehit	0,123	±	0,004	0,139	±	0,012	0,199
62	Gliserik asit	0,065	±	0,002	0,065	±	0,004	0,949
63	Gliserol	0,376	±	0,008	0,377	±	0,013	0,946
64	Gliserol 1-fosfat	0,019	±	0,002	0,016	±	0,000	0,077
65	Glisin	0,954	±	0,039	0,891	±	0,044	0,160
66	Glikolik asit	0,030	±	0,001	0,031	±	0,001	0,364
67	Heptadekanoik asit	0,028	±	0,001	0,024	±	0,001	0,003
68	Homoserin	0,120	±	0,005	0,132	±	0,006	0,139
69	Hidrokinon	0,006	±	0,001	0,006	±	0,001	0,882
70	Hipotaurin	0,010	±	0,001	0,009	±	0,001	0,392
71	İnorganik fosfat	0,055	±	0,003	0,062	±	0,003	0,090

Tablo 4.5. (Devam) GC-MS analizi sonucunda şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında tanımlanan metabolitler ve bağıl derişimleri.

72	İnosin	0,022	±	0,008	0,011	±	0,004	0,272
73	İzolösin	0,801	±	0,036	0,783	±	0,037	0,712
74	İzomaltoz	0,010	±	0,006	0,009	±	0,003	0,835
75	İtakonik asit	0,032	±	0,001	0,032	±	0,002	0,800
76	Kinürenin	0,004	±	0,001	0,004	±	0,001	0,610
77	Laktamid	0,115	±	0,023	0,310	±	0,156	0,219
78	Laktik asit	0,512	±	0,020	0,483	±	0,025	0,300
79	Laktobionik asit	0,029	±	0,002	0,030	±	0,001	0,633
80	Laktoz	0,030	±	0,004	0,032	±	0,005	0,670
81	Laktuloz	0,012	±	0,000	0,011	±	0,001	0,110
82	Laurik asit	0,046	±	0,002	0,051	±	0,006	0,417
83	Lösin	0,611	±	0,070	0,599	±	0,057	0,864
84	Linoleik asit	0,221	±	0,010	0,171	±	0,008	0,000
85	Lizin	0,857	±	0,034	0,852	±	0,042	0,930
86	Liksoz	0,033	±	0,004	0,024	±	0,004	0,091
87	Maleik asit	0,059	±	0,001	0,059	±	0,002	0,940
88	Malik asit	0,060	±	0,003	0,061	±	0,003	0,705
89	Malonamid	0,051	±	0,004	0,053	±	0,003	0,470
90	Maltitol	0,016	±	0,001	0,015	±	0,001	0,317
91	Maltoz	0,210	±	0,018	0,194	±	0,013	0,436
92	Maltotrioz	0,004	±	0,001	0,005	±	0,001	0,529
93	Mannitol	0,089	±	0,036	0,086	±	0,016	0,949
94	Mannoz	0,207	±	0,012	0,307	±	0,104	0,358
95	Metionin	0,230	±	0,009	0,219	±	0,011	0,377
96	Metil kaprilat	0,003	±	0,002	0,006	±	0,003	0,490
97	Metil linolenat	0,350	±	0,013	0,358	±	0,016	0,698
98	Metil oleat	0,009	±	0,004	0,005	±	0,000	0,305
99	Metil palmitat	0,023	±	0,005	0,035	±	0,007	0,116
100	Metil stearat	0,088	±	0,037	0,049	±	0,003	0,310
101	Metilmalonik asit	0,099	±	0,004	0,101	±	0,005	0,738
102	Mimozin	0,064	±	0,003	0,059	±	0,003	0,390
103	Miyo-inositol	0,722	±	0,032	0,784	±	0,034	0,042
104	N-asetil-D-mannozamin	0,015	±	0,001	0,014	±	0,001	0,355
105	N-asetil-D-triptofan	0,126	±	0,015	0,103	±	0,011	0,036
106	N-asetil-L-glutamik asit	0,390	±	0,023	0,328	±	0,021	0,028
107	N-asetil-ornitin	0,043	±	0,004	0,035	±	0,003	0,051

Tablo 4.5. (Devam) GC-MS analizi sonucunda şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında tanımlanan metabolitler ve bağıl derişimleri.

108	N-etilglisin	0,016	±	0,001	0,015	±	0,001	0,407
109	N-metilalanin	0,109	±	0,008	0,096	±	0,008	0,113
110	Oleik asit	0,263	±	0,017	0,194	±	0,013	0,006
111	O-fosfokolamin	0,051	±	0,003	0,060	±	0,004	0,035
112	O-fosfo-L-serin	0,175	±	0,009	0,168	±	0,010	0,562
113	Oksaloasetik asit	0,060	±	0,007	0,066	±	0,005	0,446
114	Oksalik asit	0,186	±	0,012	0,198	±	0,010	0,390
115	Palatinitol	0,000	±	0,000	0,000	±	0,000	0,594
116	Palmitik asit	0,788	±	0,018	0,735	±	0,022	0,103
117	Palmitoleik asit	0,094	±	0,010	0,110	±	0,011	0,068
118	P-kresol	0,031	±	0,003	0,032	±	0,003	0,674
119	Fenilalanin	0,699	±	0,021	0,695	±	0,028	0,916
120	Fosforik asit	1,054	±	0,009	1,037	±	0,033	0,595
121	Porfin	0,343	±	0,015	0,344	±	0,019	0,940
122	Prolin	0,686	±	0,065	0,672	±	0,048	0,845
123	Pürin ribozid	0,065	±	0,003	0,060	±	0,003	0,179
124	Piroglutamik asit	0,995	±	0,045	0,901	±	0,056	0,087
125	Pirüvik asit	0,131	±	0,011	0,123	±	0,012	0,583
126	Kinik asit	0,034	±	0,004	0,046	±	0,005	0,096
127	Ribitol	0,015	±	0,001	0,018	±	0,002	0,049
128	Riboz	0,021	±	0,002	0,017	±	0,002	0,107
129	Ribuloz-5-fosfat	0,002	±	0,000	0,003	±	0,001	0,010
130	Sakkarik asit	0,019	±	0,001	0,020	±	0,001	0,260
131	S-karboksimetil sistein	0,006	±	0,000	0,006	±	0,000	0,262
132	Sedoheptuloz	0,626	±	0,008	0,598	±	0,027	0,284
133	Serin	0,770	±	0,035	0,647	±	0,046	0,001
134	Sorbitol	0,011	±	0,001	0,010	±	0,001	0,675
135	Sorboz	0,197	±	0,018	0,275	±	0,072	0,312
136	Skualen	0,003	±	0,000	0,003	±	0,000	0,823
137	Stearik asit	0,787	±	0,018	0,764	±	0,026	0,484
138	Süksinik asit	0,142	±	0,004	0,138	±	0,006	0,351
139	Sükroz	0,275	±	0,103	0,273	±	0,064	0,990
140	Tagatoz	0,386	±	0,070	0,576	±	0,093	0,100
141	Tartarik acit	0,046	±	0,002	0,048	±	0,002	0,342
142	Tartronik asit	0,021	±	0,001	0,023	±	0,001	0,373
143	Treitol	0,038	±	0,001	0,038	±	0,002	0,926
144	Treonin	0,131	±	0,010	0,121	±	0,008	0,345

Tablo 4.5. (Devam) GC-MS analizi sonucunda şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında tanımlanan metabolitler ve bağıl derişimleri.

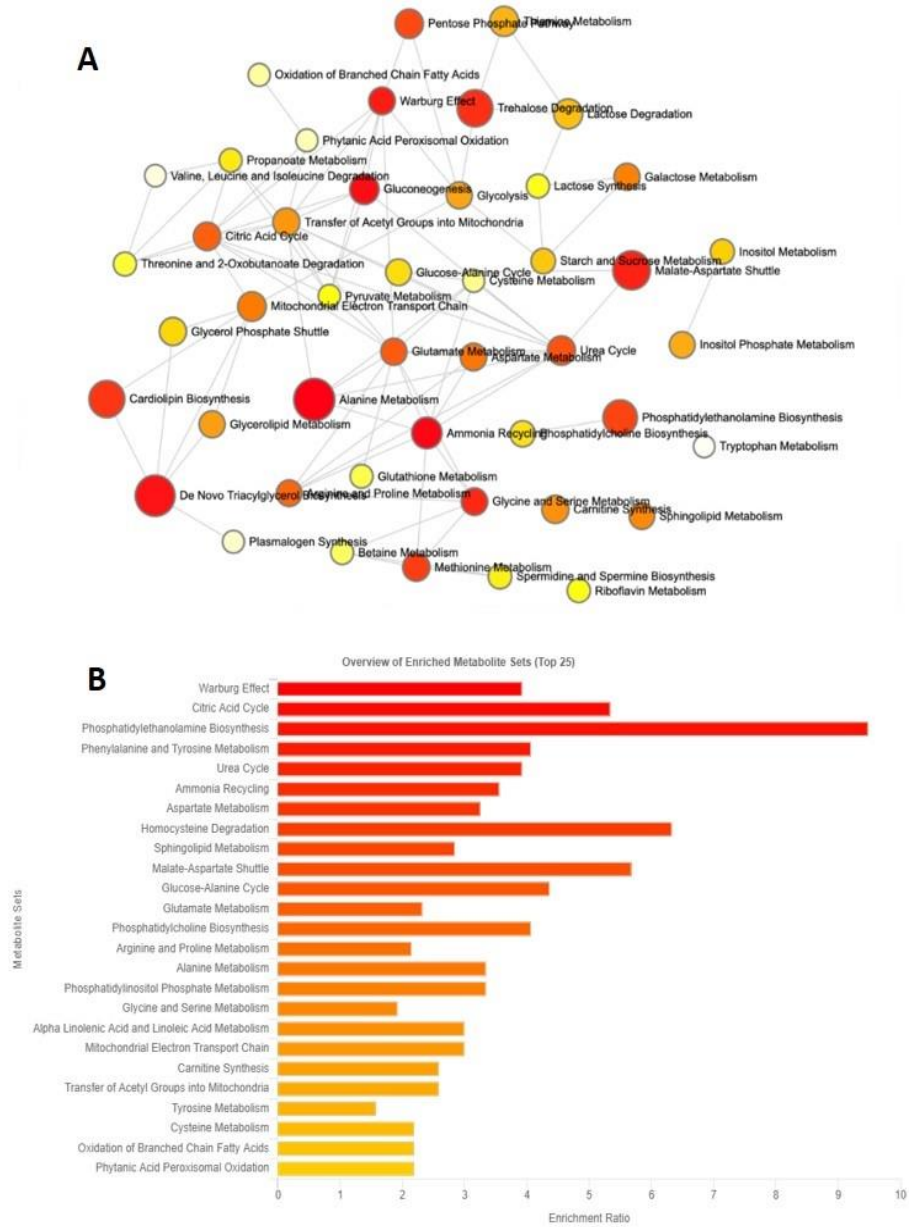
145	Timin	0,027	±	0,001	0,024	±	0,001	0,130
146	Trehaloz	0,092	±	0,006	0,095	±	0,005	0,531
147	Triptofan	0,602	±	0,077	0,593	±	0,074	0,881
148	Tirozin	0,803	±	0,036	0,787	±	0,043	0,710
149	Urasil	0,018	±	0,001	0,018	±	0,002	0,843
150	Üre	0,957	±	0,016	0,888	±	0,036	0,072
151	Valin	0,861	±	0,082	0,858	±	0,072	0,975
152	Ksilitol	0,096	±	0,004	0,094	±	0,004	0,657

** : İnternal standarda göre normalizasyondan sonraki deęerlerdir.

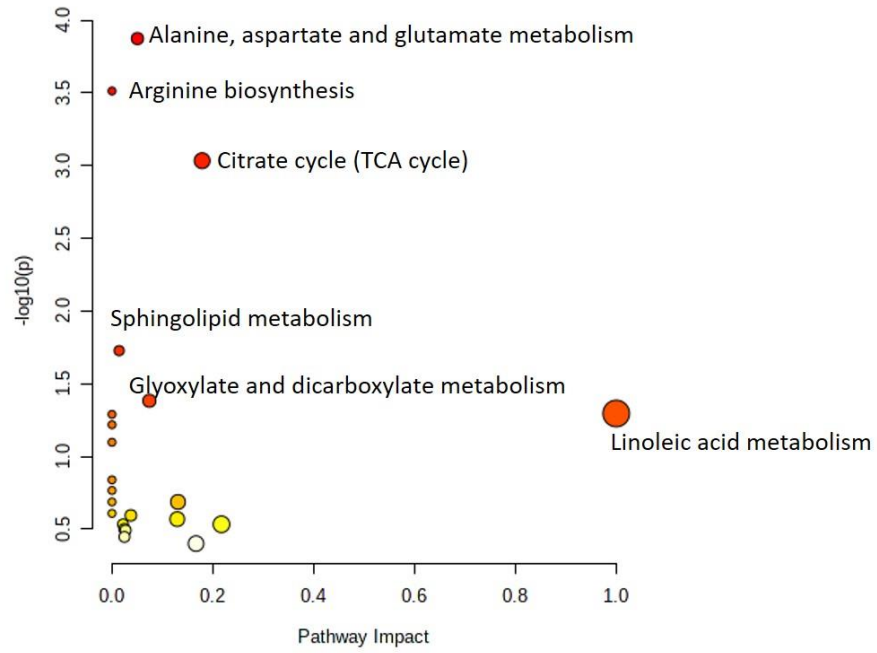
* $p < 0.05$ istatistiksel olarak farkın anlamlı olduğunu gösterir.

4.6. Yolak Analizleri

Kurşuna maruz kalan ve şelasyon tedavisi alan işçilerden alınan örneklerde yapılan metabolomik analiz istatistiksel olarak karşılaştırılmış (Tablo 4.6.) ve anlamlı değişen metabolitler kullanılarak ($p < 0.05$) yolak analizleri (MetaboAnalyst, Kanada) gerçekleştirilmiştir. Yolak analizlerinin sonuçları Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.'da sunulmuştur.



Şekil 4.5. Şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasına ait genel değişen yollar (A) ve istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin zenginleştirici yollar analizlerinden elde edilen yollar (B).



Şekil 4.6. Şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasına ait anlamlı şekilde değişen bazı belirgin yollar.

Tablo 4.6. Şelasyon tedavisine bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı değişen metabolitlerin yer aldıkları yollar.

Yolak adı	Eşleşme	<i>p</i> değeri	Etki
Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması	4/28	1.3388E-4	0.05048
Arjinin biyosentezi	3/14	3.0695E-4	0.0
Sitrat (TCA) döngüsü	3/20	9.255E-4	0.17875
Sfingolipit metabolizması	2/21	0.018719	0.0142
Glikoksilat ve dikarboksilat metabolizması	2/32	0.041386	0.07408

Şelasyon tedavisi ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde etkilenen ($p<0,05$) yolaklar Tablo 4.6.'da verildiği şekilde alanin, aspartat ve glutamat metabolizması, arjininin biyosentezi, sitrat (TCA) döngüsü, sfingolipit metabolizması ve glikoksilat ve dikarboksilat metabolizmasıdır. Bunlardan özellikle lipit yolaklarının önemli bileşeni olan ve biyolojik fonksiyonları dolayısıyla pekçok farklı molekülün de dahil olduğu sfingolipit metabolizmasında bulunan 32 metabolitten 2 tanesinin şelasyon tedavisi öncesi ve sonrasında anlamlı şekilde değiştiği görülmüştür.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması ile Pb zehirlenmesi görülen hastalarda şelasyon tedavisinin metabolomik profilde oluşturduğu değişikliklerin belirlenmesi, kolesterolün oto-oksidasyonu sonucunda oluşan oksisterol düzeylerinin ölçülerek birlikte ele alınması, sfingolipitlerin metabolizması ile oluşan ve polar bir metabolit olan, hücre zarının akışkanlığının düzenlenmesinde yapısal olarak önemli rol oynayan S1P düzeylerinin tespit edilerek şelasyon tedavisinin etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Kurşun çevrede yaygın olarak bulunan bir ağır metaldir. İnsanoğlunun kullanmayı öğrendiği ilk metallere birisi olan Pb'nin toksisitesi antik çağlardan beri bilinmektedir (274, 275).

Kurşuna çevresel maruziyet esas olarak kurşunla kontamine toprak, kir, içme suyu ve Pb bazlı zararlı boyalar ile temas halinde meydana gelir (274, 276). Pb, 500-600°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda buharlaşabilen bir metal olduğundan çevresel dağılımı çoğunlukla havaya yayılan endüstriyel bacalardan çıkan gazlar ve Pb ilave edilmiş petrol ile fosil yakıtların yanma ürünleri aracılığı ile olmaktadır. Bu yanma ürünlerinin içerisinde mikrometre düzeyinde Pb partikülleri bulunmaktadır. Daha az miktarda Pb maruziyeti gastrointestinal sistem yolu ile olmaktadır. Özellikle sanayi bölgelerine yakın alanlardaki sebzelerde Pb konsantrasyonu yükselmektedir (100, 277).

Mesleki Pb maruziyetine sebep olan yaygın aktiviteler ve endüstrilere; akümülatör yapım ve tamiri, matbaacılık, pil üretimi, kaynakçılık ve boyacılık örnek olarak verilebilir (278).

DSÖ ile FDA tarafından yapılan çalışmalar sonucunda gıdalarla bireylerin maruz kalabileceği izin verilen günlük Pb miktarı 25 µg/kg olarak belirlenmiştir. Suyla alınan günlük Pb'nin %40'ı absorbe olup kan dolaşımına katılırken, sindirim kanalından alınan Pb'nin ancak %10-15'i absorbe edilmektedir. Organik Pb bileşikleri deri yolu ile de absorbe edilebilir. İnsan vücuduna giren Pb'nin %85-90'luk kısmı kanda eritrositlerin zarına bağlanarak, %1'i serbest ve geri kalanı ise albumine bağlı olarak taşınmaktadır. Pb parankimal organlarda dağılım göstermektedir ve ayrıca, kemiklerde Ca'nın yerini alarak depolanmaktadır (100, 279, 280).

Üretimde yaygın olarak Pb kullanılması sonucu mesleki Pb maruziyeti dünya genelinde sürekli olarak meydana gelmektedir. Pb maruziyetinin toksik etkileri insan ve hayvan modellerinde gösterilmiştir (281).

Kurşuna yüksek düzeylerde maruziyet hematopoetik, gastrointestinal, üriner, kardiyovasküler ve sinir sisteminde advers etkilere yol açmaktadır (278). Düşük dozlarda ise kronik Pb maruziyeti çocuklarda anormal kognitif gelişim, anemi, hipertansiyon ve nörolojik bozukluk gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (279). Bebekler ve çocuklar, Pb toksisitesi yönünden daha fazla risk altındadır. Beslenme de Pb toksisitesini etkilemektedir (274, 275).

Oksidatif stres, Pb zehirlenmesinin en temel mekanizmalardan biridir. Dolayısıyla Pb'ye bağlı olarak ROB üretimi gerçekleşmekte ve oksidatif makromolekül hasarına neden olmaktadır (3). Redoks reaksiyonları nedeniyle ortaya çıkabilen lipit oksidasyon ürünlerinin de oksidatif stresi ve hücre ölümünü indükleyebildiği gösterilmiştir. Bu bağlamda oksisteroller, lipitlerin biyoaktivitesi yüksek önemli bir grubunu oluşturmaktadır (282). Pb, kovalent bağ oluşumuna yardımcı olan güçlü bir elektron paylaşım özelliğine sahiptir. Antioksidan enzimlerdeki sülfhidril grupları ile Pb arasında kovalent bağlar oluşabilmektedir ve sonuçta Pb enzimlerin aktivitelerini engellemektedir (13). Benzer şekilde Pb toksisitesinin kritik toksisite mekanizmalarından birisi "hem" biyosentetik yolağı içindeki temel enzimleri inhibe etmesidir (85). Pb, ALAD 'ın da aralarında bulunduğu birçok enzimin aktivitesini inhibe edebilir. ALAD ile etkileşim "hem" biyosentezinin inhibe olmasına ve ALA birikimine neden olur. Bu nedenle, Pb maruziyetinin biyobelirteci olarak kan ALA düzeyleri kullanılmaktadır (283).

Kronik Pb maruziyetinin karakteristik klinik belirtileri arasında karın ağrısı, bulantı, kısa süreli hafıza kaybı, depresyon, koordinasyon kaybı, ekstremitelerde uyuşma ve karıncalanma, kabızlık, konsantrasyon olamama ve impotens sayılabilir (283).

Şelasyon, Pb de dahil pekçok ağır metal zehirlenmesinin tedavisinde uygulanmakta olup hedeflenen bölgeden spesifik toksik metali tamamen uzaklaştırmayı amaçlamaktadır. Şelasyon ajanları, metal iyonlarını "şelat" olarak adlandırılan kompleks halka benzeri yapı oluşturarak bağlayabilen organik veya inorganik bileşiklerdir (284). CaNa₂EDTA, Ca'dan daha yüksek afiniteye sahip olan

metaller ile zehirlenmelerin tedavisinde etkilidir. Pb-EDTA kompleksi yüksek stabiliteye sahiptir ve bu nedenle CaNa_2EDTA , Pb zehirlenmelerinde genellikle tercih edilen bir şelatör ajandır (200). Pb'nin karaciğer toksisitesinin araştırıldığı bir çalışmada, karaciğer enzimleri arasında yer alan AST, ALT ve ALP serum düzeylerinde yükseliş ve karaciğer kolesterol metabolizmasında değişiklikler tespit edilmiştir (8). Aralarında EDTA'nın da bulunduğu farklı şelasyon ajanlarının biyokimyasal parametreler üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise, karaciğer enzimleri de dahil biyokimyasal analitlerde değişiklikler olduğu belirlenmiştir (285, 286). Yaptığımız çalışmada literatür verileriyle uyumlu olarak şelasyon tedavisi sonrasında çalışma grubunda yer alan kişilerin karaciğer enzimlerinde geçici bir artış olduğu gözlenmiş, bu duruma hastanın genel durumuna uygun olarak verilen ilaçların da katkıda bulunmuş olabileceği düşünülmüştür.

Oksisteroller, kolesterolün halkaları veya yan zincirine oksijen atomunun OH, keto, epoksit veya peroksit grupları oluşturacak şekilde eklenmesiyle meydana gelen, kolesterol metabolizmasındaki önemli oksidasyon ürünleridir. Farklı kimyasal yapılara sahip çok sayıda oksisterol türevi bulunmaktadır (282, 287). Oksisteroller, enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla olmak üzere iki farklı şekilde meydana gelebilir (282). Enzimatik yolla yani CYP450 ailesine ait enzimler ile oluşan oksijenasyon ürünleri, diğerlerine oranla dolaşımında daha fazla bulunmaktadır ve normal hücresel süreçlerde bu türlerin çeşitli düzenleyici rolleri vardır (223). Enzimatik olmayan (oto-oksidadasyon) yolla oluşan oksisterol türevleri ise kolesterolün ROB ve RNS aracılığı ile oto-oksidadasyona uğraması sonucunda oluşmaktadır (231).

Oksisteroller, vücutta önemli biyolojik faaliyetlerin regülasyonunda görev alırlar ve çeşitli türleri farklı biyolojik fonksiyonlara sahiptir (287). Lipid metabolizmasının transkripsiyonel kontrolünde, SREBP düzenlenmesinde, ROR aktivitesininin modüle edilmesinde, hücre ölümünde (apoptoz), enflamasyon sürecinin başlamasında ve enflamasyonda oksisterollerin rolünün olduğu bilinmektedir (267). Oksisteroller, memeli dokularında çok düşük konsantrasyonlarda bulunur (282). Oksisterollerin düzeyleri, makrofaj köpük hücreleri, aterosklerotik lezyonlar, katarakt ve safra taşları gibi dokularda gelişebilen çeşitli patolojik durumlarda çok artabilmektedir (267). Oto-oksidadasyon ile oluşan oksisterollerin ateroskleroz, nörolojik hastalıklar ve kanserle olan ilişkisi yapılan pekçok çalışma ile gösterilmiştir.

Özellikle kronik seyir gösteren hastalıklarda inflamasyon sürecini başlattıkları belirtilmiştir (287). Son birkaç yılda, gelişen LC-MS/MS teknolojisi ile oksisterol türlerinin miktarlarının saptanabilir hale gelmesi, oksisterollerin oksidatif stresin de içinde bulunduğunu pek çok lipit ilişkili süreç için biyobelirteç olarak kullanılabilmesi konusunu gündeme getirmiştir. Bu nedenle lipidomik araştırmalarının önemli bir parçası olan oksisterollerin biyobelirteç olarak hastalıkların teşhisinde, tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde ve hastalıkların prognozunun takibinde önemli olduğu düşünülmektedir (287).

Kanser araştırmalarında, oksisterollerin kansere katkıda bulunan pro-oksidatif ve pro-inflamatuar özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. İlk olarak ROB/RNS üretimini artırarak tümör oluşmasını başlatır. İkinci olarak hücre fenotiplerinin değişimini tetikleyen siklooksijenaz (COX) 2 gibi upregüle proteinler aracılığı ile tümör gelişimini tetikleyebilir. Yapılan bir çalışmada 20 tane akciğer kanseri hastasının plazmasında oksisteroller ölçülmüştür. 7 β -OHC seviyesi ile akciğer kanseri arasında bir ilişki bulunmuştur. Akciğer kanseri riskinde bu molekül biyobelirteç olarak bilinmektedir (231).

NP-C1 genetik bir hastalık olup hastaların lipit metabolizmasında bozukluk bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar, hastalıkta kolesterol oksidasyonunun indüklendiğini, triol ve 7-KC'in NP-C'nin teşhisi için spesifik biyobelirteçler olabileceğini ortaya koymuştur. Elde edilen sonuçlara göre oksisteroller NP-C'nin güvenilir ve duyarlı biyobelirteçleridir (273).

Safra taşlarının ve özellikle bakteriyel enfeksiyonun eşlik ettiği safra yolu iltihabının varlığında çeşitli oksisterollerin düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir. Bu durum safrada oksisterol oluşumunun lökosit aracılı ROB üretimi yoluyla gerçekleştiğini düşündürmektedir. Biliyer oksisteroller, safra epitel hücreleri ile etkileşime girerek mitokondriyal yolla apoptozu indükleyip epitel hücre fonksiyonlarını modüle edebilir. Safra yolu oksisterollerini ayrıca kolanjiyo karsinom ile ilişkili bulunmuştur. *O. viverrini* ile indüklenen kolanjiyo karsinomlu hamster karaciğerlerinde triol önemli ölçüde daha yüksek seviyelerde bulunmuştur (288).

Ateroskleroz, oksisterollerle ilgili olduğu bilinen kardiyovasküler bir hastalıktır. Aterosklerotik lezyonlarda bulunan kolesterol LDL'den

kaynaklanmaktadır (289). Bu patolojik durumda oksisterollerden; 7-KC, 27-OHC ve 7 α / β -OHC düzeylerinin plazmada belirgin şekilde arttığı çalışmalarla gösterilmiştir. Aynı zamanda, aterosklerotik plağın içeriğinin %75-80'i oto oksidasyonla oluşan oksisterollerden oluşmaktadır. Plak gelişiminde bu oksisterollerin aktif rol aldığı belirlenmiştir (217).

Silikozis hastaları ile yapılan bir çalışmada oto-oksidasyon ile oluşan oksisterol düzeylerinin değerlendirilmesi; bir sfingolipit metaboliti olan S1P düzeylerinin tespit edilmesi; söz konusu parametrelerin yanısıra indüklenmesi olası lipit peroksidasyonunun da farklı parametrelerle belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, oto-oksidasyonla oluşan oksisterol türevlerinden 7-KC, triol, lipit peroksidasyonunun önemli belirteçleri olan MDA, F2-izoprostan (F2-iP) ve 4-HNE ile S1P düzeyleri ölçülmüştür. Kontrol grubunda 7-KC ve triol düzeyleri sırasıyla 20,26 \pm 1,38 ng/ml ve 13,83 \pm 1,75 ng/ml olarak ölçülürken, hasta grubunda sırasıyla 40,61 \pm 2,07 ng/ml ve 16,15 \pm 2,22 ng/ml olarak ölçülmüştür (p<0,001). Hasta grubu plazma 4-HNE, F2-iP ve MDA düzeylerinin hem idrar hem de plazmada kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, silikoziste lipit metabolizmasının etkilendiği ve oksidatif lipit hasarının tetiklendiği, kolesterol oksidasyonunun bu maruziyet grubunda da önemli bir belirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (290).

Kurşuna maruz kalan işçilerle yapılan bir çalışmada 137 hasta ile çalışılmış ve Pb maruziyet düzeyine göre iki grup oluşturulmuştur. Bu gruplarda kolesterol oksidasyonu 7-KC düzeyleri ve oksidatif lipit hasarı ise MDA düzeyleri ölçülerek değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, 7-KC düzeylerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, lipit peroksidasyonunun indüklendiği belirlenmiştir (291).

Yapmış olduğumuz tez çalışmasında, Pb'ye maruz kalan bireylerde triol ve 7-KC düzeylerinin, şelasyon tedavisi ile azaldığı gösterilmiştir (p<0,001). Dolayısıyla, kolesterol oksidasyonunun da bu maruziyet grubu için ayırt edici bir belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca toksisitenin patofizyolojisinin anlaşılacak, farklı tedavi hedeflerinin belirlenmesine de katkıda bulunabileceği anlaşılmaktadır.

S1P, hücrenin büyümesi, hayatta kalması, hareketinin düzenlenmesi gibi faaliyetlerinin yanında invazyon, anjiyogenez, vasküler olgunlaşma, lenfosit

hareketleri ve bağımsızlık düzenlenmesi gibi önemli biyolojik fonsiyonların devamını sağlayan moleküllerden biridir. Sfingolipit metabolizmasındaki önemli biyoaktif metabolitlerden biri olan S1P'nin kanser, ateroskleroz, diyabet ve osteoporoz gibi birçok hastalığın gelişimiyle ilişkili olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, S1P, pekçok patolojik durumla ilgili araştırmada hücre içi hedeflerden biri olarak gösterilmiştir (237). Kanser oluşumunda, S1P oluşumunu indükleyen SphK1 aktivasyonu ile S1P'nin artması, kanser hücrelerinin apoptozunu engellerken, çoğalmalarını, anjiyogenez ve metastaza yönelmelerini kolaylaştırır. Ayrıca, meme, kolon, akciğer, yumurtalık, mide, uterus, böbrek ve rektum gibi pekçok kanser türünde SphK1 düzeylerinin aşırı arttığı bildirilmiştir (232).

Sfingolipid metabolizması farklı nörolojik hastalıklarla ilişkilendirilmiş, Alzheimer hastalarında da etkilendiği bildirilmiştir. Bu hastalarda beyin S1P seviyelerinde düşüş olması hücre ölümünü tetiklemekte ve beyin hücrelerinde kayıpların gerçekleşmesine neden olmaktadır. Ayrıca, Alzheimer hastalarında S1P'nin geri dönüşümsüz olarak etanolamin ve heksadesanole dönüşümünü katalizleyen SPL ekspresyonu artmış ve bu durum klinik demans progresyonu ile korelasyon göstermiştir. Bu bulgular, S1P metabolizmasının Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (292).

Yapmış olduğumuz çalışma ile uygulanan şelasyon tedavisi sonrası S1P'nin düzeylerinin azalmış olduğu gösterilmiştir. Bu durum literatürde patolojik durumlarda artış gösterebilen S1P'nin Pb maruziyeti olan grupta şelasyon tedavisi ile geri çevrilebildiğini kanıtlamaktadır. Sfingolipit metabolizması üzerinde geniş çaplı analizlerin bu maruziyet grubu için değerli olabileceği ortaya konulmuştur. Ayrıca metabolomik yolak analizlerinde de sfingolipit metabolizmasının etkilendiği ve olası toksisitenin patofizyolojisinde rolünün olabileceği gösterilmiştir.

İnsan Genom Projesi'nin, 2003 yılında tamamlanmasıyla insan vücudundaki genlerin, tüm bireylerde büyük oranda aynı olup sadece % 0.1'inin farklı olduğu ortaya çıkarılmıştır. İnsanlar arasındaki hastalıklara karşı olan bireysel farklılıklar klinik fenotipi belirleyen tüm bilgilerin hücrede oluşan metabolitler düzeyinde saklı olması ile açıklanmaktadır (31). Metabolitler, biyokimyasal reaksiyonların ara ürünleridir ve canlı hücre içerisinde gerçekleşen çok sayıda farklı metabolik kaskadlarda rol alan

veya bu metabolik yolların işleyişi sırasında ortaya çıkan önemli kimyasal moleküllerdir (293).

Metabolomik ise metabolomdaki küçük moleküllü metabolitlerin spektroskopi, kromatografi gibi yüksek verimli teknolojiler kullanılarak saptanması, miktarının belirlenmesi ve tanımlanmasıdır (31). Geleneksel yöntemlerin aksine metabolomik çalışma; bir biyolojik numune içindeki binlerce küçük molekülün ölçülebilmesini sağlayabilir. Milyonlarca veri parçaları arasından bir molekül sinyali belirlenerek matematiksel hesap ile sayısal bir sonuca ulaşılabilmektedir (294).

Kurşun maruziyetinde plazma metabolomik profilinin araştırıldığı bir çalışmada, çalışma grubundan toplanan ayak tırnağı ve kan örneklerinde analizler yapılmıştır. Pb maruziyeti ile ilişkili metabolitleri tanımlamak için çok değişkenli doğrusal regresyon modelleri, düzleştirici eğriler ve yol analizleri kullanılmıştır. Toplam 399 kişiden toplanan örneklerde 858 metabolit ölçülmüş ve 154 tanesinin kan kurşunu ile anlamlı şekilde ilişkili olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonunda, Pb maruziyetinin oksidatif stres ve immün fonksiyon bozukluğu ile ilişkili metabolitler ve metabolomik yolaklarda etkili olduğu belirlenmiştir (295).

Bir metabolomik çalışmasında, çeşitli kaynaklar aracılığı ile gerçekleşen Pb maruziyetinin idrar metabolomik profillerini değiştirebileceği ve bu değişikliklerin biyolojik özelliklerle bağlantılı olabileceği öngörülmüştür. Çalışma sonunda tanımlanan on aday biyobelirteç, muhtemelen böbrekte amino asit, porfirin ve klorofil metabolizması ve hem biosentetik yolak dahil küçük molekül taşınımının bozulmasıyla ilgili olan ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılarıyla ilişkilendirilmiştir. Özetle, sonuçlar Pb'nin bu biyolojik yolların değiştirilmesi yoluyla bireylerdeki sağlık etkileriyle ilişkili olduğunu göstermiştir. Çalışmada bu maruziyet grubu için kohort çalışmalar önerilmiştir (29).

Ağır metallerle maruz kalmanın metabolik enzimlerin normal aktivitesini etkilediği bulunmuştur. Örneğin, civa klorür ($HgCl_2$), enzimlerin aktivitesini düşürerek kırmızı kan hücrelerinde yalnızca iki metabolik yolu, glikoliz yolunu ve heksoz-fosfat liziz yolunu inhibe edebilmektedir. Glikolizin ilk basamağındaki enzim heksokinaz ve glikoliz işleminin son enzimi olan piruvat kinazın aktivitesinin de maruziyetle önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Dolayısıyla Pb maruziyetiyle de glikolitik yolaklarda metabolik düzeyde belirgin değişimler gözlenebilmektedir.

Özellikle biyolojik sistemlerde redoks reaksiyonları yoluyla Pb de dahil ağır metallere indüklenen ROB pekçok patolojik durumun ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (296).

Yapmış olduğumuz metabolomik çalışmada öne çıkan aday metabolitlerin karbonhidrat, protein metabolizması yanısıra dolaylı olarak lipit metabolizması ile ilişkili olduğu ve literatürdeki sınırlı veri ile de paralellik gösterdiği görülmüştür. Anlamlı olarak değişen metabolitler arasında benzer olanların da olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda, anlamlı bulunan metabolitler alfa ketoglutarik asit, benzoik asit, sitrik asit, kreatinin, fukoz, fumarik asit, glukoz-6-fosforik asit, heptadekanoik asit, miyo-inositol, linoleik asit, N-asetil-D-triptofan, N-asetil-L-glutamik asit, oleik asit, O-fosfokolamin, ribitol, ribuloz-5-fosfat ve serin şeklinde sıralanmıştır. Yapılan yolak analizleri sonucunda ise söz konusu metabolitlerin aktif rol aldığı yolaklar arasında alanin, aspartat ve glutamat metabolizması, arjinin biyosentezi, TCA, sfingolipit metabolizması, glikoksilat ve dikarboksilat metabolizmasının yer aldığı belirlenmiştir.

Genel olarak çalışma sonuçlarımız özetlendiğinde, Pb maruziyetinin kolesterol oto-oksidasyonunu indükleyebileceği, toksisitenin patogenezinde oksisterollerin de katkısının olabileceği ve şelasyon tedavisinin bu oksidasyonun geri döndürülmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. Oksisterollerin biyobelirteç olarak hastalıkların teşhisinde, tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde ve hastalıkların prognozunun takibinde önemli lipidomik parametreler olabileceği ve farklı türevlerinin de çalışılmasının yararlı olabileceği öngörülmektedir. Diğer oksisterol türlerinin de Pb maruziyetindeki değişimi, patogeneze katkısı ve şelasyon tedavisi ile değişiminin değerlendirilmesinin değerli olabileceği öngörülmüştür. Ayrıca S1P düzeylerindeki değişimin de şelasyonla azaldığı belirlenmiştir. Bu maruziyet grubunda sfingolipit metabolizması ve seramidlerin değerlendirilmesi, toplumsal bir problem olan hastalığın patogenezinin tam olarak anlaşılması ve olası hedef tedavilerde lipitlerin yerinin ortaya konması açısından önemli görülmektedir.

Ağır metal maruziyetlerinde olası hasarın patogenezinin anlaşılması, erken dönem biyobelirteçlerinin belirlenerek toksisitenin tespiti ve tedavisine katkı sunulması önem taşımaktadır. Dolayısıyla, etkilenen ve değişen metabolik yolları

açıklamak bu tür maruziyetlerde yeni terapötik hedefler belirlemek için yararlı olabilir. Ayrıca şelasyon tedavisi çalışmamızdaki metabolomik verilerinde de görüldüğü gibi Pb, maruziyet döneminde metabolik profilde değişikliklere neden olmaktadır. Ayrıca lipit ilişkili yolların Pb maruziyetinde etkilendiği ve şelasyon tedavisinin bu profilde değişikliklere neden olduğu belirlenmiştir. Özetle, elde edilen metabolomik verileri de lipit yollarının ilişkili olduğu pek çok metabolit profilde değişikliği ortaya koymuş, gelecekte hasta sayısının da artırılarak geniş çaplı lipidomik çalışmaların yapılmasının anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Temel toksisite mekanizması oksidatif stres olarak verilen Pb'ye bağlı değerlendirilen parametrelerde şelasyona bağlı geri dönüşler, antioksidan takviyesinin de bu hasta grubu için değerli olabileceğini öngörmemize neden olmaktadır.

Yapılan literatür taramasında daha önce bu hasta grubunda metabolomik çalışmalarının ve oksisterol düzeylerinin birlikte değerlendirildiği bilimsel bir makaleye rastlanmamıştır. Dolayısıyla, çalışmanın bir ön çalışma olması söz konusudur. Özellikle, uygulanan şelasyon tedavisinin Pb toksisitesi üzerine etkisinin tüm parametrelerle birlikte değerlendirildiği ilk pilot çalışma olma niteliğindedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması ile Pb zehirlenmesi görülen hastalarda şelasyon tedavisinin metabolomik profilde oluşturduğu değişikliklerin belirlenmesi, kolesterolün oto-oksidasyonu sonucunda oluşan oksisterol düzeylerinin ölçülerek birlikte ele alınması, sfingolipitlerin metabolizması ile oluşan ve polar bir metabolit olan, hücre zarının akışkanlığının düzenlenmesinde yapısal olarak önemli rol oynayan S1P düzeylerinin tespit edilerek şelasyon tedavisinin etkinliğinin incelenmesi planlanmıştır.

Elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- Kolesterol oksidasyonunun belirlenebilmesi amacıyla, kolesterol oto-oksidasyonunun belirteçlerinden olan 7-KC ve triol düzeyleri ölçülmüş, Pb maruziyetinde meydana gelen artışın şelasyonla geri çevrildiği saptanmıştır. Dolayısıyla bu hasta grubunda kolesterol oksidasyonunun da toksisitenin patogenezinde rol alabileceği düşünülmektedir. Farklı oksisterol türlerinin de Pb maruziyetindeki durumu ve şelasyonla değişiminin değerlendirilmesinin değerli olabileceği öngörülmüştür.
- Oksisteroller biyobelirteç olarak hastalıkların teşhisinde, tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde ve hastalıkların prognozunun takibinde önemli lipidomik parametrelerdir. Dolayısıyla toksikolojik çalışmalarda da farklı maruziyetlerin mekanistik çalışmalarında kullanılabilir.
- Bu hastalarda, ayrıca S1P düzeyleri de ölçülmüş ve şelasyon tedavisi sonrasında anlamlı şekilde azaldığı belirlenmiştir.
- Sonuçlarımız çalışmanın gerçekleştirilmesi için kurduğumuz hipoteze uygun olarak Pb maruziyetinde lipit metabolizmasının etkilendiğini ve kolesterol oksidasyonunun bu maruziyet grubunda da önemli bir belirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir ve uygulanan şelasyon tedavisi ile söz konusu kolesterol oto-oksidasyonunun geri çevrilebildiği belirlenmiştir. Ayrıca ana mekanizması oksidatif stres olan Pb toksisitesinde şelasyon tedavisinin yanısıra düzenli olarak kullanılacak antioksidan

takviyelerinin serbest radikal reaksiyonlarını ve oksidatif lipit hasarını azaltabileceği düşünülmüştür. Ayrıca, şelasyon tedavisinin parametreler üzerindeki etkisi göz önüne alındığında, kullanılacak antioksidan takviyelerinin oksidatif stres mekanizması üzerinden oluşan Pb toksisitesinin azalmasına ve oksidatif lipit hasarının da önlenmesine yardımcı olabileceği sonucuna varılabilir.

- Elde edilen bulgularda, Pb maruziyetinde şelasyon tedavisi öncesi ile sonrası kıyaslandığında metabolik düzeyde değişiklikler olduğu, etkilenen yollar içinde sfingolipit metabolizması gibi lipit ilişkili olanların da yer aldığı belirlenmiştir. Dolayısıyla, gelecekte hasta sayısının da artırılarak geniş çaplı lipidomik çalışmaların yapılmasının anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır.
- Yapılan literatür taramasında daha önce bu hasta grubunda metabolomik analizlerinin, oksisterol ve S1P düzeylerinin birlikte değerlendirildiği bilimsel bir makaleye rastlanmamıştır. Ayrıca, şelasyon tedavisinin etkisinin uygulama öncesi ve sonrası şeklinde tüm parametrelerle birlikte değerlendirildiği ilk pilot çalışma olma niteliğindedir. Dolayısıyla, çalışmanın özgün bir ön çalışma olması söz konusudur.

7. KAYNAKÇA

1. Klaassen CD, Amdur MO. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons: McGraw-Hill New York; 2013.
2. Kitman JL. The Secret History of Lead. Nation (New York, NY: 1865). 2000;270:11-+.
3. Sachdeva C, Thakur K, Sharma A, Sharma KK. Lead: Tiny but Mighty Poison. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2018;33(2):132-46.
4. Grant LD. Lead And Compounds. Lippmann M, Leikauf GD, editors. Environmental Toxicants. 4th ed. USA: John Wiley & Sons Inc; 2020.
5. Garza A, Vega R, Soto E. Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. Medical science monitor. 2006;12(3):RA57-RA65.
6. Yapıcı G, Can G, Şahin Ü. Çocuklarda asemptomatik kurşun zehirlenmesi. Cerrahpaşa Tıp Dergisi. 2002;33(3).
7. De Francisco N, Ruiz Troya JD, Agüera EI. Lead and lead toxicity in domestic and free living birds. Avian Pathol. 2003;32(1):3-13.
8. Mitra P, Sharma S, Purohit P, Sharma P. Clinical and molecular aspects of lead toxicity: An update. Critical reviews in clinical laboratory sciences. 2017;54(7-8):506-28.
9. Denizli A. Ağır metal toksikolojisi. Erzurum: Atatürk Üniversitesi Ders Yayınları; 2008.
10. Chandran L, Cataldo R. Lead poisoning: basics and new developments. PEDIATR Rev. 2010;31(10):399-405; quiz 6.
11. Church HJ, Day JP, Braithwaite RA, Brown SS. Binding of lead to a metallothionein-like protein in human erythrocytes. J Inorg Biochem. 1993;49(1):55-68.
12. Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Rybicka M, Nowacki P, Chlubek D. Neurotoxicity of lead. Hypothetical molecular mechanisms of synaptic function disorders. Neurologia i neurochirurgia polska. 2012;46(6):569-78.
13. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. Curr Top Med Chem. 2001;1(6):529-39.
14. Ahamed M, Siddiqui M. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. Clinica chimica acta. 2007;383(1-2):57-64.
15. Corradi M, Goldoni M, Sabbadini F, Mutti A. Acute lead poisoning: a singular case of hemolytic anemia and lead colic. La Medicina del Lavoro. 2011;102(3):243-9.
16. Gidlow DA. Lead toxicity. Occup Med (Lond). 2015;65(5):348-56.
17. Flora G, Gupta D, Tiwari A. Toxicity of lead: A review with recent updates. Interdiscip Toxicol. 2012;5(2):47-58.
18. Humans IWGotEoCRt, Organization WH, Cancer IAFRo. Inorganic and organic lead compounds: IARC; 2006.
19. Tüzün D. Kurşuna Maruz Kalan İşçilerin Tedavisinde Kullanılan Şelatör Ajanların Değerlendirilmesi [Yüksek Lisans Tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2007.

20. Klaassen CD. Heavy metals and heavy-metal antagonists. The pharmacological basis of therapeutics. 1996:1649-71.
21. Chen K-H, Lin J-L, Lin-Tan D-T, Hsu H-H, Hsu C-W, Hsu K-H, et al. Effect of chelation therapy on progressive diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes and high-normal body lead burdens. *American Journal of Kidney Diseases*. 2012;60(4):530-8.
22. Čabarkapa A, Borozan S, Živković L, Stojanović S, Milanović-Čabarkapa M, Bajić V, et al. CaNa₂EDTA chelation attenuates cell damage in workers exposed to lead-a pilot study. *Chemico-biological interactions*. 2015;242:171-8.
23. Sargent JR, Tocher DR, Bell JG. The lipids. *Fish nutrition*: Elsevier; 2003. p. 181-257.
24. Gurr MI, Harwood JL, Frayn KN. *Lipid biochemistry*: Springer; 2002.
25. Brown AJ, Jessup W. Oxysterols: sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Molecular aspects of medicine*. 2009;30(3):111-22.
26. Björkhem I, Diczfalusy U, Lütjohann D. Removal of cholesterol from extrahepatic sources by oxidative mechanisms. *Curr Opin Lipidol*. 1999;10(2):161-5.
27. Björkhem I. Are side-chain oxidized oxysterols regulators also in vivo? *Journal of lipid research*. 2009;50(Supplement):S213-S8.
28. Vejux A, Lizard G. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Molecular aspects of medicine*. 2009;30(3):153-70.
29. Eguchi A, Nomiya K, Sakurai K, Trang PTK, Viet PH, Takahashi S, et al. Alterations in urinary metabolomic profiles due to lead exposure from a lead-acid battery recycling site. *Environmental pollution*. 2018;242:98-105.
30. Griffiths W, Karu K, Hornshaw M, Woffendin G, Wang Y. Metabolomics and metabolite profiling: past heroes and future developments. *European journal of mass spectrometry*. 2007;13(1):45-50.
31. Yaman Ö. Hekimlikte Metabolomik Çalışmalara Genel Bir Bakış. *Bahri Dağdaş Hayvancılık Araştırma Dergisi*. 2015;3(1):33-46.
32. Mizuno H, Ueda K, Kobayashi Y, Tsuyama N, Todoroki K, Min JZ, et al. The great importance of normalization of LC-MS data for highly-accurate non-targeted metabolomics. *Biomedical Chromatography*. 2017;31(1):e3864.
33. ATSDR. Toxicological Profile for Lead [Internet]. 2020 [Erişim Tarihi 1 Kasım 2020]. Erişim adresi: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13-p.pdf>
34. Jannuzzi AT. Mesleki Kurşun Maruziyetine Bağlı DNA Hasarlarının Değerlendirilmesi [Yüksek lisans tezi]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2013.
35. UNEP. Final review of scientific information on lead [Internet]. 2010 [Erişim Tarihi 5 Aralık 2020]. Erişim adresi: <https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/27635/LeadRev.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

36. Tatar Ç. Kurşun Maruziyetinin İş Sağlığı ve Güvenliği Açısından Değerlendirilmesi (Akü, Maden ve Metal İşyerlerinde). Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı İş Sağlığı ve Güvenliği Genel Müdürlüğü. 2014.
37. von Lindern IH, Spalinger SM, Bero BN, Petrosyan V, von Braun MC. The influence of soil remediation on lead in house dust. *Sci Total Environ.* 2003;303(1-2):59-78.
38. Girgin G. Kurşuna Maruziyetin Esansiyel Elementler Üzerine Etkisi [Doktora tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2003.
39. Copius Peereboom JW. General aspects of trace elements and health. *Science of The Total Environment.* 1985;42(1):1-27.
40. Patrick L. Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. *Altern Med Rev.* 2006;11(1):2-22.
41. Kurşun-Çinko [İnternet]. [Erişim Tarihi 15 Aralık 2020]. Erişim adresi: https://www.jmo.org.tr/resimler/ekler/e6b1cf3fb0a3aa1_ek.doc?tipi=25&tu ru=X&sube=0
42. CDC. Lead [İnternet]. [Erişim Tarihi 15 Aralık 2020]. Erişim adresi: <https://en.wikipedia.org/wiki/Lead>.
43. Işıklı B, Demir T, Berber A, Kalyoncu C. Yol kenarı toprak ve bitkilerinde kurşun birikimi. VI Ulusal Halk Sağlığı Kongresi Adana, Nisan. 1998;414.
44. Multani A. Lead contamination of drinking water in India due to PVC pipes. *Lead Action News.* 2010;10(1):12-5.
45. Kianoush S, Sadeghi M, Balali-Mood M. Recent Advances in the Clinical Management of Lead Poisoning. *Acta Medica Iranica.* 2015:327-36.
46. Juberg DR, Kleiman CF, Kwon SC. Position paper of the American Council on Science and Health: lead and human health. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1997;38(3):162-80.
47. Singh RP, Tripathi RD, Sinha SK, Maheshwari R, Srivastava HS. Response of higher plants to lead contaminated environment. *Chemosphere.* 1997;34(11):2467-93.
48. Levin R, Brown MJ, Kashtock ME, Jacobs DE, Whelan EA, Rodman J, et al. Lead exposures in U.S. Children, 2008: implications for prevention. *Environmental health perspectives.* 2008;116(10):1285-93.
49. Lewendon G, Kinra S, Nelder R, Cronin T. Should children with developmental and behavioural problems be routinely screened for lead? *Arch Dis Child.* 2001;85(4):286-8.
50. Manton WI, Angle CR, Krogstrand KL. Origin of lead in the United States diet. *Environ Sci Technol.* 2005;39(22):8995-9000.
51. Srivastava S, Mehrotra PK, Srivastava SP, Tandon I, Siddiqui MK. Blood lead and zinc in pregnant women and their offspring in intrauterine growth retardation cases. *J Anal Toxicol.* 2001;25(6):461-5.
52. Rose M, Baxter M, Brereton N, Baskaran C. Dietary exposure to metals and other elements in the 2006 UK Total Diet Study and some trends over the last 30 years. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2010;27(10):1380-404.

53. Barbosa F, Jr., Tanus-Santos JE, Gerlach RF, Parsons PJ. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environmental health perspectives*. 2005;113(12):1669-74.
54. Ying X-L, Markowitz M, Yan C-H. Folk prescription for treating rhinitis as a rare cause of childhood lead poisoning: a case series. *BMC Pediatr*. 2018;18(1):219-.
55. Rahbar MH, White F, Agboatwalla M, Hozhabri S, Luby SP. Factors associated with elevated blood lead concentrations in children in Karachi, Pakistan / Mohammad Hossein Rahbar ... [et al.]. *Facteurs associés à une plombémie élevée chez les enfants de Karachi (Pakistan) : résumé*. 2002.
56. Rădulescu A, Lundgren S. A pharmacokinetic model of lead absorption and calcium competitive dynamics. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-27.
57. Yalçın M, Halis O. Konya Bölgesi İçme Sularındaki Ağır Metal Düzeylerinin Araştırılması. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*. 2010;2(35):9-18.
58. Park SK, O'Neill MS, Vokonas PS, Sparrow D, Wright RO, Coull B, et al. Air pollution and heart rate variability: effect modification by chronic lead exposure. *Epidemiology (Cambridge, Mass)*. 2008;19(1):111.
59. Nathan DG, Oski FA. *Hematology of infancy and childhood*. 3th ed. USA: John Wiley & Sons Inc; 1987.
60. CDC. *Low Level Lead Exposure Harms Children: A Renewed Call for Primary Prevention* [Internet]. 2012 [Erişim Tarihi 16 Aralık 2020]. Erişim adresi: https://www.cdc.gov/nceh/lead/acclpp/final_document_030712.pdf
61. Walter S, Yankel A, Lindern Iv. Age-specific risk factors for lead absorption in children. *Archives of Environmental Health: An International Journal*. 1980;35(1):53-8.
62. Nuwayhid I, Nabulsi M, Muwakkit S, Kouzi S, Salem G, Mikati M, et al. Blood lead concentrations in 1-3 year old Lebanese children: a cross-sectional study. *Environ Health*. 2003;2(1):5.
63. Monnot AD, Christian WV, Abramson MM, Follansbee MH. An exposure and health risk assessment of lead (Pb) in lipstick. *Food and Chemical Toxicology*. 2015;80:253-60.
64. Wu Y, Yang X, Ge J, Zhang J. Blood lead level and its relationship to certain essential elements in the children aged 0 to 14 years from Beijing, China. *Science of the total environment*. 2011;409(16):3016-20.
65. Vahter M, Berglund M, Akesson A, Lidén C. Metals and women's health. *Environ Res*. 2002;88(3):145-55.
66. Goyer RA. Results of lead research: prenatal exposure and neurological consequences. *Environmental Health Perspectives*. 1996;104(10):1050-4.
67. Ren L, Mu X, Chen H, Yang H, Qi W. Prenatal lead exposure related to cord blood brain derived neurotrophic factor (BDNF) levels and impaired neonatal neurobehavioral development. *Zhonghua yu Fang yi xue za zhi [Chinese Journal of Preventive Medicine]*. 2016;50(6):514-8.
68. Cake KM, Bowins RJ, Vaillancourt C, Gordon CL, McNutt RH, Laporte R, et al. Partition of circulating lead between serum and red cells is different for internal and external sources of lead. *Am J Ind Med*. 1996;29(5):440-5.

69. Wani AL, Ara A, Usmani JA. Lead toxicity: a review. *Interdiscip Toxicol*. 2015;8(2):55-64.
70. Silbergeld EK, Schwartz J, Mahaffey K. Lead and osteoporosis: mobilization of lead from bone in postmenopausal women. *Environ Res*. 1988;47(1):79-94.
71. Elmes P. Fibrous minerals and health. *Journal of the Geological Society*. 1980;137(5):525-33.
72. Silbergeld E, Sauk J, Somerman M, Todd A, McNeill F, Fowler B, et al. Lead in bone: storage site, exposure source, and target organ. *Neurotoxicology*. 1993;14(2-3):225-36.
73. Gulson BL, Mizon KJ, Korsch MJ, Palmer JM, Donnelly JB. Mobilization of lead from human bone tissue during pregnancy and lactation—a summary of long-term research. *Science of the Total Environment*. 2003;303(1-2):79-104.
74. Ellenhorn M. Metals and related compounds: Lead. *Medical toxicology*. 1988.
75. WHO. Major poisoning episodes from environmental chemicals, Geneva: World Health Organization; 1994.
76. Yapıcı G CG, Şahin Ü. Çocuklarda asemptomatik kurşun zehirlenmesi. *Cerrahpaşa Journal of Medicine*. 2002;33(3):197-204.
77. Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1999;222(3):236-45.
78. Kaya H. Tilapia’da (*Oreochromis mossambicus*) Kurşun Toksisitesi: Oksidatif Stres ve Bazı Fizyolojik Etkiler [Doktora tezi]. Çanakkale: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi; 2012.
79. Imlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annual Reviews in Microbiology*. 2003;57(1):395-418.
80. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*. 2017;86:715-48.
81. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual review of biochemistry*. 1989;58(1):79-110.
82. Gutteridge J. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical chemistry*. 1995;41(12):1819-28.
83. Busch CJ, Binder CJ. Malondialdehyde epitopes as mediators of sterile inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2017;1862(4):398-406.
84. Djordjevic VB. Free radicals in cell biology. *International review of cytology*. 2004;237:57-91.
85. Kasperczyk S, Słowińska-Łożyńska L, Kasperczyk A, Wielkoszyński T, Birkner E. The effect of occupational lead exposure on lipid peroxidation, protein carbonylation, and plasma viscosity. *Toxicology and industrial health*. 2015;31(12):1165-71.
86. Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. Interaction of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol. *Toxicology*. 2001;156(2-3):93-100.

87. Velmurugan B, Bhuvaneswari V, Nagini S. Antiperoxidative effects of lycopene during N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis. *Fitoterapia*. 2002;73(7-8):604-11.
88. Dursun N, Dogan P, Donmez H. Plasma and erythrocyte lipid peroxide levels in workers with occupational exposure to lead. *Biological trace element research*. 2001;82(1-3):29-34.
89. Hoffman RS NL, Howland MA, Lewin NA, Flomenbaum NE, Goldfrank LR. *Goldfrank's Manual of Toxicologic Emergencies*. New York: McGraw-Hill Medical; 2007.
90. Flora SJ, Saxena G, Mehta A. Reversal of lead-induced neuronal apoptosis by chelation treatment in rats: role of reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2007;322(1):108-16.
91. Vaziri N, Khan M. Interplay of reactive oxygen species and nitric oxide in the pathogenesis of experimental lead-induced hypertension. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2007;34(9):920.
92. Kiziler AR, Aydemir B, Onaran I, Alici B, Ozkara H, Gulyasar T, et al. High levels of cadmium and lead in seminal fluid and blood of smoking men are associated with high oxidative stress and damage in infertile subjects. *Biological trace element research*. 2007;120(1-3):82-91.
93. Telisman S, Cvitković P, Jurasović J, Pizent A, Gavella M, Rocić B. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. *Environmental health perspectives*. 2000;108(1):45-53.
94. Kasperczyk S, Birkner E, Kasperczyk A, Zalejska-Fiolka J. Activity of superoxide dismutase and catalase in people protractedly exposed to lead compounds. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2004;11(2):291-6.
95. Oyagbemi AA, Omobowale TO, Akinrinde AS, Saba AB, Ogunpolu BS, Daramola O. Lack of reversal of oxidative damage in renal tissues of lead acetate-treated rats. *Environmental toxicology*. 2015;30(11):1235-43.
96. Gurer-Orhan H, Sabır HU, Özgüneş H. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology*. 2004;195(2-3):147-54.
97. Patrick L. Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Alternative medicine review*. 2006;11(2).
98. Ergurhan-Ilhan I, Cadir B, Koyuncu-Arslan M, Arslan C, Gultepe FM, Ozkan G. Level of oxidative stress and damage in erythrocytes in apprentices indirectly exposed to lead. *Pediatrics International*. 2008;50(1):45-50.
99. Özbolat G, Abdullah T. Ağır metal toksisitesinin insan sağlığına etkileri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2016;25(4):502-21.
100. Çaylak E. Çocuklarda kurşun zehirlenmesi, oksidatif stres ve tiyol bileşiklerin antioksidan etkisi. *Çocuk Dergisi*. 2010;10(1):13-23.
101. Kelada SN, Shelton E, Kaufmann RB, Khoury MJ. δ -Aminolevulinic acid dehydratase genotype and lead toxicity: a HuGE review. *American journal of epidemiology*. 2001;154(1):1-13.

102. Mudipalli A. Lead hepatotoxicity & potential health effects. *Indian Journal of Medical Research*. 2007;126(6):518.
103. Vij AG, Dhundasi S. Hemopoietic, hemostatic and mutagenic effects of lead and possible prevention by zinc and vitamin C. *Al Ameen J Med Sci*. 2009;2:27-36.
104. Hu H, Wu M-T, Cheng Y, Sparrow D, Weiss S, Kelsey K. The delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism and bone and blood lead levels in community-exposed men: the Normative Aging Study. *Environmental Health Perspectives*. 2001;109(8):827-32.
105. Bergdahl IA, Grubb A, Schütz A, Desnick RJ, Wetmur JG, Sassa S, et al. Lead binding to δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in human erythrocytes. *Pharmacology & toxicology*. 1997;81(4):153-8.
106. Smith CM, Wang X, Hu H, Kelsey KT. A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene may modify the pharmacokinetics and toxicity of lead. *Environmental Health Perspectives*. 1995;103(3):248-53.
107. Cleveland LM, Minter ML, Cobb KA, Scott AA, German VF. Lead Hazards for Pregnant Women and Children: Part 1: Immigrants and the poor shoulder most of the burden of lead exposure in this country. Part 1 of a two-part article details how exposure happens, whom it affects, and the harm it can do. *AJN The American Journal of Nursing*. 2008;108(10):40-9.
108. Fujita H, Nishitani C, Ogawa K. Lead, chemical porphyria, and heme as a biological mediator. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2002;196(2):53-64.
109. Lidsky TI, Schneider JS. Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. *Brain*. 2003;126(1):5-19.
110. Assi MA, Hezmee MNM, Abd Wahid Haron MYM, Sabri MAR. The detrimental effects of lead on human and animal health. *Veterinary world*. 2016;9(6):660.
111. Cocco P, Dosemeci M, Heineman EF. Brain cancer and occupational exposure to lead. *Journal of occupational and environmental medicine*. 1998;40(11):937-42.
112. Bressler J, Kim K-a, Chakraborti T, Goldstein G. Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. *Neurochemical research*. 1999;24(4):595-600.
113. Brent J, Burkhart K, Dargan P, Hatten B, Megarbane B, Palmer R, et al. *Critical care toxicology: diagnosis and management of the critically poisoned patient*: Springer; 2017.
114. Childhood lead poisoning, Albania: WHO; 2010.
115. Goyer RA. Lead toxicity: from overt to subclinical to subtle health effects. *Environmental Health Perspectives*. 1990;86:177-81.
116. Laraque D, Trasande L. Lead poisoning: successes and 21st century challenges. *Pediatrics in review*. 2005;26(12):429.
117. Brent J. A Review of: "Medical Toxicology". *Clinical Toxicology*. 2006;44(3):355-.
118. Triebig G, Weltle D, Valentin H. Investigations on neurotoxicity of chemical substances at the workplace. V. Determination of the motor and sensory

nerve conduction velocity in persons occupationally exposed to lead. *Int Arch Occup Environ Health*. 1984;53(3):189-203.

119. Davis J, Svendsgaard D. Nerve conduction velocity and lead: a critical review and meta-analysis. *Advances in Neurobehavioral Toxicology* (Johnson BL, ed) Chelsea, MI: Lewis Publishers Inc. 1990:353-76.
120. Lindgren KN, Masten VL, Ford DP, Bleecker ML. Relation of cumulative exposure to inorganic lead and neuropsychological test performance. *Occupational and environmental medicine*. 1996;53(7):472-7.
121. Sanders T, Liu Y, Buchner V, Tchounwou PB. Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: a review. *Reviews on environmental health*. 2009;24(1):15.
122. Winneke G, Brockhaus A, Ewers U, Krämer U, Neuf M. Results from the European multicenter study on lead neurotoxicity in children: implications for risk assessment. *Neurotoxicology and Teratology*. 1990;12(5):553-9.
123. Murata K, Iwata T, Dakeishi M, Karita K. Lead toxicity: does the critical level of lead resulting in adverse effects differ between adults and children? *Journal of occupational health*. 2008;0811040039-.
124. Lanphear BP, Hornung R, Khoury J, Yolton K, Baghurst P, Bellinger DC, et al. Erratum: "Low-Level Environmental Lead Exposure and Children's Intellectual Function: An International Pooled Analysis". *Environmental health perspectives*. 2019;127(9):099001.
125. Goodman LS, Gilman A, Brunton LL, Parker KL. *Manual of Pharmacology and therapeutics*: McGraw-Hill Medical; 2008.
126. Schnaas L, Rothenberg SJ, Flores M-F, Martinez S, Hernandez C, Osorio E, et al. Reduced intellectual development in children with prenatal lead exposure. *Environmental health perspectives*. 2006;114(5):791-7.
127. Baker E, White RF, Pothier LJ, Berkey CS, Dinse G, Travers PH, et al. Occupational lead neurotoxicity: improvement in behavioural effects after reduction of exposure. *Occupational and Environmental Medicine*. 1985;42(8):507-16.
128. Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld EK, Rothenberg SJ. Lead exposure and cardiovascular disease—a systematic review. *Environmental health perspectives*. 2007;115(3):472-82.
129. Loghman-Adham M. Renal effects of environmental and occupational lead exposure. *Environ Health Perspect*. 1997;105(9):928-38.
130. Goyer R. Mechanisms of lead and cadmium nephrotoxicity. *Toxicology letters*. 1989;46(1-3):153-62.
131. Batuman V. Lead nephropathy, gout, and hypertension. *Am J Med Sci*. 1993;305(4):241-7.
132. Gonick H, Behari JR. Is lead exposure the principal cause of essential hypertension? *Medical hypotheses*. 2002;59(3):239-46.
133. Waalkes MP, Liu J, Goyer RA, Diwan BA. Metallothionein-I/II double knockout mice are hypersensitive to lead-induced kidney carcinogenesis: role of inclusion body formation. *Cancer Research*. 2004;64(21):7766-72.

134. Report of the Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention, USA: ACCLPP; 2012.
135. Fels LM, Wunsch M, Baranowski J, Norska-Borówka I, Price RG, Taylor SA, et al. Adverse effects of chronic low level lead exposure on kidney function--a risk group study in children. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association*. 1998;13(9):2248-56.
136. Carmignani M, Volpe AR, Boscolo P, Qiao N, Di Gioacchino M, Grilli A, et al. Catcholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. *Life Sciences*. 2000;68(4):401-15.
137. Patra R, Swarup D, Dwivedi S. Antioxidant effects of α tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology*. 2001;162(2):81-8.
138. Gerhardsson L, Chettle D, Englyst V, Nordberg G, Nyhlin H, Scott M, et al. Kidney effects in long term exposed lead smelter workers. *Occupational and Environmental Medicine*. 1992;49(3):186-92.
139. Ehrlich R, Robins T, Jordaan E, Miller S, Mbuli S, Selby P, et al. Lead absorption and renal dysfunction in a South African battery factory. *Occupational and Environmental medicine*. 1998;55(7):453-60.
140. Sharma V, Kansal L. The protective effect of *Rubia cordifolia* against lead nitrate-induced immune response impairment and kidney oxidative damage. *Indian journal of pharmacology*. 2011;43(4):441.
141. Staessen JA, Lauwerys RR, Buchet J-P, Bulpitt CJ, Rondia D, Vanrenterghem Y, et al. Impairment of renal function with increasing blood lead concentrations in the general population. *New England journal of medicine*. 1992;327(3):151-6.
142. Tsaih S-W, Korrick S, Schwartz J, Amarasiriwardena C, Aro A, Sparrow D, et al. Lead, diabetes, hypertension, and renal function: the normative aging study. *Environmental health perspectives*. 2004;112(11):1178-82.
143. Vaziri ND, Sica DA. Lead-induced hypertension: role of oxidative stress. *Current hypertension reports*. 2004;6(4):314-20.
144. Glenn BS, Stewart WF, Schwartz BS, Bressler J. Relation of alleles of the sodium-potassium adenosine triphosphatase $\alpha 2$ gene with blood pressure and lead exposure. *American journal of epidemiology*. 2001;153(6):537-45.
145. Swoboda KJ, Kanavakis E, Xaidara A, Johnson JE, Leppert MF, Schlesinger-Massart MB, et al. Alternating hemiplegia of childhood or familial hemiplegic migraine?: a novel ATP1A2 mutation. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. 2004;55(6):884-7.
146. Nawrot T, Thijs L, Den Hond E, Roels H, Staessen JA. An epidemiological re-appraisal of the association between blood pressure and blood lead: a meta-analysis. *Journal of human hypertension*. 2002;16(2):123-31.
147. Victery W. Evidence for effects of chronic lead exposure on blood pressure in experimental animals: an overview. *Environmental Health Perspectives*. 1988;78:71-6.

148. Cheng Y, Schwartz J, Sparrow D, Aro A, Weiss ST, Hu H. Bone lead and blood lead levels in relation to baseline blood pressure and the prospective development of hypertension the normative aging study. *American journal of epidemiology*. 2001;153(2):164-71.
149. Vupputuri S, He J, Muntner P, Bazzano LA, Whelton PK, Batuman V. Blood lead level is associated with elevated blood pressure in blacks. *Hypertension*. 2003;41(3):463-8.
150. Dietert RR, Lee J-E, Hussain I, Piepenbrink M. Developmental immunotoxicology of lead. *Toxicology and applied pharmacology*. 2004;198(2):86-94.
151. Luebke RW, Chen DH, Dietert R, Yang Y, King M, Luster MI. The comparative immunotoxicity of five selected compounds following developmental or adult exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2006;9(1):1-26.
152. Karmaus W, Brooks KR, Nebe T, Witten J, Obi-Osius N, Kruse H. Immune function biomarkers in children exposed to lead and organochlorine compounds: a cross-sectional study. *Environmental Health*. 2005;4(1):5.
153. Renner R. Exposure on tap: drinking water as an overlooked source of lead. *Environ Health Perspect*; 2010; 118(2): A68–A74.
154. Pounds JG, Long GJ, Rosen JF. Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environmental health perspectives*. 1991;91:17-32.
155. Carmouche JJ, Puzas JE, Zhang X, Tiyyapatanaputi P, Cory-Slechta DA, Gelein R, et al. Lead exposure inhibits fracture healing and is associated with increased chondrogenesis, delay in cartilage mineralization, and a decrease in osteoprogenitor frequency. *Environmental health perspectives*. 2005;113(6):749-55.
156. Campbell JR, Rosier RN, Novotny L, Puzas JE. The association between environmental lead exposure and bone density in children. *Environmental Health Perspectives*. 2004;112(11):1200-3.
157. Vahter M, Berglund M, Åkesson A, Liden C. Metals and women's health. *Environmental research*. 2002;88(3):145-55.
158. Silbergeld EK. Lead in bone: implications for toxicology during pregnancy and lactation. *Environmental health perspectives*. 1991;91:63-70.
159. Schoeters G, Den Hond E, Dhooge W, Van Larebeke N, Leijts M. Endocrine disruptors and abnormalities of pubertal development. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2008;102(2):168-75.
160. Borja-Aburto VH, Hertz-Picciotto I, Lopez MR, Farias P, Rios C, Blanco J. Blood lead levels measured prospectively and risk of spontaneous abortion. *American Journal of Epidemiology*. 1999;150(6):590-7.
161. Zhang H, Liu Y, Zhang R, Liu R, Chen Y. Binding mode investigations on the interaction of lead (II) acetate with human chorionic gonadotropin. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2014;118(32):9644-50.
162. Hu H. Knowledge of diagnosis and reproductive history among survivors of childhood plumbism. *American journal of public health*. 1991;81(8):1070-2.

163. Silbergeld EK. Facilitative mechanisms of lead as a carcinogen. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2003;533(1-2):121-33.
164. Waalkes MP, Diwan BA, Ward JM, Devor DE, Goyer RA. Renal tubular tumors and atypical hyperplasias in B6C3F1 mice exposed to lead acetate during gestation and lactation occur with minimal chronic nephropathy. *Cancer research*. 1995;55(22):5265-71.
165. Statement on the 2006 UK Total Diet Study of Metals and Other Elements. London: COT; 2008.
166. Fayerweather WE, Karns ME, Nuwayhid IA, Nelson TJ. Case-control study of cancer risk in tetraethyl lead manufacturing. *American journal of industrial medicine*. 1997;31(1):28-35.
167. Silbergeld EK, Waalkes M, Rice JM. Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. *American journal of industrial medicine*. 2000;38(3):316-23.
168. Olszewski U, Hamilton G. Mechanisms of cytotoxicity of anticancer titanocenes. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. 2010;10(4):302-11.
169. Anttila A, Heikkilä P, Pukkala E, Nykyri E, Kauppinen T, Hernberg S, et al. Excess lung cancer among workers exposed to lead. *Scandinavian journal of work, environment & health*. 1995:460-9.
170. Fu H, Boffetta P. Cancer and occupational exposure to inorganic lead compounds: a meta-analysis of published data. *Occupational and Environmental Medicine*. 1995;52(2):73-81.
171. Lundström N-G, Nordberg G, Englyst V, Gerhardsson L, Hagmar L, Jin T, et al. Cumulative lead exposure in relation to mortality and lung cancer morbidity in a cohort of primary smelter workers. *Scandinavian journal of work, environment & health*. 1997:24-30.
172. Wynant W, Siemiatycki J, Parent M-É, Rousseau M-C. Occupational exposure to lead and lung cancer: results from two case-control studies in Montreal, Canada. *Occupational and environmental medicine*. 2013;70(3):164-70.
173. Beach JR, Henning SJ. The Distribution of Lead in Milk and the Fate of Milk Lead in the Gastrointestinal Tract of Suckling Rats. *Pediatric Research*. 1988;23(1):58-62.
174. D'Souza H S, Dsouza SA, Menezes G, Venkatesh T. Diagnosis, evaluation, and treatment of lead poisoning in general population. *Indian J Clin Biochem*. 2011;26(2):197-201.
175. Söylemezoğlu T, Kayaaltı Z, Yılmaz H, Odabaşı M. Kronik metal zehirlenmesinde kalsiyum disodyum etilendiamin tetraasetat tedavisinin kurşun düzeylerine etkisi. 2009; 38(1):17-27.
176. Gracia RC, Snodgrass WR. Lead toxicity and chelation therapy. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2007;64(1):45-53.
177. Gerhardsson L, Aaseth J. Guidance for clinical treatment of metal poisonings—Use and misuse of chelating agents. *Chelation therapy in the treatment of metal intoxication Academic Press, London*. 2016:313-41.

178. Cao Y, Skaug MA, Andersen O, Aaseth J. Chelation therapy in intoxications with mercury, lead and copper. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2015;31:188-92.
179. Chisolm JJ. BAL, EDTA, DMSA and DMPS in the treatment of lead poisoning in children. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. 1992;30(4):493-504.
180. Glotzer DE, Bauchner H. Management of childhood lead poisoning: a survey. *Pediatrics*. 1992;89(4):614-8.
181. Şakul AS. AntiAging için Ağır Metal Detoksifikasyonu ve Şelasyon Tedavisi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. 2008;28(6):236.
182. Chen CY, Chen CY. Stability constants of polymer-bound iminodiacetate-type chelating agents with some transition-metal ions. *Journal of applied polymer science*. 2002;86(8):1986-94.
183. Chaberek Jr S, Martell A. Stability of metal chelates. I. Iminodiacetic and iminodipropionic acids. *Journal of the American Chemical Society*. 1952;74(20):5052-6.
184. Harris WR, Chen Y, Stenback J, Shah B. Stability constants for dimercaptosuccinic acid with bismuth (III), zinc (II), and lead (II). *Journal of coordination chemistry*. 1991;23(1-4):173-86.
185. van Eijkeren JC, Olie JDN, Bradberry SM, Vale JA, De Vries I, Clewell III HJ, et al. Modeling the effect of succimer (DMSA; dimercaptosuccinic acid) chelation therapy in patients poisoned by lead. *Clinical Toxicology*. 2017;55(2):133-41.
186. Cremin Jr J, Luck M, Laughlin N, Smith D. Efficacy of succimer chelation for reducing brain lead in a primate model of human lead exposure. *Toxicology and applied pharmacology*. 1999;161(3):283-93.
187. Warniment CB, Tsang K, Galazka SS. Lead poisoning in children. *American Family Physician*. 2010;81(6):751-7.
188. Bradberry S, Vale A. A comparison of sodium calcium edetate (edetate calcium disodium) and succimer (DMSA) in the treatment of inorganic lead poisoning. *Clinical toxicology*. 2009;47(9):841-58.
189. Lee B-K, Schwartz BS, Stewart W, Ahn K-D. Provocative chelation with DMSA and EDTA: evidence for differential access to lead storage sites. *Occupational and environmental medicine*. 1995;52(1):13-9.
190. Sánchez-Fructuoso AI, Cano M, Arroyo M, Fernández C, Prats D, Barrientos A. Lead mobilization during calcium disodium ethylenediaminetetraacetate chelation therapy in treatment of chronic lead poisoning. *American journal of kidney diseases*. 2002;40(1):51-8.
191. Seaton CL, Lasman J, Smith DR. The effects of CaNa₂EDTA on brain lead mobilization in rodents determined using a stable lead isotope tracer. *Toxicology and applied pharmacology*. 1999;159(3):153-60.
192. Jones MM, Basinger MA, Gale GR, Atkins LM, Smith AB, Stone A. Effect of chelate treatments on kidney, bone and brain lead levels of lead-intoxicated mice. *Toxicology*. 1994;89(2):91-100.
193. Markowitz ME, Bijur PE, Ruff HA, Balbi K, Rosen JF. Moderate lead poisoning: trends in blood lead levels in unchelated children. *Environmental health perspectives*. 1996;104(9):968-72.

194. Besunder JB, Super DM, Anderson RL. Comparison of dimercaptosuccinic acid and calcium disodium ethylenediaminetetraacetic acid versus dimercaptopropanol and ethylenediaminetetraacetic acid in children with lead poisoning. *The Journal of pediatrics*. 1997;130(6):966-71.
195. Waters RS, Bryden NA, Patterson KY, Veillon C, Anderson RA. EDTA chelation effects on urinary losses of cadmium, calcium, chromium, cobalt, copper, lead, magnesium, and zinc. *Biological trace element research*. 2001;83(3):207-21.
196. Control CfD, Prevention. Deaths associated with hypocalcemia from chelation therapy--Texas, Pennsylvania, and Oregon, 2003-2005. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2006;55(8):204.
197. Lowry JA. Oral chelation therapy for patients with lead poisoning. *Am Acad Pediatr*. 2010;116:1036-46.
198. Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radical Biology and Medicine*. 2000;29(10):927-45.
199. Aneni EC, Escolar E, Lamas GA. Chronic toxic metal exposure and cardiovascular disease: mechanisms of risk and emerging role of chelation therapy. *Current atherosclerosis reports*. 2016;18(12):81.
200. Björklund G, Mutter J, Aaseth J. Metal chelators and neurotoxicity: lead, mercury, and arsenic. *Archives of toxicology*. 2017;91(12):3787-97.
201. Vance DE, Vance JE. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. 4th ed. Elsevier; 1996.
202. Mead JF. *Lipids: chemistry, biochemistry, and nutrition*: Plenum Press; 1986.
203. Kayahan M. *Lipidler*. Ankara: Gıda Mühendisliği Yayınları; 1998:152-3.
204. Sönmez H. *Lipid Metabolizmasının Ana Hatları Primer ve Sekonder Hiperlipidemiler*. Türkiye Klinikleri Kardiyoloji Dergisi. 2000;13(1):1-8.
205. Segré D, Ben-Eli D, Deamer DW, Lancet D. The lipid world. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. 2001;31(1-2):119-45.
206. Ası T. *Tablolarla Biyokimya Cilt II* [İnternet]. 1999 [Erişim Tarihi 25 Aralık 2021]. Erişim adresi: <http://veterinary.ankara.edu.tr/~fidanci>.
207. Aksu N, Sabuncuoğlu S. Oksisteroller: Hücresel Etkileri ve Kronik Hastalıklarla İlişkileri. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi*. 2019;8(3):225-34.
208. M A. *Beslenme Biyokimyası*. Ankara: Hatipoğlu Yayınevi; 2008. 680 p.
209. van Meer G, de Kroon AI. Lipid map of the mammalian cell. *Journal of cell science*. 2011;124(1):5-8.
210. Russell DW. Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2000;1529(1-3):126-35.
211. Eraslan Y. *Organik Asidemili Hastalarda Oksisterol Türlerinin Lc-Ms/Ms Yöntemi ile İncelenmesi* [Yüksek lisans tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2018.
212. Miyoshi N, Iuliano L, Tomono S, Ohshima H. Implications of cholesterol autoxidation products in the pathogenesis of inflammatory diseases. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;446(3):702-8.

213. Pikuleva IA. Cholesterol-metabolizing cytochromes P450: implications for cholesterol lowering. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2008;4(11):1403-14.
214. Smith LL. Cholesterol autoxidation 1981–1986. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1987;44(2-4):87-125.
215. Lange Y, Ye J, Strebel F. Movement of 25-hydroxycholesterol from the plasma membrane to the rough endoplasmic reticulum in cultured hepatoma cells. *Journal of lipid research*. 1995;36(5):1092-7.
216. Schroepfer Jr GJ. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiological reviews*. 2000;80(1):361-554.
217. Brown AJ, Jessup W. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1999;142(1):1-28.
218. Aksu N. Silikozis Hastalarında Oksisterol Düzeylerinin Değerlendirilmesi [Yüksek lisans tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2018.
219. Pandey JK, Agarwal D. Biomarkers: A potential prognostic tool for silicosis. *Indian journal of occupational and environmental medicine*. 2012;16(3):101.
220. Laney AS, Weissman DN. The classic pneumoconioses: new epidemiological and laboratory observations. *Clinics in Chest Medicine*. 2012;33(4):745-58.
221. Vejux A, Abed-Vieillard D, Hajji K, Zarrouk A, Mackrill JJ, Ghosh S, et al. 7-Ketocholesterol and 7 β -hydroxycholesterol: In vitro and animal models used to characterize their activities and to identify molecules preventing their toxicity. *Biochemical pharmacology*. 2020;173:113648.
222. Griffiths WJ, Wang Y. Oxysterols as lipid mediators: Their biosynthetic genes, enzymes and metabolites. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2020;147:106381.
223. Iuliano L. Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms. *Chemistry and physics of lipids*. 2011;164(6):457-68.
224. Anderson A, Campo A, Fulton E, Corwin A, Jerome III WG, O'Connor MS. 7-Ketocholesterol in disease and aging. *Redox biology*. 2020;29:101380.
225. Terasaka N, Wang N, Yvan-Charvet L, Tall AR. High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(38):15093-8.
226. Lyons MA, Brown AJ. 7-Ketocholesterol. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 1999;31(3-4):369-75.
227. Samadi A. Analysis Of Oxysterol Species In Type 1 And Type 2 Diabetes Mellitus By Lc-ms/ms Method [Doktora tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2016.
228. Lin C-Y, Huo C, Kuo L-K, Hiipakka RA, Jones RB, Lin H-P, et al. Cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol suppresses proliferation, migration, and invasion of human prostate cancer cells. *PLoS One*. 2013;8(6):e65734.
229. Hu H, Zhou Y, Leng T, Liu A, Wang Y, You X, et al. The major cholesterol metabolite cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol functions as an endogenous neuroprotectant. *Journal of Neuroscience*. 2014;34(34):11426-38.

230. Boenzi S, Deodato F, Taurisano R, Goffredo BM, Rizzo C, Dionisi-Vici C. Evaluation of plasma cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol and 7-ketocholesterol in inherited disorders related to cholesterol metabolism. *Journal of lipid research*. 2016;57(3):361-7.
231. Jusakul A, Loilome W, Namwat N, Techasen A, Kuver R, Ioannou GN, et al. Anti-apoptotic phenotypes of cholestan-3 β , 5 α , 6 β -triol-resistant human cholangiocytes: Characteristics contributing to the genesis of cholangiocarcinoma. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2013;138:368-75.
232. Çalış İU. Meme kanserinin metastazında sfingozin 1-fosfat ve reseptörlerinin rolü [Yüksek lisans tezi]. Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi; 2016.
233. Furuya H, Shimizu Y, Kawamori T. Sphingolipids in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2011;30(3-4):567-76.
234. Hla T. Sphingosine 1-phosphate receptors. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2001;64(1-4):135-42.
235. Veltman M, Stolarczyk M, Radzioch D, Wojewodka G, De Sanctis JB, Dik WA, et al. Correction of lung inflammation in a F508del CFTR murine cystic fibrosis model by the sphingosine-1-phosphate lyase inhibitor LX2931. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2016;311(5):L1000-L14.
236. Gandy KAO, Obeid LM. Targeting the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate pathway in disease: review of sphingosine kinase inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2013;1831(1):157-66.
237. Maceyka M, Harikumar KB, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends in cell biology*. 2012;22(1):50-60.
238. Kim RH, Takabe K, Milstien S, Spiegel S. Export and functions of sphingosine-1-phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2009;1791(7):692-6.
239. Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003;4(5):397-407.
240. Pyne NJ, Pyne S. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2010;10(7):489-503.
241. Sarkar S, Maceyka M, Hait NC, Paugh SW, Sankala H, Milstien S, et al. Sphingosine kinase 1 is required for migration, proliferation and survival of MCF-7 human breast cancer cells. *FEBS letters*. 2005;579(24):5313-7.
242. Ling B, Chen L, Alcorn J, Ma B, Yang J. Sphingosine-1-phosphate: a potential therapeutic agent against human breast cancer. *Investigational new drugs*. 2011;29(2):396-9.
243. Ancellin N, Colmont C, Su J, Li Q, Mittereder N, Chae S-S, et al. Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme: sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(8):6667-75.
244. Spiegel S, Milstien S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(6):403-15.

245. Dai L, Liu Y, Xie L, Wu X, Qiu L, Di W. Sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate (S1P)/S1P receptor axis is involved in ovarian cancer angiogenesis. *Oncotarget*. 2017;8(43):74947.
246. Łukomska A, Baranowska-Bosiacka I, Budkowska M, Pilutin A, Tarnowski M, Dec K, et al. The effect of low levels of lead (Pb) in the blood on levels of sphingosine-1-phosphate (S1P) and expression of S1P receptor 1 in the brain of the rat in the perinatal period. *Chemosphere*. 2017;166:221-9.
247. Geho DH, Bandle RW, Clair T, Liotta LA. Physiological mechanisms of tumor-cell invasion and migration. *Physiology*. 2005;20(3):194-200.
248. Başaran E, Aras S, Cansaran-duman D. Genomik, proteomik, metabolomik kavramlarına genel bakış ve uygulama alanları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 2010;67(2):85-96.
249. Bujak R, Struck-Lewicka W, Markuszewski MJ, Kaliszan R. Metabolomics for laboratory diagnostics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015;113:108-20.
250. Kızıldaş N. Mide Kanseri Dokularında Hedeflenmemiş Metabolomik Teknolojileri Yardımıyla Alternatif Tanı Ve Yöntemlerinin Geliştirilmesi [Yüksek lisans tezi]. Erzurum: Atatürk Üniversitesi; 2019.
251. Horgan RP, Kenny LC. ‘Omic’ technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician & Gynaecologist*. 2011;13(3):189-95.
252. Yazıcı F, Aydın S. Toksikolojide Toksikogenomikler ve Yeni Gelişmeler. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi*. 2019;8(1):29-42.
253. Lin YS, Shireman L, McFeely S. Metabolomics approaches in toxicology. McQueen C, editor. *Comprehensive toxicology*, vol. 1: General principles. Amsterdam: Elsevier Science; 2017. pp. 391–414.
254. Kasap H, Pazarıcı P, Erkoç MA. Sistem Biyolojisi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2010;19(1):25-35.
255. Ayhan S. Metabolom ve Transkriptom Profillemesi ile İnsan Kemik İliğinde Hematopoetik Niş Karakterizasyonu [Doktora tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2015.
256. Wenk MR. The emerging field of lipidomics. *Nature reviews Drug discovery*. 2005;4(7):594-610.
257. Corona G, Cannizzaro R, Miolo G, Caggiari L, De Zorzi M, Repetto O, et al. Use of metabolomics as a complementary omic approach to implement risk criteria for first-degree relatives of gastric cancer patients. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(3):750.
258. Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clinical cancer research*. 2009;15(2):431-40.
259. Davis VW, Bathe OF, Schiller DE, Slupsky CM, Sawyer MB. Metabolomics and surgical oncology: Potential role for small molecule biomarkers. *Journal of surgical oncology*. 2011;103(5):451-9.
260. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, et al. HMDB: the human metabolome database. *Nucleic acids research*. 2007;35(suppl_1):D521-D6.

261. Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and functional genomics*. 2001;2(3):155-68.
262. Ryan D, Robards K. Metabolomics: the greatest omics of them all? *Analytical chemistry*. 2006;78(23):7954-8.
263. Nowak C, Salihovic S, Ganna A, Brandmaier S, Tukiainen T, Broeckling CD, et al. Effect of insulin resistance on monounsaturated fatty acid levels: a multi-cohort non-targeted metabolomics and Mendelian randomization study. *PLoS genetics*. 2016;12(10):e1006379.
264. Naz S, Vallejo M, García A, Barbas C. Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. *Journal of Chromatography A*. 2014;1353:99-105.
265. Armitage EG, Barbas C. Metabolomics in cancer biomarker discovery: current trends and future perspectives. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2014;87:1-11.
266. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass spectrometry reviews*. 2007;26(1):51-78.
267. Olkkonen VM, Béaslas O, Nissilä E. Oxysterols and their cellular effectors. *Biomolecules*. 2012;2(1):76-103.
268. Dyer RG, Stewart MW, Mitcheson J, George K, Alberti M, Laker MF. 7-ketocholesterol, a specific indicator of lipoprotein oxidation, and malondialdehyde in non-insulin dependent diabetes and peripheral vascular disease. *Clinica chimica acta*. 1997;260(1):1-13.
269. Kang J-S. Principles and applications of LC-MS/MS for the quantitative bioanalysis of analytes in various biological samples. *Tandem mass spectrometry-Applications and principles*. 2012;2012:441-92.
270. Niessen W, Tinke A. Liquid chromatography-mass spectrometry general principles and instrumentation. *Journal of Chromatography A*. 1995;703(1-2):37-57.
271. Comitre ALD, Reis BF. Automatic flow procedure based on multicommutation exploiting liquid-liquid extraction for spectrophotometric lead determination in plant material. *Talanta*. 2005;65(4):846-52.
272. Woldegebriel M, Vivó-Truyols G. Probabilistic model for untargeted peak detection in LC-MS using bayesian statistics. *Analytical chemistry*. 2015;87(14):7345-55.
273. Jiang X, Sidhu R, Porter FD, Yanjanin NM, Speak AO, Te Vruchte DT, et al. A sensitive and specific LC-MS/MS method for rapid diagnosis of Niemann-Pick C1 disease from human plasma. *Journal of lipid research*. 2011;52(7):1435-45.
274. Goyer RA. Lead toxicity: current concerns. *Environ Health Perspect*. 1993;100:177-87.
275. Batuman V. Lead nephropathy, gout, and hypertension. *The American journal of the medical sciences*. 1993;305(4):241-7.
276. Njati SY, Maguta MM. Lead-based paints and children's PVC toys are potential sources of domestic lead poisoning—A review. *Environmental pollution*. 2019;249:1091-105.

277. Kaya S, Akar F. Metaller, Diğer İnorganik Ve Radyoetkin Maddeler. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji, Medisan Yayınevi. 1998;1:119-54.
278. Driscoll TR, Carey RN, Peters S, Glass DC, Benke G, Reid A, et al. The Australian work exposures study: occupational exposure to lead and lead compounds. *Annals of Occupational Hygiene*. 2016;60(1):113-23.
279. Organization WH. Environmental health criteria 165, inorganic lead. International Programme on Chemical Safety (ICPS). Geneva, Switzerland: United Nations Environment Programme, International ...; 1995.
280. Grandjean P. Health significance of metals. Public health and preventive medicine Prentice-Hall International Inc, London, UK. 1992.
281. Stoleski S, Karadžinska-Bislimovska J, Stikova E, Risteska-Kuc S, Mijakoski D, Minov J. Adverse effects in workers exposed to inorganic lead. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 2008;59(1):19-29.
282. Björkhem I, Diczfalusy U. Oxysterols: friends, foes, or just fellow passengers? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002;22(5):734-42.
283. Gidlow D. Lead toxicity. *Occupational medicine*. 2004;54(2):76-81.
284. Flora SJ, Pachauri V. Chelation in metal intoxication. *International journal of environmental research and public health*. 2010;7(7):2745-88.
285. Kamali H, Mohri M. Effects of heparin, citrate, and EDTA on plasma biochemistry of cat: comparison with serum. *Revue Med Vet*. 2015;166(9-10):275-9.
286. Sakthithasan K, Lévy P, Poupon J, Garnier R. A comparative study of edetate calcium disodium and dimercaptosuccinic acid in the treatment of lead poisoning in adults. *Clinical Toxicology*. 2018;56(11):1143-9.
287. Sabuncuoğlu S, Öztaş Y. Oxysterols and their metabolic roles beyond cholesterol: a reappraisal. *Acta Medica*. 2014;45(1):75-9.
288. Kuver R. Mechanisms of oxysterol-induced disease: insights from the biliary system. *Clinical lipidology*. 2012;7(5):537-48.
289. Goldstein JL, Ho Y, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1979;76(1):333-7.
290. Aksu N, Samadî A, Yalçınkaya A, Çetin T, Eser B, Lay İ, et al. Evaluation of oxysterol levels of patients with silicosis by LC-MS/MS method. *Molecular and cellular biochemistry*. 2020;467(1):117-25.
291. Kasperczyk S, Birkner E, Kasperczyk A, Kasperczyk J. Lipids, lipid peroxidation and 7-ketocholesterol in workers exposed to lead. *Human & experimental toxicology*. 2005;24(6):287-95.
292. Leong WI, Saba JD. S1P metabolism in cancer and other pathological conditions. *Biochimie*. 2010;92(6):716-23.
293. Li L, Wang C, Yang H, Liu S, Lu Y, Fu P, et al. Metabolomics reveal mitochondrial and fatty acid metabolism disorders that contribute to the development of DKD in T2DM patients. *Molecular BioSystems*. 2017;13(11):2392-400.

- 294.** Sansone S-A, Fan T, Goodacre R, Griffin JL, Hardy NW, Kaddurah-Daouk R, et al. The metabolomics standards initiative. *Nature biotechnology*. 2007;25(8):846-9.
- 295.** Kelly RS, Bayne H, Spiro II A, Vokonas P, Sparrow D, Weiss ST, et al. Metabolomic signatures of lead exposure in the VA Normative Aging Study. *Environmental Research*. 2020;190:110022.
- 296.** Fu Z, Xi S. The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicology mechanisms and methods*. 2020;30(3):167-76.

8. EKLER

EK-1: Etik Kurul İzin Belgesi



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557-1846


Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 01 EKİM 2019 SALI
Toplantı No : 2019/23
Proje No : GO 19/827(Değerlendirme Tarihi: 03.09.2019)
Karar No : 2019/23-02

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Suna SABUNCUOĞLU'nun sorumlu araştırmacı olduğu, Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU, Uzm. Dr. Türkan Nadir ÖZİŞ ile birlikte çalışacakları ve Ecz. Tuğçe ÇETİN'in yüksek lisans tezi olan, GO 19/827 kayıt numaralı, "*Kurşun Maruziyeti ve Şelasyon Tedavisi Sonrası Metabolomik ve Lipidomik Analizler*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 02 Ekim 2019-02 Ekim 2020 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan **uygun bulunmuştur**. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

1. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	(Başkan)	İZİNLİ	9. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR	(Üye)
2. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU	(Üye)	İZİNLİ	10. Doç. Dr. Can Ebru KURT	(Üye)
3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARIN	(Üye)	İZİNLİ	11. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL	(Üye)
4. Prof. Dr. Nurdan SAMURAM	(Üye)	İZİNLİ	12. Dr. Öğr. Üyesi Özay GÖKÖZ	(Üye)
5. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL	(Üye)	İZİNLİ	13. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	
6. Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU	(Üye)	İZİNLİ	14. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGİLEN	
7. Prof. Dr. M. Özgür UYANIK	(Üye)	İZİNLİ	15. Av. Meltem ONURLU	(Üye)
8. Doç. Dr. Gözde GİRGİN	(Üye)	İZİNLİ		

EK-2: Dijital Makbuz

Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Tuğçe Çetin
Assignment title: Tuğçe Çetin
Submission title: Tuğçe Çetin ylisans tezi
File name: TUGCECET_N15022021.pdf
File size: 2.88M
Page count: 120
Word count: 25,731
Character count: 167,639
Submission date: 15-Feb-2021 03:14PM (UTC+0300)
Submission ID: 1509982716

TC
SAĞLIK BAKANLIĞI
SAGLIK BULGUSUNU OLCME

KURDAN HAREKİYETİ VE SIKLISSIN TEDAVİSİ GÖRANİ
METABOLİZME VE LİPİDOME ANALİZLER

Dr. Tuğçe ÇETİN

Fakülte Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya

ANKARA
2021

EK-3: Orijinallik Raporu

TEZİN TAM BAŞLIĞI: KURŞUN MARUZİYETİ VE ŞELASYON TEDAVİSİ SONRASI METABOLOMİK VE LİPİDOMİK ANALİZLER

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: TUĞÇE ÇETİN

DOSYANIN TOPLAM SAYFA SAYISI: 142

ORIGINALITY REPORT			
6%	4%	2%	2%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS
PRIMARY SOURCES			
1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source	4%	
2	Neslihan AKSU, Suna SABUNCUOĞLU. "Oxysterols: Cellular Effects and Relations with Chronical Diseases", Journal of Literature Pharmacy Sciences, 2019 Publication	2%	
Exclude quotes	On	Exclude matches	< 2%
Exclude bibliography	On		