

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

**MERMER İŞÇİLERİNDE GENOTOKSİK ETKİ  
MEKANİZMALARININ VE OKSİDATİF STRES İLE İLİŞKİLİ  
DEĞİŞİKLİKLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Uzm. Ecz. Merve BECİT**

**Farmasötik Toksikoloji Programı  
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA  
2021**



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

**MERMER İŞÇİLERİNDE GENOTOKSİK ETKİ  
MEKANİZMALARININ VE OKSİDATİF STRES İLE İLİŞKİLİ  
DEĞİŞİKLİKLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Uzm. Ecz. Merve BECİT**

**Farmasötik Toksikoloji Programı  
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ**

**ANKARA  
2021**

## ÖZET

**Becit, M. Mermer İşçilerinde Genotoksik Etki Mekanizmalarının ve Oksidatif Stres ile İlişkili Değişikliklerin Değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2021.** Mermer işleme tesislerinde çalışan işçiler kesme, cilalama ve şekil verme gibi süreçlerde yüksek düzeyde oluşan solunabilir mermer tozuna (<10 µm) maruz kalmaktadır. Mermer tozu esas olarak kalsiyum karbonattan oluşmakta ve farklı oranlarda kristal silika içermektedir. Mermer tozunun sağlık üzerine olumsuz etkilerinden hem partiküle tozun hem de kristal yapılu silikanın sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Mesleki olarak mermer tozuna maruz kalan işçilerin genotoksisite ve oksidatif stres parametrelerini değerlendiren sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu çalışmada İncehisar (Afyonkarahisar) bölgesindeki mermer işleme tesislerinde çalışan işçilerde; mermer tozunun oksidatif stres, genotoksisite ve immünotoksisite mekanizmalarını nasıl etkilediğini açıklığa kavuşturmak amaçlanmıştır. Oksidatif stres ve immün sistem parametreleri, ticari kitler kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Genotoksisite ise sırasıyla lenfositlerde ve yanak epitel hücrelerinde tek hücre jel elektroforez (comet) ve mikroçekirdek yöntemleri ile değerlendirilmiştir. İşçilerde (n= 48) süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz enzim aktiviteleri ve glutatyon ve clara hücre sekreteruar protein düzeyleri kontrol grubuna (n= 41) kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunurken, malondialdehit, 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin, tümör nekroz faktör-alfa ve interlökin-1beta düzeyleri ise istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur. İşçilerde DNA hasarı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek olup DNA hasarındaki artış ile maruz kalma süresi arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur. Ayrıca işçilerin yanak epitelindeki mikroçekirdek sıklığı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Sonuçlar, mermer endüstrisinde çalışan işçiler için immünotoksik ve genotoksik risk olasılığı olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Mermer tozu, mesleki maruziyet, genotoksisite, immünotoksisite

**Destekleyen Kurum:** Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi Doktora Tez Projesi (Proje No: TDK-2020-18626)

## ABSTRACT

**Becit, M. Evaluation of Genotoxic Mechanisms and Its Oxidative Stress-Related Changes in Marble Workers, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Pharmaceutical Toxicology, Ankara, 2021.** Workers working in marble processing plants are exposed to high levels of respirable marble dust (<10 µm) in processes such as cutting, polishing, shaping. Marble dust is mainly composed of calcium carbonate and contains crystalline silica in different proportions. It is thought that both particulate dust and crystalline silica may be responsible for the adverse health effects of marble dust. There are a limited number of studies evaluating the genotoxicity and oxidative stress parameters of workers occupationally exposed to marble dust. In this study, among the workers working in the marble processing plants in Iscehisar (Afyonkarahisar) region; it is aimed to clarify how marble dust affects oxidative stress, genotoxicity and immunotoxicity mechanisms. Oxidative stress and immune system parameters were determined spectrophotometrically using commercial kits. Genotoxicity was evaluated by single cell gel electrophoresis (comet) and micronucleus methods in lymphocytes and buccal epithelial cells, respectively. Superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, glutathione peroxidase enzyme activities and glutathione and clara cell secretory protein levels were found to be statistically significantly lower in workers (n = 48) compared to the control group (n = 41), while the levels of malondialdehyde, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta were found to be statistically significantly higher. DNA damage in workers was statistically significantly higher than in the control group, and a strong correlation was found between the increase in DNA damage and the exposure time. In addition, the frequency of micronucleus in the buccal epithelium of the workers was found to be statistically significantly higher than the controls. The results show that there is a possibility of immunotoxic and genotoxic risks for workers working in the marble industry.

**Key Words:** Marble dust, occupational exposure, genotoxicity, immunotoxicity

**Supported by:** Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit Doctorate Thesis Project (Project no: TDK-2020-18626)

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xvii
TABLolar	xviii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Mermer Tozu ve Özellikleri	3
2.2. Türkiye ve Dünya'daki Mermer Üretim Alanları, Karşılaşılan Sorunlar ve Koruyucu Önlemler	4
2.3. Toz Partiküllerinin Toksisitesi	6
2.3.1. Partikül Maddenin Özellikleri	6
2.3.2. Partiküllerin Solunum Sistemindeki Davranışları ve Solunum Yollarının Savunma Sistemleri	6
2.3.3. Toz Partiküllerinin İnsan Sağlığı Üzerine Toksik Etkileri	9
2.4. Silika Toksisitesi	11
2.4.1. Silikanın Fizikokimyasal Özellikleri	11
2.4.2. Silikanın Farmakokinetik Özellikleri	12
2.4.3. Silika Maruziyeti	13
2.4.4. Silikanın Akut ve Tekrarlı Doz Toksisitesi	14
2.4.5. Silikanın Mutajenik, Karsinojenik ve Teratojenik Etkileri	15
2.4.6. Silikanın İnsan Sağlığı Üzerindeki Toksik Etkileri	16
2.5. Kalsiyum Karbonat Toksisitesi	19
2.5.1. Kalsiyum Karbonatın Fizikokimyasal Özellikleri	19
2.5.2. Kalsiyum Karbonat Toksisitesi	19

2.6. İşyeri Kaynaklı Toz ve Silika Maruziyetinde Yasal Düzenlemeler	21
2.7. Oksidatif Stres	22
2.7.1. Serbest Radikaller	23
2.7.2. Oksidatif Stres Oluşumu	25
2.7.3. Antioksidan Sistemler	28
2.8. İmmünotoksik Yanıt ve Bazı İmmün Yanıt Göstergelerinin Özellikleri	31
2.8.1. Tümör Nekroz Faktör-alfa	32
2.8.2. İnterlökin-1beta	33
2.8.3. Clara Hücre Protein 16	34
2.9. Tek Hücre Jel Elektroforez (Comet) Yöntemi	34
2.10. Mikroçekirdek Yöntemi	37
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	42
3.1. Kimyasal Maddeler	42
3.2. Araç ve Gereçler	43
3.3. Çözeltilerin Hazırlanması	44
3.3.1. Süperoksit Dismutaz Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	44
3.3.2. Katalaz Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	45
3.3.3. Glutasyon Redüktaz Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	46
3.3.4. Glutasyon Peroksidaz Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	47
3.3.5. Glutasyon Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	48
3.3.6. Malondialdehit Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	49
3.3.7. 8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	50
3.3.8. Tümör Nekroz Faktör-alfa Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	51
3.3.9. İnterlökin-1beta Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	52
3.3.10. Clara Hücre Protein 16 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	54
3.3.11. Tek Hücre Jel Elektroforez Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	55
3.3.12. Mikroçekirdek Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	57
3.4. Çalışma Grubunun Seçimi	57
3.5. Çalışma Grubundan Biyolojik Örneklerin Alınması	58
3.6. İşyeri Ortamında Maruziyetin Değerlendirilmesi	58
3.7. Biyokimyasal Parametrelerinin Değerlendirilmesi	59
3.8. Oksidatif Stres ve İmmün Parametrelerinin Değerlendirilmesi	59

3.8.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü	60
3.8.2. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü	61
3.8.3. Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Ölçümü	62
3.8.4. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Ölçümü	64
3.8.5. Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi	65
3.8.6. Malondialdehit Düzeylerinin Belirlenmesi	66
3.8.7. 8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin Düzeylerinin Belirlenmesi	67
3.8.8. Tümör Nekroz Faktör-alfa Düzeylerinin Belirlenmesi	68
3.8.9. İnterlökin-1beta Düzeylerinin Belirlenmesi	70
3.8.10. Clara Hücre Protein 16 Düzeylerinin Belirlenmesi	71
3.9. Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi ile DNA Hasarının Belirlenmesi	72
3.10. Yanak Epitel Hücrelerinde Mikroçekirdek Yöntemi	74
3.11. İstatistiksel Yöntemler	75
<b>4. BULGULAR</b>	76
4.1. Demografik Bulgular	76
4.2. İşyeri Ortamında Toz Ölçüm Sonuçları	84
4.3. Solunum Fonksiyon Testi ve Akciğer Filmine İlişkin Bulgular	87
4.4. Biyokimyasal Parametrelere İlişkin Bulgular	88
4.5. Oksidatif Stres ve İmmün Parametrelere İlişkin Bulgular	91
4.5.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesine İlişkin Bulgular	95
4.5.2. Katalaz Aktivitesine İlişkin Bulgular	98
4.5.3. Glutasyon Redüktaz Aktivitesine İlişkin Bulgular	100
4.5.4. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesine İlişkin Bulgular	102
4.5.5. Glutasyon Düzeylerine İlişkin Bulgular	104
4.5.6. Malondialdehit Düzeylerine İlişkin Bulgular	106
4.5.7. 8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin Düzeylerine İlişkin Bulgular	108
4.5.8. Tümör Nekroz Faktör-alfa Düzeylerine İlişkin Bulgular	110
4.5.9. İnterlökin-1beta Düzeylerine İlişkin Bulgular	112
4.5.10. Clara Hücre Protein 16 Düzeylerine İlişkin Bulgular	114
4.6. Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemine İlişkin Bulgular	116
4.7. Yanak Epitel Hücrelerinde Mikroçekirdek Yöntemine İlişkin Bulgular	120
<b>5. TARTIŞMA</b>	125



<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	133
<b>7. KAYNAKLAR</b>	136
<b>8. EKLER</b>	
<b>EK-1: Etik Kurul İzin Belgesi</b>	
<b>EK-2: Orjinallik Raporu</b>	
<b>EK-3: Anket Formu</b>	
<b>EK-4: Tez Çalışması ile İlgili Yayın</b>	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>-CH<sub>2</sub></b>	Metilen grubu
<b>-SiOH</b>	Silanol
<b>(SiO<sub>4</sub>)<sup>-4</sup></b>	Silisyum-oksijen tetrahedral yapı
<b>8-OHdG</b>	8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin
<b>ACGIH</b>	<i>American Conference of Governmental Industrial Hygienists</i> , Amerikan Hükümeti Endüstri Hijyenistleri Konferansı
<b>ALT</b>	Alanin aminotransferaz
<b>AST</b>	Aspartat aminotransferaz
<b>CaCO<sub>3</sub></b>	Kalsiyum karbonat, kireçtaşı
<b>CaMg(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	Dolomittik kireçtaşı
<b>CAT</b>	Katalaz
<b>CC16</b>	Clara hücre protein 16
<b>Comet</b>	Tek hücre jel elektroforezi
<b>CRP</b>	C reaktif protein
<b>DAPI</b>	4,6-diamidino-2-fenilindol
<b>DMSO</b>	Dimetil sülfoksit
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>DTNB</b>	5,5'-diti-bis-(2-nitrobenzoik) asit
<b>ECVAM</b>	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i> , Avrupa Alternatif Metotlar Validasyon Merkezi
<b>EDTA</b>	Etilendiamin tetraasetik asit
<b>EPA</b>	<i>Environmental Protection Agency</i> , Çevre Koruma Ajansı
<b>EtBr</b>	Etidyum bromür
<b>FEV1</b>	Zorlu soluk vermenin 1. saniyesinde dışarı atılan soluk hacmi
<b>FVC</b>	Zorlu vital kapasite
<b>GPx</b>	Glutatyon peroksidaz
<b>GR</b>	Glutatyon redüktaz
<b>GSH</b>	Redükte glutatyon
<b>GSSG</b>	Okside glutatyon, glutatyon disülfit
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen peroksit

<b>HCT</b>	<i>Hematocrit</i> , Hematokrit
<b>HDL</b>	<i>High Density Lipoprotein</i> , Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
<b>HG</b>	Hemoglobin
<b>HRP</b>	<i>Horseradish</i> peroksidaz
<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i> , Uluslararası Kansere Araştırmaları Ajansı
<b>IL</b>	İnterlökin
<b>JaCVAM</b>	<i>Japanese Center for the Validation of Alternative Methods</i> , Japonya Alternatif Metotlar Validasyon Merkezi
<b>LD<sub>50</sub></b>	Hayvan popülasyonunun %50'sinde ölüm meydana getiren doz
<b>LMPA</b>	Düşük erime noktalı agar
<b>LOAEL</b>	<i>Low Observed Adverse Effect Level</i> , Gözlenen En Düşük Olumsuz Etki Düzeyi
<b>MCH</b>	<i>Mean Cell Hemoglobin</i> , Ortalama korpüsküler hemoglobin
<b>MCHC</b>	<i>Mean cell hemoglobin concentration</i> , Ortalama korpüsküler hemoglobin konsantrasyonu
<b>MCV</b>	<i>Mean Cell Volume</i> , Ortalama korpüsküler hacim
<b>MDA</b>	Malondialdehit
<b>MES</b>	2-(N-morfolin) etansülfonik asit
<b>MPV</b>	<i>Mean Platelet Volume</i> , Ortalama trombosit hacmi
<b>mRNA</b>	Haberci ribonükleik asit
<b>NaCl</b>	Sodyum klorür
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NADPH</b>	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NaOH</b>	Sodyum hidroksit
<b>NIOSH</b>	<i>National Institute for Occupational Safety and Health</i> , Mesleki Güvenlik ve Sağlık Ulusal Enstitüsü
<b>NMPA</b>	Normal erime noktalı agar
<b>NO·</b>	Nitrik oksit
<b>NOAEC</b>	<i>No Observed Adverse Effect Concentration</i> , Olumsuz etki gözlemlenmeyen konsantrasyon

<b>NOAEL</b>	<i>No Observed Adverse Effect Level</i> , Advers Etki Gözlenmeyen En Yüksek Düzey
<b>NRBC</b>	<i>Nucleated RBC</i> , Çekirdekli kırmızı kan hücresi
<b>O<sub>2</sub></b>	Moleküler oksijen
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Süperoksit
<b>OECD</b>	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> , Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
<b>OH<sup>·</sup></b>	Hidroksil
<b>ONOOH</b>	Peroksinitrit
<b>OSHA</b>	<i>Occupational Safety and Health Administration</i> , İş Güvenliği ve Sağlığı İdaresi
<b>P-LCR</b>	<i>Platelet-Large Cell Ratio</i> , Trombosit-büyük hücre oranı
<b>PBMC</b>	<i>Peripheral Blood Mononuclear</i> , Periferik kan mononükleer hücre
<b>PBS</b>	Fosfat tamponlu serum fizyolojik
<b>PCT</b>	<i>Procalcitonin</i> , Prokalsitonin
<b>PDW</b>	<i>Platelet Distribution Width</i> , Trombosit dağılım genişliği
<b>PEL</b>	<i>Permissible Exposure Limit</i> , İzin verilen maruz kalma sınırı
<b>PLT</b>	<i>Platelet</i> , Trombosit
<b>PM</b>	Partikül madde
<b>PM<sub>10</sub></b>	Aerodinamik çapı < 10 µm olan solunabilir partikül madde
<b>PM<sub>2,5</sub></b>	Aerodinamik çapı < 2,5 µm olan solunabilir ince partikül madde
<b>RBC</b>	<i>Red Blood Cell</i> , Kırmızı kan hücresi
<b>RDW-CV</b>	<i>Red Cell Distribution Width</i> , Kırmızı hücre dağılım genişliği
<b>RDW-SD</b>	<i>RBC Distribution Width Standard Deviation</i> , Trombosit dağılım genişliği standart sapması
<b>REL</b>	<i>Recommended Exposure Limit</i> , Önerilen maruziyet sınır değeri
<b>SiO</b>	Silisyum monooksit
<b>SiO<sub>2</sub></b>	Silisyum dioksit, silika
<b>SOD</b>	Süperoksit dismutaz
<b>TBA</b>	Tiyobarbitürik asit
<b>TBARs</b>	Tiyobarbitürik asit reaktif türleri
<b>TK</b>	Toplam kolesterol

<b>TLV</b>	<i>Threshold Limit Value</i> , Eşik sınır değeri
<b>TNB</b>	5-tiyo-2-nitrobenzoik asit
<b>TNF</b>	Tümör nekroz faktör
<b>TSP</b>	Toplam süspand (havada asılı kalan) partikül
<b>TWA</b>	<i>Time Weighted Average</i> , Zaman ağırlıklı ortalama değeri
<b>WBC</b>	<i>White Blood Cell</i> , Beyaz kan hücresi

## ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Partikül maddeler için boyut karşılaştırmaları.	6
2.2.	Solunabilir toz partiküllerinin toksisitesi.	10
2.3.	Kristal silikanın neden olduğu silikozis ve akciğer kanseri patojenezi ile ilişkilendirilen çeşitli teoriler.	17
2.4.	Oksidatif stres ve hasar oluşumu.	23
2.5.	Lipit peroksidasyon mekanizması.	27
2.6.	Başlıca enzimatik antioksidanlar ve tepkimeleri.	29
2.7.	Redükte ve okside glutatyon oluşumu.	30
2.8.	Kuyruklu yıldız görünümü.	37
2.9.	Ağız mukozasının epitel tabakası.	39
2.10.	Yanak epitel hücrelerinde değerlendirilebilen hasarlar.	40
3.1.	Süperoksit dismutaz ölçümünün şeması.	60
3.2.	Glutatyon redüktaz reaksiyonu.	63
3.3.	Glutatyon peroksidaz reaksiyonu.	64
3.4.	Glutatyon döngüsü.	65
3.5.	Malondialdehit ve tiobarbitürik asit reaksiyonu.	66
4.1.	Yanak içi epitelindeki çeşitli hücreler.	124

## TABLOLAR

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
2.1. Farklı bölgelerdeki mermer tozu içeriği.	3
2.2. Solunum yollarının savunma sistemleri.	7
2.3. Partiküllerin aerodinamik çaplarına göre farklı bölgelerdeki birikme yüzdesi.	9
2.4. Kristal silika ve solunabilir toz ile ilgili uluslararası kuruluşlar tarafından belirlenen mesleki maruziyet limit değerleri.	22
2.5. Biyolojik sistemlerde önemli olan reaktif oksijen ve nitrojen türleri.	24
4.1. Mermer tozuna maruz kalan işçi grubundaki bireylere ait bulgular.	77
4.2. Kontrol grubundaki bireylere ait bulgular.	79
4.3. Çalışma popülasyonunun temel demografik özellikleri.	81
4.4. Koruyucu maske kullanan ve kullanmayan işçilere ait bulgular.	82
4.5. Mermer işleme tesislerinde değişik bölgelerden alınan hava örneklerindeki partikül madde ölçüm değerleri.	85
4.6. Mermer işleme tesislerinde ortalama partikül madde ölçüm değerleri.	86
4.7. Mermer tozuna maruz kalan işçilerin solunum fonksiyon parametreleri ve akciğer radyografisine ilişkin bulgular.	88
4.8. Mermer tozuna maruz kalan işçi grubu ve kontrol grubunun biyokimyasal parametrelerine ilişkin bulgular.	89
4.9. Mermer tozuna maruz kalan işçi grubunun oksidatif stres ve immün parametrelerine ilişkin bulgular.	92
4.10. Kontrol grubunun oksidatif stres ve immün parametrelerine ilişkin bulgular.	93

4.11.	Mermer tozuna maruz kalan işçi grubu ve kontrol grubunun oksidatif stres ve immün parametrelerine ilişkin bulgular.	95
4.12.	Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının plazmada SOD aktivitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.	97
4.13.	Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının plazmada CAT enzim aktivitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.	99
4.14.	Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının plazmada GR aktivitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.	101
4.15.	Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının plazmada GPx aktivitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.	103
4.16.	Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının plazmada GSH düzeylerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.	105
4.17.	Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının plazmada MDA düzeylerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.	107
4.18.	Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının plazmada 8-OHdG düzeylerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.	109
4.19.	Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının plazmada TNF-alfa düzeylerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.	111
4.20.	Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının plazmada IL-1beta düzeylerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.	113
4.21.	Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının plazmada CC16 düzeylerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.	115
4.22.	Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının lenfositlerde DNA hasarına ilişkin bulgular.	117
4.23.	Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının lenfositlerde DNA hasarının değerlendirilmesine ilişkin bulgular.	119
4.24.	Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sayısına ilişkin bulgular.	121



- 4.25.** Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının yanak epitel hücrelerinde mikroçekirdek sıklığı değerlendirilmesine ilişkin bulgular. 123

## 1. GİRİŞ

Sanayileşmenin hızla büyümesi alerjen, genotoksik, karsinogen olabilen çeşitli maddelere kazai, mesleki ve çevresel maruziyeti de beraberinde getirmiştir. Kaya/mineral, mermer, kereste ve kuru tahıl gibi maddelerin işlenmesi sırasında partikül boyutları 1-100 µm arasında değişen yüksek düzeylerde toz oluşmaktadır. Bu toz partiküllerine mesleki maruziyet; tozun türüne, partikül büyüklüğüne ve maruziyet süresine bağlı olarak solunum sistemi başta olmak üzere çeşitli sağlık sorunlarına yol açmaktadır (1).

Antik çağlardan beri dayanıklılığı ve estetik görünüşü nedeniyle barınma, korunma, sanat gibi pek çok amaç için doğal bir taş olan mermer tercih edilmektedir. Dünyanın en zengin mermer kaynaklarının bulunduğu Alp kuşağında yer alan Türkiye, dünya rezervinin yaklaşık % 33'ünü (15 milyar m<sup>3</sup>'lük dünya rezervin 5,1 milyar m<sup>3</sup>'ünü) oluşturmakta ve dünyadaki önemli mermer üreticileri arasında yer almaktadır. İşçehisar (Afyonkarahisar) bölgesi, ülkemizin en önemli mermer üretim ve işleme alanlarından biri olarak bilinmektedir (2).

Mermer tozu, esas olarak kalsiyum karbonattan oluşmaktadır ve farklı oranlarda kristal silika içermektedir (3). Mermer ocaklarında kırma, kesme, delme ve düzleştirme gibi işlemler sırasında ciddi düzeyde oluşan mermer tozu; çevre ve insan sağlığı açısından olumsuz sonuçlara yol açabilmektedir. Solunabilir mermer tozuna mesleki maruziyeti değerlendiren az sayıdaki çalışmada; astım, kronik bronşit, rinit gibi solunum yolu hasarına yol açabileceği gösterilmiştir (3,4). Bu olumsuz sonuçlardan büyük ölçüde kristal silikanın sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Günümüzde solunabilir kristal silikaya (aerodinamik çap <10 µm) maruz kalan milyonlarca işçi olduğu tahmin edilmektedir. Avrupa'da yaklaşık 3-5 milyon işçinin (5), Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 2,3 milyon işçinin (6), daha düşük ve orta gelirli ülkelerden Hindistan ve Çin gibi ülkelerde 10 milyondan fazla işçinin (7) maruziyeti söz konusudur. Kristal silika birçok ciddi hastalık ve mortaliteye neden olabilen bir etken olduğundan önemli bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir (8,9). Yapılan sürveyans çalışmaları yetersiz olup bildirilen oranların gerçek maruziyet sayısını yansıtmadığı düşünülmektedir (9).

Silikozis, tüberküloz, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, akciğer ve diğer (mide,

gırtlak gibi) kanserler, kronik böbrek hastalığı ve otoimmün hastalıklar gibi kristal silika ile ilişkilendirilmiş pek çok hastalık bildirilmiştir. Kristal silikanın sağlık üzerindeki etkileri, esas olarak akciğerlerde solunabilir toz partiküllerinin birikmesi ve solunan tozdaki kuvars silika miktarından kaynaklanmaktadır (10).

Silika maruziyetinin neden olduğu kanser patojenezinde oksidatif stres, immünotoksisite ve genotoksisitenin önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Kristal silika tozu maruziyeti olan kişilerde genotoksisite değerlendirmesi yapan çalışmalarda, deoksiribonükleik asit (DNA) hasarına yol açtığı ve genotoksisite mekanizmasının anlaşılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna ulaşılmıştır (11–18).

Mesleki mermer tozu maruziyetinin genotoksik ve immünotoksik etkilerine dair yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasının amacı İşçehisar bölgesinde mermer üretim tesislerinde (mermer ocakları, mermer fabrikaları, mermer atölyeleri gibi) çalışan işçilerde mesleki mermer tozu maruziyetinin oksidatif stresin yanı sıra genotoksisite ve immünotoksisite mekanizmalarını nasıl etkilediğine açıklık getirmektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Mermer Tozu ve Özellikleri

Mermer, kireçtaşı (kalsiyum karbonat,  $\text{CaCO}_3$ ) ve dolomittik kireçtaşlarının ( $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ ) basınç ve sıcaklık etkisi ile başkalaşım geçirerek yeniden kristalleşmesi sonucunda meydana gelen kayaç olarak tanımlanmaktadır. Mermerin renkleri genellikle beyaz ve grimsidir. İçeriğindeki yabancı maddeler nedeniyle sarı, pembe, mavimsi, kırmızımsı veya siyah renklerde de olabilir. Mikroskop altında incelendiğinde birbirine kenetlenmiş kalsiyum karbonat kristallerinden (kalsit) oluştuğu görülür (19,20).

Mermer tozu esas olarak kalsiyum karbonat kristallerinden oluşur ve toksikolojik önemi olan farklı oranlarda (genellikle % 1'den az) silisyum dioksit ( $\text{SiO}_2$ , silika) içerir (3). Bununla birlikte Işçehisar (Afyonkarahisar, Türkiye) bölgesinde (20), Skikda (Cezayir) bölgesinde (21), Yunanistan'da (22) ve Shaq El-Thoaban (Mısır) bölgesinde (23) bulunan mermer işleme tesislerinde işlenen mermer çamurunun kimyasal içerikleri X-ışını floresan tekniği ile incelenmiştir (Tablo 2.1.).

**Tablo 2.1.** Farklı bölgelerdeki mermer tozu içeriği.

İçerik (%)	Işçehisar (Türkiye)	Skikda (Cezayir)	Yunanistan	Shaq El-Thoaban (Mısır)
$\text{SiO}_2$	4,67	0,05	2,31	0,79
$\text{Al}_2\text{O}_3$	-	0,05	0,85	0,21
$\text{Fe}_2\text{O}_3$	0,03	0,02	0,30	0,06
CaO	51,8	56,94	53,40	55,42
MgO	0,4	0,92	0,24	0,25
$\text{SO}_3$	-	0,32	0,03	0,24
$\text{Na}_2\text{O}$	-	-	0,04	0,10
$\text{K}_2\text{O}$	-	0,009	-	0,02
Kayıp	41,16	41,63	42,35	42,28

$\text{Al}_2\text{O}_3$ : Alüminyum oksit, CaO: Kalsiyum oksit,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ : Demir oksit,  $\text{K}_2\text{O}$ : Potasyum oksit, MgO: Magnezyum oksit,  $\text{Na}_2\text{O}$ : Sodyum oksit,  $\text{SiO}_2$ : Silisyum dioksit,  $\text{SO}_3$ : Sülfoksit.

Mermer tozunun % 50'den fazla oranda (% 51,8-56,94) kalsiyum oksit (kalsiyum karbonat kaynaklı), silika, demir oksit, magnezyum oksitin yer aldığı ve ayrıca düşük oranlarda da olsa alüminyum oksit, sülfoksit, sodyum oksit ve potasyum oksit içerdiği belirlenmiştir. Bu tez çalışmasının dahil edildiği Işçehisar bölgesindeki mermer tozu içeriğindeki kristal silika oranının % 1'den fazla olduğu (% 4,67) bildirilmiştir (20).

## **2.2. Türkiye ve Dünya'daki Mermer Üretim Alanları, Karşılaşılan Sorunlar ve Koruyucu Önlemler**

Sanayileşmenin hızla büyümesi alerjen, genotoksik, karsinojen olabilen çeşitli maddelere kazai, mesleki ve çevresel maruziyeti de beraberinde getirmiştir. Patlatma, kırma, delme ve öğütme işleri; maden (taş, mermer vb.) ocakları; yol, tünel ve baraj yapımı işleri; döküm işleri (kum ve grafit); porselen sanayi; tuğla ve kiremit sanayi; çimento sanayi; kaynak işleri; pamuklu dokuma sanayi; sigara sanayi; ağaç doğrama ve mobilya işleri gibi çeşitli iş kollarında tozlu ortamlar ile karşılaşmaktadır (24). Çalışma ortamında içeriğinde asbest ve kristal yapılu silika gibi karsinojenik etkileri kanıtlanmış olan tozlar bulunabilmektedir (25). İşyeri Sağlık ve Güvenlik Birimleri ile Ortak Sağlık ve Güvenlik Birimleri Hakkında Yönetmelik'e göre (Resmi gazete yayınlanma tarihi: 15 Ağustos 2009, Resmi gazete sayısı: 27230) oluşturulan Tehlike Sınıfı Belirleme Komisyonu'nun görüşleri doğrultusunda mermerlerin kesilmesi, şekil verilmesi ve bitirilmesi de çok tehlikeli işler kategorisinde yer almaktadır (26).

Antik çağlardan beri dayanıklılığı ve estetik görünüşü nedeniyle barınma, korunma ve sanat gibi pek çok amaç için doğal bir taş olan mermer tercih edilmektedir. Dünyanın en zengin ve kaliteli mermer kaynakları; Alp kuşağında yer alan Portekiz, İspanya, İtalya, Yunanistan, Türkiye, İran ve Pakistan gibi ülkelerde olduğu görülmektedir. Türkiye, 15 milyar m<sup>3</sup>'lük dünya rezervinin 5,1 milyar m<sup>3</sup>'ünü (yaklaşık % 33'ünü) oluşturmakta ve dünyadaki önemli mermer üreticileri arasında yer almaktadır. Ülkemizde üretimin en fazla olduğu iller; Afyonkarahisar, Balıkesir, Denizli, Bilecik ve Muğla'dır. Bu bölgelerdeki üretim, tüm üretimin % 65'ini oluşturmaktadır. Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı'nın yayınladığı 2020 yılına ait verilere göre; ülkemizde mermer sektöründe yaklaşık 1500 adet mermer işletme izinli ruhsat sayısı (mermer ocağı), küçük ve orta ölçekli yaklaşık 2,000 fabrika ve 9,000

atölye bulunmaktadır. Bu sektörde yaklaşık 300,000 kişi istihdam edilmektedir (27).

Mermer ocaklarında kırma, kesme, düzleştirme, cilalama, kenar düzeltme ve işleme gibi işlemler sırasında ciddi düzeyde oluşan mermer tozu; çevre ve insan sağlığı açısından olumsuz sonuçlar doğurabilmektedir. Solunabilir mermer tozuna maruziyeti toksikolojik açıdan değerlendiren az sayıdaki epidemiyolojik çalışma ve vaka raporu; astım, kronik bronşit, burun iltihabı ve akciğer fonksiyonlarının zarar görmesi gibi solunum yolu hastalıklarına yol açtığına işaret etmektedir. Bu olumsuz sonuçlardan büyük ölçüde kristal yapılı silika sorumlu tutulmuştur (3,4) Mesleki Güvenlik ve Sağlık Ulusal Enstitüsü (*National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH*), solunabilir kristal silika maruziyetinin sağlık üzerindeki etkilerini derlediği kılavuzda, “silikozis” olarak adlandırılan geri dönüşümsüz akciğer hasarı yapan ciddi bir mesleki solunum sistemi hastalığına yol açtığını rapor etmiştir. Ayrıca bu kılavuzda tüberküloz ve diğer enfeksiyonlar, akciğer kanseri, diğer solunum sistemi hastalıkları, oto-immün hastalıklar ve böbreklerde olası toksik etkiler kristal silika ile ilişkilendirilmiştir (10).

Mesleki solunum hastalıklarının oluşmasında tozun ortamdaki konsantrasyonu, maruziyetin süresi ve sıklığı, partikül büyüklüğü, tozun fibrojenik potansiyeli ve kişisel faktörler (sigara içilmesi, genetik yapı, soluk alma sayısı ve ekspiratuvar rezerv hacmi gibi solunumsal özellikler) etkili rol oynamaktadır (24,28).

Meslek hastalıkları ile ilgili farkındalık artmasına rağmen her geçen yıl meslek hastalıklarının görülme sıklığı ve meslek hastalığına bağlı mortalite oranının arttığı gösterilmiştir (29). Bu durum koruyucu önlemlerin artırılmasının önemine işaret etmektedir. Kristal silika tozuna maruz kalan yerlerinin tespit edilmesi, havada bulunmasına izin verilen mesleki maruziyet sınır değerleri dikkate alınarak toz ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesi, tozun elimine edilebilmesi için gerekli mühendislik ve idari önlemlerin alınması, önlemlerin sürekliliğinin sağlanması, kişiye özgü koruyucu ekipmanların (maske, gözlük, kulaklık gibi) kullanılması ve düzenli kontrol takibi yapılması önerilmektedir.

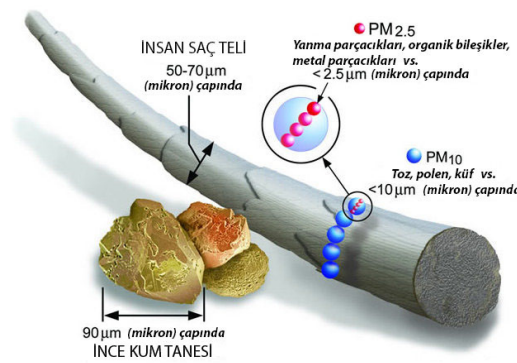
## 2.3. Toz Partiküllerinin Toksisitesi

### 2.3.1. Partikül Maddenin Özellikleri

Rüzgar, volkanik püskürme gibi doğal kuvvetler ve kırma, öğütme, delme, taşıma, eleme ve süpürme gibi mekanik veya insan yapımı işlemlerle havada oluşan küçük, katı parçacıklar “toz” olarak tanımlanır. Toz parçacıkları genellikle 1-100  $\mu\text{m}$  arasında değişen aerodinamik çapa sahiptir (30).

Çalışma ortamında bulunabilen tozlara kristal silika, kömür ve çimento tozları gibi mineral tozlar; kurşun, kadmiyum, nikel ve berilyum tozları gibi metalik tozlar; un, odun, pamuk, çay tozları, polen gibi organik ve bitkisel tozlar; canlı parçacıkları, küfler ve sporlar gibi biyolojik tehlikeler örnek olarak verilebilir (1).

Partikül madde (PM), havada oluşan (*airborn*) katı veya sıvı parçacıklardır. Parçacık boyutları ve kimyasal bileşimleri, partikül maddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerini ve ayrıca toksikolojik profilini belirlemektedir. Çevre Koruma Ajansı (*Environmental Protection Agency*, EPA) partikülleri aerodinamik çap değerlerine (fiziksel çap ve yoğunluk ile ilişkili) göre PM<sub>10</sub> (aerodinamik çapı < 10  $\mu\text{m}$  olan solunabilir partikül madde) ve PM<sub>2,5</sub> (aerodinamik çapı < 2,5  $\mu\text{m}$  olan solunabilir ince partikül madde) olarak sınıflandırmıştır (Şekil 2.1.) (31).



Şekil 2.1. Partikül maddeler için boyut karşılaştırmaları (31).

### 2.3.2. Partiküllerin Solunum Sistemindeki Davranışları ve Solunum Yollarının Savunma Sistemleri

Havada oluşan partiküllerinin organizmaya ana girişi solunum yoludur. Solunum yolu ile maruz kalınan partiküllerin solunum sisteminde birikmesi,

temizlenmesi veya sistemik dolaşıma geçişi; partikülün fizikokimyasal özellikleri ve solunum yollarının savunma sistemleri ile ilişkilidir (32,33).

Solunum sistemindeki nazofarenks bölge (üst solunum yolu) ve trakeabronşiyal bölge (alt solunum yolu) dış ortam ile temas halinde olan en büyük epitelyal yüzeyi oluşturmaktadır. Akciğerlerdeki gaz alış-verişinin sürdürülebilmesi için alınan hava ile birlikte gelen yabancı maddelerin uzaklaştırılabilmesi için burundan alveollere kadar karmaşık bir savunma mekanizması bulunmaktadır. Anatomik bariyerler, öksürük refleksi, hava yolu epitel hücreleri, muköz membranlardan salgılanan immünoglobulin A antikoru, üst solunum yolu ve bronşlarda yer alan savunma yollarıdır. Alveolar kısımda ise makrofajlar, lenfositler, nötrofiller ve kompleman aktivasyonu rol alır (Tablo 2.2.) (34,35).

**Tablo 2.2.** Solunum yollarının savunma sistemleri.

<b>Üst solunum yolları ve bronşlar</b>	<b>Alveolar boşluk</b>
Anatomik bariyerler	Alveolar makrofajlar
Öksürük refleksi	Lenfosit aracılı immünite
Mukosilyer temizlenme	Kompleman aktivasyonu
Hava yolu epiteli	Nötrofiller
Sekretuar IgA ve diğer Ig'ler	

Ig: İmmünoglobulin.

Solunum yollarında mukosilyer temizlenmenin düzgün çalışabilmesi için solunan hava ilk basamakta üst solunum yollarında yaklaşık 37°C'ye ısıtılıp % 95 oranında doymuş hale getirilir. Solunum sisteminin savunma mekanizmalarından diğer bir basamak ise solunan havanın filtre edilmesidir. İlk bariyer burunda başlayarak, üst solunum yollarında da devam ederek önemli bir süzgeç görevi görür. Filtrasyon, aerodinamik çapı 10 µm'den büyük partiküllerin alt solunum yollarına geçmesini önler. Ancak 5 µm'den daha küçük partiküller filtrasyon basamağından kurtularak alt solunum yollarına ve alveollere kadar ulaşabilir. Bu bölgelerde biriken partiküller daha yavaş temizlenir ve akciğerlerde hasar oluşturma potansiyelleri yüksektir. Aerodinamik çapı 1 µm'den küçük olan partiküller çoğunlukla solunum yolu ile tekrar atılarak ya da alveolar makrofajlar tarafından fagosite edilerek temizlenir. Aerodinamik çapı 1 µm'den büyük olan partiküller ise bronşlarda tutulup



mukosilyer hareket ile larenkse sürüklendikten sonra yutulurak sindirim sistemi üzerinden dışarı atılır. Ancak bazı partiküllerin aerodinamik yapısı hava yolunda ilerlemeye izin vermez ve hava yolunda birikme eğilimindedir (36–38).

Trakeobronşiyal kısımlarda partiküller farklı mekanizmalar ile birikebilirler. Bu mekanizmaların başlıcaları: sıkışarak kümeleşme (impaksiyon), yerçekimsel birikim (sedimentasyon), “*Brownian*” hareketi ile çökme ve partikül birikimi (*Brownian* difüzyonu)’dir. Ayrıca intersepsiyon (engellenme, takılma) ve elektrostatik çökme de bu mekanizmalara dahil edilebilir (36,39). Sıkışarak kümeleşme, 1  $\mu\text{m}$ ’den büyük partiküllerin hava yollarında çarpma veya çarpıp durma esasına dayanan birikme mekanizmasıdır. 1-10  $\mu\text{m}$  aerodinamik çapa sahip partiküllerin kıvrım yerlerinde duvara çarpması sonucu biriken partiküller çarpmanın oluşturduğu basınç ile sıkışarak kümelenirler (33,38,40). Yerçekimsel birikim, akciğer periferine doğru gidildikçe sıfıra yaklaşan hava akımı ve yerçekimi etkisi ile 0,5-5  $\mu\text{m}$  aerodinamik çapa sahip partiküllerin sedimente olarak birikmesidir. Birikimin en etkin olduğu bölge bronş dallanmalarıdır (33,34,39,40). “*Brownian*” difüzyon, aerodinamik çapı 0,5  $\mu\text{m}$ ’den küçük partiküllerin, gaz moleküllerinin sürekli hareketi esnasında devamlı bombardımana tabi tutularak çökmeleridir. Partikül çapı küçüldükçe partikülün akciğerin distal alanlarına ulaşabilme potansiyeli ve dolayısı ile hasar veya fibrozis görülme riski artar (33,34,39).

Partiküllerin solunum sistemindeki toksisitesinin değerlendirilmesinde oldukça önemli bir etken, partiküllerin birikme bölgesidir. Çünkü birikme bölgesi, hasarın şiddetini ve sistemik dolaşıma geçişini belirler. Partiküllerin aerodinamik çaplarına göre solunum yollarında farklı bölgelerdeki birikme miktarları Tablo 2.3.’te gösterilmiştir (41). Partikül çapı 1  $\mu\text{m}$ ’den 10  $\mu\text{m}$ ’ye doğru büyüdükçe büyük hava yollarında birikim daha fazla görülmektedir. Aerodinamik çapın yanı sıra birikme yerini solunum fiziyojisi, patolojik durumlar ve sigara gibi iritan madde kullanımı gibi faktörler de etkilemektedir (32,36).

**Tablo 2.3.** Partiküllerin aerodinamik çaplarına göre farklı bölgelerdeki birikme yüzdesi (41).

<b>Aerodinamik çap (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Orofarinks (%)</b>	<b>Trakeobronşiyal bölge (%)</b>	<b>Alveolar bölge (%)</b>	<b>Ekshale yüzdesi (%)</b>
1	0	0	16	84
2	0	2	40	58
3	5	7	50	38
4	20	12	42	26
5	37	16	30	17
6	52	21	17	10
7	56	25	11	8
8	60	28	5	7

### 2.3.3. Toz Partiküllerinin İnsan Sağlığı Üzerine Toksik Etkileri

Toz partiküllerinin solunması insan sağlığı için önemli tehdit oluşturmaktadır. Tozlar, değişken içeriğe sahiptir. Solunum yolu tahrişinden kansere kadar karmaşık bir sistemi tetikleyebilmektedir. Başlıca örneği, kristal silika içeren toz partiküllere mesleki maruziyetin insanlarda akciğer kanseri ile ilişkilendirilmesidir (42,43).

Toz partiküllerinin sağlık üzerindeki olumsuz etkileri partikül büyüklüğü ile doğrudan bağlantılıdır. Partikül boyutu küçüldükçe solunum ağacında birikme eğilimi artmaktadır. Aerodinamik çapı 10  $\mu\text{m}$ 'den büyük olan partiküller nazofarekste tutulmakta, 10  $\mu\text{m}$ 'den küçük olanların bir kısmı bronşlarda birikirken 1-2  $\mu\text{m}$  çapında olan partiküller ise alveollere ulaşır. Alveolo-kapiller bariyeri geçerek sistemik dolaşıma girebilen ince partiküller ise başta kardiyovasküler ve sinir sistemi olmak üzere diğer sistemleri olumsuz etkileyebilmektedir (31,37,44). Sistemik dolaşıma geçebilen bu partiküller PM<sub>2,5</sub>, PM<sub>10</sub> ve toplam süspande (havada asılı kalan) partikül (TSP) gibi daha büyük partiküllere kıyasla toksik etkilere neden olma potansiyeli daha yüksektir (45).

Partikül maddelerin aerodinamik özelliklerinin yanı sıra kimyasal kompozisyonu da toksisite profilinin değerlendirilmesinde oldukça önemlidir. Tozları oluşturan maddelerin kendisi kimyasal bakımdan aktif olabileceği gibi; ince partiküller

(PM<sub>2,5</sub>) civa, kurşun, kadmiyum gibi ağır metaller ile karsinojenik kimyasallar gibi toksik hava kirleticilerini de taşıyabilmektedir (45–48).

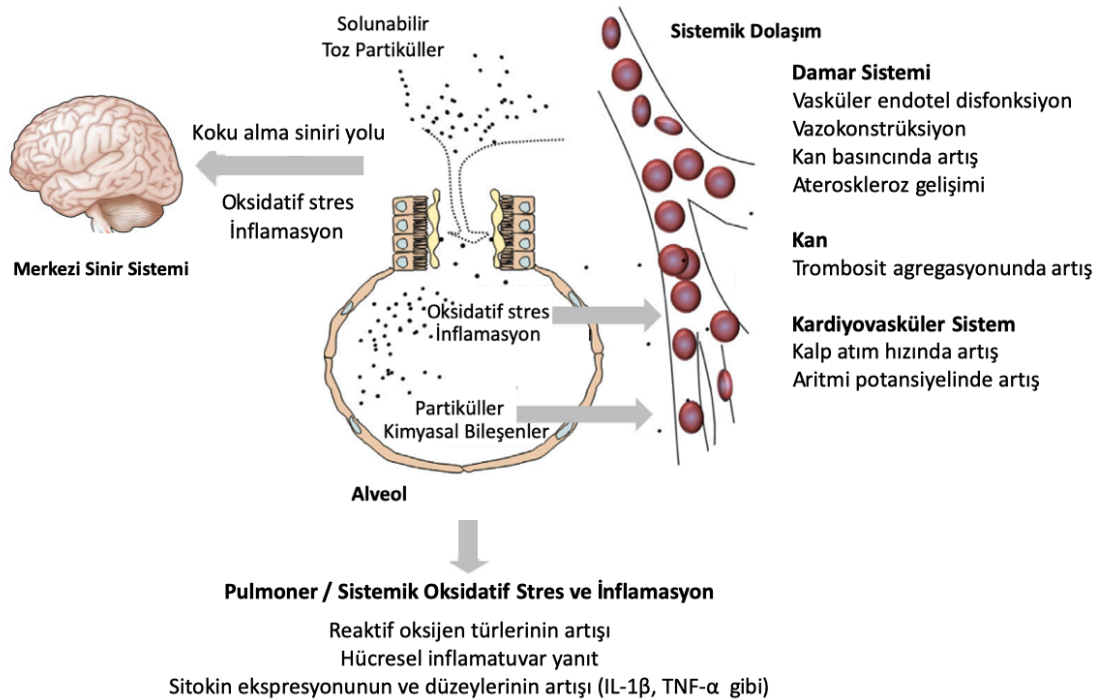
Partikül madde toksisitesi ile ilgili birbiri ile örtüşen bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür (44,49–51) (Şekil 2.2.). Moleküler düzeyde önerilen mekanizmalar:

(i) oksidatif stres (hücre proliferasyonunun artması, sitotoksosite, genotoksosite ve karsinojenite) (52–55)

(ii) oksidatif stres kaynaklı pulmoner ve sistemik enflamasyonun tetiklenmesi (proenflamatuvar sitokinler ile sistemik immün yanıtın uyarılması) (54,56)

(iii) alveolar membran boyunca ultra ince, nano boyutlu partiküllerin ve/veya partikül bileşenlerinin sistemik dolaşıma translokasyonu (vasküler endotel disfonksiyonu ve/veya kardiyak doku etkileşimi ile lokalize toksisite) (51,57)

(iv) hava yoluna duyarlı reseptörlerin veya sinirlerin aktivasyonu ve ardından merkezi sinir sistemi hasarı (58)



**Şekil 2.2.** Solunabilir toz partiküllerinin toksisitesi.

Solunum yolu ile maruz kalınan toz partiküllerin öncelikli hedef organları akciğer ve kalptir. Artan solunum ve kardiyovasküler morbidite ve mortalite ile ortamdaki partiküllere akut ve kronik maruziyet arasındaki ilişki epidemiyolojik çalışmalarda açık bir şekilde ortaya konmuştur (59–62). Partikül maruziyetine bağlı

olarak akciğer fonksiyonunda azalma, astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (63), akciğer kanseri (42), aritmi ve iskemik kalp hastalığı (51) dahil olmak üzere bir dizi olumsuz sağlık etkisinin geliştiği veya şiddetlendiği gösterilmiştir. Ayrıca ateroskleroz (64) ve enfeksiyona karşı artan duyarlılık (65) ile maruziyet ilişkilendirilmiştir.

Solunabilir ince partiküllerin pulmoner ve kardiyovasküler sistem toksisitesinin yanı sıra serebrovasküler sistem üzerinde de olumsuz etkiye sahip olabileceği bildirilmiştir (66). Partikül maddelerin ya nazal epitel hücrelerinden (koku alma siniri yolu ile) ya da alveolar epitelden sistemik dolaşıma geçerek ve kan beyin bariyerini aşarak merkezi sinir sistemini etkileyebildiği rapor edilmiştir (67).

Partikül maddeye ana maruziyet yolu solunum olsa da, deri yolu ile maruziyet söz konusudur. Maruziyetin enflamatuvar deri hastalıkları, deri yaşlanması, alopesia ve deri kanseri gibi çeşitli cilt hastalıklarının gelişmesini ve alevlenmesini tetikleyebileceğine dair veriler de mevcuttur (68).

## **2.4. Silika Toksikitesi**

### **2.4.1. Silikanın Fizikokimyasal Özellikleri**

Silika, doğada bol bulunan silisyum (Si) ve oksijenden (O) oluşan  $\text{SiO}_2$  moleküllerinin polimerizasyonu sonucu meydana gelir. Temel bileşenleri silisyum-oksijen tetrahedral yapıya sahip olup kristal (serbest) ve kristal halde olmayan (amorf) iki formu bulunur (32,69,70). Toksikitesi yüksek olan ve fibrojenik özellik gösteren form, kristal yapıya sahiptir. Amorf form ise yüksek ısı ve basınç altında kristaller oluşturabilmektedir (8,71).

Amorf silika, doğal veya sentetik olarak bulunabilmektedir. Opal, biyojenik silika, diyatome toprağı, silika lifleri ve vitröz silika doğada kendiliğinden bulunabilirken; kaynaşmış silika, pirojenik silika, koloidal silika ve silika jel ise sentetik amorf silika şekillerini oluşturur (42,72,73).

Kristal silikanın kuvars, tridimit, kristobalit, moganit, koesit ve sisovit gibi farklı polimorfları bulunur. Endüstride en sık kullanılanların biyolojik aktivite sıralaması, kuvars > tridimit > kristobalit şeklindedir (8,42,71). Kuvars yeryüzündeki tüm kayalarda, kristobalit ve tridimit ise büyük çoğunlukla volkanik kayalarda bulunur. Kristal silika polimorfları sıcaklığa ve kimyasal etkilere karşı çok

dayanıklıdır. Tüm polimorfların sağlık üzerine olumsuz etkileri söz konusu olup mesleki maruziyetlerin çoğundan kuvars silika sorumlu tutulmaktadır (70,71,74,75).

Silika suda çok az çözünmekte olup amorf formlarının kristal formlarına göre suda çözünürlüğü daha yüksektir. Silikanın çözünürlüğü ortamın sıcaklığı, pH, ortamdaki metal varlığı ve partikül büyüklüğü gibi birçok faktöre bağlıdır (42).

Silikanın yüzey özellikleri, kristal yapının yanı sıra tozun kökenine, termik ve mekanik özelliklerine ve safsızlıklara (aliminyum, demir, titanyum, sodyum, potasyum ve kalsiyum içerebilir) bağlı olarak değişebilmektedir. Silisyum-oksijen tetrahedral yapıya (SiO<sub>4</sub>)<sup>-4</sup> sahip silika yüzeyi, havadaki su partikülleri ile etkileşerek silanol gruplarını (-SiOH) oluşturmaktadır (76,77). Tüm yüzeyi kaplayabilen silanol tabakasının yoğunluğu ve büyüklüğü silika tozunun hidrofobik özelliğini belirlemektedir (78). Ayrıca silanol grupları, toksisite mekanizmasının anlaşılmasında da önem taşımaktadır. Silika yüzeyinde bulunan silanol grupları, hidrojen donörleri olarak biyolojik makromoleküllerin sahip olduğu oksijen veya azot üzerindeki yalnız çift elektronları ile etkileşip hidrojen bağı oluşturarak membran hasarına ve hücre geçirgenliğinde bozulmaya neden olmaktadır (71,76).

#### **2.4.2. Silikanın Farmakokinetik Özellikleri**

Silikanın oral ve dermal yol ile teması mümkün olup organizmaya ana giriş yolu solunumdur.

Toksik etkiler, genellikle silikanın akciğerlere ulaşması ve burada birikmesi sonucu meydana gelmektedir (9,73,79,80). Silika partiküllerinin akciğerlerde birikmesi ayrıca soluk hacmi, soluk sayısı ve ekspiratuar rezerv hacmi gibi solunumsal özellikler ile de ilişkilidir (1,28,42). Genellikle 10 µm'den küçük partikül çapına sahip parçacıklar solunduğunda üst solunum yollarında daha az oranda tutularak akciğerlerin işlevsel kısımları olan bronşlara ve alveollere ulaşarak birikerek hasara neden olabilmektedir. Bronş ve alveollerde biriken partiküller yavaş temizlenir ve akciğer hasarı potansiyeli daha yüksektir.

Silika partikülleri, solunum yollarındaki epitel tabakaya doğrudan bağlanıp uzun süre kalabilmekte veya lenfatik sistem ile lenfoid organlara veya intersitisyel alana taşınabilmektedir (42). Solunum yolu ile alveole ulaşan partiküller, pulmoner alveoler makrofajlar tarafından parçalanarak mukosilyer hareketler ile lenf

düğümlerine gönderilir. İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalar, kristal silikaya solunum yolu ile maruziyetin böbreklere, lenf düğümlerine, kana, karaciğere ve dalağa dağıldığını göstermektedir. Oral veya dermal maruziyetin dağılımı hakkında bilgi bulunmamaktadır (79,81).

Emilen silika bileşiklerinin, metabolizasyona uğramadığı belirtilmiştir (81).

Solunabilir kristal silikaya maruz kalan işçilerin idrarında silika tespit edilmiştir. Maruz kalınan silika miktarının artması ve akciğerlerin temizleme kapasitesinin yetmemesi sonucunda silika taşıyan makrofajlar endotel dokuya penetre olarak interstisyel alana taşınmaktadır (81,82). Oral yol ile temasta feçes ile atıldığı bilinmektedir (81).

### **2.4.3. Silika Maruziyeti**

Doğada yaygın olarak bulunması ve geniş kullanım alanına sahip olması silika maruziyetini kaçınılmaz hale getirmektedir. Hava, su ve gıda yolu ile nadiren çevresel maruziyet söz konusu olsa da toksisite açısından en önemlisi ve yaygın olanı mesleki maruziyettir. Kristal silika içeren malzemeleri kesme, zımparalama, ezme veya delme işlemleri sırasında yüksek oranda solunabilir toz ortaya çıkabilmektedir. Madencilik, taş ocakları (mermer gibi), seramik, çömlekçilik, döküm, kot taşlama, inşaat, diyatomik toprak işleme ve hidrolik kırma gibi pek çok iş kolunda silikaya mesleki maruziyet görülmektedir (1,8–10).

Günümüzde solunabilir kristal silikaya (aerodinamik çap  $<10 \mu\text{m}$ ) maruz kalan milyonlarca işçi olduğu tahmin edilmektedir. Avrupa'da yaklaşık 3-5 milyon işçinin (5), Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 2,3 milyon işçinin (6), daha düşük ve orta gelirli Hindistan ve Çin gibi ülkelerde 10 milyondan fazla işçinin (7) söz konudur.

Ülkemizde silika maruziyeti olan birey sayısı ile ilgili kesin bir veri bulunmamaktadır. Ancak her yıl yeni silikozis tanısını koyulan vakaların sayısı, maruziyetin yaygın olduğu hakkında bilgi vermektedir. Sosyal Güvenlik Kurumu tarafından yapılan güncel istatistik verilerine göre ülkemizde 2019 yılında toplam 997 erkek ve 91 kadına meslek hastalığı tanısı konulmuştur. Meslek hastalığı tanısı alan 397 erkek (% 39,82) ve 9 kadında (% 9,89) solunum sistemi hastalıklarının görüldüğü rapor edilmiştir. Bu gruptan 28 erkekte kömür işçisi pnömokonyozu, 16 erkekte asbest ve diğer mineral liflerine bağlı pnömokonyoz, 319 erkek ve 6 kadın olmak üzere 325

kişide diğer silisyum içeren tozlara bağlı pnömokonyoz görülmüştür (29).

Yapılan sürveyans çalışmaları yetersiz olup bildirilen oranların gerçek maruziyet sayısını yansıtmadığı düşünülmektedir. Kristal silika birçok ciddi hastalık ve mortaliteye neden olabildiğinden, maruziyeti önemli bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir (8,9).

#### 2.4.4. Silikanın Akut ve Tekrarlı Doz Toksisitesi

Silikanın akut oral toksisitesi düşüktür. Hayvan popülasyonunun %50'sinde ölüm meydana getiren doz (LD<sub>50</sub>) değeri sıçanda > 22,500 mg / kg (oral); farede > 15,000 mg / kg (oral) olarak bildirilmiştir (83).

Tek doz intratrakeal uygulanan kristal silikanın uygulamadan 21-30 gün sonra fare ve sıçanların akciğerlerde silikotik granülom ve fibrozis oluşumuna yol açtığı bildirilmiştir (84). Ayrıca solunum yolu ile kısa süreli tekrarlayan (3 gün boyunca, 6 saat/gün) kristal silikaya maruziyetinin sıçanlarda alveolar makrofaj fonksiyonlarını bozduğu, temastan 1 ay süre sonunda ilerleyici lezyonlara ve 2 ay süre sonunda granülomatoz tip pnömoniye yol açtığı rapor edilmiştir (85). Kısa süreli *in vivo* deneysel sistemlerde inhalasyon/intratrakeal kristal silika maruziyetinin oksidatif strese ve hücrel enflamatuvar yanıtı neden olduğu ve pek çok *in vitro* çalışmada da sitotoksitesi gösterilmiştir. Ancak kristal silikanın hücrel hasarından sorumlu mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır (1).

Kristal silikaya uzun süre solunum yolu ile maruziyetin değerlendirildiği subkronik ve kronik toksisite çalışmalarında, sıçan ve fareler üzerinde immün fonksiyonları baskıladığı, pulmoner alveoler proteinozise yol açtığı, hücrel proliferasyonu, kollajen düzeyini ve nodül oluşumunu artırdığı gösterilmiştir (1). Bu çalışmalardan elde edilen veriler Gözlenen En Düşük Olumsuz Etki Düzeyi (*Low Observed Adverse Effect Level*, LOAEL) değerlerinin sıçanlarda 1-2 mg/m<sup>3</sup> (insan eşdeğer konsantrasyonları 0,18-0,36 mg/m<sup>3</sup>) (86,87) ve farelerde 2-5 mg/m<sup>3</sup> (insan eşdeğer konsantrasyonları 0,36-0,90 mg/m<sup>3</sup>) (88,89) değerleri arasında değiştiğini göstermektedir (1). Ayrıca sıçanlarda inhalasyon/intratrakeal kristal silika maruziyetinin adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinomlarında istatistiksel anlamlı artışlara neden olduğu bildirilmiştir (42).

#### 2.4.5. Silikanın Mutajenik, Karsinojenik ve Teratojenik Etkileri

Kristal silikanın bakteriyel mutajenite testlerinde pozitif sonuç göstermediği, ancak genotoksisite çalışmalarında sonuçlar çelişkili olmak ile birlikte doğrudan genotoksik etkiye neden olduğu bildirilmiştir (1). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (*International Agency for Research on Cancer*) tarafından *in vitro* sistemlerde kuvars, kristobalit ve tridimit partiküllerinin DNA hasarına yol açtığı bildirilmiştir. Ancak çok yüksek doz silika kullanılması ve deney şartlarının fizyolojik koşulları yansıtmamasından dolayı *in vitro* sistemlerden elde edilen bulguların *in vivo* sistemlere uyarlanmasında zorluklar olduğu bilinmektedir (10,42).

Uzun süreli inhalasyon veya intratrakeal uygulama ile sıçanlara verilen kristal silika ile ilgili karsinojenite çalışmalardan elde edilen sonuçlar şu şekildedir: (i) Tümörler (genellikle adenokarsinom veya epidermoid karsinom) geç dönemde ortaya çıkmaktadır. (ii) Tümör gelişen farelerin akciğerlerinde fibrozis de görülmektedir. (iii) Doz-cevap ilişkisi hakkında yeterli bilgi (Advers Etki Gözlenmeyen En Yüksek Düzey, (*No Observed Adverse Effect Level*, NOAEL) ve LOAEL gibi) bulunmamaktadır. (iv) Çalışma yöntemleri arasında önemli farklılıklar olmasından dolayı intratrakeal ve solunum yolu uygulamaları karşılaştırılmamaktadır. (v) Hayvanlarda yapılan uzun süreli karsinojenite çalışmaları, kristal silika toksisitesi ve doz-cevap ilişkisi hakkında bilgi sağlasa da uygun hücresel ve moleküler modellerin geliştirilebilmesi için *in vitro* çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (10,84).

Kristal silikanın üreme ve gelişimsel etkilerine ilişkin yeterli veri bulunmamaktadır. İnhalasyon maruziyetini takiben hayvanlarda gelişimsel etkileri değerlendiren çalışmaya rastlanmamıştır. Epidemiyolojik çalışmalara göre kristal silikanın üreme sistemi için bir hedef olmadığı bildirilmiştir (90).

1.000 mg/kg/gün'e kadar gavaj dozlarında çökeltilmiş amorf silikaya maruz kalan sıçanlarda yapılan 2 nesil bir çalışmada üreme performansı, cinsel olgunlaşma, östrus döngüsü, sperm parametreleri veya üreme organı histolojisi üzerinde hiçbir etki gözlenmemiştir (91). Bir diğer çalışmada 500 mg/kg/gün diyet dozunda amorf silikaya maruz kalan sıçanlarda 1 nesil çalışmada üreme performansı veya üreme organı histolojisi üzerinde hiçbir etki gözlenmemiştir (92). Ayrıca her iki çalışmada da doğan



yavrularda gelişimsel etki gözlenmemiştir. Çalışma sonuçlarına göre, amorf silikanın üreme ve gelişimsel etkilerinin muhtemelen endişe verici olmadığı bildirilmiştir.

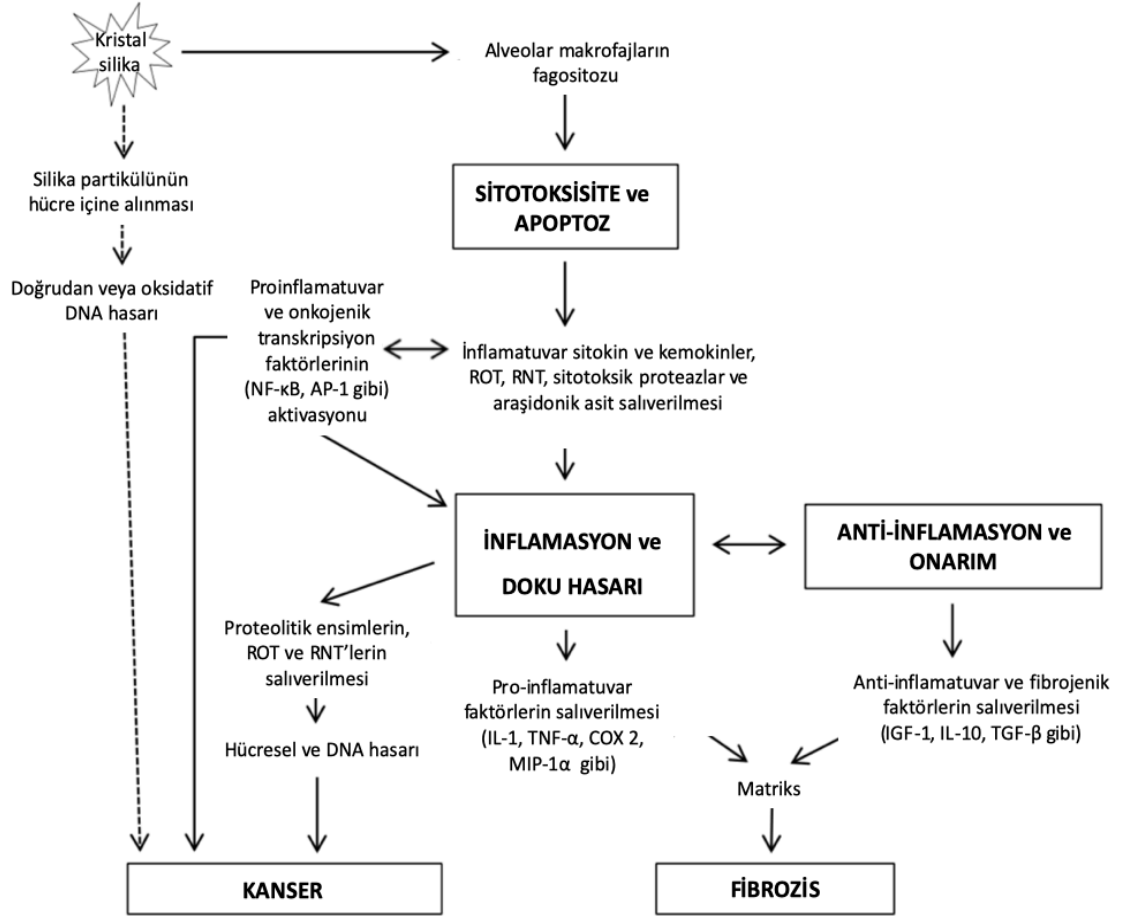
#### 2.4.6. Silikanın İnsan Sağlığı Üzerindeki Toksik Etkileri

Silika toksisitesi, havada asılı olarak kalabilen solunabilir özellikteki kristal silika partiküllerinin (<10 µm) immünolojik ve immünolojik olmayan savunma mekanizmalarını geçerek akciğerlere ulaşması sonucu oluşmaktadır (9). Kristal silikanın akciğerlerde neden olduğu oksidatif stres ve güçlü enflamatuvar yanıtın toksisitede önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Toksikite mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olup çeşitli teoriler ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 2.3.) (81).

(i) Doğrudan sitotoksik etki; kristal silikanın yüzeyinde (silanol grupları) oluşan reaktif oksijen bileşikleri ve/veya silika içeren taşların işlenmesi sırasında oluşan silisyum ve silisyum monoksit (Si• ve SiO•) radikalleri akciğer hücreleri ile reaksiyona girerek oksidatif stresi tetiklemektedir. Böylelikle membran lipitleri, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasar oluşmakta, hücre geçirgenliği bozulmakta ve pulmoner enflamasyon tetiklenmektedir (71).

(ii) Alveoler makrofajlarda serbest radikal oluşumunun ve enflamatuvar sitokinlerin sekresyonunun uyarılması; silika partikülleri, alveolar makrofajlar üzerindeki radikal süpürücü reseptörler ile kuvvetli reaksiyona girmekte ve reaktif oksijen bileşiklerinin oluşumunu uyarmaktadır. Ayrıca transkripsiyon faktörleri nükleer faktör kappa B (93) ve aktivatör protein-1 (94) aktivasyonu ile enflamatuvar sitokinler (tümör nekroz faktör (TNF)-alfa, interlökin (IL)-1 gibi) için gereken haberci ribonükleik asit (mRNA) üretimini uyararak hasara yol açabilmektedir (8,71).

(iii) Alveoler makrofajlardan ve/veya epitel hücrelerinden büyüme faktörlerinin sekresyonunun uyarılması; kristal silika maruziyeti fibrotik (TNF-alfa, IL-1 vb.) ve antifibrotik (IL-6, prostaglandin E<sub>2</sub> vb.) dengeyi bozarak fibrozise neden olmaktadır (8,71).



**Şekil 2.3.** Kristal silikanın neden olduğu silikozis ve akciğer kanseri patojenezi ile ilişkilendirilen çeşitli teoriler (81).

Solunabilir kristal silika alveolar makrofajlar tarafından fagosite edilerek hücre içi çeşitli kimyasalların (enflamatuvar sitokinler, kemokinler, ROT ve araziidonik asit metabolitleri gibi) salıverilmesine yol açan sitotoksosite ve apoptoza neden olmaktadır. Bu kimyasallar hücrelere ve hücre dışı matrislere zarar verebilir, transkripsiyon faktörlerini aktive ederek hasar bölgesine makrofaj göçünü sağlar. Bu döngünün tekrarlanması kronik enflamasyon sürecine neden olmaktadır. İnflamatuvar yanıt, doku onarımını ve yenilenmesi için anti-enflamatuvar ve fibrojenik faktörlerin salıverilmesine yol açar. İnflamatuvar yanıt ve onarım basamağındaki dengesizlik fibrozise neden olur. İnflamasyon ayrıca proteolitik enzimlerin ve serbest radikallerin salıverilmesine neden olabilir. Bu durum da kanserojen süreci tetikleyebilen hücrel ve DNA hasarını içeren genotoksik olaylara yol açabilir. Kristal silikanın neden olduğu kanserin altında yatan en olası mekanizma enflamasyon aracılı genotoksosite gibi görünse de doğrudan genotoksositeye de (kesikli okta gösterildiği gibi) yol açabilmektedir. (DNA: deoksiribonükleik asit; ROT: reaktif oksijen türleri; RNT: reaktif nitrojen türleri, NF-κB: nükleer faktör kappa B, AP: aktivatör protein, IL: İnterlökin, TNF: Tümör nekroz faktör, COX: siklooksijenaz, MIP: Makrofaj enflamatuvar protein, IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü, TGF: Dönüştürücü büyüme faktörü).

Çok sayıda epidemiyolojik çalışmada solunabilir kristal silikanın solunum sistemi, bağışıklık sistemi ve böbrekler üzerinde olumsuz etkilere yol açtığı bildirilmiştir (1,8,10,70,71).

Kristal silika tozunun (<10 µm) akciğerde birikimi ile oluşan “silikozis”

ilerleyici, neoplastik olmayan yapısal değişikliklere yol açan ve tedavi edilemeyen fibrotik mesleki akciğer hastalığı olarak tanımlanmaktadır (71,75). Havada bulunan silika konsantrasyonuna göre kronik (klasik), hızlandırılmış ve akut silikozis olmak üzere 3 tipi görölmektedir.

(i) Kronik silikozis, genellikle kristal silikaya düşük konsantrasyonlarda maruziyetten 10 yıl veya daha uzun zaman sonra ortaya çıkmaktadır. Kristal silika ile etkileşen makrofaj, fibroblast ve lenfositler hasarlı bölgede birikmektedir. Oluşan silikotik nodüllerin büyüklüğü kalsifikasyon ve nekrozisin derecesini göstermektedir.

(ii) Hızlandırılmış (akselere) silikozis, kronik silikozise göre daha yoğun ve kısa süreli (5-10 yıl) maruziyet sonrası ortaya çıkmaktadır. Kronik silikozis ve hızlandırılmış silikoziste benzer belirtiler görölmektedir. Farklı olarak hızlandırılmış silikoziste klinik ve radyografik belirtiler çok daha hızlı gelişmekte olup fibrozis daha düzensiz ve yaygındır.

(iii) Akut silikozis ise kristal silikaya kısa süreli yüksek konsantrasyonda ilk maruziyetten birkaç hafta ile 5 yıl arasında değişen süre içinde gelişmektedir. Morfolojik olarak, akciğer dokusu enflamasyonu ve ödemin yanında silikoproteinozis olarak da bilinen alveoler yüzey protein hasarı ile karakterizedir (10,71). Maruziyet kesildikten sonra da silikozis ilerleyebilmekte veya gelişebilmektedir.

Silikozisin ilerlemesi veya silika maruziyetinin bulunması, mikobakteriyel veya mantar enfeksiyonların gelişme riskini artırmaktadır. Bu enfeksiyonlardan en yaygın olanı, *Mycobacterium tuberculosis* bakterilerinin neden olduğu tüberküloz olmakla birlikte silika maruziyeti olan işçilerde *Mycobacterium kansasii* ve *Mycobacterium avium-intracellulare* gibi tüberküloz dışı mikobakterilerden kaynaklı enfeksiyonlar da gelişebilmektedir. Bunun yanı sıra *Nocardia asteroides* ve *Cryptococcus* kaynaklı enfeksiyonlar da görölmektedir (8,10).

Kristal silika maruziyetinin bronşit, amfizem, kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi diğer solunum yolu rahatsızlıklarında istatistiksel anlamlı artışa neden olduğu bildirilmiştir (1).

Kristal silikaya mesleki maruziyetin akciğer kanserine yol açtığına dair kanıtları IARC yeterli bulmuştur. 1997 yılında IARC tarafından kuvars ve kristobalit insanda karsinojen etkisi kesin olarak bilinen maddelerin yer aldığı Grup 1'de; amorf silika karsinojenik etkisi bakımından sınıflandırılmayan maddelerin yer aldığı Grup

3'de sınıflandırılmıştır (42). Amerikan Toraks Derneği de kristal silika maruziyetinin akciğer kanserine yol açabildiğini bildirmiştir (95). Kristal silikanın muhtemel karsinojenite mekanizması hala belirsizliğini korumaktadır. Akciğerlerde fagositoz sırasında reaktif oksijen bileşiklerinin neden olduğu genetik hasar, nükleer faktör kappa B ve aktivatör protein aktivasyonu ve epitel hücre çoğalmasındaki artış kristal silikaya bağlı ilerleyen kanser patojenezi ile ilişkilendirilen mekanizmalar olarak öne sürülmektedir (96–98).

Akciğerlerdeki güçlü immün yanıtın Erasmus sendromu (kristal silikaya maruziyetin eşlik ettiği skleroz) ve Caplan sendromu (kristal silikaya maruziyetin eşlik ettiği romatoit artrit), sistemik lupus eritematozus gibi immünolojik bozukluklara yol açabileceği öngörülmektedir (1,9). Ayrıca immünolojik hastalıklara bağlı olabilen kronik böbrek hastalıkları, ataksik duyuşal nöropati, kronik tiroidit, hipertiroidizm, monoklonal gammopati ve poliarterit nodosa (atardamarda görülen vaskülit) gibi çeşitli hastalıklar ile ilgili vaka raporları bildirilmiştir. Bu toksik etkiler, kristal silikanın doğrudan sitotoksik etkisi veya immün kompleks oluşturarak immünotoksik yanıt oluşturması ile ilişkilendirilmiştir (10).

## **2.5. Kalsiyum Karbonat Toksisitesi**

### **2.5.1. Kalsiyum Karbonatın Fizikokimyasal Özellikleri**

Kalsiyum karbonat; kireçtaşı, dolomit, mermer tozu ve kalsit isimleri ile de bilinmektedir. Kokusuz, beyaz, kristal görünümlü veya toz halinde bir yapıya sahiptir. Suda çözünmez (19).

Kalsiyum karbonatın farklı kullanım alanları bulunmaktadır. Antiasit, kalsiyum takviyesi ve gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tarımsal kireç, çimento, boya, kozmetik, diş macunlarında da kullanımı bulunmaktadır (19).

### **2.5.2. Kalsiyum Karbonat Toksisitesi**

Kalsiyum karbonata cilt, göz, solunum ve sindirim yolu ile maruziyet söz konusu olup toksikolojik olarak önemli ana giriş yolu inhalasyondur (99).

Kalsiyum karbonattan kalsiyumun büyük bir kısmı kalın bağırsaktan emilir. Kalsiyum karbonatın akut toksisitesi düşüktür. Sıçanlar ve farelerde oral LD<sub>50</sub> dozu

6450 mg/kg ve sıçanlar için inhalasyon LD<sub>50</sub> > 3 mg/L hava olarak bildirilmiştir (19,100).

Kalsiyum karbonatın (nano) sıçanlara günde 100, 300 ve 1000 mg/kg vücut ağırlığı doz seviyelerinde gavaj yoluyla oral yoldan verildiği çalışmada tüm doz seviyelerinde toksik bir etki oluşturmadığı rapor edilmiştir. NOAEL 1000 mg/kg vücut ağırlığı / gün olarak kabul edilmiştir (100).

Kalsiyum karbonata (nano) 0,399 mg/L düzeyde inhalasyon maruziyeti geri dönüşümlü alt solunum yolu tahrişine neden olduğu ve kalsiyum karbonata (nano) subkronik solunum maruziyetinin lokal etkileri için Olumsuz Etki Gözlemlenmeyen Konsantrasyon (*No Observed Adverse Effect Concentration*, NOAEC) 0,212 mg/l olduğu bildirilmiştir (100).

Metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *Salmonella typhimurium* suşları TA 98, TA 100, TA 1535 ve TA 1537 ve *Escherichia coli* WP2 uvrA ile (Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (*Organisation for Economic Co-operation and Development*, OECD) test no: 471) *in vitro* gen mutasyon çalışması, insan lenfositlerini kullanan memeli hücrelerinde (OECD test no: 473) *in vitro* kromozom aberasyon çalışması, ve fare lenfoma L5178Y hücrelerini kullanan memeli hücrelerinde (OECD test no: 476) *in vitro* gen mutasyon çalışması sonuçlarına göre kalsiyum karbonatın genotoksik ve mutajenik olmadığı bildirilmiştir (100).

Muhtemel kanserojen aktivitesini doğrudan araştırmak için kalsiyum karbonat üzerinde yaşam boyu hayvan çalışmaları bulunmamaktadır. Bununla birlikte, kalsiyum karbonat, *in vitro* genotoksisite çalışmalarında negatif sonuçlar vermiştir ve kalsiyum karbonat ile tekrarlanan doz çalışmalarında, kalsiyum karbonatın hiperplazi veya pre-neoplastik lezyonları indükleyebildiğine dair hiçbir kanıt yoktur. Ayrıca, uzun vadeli insan verilerinde herhangi bir kanserojenik veriye rastlanmamıştır. Kalsiyum karbonatın karsinojenite riski oluşturması beklenmemektedir (100).

Literatürde, hamile kadınlara kalsiyumun uygulandığı bir dizi destekleyici çalışma bildirilmiştir. Hiçbir teratojenik veya üreme etkisi kaydedilmemiştir. Bununla birlikte, gebelik sırasında aşırı miktarda kalsiyum karbonat antiasit tablet tüketiminin, neonatal hiperkalsemiye neden olabileceği ve bu etkilerin doğum ve hastanede tedaviyi takiben tamamen tersine döndüğü bildirilmiştir (100).

1000 mg / kg / gün doz seviyesinde 48 güne kadar bir süre boyunca erkek ve

dişi sıçanlara verilen kalsiyum karbonatın üreme, doğurganlık veya gelişme üzerine toksik etki oluşturmadığı gösterilmiştir. Üreme toksisitesi için NOAEL 1000 mg/kg/gün olarak kabul edilmiştir. Ayrıca kalsiyum karbonatın kullanılan konsantrasyonlarda ne fetotoksik ne de teratojenik olmadığını göstermiştir. Test edilen en yüksek doz seviyesinde (diyet % 1,25 Ca) hiçbir yan etki görülmediğinden, sıçanlarda teratojenik ve maternal toksik etkiler için NOAEL % 1,25 Ca'dan fazladır, eşdeğer kalsiyum karbonat düzeyi yaklaşık 1963-2188 mg/kg/gün'dür (100).

Kalsiyum karbonat toksik etkilerini cilt, göz ve solunum sistemi üzerinde göstermektedir. Kalsiyum karbonatın cilt ve göz ile teması hafif tahrişe, cilt kuruluğuna, gözlerde kızarıklığa ve göz yaşarmasına yol açabilmektedir. Kalsiyum karbonatın saf kristal veya toz halinin solunması ise solunum yollarının tahriş, öksürük, hapsirme ve burun akıntısına neden olmaktadır (99,101).

## 2.6. İşyeri Kaynaklı Toz ve Silika Maruziyetinde Yasal Düzenlemeler

Çalışma ortamında ortaya çıkabilecek risklerin önlenmesi amacıyla uluslararası kuruluşlar tarafından havada bulunan toz seviyelerini sınırlandırıcı çeşitli standartlar belirlenmiştir.

Solunabilir tozlar için maruziyet sınır değerleri, İş Güvenliği ve Sağlığı İdaresi (*Occupational Safety and Health Administration, OSHA*) ve NIOSH tarafından 5000  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  ve Amerikan Hükümeti Endüstri Hijyenistleri Konferansı (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists, ACGIH*) tarafından 3000  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  olarak belirlemiştir (Tablo 2.4.) (102). OSHA kristal silika için havada bulunmasına izin verilen maruz kalma sınırını (*permissible exposure limit, PEL*) zaman ağırlıklı ortalama değeri 50  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  olarak, NIOSH ise önerilen maruziyet sınır değerini (*recommended exposure limit, REL*) 50  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  olarak belirlenmiştir. ACGIH'e göre kristal silika için eşik sınır değer (*Threshold Limit Value, TLV*) 25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  olarak bildirilmiştir (103). Kalsiyum karbonat için ise izin verilen mesleki maruziyet sınır değerleri toplam toz miktarı cinsinden zaman ağırlıklı ortalama değer (*Time Weighted Average, TWA*) OSHA tarafından 15  $\text{mg}/\text{m}^3$ , NIOSH tarafından 10  $\text{mg}/\text{m}^3$  olarak bildirilmiştir (99).

**Tablo 2.4.** Kristal silika ve solunabilir toz ile ilgili uluslararası kuruluşlar tarafından belirlenen mesleki maruziyet limit değerleri.

<b>Madde</b>	<b>Uluslararası Kuruluş</b>	<b>Mesleki Maruziyet Limitleri</b>
<b>Solunabilir toz</b>	OSHA	5000 µg/m <sup>3</sup> (TWA-PEL)
	ACGIH	3000 µg/m <sup>3</sup> (TWA-TLV)
<b>Kristal silika</b>	OSHA	50 µg/m <sup>3</sup> (PEL)
	NIOSH	50 µg/m <sup>3</sup> (REL)
	ACGIH	25 µg/m <sup>3</sup> (TLV)
<b>Kalsiyum karbonat</b>	OSHA	15 mg/m <sup>3</sup> (TWA-PEL)
	NIOSH	10 mg/m <sup>3</sup> (TWA-REL)

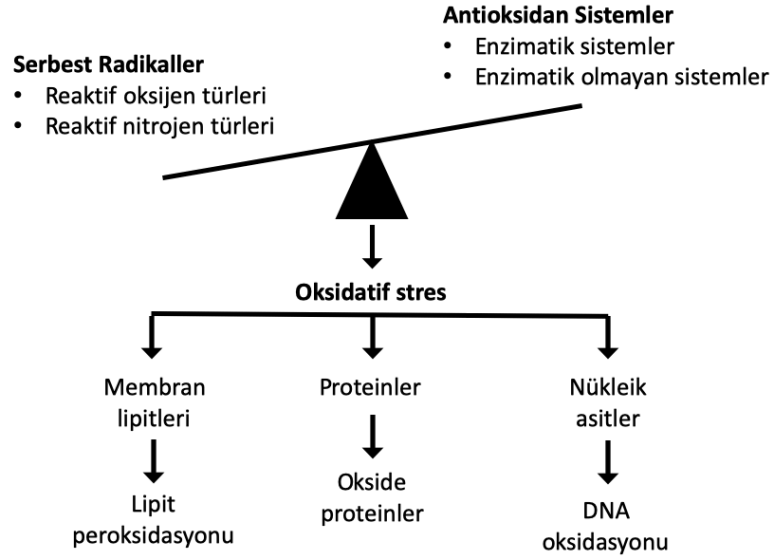
ACGIH: Amerikan Hükümeti Endüstri Hijyenistleri Konferansı (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*), NIOSH: Mesleki Güvenlik ve Sağlık Ulusal Enstitüsü (*National Institute for Occupational Safety and Health*), OSHA: İş Güvenliği ve Sağlık İdaresi (*Occupational Safety and Health Administration*), PEL: İzin verilen maruz kalma sınırı (*Permissible exposure limit*), REL: Önerilen maruziyet sınır değeri (*Recommended exposure limit*), TLV: eşik sınır değeri (*Threshold Limit Value*), TWA: Zaman ağırlıklı ortalama değer (*Time Weighted Average*).

Ülkemizde iş sağlığı ve güvenliği yönünden tozla mücadele etmek ve bu işlerde çalışanların tozun etkilerinden korunmalarını sağlamak için alınması gerekli tedbirlere dair usul ve esasların belirlendiği “Tozla Mücadele Yönetmeliği” (Resmi gazete tarihi: 05.11.2013, Resmi gazete sayısı: 28812) yürürlüğe girmiştir. Buna göre risk yönetiminde ortamda bulunan tozun çeşidi, tozun sağlık ve güvenlik yönünden tehlike ve zararları, maruziyet düzeyi, süresi ve sıklığı, OSHA standartlarına paralel olarak belirlenen mesleki maruziyet sınır değerleri, toz ölçüm sonuçları, alınması gereken önleyici tedbirler, sağlık gözetim sonuçları gibi hususlarının dikkate alınması gerektiği belirtilmektedir (104,105).

## 2.7. Oksidatif Stres

Biyolojik sistemlerde hücrel metabolizma sırasında oluşan serbest radikaller ile onları detoksifiye eden antioksidan sistemler arasında bir oksidatif denge söz konusudur. Serbest radikal oluşumundaki artış veya antioksidan sistemlerin yetersiz kalması sonucu, oksidatif dengenin serbest radikaller lehine bozulması oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.4.) (106,107).

Oksidatif stres sonucu oluşan serbest radikaller membran lipitlerini, hücre içi proteinlerini ve nükleik asitleri hasara uğratarak yapı ve fonksiyonları üzerinde değişikliğe yol açabilir ve hücre ölümüne kadar gidebilen hasar meydana getirebilir (108). Yaşlanma, kardiyovasküler ve nörolojik bozukluklar, immün sistem bozuklukları, solunum yolu hastalıkları, enflamatuvar hastalıklar ve kanser gibi pek çok patolojik durum oksidatif stres ile ilişkilendirilmektedir (109–111).



Şekil 2.4. Oksidatif stres ve hasar oluşumu.

### 2.7.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip atom veya molekül olarak tanımlanır. Serbest radikaller, son derece reaktif olmalarına yol açan ve kararlı olmalarını engelleyen taşıdığı eşleşmemiş elektronu eşleyerek kararlı duruma geçebilmek için diğer bileşikler ile hızla tepkimeye girme eğilimindedirler (112).  $Fe^{+3}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  ve  $Mo^{+5}$  gibi bazı elementler eşleşmemiş elektronlara sahip olmasına rağmen serbest radikal olarak değerlendirilmezler, ancak önemli oksidasyon reaksiyonlarına neden olurlar (113).

Serbest radikaller metabolik süreçler (hücre solunumu gibi) sırasında endojen olarak oluşabildiği gibi çevresel oksidanların (ilaç toksisitesi, sigara dumanı, alkol, ultraviyole radyasyon gibi) etkisi ile ekzojen olarak da oluşabilmektedirler (114,115).



Kovalan bağların homolitik bölünmesi ( $X:Y \rightarrow X^\cdot + Y^\cdot$ ), bir molekülden tek bir elektron kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi ( $X:Y \rightarrow X^{\cdot-} + Y^+$ ) veya bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ( $X + e^- \rightarrow X^{\cdot-}$ ) ile serbest radikaller oluşabilmektedir. Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucunda meydana gelir. Serbest radikaller pozitif veya negatif yüklü veya nötral olabilirler (116).

Serbest radikal oluşturan başlıca mekanizmalar arasında; otooksidasyon, demir ve bakır gibi geçiş metal iyonların etkisi, fotooksidasyon, enzimatik oksidasyonlar (ksantin oksidaz, nötrofil miyeloperoksidaz), sitokrom P-450 monooksijenazlar tarafından radikal oluşumu (halojenlenmiş hidrokarbonlar ve hava kirleticileri olarak bilinen azot oksitlerden oluşan radikaller) yer alır (117).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, moleküler oksijen ( $O_2$ )'den türeyen reaktif oksijen türleridir (Tablo 2.5.). Enerji üretimi ve detoksifikasyon gibi önemli metabolik olaylarda rol olan moleküler oksijen, iki eşlenmemiş elektrona sahiptir ve radikal olmaya çok elverişlidir. Organizmadaki geçiş metallerini (Fe, Cu gibi) içeren enzimler aracılığı ile moleküler oksijene tek elektron transferi ile oksitlenme reaksiyonları meydana gelir (118). Başlıca reaktif oksijen türleri süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil ( $OH^\cdot$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )'dir. Süperoksit ve hidroksil radikalleri elektron eksiklikleri nedeni ile başka moleküller ile kolaylıkla elektron alışverişi yapabilir. Hidrojen peroksit ise prooksidandır ve elektron eksikliği olmadığı halde başka moleküllere radikallerden daha zayıf bağlar ile bağlanır (107).

**Tablo 2.5.** Biyolojik sistemlerde önemli olan reaktif oksijen ve nitrojen türleri (116).

Radikaller		Radikal olmayanlar	
Süperoksit	( $O_2^{\cdot-}$ ),	Hidrojen peroksit	( $H_2O_2$ )
Hidroksil	( $OH^\cdot$ )	Hipokloröz asit	HOCl
Peroksil	( $RO_2$ )	Ozon	( $O_3$ )
Alkoksil	( $RO^\cdot$ )	Singlet oksijen	$O^\cdot$
Hidroperoksil	( $HO_2$ )	Hidroperoksit	ONOO $^-$
Nitrik oksit	( $NO^\cdot$ )	Peroksinitrit	L(R)OOH

Süperoksit radikali, oksijenli solunum yapan (aerobik) hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu ( $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$ ) veya elektronca

zengin bir ortam olan iç mitokondri zarında ve ksantin oksidaz gibi enzimlerin katalitik etkisi sırasında oluşabilmektedir. Ayrıca indirgenmiş geçiş metallere oksidasyonu sırasında da meydana gelebilmektedir ( $O_2 + Fe^{+2} \rightarrow O_2^{\cdot-} + Fe^{+3}$ ) (119). Süperoksit radikali yüksek derece reaktif olmayıp hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metallere indirgeyicisi olması açısından toksikolojik olarak önem taşımaktadır (120).

Biyolojik sistemlerde süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonda iki tane süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluşturur. Bu reaksiyona ( $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ) dismutasyon tepkimesi denir. Hidrojen peroksit, oksitleyici ve indirgeyici özelliği zayıf olmasına rağmen biyolojik membranları kolaylıkla geçebildiği için serbest radikal hasarını iletebilmekte ve en reaktif radikal olan hidroksil kaynağı olması nedeni ile serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynamaktadır (121).

Hidrojen peroksit geçiş metallere (Fe, Cu gibi) varlığında Fenton reaksiyonu ( $H_2O_2 + Fe^{+2} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + Fe^{+3}$ ) ile ve süperoksit radikallerinin varlığında Haber-Weiss reaksiyonu ( $H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + O_2$ ) sonucunda hidroksil radikalini oluşturur (122). Hidroksil radikali DNA, protein, lipit, aminoasit, glikoz ve metaller ile etkileşebilen en güçlü oksitleyici radikaldir (123). Oluşturduğu yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikaller oluşturmakta ve böylelikle hücre hasarına yol açmaktadır (124).

Reaktif nitrojen bileşikleri ise yapısında oksijen ve azot bulunduran nitrik oksit (NO) kaynaklı serbest radikaller veya peroksitlerdir. Reaktif oksiten türleri gibi yüksek reaktiviteye sahiptir ve aşırı üretimi nitrozatif strese yol açabilir. Nitrozatif stres proteinlerin yapısını değiştirebilen nitrozilasyon reaksiyonlarına neden olur (125). L-arjininden nitrik oksit sentaz enziminin katalizlenmesi ile oluşan nitrik oksit, süperoksit radikali ile reaksiyona girerek oldukça reaktif bir oksidan olan peroksinitriti (ONOOH) oluşturur. Peroksinitrit, hidroksil radikaline benzer şekilde davranır ve DNA hasarına yol açar (126).

### 2.7.2. Oksidatif Stres Oluşumu

Tüm biyolojik sistemler yaşam için uygun koşulları sağlamak için oksitlenme ve indirgenme reaksiyonlarını dengeleyerek redoks homeostazını sağlarlar. Redoks

homeostazındaki bozulmalar ile biriken oksidan maddeler lipit, protein ve DNA gibi makromolekülleri oksitleyerek yapı ve işlev değişikliklerine neden olurlar (125).

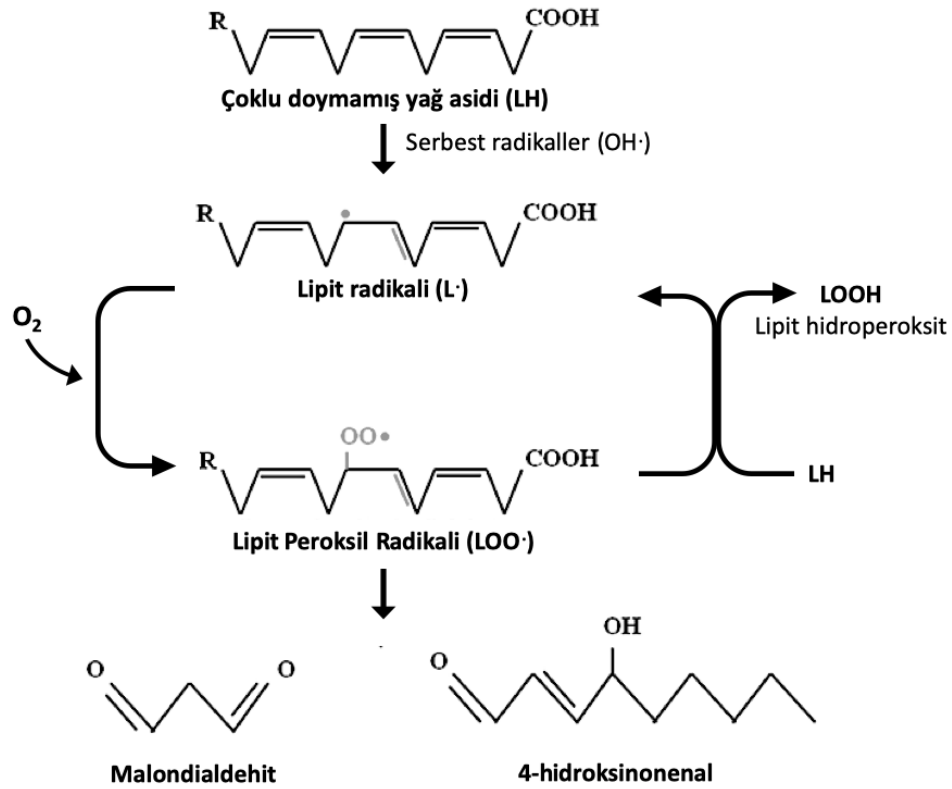
Oksidatif stres oldukça karmaşık bir süreçtir ve nicel olarak belirlenmesi zordur. Oksidatif stresin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan biyogöstergeler aşağıda sıralanmıştır (127):

- Doğrudan reaktif oksijen/nitrojen türlerinin ölçümü
- Antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, katalaz (CAT) gibi)
- Enzimatik olmayan antioksidan düzeyleri (Glutasyon, Vitamin C vb.)
- Redükte glutasyon (GSH) / okside glutasyon (GSSG)
- Lipit peroksidasyon ürünleri (Malondialdehit (MDA), tiyobarbütirik asit reaktif türleri (TBARs), hidroperoksitler vb.)
- Protein oksidasyon ürünleri (karbonil grupları, nitrözaminler vb.)
- DNA oksidasyon ürünleri (8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) vb.)

### **Lipit Peroksidasyonu**

Serbest radikaller, hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna yol açarak lipit peroksidasyonunu başlatırlar. Yağ asidi zincirlerine saldırarak metilen grubundan (-CH<sub>2</sub>) hidrojen atomu koparılması sonucu yağ asidi zinciri bir lipit radikali özelliği kazanmış olur. Lipit radikalinin moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu lipit peroksil radikalleri oluşur. Oluşan bu radikaller yağ asidi zincirlerinden hidrojen atomu koparıp zincirleme bir reaksiyonu başlatmış olur. Lipit peroksitler yıkıldığında biyolojik olarak aktif olan yıkım ürünleri açığa çıkar. Bunlardan en önemli olanları MDA ve 4-hidroksinonenal'dir (Şekil 2.5.). Bunun sonucunda membran bütünlüğü oksidatif hasarla bozulur. Membran yapı ve fonksiyonlarında değişiklikler ortaya çıkabilir ve hücre ölümüne kadar giden bir tablo görülebilir (123,128–130).

MDA, hücre membranındaki hidroperoksitleri etkileyerek iyon geçirgenliğini bozar ve enzim aktivitelerini değiştirebilir. DNA gibi makromolekülleri etkileyerek ciddi hasarlara neden olabilir. MDA lipit peroksidasyon derecesi ile iyi korelasyon göstermektedir ve oksidatif stresin biyogöstergesi olarak kullanılmaktadır (128).



Şekil 2.5. Lipit peroksidasyon mekanizması.

### Protein Oksidasyonu

Hipokloröz asit gibi oksidatif moleküller ile doğrudan veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile proteinlerin yapısında bulunan sülfhidril ve aromatik aminoasit grupları okside olabilmektedir. Bölgesel aminoasit modifikasyonu, peptit zinciri parçalanması, enzim aktivitesinde değişiklikler, membran taşıyıcı proteinlerde hasar, reseptörler ile etkileşme gibi çeşitli mekanizmalar ile hücre protein oksidasyonundan etkilenmektedir. 3-nitrotirozin ve protein karbonilleri oksidatif protein hasarını değerlendirmek için en yaygın olarak kullanılan biyogöstergelerdir (131,132).

### Oksidatif DNA Hasarı

Oksidatif DNA hasarı radyasyon, endüstriyel kimyasallar gibi ekzojen veya çeşitli endojen kaynakların etkisi ile oluşan serbest radikallerin, DNA tek/çift zincir kırıkları veya baz modifikasyonları gibi DNA'da oluşturduğu hasardır. Oksidatif DNA hasarının başta kanser olmak üzere birçok hastalığın patojenezinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Yüksek reaktiviteye sahip serbest radikaller hem pürin hem pirimidin

bazları ile ve ayrıca deoksiriboz dizisi gibi DNA molekülünün tüm bileşenleri ile reaksiyona girerek DNA hasarı oluşturabilir (107,125). Özellikle hidroksil radikali, reaktif nitrojen türleri, lipid peroksidasyon ürünleri hipokloröz asit gibi reaktif ürünler genetik materyalde 5-hidroksi-6-hidrotimin, timin glikol, 5-hidroksisitozin, sitozin glikol, 5-hidroksiurasil, urasil glikol, 8-hidroksiadenin ve 2-hidroksidenin gibi oksidatif baz hasar ürününün oluşmasına yol açabilir (107,133,134).

8-OHdG, reaktif oksijen türlerinin DNA'da neden olduğu oksidatif baz hasar ürünlerinden en çok bilinenidir. Guanin molekülünün 8.pozisyonunda meydana gelen oksidasyon sonucu oluşur ve DNA hasarının belirlenmesinde biyogösterge olarak tercih edilir (107,110,134,135). Mutajenik olması nedeni ile karsinogenin potansiyel bir biyobelirtecidir. DNA'nın oksidatif hasarına bağlı olarak serum, plazma, idrar ve hücre lizatında 8-OHdG oluşabilmektedir (111).

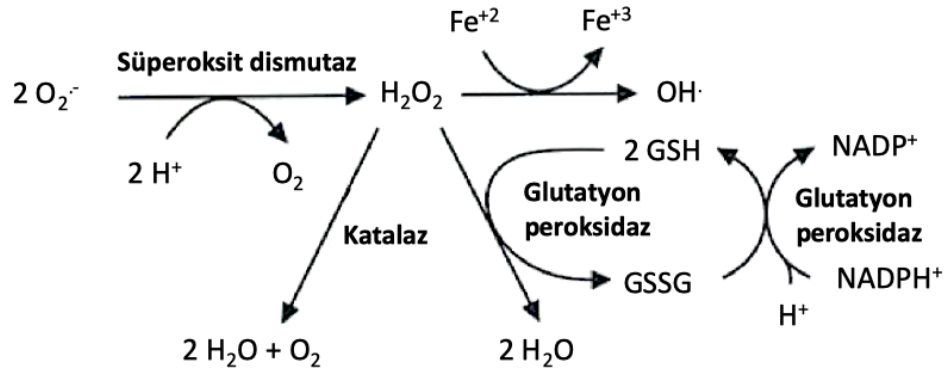
### 2.7.3. Antioksidan Sistemler

Hücrelerdeki okside olma eğilimi olan membran lipitleri, proteinler ve nükleik asitler gibi yapıların serbest radikaller tarafından oksidasyonunu geciktirebilen veya önleyebilen maddelere antioksidan, bu savunma mekanizmalarına ise antioksidan sistemler denir (109,126).

Antioksidanlar, serbest radikallere elektron transferi yaparak oksidatif hasarı engellemektedir. Antioksidanların dört farklı etki mekanizması vardır (107,126). (i) Süpürme (uzaklaştırma); reaktif oksijen türlerini ortamdan uzaklaştırır veya daha zayıf etkili bir moleküle çevirirler. Katalitik metal iyonlarını ortamdan uzaklaştırırlar. (ii) Baskılama; oksidanlara bir hidrojen aktararak onları etkisiz hale getirebilir veya etkilerinin/reaksiyon hızlarını azaltırlar. (iii) Onarma; serbest radikallere bağlı oluşan biyolojik hasarı onarıcı etkiler gösterirler. (iv) Zincir koparma; serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirleme reaksiyonların başlamasını engeller.

Antioksidanlar biyolojik sistemlerde doğal olarak sentezlenebildiği gibi (endojen) dışarıdan besinler ile (ekzojen) de alınabilmektedir. Endojen antioksidanlar, yapılarına göre enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere sınıflandırılır (107). SOD, CAT, glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR) başlıca enzimatik antioksidanlardır (Şekil 2.6.). GSH vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol), vitamin C (askorbik asit), karotenoidler ve flavonoidler enzimatik olmayan

antioksidanlardır (125,129).



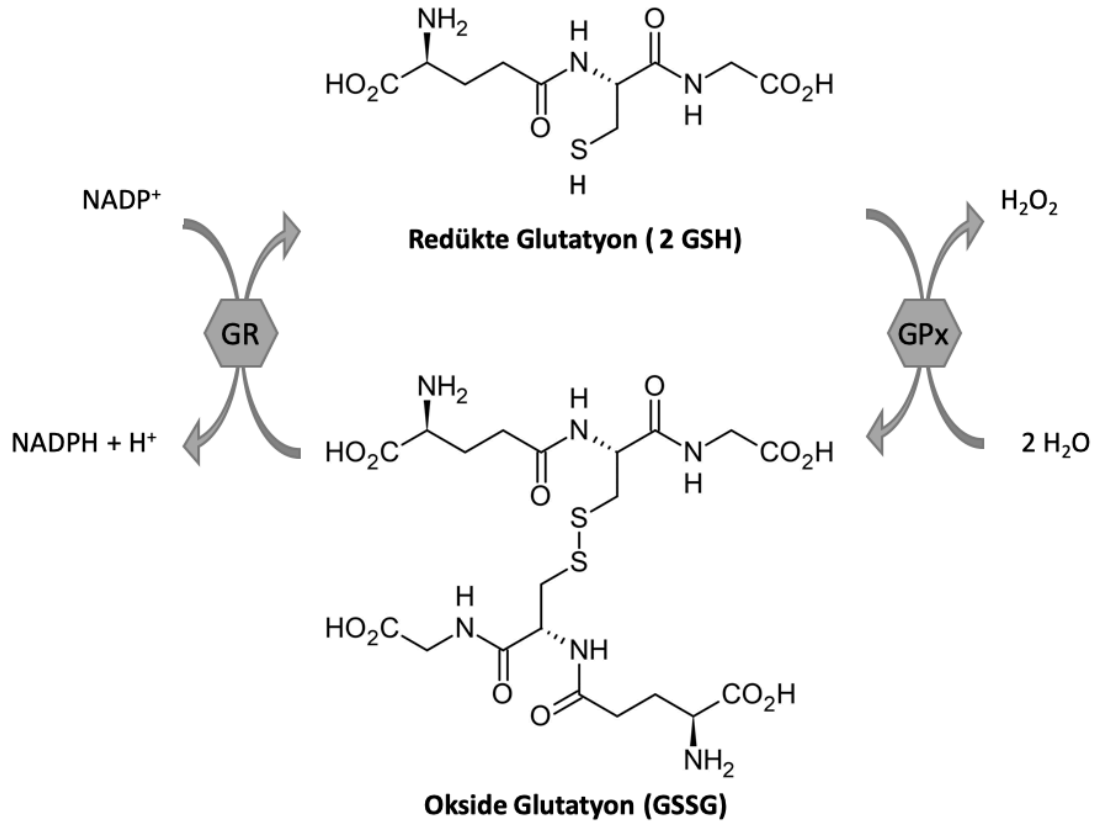
**Şekil 2.6.** Başlıca enzimatik antioksidanlar ve tepkimeleri.

SOD, süperoksit anyonlarını daha az toksik olan  $H_2O_2$  ve  $O_2$  dönüşümünü katalizleyen ve hücrel antioksidan savunma mekanizmasının önemli bir parçasını oluşturan antioksidan bir enzimdir (116). Reaktif oksijen türleri ve süperoksit anyonlarına karşı en önemli antioksidan savunma sistemidir. Mangan süperoksit dismutaz (MnSOD), bakır-çinko süperoksit dismutaz (CuZnSOD) ve bakır süperoksit dismutaz (CuSOD) olmak üzere 3 izoformu mevcuttur (126).

CAT,  $H_2O_2$ 'nin oksijen ve suya dönüşümünü katalizleyen ve lipid peroksidasyonuna karşı hücre savunmasında önemli rol oynayan antioksidan enzimdir. CAT enzimi temel olarak peroksisomlarda bulunmaktadır, sıçan kalbi dışında memeli hücrelerinin mitokondrilerinde bulunmamaktadır (126).

GPx; hidrojen peroksitleri suya, lipid-hidroperoksitleri ise toksik olmayan alkollere indirgenmesini katalize eden ve lipid peroksidasyonuna karşı hücre savunmasında rol oynayan antioksidan bir enzimdir. Hücre içinde sitoplazmada ve mitokondride bulunur (126,136).

Antioksidan bir enzim olan glutatyon redüktaz (GR), hücre içi glutatyon indirgeme/yükseltgeme olayında önemli bir role sahiptir. Oksidatif strese karşı koruma için yüksek GSH/GSSG oranı gereklidir ve GR bu oranı yükseltir. GSSG'den GSH'ye dönüşümünü ve indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'tan GSSG'nin disülfid bağına elektron transferini katalizler (Şekil 2.7.) (137).



**Şekil 2.7.** Redükte ve okside glutasyon oluşumu.

GPx: Glutasyon peroksidaz, GR: Glutasyon redüktaz, H<sub>2</sub>O: Su, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: hidrojen peroksit, NADP<sup>+</sup>: nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, NADPH: İndirgenmiş NADP<sup>+</sup>.

GSH, serbest radikallere ve oksidatif hasara karşı güçlü en önemli antioksidan moleküllerden biridir. Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda glutasyon transferaz için nükleofilik bir ko-substrat görevi gören aynı zamanda hidroperoksitlerin redüksiyonunda GPx'lar için elektron donörü görevini üstlenen tripeptit yapısında ( $\gamma$ -glutamil-sisteinil-glisin) bir bileşiktir (125,137). GSH, hidroksil radikali ve singlet oksijen süpürücüsüdür ve detoksifikasyon ve hücre redoks durumunu kapsayan mekanizmalar ile apoptoza karşı hücreleri korur. Vücutta GSH ve GSSG halinde bulunabilir (Şekil 2.7.) GSH'daki sistein aminoasidinde bulunan tiyol grubu reaktif oksijen türleri gibi kararsız molekülleri redükleyerek (indirgeyerek) kendisi reaktif hale gelir ve iki reaktif GSH birleşerek GSSG oluşturur. GSSG, GR enzimi ile yeniden GSH'ye dönüştürülür. GSH/GSSG oranı oksidatif stresin önemli bir ölçüsüdür. Oksidatif stres altında hücrenin GSSG'yi GSH'ye indirgeme özelliği azalır, GSSG hücrede birikir ve GSH/GSSG oranı düşer (137).

## 2.8. İmmünotoksik Yanıt ve Bazı İmmün Yanıt Göstergelerinin Özellikleri

İmmün sistem organizmayı korumak amacı ile düzenli ve uyum içinde çalışan hücre, hücre ürünleri, doku ve organlardan meydana gelen karmaşık ve dinamik bir sistemdir. İmmün sistem, yabancı madde ile temas ettiğinde iki tip yanıt oluşturmaktadır: doğal (özellik (spesifik) olmayan) immün yanıt ve kazanılmış (özellik) immün yanıt. Doğal immünite, antijene karşı organizmanın ilk savunma mekanizması olup immünolojik hafıza içermemektedir ve ilk veya tekrarlanan temasta yanıtın şiddeti değişiklik göstermemektedir. Deri, mukozal hücreler, kan ve dokulardaki fagositik hücreler (makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller), doğal öldürücü hücreler, akut faz proteinleri ve kompleman sistemi doğal immünitenin başlıca elemanlarıdır. Ayrıca kemokinler, interferonlar, interlökinler, lenfokinler, tümör nekroz faktör gibi sitokinler de doğal immünitenin birer elemanıdır. Kazanılmış immünite ise, antijen ile karşılaşıldığında uyarılan ve sadece o antijene özgü gelişen, immünolojik hafıza oluşumu ile karakterize, ikinci karşılaşmada hızlı ve artan şekilde yanıt verilmesini sağlayan sistemdir. Lenfositler, antikorlar ve lenfokinler özgül immünitenin başlıca elemanlarıdır. Özellik immün yanıtın iki tipi bulunmaktadır: antikor aracılı (hümorale) immün yanıt ve hücre aracılı immün yanıt. Hümorale immün yanıtta B hücreleri tarafından üretilen ve antijeni spesifik olarak tanıyan antikorlar önemli rol oynarken hücreli immün yanıtta antijeni spesifik olarak tanıyan T lenfositler önemli rol oynamaktadır (138).

Fiziksel, kimyasal ve biyolojik etmenlere çevresel, mesleki, terapötik veya kazai maruziyetin immün sistemi etkilemesi sonucu immün sistem bileşenleri ve işlevleri bozulabilmektedir. İmmünespresyon, alerji, otoimmünite ve enflamasyonu kapsayan olumsuz etkiler ortaya çıkabilmektedir (139).

İnflamatuvar reaksiyonlar vücudun savunma mekanizmalarından biridir. İnflamatuvar yanıtta temel rolü IL-1 ve TNF-alfa oynamaktadır. İnflamatuvar mediyatörlerin kronik ve aşırı üretimi otoimmün hastalıklar ile ilişkilendirilmektedir. Fibroblast proliferasyonu, fibrozis ve mikrovasküler proliferasyon ile hastalığı başlatabildiği gibi astım, ateroskleroz veya Alzheimer gibi mevcut hastalıkları daha da şiddetlendirebilmektedir (140).



İmmün sistemin kompleks bir sistem olması, değerlendirilmesinde tek bir fonksiyonel ve/veya morfolojik parametreden yararlanılamaması, immünotoksik etkinin stres, beslenme, genetik yapı gibi pek çok faktörden etkilenmesi maddelerin immünotoksitesini değerlendirmeyi zorlaştırmaktadır. Bununla birlikte histopatolojik bulgular, hematolojik parametreler, doğal immünite, humoral ve hücrel immünite elemanlarının tayini immünotoksik potansiyeli değerlendirmede kullanılmaktadır. Sitokinler, immün yanıtı modüle ederek ve düzenleyerek homeostazda çok önemli bir rol oynamaktadır ve genellikle immünotoksitenin biyobelirteçleri olarak kabul edilmektedir (138).

### **2.8.1. Tümör Nekroz Faktör- alfa**

TNF-alfa, kaşeksin olarak da adlandırılan, özellikle monosit ve makrofajlar olmak üzere T-lenfosit, nötrofil, mast hücresi, fibroblast ve endotel hücrelerinden sentezlenen, glikoprotein yapısında bir proenflamatuvar sitokindir. Doku hasarı ya da fiziksel stres sonrasında kanda ilk saptanabilen sitokindir ve birçok otoimmün hastalıkta enflamatuvar süreçte önemli rol oynar (141). Lipopolisakkaritler, virüs, gram pozitif bakteri, tümör hücreleri, immün kompleks oluşumu, kompleman sistem aktivasyonu, IL-1, IL-2 gibi faktörlerin salıverilmesini artırırken; IL-10, prostaglandin ve kortikosteroidler ise salıverilmesini azaltır (142).

TNF-alfa, monositler için kemotaktik bir ajan olarak görev yapar ve fagositik aktiviteyi artırır. Ayrıca endotel hücrelerini adezyon moleküllerini ve kemokinleri üretmek için uyarır. TNF-alfa, T-lenfosit ve doğal öldürücü hücreleri uyararak neoplastik hücrelere ve parazitlere karşı sitotoksik etki göstermektedir (139,143).

Pro-enflamatuvar olaylardaki etkileri eritrositler hariç tüm hücrelerin yüzeyindeki sisteinden zengin bölge içeren TNF reseptör 1'e bağlanarak gösterir. Uyarıdan sonra sinyal kaskatı; nükleer faktör kappa B ve aktivatör protein-1 ile özellikle enflamasyon sürecinde veya apoptoz oluşmasında etkindir. TNF-alfa, pleiotropik (tek bir sitokin, birden çok hücre tipi üzerinde etkili) etkili olup enflamatuvar hastalık durumunda çeşitli hücrelerde farklı etkilere yol açabilmektedir. Düşük konsantrasyonlarda enfeksiyonlara karşı savunmada organizmanın aktivasyonunu sağlarken yüksek konsantrasyonlarda enflamasyon ve doku hasarına neden olduğu gösterilmiştir. İmmün aracılı hastalıklarda TNF-alfa düzeyleri yüksek

bulunmuştur (143).

### 2.8.2. İnterlökin-1beta

IL-1, enflamasyon ve immünolojik reaksiyonlar ve doku hasarına karşı vücudun oluşturduğu yanıtın önemli mediyatörlerinden biridir (144).

İnterlökin (IL)-1 sitokin ailesinin, pro-enflamatuvar etkiye sahip 7 üyesi (IL-1alfa, IL-1beta, IL-18, IL-33, IL-36 alfa, IL-36 beta, IL-36gamma) ve anti-enflamatuvar etkiye sahip 4 üyesi (IL-1Ra, IL-36Ra, IL-37 ve IL-38) bulunmaktadır (145).

Lökositik pirojen, lökositik endojen mediatör, mononükleer hücre faktörü, lenfosit aktive edici faktör olarak da bilinen IL-1beta, insanlarda *IL1B* geni tarafından kodlanan bir sitokin proteindir. IL-1beta, IL-1beta-dönüştürücü enzim (sitozolik kaspaz 1) tarafından enzimatik olarak bölünerek aktif 154 amino asit, 17 kDa olgun peptide bölünen 269 amino asitli pro-sitokin olarak sentezlenir. IL-1beta, makrofajlar, monositler, astrositler, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, keratinositler, adipositler, T hücreleri ve eozinofiller dahil birçok hücre türü tarafından üretilir. IL-1alfa ve IL-1beta yalnızca % 26 amino asit benzerliğine rağmen, aynı hücre yüzeyi reseptörlerine (immün veya enflamatuvar yanıtlarda rol oynayan çeşitli hücre tiplerinde bulunan IL-1 RI (IL-1 reseptör tip I) ve IL-1 RII (IL-1 reseptör tip II) bağlanırlar (146–149).

Normal IL-1 üretimi, enfeksiyon ve yaralanmaya karşı konakçı yanıtlarına aracılık etmede kritik öneme sahiptir. IL-1'in immünolojik, pro-enflamatuvar ve koruyucu fonksiyonları bulunmaktadır. TNF-alfa'ya benzer sitotoksik aktivitesinin yanında; T hücre aktivasyonu, B hücre büyümesi ve farklılaşması, doğal öldürücü hücrelerin aktivasyonu, lenfokin ve kompleman için gen ekspresyonu ve endotelial hücre aktivasyonu gibi özellikleri bulunmaktadır (144).

Aktive olmuş fagositik hücrelerin ürünü olan IL-1 sinoviyal fibroblastlar, keratinositler ve langerhans hücreleri, böbrek mezenşimal hücreleri, B ve T lenfosit hücreleri, doğal öldürücü hücreler, astrositler ve mikroglia hücreleri, damar endotelial hücreleri, düz kas hücresi, kornea, diş eti gibi hücrelerden sentezlenebilmektedir (150). IL-1, hem akut hem de kronik patolojik enflamatuvar hastalıklar ile ilişkili bir sitokindir. IL-1'in aktif olarak katıldığı hastalık durumları arasında artrit, iltihaplı bağırsak hastalığı ve şok gibi iltihaplı hastalıkların yanı sıra ateroskleroz, alerjik

hastalıklar ve bazı kanser tipleri yer alır (146–149,151).

### 2.8.3. Clara Hücre Protein 16

Memeli akciğerlerinde bulunan siliyer olmayan sekretuar hücre tiplerinden birisi olan Clara hücreleri, salgıladıkları maddeler ile bronşiyal epitel hücre onarımında kök hücre gibi davranmakta ve solunum yolunun korunmasında rol oynar. Ayrıca Clara hücreleri yüksek bir ksenobiyotik biyotransformasyon kapasitesine de sahiptir (152,153).

Clara hücreleri tarafından salgılanan ve önemli biyolojik aktiviteye sahip ana proteinlerden biri 15.840  $\approx$  16 kDa ağırlığında olan Clara hücre protein 16 (CC16), 70 aminoasit alt biriminden oluşan disülfid köprülü homodimerik bir proteindir (152,154).

CC16 solunum sistemini oksidatif strese ve enflamasyona karşı korumaktadır. Bunu, hasara neden olacak immün sistemin aktivasyonuna karşı koruyucu immünsüpresif etkisi ile ve TNF-alfa, fosfolipaz A2 gibi enflamatuvar yanıt mediyatörlerinin üretimini ve/veya aktivitesini düzenleyerek anti-enflamatuvar etkisi ile gerçekleştirdiği düşünülmektedir (152,153).

Serum CC16 düzeyinin, solunum epitel bütünlüğünü değerlendirmek ve geçirgenlik değişikliklerinin erken dönem tanısına yönelik iyi bir biyogösterge olduğu düşünülmektedir (152). Serumda CC16 düzeyinin kolay ölçülebilen bir biyobelirteç olduğu için çevresel ve mesleki toksikoloji çalışmalarında önemli bir yeri vardır. İnsanlarda sigaraya akut maruziyetin serum CC16 düzeylerinde artışa yol açtığı (155), ancak silika tozuna kronik maruziyetin Clara hücre sayılarındaki azalmaya bağlı olarak bronkoalveoler lavajda ve serum düzeylerinde CC16 düzeylerinde eşzamanlı olarak azalmaya yol açtığı (156) gösterilmiştir.

### 2.9. Tek Hücre Jel Elektrophorez (Comet) Yöntemi

Son yıllarda gelişen tek hücre jel elektrophorezi yöntemi; *in vitro*, *in vivo* ve *ex vivo* sistemlere uygulanabilen, DNA sarmal kırıklarının tespiti için sıklıkla tercih edilen, hassas, güvenilir ve hızlı bir genotoksisite yöntemidir. Tek hücre jel elektrophorez yönteminde hasarlı DNA'nın görünüşü, kuyruklu yıldıza benzediği için "comet" yöntemi olarak da adlandırılmaktadır (157). Bu yöntemde DNA tek ve çift zincir kırıkları, alkali oynak bölgeler ve oksidatif DNA baz hasarı belirlenebilmektedir (158).

İlk kez 1984 yılında Ostling ve Johanson (159) tarafından kullanılan mikro jel elektroforez tekniğinde, DNA çift sarmal kırıklarını tespitine izin veren nötr ortam kullanılmıştır. Bu yöntem ile tek sarmal kırıkları belirlenememekte ve proteinler tam olarak uzaklaştırılmamaktadır. 1988 yılında Singh ve ark. (160) tarafından deney protokolünde birtakım değişiklikler yaparak günümüzde uygulanan comet yöntemi metodolojisi oluşturulmuştur. Geliştirilen yöntemde alkali ortam ( $\text{pH}>13$ ) kullanılarak tek sarmal kırıklarının tespiti ve daha güçlü lizis koşulları ile proteinlerin % 95'inin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Pek çok genotoksik ajanın çift zincir kırıklarından çok, tek zincir kırıkları oluşturması nedeni ile alkali ortamda uygulanan bu yöntem günümüzde önerilmektedir (161).

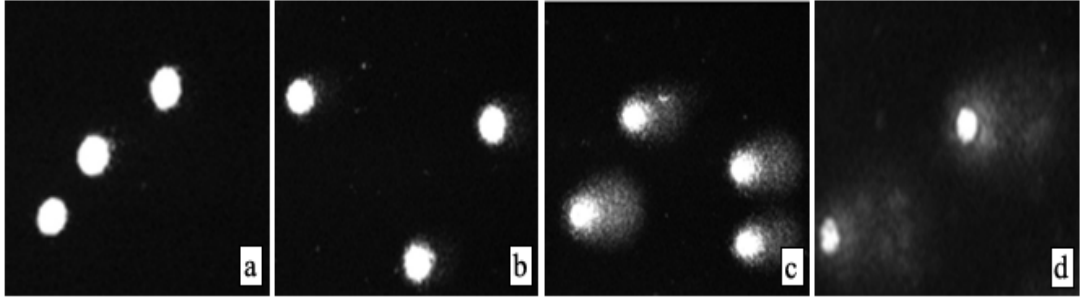
Comet yöntemi, alkali ortamda DNA'nın çözülmesi sonrasında farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda göç etmeleri sonucu oluşan kuyruklu yıldız andıran görüntünün floresan mikroskobu altında incelenerek DNA hasarının tespiti esasına (162). DNA göçünün derecesi, hücredeki DNA hasarının boyutu hakkında bilgi verir (157). Comet yönteminin basamakları aşağıda özetlenmiştir (161,162).

- a. Hücrelerin izole edilmesi:** Hemen hemen tüm ökaryotik hücre tipinde çalışılabilmektedir. Kültüre edilmiş hücreler, tam kan örnekleri (polimorf lökositler, mononükleer hücre fraksiyonları), sperm, yanak ve nazal epiteli, plasental hücreler materyal olarak kullanılabilir. Her bir materyalin hazırlanması kendine özgüdür (163). Kolay şekilde alınması ve iyi sonuç vermesi nedeni ile periferik kan mononükleer hücreleri sık tercih edilmektedir ancak yaş, sigara, fiziksel aktivite gibi olası faktörlerden etkilenmediği unutulmamalıdır.
- b. Mikroskop lamalarının hazırlanması:** Hücreler, mikroskop lamı üzerinde ince bir agaroz jel içine gömülür. Agaroz jelin bütünlüğünün bozulmaması dikkat ve el becerisi gerektirmektedir.
- c. Lizis:** Yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren lizis çözeltisinde bekletilir. Membranlar parçalanıp çekirdekte bulunan süperkoil DNA'nın serbestleşebilmesi sağlanır. Serbestleşen DNA, ışığa karşı duyarlı olduğundan ilave kırıkların oluşmasını engellemek için işlemler karanlık ortamda yürütülmelidir.
- d. Alkali ortamda elektroforez:** Çift sarmal DNA sarmalının açılması ve kırıkların ortaya çıkması için yüksek alkali özellikteki ( $\text{pH}>13$ ) elektroforez tamponunda

inkübe edildikten sonra elektroforez işlemine tabi tutulur. Hasarsız DNA elektrik akımı ile kuyruk bırakmadan göç ederken, hasarlı DNA parçaları ise farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine sahip olduklarından elektriksel alanda kuyruklu yıldız görünümü oluşturmaktadır (Şekil 2.8.).

- e. **Nötralizasyon:** Alkali ortamda elektroforez işleminden sonra jel pH'sının nötralizasyonu için uygun bir tamponla yıkama işlemi yapılır.
- f. **DNA'nın boyanma ve görüntüleme:** Floresan mikroskobu ile incelenen örneklerde kuyruklu yıldız görüntülenmesi için DNA spesifik boyalar kullanılır. Tercih edilen boya uygulayan bireyin ihtiyacına bağlı olup yöntemin güvenilirliğine veya hassasiyetine etkisi yoktur. Floresans boyama yöntemleri arasında etidiyum bromür, 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), propidyum iyodür gibi floresan boyalar yer almaktadır. Bu boyalar arasında parlak ve uzun süren floresan renk vermesi, yarı karanlık ortamlarda sayım yapılmasına olanak sağlaması ve düşük arka plan sinyaline neden olması gibi avantajları ile etidiyum bromür sıklıkla tercih edilmektedir (163).
- g. **Comet sayımı ve DNA hasarının belirlenmesi:** Görsel analiz veya bilgisayarlı görüntü analizi ile comet sayımı gerçekleştiren yazılımlar kullanılır. Sıklıkla tercih edilen, daha hassas ve doğru sonuç veren bilgisayarlı görüntü analizinde; mikroskop üzerine monte edilen kapalı sistem dijital kamera bağlantısı ile otomatik olarak karakteristik cometlerin görüntüleri analiz edilmektedir. DNA hasarının tespitinde; kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu ve kuyruktaki DNA yüzdesi gibi parametreler kullanılmaktadır. Sonuçların değerlendirilmesinde kuyruk içerisindeki DNA yoğunluğunun tüm hücre yoğunluğuna göre yüzde değerine karşılık gelen % kuyruk yoğunluğunun kullanılması önerilmektedir (163). Lamaların kenar kısımlarında kalan DNA'nın daha yüksek hasarlı olabileceğinden, sayım lamın orta kısımlarında yapılmalıdır. Tüm çalışma boyunca sayım işlemi aynı birey tarafından gerçekleştirilmelidir.

Comet yöntemi DNA hasar/onarım temel mekanizması, radyasyon biyolojisinde, oksidatif hasarın belirlenmesi, endüstriyel toksikoloji, çevresel toksikoloji, genetik toksikoloji, insan biyoizlemleri ve apoptoz gibi çalışmalarda kullanılabilir (161).



**Şekil 2.8.** Kuyruklu yıldız görünümü: a) hasarsız, b) az hasarlı, c) hasarlı, d) çok hasarlı.

Comet yönteminin basit, hızlı, duyarlı ve ucuz bir yöntem olması, az sayıda hücre gerektirmesi, düşük düzeydeki DNA hasarının da belirlenebilmesi, herhangi bir dokuya da uygulanabilir olması diğer genotoksisite testlerine göre bir üstünlük sağlar. Anca deney prosedüründeki farklılıklar (agaroz konsantrasyonu, hücre miktarı, lizis koşulları, elektroforez süresi gibi) farklı sonuçlara yol açabildiği gibi aynı prosedür uygulandığı farklı laboratuvar sonuçlarında da sayım yapan kişi kaynaklı farklılık görülebilmektedir. Comet sayımının deneyimli bir kişi olması ve sayımın baştan sonra aynı kişi tarafından yürütülmesi sonuçların güvenilirliği açısından önem taşımaktadır (158,161).

Comet yöntemi, Japonya Alternatif Metotlar Validasyon Merkezi (*Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*, JaCVAM) ve Avrupa Alternatif Metotlar Validasyon Merkezi (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*, ECVAM) tarafından yapılan çalışmalar sonucunda, *in vivo* memeli hücrelerinde OECD tarafından 2014 yılında valide bir yöntem (test no: 489) olarak kabul edilmiştir (164,165).

## 2.10. Mikroçekirdek Yöntemi

Mikroçekirdekler hücrenin mitoz bölünmesi (metafaz-anafaz geçişi) sırasında oluşan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır (166). Genellikle hücre döngüsünü kontrol eden genlerdeki eksiklikler, mitotik iğdeki hatalar, kinetokor veya mitotik aygıtın diğer parçaları ve kromozomal hasarlar mikroçekirdek oluşumuna yol açabilmektedir (167).

Mikroçekirdek sayısındaki artış, çeşitli etmenlerin hücrelerde oluşturduğu

sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin dolaylı göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Kromozom sayısındaki değişikliği (anöploidi) uyaran etmenler sentromer bölünme hatalarına ve iç iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastrojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak mikroçekirdek oluşumuna neden olurlar (166–168). Hücrelerde mikroçekirdek sayısındaki artış, somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (167).

Sitogenetik hasara neden olan maddeleri belirlemeyi amaçlayan mikroçekirdek yöntemi, değerlendirilmesi nispeten kolay uygulanabilen ve farklı hücre tiplerinde kullanılabilen bir testtir. Bu yöntem, kromozomal hasarların değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan standart genotoksisite test sistemi içinde yer almakta ve *in vivo* ve *in vitro* olarak uygulanabilmektedir (167).

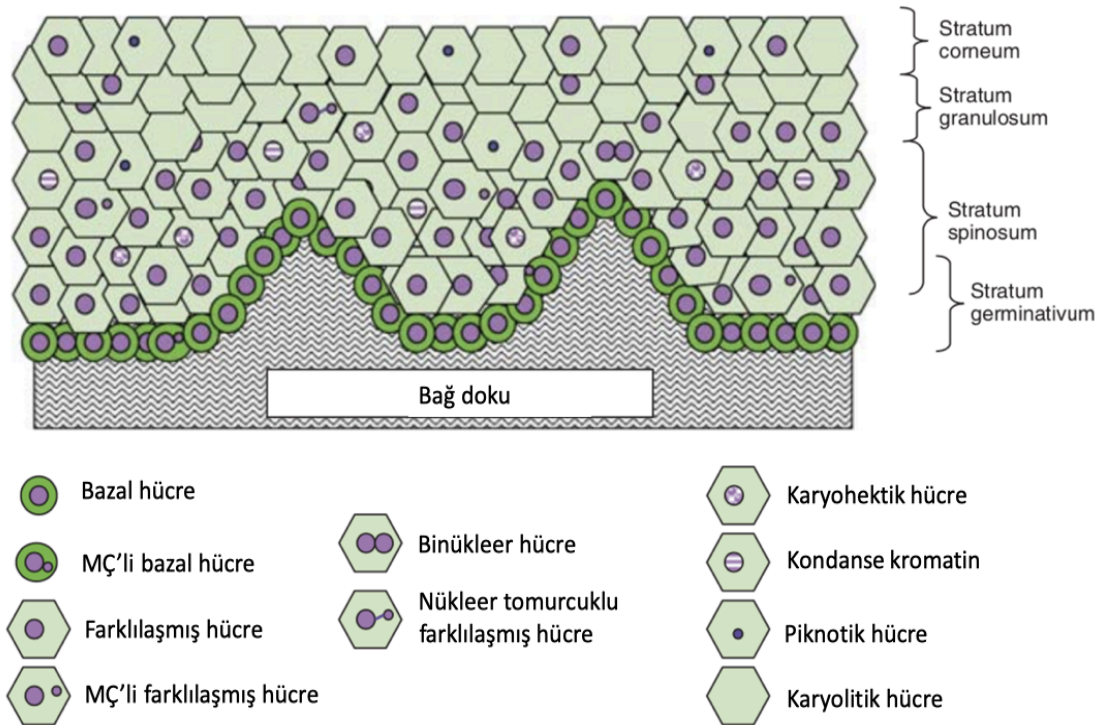
Mikroçekirdek yöntemi, mitoz geçiren tüm bitki, hayvan ve insan hücrelerinde DNA kromozomlarında hasara neden olabilecek fiziksel etkenlerin ve/veya kimyasal maddelerin genotoksik ve karsinojenik potansiyellerinin belirlenmesinde kullanılabilir. Genetik toksikoloji alanında en iyi bilinen sitogenetik yöntemlerden biri olan mikroçekirdek yöntemi, eritrosit, lenfosit gibi kan hücreleri yanında, çeşitli epitel (oral, nazal, ürotelial gibi) hücreler için de uygun niteliktedir (168,169). Mikroçekirdekler hücre bölünmesi esnasında oluştuğu için, mikroçekirdek yöntemi bölünemeyen hücreler veya bölünme kinetiği bilinmeyen/kontrol edilemeyen hücrelerde kullanılamaz (168).

Sitokinezi bloke edilmiş mikroçekirdek yöntemi, *in vivo* memeli eritrositlerinde (test no: 474) ve *in vitro* memeli hücrelerinde (test no: 487) OECD tarafından valide bir yöntem olarak kabul edilmiştir (170,171).

### **Yanak Epitel Hücrelerinde Mikroçekirdek Yöntemi**

Yanak epitel hücrelerinde mikroçekirdek yöntemi, insanlarda genetik hasarı gösteren ve girişimsel özelliğinin en az olması nedeni ile kolay uygulanabilen bir yöntemdir (169). Yanak epitel hücreleri, inhalasyon ve oral yol ile vücuda giren potansiyel karsinojenlere ve reaktif özellikli metabolite dönüşebilecek maddelere karşı bir bariyer görevi görmektedir. Kanser olgularının % 90'ı epitel hücrelerden köken aldığından, yanak epitel hücreleri potansiyel karsinojenlerin ana hedefi ve erken genotoksik etkileri hakkında önemli bir bilgi kaynağı oluşturur (172).

Epitel dokularda mikroçekirdek testi uygulamadan önce, o dokudaki mikroçekirdek oluşum kinetiklerini bilmek gerekmektedir. Ağız boşluğunda çok tabakalı skuamöz epitel hücreler bulunmaktadır (Şekil 2.9.). Yanak epitel hücreleri 7-21 gün arasında yenilediğinden, akut maruziyetin oluşturabileceği etkileri belirlemek için 2-3 hafta kadar bir zamana ihtiyaç bulunmaktadır (172).



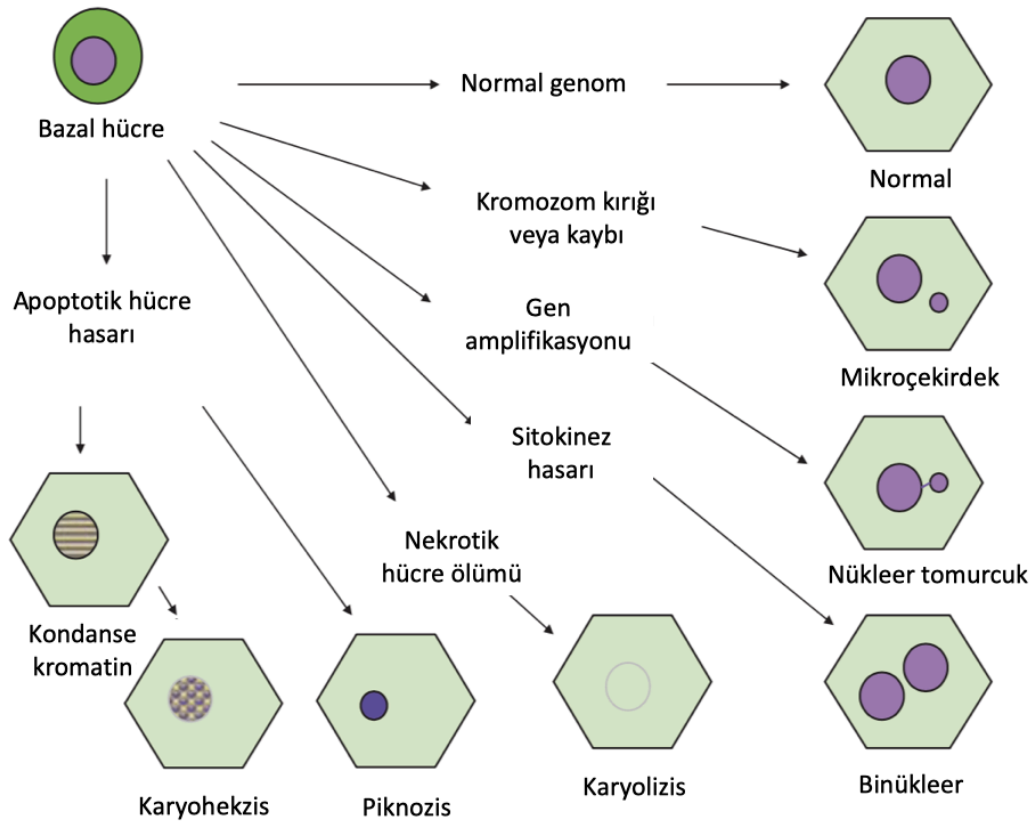
**Şekil 2.9.** Ağız mukozasının epitel tabakası (172).

Epitelin bazal hücrelerinde meydana gelen kromozomal hasar sonucu, sitoplazmada ana çekirdekten ayrı olarak etrafı membranlar ile çevirili olan mikroçekirdek oluşmaktadır. Yanak epitel hücreleri, mikroçekirdek dışında diğer anomalileri değerlendirmeye de olanak sağlamaktadır (Şekil 2.10). Yanak epitel mikroçekirdek değerlendirmesinde, yalnızca farklılaşmış hücrelerdeki mikroçekirdekler sayıma tabi tutulmaktadır (172).

Yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek yönteminde, kişilerin yanak içlerinden tahta spatül veya küçük başlı diş fırçası veya metal spatül ile hücreler toplanmaktadır. Örneklem yapılırken, farklılaşmış hücrelerin toplanabilmesi için her iki yanaktan geniş bir alandan sürüntü alınmalıdır. Mikroskop lamı üzerine sabitlenen hücrelerin boyanması için DNA'ya özgü boyalar (Feulgen, akrinin turuncusu gibi)



tercih edilmelidir. Giemsa ve Leishmann's gibi boyalar yanlış pozitif sonuçlara yol açabildiğinden önerilmemektedir (172). Mikroçekirdek sayısını belirlemek amacı ile mikroskop lamalarında hazırlanan örneklerde genellikle 1000 hücre incelenerek mikroçekirdek taşıyan hücre sıklığı belirlenmektedir. Yanak epitel hücrelerinde mikroçekirdek sayılmasında Tolbert ve arkadaşlarının (173) tanımladığı kriterler kullanılmaktadır: mikroçekirdek çapı genelde ana çekirdeğin 1/3'ü ile 1/16'sı aralığında, yuvarlak veya oval şekilli ve ana çekirdekle aynı boyama yoğunluğuna sahip olmalıdır.



**Şekil 2.10.** Yanak epitel hücrelerinde değerlendirilebilen hasarlar (172).

Yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek oluşum mekanizması, lenfositler ile benzerlik göstermektedir (174). Ayrıca yanak epitel hücreleri ve lenfosit hücrelerindeki mikroçekirdek sıklıkları arasında güçlü korelasyon mevcuttur (169). Epitel hücrelerde mikroçekirdek yönteminde, doğrudan hedef dokunun incelenmesi ve mitoz bölünme için uyarılmanın gerekmemesi yönünden lenfositlere uygulanan yöntemden daha üstün görünmektedir (172).

Yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığı yaş, cinsiyet, sigara, yaşam alışkanlıkları, genetik yapı gibi faktörlerden etkilenebilmektedir (172,175).

Değerlendirmenin doğru ve güvenilir olabilmesi için maruziyet ile ilgili detaylı bilgi (maruz kalınan maddenin türü ve toksisitesi, maruziyet süresi, örnek alımına kadar geçen süre vb.) edinilmelidir (172).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Kimyasal Maddeler

8-OHdG Tayin Kiti	Elabscience
Akridin Turuncusu	Sigma-Aldrich
CAT Ölçüm Kiti	Cayman
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich
Düşük Erime Noktalı Agar (LMPA)	Sigma
Etidiyum Bromür (EtBr)	Sigma-Aldrich
Etil Alkol	Sigma-Aldrich
Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ficoll (Histopaque-1077)	Sigma
Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (PBS) Tablet	Sigma
GPx Ölçüm Kiti	Cayman
GR Ölçüm Kiti	Cayman
GSH Ölçüm Kiti	Cayman
İnsan CC16 ELISA Kiti	Elabscience
İnsan IL-1beta ELISA Kiti	Elabscience
İnsan TNF-alfa ELISA Kiti	Elabscience
Metil Alkol	Sigma-Aldrich
N-Lauril Sarkosinat Sodyum Tuzu	Sigma-Aldrich
Normal Erime Noktalı Agar (NMPA)	Sigma
SOD Ölçüm Kiti	Cayman
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma
TBARs Ölçüm Kiti	Cayman
Tripan Mavisi	Sigma-Aldrich
Tris	Sigma
Triton X-100	Sigma

### 3.2. Araç ve Gereçler

Buzdolabı	Hotpoint
Cam Pastör Pipeti	Interlab
Comet Bilgisayarlı Görüntüleme Sistemi	Comet Analysis Software
Derin Dondurucu (-20°C)	Ariston
Derin Dondurucu (-80°C)	Revco
Distile Su Cihazı	Mes
Elektroforez	Biometra Analitik
Elektroforez Güç Kaynağı	Power Pack P25
Floresan Mikroskop	Leica
Hematoloji Otoanalizörü	Sysmex XN-2000
İnkübatör	Heraeus Instruments
Karıştırıcı-Isıtıcı	Jankel&Kunkel, Ikamag
Kırık Buz Makinası	Scotsman AF100
Lam (26x76mm)	Marienfeld
Lamel (24x60mm)	Marienfeld
Manyetik Karıştırıcı	Stuart Scientific
Mikrodalga Fırını	Vestel
Mikropipet, 8 kanallı (5-300 µl)	Eppendorf
Mikropipetler (0,5-1µl, 1-5µl, 5-10µl, 10-200µl, 200-1000µl, 1-5ml)	Finnpipette, Gilson, Discovery Confort
Mikrosantrifüj	Hettich
Mikrosantrifüj Tüpü (15ml)	Eppendorf
<i>Neubauer</i> Camı (Hücre sayım camı)	Marienfeld
pHmetre	Cyberscan
pH metre elektrodu	Hanna HI 1131
Pipet Ucu (0,5-10, 10-200, 100-1000 µl)	Eppendorf
Santrifüj	Heraeus, Hettich
Santrifüj Tüpü (Falcon 15 ml)	Isolab
Spektrofotometre	Spektramax M2
Su Banyosu	Termal Lab. Aletleri

Terazi (Hassas)	Mettler Toledo
Ultrasonik Banyo	Transsonic 460/H
Vorteks	Heidolph Reax 2000

### 3.3. Çözeltilerin Hazırlanması

#### 3.3.1. Süperoksit Dismutaz Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

##### Deney Tamponu (10X)

Kit 5 ml deney tamponu içermektedir. Deney tamponundan 3 ml alınır ve 27 ml distile su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir. Seyreltilen çözelti 0,1 mM dietilen triamin pentaasetik asit ve 0,1 mM hipoksantin içeren 50 mM Tris-hidroklorik asit (pH 8,0) tamponudur. Radikal detektörü seyreltmek için kullanılır. 4°C'de 2 ay dayanıklıdır.

##### Örnek Tamponu (10X)

Kit 5 ml örnek tamponu içermektedir. Örnek tamponundan 2 ml alınır ve 18 ml distile su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir. Seyreltilen çözelti, 50 mM Tris-hidroklorik asit (pH 8,0) tamponudur. SOD standartlarını hazırlamak, ksantin oksidazı ve SOD örneklerini seyreltmek için kullanılır. 4°C'de 6 ay dayanıklıdır.

##### Radikal Detektör

Kit 250 µl tetrazolyum tuzu çözeltisi içermektedir. Kullanmadan önce 50 µl'si başka bir şişeye aktararak 19,95 ml 1X deney tamponu ile seyreltilir. Bu seyreltilen çözelti 96 kuyucuk içindir ve ihtiyaca göre ek çözelti hazırlanır. Seyreltilen çözelti ışıktan korunarak saklanmalıdır ve 2 saat dayanıklıdır.

##### SOD Standart Çözeltileri

Kit 100 µl sığır eritrosit SOD stok çözeltisi (Cu/Zn-SOD şeklinde) içermektedir. SOD stok çözeltisinden 20 µl alınır ve 1,98 ml 1X örnek tamponu ile seyreltilir ve buzda bekletilerek kullanılır. Standart çözeltiler taze olarak hazırlanmalıdır. 7 tane temiz ve kodlanmış deney tüpü alınır. Seyreltilen SOD stok

çözeltisinden sırası ile 0 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl, 120 µl, 160 µl ve 200 µl alınarak; toplam hacim 1000 µl'ye 1X örnek tamponu ile tamamlanır. Böylece 0; 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 ve 0,05 U/ml konsantrasyonlarında standart çözeltiler hazırlanmış olur.

### **Ksantin Oksidaz**

Kitte her birinde 150 µl ksantin oksidaz içeren 3 adet şişe bulunmaktadır. Kullanmadan önce, 50 µl'si başka bir şişeye aktararak 1,95 ml 1X örnek tamponu ile seyreltilir. Buzda bekletilerek kullanılır. Bu seyreltilen enzim çözeltisi 96 kuyucuk içindir ve ihtiyaca göre ek çözelti hazırlanır. Çözelti 1 saat dayanıklıdır.

### **3.3.2. Katalaz Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**

#### **Deney Tamponu (10X)**

Kit 5 ml deney tamponu içermektedir. Deney tamponundan 2 ml alınır ve 18 ml distile su ile seyreltilir. Böylelikle 1X çözelti elde edilir. Seyreltilen çözelti 100 mM potasyum fosfat (pH 7,0) tamponudur. 4°C'de 2 ay dayanıklıdır.

#### **Örnek Tamponu (10X)**

Kit 10 ml örnek tamponu içermektedir. Örnek tamponundan 5 ml alınır ve 45 ml distile su ile seyreltilir. Böylelikle 1X örnek tamponu elde edilir. Seyreltilen çözelti % 0,1 sıgır serum albümin ve 1 mM EDTA içeren 25 mM potasyum fosfat (pH 7,5) tamponudur. Formaldehit standartlarını ve CAT kontrolü hazırlamak ve aynı zamanda örnekleri seyreltmek için kullanılır. 4°C'de 2 ay dayanıklıdır.

#### **Formaldehit Standart Çözeltileri**

Kit tedarik edildiği gibi kullanıma hazır olan 4,25M ve 100 µl formaldehit stok çözeltisi içermektedir. Formaldehit standart çözeltisinden 10 µl alınarak 9,99 ml seyreltilmiş örnek tamponu ile seyreltilir. Böylelikle 4,25 mM ara stok çözeltisi elde edilir. 7 tane temiz ve kodlanmış deney tüpü alınır. Ara stok çözeltisinden sırası ile 0 µl, 10 µl, 30 µl, 60 µl, 90 µl, 120 µl ve 150 µl alınarak; toplam hacim 1000 µl'ye 1X örnek tamponu ile tamamlanır. Böylelikle 0, 5, 15, 30, 45, 60 ve 75 µM

konsantrasyonlarında standart çözeltiler hazırlanmış olur.

### **CAT Kontrol**

Kit liyofilize toz halinde bir sığır karaciğeri CAT tozu içermektedir ve pozitif kontrol olarak kullanılır. 2 ml 1X örnek tamponu eklenir, karıştırılır ve 100 µl alınır. 1,9 ml 1X örnek tamponu ile seyreltilir. Çözelti 30 dakika dayanıklıdır.

### **Potasyum Hidroksit**

Kit 2,24 g potasyum hidroksit pelletleri içermektedir. Buz üzerinde, 4 ml soğuk distile su eklenir ve 10M'lik bir çözelti elde edilir. 4°C'de 3 ay dayanıklıdır.

### **Hidrojen Peroksit**

Kit 8,82 M ve 1 ml hidrojen peroksit çözeltisi içermektedir. Bu çözülden 40 µl alınır ve 9,96 ml distile su ile seyreltilerek 35,28 mM çözelti elde edilir. Çözelti 2 saat dayanıklıdır.

### **4-amino-3-hidrazino-5-merkapt-1,2,4-triazol (Purpald, Kromojen)**

Kit 0,5 M hidroklorik asit içinde hazırlanan 4 ml purpald içermektedir. Reaktif tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır.

### **Potasyum Periyodat**

Kit 0,5 M potasyum hidroksit içinde 1,5 ml potasyum periyodat içermektedir. Reaktif tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır.

## **3.3.3. Glutasyon Redüktaz Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**

### **Deney Tamponu (10X)**

2 ml deney tamponu 18 ml distile su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir. Elde edilen çözelti, 1 mM EDTA içeren 50 mM potasyum fosfat (pH 7,5) tamponudur. 4°C'de 2 ay dayanıklıdır.

### **Örnek Tamponu (10X)**

2 ml örnek tamponu 18 ml distile su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir. Seyreltilen çözelti, 1 mM EDTA ve 1 mg/ml sığır serum albumini içeren 50 mM potasyum fosfat (pH 7,5) tamponudur. GR kontrol çözeltisini ve örnekleri seyreltmek için kullanılır. 4°C'de 1 ay dayanıklıdır.

### **GR Kontrol**

GR çözeltisinin 10 µl'si başka bir şişeye aktarılarak 990 µl 1X örnek tamponu ile seyreltilir. Buz üzerinde çalışılır ve 4 saat dayanıklıdır.

### **GSSG**

Kit 9.5 mM GSSG çözeltisi içermektedir. Reaktif tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır. -20°C'de saklanır.

### **NADPH**

Kitte liyofilize toz halinde NADPH içeren 3 şişe bulunmaktadır. 1 şişe/40 kuyucuk 2 ml distile suda çözülür. İhtiyacı karşılayacak miktarda şişe sulandırılır. Deney yapılırken oluşturulan reaktif 25°C'de bekletilir ve 4°C'de 2 gün dayanıklıdır.

### **3.3.4. Glutatyon Peroksidaz Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**

#### **Deney Tamponu (10X)**

Kit 3 ml deney tamponu içermektedir. 27 ml distile su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir. Elde edilen çözelti, 5 mM EDTA içeren 50 mM Tris-hidroklorik asit (pH 7,6) tamponudur. 4°C'de 6 ay dayanıklıdır.

#### **Örnek Tamponu (10X)**

Kit 3 ml örnek tamponu içermektedir. Örnek tamponundan 2 ml alınır ve 18 ml distile su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir. Seyreltilen çözelti 5 mM EDTA ve 1 mg/ml sığır serum albumini içeren 50 mM Tris-hidroklorik asit (pH 7,6) tamponudur. GPx kontrol çözeltisini ve örnekleri seyreltmek için kullanılır. 4°C'de 1 ay



dayanıklıdır.

### **GPx Kontrol**

Kit 50 µl sığır eritrosit GPx içermektedir. Kullanmadan önce, enzimin 10 µl'si başka bir şişeye aktarılır ve 490 µl 1X örnek tamponu ile seyreltilir. Buz üzerinde çalışılır. Seyreltilen enzim çözeltisi buz üzerinde 4 saat dayanıklıdır.

### **Ko-Substrat Karışımı**

Kitte liyofilize toz halinde NADPH, GSH ve GR içeren 3 şişe bulunmaktadır. 1 şişe/40 kuyucuk 2 ml distile suda çözülür. İhtiyacı karşılayacak miktarda şişe sulandırılır. Deney yapılırken reaktif 25°C'de bekletilir ve 4°C'de 2 gün dayanıklıdır.

### **Kümen Hidroperoksit**

Kit 2.5 ml kümen hidroperoksit içermektedir. Reaktif tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır. -20°C'de saklanır.

### **3.3.5. Glutasyon Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**

#### **2-(N-morfolin) Etansülfonik Asit (MES) Tamponu (2X)**

Kitte 0,4 M ve 60 ml MES tamponu (pH 6,0) bulunmaktadır. Bu çözelti 2 mM EDTA ve 0,1 M fosfat içerir. Kullanmadan önce 60 ml MES tamponu, 60 ml distile su ile seyreltilerek 1X MES tamponu elde edilir.

#### **GSSG Standart Çözeltileri**

Kit tedarik edildiği gibi kullanıma hazır olan 25 µM ve 2 ml GSSG çözeltisi içermektedir. 8 tane temiz ve kodlanmış deney tüpüne seyreltilen GSSG çözeltisinden sırası ile 0 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl, 120 µl ve 160 µl alınarak; toplam hacim 500 µl'ye 1X MES tamponu ile tamamlanır. Böylelikle 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 µM konsantrasyonlarında standart çözeltiler hazırlanır. 0-4°C'de, en az 1 yıl dayanıklıdır.

### **Ko-Faktör Karışımı**

Kit, liyofilize toz halde NADP<sup>+</sup> ve glukoz-6-fosfat içermektedir. Kullanmadan önce bu toz karışımı 0,5 ml distile suda çözülür. 0-4°C'de, 2 hafta dayanıklıdır.

### **Enzim Karışımı**

Kitte, GR ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz içeren 0,2 ml tampon çözelti bulunmaktadır. 1X MES tampon çözeltisinden 2 ml eklenerek seyreltilir. 0-4°C'de 2 hafta dayanıklıdır.

### **5,5'-diti-bis-(2-nitrobenzoik) Asit (DTNB, Ellman reaktifi)**

Kit, liyofilize toz halde DTNB içermektedir. Kullanmadan önce 0,5 ml distile suda çözülür. Reaktif çözeltisi hazırlandıktan sonra 10 dakika içinde kullanılmalıdır.

### **3.3.6. Malondialdehit Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**

#### **Tiyobarbitürik Asit (TBA)**

Kit 2 g TBA içermektedir. Renk reaktifini hazırlamak için kullanılır.

#### **Asetik Asit**

Kit, her birinde 20 ml konsantre asetik asit bulunan 2 şişe içermektedir. 40 ml asetik asit 160 ml distile su ile seyreltilir ve renk reaktifi hazırlamak için kullanılır. Oda sıcaklığında 3 ay dayanıklıdır.

#### **NaOH (10X)**

Kit 20 ml NaOH çözeltisi içermektedir. Bu çözelti 180 ml distile su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir ve renk reaktifi hazırlamak için kullanılır. Oda sıcaklığında 3 ay dayanıklıdır.

#### **MDA Standart Çözeltileri**

Kit, tedarik edildiği gibi kullanıma hazır olan 500 µM MDA stok çözeltisi içermektedir. 250 µl MDA stok çözeltisi 750 µl distile su ile seyreltilerek 125 µM ara

stok çözeltisi elde edilir. 8 tane temiz ve kodlanmış deney tüpü alınır. MDA ara stok çözeltisinden sırası ile 0 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl, 200 µl ve 400 µl alınarak; toplam hacim 1000 µl'ye distile su ile tamamlanır. Böylelikle; 0; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 25 ve 50 µM konsantrasyonlarında MDA standart çözeltileri hazırlanmış olur.

### **Sodyum Dodesil Sülfat Çözeltisi**

Kit, tedarik edildiği gibi kullanıma hazır olan sodyum dodesil sülfat çözeltisi içermektedir.

### **Renk Reaktifi**

530 mg TBA tartılır ve en az 150 ml'lik büyük bir şişeye alınır. Seyreltilen asetik asit çözeltisi (50 ml) ve seyreltilen NaOH çözeltisi (50 ml) içinde çözülmesi ile hazırlanır. Renk reaktifi 24 saat dayanıklıdır.

### **3.3.7. 8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**

#### **Yıkama Tamponu (25X)**

Kit 30 ml yıkama tamponu (25X) içermektedir. 30 ml yıkama tamponu 720 ml distile su ile seyreltilir ve 1X yıkama tamponu elde edilir.

#### **8-OHdG Standardı ve Standart-Örnek Seyreltme Çözeltisi**

Kit 2 şişe 8-OHdG standardı ve 20 ml seyreltme çözeltisi içermektedir. Standart çözeltileri deney sırasında taze olarak hazırlanır ve 15 dakika içinde kullanılır. 8-OHdG standardına, 1 ml seyreltme çözeltisi eklenir. 10 dakika beklenir ve birkaç kere yavaşça ters düz edilir. Elde edilen çözelti konsantrasyonu 100 ng/ml'dir. 7 tane temiz ve kodlanmış deney tüpü alınır. Öncelikle her bir deney tüpüne 500 µl seyreltme çözeltisinden eklenir. Ardından 1:1 seri dilüsyonlar yapılarak standart çözeltiler hazırlanır. İlk tüpe 100 ng/ml'lik çözeltiden 500 µl eklenip pipetle karıştırılır ve 50 ng/ml standart çözeltisi elde edilir. Bir sonraki tüpe 50 ng/ml'lik çözeltiden 500 µl eklenip pipetle karıştırılır ve 25 pg/ml standart çözeltisi elde edilir. Bu işleme son tüpe kadar devam edilir. Son tüp konsantrasyonu 0 ng/ml kabul edilir ve yalnızca standart-

örnek seyreltme çözeltisi içermelidir. Böylelikle sırası ile 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,563 ve 0 ng/mL konsantrasyonlarında standartlar hazırlanmış olur.

#### **Biyotinli Deteksiyon Antikor (100X) ve Seyreltme Çözeltisi**

Kit 120 µl biyotinli deteksiyon antikor çözeltisi ve 10 ml seyreltme çözeltisi içermektedir. İhtiyacı karşılayacak miktar (50 µL/kuyucuk) hesaplanır. Seyreltme çözeltisi ile 1X çözelti hazırlanır.

#### **HRP (*Horseradish* Peroksidaz) Konjugatı (100X) ve Seyreltme Çözeltisi**

Kit 120 µL HRP konjugatı (100X) ve 10 ml seyreltme çözeltisi içermektedir. İhtiyacı karşılayacak enzim konjugat çözeltisi miktarı (100 µL/kuyucuk) hesaplanır. Seyreltme çözeltisi ile 1X çözelti hazırlanır.

#### **Substrat Reaktifi**

Kit 10 ml substrat reaktifi içermektedir. Tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır. 4°C'de ışıktan korunarak saklanır.

#### **Durdurma Çözeltisi**

Kit 10 ml durdurma çözeltisi içermektedir. Reaktif tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır. 4°C'de saklanır.

### **3.3.8. Tümör Nekroz Faktör-alfa Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**

#### **Yıkama Tamponu (25X)**

Kit 30 ml yıkama tamponu (25X) içermektedir. 30 ml yıkama tamponu 720 ml distile su ile seyreltilir. Böylelikle 1X yıkama tamponu elde edilir.

#### **Referans Standardı ve Standart-Örnek Seyreltme Çözeltisi**

Kit 2 şişe referans standardı ve 20 ml seyreltme çözeltisi içermektedir. Standart çözeltileri deney sırasında taze olarak hazırlanır ve 15 dakika içinde kullanılır. Standarda 1 ml seyreltme çözeltisi eklenir. 10 dakika beklenir ve birkaç kere yavaşça ters düz edilir. Elde edilen çözelti konsantrasyonu 500 pg/ml'dir. 7 tane temiz ve

kodlanmış deney tüpü alınır ve her birine 500 µl standart-örnek seyreltme çözeltisinden eklenir. Ardından 1:1 seri dilüsyonlar yapılır. İlk tüpe 500 pg/ml'lik çözeltiden 500 µl eklenip pipetle karıştırılır ve 250 pg/ml standart çözeltisi elde edilir. Bir sonraki tüpe 250 pg/ml'lik çözeltiden 500 µl eklenip pipetle karıştırılır ve 125 pg/ml standart çözeltisi elde edilir. Bu işlem son tüpe kadar devam edilir. Son tüp konsantrasyonu 0 pg/ml kabul edilir, yalnızca standart-örnek seyreltme çözeltisi içermelidir. Böylece sırasıyla 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81 ve 0 ng/mL konsantrasyonlarında standartlar hazırlanmış olur.

### **Biyotinli Deteksiyon Antikor (100X) ve Seyreltme Çözeltisi**

Kit 120 µl biyotinli deteksiyon antikor çözeltisi ve 14 ml seyreltme çözeltisi içermektedir. İhtiyacı karşılayacak miktar (100 µL/kuyucuk) hesaplanır. Seyreltme çözeltisi ile 1X çözelti hazırlanır.

### **HRP Konjugatı (100X) ve Seyreltme Çözeltisi**

Kit 120 µL HRP konjugatı (100X) ve 14 ml seyreltme çözeltisi içermektedir. İhtiyacı karşılayacak enzim konjugat çözeltisi miktarı (100 µL/kuyucuk) hesaplanır. Seyreltme çözeltisi ile 1X çözelti hazırlanır.

### **Substrat Reaktif**

Kit 10 ml substrat reaktif içermektedir. Reaktif tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır. 4°C'de ışıktan korunarak saklanır.

### **Durdurma Çözeltisi**

10 ml durdurma çözeltisi içeren kit tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır. 4°C'de saklanır.

### **3.3.9. İnterlökin-1beta Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**

#### **Yıkama Tamponu (25X)**

Kit 30 ml yıkama tamponu (25X) içermektedir. 30 ml yıkama tamponu 720 ml distile su ile seyreltilir ve 1X yıkama tamponu elde edilir.

### **Referans Standardı ve Standart-Örnek Seyreltme Çözeltisi**

Kit 2 şişe referans standardı ve 20 ml seyreltme çözeltisi içermektedir. Standart çözeltileri deney sırasında taze olarak hazırlanır ve 15 dakika içinde kullanılır. Standarda 1 ml seyreltme çözeltisi eklenir. 10 dakika beklenir ve birkaç kere yavaşça ters düz edilir. Elde edilen çözelti konsantrasyonu 500 pg/ml'dir. 7 tane temiz ve kodlanmış deney tüpü alınır ve her birine 500 µl seyreltme çözeltisinden eklenir. Ardından 1:1 seri dilüsyonlar yapılır. İlk tüpe 500 pg/ml'lik çözeltiden 500 µl eklenip pipetle karıştırılır ve 250 pg/ml standart çözeltisi elde edilir. Bir sonraki tüpe 250 pg/ml'lik çözeltiden 500 µl eklenip pipetle karıştırılır ve 125 pg/ml standart çözeltisi elde edilir. Bu işleme son tüpe kadar devam edilir. Son tüp konsantrasyonu 0 pg/ml kabul edilir ve yalnızca standart-örnek seyreltme çözeltisi içermelidir. Böylelikle sırası ile 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81 ve 0 ng/mL konsantrasyonlarında standartlar hazırlanmış olur.

### **Biyotinli Deteksiyon Antikor (100X) ve Seyreltme Çözeltisi**

Kit 120 µl biyotinli deteksiyon antikor çözeltisi (100X) ve 14 ml seyreltme çözeltisi içermektedir. İhtiyacı karşılayacak miktar (100 µL/kuyucuk) hesaplanır. Seyreltme çözeltisi ile 1:100 dilüsyon yapılarak 1X biyotinli deteksiyon antikor çözeltisi hazırlanır.

### **HRP Konjugatı (100X) ve Seyreltme Çözeltisi**

Kit 120 µL HRP konjugatı (100X) ve 14 ml seyreltme çözeltisi içermektedir. İhtiyacı karşılayacak enzim konjugat çözeltisi miktarı (100 µL/kuyucuk) hesaplanır. Seyreltme çözeltisi ile 1X çözelti hazırlanır.

### **Substrat Reaktif**

Kit 10 ml substrat reaktif içermektedir. Reaktif tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır. 4°C'de ışıktan korunarak saklanır.

### **Durdurma Çözeltisi**

Kit 10 ml durdurma çözeltisi içermektedir. Reaktif tedarik edildiği gibi

kullanıma hazırdır. 4°C'de saklanır.

### **3.3.10. Clara Hücre Protein 16 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**

#### **Yıkama Tamponu (25X)**

Kit 30 ml yıkama tamponu (25X) içermektedir. 30 ml yıkama tamponu 720 ml distile su ile seyreltilir ve 1X yıkama tamponu elde edilir. 4°C'de 6 ay saklanır.

#### **Referans Standardı ve Standart-Örnek Seyreltme Çözeltisi**

Kit 2 şişe referans standardı ve 20 ml seyreltme çözeltisi içermektedir. Standarda 1 ml seyreltme çözeltisi eklenir. 10 dakika beklenir ve birkaç kere yavaşça ters düz edilir. Elde edilen çözelti konsantrasyonu 4000 pg/ml'dir. 7 tane temiz ve kodlanmış deney tüpü alınır ve her birine 500 µl standart-örnek seyreltme çözeltisinden eklenir. Ardından 1:1 seri dilüsyonlar yapılır. İlk tüpe 4000 pg/ml'lik çözeltiden 500 µl eklenip pipetle karıştırılır ve 2000 pg/ml standart çözeltisi elde edilir. Bir sonraki tüpe 2000 pg/ml'lik çözeltiden 500 µl eklenip pipetle karıştırılır ve 1000 pg/ml standart çözeltisi elde edilir. Bu işleme son tüpe kadar devam edilir. Son tüp konsantrasyonu 0 pg/ml kabul edilir ve yalnızca standart-örnek seyreltme çözeltisi içermelidir. Böylelikle sırası ile 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,50 ve 0 pg/mL konsantrasyonlarında standartlar hazırlanmış olur.

#### **Biyotinli Deteksiyon Antikor (100x) ve Seyreltme Çözeltisi**

Kit 120 µL biyotinli deteksiyon antikor çözeltisi (100X) ve 14 ml seyreltme çözeltisi içermektedir. Kullanmadan önce stok çözelti (100X) santrifüj edilir. İhtiyacı karşılayacak miktar (100 µL/kuyucuk) hesaplanır. Seyreltme çözeltisi ile 1X çözelti hazırlanır.

#### **HRP Konjugatı (100X) ve Seyreltme Çözeltisi**

Kit 120 µL HRP konjugatı (100X) ve 14 ml seyreltme çözeltisi içermektedir. İhtiyacı karşılayacak miktar enzim konjugat çözeltisi miktarı (100 µL/kuyucuk) hesaplanır. Seyreltme çözeltisi ile 1X çözelti hazırlanır.

**Substrat Reaktifi**

Kit 10 ml substrat reaktifi içermektedir. Reaktif tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır. 4°C'de saklanır.

**Durdurma Çözeltisi**

Kit 10 ml durdurma çözeltisi içermektedir. Reaktif tedarik edildiği gibi kullanıma hazırdır. 4°C'de saklanır.

**3.3.11. Tek Hücre Jel Elektroforez Yönteminde Kullanılan Çözeltiler****LMPA Çözeltisi**

750 mg LMPA, mikrodalga kullanılarak 100 ml PBS içinde çözülerek % 0,75'lik LMPA çözeltisi hazırlanır. Küçük hacimler halinde buzdolabında saklanır.

**Elektroforez tampon çözeltisi**

1705 ml soğuk distile su, 52,8 ml 10 N NaOH ve 8,8 ml 200 mM EDTA çözeltisi karıştırılır. Deney günü taze hazırlanır.

**Etanol çözeltisi (% 50)**

% 99,8'lik etanol çözeltisinden 150,3 ml alınır ve distile su ile 300 ml'ye tamamlanarak homojen karışması sağlanır.

**Etanol çözeltisi (% 75)**

% 99,8'lik etanol çözeltisinden 225,5 ml alınır ve distile su ile 300 ml'ye tamamlanarak homojen karışması sağlanır.

**Etanol çözeltisi (% 98)**

% 99,8'lik etanol çözeltisinden 294,5 ml alınır ve distile su ile 300 ml'ye tamamlanarak homojen karışması sağlanır.

**EtBr çözeltisi (20 µg/ml)**



10 mg EtBr 50 ml distile suda çözülerek 200 µg/ml'lik stok EtBr çözeltisi hazırlanır. Stok EtBr çözeltisinden 1 ml alınıp distile su ile 10 ml'ye tamamlanarak 20 µg/ml'lik EtBr çözeltisi hazırlanır. Oda sıcaklığında karanlıkta saklanır.

### **EDTA Çözeltisi (200 mM)**

14,89 g EDTA 200 ml distile suda çözülüp pH 10'a ayarlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

### **PBS**

1 PBS tableti 200 ml distile suda çözülür. 4 °C'de saklanır.

### **Lizis Çözeltisi**

146,1 g NaCl; 37,2 g EDTA; 1,2 g Tris tartılıp 500 ml distile suda çözülür. 10 g NaOH eklenerek pH 10'a ayarlanır. 10 g N-Lauril sarkosinat sodyum tuzu eklenir. Distile su ile son hacim 890 ml'ye tamamlanıp maddeler çözününceye kadar karıştırılarak stok lizis çözelti hazırlanır. Oda sıcaklığında saklanır. 178 ml stok lizis çözelti, 2 ml Triton x-100 ve 20 ml DMSO ile karıştırılır. Deney günü taze hazırlanır, kullanılacağı zamana kadar 4 °C'de tutularak deney sırasında soğuk çözeltisi kullanılır.

### **NaOH (10 N)**

200 g NaOH 500 ml distile suda çözülür. 4 °C'de saklanır.

### **NMPA çözeltisi**

1000 mg NMPA mikrodalga kullanılarak 100 ml PBS içinde çözülür. % 1'lik NMPA çözeltisi hazırlanır. Yarı-buzlu lamlar NMPA (% 1) çözeltisi ile kaplanır. Lamlar oda sıcaklığında saklanır.

### **Nötralizasyon Tampon Çözeltisi**

48,5 mg Tris 750 ml distile suda çözülüp pH 7,50'e ayarlanır. Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

### 3.3.12. Mikroçekirdek Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

#### PBS

1 PBS tableti 200 ml distile suda çözülür. 4 °C’de saklanır.

#### Metanol çözeltisi (% 80)

% 99,8’lik metanol çözeltisinden 80,16 ml alınır ve distile su ile 100 ml’ye tamamlanarak homojen karışması sağlanır.

#### Akridin turuncusu (% 0,1)

5 mg akridin turuncusu tartılarak 100 ml PBS ile çözülür. Çözelti ışıktan korunması için alüminyum folyoya sarılarak 4 °C’de saklanır.

### 3.4. Çalışma Grubunun Seçimi

Planlanan tez çalışmamızın gerçekleştirilebilmesi için Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’ndan Helsinki Bildirgesi’ne uygun olarak onay alınmıştır (etik kurul onay tarihi: 22 Ekim 2019, numara: GO 19/957) (Bkz. Ek 1.).

Çalışma grubumuz, Işçehisar (Afyonkarahisar) bölgesinde faaliyet gösteren mermer işleme tesisinde en az altı ay süre ile çalışan mermer tozu maruziyeti bulunan 48 erkek işçiden oluşmaktadır. Kontrol grubu ise mermer tozu veya diğer kimyasallara mesleki olarak maruziyeti bulunmayan, yaş, cinsiyet, yaşam tarzı, sigara ve alkol kullanım alışkanlıkları yönünden işçi grubuna benzer 41 erkek ofis çalışanından oluşmaktadır.

Çalışmaya katılan bireylere çalışmanın amacı hakkında ayrıntılı bilgi verilerek onam formları imzalatılmıştır. Çalışmaya katılan işçilere ve kontrol grubundaki bireylere yaş, cinsiyet, sigara ve alkol kullanımı, ilaç ve vitamin kullanımı, geçirdiği ve mevcut hastalıkları, çalışma saatleri ve bu iş kolunda çalıştıkları süre, çalışırken koruyucu maske kullanımı, mesleki toz ve/veya kimyasal madde maruziyet durumu, kendileri ve/veya ailelerindeki solunum yolları ile ilişkili hastalık öyküleri ile ilgili soruları içeren ayrıntılı bir anket formu uygulanmıştır (Bkz. Ek 3.).

Mermer işleme tesisinde 6 aydan daha kısa süre çalışan işçiler, 18 yaşından küçük olan, aktif enfeksiyonu veya kronik hastalığı bulunan, radyoterapi veya kemoterapi tedavisi alan bireyler çalışma dışı bırakılmıştır. İşçilerden 6 kişi ve kontrol grubundan 1 kişi çalışma şartlarına uymaması nedeniyle çalışmaya dahil edilmemiştir.

### **3.5. Çalışma Grubundan Biyolojik Örneklerin Alınması**

Çalışmamızda biyolojik örnek olarak, her bir gönüllüden toplam 18 ml periferik kan örneği ve yanak epitel hücre örneği toplanmıştır. Ayrıca, tez kapsamına dahil edilmeyen ve ileri araştırmalarda kullanılmak üzere idrar örnekleri de alınmıştır.

Hemogram parametrelerinin analizi için, EDTA'lı tüplere 5 ml periferik kan örneği alınmıştır. Serumdaki C-reaktif protein (CRP), aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), toplam kolesterol (TK) ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (*High Density Lipoprotein*, HDL) ölçümü için 3 ml kan numunesi silikon kaplı tüplere alınarak pıhtılaşmasına izin verilmiştir. Hemogramlar ve serum biyokimyasal parametreleri hemen Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya laboratuvarında ölçülmüştür.

Her bir gönüllüden 10 ml periferik kan örneği sodyum heparinli tüpe alınmıştır. Oksidatif stres ve immün parametrelerin (SOD, CAT, GR, GPx, GSH, MDA, 8-OHdG, TNF-alfa, IL-1beta, CC16) analizleri için 5 ml heparinize kan örneği kullanılmıştır. Plazma örnekleri -20 °C'de dondurulmuştur ve soğuk taşıma kabında ve ışıktan korunarak 24 saat içinde Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Toksikoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'na ulaştırılmıştır. Analiz gününe kadar -80 °C'de saklanmıştır.

DNA hasarının analizi için 5 ml heparinize kan örneği ve mikroçekirdek sıklığının belirlenmesi için ise santrifüj tüpüne yanak epitel hücre örneği toplanmıştır.

### **3.6. İşyeri Ortamında Maruziyetin Değerlendirilmesi**

Partikül maddelerin konsantrasyonları belirlenirken ışık saçılımı prensibi ile havada süspansiyon durumunda bulunan madde miktarının tayini için Türk Standardı 2361 "Hava Kirliliği Ölçme Metotları (Havada Süspansiyon Durumunda Bulunan Madde Miktarının Tayinine Yönelik Yöntemler)" standardına uygun olarak ölçüm yapılmıştır. Hava ölçümleri üç ayrı noktada gerçekleştirilmiştir.

Hava örnekleme için partikül izleme cihazı Dustmate (Turnkey Instrument Ltd., İngiltere) kullanılmıştır. Cihaz 0-65000  $\mu\text{g} / \text{m}^3$  aralığında ölçüm yapabilmektedir ve farklı partikül çaplara sahip partiküllerin ( $\text{PM}_{10}$ ,  $\text{PM}_{2,5}$  ve  $\text{PM}_{10}$ ) ve ayrıca TSP konsantrasyonlarını aynı anda izleyebilmektedir. Sonuçlar  $\pm$  ortalama standart sapma olarak verilmiştir.

### 3.7. Biyokimyasal Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Plazma örneklerindeki beyaz kan hücresi (*White Blood Cell*, WBC), kırmızı kan hücresi (*Red Blood Cell*, RBC), hemoglobin (*Hemoglobin*, HG), hematokrit (*Hematocrit*, HCT), ortalama korpüsküler hacim (*Mean Cell Volume*, MCV), ortalama korpüsküler hemoglobin (*Mean Cell Hemoglobin*, MCH), ortalama korpüsküler hemoglobin konsantrasyonu (*Mean cell hemoglobin concentration*, MCHC), trombosit (*platelet*, PLT), trombosit dağılım genişliği standart sapması (*RBC Distribution Width Standard Deviation*, RDW-SD), kırmızı hücre dağılım genişliği (*Red Cell Distribution Width*, RDW-CV), trombosit dağılım genişliği (*Platelet Distribution Width*, PDW), ortalama trombosit hacmi (*Mean Platelet Volume*, MPV), trombosit-büyük hücre oranı (*Platelet-Large Cell Ratio*, P-LCR), prokalsitonin (*Procalcitonin*, PCT), çekirdekli kırmızı kan hücresi (*Nucleated RBC*, NRBC), nötrofiller, monositler, lenfositler, eozinofil, bazofiller ve immünoglobulin G seviyeleri hematoloji otoanalizörü kullanılarak analiz edilmiştir. Örnekler duplike çalışılmıştır. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma (aralık) olarak verilmiştir. Birimleri ise şu şekildedir: WBC, PLT, nötrofiller, monositler, lenfositler, eozinofil, bazofiller, immünoglobulin G için  $10^3/\mu\text{l}$ ; RBC için  $10^6/\mu\text{l}$ ; HGB ve MCHC için g/dl; HCT, RDW-CV, P-LCR, PCT ve NRBC için %; MCV, RDW-SD, PDW ve MPV için femtolitre (fl); MCH için pikogram (pg).

Serum örneklerindeki CRP, karaciğer fonksiyon parametreleri (AST, ALT) ve serum lipit seviyeleri (TK, HDL) hematoloji otoanalizörü ile belirlenmiştir. Örnekler çift tekrar çalışılmıştır. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma (aralık) olarak verilmiştir. Birimleri şu şekildedir: CRP, TK ve HDL için mg/dl; AST ve ALT için U/L.

### 3.8. Oksidatif Stres ve İmmün Parametrelerinin Değerlendirilmesi

SOD, CAT, GR ve GPx enzim aktiviteleri ve ayrıca GSH, MDA, 8-OHdG,

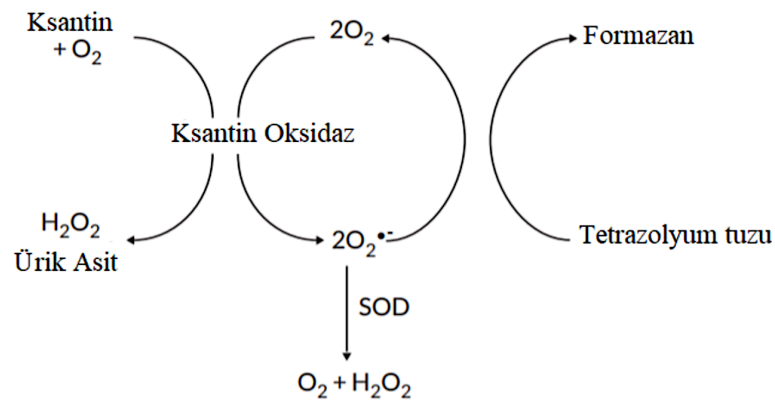
TNF-alfa, IL-1beta ve CC16 plazma düzeyleri test kitleri kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Kitler sırası ile 450 nm, 540 nm, 340 nm, 340 nm, 405 nm, 540 nm, 450 nm, 450 nm, 450 nm ve 450 nm dalga boylarında çalışılmıştır. Örnekler duplike çalışılmıştır. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma (aralık) olarak verilmiştir. Birimleri ise şu şekildedir: SOD için U/ml; CAT, GR ve GPx için nmol/dk/ml; GSH ve MDA için  $\mu$ M; 8-OHdG için ng/ml; TNF-alfa, IL-1beta ve CC16 için pg/ml.

### 3.8.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü

#### SOD Enzim Aktivitesinin Ölçüm Yönteminin Esası

SOD ölçüm kitinde (Cayman, No: 706002) yöntem; ksantin oksidazın ksantini ürik aside dönüştürürken oluşturduğu süperoksit anyonunun SOD ile dismutasyonu esnasında ortama eklenen tetrazolyum tuzunun formazan kristaline dönüşmesinde ortaya çıkan renk değişiminin spektrofotometrik olarak 450 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 3.1.).

SOD'un bir ünitesi, süperoksit radikalının % 50 dismutasyonunun oluşması için gereken enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Üç tip SOD (Cu/Zn, Mn ve FeSOD) ölçülebilmektedir.



Şekil 3.1. Süperoksit dismutaz ölçümünün şeması.

#### SOD Enzim Aktivitesinin Ölçüm Yönteminin Uygulanışı

1. Tüm kuyucuklara 200  $\mu$ l dilüe edilen radikal detektörü ve ardından ilgili kuyucuklara 10  $\mu$ l SOD standartı veya 10  $\mu$ l plazma örneği eklenmiştir.

2. Tüm kuyucuklara 20 µl dilüe edilen ksantin oksidaz çözeltisi mümkün olan en kısa sürede eklenerek reaksiyon başlatılmıştır.
3. Plak birkaç saniye dikkatlice çalkalanmıştır ve kapak kapatılmıştır.
4. Oda sıcaklığında çalkalayıcıda 20 dakika inkübe edilmiştir.
5. Standart ve örneklerin absorbans değerleri 450 nm’de ölçülmüştür.

### **SOD Enzim Aktivitesinin Hesaplanması**

Standart ve örneklere ait ortalama absorbans değerleri hesaplanmıştır. 0 U/ml SOD aktivitesine sahip standarda ait absorbans değeri, kendisine ve diğer absorbans değerlerine bölünmüştür. Elde edilen oran, standartların SOD aktivitesine karşı grafiğe geçirilerek bir standart eğri ve denklemi ( $y=ax+b$ ) elde edilmiştir. Bu denklemden hareketle örneklerin SOD aktiviteleri Formül 3.1. kullanılarak belirlenmiştir:

$$\text{SOD (U/ml)} = ((\text{örnek absorbansı} - b)/a) * (0,23/0,01) \quad (3.1.)$$

### **3.8.2. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü**

#### **CAT Enzim Aktivitesinin Ölçüm Yönteminin Esası**

CAT ölçüm kitinde (Cayman, No: 707002) yöntem; hidrojen peroksit substratının katalaz ile enzimatik tepkimesi sonucu oluşan formaldehitin kromojen ile renkli bir bileşik oluşturması ve oluşan renk şiddetinin kolorimetrik olarak 540 nm’de ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Bir birim enzim, 25°C’de, 1 dakikada 1 nmol formaldehit oluşumunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

#### **CAT Enzim Aktivitesinin Ölçüm Yönteminin Uygulanışı**

1. Tüm kuyucuklara 100 µl seyreltilen (1X) deney tamponu ve 30 µl metanol eklendikten sonra ilgili kuyucuklara 20 µl SOD standardı veya 20 µl seyreltilen CAT kontrol çözeltisi veya 20 µl plazma örneği eklenmiştir.
2. Tüm kuyucuklara 20 µl seyreltilen hidrojen peroksit çözeltisi mümkün olan en kısa sürede eklenmiştir ve reaksiyonun başlama zamanı not edilmiştir.
3. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında çalkalayıcıda 20 dakika inkübe

edilmiştir.

4. Reaksiyonu sonlandırmak için tüm kuyucuklara 30 µl seyreltilen potasyum hidroksit çözeltisi ve ardından 30 µl kromojen eklenmiştir.
5. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında çalkalayıcıda 10 dakika inkübe edilmiştir.
6. Tüm kuyucuklara 10 µl potasyum periyodat eklenmiştir.
7. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında çalkalayıcıda 5 dakika inkübe edilmiştir.
8. Standart ve örneklerin absorbans değerleri 540 nm'de ölçülmüştür.

### **CAT Enzim Aktivitesinin Hesaplanması**

Standart ve örneklere ait ortalama absorbans değerleri hesaplanmıştır. 0 µM konsantrasyondaki standartın ortalama absorbans değeri, kendisinden ve diğer standartlardan çıkarılmıştır. Elde edilen değerler grafiğe geçirilerek bir standart eğri ve denklemi ( $y=ax+b$ ) elde edilmiştir. Bu denklemden hareketle formaldehit konsantrasyonları (µM) Formül 3.2. kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Formaldehit } (\mu\text{M}) = ((\text{örnek absorbansı}-b)/a) * (0,17/0,02) \quad (3.2.)$$

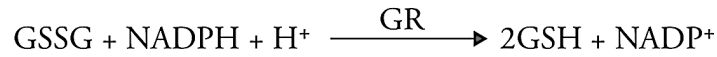
Hesaplanan formaldehit konsantrasyonlarından (µM) örneklerin CAT aktivitesi Formül 3.3. kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{CAT Aktivitesi (nmol/dk/ml)} = \text{Formaldehit } (\mu\text{M}) / 20 \text{ dakika} \quad (3.3.)$$

### **3.8.3. Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Ölçümü**

#### **GR Enzim Aktivitesinin Ölçüm Yönteminin Esası**

GR ölçüm kitinde (Cayman, No: 703202) yöntem; GSSG'nin GR enziminin katalizlediği reaksiyon ile GSH'a dönüştürülmesi sırasında ortamda bulunan NADPH'nin nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP<sup>+</sup>)'ye oksidasyonu sonucu absorbansta meydana gelen azalmanın 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 3.2.).



### Şekil 3.2. Glutatyon redüktaz reaksiyonu.

GR: Glutatyon redüktaz, GSH: indirgenmiş glutatyon, GSSG: Okside glutatyon, NADP<sup>+</sup>: Nikotin amid dinükleotid fosfat, NADPH: İndirgenmiş NADP<sup>+</sup>.

#### GR Enzim Aktivitesinin Ölçüm Yönteminin Uygulanışı

1. Kör (enzimatik olmayan) için; 3 kuyucuğa 120 µl deney tamponu ve 20 µl GSSG çözeltisi eklenmiştir.
2. Pozitif kontrol için; 3 kuyucuğa 100 µl deney tamponu, 20 µl GSSG çözeltisi ve 20 µl seyreltilen GR kontrol çözeltisi eklenmiştir.
3. Örnek kuyucukları için; 100 µl deney tamponu, 20 µl GSSG çözeltisi ve 20 µl ilgili plazma örneklerinden eklenmiştir.
4. Tüm kuyucuklara 50 µl NADPH çözeltisi mümkün olan en kısa sürede eklenip birkaç dakika çalkalayıcıda karıştırılmıştır ve reaksiyonun başlama zamanı not edilmiştir.
5. Standart ve örneklerin en az 5 zaman noktasında (5 dakika boyunca dakikada bir kere olmak üzere) absorbans değerleri 340 nm'de ölçülmüştür.

#### GR Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

Standart ve örneklere ait ortalama absorbans değerleri hesaplanmıştır. Her bir örnek için dakika başına absorbans değişiklikleri ( $\Delta A_{340}$ ) Formül 3.4. kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\Delta A_{340} / \text{dk} = |\text{Son ölçülen absorbans} - \text{İlk ölçülen absorbans}| / 2 \text{ zaman arası fark} \quad (3.4.)$$

Absorbans değişiklikleri ( $\Delta A_{340}$ )'nden hareketle GR aktiviteleri Formül 3.5. kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{GR aktivitesi} = (\Delta A_{340} / \text{dk} * 0,19) / (0,00373 * 0,02) \quad (3.5.)$$

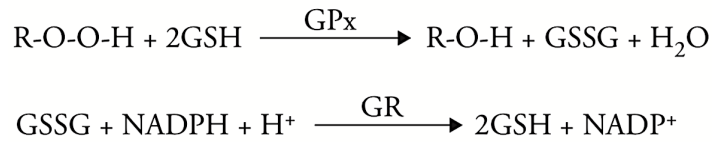


### 3.8.4. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Ölçümü

#### GPx Enzim Aktivitesinin Ölçüm Yönteminin Esası

GPx ölçüm kitinde (Cayman, No: 703102) yöntem; hidroperoksit varlığında GSH'ın GPx tarafından GSSG'ye dönüşerek, GSSG'nin GR ile tekrar GSH'a dönüştürülmesi esnasında ortamda bulunan NADPH'nin NADP<sup>+</sup>'ye oksidasyonu sonucu absorbansta meydana gelen azalmanın 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 3.3.).

Bir ünite GPx, dakikada 1 nmol NADPH'yi NADP<sup>+</sup>'ye dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.



**Şekil 3.3.** Glutasyon peroksidaz reaksiyonu.

GPx: Glutasyon peroksidaz, GR: Glutasyon redüktaz, GSH: indirgenmiş glutasyon, GSSG: okside glutasyon, NADP<sup>+</sup>: Nikotin amid dinükleotid fosfat, NADPH: İndirgenmiş NADP<sup>+</sup>.

#### GPx Enzim Aktivitesinin Ölçüm Yönteminin Uygulanışı

1. Kör (enzimatik olmayan) için; 3 kuyucuğa 120 µl deney tamponu ve 50 µl ko-substrat karışımı eklenmiştir.
2. Pozitif kontrol için; 3 kuyucuğa 100 µl deney tamponu, 50 µl ko-substrat karışımı ve 20 µl seyreltilen GPx kontrol çözeltisi eklenmiştir.
3. Örnek kuyucukları için; 100 µl deney tamponu, 50 µl ko-substrat karışımı ve 20 µl ilgili plazma örneklerinden eklenmiştir.
4. Tüm kuyucuklara 20 µl kümen hidroperoksit çözeltisi mümkün olan en kısa sürede eklenmiştir ve reaksiyonun başlama zamanı not edilmiştir.
5. Standart ve örneklerin en az 5 zaman noktasında (5 dakika boyunca dakikada bir kere olmak üzere) absorbans değerleri 340 nm'de ölçülmüştür.

#### GPx Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

Standart ve örneklere ait ortalama absorbans değerleri hesaplanmıştır. Her bir

örnek için dakika başına absorbands değişiklikleri ( $\Delta A_{340}$ ) Formül 3.6. kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\Delta A_{340} / dk = |\text{Son ölçülen absorbands} - \text{İlk ölçülen absorbands}| / 2 \text{ zaman arası fark} \quad (3.6.)$$

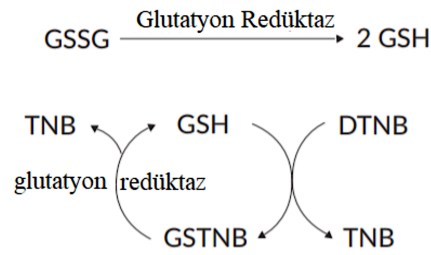
Absorbans değişiklikleri ( $\Delta A_{340}$ )'nden hareketle GPx aktiviteleri Formül 3.7. kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{GPx aktivitesi} = (\Delta A_{340} / dk * 0,19) / (0,00373 * 0,02) \quad (3.7.)$$

### 3.8.5. Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

#### GSH Düzeylerinin Ölçüm Yönteminin Esası

GSH ölçüm kitinde (Cayman, No: 703002) yöntem; DTNB'nin GSH'ın sülfidril grupları ile etkileştiği ve GR ile enzimatik tepkimesi sonucu oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB)'ye dönüşmesi ve oluşan renk şiddetinin spektrofotometrik olarak 405 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Üretilen GSH ve TNB arasında oluşan disülfid karışımı, GSH'yi geri dönüştürmek ve daha fazla TNB üretmek için GR tarafından indirgenmektedir (Şekil 3.4.). TNB üretim hızı doğrudan bu geri dönüşüm reaksiyonu ve örnekteki GSH konsantrasyonu ile orantılıdır.



**Şekil 3.4.** Glutasyon döngüsü.

DTNB: 5,5'-diti-bis-(2-nitrobenzoik) asit, GSH: indirgenmiş glutasyon, GSSG: okside glutasyon, TNB: 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit. GSTNB (GSH ve TNB arasında oluşan disülfid karışımı)

#### GSH Düzeylerinin Ölçüm Yönteminin Uygulanışı

1. İlgili kuyucuklara 50 µl GSSG standart çözeltileri ve 50 µl plazma örnekleri eklenmiştir.
2. MES tamponu (11,25 ml), ko-faktör karışımı (0,45 ml), enzim karışımı (2,1

ml) ve distile su (2,3 ml) ve DTNB (0,45 ml) karıştırılarak deney kokteyli hazırlanmıştır.

3. Tüm kuyucuklara 150 µl taze hazırlanan deney kokteyli eklenmiştir.
4. Plağın kapağı kapatılıp ışıktan korunarak çalkalayıcıda 25 dakika inkübe edilmiştir.
5. Standart ve örneklerin absorbands değerleri 405 nm'de ölçülmüştür.

### GSH Düzeylerinin Hesaplanması

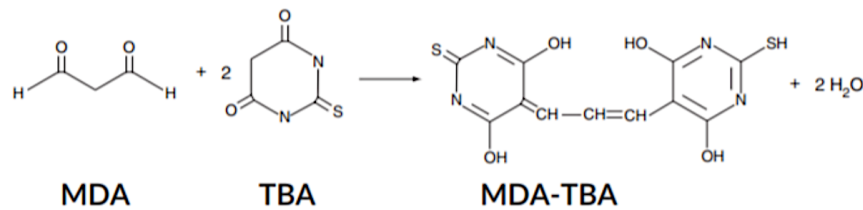
Standart ve örneklere ait ortalama absorbands değerleri hesaplanmıştır. 0 µM konsantrasyondaki standartın ortalama absorbands değeri, kendisinden ve diğer standartlardan çıkarılmıştır. Elde edilen değerler grafiğe geçirilerek bir standart eğri ve denklemi ( $y=ax+b$ ) elde edilmiştir. Bu denklemden hareketle toplam GSH konsantrasyonları (µM) Formül 3.8. kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Toplam GSH } (\mu\text{M}) = ((\text{örnek absorbandsı}-b)/a) \quad (3.8.)$$

### 3.8.6. Malondialdehit Düzeylerinin Belirlenmesi

#### MDA Düzeylerinin Ölçüm Yönteminin Esası

Lipit peroksidasyonu ölçüm kitinde (Cayman, No: 10009055) yöntem; MDA ve TBA yüksek sıcaklık ve asidik koşullar altında reaksiyonu ile oluşan renkli MDA-TBA kompleksinin 540 nm'de kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 3.5.).



**Şekil 3.5.** Malondialdehit ve tiyobarbitürik asit reaksiyonu.

MDA: Malondialdehit; TBA: Tiyobarbitürik asit.

#### MDA Düzeylerinin Ölçüm Yönteminin Uygulanışı

1. 100 µl seyreltilen standart çözeltisi veya plazma örnekleri 5ml'lik cam tüplere

eklenmiştir.

2. Her tüpe 100 µl sodium dodesil sülfat çözeltisi eklenip hızlıca karıştırılmıştır.
3. Her cam tüpe 4 ml renk reaktifi eklenerek ve yavaşça ters düz edilmiştir.
4. Tüpler su banyosunda (100°C) bir saat boyunca bekletilmiştir. Tüpler su banyosundan alınarak buz içinde 10 dakika süre ile bekletilmiştir.
5. Tüpler 4 °C'de 3500 devir/dk 10 dakika süre ile santrifüj edilerek oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir.
6. Standart ve örneklerden 150 µl alınır ve plaklara eklenmiştir.
7. Standart ve örneklerin absorbans değerleri 540 nm'de ölçülmüştür.

### **MDA Düzeylerinin Hesaplanması**

Standartların ve örneklerin ortalama absorbans değerleri hesaplanmıştır. 0 µM konsantrasyondaki standardın ortalama absorbans değeri, kendisinden ve diğer standartlardan çıkarılmıştır. Elde edilen değerler grafiğe geçirilerek bir standart eğri ve denklemi ( $y=ax+b$ ) elde edilmiştir. Bu denklemden hareketle MDA konsantrasyonları (µM) Formül 3.9. kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{MDA } (\mu\text{M}) = ((\text{örnek absorbansı}-b)/a) \quad (3.9.)$$

### **3.8.7. 8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin Düzeylerinin Belirlenmesi**

#### **8-OHdG Düzeylerinin Ölçüm Yönteminin Esası**

DNA'nın oksidatif hasarına bağlı olarak serum, plazma, idrar ve hücre lizatında 8-OHdG oluşabilmektedir. 8-OHdG ölçüm kitinde (Elabscience, No: E-EL-0028) kompetitif ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) prensibi kullanılmıştır. Kompetitif ölçümde, 8-OHdG ile kaplanan plakta, standart/örneklerdeki 8-OHdG (işaretsiz ligand) ile 8-OHdG'ye özgü biyotinli antikor (işaretili ligand) bağlanmak için yarışır. Yıkama ile sabit kompleksler dışındaki ürünler ortamdan uzaklaştırılır. Sabit kompleksleri belirleyebilmek için ikinci bir antikor (HRP konjugatı) eklenerek monoklonal antikorlara bağlanması sağlanır. Enzimin substratı ortama eklenerek oluşan renkli kompleksten yararlanılarak spektrofotometrik ölçüm yapılır.

### 8-OHdG Düzeylerinin Ölçüm Yönteminin Uygulanışı

1. İlgili kuyucuklara 50 µL standart çözeltileri ve 50 µL plazma örnekleri eklenmiştir. Kuyucukların iç yüzeyine dokunmadan ekleme yapılmıştır ve de köpük oluşturmaktan kaçınılmıştır.
2. Tüm kuyucuklara mümkün olan en kısa sürede 50 µL 1X biyotinli deteksiyon antikor çözeltisi eklenmiştir. Yavaşça karıştırılıp plak kapağı kapatılmıştır. 37 °C’de 45 dakika inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon sonunda çözeltiler atılmıştır. Tüm kuyucuklara 350 µl 1X yıkama tamponu eklenmiştir. 1 ~ 2 dakika bekletildikten sonra çözeltiler atılmıştır. Bu yıkama işlemi 3 kere tekrarlanmıştır.
4. Tüm kuyucuklara 100 µl 1X HRP konjugatı eklenmiştir. Plak kapağı kapatılarak 37 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir.
5. İnkübasyon sonunda çözeltiler atılmıştır. 3. adımda belirtilen yıkama işlemi 5 kere tekrarlanmıştır.
6. Tüm kuyucuklara 90 µl substrat reaktifi eklenmiştir. Plak kapağı kapatılarak 37 °C’de 15 dakika ışıktan korunarak inkübe edilmiştir.
7. Tüm kuyucuklara 50 µl durdurma çözeltisi eklenmiştir.
8. Standart ve örneklerin absorbans değerleri 450 nm’de ölçülmüştür.

### 8-OHdG Düzeylerinin Hesaplanması

Standartların ve örneklerin ortalama absorbans değerleri hesaplanmıştır. 0 ng/ml konsantrasyondaki standardın ortalama absorbans değeri, kendisinden ve diğer standartlardan çıkarılmıştır. Elde edilen değerler grafiğe geçirilerek bir standart eğri ve denklemi ( $y=ax+b$ ) elde edilmiştir. Bu denklemden hareketle 8-OHdG konsantrasyonları (ng/ml) Formül 3.10. kullanılarak hesaplanmıştır:

$$8\text{-OHdG (ng/ml)} = ((\text{örnek absorbansı}-b)/a) \quad (3.10.)$$

### 3.8.8. Tümör Nekroz Faktör-alfa Düzeylerinin Belirlenmesi

#### TNF-alfa Düzeylerinin Ölçüm Yönteminin Esası

TNF-alfa ölçüm kitinde (Elabscience Biotechnology, Co. Ltd., No: E-EL-

H0109) sandviç ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) prensibi kullanılmıştır. Sandviç ELISA yönteminde, insan TNF-alfa'ya özgü bir antikor ile kaplanan plağa standart veya örnek çözeltileri eklenerek özgü antikor ile birleştirilir. Yıkama ile sabit kompleksler dışındaki ürünler ortamdan uzaklaştırılır. Biotinli antikor ve HRP konjugatı art arda eklenmesi ile primer enzim işaretli antikor kompleksi oluşur. Yıkama ile sabit kompleksler dışındaki ürünler ortamdan uzaklaştırılır. Enzimin substratı ortama eklenerek oluşan renkli kompleksten yararlanılarak 450 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapılır.

### **TNF-alfa Düzeylerinin Ölçüm Yönteminin Uygulanışı**

1. İlgili kuyucuklara 100 µL standart çözeltileri ve 100 µL plazma örnekleri eklenmiştir. Ekleme yapılırken kuyucukların iç yüzeyine dokunmaktan ve köpük oluşturmaktan kaçınılmıştır. Plak kapağı kapatılarak 37 °C'de 90 dakika inkübe edilmiştir.
2. İnkübasyon sonunda çözeltiler atılmıştır. Tüm kuyucuklara mümkün olan en kısa sürede 100 µl 1X biyotinli deteksiyon antikor çözeltisi eklenmiştir. Yavaşça karıştırılıp plak kapağı kapatılmıştır. 37 °C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon sonunda çözeltiler atılmıştır. Tüm kuyucuklara 350 µl 1X yıkama tamponu eklenmiştir. 1 ~ 2 dakika bekletildikten sonra çözeltiler atılmıştır. Bu yıkama işlemi 3 kere tekrarlanmıştır.
4. Tüm kuyucuklara 100 µl 1X HRP konjugatı eklenmiştir. Plak kapağı kapatılarak 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
5. İnkübasyon sonunda çözeltiler atılmıştır. 3. adımda belirtilen yıkama işlemi 5 kere tekrarlanmıştır.
6. Tüm kuyucuklara 90 µl substrat reaktifi eklenmiştir. Plak kapağı kapatılarak 37 °C'de 15 dakika ışıktan korunarak inkübe edilmiştir.
7. Tüm kuyucuklara 50 µl durdurma çözeltisi eklenmiştir.
8. Standart ve örneklerin absorbans değerleri 450 nm'de ölçülmüştür.

### **TNF-alfa Düzeylerinin Hesaplanması**

Standartların ve örneklerin ortalama absorbans değerleri hesaplanmıştır. 0

pg/ml konsantrasyondaki standardın ortalama absorbans değeri, kendisinden ve diğer standartlardan çıkarılmıştır. Elde edilen değerler grafiğe geçirilerek bir standart eğri ve denklemi ( $y=ax+b$ ) elde edilmiştir. Bu denklemden hareketle TNF-alfa konsantrasyonları (pg/ml) Formül 3.11. kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{TNF-alfa (pg/ml)} = ((\text{örnek absorbansı}-b)/a) \quad (3.11.)$$

### 3.8.9. İnterlökin-1beta Düzeylerinin Belirlenmesi

#### IL-1beta Düzeylerinin Ölçüm Yönteminin Esası

IL-1beta ölçüm kitinde (Elabscience Biotechnology, Co. Ltd., No: E-EL-H0149) sandviç ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) prensibi kullanılmıştır. Sandviç ELISA yönteminde, insan IL-1beta'ya özgü bir antikor ile kaplanan plağa standart veya örnek çözeltileri eklenerek özgü antikor ile birleştirilir. Yıkama ile sabit kompleksler dışındaki ürünler ortamdan uzaklaştırılır. Biotinli antikor ve HRP konjugatı art arda eklenmesi ile primer enzim işaretli antikor kompleksi oluşur. Yıkama ile sabit kompleksler dışındaki ürünler ortamdan uzaklaştırılır. Enzimin substratı ortama eklenerek oluşan renkli kompleksten yararlanılarak 450 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapılır.

#### IL-1beta Düzeylerinin Ölçüm Yönteminin Uygulanışı

1. İlgili kuyucuklara 100 µL standart çözeltileri ve 100 µL plazma örnekleri eklenmiştir. Ekleme yapılırken kuyucukların iç yüzeyine dokunmaktan ve köpük oluşturmaktan kaçınılmıştır. Plak kapağı kapatılarak 37 °C'de 90 dakika inkübe edilmiştir.
2. İnkübasyon sonunda çözeltiler atılmıştır. Tüm kuyucuklara mümkün olan en kısa sürede 100 µl 1X biyotinli deteksiyon antikor çözeltisi eklenmiştir. Yavaşça karıştırılıp plak kapağı kapatılmıştır. 37 °C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon sonunda çözeltiler atılmıştır. Tüm kuyucuklara 350 µl 1X yıkama tamponu eklenmiştir. 1 ~ 2 dakika bekletildikten sonra çözeltiler atılmıştır. Bu yıkama işlemi 3 kere tekrarlanmıştır.
4. Tüm kuyucuklara 100 µl 1X HRP konjugatı eklenmiştir. Plak kapağı

kapatılarak 37 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir.

5. İnkübasyon sonunda çözeltiler atılmıştır. 3. adımda belirtilen yıkama işlemi 5 kere tekrarlanmıştır.
6. Tüm kuyucuklara 90 µl substrat reaktifi eklenmiştir. Plak kapağı kapatılarak 37 °C’de 15 dakika ışıktan korunarak inkübe edilmiştir.
7. Tüm kuyucuklara 50 µl durdurma çözeltisi eklenmiştir.
8. Standart ve örneklerin absorbans değerleri 450 nm’de ölçülmüştür.

### **IL-1beta Düzeylerinin Hesaplanması**

Standartların ve örneklerin ortalama absorbans değerleri hesaplanmıştır. 0 pg/ml konsantrasyondaki standardın ortalama absorbans değeri, kendisinden ve diğer standartlardan çıkarılmıştır. Elde edilen değerler grafiğe geçirilerek bir standart eğri ve denklemi ( $y=ax+b$ ) elde edilmiştir. Bu denklemden hareketle IL-1beta konsantrasyonları (pg/ml) Formül 3.12. kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{IL-1beta (pg/ml)} = ((\text{örnek absorbansı}-b)/a) \quad (3.12.)$$

### **3.8.10. Clara Hücre Protein 16 Düzeylerinin Belirlenmesi**

#### **CC16 düzeylerinin ölçüm yönteminin esası**

CC16 ölçüm kitinde (Elabscience Biotechnology, Co. Ltd., No: E-EL-H0744) sandviç ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) prensibi kullanılmıştır. Sandviç ELISA yönteminde, insan CC16’ya özgü antikor ile kaplanan plağa standart veya örnek çözeltileri eklenerek özgü antikor ile birleştirilir. Yıkama ile sabit kompleksler dışındaki ürünler ortamdan uzaklaştırılır. Biotinli antikor ve HRP konjugatı art arda eklenmesi ile primer enzim işaretli antikor kompleksi oluşur. Yıkama ile sabit kompleksler dışındaki ürünler ortamdan uzaklaştırılır. Enzimin substratı ortama eklenerek oluşan renkli kompleksten yararlanılarak 450 nm’de spektrofotometrik ölçüm yapılır.

#### **CC16 düzeylerinin ölçüm yönteminin uygulanışı**

1. İlgili kuyucuklara 100 µL standart çözeltileri ve 100 µL plazma örnekleri



eklenmiştir. Ekleme yapılırken kuyucukların iç yüzeyine dokunmaktan ve köpük oluşturmaktan kaçınılmıştır. Plak kapağı kapatılarak 37 °C’de 90 dakika inkübe edilmiştir.

2. İnkübasyon sonunda çözeltiler atılmıştır. Tüm kuyucuklara mümkün olan en kısa sürede 100 µl 1X biyotinli deteksiyon antikor çözeltisi eklenmiştir. Yavaşça karıştırılıp plak kapağı kapatılmıştır. 37 °C’de 60 dakika inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon sonunda çözeltiler atılmıştır. Tüm kuyucuklara 350 µl 1X yıkama tamponu eklenmiştir. 1 ~ 2 dakika bekletildikten sonra çözeltiler atılmıştır. Bu yıkama işlemi 3 kere tekrarlanmıştır.
4. Tüm kuyucuklara 100 µl 1X HRP konjugatı eklenmiştir. Plak kapağı kapatılarak 37 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir.
5. İnkübasyon sonunda çözeltiler atılmıştır. 3. adımda belirtilen yıkama işlemi 5 kere tekrarlanmıştır.
6. Tüm kuyucuklara 90 µl substrat reaktifi eklenmiştir.
7. Plak kapağı kapatılıp 37 °C’de 15 dakika ışıktan korunarak inkübe edilmiştir.
8. Tüm kuyucuklara 50 µl durdurma çözeltisi eklenmiştir.
9. Standart ve örneklerin absorbans değerleri 450 nm’de ölçülmüştür.

### CC16 Düzeylerinin Hesaplanması

Standartların ve örneklerin ortalama absorbans değerleri hesaplanmıştır. 0 pg/ml konsantrasyondaki standardın ortalama absorbans değeri, kendisinden ve diğer standartlardan çıkarılmıştır. Elde edilen değerler grafiğe geçirilerek bir standart eğri ve denklemi ( $y=ax+b$ ) elde edilmiştir. Bu denklemden hareketle CC16 konsantrasyonları (pg/ml) Formül 3.13. kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{CC16 (pg/ml)} = ((\text{örnek absorbansı}-b)/a) \quad (3.13.)$$

### 3.9. Tek Hücre Jel Elektrophorez Yöntemi ile DNA Hasarının Belirlenmesi

1. DNA hasarının belirlenmesi için tek hücre jel elektrophorez yöntemi kullanılmıştır (176,177).
2. *Ficoll-hypaque* gradient santrifüj yöntemi ile periferik kan mononükleer hücreleri (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*, PBMC) elde edilmiştir.

Heparinli tüpe alınan 5 ml kan örneği, 5 ml PBS ile 1:1 oranında seyreltilmiştir. 2 ml Ficoll üzerine seyreltilmiş kan örneği pastör pipeti ile yavaşça yayılmıştır. Ficoll-kan karışımı oda sıcaklığında 2000 rpm'de 20 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda Ficoll üzerindeki interfazda ince bir tabaka halinde bulunan PBMC'ler pastör pipeti ile dikkatle toplanmıştır. İzole edilen hücreler PBS ile iki kere yıkanmıştır. Yıkama işlemi için, izole edilen hücreler steril tüpe alınarak üzerine PBS eklenmiştir. 2300 rpm'de 10 dk süre ile santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Yıkama işleminin ardından çöken kısımdaki hücreler *Neubauer* lamında sayıldıktan sonra PBS ile seyreltilerek hücre konsantrasyonları yaklaşık  $2 \times 10^5$  hücre/ml olarak ayarlanmıştır. Hücre canlılığı tripan mavisi ile kontrol edilmiştir ve % 85'in üzerinde olduğu doğrulanmıştır.

3.  $37 \pm 0,5$  °C'de eritilmiş 75 µl % 0,75'lik LMPA, 50 µl hücre süspansiyonu ile karıştırıldıktan sonra, daha önceden hazırlanan % 1'lik NMPA çözeltisine daldırılıp agar ile kaplanmış lamlara yayılmıştır ve üzerine lamel kapatılmıştır.
4. Lamalar, soğuk metal üzerinde 5 dakika bekletilerek ağarın katılaşması sağlanmıştır. Ardından agar üzerindeki lamel zedelenmeden alınmıştır.
5. Lamalar, önceden hazırlanıp 4 °C'de saklanan soğuk lizis çözeltisine daldırılarak en az 1 saat 4 °C'de bekletilmiştir.
6. Lizis çözeltisinden çıkarıldıktan sonra lamalar süzülerek elektroforez için hazır hale getirilmiştir.
7. Elektroforez işlemi için tank soğuk elektroforez çözeltisi ile doldurulmuştur.
8. Lamalar agar yayılan kısımları üste gelecek şekilde elektroforez tankının içine yerleştirilerek akım uygulanmadan elektroforez kuvvetinin içerisinde 20 dakika bekletilmiştir.
9. Elektroforez 25 volt ve 300 mA akım uygulayarak 20 dakika 4 °C'de elektroforez uygulanmıştır.
10. Elektroforez işlemi bittikten sonra alınan lamalar 5 dakika distile suda, takiben 15 dakika nötralizasyon tampon çözeltisinde bekletilmiştir. Ardından lamalar sırası ile 5'er dakika % 50, % 75 ve % 98'lik etanol çözeltisinde tutulmuştur ve okuma öncesinde lamalar kurumasi için en az 1 gün bekletilmiştir.
11. Okuma sırasında kurutulmuş lamalar üzerine 35 µl 20 µg/ml EtBr çözeltisi ilave

edilmiştir.

12. Her bir gönüllü için 2 lama uygulama yapılmıştır ve agaroz jeldeki DNA fragmanlarının elektroforetik göçünden sonra DNA hasarının boyutunu belirlemek için toplam 100 hücre 400x büyütme ile floresan mikroskopunda bilgisayarlı görüntüleme sistemi ile (Comet Analysis Software, version 4.0, Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, İngiltere) değerlendirilmiştir.
13. DNA hasar derecesinde kuyruk yoğunluğu esas alınmıştır. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.
14. Tüm işlemler ek bir DNA hasarını önlemek amacı ile karanlıkta yapılmıştır.

### 3.10. Yanak Epitel Hücrelerinde Mikroçekirdek Yöntemi

1. Çalışmamızda kromozomal genetik hasarı belirlemek üzere yanak epitel hücrelerinde mikroçekirdek testi kullanılmıştır (174,178).
2. Gönüllerden ağızlarını distile su ile çalkalanmaları istenmiştir. Keratinize dokunun temizlenmesi amacıyla tahta spatül ile temizleme yapılmıştır. Ardından diş fırçası yardımı ile her iki yanak mukozasından epitel hücreler toplanmıştır.
3. Toplanan yanak epitel hücreler, 10 ml PBS içeren bir santrifüj tüpüne alınmıştır.
4. Hücre süspansiyonları, mikroçekirdek sayımını zorlaştırabilecek bakteri ve hücre döküntülerini gidermek amacı ile 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Bu işlem 10 ml PBS eklenerek 2 kere tekrarlanmıştır.
5. Hücre süspansiyonu temiz ve numaralandırılmış lamalar üzerine yayılarak, oda sıcaklığında kurutulmuştur.
6. Lamlar % 80 metanol çözeltisi içinde 15 dakika bekletilip tekrar oda sıcaklığında kurutularak sabitleme işlemi yapılmıştır.
7. Lam üzerine sabitlenen hücreler, DNA'ya özgü bir boya olan akridin turuncusu ile boyanmıştır. Boyama için, lamaların üzerine 35-50  $\mu$ l % 0,1'lik akridin turuncusu çözeltisinden damlatılıp lamel ile kapatılarak karanlıkta ve oda sıcaklığında 15 dk bekletilmiştir (178,179).

### **Mikroçekirdek Sıklığının Hesaplanması**

Boyanan preparatlarda her birey için toplam 2000 hücrede mikroçekirdek sıklıkları 440-490 eksitasyon filtresi ve 520 nm emisyon filtreli floresan mikroskobu kullanılarak değerlendirilmiştir.

Mikroçekirdek sıklıkları Tolbert ve ark. (173) kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Sonuçlar sıklık cinsinden ifade edilmiştir.

Bazal, binükleer, nükleer tomurcuk, piknotik, kondanse kromatin, karyohektik ve karyolitik hücreler mikroçekirdek içeren hücrelerin değerlendirilmesinin dışında tutulmuştur (178).

### **3.11. İstatistiksel Yöntemler**

Verilerin analizi *SPSS for Windows 20.0* bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılıma uyup uymadığı Kolmogorov-Smirnov testi ile incelenmiştir. Varyansın homojenliği ise Levene testi ile araştırılmıştır. Sürekli değişkenler için veriler ortalama  $\pm$  standart sapma ve kategorik değişkenler ise vaka sayısı (n) ve yüzdesi (%) olarak ifade edilmiştir. Normal dağılıma sahip gruplar arasındaki farklılıklar ANOVA (*One-Way Variance Analysis*) testi ile değerlendirilmiştir ve grup farklılıklarının post-hoc analizi LSD (*Least Significant Difference*) testi ile gerçekleştirilmiştir. Normal dağılım göstermeyen gruplar arasındaki farklılıklar iki grup için Mann-Whitney U ve ikiden fazla grup için Kruskal-Wallis testi ile değerlendirilmiştir. Doğrusal ilişkinin büyüklüğü Pearson korelasyon analizi ile hesaplanmıştır. Parametreleri belirlemek için çoklu doğrusal regresyon analizi kullanılmıştır. Yanak epitel mikroçekirdek test sonuçlarının istatistiksel analizi için mikroçekirdek yüzdesi için z-testi uygulanmıştır. 0,05'ten küçük p değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Demografik Bulgular

Çalışma grubumuz aynı coğrafi bölgede yaşayan, benzer yaşam koşullarına sahip kişiler arasından seçilmiştir. Çalışma grubumuzun tamamı erkeklerden oluşmaktadır. Coğrafi konum, yaşam koşulları ve cinsiyetin değerlendirilen parametrelere etkisi bulunmamaktadır.

Mesleki olarak mermer tozuna maruz kalan işçi (n=48) grubundaki her bir bireye ait yaş, sigara ve alkol kullanma alışkanlığı, çalışma yılı ve koruyucu maske kullanımına ilişkin bulgular Tablo 4.1.'de verilmiştir. Kontrol (n=41) grubundaki her bir bireye ait yaş, sigara ve alkol kullanma alışkanlığına ilişkin bulgular Tablo 4.2.'de verilmiştir. Çalışma popülasyonunun temel demografik özellikleri ise Tablo 4.3.'te özetlenmiştir.

Çalışmada yer alan işçiler İşçehisar (Afyonkarahisar) bölgesinde aynı mermer fabrikasında çalışan bireylerdir. İşçilerin yaş ortalaması  $37,81 \pm 8,50$  (ortalama  $\pm$  standart sapma) olup yaş sınırı 21 ile 58 yıl arasında değişmektedir. 19-40 yaş aralığında olan 32 işçi (% 66,67) genç yaş işçi grubunu ve 41-60 yaş aralığında olan 16 işçi (% 33,33) ise orta yaş işçi grubunu oluşturmuştur. İşçilerin % 58,33'ü sigara içerken, % 41,67'si sigara içmemektedir. İşçilerin günlük kullandığı sigara adedinin  $16,96 \pm 7,12$  (ortalama  $\pm$  standart sapma) olduğu belirlenmiştir. İşçi grubundaki bireylerin tamamı hiç alkol kullanmadıklarını ifade etmiştir. Çalışma süresine göre sınıflandırıldığında % 20,83'ünün 16 yıl ve daha uzun süre (uzun çalışma süreli), % 47,92'sinin 5-15 yıl (orta çalışma süreli), % 31,25'inin 0,5-4,5 yıl (kısa çalışma süreli) mermer üretim alanlarında çalışmış olduğu görülmüştür. Mermer üretim alanında çalışan işçilerin % 25'i koruyucu maske kullandığını ve % 75'i ise koruyucu maske kullanmadığını belirtmiştir.

Çalışmada yer alan kontrol grubundaki bireyler ofis çalışanı olup mermer tozu maruziyet öyküsü bulunmayan bireylerdir. Kontrol grubunun yaş ortalaması  $38,32 \pm 7,73$  (ortalama  $\pm$  standart sapma) olup yaş sınırı 21 ile 57 yıl arasında değişmektedir. Kontrol grubundaki bireylerin % 39,02'si sigara içerken, % 60,98'i sigara içmemektedir. Günlük kullandıkları sigara adedinin ise  $18,31 \pm 3,68$  (ortalama  $\pm$  standart sapma) olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubundaki yalnızca 1 kişi alkol

kullandığını ifade etmiştir.

İşçi ve kontrol grubu arasında yaş ve alkol kullanımı ile ilgili anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Çalışma popülasyonumuzda sadece kontrol grubundan 1 kişi alkol kullandığını belirttiği için incelenen parametrelerde alkol kullanım durumu ile ilgili değerlendirme yapılmamıştır. İşçi grubunun sigara içme oranı (%) kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Bu farklılık nedeni ile sigara kullanımının incelenen parametrelere etkisinin olup olmadığı ayrıca değerlendirilmiştir.

**Tablo 4.1.** Mermer tozuna maruz kalan işçi grubundaki bireylere ait bulgular.

No	Kod	Yaş	Sigara	Sigara tüketim miktarı (adet/gün)	Alkol	Çalışma Süresi (yıl)	Koruyucu maske kullanımı
1	M004	24	Hayır	0	Hayır	3	Hayır
2	M005	58	Hayır	0	Hayır	5	Hayır
3	M006	39	Evet	20	Hayır	25	Hayır
4	M007	42	Hayır	0	Hayır	4,5	Hayır
5	M008	37	Evet	20	Hayır	2	Hayır
6	M009	45	Evet	40	Hayır	30	Evet
7	M010	41	Evet	10	Hayır	20	Hayır
8	M011	28	Evet	10	Hayır	4,5	Hayır
9	M012	39	Evet	10	Hayır	0,67	Hayır
10	M015	26	Hayır	0	Hayır	6	Hayır
11	M016	40	Evet	20	Hayır	14	Evet
12	M017	36	Evet	20	Hayır	6	Evet
13	M018	38	Evet	20	Hayır	4	Evet
14	M019	40	Hayır	0	Hayır	6	Hayır
15	M020	54	Hayır	0	Hayır	35	Hayır
16	M021	47	Evet	20	Hayır	17	Hayır
17	M022	26	Evet	10	Hayır	6	Hayır
18	M023	41	Evet	20	Hayır	10	Hayır

**Tablo 4.1. (devam)** Mermer tozuna maruz kalan işçi grubundaki bireylere ait bulgular.

19	M024	27	Hayır	0	Hayır	1,5	Evet
20	M025	32	Evet	20	Hayır	1	Evet
21	M026	32	Hayır	0	Hayır	9,5	Hayır
22	M027	24	Hayır	0	Hayır	1	Hayır
23	M028	32	Evet	30	Hayır	0,50	Hayır
24	M029	25	Evet	20	Hayır	0,67	Hayır
25	M030	21	Hayır	0	Hayır	1	Hayır
26	M031	38	Hayır	0	Hayır	10	Evet
27	M032	25	Evet	20	Hayır	4,5	Hayır
28	M033	40	Hayır	0	Hayır	15	Hayır
29	M034	40	Hayır	0	Hayır	12	Evet
30	M035	46	Hayır	0	Hayır	10	Hayır
31	M037	36	Evet	15	Hayır	7	Hayır
32	M038	40	Evet	20	Hayır	10	Hayır
33	M039	44	Hayır	0	Hayır	5	Hayır
34	M040	49	Hayır	0	Hayır	6	Hayır
35	M041	40	Evet	20	Hayır	16	Evet
36	M042	33	Evet	20	Hayır	5	Hayır
37	M043	30	Evet	20	Hayır	5,5	Hayır
38	M044	41	Hayır	0	Hayır	24	Hayır
39	M045	32	Evet	10	Hayır	15	Hayır
40	M046	39	Evet	10	Hayır	0,5	Hayır
41	M047	38	Evet	10	Hayır	18	Hayır
42	M048	38	Evet	10	Hayır	0,67	Hayır
43	M049	41	Hayır	0	Hayır	15	Hayır
44	M050	50	Hayır	0	Hayır	15	Evet
45	M051	34	Evet	10	Hayır	12	Hayır
46	M052	49	Evet	10	Hayır	10	Hayır
47	M053	46	Evet	10	Hayır	25	Evet
48	M054	52	Hayır	0	Hayır	16	Evet

**Tablo 4.2.** Kontrol grubundaki bireylere ait bulgular.

<b>No</b>	<b>Kod</b>	<b>Yaş</b>	<b>Sigara</b>	<b>Sigara tüketim miktarı (adet/gün)</b>	<b>Alkol</b>
1	K001	33	Hayır	0	Hayır
2	K002	44	Evet	20	Hayır
3	K003	44	Hayır	0	Hayır
4	K004	39	Hayır	0	Hayır
5	K005	40	Evet	20	Hayır
6	K006	35	Hayır	0	Hayır
7	K007	35	Evet	20	Hayır
8	K008	35	Hayır	0	Hayır
9	K009	38	Hayır	0	Hayır
10	K010	48	Evet	20	Hayır
11	K011	54	Hayır	0	Hayır
12	K012	25	Hayır	0	Hayır
13	K013	33	Hayır	0	Hayır
14	K014	41	Hayır	0	Hayır
15	K015	42	Evet	20	Hayır
16	K016	42	Hayır	0	Hayır
17	K017	40	Evet	20	Hayır
18	K018	36	Hayır	0	Hayır
19	K019	33	Evet	10	Hayır
20	K020	41	Hayır	0	Evet
21	K021	38	Hayır	0	Hayır
22	K023	37	Hayır	0	Hayır
23	K024	41	Evet	20	Hayır
24	K025	41	Evet	20	Hayır
25	K026	36	Hayır	0	Hayır
26	K027	35	Evet	10	Hayır
27	K028	27	Hayır	0	Hayır
28	K029	40	Hayır	0	Hayır
29	K030	36	Hayır	0	Hayır



**Tablo 4.2. (devam)** Kontrol grubundaki bireylere ait bulgular.

<b>30</b>	K031	37	Evet	20	Hayır
<b>31</b>	K032	42	Evet	13	Hayır
<b>32</b>	K033	37	Evet	20	Hayır
<b>33</b>	K034	39	Hayır	0	Hayır
<b>34</b>	K035	30	Evet	20	Hayır
<b>35</b>	K036	23	Evet	20	Hayır
<b>36</b>	K037	57	Hayır	0	Hayır
<b>37</b>	K038	49	Hayır	0	Hayır
<b>38</b>	K039	43	Hayır	0	Hayır
<b>39</b>	K040	21	Hayır	0	Hayır
<b>40</b>	K041	29	Hayır	0	Hayır
<b>41</b>	K042	55	Evet	20	Hayır

**Tablo 4.3.** Çalışma popülasyonunun temel demografik özellikleri.

<b>Parametreler</b>	<b>İşçi Grubu (n= 48)</b>	<b>Kontrol Grubu (n= 41)</b>
<b>Yaş (yıl)</b>	37,81 ± 8,50 (21-58)	38,32 ± 7,73 (21-57)
<b>Yaş Grupları</b>		
Genç yaş (19-40)	32 (% 66,67)	26 (% 63,41)
Orta yaş (41-60)	16 (% 33,33)	15 (% 36,59)
<b>Sigara Kullanımı</b>		
Evet	28 (% 58,33)	16 (% 39,02) <sup>a</sup>
Hayır	20 (% 41,67)	25 (% 60,98)
Sigara adeti/gün	16,96 ± 7,12 (10-40)	18,31 ± 3,68 (10-20)
<b>Alkol Kullanımı</b>		
Evet	0 (% 0)	1 (% 2,44)
Hayır	48 (% 100)	40 (% 97,56)
<b>Çalışma Süresi</b>		-
Kısa süre (0,5-4,5 yıl)	15 (% 31,25)	
Orta süre (5-15 yıl)	23 (% 47,92)	
Uzun süre (16-35 yıl)	10 (% 20,83)	
<b>Koruyucu Maske Kullanımı</b>		-
Evet	12 (% 25)	
Hayır	36 (% 75)	

Değerler ortalama ± standart sapma (aralık) olarak verilmiştir. Her iki grupta da en az 1 yıl süreyle günde ondan fazla sigara içen bireyler, sigara içen olarak kabul edildi. n: Birey sayısı. <sup>a</sup>p <0,05; z-testi kullanılarak kıyaslanmıştır.

Koruyucu maske kullanımının parametrelere etkisi incelenmiştir (Tablo 4.4.). Koruyucu maske kullanan ve kullanmayan bireylerde yaş, çalışma süresi ve sigara tüketimi arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). İncelenen biyokimyasal parametrelerde (RDW-SD ve monosit düzeyleri haricinde), oksidatif stres ve immün sistem parametrelerinde ve DNA hasar derecesinde; koruyucu maske kullanan ve kullanmayan işçiler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Beklenenin aksine, koruyucu maske kullanan işçilerde mikroçekirdek sıklığı koruyucu maske kullanmayan işçilere göre daha yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Bu çelişkili sonuç, mikroçekirdek sıklığını artıran yaş ve sigara kullanımı gibi faktörlerden kaynaklanabileceğini düşündürmüştür.

**Tablo 4.4.** Koruyucu maske kullanan ve kullanmayan işçilere ait bulgular.

Parametreler	Maske kullanan (n=12)	Maske kullanmayan (n=36)	<i>p</i>
Yaş (yıl)	40,33 ± 7,14	36,97 ± 8,84	0,197
Çalışma süresi (yıl)	12,54 ± 8,89	8,90 ± 8,05	0,226
Sigara (adet/gün)	21,43 ± 9,00	15,48 ± 5,90	0,141
WBC (10 <sup>3</sup> /μl)	7,49 ± 1,87	8,05 ± 1,52	0,364
RBC (10 <sup>6</sup> /μl)	5,38 ± 0,41	5,33 ± 0,35	0,729
HG (g/dl)	15,13 ± 1,46	15,60 ± 0,86	0,314
HCT (%)	44,48 ± 2,76	45,26 ± 2,85	0,409
MCV (fl)	83,03 ± 7,23	85,69 ± 4,51	0,252
MCH (pg)	28,28 ± 3,33	29,35 ± 2,03	0,312
MCHC (g/dl)	33,96 ± 1,57	34,22 ± 1,20	0,610
PLT (10 <sup>3</sup> /μl)	242,83 ± 50,23	218,97 ± 62,95	0,199
RDW-SD (fl)	37,67 ± 2,27	39,44 ± 1,90	0,027 <sup>a</sup>
RDW-CV (%)	12,84 ± 1,53	12,78 ± 0,95	0,897
PDW (fl)	13,37 ± 1,44	13,50 ± 2,16	0,809
MPV (fl)	10,86 ± 0,71	10,94 ± 0,89	0,755
P-LCR (%)	30,68 ± 10,26	32,58 ± 7,24	0,562
PCT (%)	0,26 ± 0,06	0,24 ± 0,07	0,196
NRBC (%)	0 ± 0	0 ± 0	0,552
Nötrofil (10 <sup>3</sup> /μl)	4,37 ± 1,15	1,99 ± 1,34	0,139

**Tablo 4.4. (devam)** Koruyucu maske kullanan ve kullanmayan işçilere ait bulgular.

Parametreler	Maske kullanan (n=12)	Maske kullanmayan (n=36)	<i>p</i>
Monosit (10 <sup>3</sup> /μl)	0,45 ± 0,11	0,55 ± 0,18	0,033 <sup>a</sup>
Lenfosit (10 <sup>3</sup> /μl)	2,43 ± 0,86	2,30 ± 0,62	0,637
Eosinofil (10 <sup>3</sup> /μl)	0,20 ± 0,16	0,17 ± 0,10	0,521
Basofil (10 <sup>3</sup> /μl)	0,06 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,884
IG (10 <sup>3</sup> /μl)	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,428
CRP (mg/dl)	0,13 ± 0,12	0,14 ± 0,14	0,854
AST (U/l)	21,76 ± 2,99	21,49 ± 4,50	0,815
ALT (U/l)	23,05 ± 9,66	21,23 ± 9,81	0,579
TK (mg/dl)	168,58 ± 38,11	155,37 ± 42,15	0,323
HDL (mg/dl)	39,99 ± 5,87	39,57 ± 7,58	0,842
SOD (U/ml)	0,27 ± 0,11	0,25 ± 0,08	0,478
CAT (nmol/dk/ml)	64,91 ± 21,02	73,36 ± 17,18	0,226
GR (nmol/dk/ml)	25,42 ± 6,99	26,43 ± 5,52	0,658
GPx (nmol/dk/ml)	118,78 ± 17,81	127,09 ± 13,57	0,159
GSH (μM)	7,06 ± 3,95	9,22 ± 3,18	0,105
MDA (μM)	2,81 ± 0,71	2,52 ± 0,55	0,217
8-OHdG (ng/ml)	34,79 ± 12,11	32,30 ± 6,31	0,507
TNF-alfa (pg/ml)	18,23 ± 8,53	13,57 ± 7,04	0,106
IL-1beta (pg/ml)	8,44 ± 6,57	5,37 ± 5,37	0,162
CC16 (pg/ml)	488,18 ± 137,31	542,03 ± 153,41	0,266
DNA kuyruk yoğunluğu	1,66 ± 0,69	1,57 ± 0,70	0,686
Mikroçekirdek sıklığı	11,15 ± 4,40	8,10 ± 4,55	0,053 <sup>a</sup>

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir, <sup>a</sup>*p*<0,05; maske kullanan işçi maske kullanmayan işçi ile karşılaştırılmıştır. WBC: Beyaz kan hücresi; RBC: Kırmızı kan hücresi; HG: Hemoglobin; HCT: Hematokrit; MCV: Ortalama korpüsküler hacim; MCH: Ortalama korpüsküler hemoglobin; MCHC: Ortalama korpüsküler hemoglobin konsantrasyonu; PLT: Trombosit; RDW-SD: Trombosit dağılım genişliği-standart sapma; RDW-CV: Kırmızı hücre dağılım genişliği; PDW: Trombosit dağılım genişliği; MPV: Ortalama trombosit hacmi; P-LCR: Trombosit-büyük hücre oranı; PCT: Prokalsitonin; NRBC: Çekirdekli kırmızı kan hücresi; IG: İmmüoglobulin G; CRP: C-reaktif protein; AST: Aspartat aminotransferaz; ALT: Alanin aminotransferaz; TK: toplam kolesterol; HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein; SOD: Süperoksit dismutaz; CAT: katalaz; GR: Glutasyon redüktaz; GPx: Glutasyon peroksidaz; GSH: Glutasyon; MDA: Malondialdehit; 8-OHdG: 8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin; TNF-alfa: Tümör Nekroz Faktörü-alfa; IL-1beta: İnterlökin 1beta; CC16: Clara hücre protein 16.

## 4.2. İşyeri Ortamında Toz Ölçüm Sonuçları

İşçi grubunun çalıştığı mermer işleme tesisinin değişik bölgelerinden alınan hava örneklerinde TSP, PM<sub>10</sub>, PM<sub>2,5</sub> ve PM<sub>1</sub> düzeyleri Tablo 4.5. ve Tablo 4.6.'da verilmiştir. Sonuçlar, OSHA tarafından belirlenen sınır değer (5000 µg/m<sup>3</sup>) ile karşılaştırılmıştır.

Genel olarak, PM<sub>10</sub> seviyelerinin (2117,5 ± 1644,5 µg/m<sup>3</sup>); PM<sub>2,5</sub> (178,8 ± 140,1 µg/m<sup>3</sup>) ve PM<sub>1</sub> (91,4 ± 125,1 µg/m<sup>3</sup>) seviyelerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Ortalama TSP düzeyleri ise 2574 ± 1537 µg/m<sup>3</sup> (540,8 - 4870,4) olarak bulunmuştur.

İşçilerin ortalama temas edilen mermer tozu düzeyinin ülkemizde ve uluslararası kuruluşlarca mesleki ortamlar için izin verilen maruziyet sınır değerini (5000 µg/m<sup>3</sup>) aşmadığı belirlenmiştir. Ancak, ebatlama ve kesim birimlerinde çalışan 5 ve 18 işçinin (toplam % 47,9) sınır değere çok yakın düzeyde (TSP konsantrasyonları sırasıyla 4237 µg/m<sup>3</sup> ve 4870 µg/m<sup>3</sup>) maruz kaldığı belirlenmiştir.

Türkiye'de sadece solunabilir toz ölçümlerinin zorunlu olması nedeniyle mermer tozu oluşan çalışma alanlarının ortam havasındaki kristal silika içeriği tespit edilmemiştir.

Çalışmamızdaki işçiler bakım (% 6,25), cilalama (% 25), ebatlama (% 10,42), şekil verme (% 12,5), kesim (% 37,5), marangozluk (% 2,08) ve seleksiyon (% 6,25) gibi mermer işleme aşamasındaki farklı bölümlerde çalışmaktadırlar.

**Tablo 4.5.** Mermer işleme tesislerinde değişik bölgelerden alınan hava örneklerindeki partikül madde ölçüm değerleri.

<b>İş Bölümleri ve İşyerleri</b>	<b>TSP</b>	<b>PM<sub>10</sub></b>	<b>PM<sub>2,5</sub></b>	<b>PM<sub>1</sub></b>
	<b>(µg/m<sup>3</sup>)</b>	<b>(µg/m<sup>3</sup>)</b>	<b>(µg/m<sup>3</sup>)</b>	<b>(µg/m<sup>3</sup>)</b>
<b>Bakım</b>				
Makine atölyesi torna makine alanı	540,80	211,60	46,40	20,10
<b>Cilalama</b>				
3+12 cila makine alanı	6427,9	6247,1	135,29	46,79
2+10 cila makine girişi-I	2418,9	1947,5	136,85	47,85
2+10 cila makine girişi-II	2005,8	1208,6	313,26	51,86
Plaka cila makine alanı	1518,3	279,10	130,53	47,00
2+4 cila makine alanı	1430,5	941,50	143,50	46,98
<b>Ebatlama</b>				
6 kafalı ebatlama makine alanı	6527,9	6527,9	147,11	100,86
Ebatlama makine girişi-I	4914,7	4811,6	266,13	52,79
Ebatlama makine girişi-II	1270,4	407,00	270,80	120,86
<b>Şekil verme</b>				
Eskitme alanı 1.hol	417,90	203,10	140,13	46,70
Eskitme alanı 2.hol	4170,7	3804,5	246,71	189,47
Eskitme alanı 3.hol	2578,6	3414,8	255,40	6,68
<b>Kesim</b>				
Yarma makine alanı	6527,9	6527,9	652,79	652,79
Yarma makine (SPX 610) alanı	3401,8	2814,9	246,17	86,83
Baş kesme makine alanı-I	6527,9	6527,9	652,79	652,79
Baş kesme makine alanı-II	6527,9	6527,9	652,79	652,79
Yan kesme makine alanı	6427,9	6527,9	220,80	16,53
Köprü kesme makine (BRX-3000) alanı	4817,8	4311,4	252,86	52,79
Köprü kesme makine (KRX-1203) alanı	6527,9	6527,9	652,79	652,79
ST-1 makine alanı	3114,8	2911,7	252,79	46,83
ST-2 makine alanı	6527,9	6527,9	652,79	652,79
ST-3 makine alanı	6527,9	6527,9	652,79	652,79
ST-4 makine alanı	6527,9	6527,9	652,79	652,79

**Tablo 4.5. (devam)** Mermer işleme tesislerinde değişik bölgelerden alınan hava örneklerindeki partikül madde ölçüm değerleri.

ST-5 makine alanı	6527,9	6527,9	652,79	652,79
ST-6 makine alanı	6527,9	6527,9	652,79	652,79
42 lemalı katrak makinesi	2647,5	1950,3	317,83	47,81
Büyük kartak (KT80) makine alanı	1590,2	596,80	146,11	67,17
İnce kesim katrak makine alanı	1250,8	410,50	218,51	47,11
3'lü lemalı katrak makinesi	795,20	605,30	119,46	24,51
<b>Marangozluk</b>				
Marangozhane	1820,6	926,70	35,21	4,98
<b>Seleksiyon</b>				
Seleksiyon alanı	1401,3	673,80	126,25	45,11

TSP: Total süspande partikül, PM<sub>10</sub>: Aerodinamik çapı 10 µm'den küçük partikül madde, PM<sub>2,5</sub>: Aerodinamik çapı 2,5 µm'den küçük partikül madde; PM<sub>1</sub>: Aerodinamik çapı 1 µm'den küçük partikül madde. Ölçümler üç tekrar yapılmıştır.

**Tablo 4.6.** Mermer işleme tesislerinde ortalama partikül madde ölçüm değerleri.

	n	Maske kullanımı	TSP (µg/m <sup>3</sup> )	PM <sub>10</sub> (µg/m <sup>3</sup> )	PM <sub>2,5</sub> (µg/m <sup>3</sup> )	PM <sub>1</sub> (µg/m <sup>3</sup> )	Sınır değer (µg/m <sup>3</sup> )
<b>Bakım</b>	3	1 (33,3 %)	540,8	211,6	46,4	20,1	5000,0
<b>Cilalama</b>	12	5 (41,7 %)	2760,3	2124,8	171,9	48,1	5000,0
<b>Ebatlama</b>	5	0 (0,0 %)	4237,7	3717,2	186,1	69,5	5000,0
<b>Şekil verme</b>	6	3 (50,0 %)	2389,1	2528,2	235,8	83,3	5000,0
<b>Kesim</b>	18	3 (16,7 %)	4870,4	4640,0	450,0	368,5	5000,0
<b>Marangozluk</b>	1	0 (0,0 %)	1820,6	926,7	35,2	5,0	5000,0
<b>Seleksiyon</b>	3	0 (0,0 %)	1401,3	673,8	126,3	45,1	5000,0
<b>Ortalama</b>			<b>2574,3</b>	<b>2117,5</b>	<b>178,8</b>	<b>91,4</b>	
<b>Standart sapma</b>			<b>1537,7</b>	<b>1644,5</b>	<b>140,1</b>	<b>125,1</b>	

Maske kullanım değerleri birey sayısı (%) olarak verilmiştir. n: birey sayısı, TSP: Total süspande partikül, PM<sub>10</sub>: Aerodinamik çapı 10 µm'den küçük partikül madde, PM<sub>2,5</sub>: Aerodinamik çapı 2,5 µm'den küçük partikül madde, PM<sub>1</sub>: Aerodinamik çapı 1 µm'den küçük partikül madde. Ölçümler üç tekrar yapılmıştır.

### 4.3. Solunum Fonksiyon Testi ve Akciğer Filmine İlişkin Bulgular

Mermer tozuna maruz kalan işçilerin akciğer işlevlerini değerlendirmek için spirometrik inceleme ile zorlu soluk vermenin 1. saniyesinde dışarı atılan soluk hacmi (FEV1) ve zorlu vital kapasite (FVC) ölçülerek FEV1/FVC değerleri belirlenmiştir. Bu oranın % 75 ve daha düşük bulunması hava yolu tıkanıklığının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (180).

İşçilerin solunum fonksiyon test değerleri, solunum fonksiyon bozukluğunun tipi (obstrüktif, restriktif veya miks tip) ve akciğer radyografi değerlendirmesi Tablo 4.7'de verilmiştir. Kontrol grubu normal solunum fonksiyonlarına sahip bireylerden oluşturulmuştur.

İşçi grubunun ortalama FEV1/FVC değerleri %  $85,96 \pm 18,68$  olarak bulunmuştur. Ortalama FEV1 değerlerinin (%  $59,85 \pm 20,63$ ) ve ortalama FVC değerlerinin ( $53.58 \pm \% 20,36$ ) normalden ( $> \% 80$ ) düşük olduğu belirlenmiştir.

Solunum fonksiyon testlerinde 14 işçi (% 29,17) normal sınırlarda, 34 işçi (% 71,83) obstrüktif, restriktif veya miks tipte olduğu belirlenmiştir.

30 işçinin (% 62,5) akciğer radyografileri normal bulunurken, 14 işçide (% 37,5) asimetrik veya simetrik lenfadenopati (% 29,2) ve 4 işçide (% 8,3) retikülonodüler opasite gözlenmiştir.



**Tablo 4.7.** Mermer tozuna maruz kalan işçilerin solunum fonksiyon parametreleri ve akciğer radyografisine ilişkin bulgular.

<b>Değişkenler</b>	<b>İşçiler (n=48)</b>
<b>Solunum fonksiyon testleri</b>	
Fonksiyonel ekspiratuvar volüm (FEV1)	59,85 ± 20,63 (15-100)
Zorlu vital kapasite (FVC)	53,58 ± 20,36 (13-95)
FEV1/FVC	85,96 ± 18,68 (27-122)
<b>Solunum fonksiyon bozukluğunun tipi</b>	
Normal	14 (% 29,17)
Obstrüktif tip	1 (% 2,08)
Restriktif tip	23 (% 47,92)
Miks tip	10 (% 20,83)
<b>Akciğer radyografisi</b>	
Normal	30 (% 62,5)
Asimetrik lenfadenopati	11 (% 22,92)
Simetrik lenfadenopati	3 (% 6,25)
Retikülodüler opasite	4 (% 8,33)

Değerler ortalama ± standart sapma (aralık) olarak verilmiştir. Solunum fonksiyon bozukluğunun tipi ve akciğer radyografisi değerlendirmeleri birey sayısı (%) olarak verilmiştir.

#### **4.4. Biyokimyasal Parametrelere İlişkin Bulgular**

Mesleki olarak mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrollerin ortalama biyokimyasal parametreleri Tablo 4.8.'de verilmiştir. Toplam kolesterol düzeyleri dışında iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Toplam kolesterol düzeyleri kontrol grubunda istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

**Tablo 4.8.** Mermer tozuna maruz kalan işçi grubu ve kontrol grubunun biyokimyasal parametrelerine ilişkin bulgular.

<b>Parametreler</b>	<b>İşçiler (n= 48)</b>	<b>Kontrol (n= 41)</b>	<b>p</b>
WBC (10 <sup>3</sup> /μl)	7,91 ± 1,62 (4,87-11,07)	7,82 ± 1,69 (4,37-12,72)	0,809
RBC (10 <sup>6</sup> /μl)	5,35 ± 0,37 (4,66-6,67)	5,35 ± 0,55 (4,27-6,99)	0,942
HG (g/dl)	15,48 ± 1,05 (12,5-18)	15,35 ± 1,10 (12,1-17,7)	0,578
HCT (%)	45,06 ± 2,82 (33,8-49,2)	45,12 ± 3,13 (36,2-51,3)	0,925
MCV (fl)	85,0 ± 5,39 (64,5-93,2)	84,71 ± 5,93 (62,5-94,2)	0,813
MCH (pg)	29,07 ± 2,44 (20,2-32)	28,85 ± 2,35 (19,9-32,3)	0,672
MCHC (g/dl)	34,15 ± 1,29 (31,4-36,8)	34,03 ± 0,94 (31,8-36,5)	0,625
PLT (10 <sup>3</sup> /μl)	225,2 ± 60,29 (108-388)	242,7 ± 43,37 (142-334)	0,122
RDW-SD (fl)	38,98 ± 2,13 (34,3-43,6)	39,56 ± 2,46 (34,5-44,2)	0,242
RDW-CV (%)	12,8 ± 1,11 (11,7-17,5)	13,08 ± 1,30 (11,5-18,7)	0,286
PDW (fl)	13,47 ± 1,98 (10,1-19,6)	13,29 ± 2,01 (10,4-20,4)	0,675
MPV (fl)	10,92 ± 0,84 (9,3-12,7)	10,53 ± 1,69 (1,4-13)	0,193
P-LCR (%)	32,07 ± 8,07 (0,9-48,04)	31,62 ± 6,87 (20,7-48,3)	0,780
PCT (%)	0,24 ± 0,06 (0,13-0,44)	0,26 ± 0,05 (0,16-0,35)	0,203

**Tablo 4.8. (devam)** Mermer tozuna maruz kalan işçi grubu ve kontrol grubunun biyokimyasal parametrelerine ilişkin bulgular.

NRBC (%)	0 ± 0 (0-0,01)	0 ± 0 (0-0)	0,160
Nötrofil (10 <sup>3</sup> /µl)	4,83 ± 1,31 (2,49-8,54)	4,38 ± 1,36 (2,09-7,85)	0,119
Monosit (10 <sup>3</sup> /µl)	0,52 ± 0,17 (0,33-1,32)	0,60 ± 0,13 (0,38-0,79)	0,095
Lenfosit (10 <sup>3</sup> /µl)	2,33 ± 0,69 (1,48-4,08)	2,57 ± 0,74 (1,27-4,52)	0,115
Eosinofil (10 <sup>3</sup> /µl)	0,17 ± 0,12 (0,03-0,57)	0,21 ± 0,10 (0,03-0,48)	0,139
Basofil (10 <sup>3</sup> /µl)	0,05 ± 0,02 (0,01-0,13)	0,05 ± 0,02 (0,02-0,11)	0,826
IG (10 <sup>3</sup> /µl)	0,03 ± 0,02 (0,01-0,11)	0,03 ± 0,01 (0,01-0,07)	0,677
CRP (mg/dl)	0,14 ± 0,16 (0-0,4)	0,15 ± 0,17 (0-0,6)	0,746
AST (U/l)	21,56 ± 4,14 (13,9-33,5)	20,21 ± 5,91 (11,6-41,4)	0,225
ALT (U/l)	21,68 ± 9,71 (10,1-56,3)	25,90 ± 17,09 (9,1-89,4)	0,167
TK (mg/dl)	158,7 ± 41,19 (90,8-273,6)	176,5 ± 32,90 (113,9-273,6)	0,026 <sup>a</sup>
HDL (mg/dl)	39,67 ± 7,14 (27,5-57,5)	41,77 ± 11,38 (25,1-83,2)	0,310

Ölçümler çift tekrar yapılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (aralık) olarak verilmiştir. <sup>a</sup>*p*<0,05; işçi grubu kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. WBC: Beyaz kan hücresi; RBC: Kırmızı kan hücresi; HG: Hemogloblin; HCT: Hematokrit; MCV: Ortalama korpüsküler hacim; MCH: Ortalama korpüsküler hemogloblin; MCHC: Ortalama korpüsküler hemogloblin konsantrasyonu; PLT: Trombosit; RDW-SD: Trombosit dağılım genişliği standart sapması; RDW-CV: Kırmızı hücre dağılım genişliği; PDW: Trombosit dağılım genişliği; MPV: Ortalama trombosit hacmi; P-LCR: Trombosit-büyük hücre oranı; PCT: Prokalsitonin; NRBC: Çekirdekli kırmızı kan hücresi; IG: Immüoglobulin G; CRP: C-reaktif protein; AST: Aspartat aminotransferaz; ALT: Alanin aminotransferaz; TK: toplam kolesterol; HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein.

#### 4.5. Oksidatif Stres ve İmmün Parametrelere İlişkin Bulgular

Mesleki olarak mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol grubundaki her bir bireyin plazma SOD, CAT, GR, GPx enzim aktiviteleri ve GSH, MDA, 8-OHdG, TNF-alfa, IL-1beta, CC16 düzeyleri Tablo 4.9. ve Tablo 4.10.'da; grupların ortalama değerleri Tablo 4.11.'de verilmiştir.

İşçi grubunun SOD, CAT, GR, GPx enzim aktiviteleri ile GSH ve CC16 düzeyleri kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ). MDA, 8-OHdG, TNF-alfa ve IL-1beta seviyeleri ise, işçi grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Mermer işleme tesislerinde 10 yıldan fazla süre çalışan işçilerde, GSH ve CC16 düzeylerinin daha düşük ve MDA, TNF-alfa ve IL-1beta düzeylerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Maruziyet süresi arttıkça GSH (regresyon katsayısı ( $r$ )=-0.516) ve CC16 ( $r$ =-0.635) düzeylerinin azaldığı; MDA ( $r$ =0.406), TNF-alfa ( $r$ =0.654) ve IL-1beta ( $r$ =0.621) seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. Maruz kalma süresi ile SOD, CAT, GR, GPx ve 8-OHdG arasında korelasyon bulunmamıştır.

İşçilerde koruyucu maske kullanımı oksidatif stres ve immün parametreleri değiştirmemiştir.

**Tablo 4.9.** Mermer tozuna maruz kalan işçi grubunun oksidatif stres ve immün parametrelerine ilişkin bulgular.

No	Kod	SOD (U/ml)	CAT (nmol/ dk/ml)	GR (nmol/ dk/ml)	GPx (nmol/ dk/ml)	GSH (µM)	MDA (µM)	8-OHdG (ng/ml)	TNF-a (pg/ml)	IL-1b (pg/ml)	CC16 (pg/ml)
1	M004	0,43	76,15	22,72	129,00	15,48	2,21	26,87	8,02	2,02	622,3
2	M005	0,15	67,05	30,21	90,42	8,35	2,18	35,19	8,45	2,08	637,7
3	M006	0,14	66,84	28,47	123,02	6,97	3,25	31,75	34,88	10,05	411,8
4	M007	0,28	99,51	25,57	128,33	10,42	1,98	25,63	13,69	2,88	582,3
5	M008	0,19	79,53	25,01	130,94	7,36	1,96	29,90	8,86	2,54	499,1
6	M009	0,39	91,91	18,95	110,19	3,17	2,98	20,95	28,96	12,16	441,7
7	M010	0,16	74,29	19,36	130,18	2,98	3,15	34,38	18,15	15,93	406,0
8	M011	0,29	86,84	16,15	141,13	6,22	2,15	26,53	7,81	2,10	732,1
9	M012	0,16	60,08	26,69	121,07	8,33	2,56	38,22	8,23	1,97	980,0
10	M015	0,38	63,87	29,10	125,47	13,35	2,8	36,40	9,33	2,31	500,6
11	M016	0,16	48,65	30,05	122,19	4,13	3,42	49,32	22,82	4,57	300,8
12	M017	0,26	85,49	22,69	130,98	15,91	2,12	26,41	20,29	23,69	668,9
13	M018	0,47	77,43	26,69	127,12	8,56	1,86	24,63	7,99	1,91	691,8
14	M019	0,23	74,86	30,72	137,69	12,98	1,96	30,21	12,18	13,83	714,2
15	M020	0,20	62,15	26,44	137,15	6,43	2,25	35,28	38,69	25,37	371,1
16	M021	0,31	72,29	17,47	131,71	6,47	2,05	31,26	17,94	4,17	445,1
17	M022	0,28	57,66	26,64	142,72	14,10	2,04	32,47	11,11	2,45	430,7
18	M023	0,34	83,09	27,46	109,35	10,00	2,63	27,99	11,14	7,98	448,8
19	M024	0,18	62,22	20,65	112,16	11,72	2,86	37,51	24,93	4,19	664,2
20	M025	0,37	78,92	34,84	113,31	8,41	1,89	26,25	9,82	2,16	567,9
21	M026	0,12	83,23	28,12	129,22	11,38	1,77	24,70	10,38	8,85	348,0
22	M027	0,15	72,12	26,64	131,07	7,94	2,45	37,62	12,98	1,93	498,9
23	M028	0,13	84,45	38,82	128,52	16,04	2,13	27,12	22,81	3,06	354,2
24	M029	0,21	90,13	22,57	127,51	8,84	2,28	30,62	11,79	2,46	618,9
25	M030	0,20	48,42	32,14	124,26	8,75	2,89	37,73	9,48	2,12	665,8
26	M031	0,23	47,74	37,24	161,89	9,06	3,16	38,05	10,83	10,69	447,4
27	M032	0,32	81,27	30,46	100,03	13,23	2,47	29,84	15,67	2,03	483,0
28	M033	0,28	74,04	26,79	131,45	5,96	3,12	35,35	18,30	9,91	511,1
29	M034	0,18	46,30	33,26	128,11	3,43	3,96	45,05	18,52	1,88	531,1
30	M035	0,34	57,26	25,72	128,24	11,35	2,17	20,65	11,30	6,66	585,1
31	M037	0,17	32,94	20,83	146,29	7,17	3,43	44,72	8,12	1,70	584,3
32	M038	0,25	77,41	22,97	136,80	13,88	2,26	32,78	17,35	10,40	451,2

**Tablo 4.9. (devam)** Mermer tozuna maruz kalan işçi grubunun oksidatif stres ve immün parametrelerine ilişkin bulgular.

33	M039	0,17	91,91	27,81	153,99	8,64	2,94	36,26	11,01	2,28	757,8
34	M040	0,32	55,48	35,76	135,50	11,61	3,27	41,49	8,33	2,99	565,1
35	M041	0,12	33,19	20,24	91,82	3,56	3,52	50,23	34,37	13,08	393,3
36	M042	0,37	97,05	31,28	96,21	8,76	2,76	30,50	8,32	2,13	697,6
37	M043	0,23	81,71	32,04	139,95	7,03	2,25	29,43	10,04	2,52	704,4
38	M044	0,19	52,03	27,46	132,50	4,85	3,21	45,59	18,29	4,67	259,2
39	M045	0,20	87,50	26,95	105,22	5,42	2,56	27,48	18,92	2,76	480,6
40	M046	0,30	74,03	21,34	112,19	6,98	1,53	21,83	13,27	2,31	803,4
41	M047	0,27	44,74	23,64	117,73	9,07	3,16	42,63	18,37	16,36	302,6
42	M048	0,18	113,85	10,46	129,51	8,48	1,48	28,43	8,17	1,70	510,3
43	M049	0,35	86,56	31,02	129,51	5,30	2,98	22,16	7,93	2,85	411,0
44	M050	0,27	38,78	23,79	100,35	3,43	3,27	52,36	8,39	3,69	391,4
45	M051	0,41	85,16	23,64	128,33	9,89	3,16	32,27	11,15	5,47	495,2
46	M052	0,25	45,50	32,86	133,01	12,01	3,45	41,49	7,93	2,51	643,7
47	M053	0,35	82,01	21,65	108,85	6,22	2,75	27,45	18,77	12,00	298,2
48	M054	0,29	86,33	15,03	118,46	7,15	1,96	19,29	13,05	11,32	461,3

Ölçümler iki kez tekrar edilmiştir. SOD: Süperoksit dismutaz; CAT: katalaz; GR: Glutasyon redüktaz; GPx: Glutasyon peroksidaz; GSH: Glutasyon; MDA: Malondialdehit; 8-OHdG: 8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin; TNF-a: Tümör Nekroz Faktörü-alfa; IL-1b: İnterlökin 1beta; CC16: Clara hücre protein 16.

**Tablo 4.10.** Kontrol grubunun oksidatif stres ve immün parametrelerine ilişkin bulgular.

No	Kod	SOD (U/ml)	CAT (nmol/ dk/ml)	GR (nmol/ dk/ml)	GPx (nmol/ dk/ml)	GSH (µM)	MDA (µM)	8-OHdG (ng/ml)	TNF-a (pg/ml)	IL-1b (pg/ml)	CC16 (pg/ml)
1	K001	0,22	99,67	44,01	159,01	9,60	2,12	31,90	7,87	10,24	610,8
2	K002	0,42	125,38	44,32	98,88	13,62	1,26	18,66	12,45	2,07	674,0
3	K003	0,49	95,48	47,91	142,03	5,21	1,75	29,14	8,26	2,37	686,8
4	K004	0,43	113,40	33,24	163,93	6,67	1,88	29,21	11,87	5,77	1121,0
5	K005	0,27	103,65	53,03	174,18	13,31	1,28	19,50	8,82	5,74	1248,5
6	K006	0,33	88,82	79,46	140,88	15,56	1,54	17,39	15,30	7,92	1131,0
7	K007	0,58	103,19	32,09	112,83	17,82	1,86	17,59	8,33	2,28	1164,8
8	K008	0,47	80,22	27,35	106,27	9,67	2,11	26,97	8,79	2,10	663,5
9	K009	0,29	123,41	51,42	154,79	22,95	1,21	16,50	9,07	2,52	1124,8
10	K010	0,46	115,93	40,95	107,48	9,85	1,29	19,33	10,14	2,10	1059,5
11	K011	0,55	116,66	44,70	126,17	11,63	1,57	19,33	17,86	2,25	1032,8
12	K012	0,37	109,85	52,42	133,20	13,86	1,62	21,85	8,89	4,17	507,5

**Tablo 4.10. (devam)** Kontrol grubunun oksidatif stres ve immün parametrelerine ilişkin bulgular.

13	K013	0,28	74,91	40,34	131,42	7,51	2,26	42,16	8,75	2,28	1019,2
14	K014	0,30	90,81	45,16	128,79	20,35	1,68	17,30	10,06	2,30	711,0
15	K015	0,48	113,55	30,33	148,74	11,62	1,93	24,68	8,68	2,98	711,7
16	K016	0,30	91,41	30,87	141,86	12,72	1,83	14,31	8,11	4,04	1017,0
17	K017	0,30	97,72	26,51	132,86	13,96	1,46	18,62	8,14	3,62	877,3
18	K018	0,44	92,40	37,52	147,78	10,31	1,77	21,03	8,18	2,56	598,8
19	K019	0,33	90,67	38,43	116,65	8,46	1,84	21,42	14,13	2,39	603,5
20	K020	0,38	120,82	35,22	97,71	9,96	2,25	27,38	10,69	4,39	717,0
21	K021	0,46	76,29	40,42	134,57	15,69	2,42	26,47	10,92	1,93	708,3
22	K023	0,34	98,01	23,15	110,06	16,53	2,38	29,24	9,19	4,58	615,8
23	K024	0,36	105,82	31,71	148,20	23,59	1,76	19,32	9,24	4,59	1401,2
24	K025	0,39	107,39	18,34	125,09	15,88	1,64	17,41	10,77	2,62	869,8
25	K026	0,22	90,15	22,69	110,63	9,63	2,18	25,14	16,63	3,36	958,3
26	K027	0,41	93,32	19,10	98,92	11,70	2,24	29,12	10,04	2,41	831,7
27	K028	0,29	115,16	28,04	138,23	17,39	2,2	25,08	11,77	4,48	996,8
28	K029	0,36	77,60	21,78	175,45	13,01	1,96	24,50	10,94	2,73	719,3
29	K030	0,38	84,00	41,36	139,92	9,36	3,45	35,65	8,87	3,57	900,2
30	K031	0,67	121,19	30,41	137,24	13,28	1,25	8,18	9,65	8,77	1085,8
31	K032	0,29	85,83	17,42	135,50	13,64	1,96	17,34	10,92	1,89	1144,7
32	K033	0,37	103,33	26,51	135,94	9,20	3,21	30,36	8,67	2,02	1137,2
33	K034	0,41	116,62	25,44	298,40	10,92	3,16	28,09	11,81	1,96	693,7
34	K035	0,40	96,58	24,14	140,88	10,57	2,26	22,81	15,27	2,08	944,8
35	K036	0,30	112,39	27,05	137,85	13,80	2,32	22,29	12,49	2,17	507,8
36	K037	0,38	87,52	24,07	102,67	5,33	3,12	37,44	8,60	1,89	625,0
37	K038	0,34	92,33	30,33	143,01	17,75	1,93	17,20	10,61	3,06	1192,5
38	K039	0,47	80,53	24,55	149,44	4,48	3,26	37,22	15,89	1,95	657,2
39	K040	0,51	88,90	44,75	128,33	10,24	2,35	26,37	13,75	3,63	1080,5
40	K041	0,42	90,17	29,72	136,13	9,02	2,33	23,61	8,06	2,01	1198,2
41	K042	0,34	94,89	33,54	125,72	14,01	2,79	31,94	8,77	4,78	1391,5

Ölçümler iki kez tekrar edilmiştir. SOD: Süperoksit dismutaz; CAT: katalaz; GR: Glutasyon redüktaz; GPx: Glutasyon peroksidaz; GSH: Glutasyon; MDA: Malondialdehit; 8-OHdG: 8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin; TNF-a: Tümör Nekroz Faktörü-alfa; IL-1b: İnterlökin 1beta; CC16: Clara hücre protein 16.

**Tablo 4.11.** Mermer tozuna maruz kalan işçi grubu ve kontrol grubunun oksidatif stres ve immün parametrelerine ilişkin bulgular.

Parametre	İşçi (n=48)	Kontrol (n=41)	p
SOD (U/ml)	0,26 ± 0,09 (0,12-0,47)	0,39 ± 0,10 (0,22-0,67)	<0,001 <sup>a</sup>
CAT (nmol/dk/ml)	71,25 ± 18,35 (32,94-113,85)	99,17 ± 13,98 (74,91-125,38)	<0,001 <sup>a</sup>
GR (nmol/dk/ml)	26,17 ± 5,86 (15,03-38,82)	34,63 ± 12,08 (17,42-79,46)	<0,001 <sup>a</sup>
GPx (nmol/dk/ml)	125,0 ± 14,99 (90,42-161,89)	137,0 ± 32,23 (97,71-298,40)	0,033 <sup>a</sup>
GSH (µM)	8,68 ± 3,47 (2,98-16,04)	12,43 ± 4,38 (5,21-23,59)	<0,001 <sup>a</sup>
MDA (µM)	2,60 ± 0,60 (1,48-3,96)	2,07 ± 0,58 (1,21-3,45)	<0,001 <sup>a</sup>
8-OHdG (ng/ml)	32,92 ± 8,07 (19,29-52,36)	24,12 ± 7,03 (8,18-42,16)	<0,001 <sup>a</sup>
TNF-alfa (pg/ml)	14,73 ± 7,62 (7,81-38,69)	10,66 ± 2,63 (7,87-17,86)	<0,001 <sup>a</sup>
IL-1beta (pg/ml)	6,14 ± 5,78 (1,70-25,37)	3,43 ± 1,93 (1,89-10,24)	0,003 <sup>a</sup>
CC16 (pg/ml)	528,6 ± 150,0 (259,2-980)	901,0 ± 247,0 (598,8-1401,2)	<0,001 <sup>a</sup>

Ölçümler iki kez tekrar edilmiştir. Değerler ortalama ± standart sapma (aralık) olarak verilmiştir. <sup>a</sup>p <0,05, işçi grubu kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. SOD: Süperoksit dismutaz; CAT: katalaz; GR: Glutasyon redüktaz; GPx: Glutasyon peroksidaz; GSH: Glutasyon; MDA: Malondialdehit; 8-OHdG: 8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin; TNF-alfa: Tümör Nekroz Faktörü-alfa; IL-1beta: İnterlökin 1beta; CC16: Clara hücre protein 16.

#### 4.5.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesine İlişkin Bulgular

Mesleki olarak mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrollerin plazma SOD aktiviteleri Tablo 4.12.'de gösterilmiştir. İşçilerin plazma SOD aktiviteleri, kontrol grubundaki bireylerden istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur (p<0,05).

Genç yaş (19-40 yaş) grubundaki işçilerin plazma SOD aktiviteleri aynı yaş



grubundaki kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Orta yaş (41-60 yaş) grubundaki işçilerin plazma SOD aktiviteleri aynı yaş grubundaki kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Sigara içen işçilerin plazma SOD aktiviteleri sigara içen kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Sigara içmeyen işçilerin plazma SOD aktiviteleri sigara içmeyen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

İşçi ve kontrol grubunda yaşların ve sigara kullanım durumlarının plazma SOD aktivitelerine olan etkisi incelendiğinde, yaş artışı ve sigara kullanımı ile SOD aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

İşçiler çalışma sürelerine (kısa (0,5-4,5 yıl), orta (5-15 yıl) ve uzun (16-35 yıl)) göre gruplandırılarak plazma SOD aktivitesine etkisi incelenmiştir. Plazma SOD aktiviteleri ile çalışma süreleri arasında korelasyon bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Koruyucu maske kullanımının işçilerin plazma SOD aktivitelerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.12.** Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının plazmada SOD aktivitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.

Değişkenler	Süperoksit Dismutaz Aktivitesi	
	İşçi Grubu (n= 48)	Kontrol Grubu (n= 41)
	0,26 ± 0,09 (0,12-0,47)	0,39 ± 0,10 (0,22-0,67) <sup>a</sup>
<b>Yaş</b>		
Genç Yaş (19-40)	0,25 ± 0,10 (0,12-0,47)	0,38 ± 0,10 (0,22-0,67) <sup>a</sup>
Orta Yaş (41-60)	0,27 ± 0,08 (0,15-0,39)	0,40 ± 0,08 (0,29-0,55) <sup>a</sup>
<b>Sigara Kullanımı</b>		
Evet	0,26 ± 0,10 (0,12-0,47)	0,40 ± 0,11 (0,27-0,67) <sup>a</sup>
Hayır	0,25 ± 0,08 (0,12-0,43)	0,38 ± 0,09 (0,22-0,55) <sup>a</sup>
<b>Çalışma Süresi (yıl)</b>		-
Kısa süre (0,5-4,5)	0,26 ± 0,10 (0,13-0,47)	
Orta süre (5-15)	0,26 ± 0,08 (0,12-0,41)	
Uzun süre (16-35)	0,24 ± 0,09 (0,12-0,39)	
<b>Maske Kullanımı</b>		-
Evet	0,27 ± 0,11 (0,12-0,47)	
Hayır	0,25 ± 0,08 (0,12-0,43)	

Ölçümler iki kez tekrar edilmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (aralık) olarak verilmiştir. <sup>a</sup>p <0.05, işçi grubu kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

#### 4.5.2. Katalaz Aktivitesine İlişkin Bulgular

Mesleki olarak mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrollerin plazma CAT aktiviteleri Tablo 4.13.'te gösterilmiştir. İşçilerin plazma CAT aktiviteleri, kontrol grubundaki bireylerin plazma CAT aktivitelerinden istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Genç yaş (19-40 yaş) grubundaki işçilerin plazma CAT aktiviteleri aynı yaş grubundaki kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Orta yaş (41-60 yaş) grubundaki işçilerin plazma CAT aktiviteleri aynı yaş grubundaki kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Sigara içen işçilerin plazma CAT aktiviteleri sigara içen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Sigara içmeyen işçilerin plazma CAT aktiviteleri sigara içmeyen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

İşçi grubunda yaş artışı ve sigara kullanımı ile CAT aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Kontrol grubunda ise yaş artışı ile enzim aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamakla birlikte ( $p>0,05$ ), beklenmeyen bir şekilde sigara içmeyen kontrol grubundaki bireylerin CAT aktivitesi sigara içen kontrol grubundaki bireylerden istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

İşçiler çalışma sürelerine göre (kısa (0,5-4,5 yıl), orta (5-15 yıl) ve uzun (16-35 yıl)) gruplandırılarak plazma CAT aktivitesine etkisi incelenmiştir. Plazma CAT aktiviteleri ile çalışma süreleri arasında korelasyon bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Koruyucu maske kullanımının işçilerin plazma CAT aktivitelerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.13.** Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının plazmada CAT enzim aktivitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.

Değişkenler	Katalaz Aktivitesi	
	İşçi Grubu (n= 48)	Kontrol Grubu (n= 41)
	71,25 ± 18,35 (32,94-113,85)	99,17 ± 13,98 (74,91-125,38) <sup>a</sup>
<b>Yaş</b>		
Genç Yaş (19-40)	71,06 ± 18,68 (32,94-113,85)	97,75 ± 13,90 (74,91-123,41) <sup>a</sup>
Orta Yaş (41-60)	71,63 ± 18,27 (38,78-99,51)	101,62 ± 14,24 (80,53-125,38) <sup>a</sup>
<b>Sigara Kullanımı</b>		
Evet	74,07 ± 19,18 (32,94-113,85)	104,43±11,16 (85,83-125,38) <sup>a</sup>
Hayır	67,30 ± 16,80 (38,78-99,51)	95,81 ± 14,75 (74,91-123,41) <sup>a,b</sup>
<b>Çalışma Süresi (yıl)</b>		-
Kısa süre (0,5-4,5)	79,00 ± 15,84 (48,42-113,85)	
Orta süre (5-15)	68,23 ± 18,83 (32,95-97,05)	
Uzun süre (16-35)	66,58 ± 18,81 (33,19-91,91)	
<b>Maske Kullanımı</b>		-
Evet	64,91 ± 21,02 (33,19-91,91)	
Hayır	73,36 ± 17,18 (32,94-113,85)	

Ölçümler iki kez tekrar edilmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (aralık) olarak verilmiştir. <sup>a</sup>*p* <0,05, işçi grubu kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır; <sup>b</sup>*p* <0,05, sigara içen bireyler sigara içmeyen bireyler ile karşılaştırılmıştır.

### 4.5.3. Glutasyon Redüktaz Aktivitesine İlişkin Bulgular

Mesleki olarak mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrollerin plazma GR aktiviteleri Tablo 4.14.'te gösterilmiştir.

İşçilerin plazma GR aktiviteleri, kontrol grubundaki bireylerin plazma GR aktivitelerinden istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Genç yaş (19-40 yaş) grubundaki işçilerin plazma GR aktiviteleri, aynı yaş grubundaki kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Orta yaş (41-60 yaş) grubundaki işçilerde de benzer şekilde plazma GR aktiviteleri aynı yaş grubundaki kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Sigara içen işçilerin plazma GR aktiviteleri sigara içen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Sigara içmeyen işçilerin plazma GR enzim aktiviteleri sigara içmeyen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

İşçi ve kontrol grubunda yaşların ve sigara kullanım durumlarının plazma GR aktivitelerine olan etkisi incelendiğinde, yaş artışı ve sigara kullanımı ile GR aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

İşçiler çalışma sürelerine göre (kısa (0,5-4,5 yıl), orta (5-15 yıl) ve uzun (16-35 yıl)) gruplandırılarak plazma GR aktivitelerine etkisi incelenmiştir. İşçilerin plazma GR aktiviteleri arasında korelasyon bulunmamıştır. ( $p> 0,05$ ).

Koruyucu maske kullanımının işçilerin plazma GR aktivitelerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir ( $p> 0,05$ ).

**Tablo 4.14.** Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının plazmada GR aktivitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.

Değişkenler	Glutasyon Redüktaz Aktivitesi	
	İşçi Grubu (n= 48)	Kontrol Grubu (n= 41)
	26,17 ± 5,86 (15,03-38,82)	34,63 ± 12,08 (17,42-79,46) <sup>a</sup>
<b>Yaş</b>		
Genç Yaş (19-40)	26,56 ± 5,95 (10,46-38,82)	35,40 ± 13,37 (19,10-79,46) <sup>a</sup>
Orta Yaş (41-60)	25,41 ± 5,76 (15,03-35,76)	33,29 ± 9,75 (17,42-47,91) <sup>a</sup>
<b>Sigara Kullanımı</b>		
Evet	25,01 ± 6,15 (10,46-38,82)	30,87 ± 9,71 (17,42-53,03) <sup>a</sup>
Hayır	27,81 ± 5,12 (15,03-37,24)	37,04 ± 13,00 (21,78-79,46) <sup>a</sup>
<b>Çalışma Süresi (yıl)</b>		-
Kısa süre (0,5-4,5)	25,38 ± 7,11 (10,46-38,82)	
Orta süre (5-15)	28,56 ± 4,24 (20,83-37,24)	
Uzun süre (16-35)	21,87 ± 4,50 (15,03-28,47)	
<b>Maske Kullanımı</b>		-
Evet	25,42 ± 6,99 (15,03-37,24)	
Hayır	26,43 ± 5,52 (10,46-38,82)	

Ölçümler iki kez tekrar edilmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (aralık) olarak verilmiştir. <sup>a</sup>p <0.05, işçi grubu kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

#### 4.5.4. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesine İlişkin Bulgular

Mesleki mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrollerin plazma GPx aktiviteleri Tablo 4.15.'te gösterilmiştir. İşçilerin plazma GPx aktiviteleri, kontrol grubundaki bireylerin plazma GPx aktivitelerinden istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Genç yaş (19-40 yaş) grubundaki işçilerin plazma GPx aktiviteleri aynı yaş grubundaki kontrole kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Orta yaş (41-60 yaş) grubundaki işçilerin plazma GPx aktiviteleri ile aynı yaş grubundaki kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Sigara içen işçilerin plazma GPx aktiviteleri sigara içen kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Sigara içmeyen işçilerin plazma GPx aktiviteleri sigara içmeyen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

İşçi ve kontrol grubunda yaşların ve sigara kullanım durumlarının plazma GPx aktivitelerine olan etkisi incelendiğinde, yaş artışı ve sigara kullanımı ile enzim aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

İşçiler çalışma sürelerine göre (kısa (0,5-4,5 yıl), orta (5-15 yıl) ve uzun (16-35 yıl)) gruplandırılarak plazma GPx aktivitelerine etkisi incelenmiştir. İşçilerin plazma GPx aktiviteleri arasında korelasyon bulunmamıştır. ( $p>0,05$ ).

Koruyucu maske kullanımının işçilerin plazma GPx aktivitelerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.15.** Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının plazmada GPx aktivitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.

Değişkenler	Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi	
	İşçi Grubu (n= 48)	Kontrol Grubu (n= 41)
	125,01 ± 14,99 (90,42-161,89)	137,02± 32,23 (97,71-298,40) <sup>a</sup>
<b>Yaş</b>		
Genç Yaş (19-40)	125,72 ± 14,63 (91,82-161,89)	142,17 ± 37,34 (98,92-298,40) <sup>a</sup>
Orta Yaş (41-60)	123,61 ± 16,07 (90,42-153,99)	128,09 ± 18,54 (97,71-149,44)
<b>Sigara Kullanımı</b>		
Evet	122,71 ± 14,35 (91,82-146,29)	129,81 ± 19,83 (98,88-174,18)
Hayır	128,24 ± 15,63 (90,42-161,89)	141,63 ± 37,80 (97,71-298,40)
<b>Çalışma Süresi (yıl)</b>		-
Kısa süre (0,5-4,5)	123,74 ± 10,30 (100,03-141,13)	
Orta süre (5-15)	127,95 ± 17,70 (90,42-161,89)	
Uzun süre (16-35)	120,16 ± 13,83 (91,82-137,15)	
<b>Maske Kullanımı</b>		-
Evet	118,78 ± 17,81 (91,82-161,89)	
Hayır	127,09 ± 13,57 (90,42-153,99)	

Ölçümler iki kez tekrar edilmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (aralık) olarak verilmiştir. <sup>a</sup>p <0.05, işçi grubu kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.



#### 4.5.5. Glutasyon Düzeylerine İlişkin Bulgular

Mesleki mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrollerin plazma GSH düzeyleri Tablo 4.16.'da gösterilmiştir. İşçilerin plazma GSH düzeyleri, kontrol grubundaki bireylerin plazma GSH düzeylerinden istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Genç yaş (19-40 yaş) grubundaki işçilerin plazma GSH düzeyleri aynı yaş grubundaki kontrol grubuna kıyasla ve ayrıca orta yaş (41-60 yaş) grubundaki işçilerin plazma GSH düzeyleri aynı yaş grubundaki kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Sigara içen işçilerin plazma GSH düzeyleri sigara içen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Sigara içmeyen işçilerin plazma GSH düzeyleri sigara içmeyen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p <0,05$ ).

İşçi ve kontrol grubunda yaşların ve sigara kullanım durumlarının plazma GSH düzeylerine olan etkisi incelendiğinde, yaş artışı ve sigara kullanımı ile GSH düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

İşçiler çalışma sürelerine göre (kısa (0,5-4,5 yıl), orta (5-15 yıl) ve uzun (16-35 yıl)) gruplandırılarak plazma GSH düzeylerine etkisi incelenmiştir. Uzun süreli çalışan işçilerin plazma GSH düzeyleri diğer işçiler ile kıyaslandığında istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Düşük ve orta süre çalışan işçilerin plazma GSH düzeyleri arasında korelasyon bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Koruyucu maske kullanımının işçilerin plazma GSH düzeylerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.16.** Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının plazmada GSH düzeylerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.

Değişkenler	Glutasyon Düzeyleri	
	İşçi Grubu (n= 48)	Kontrol Grubu (n= 41)
	8,68 ± 3,47 (2,98-16,04)	12,43 ± 4,38 (5,21-23,59) <sup>a</sup>
<b>Yaş</b>		
Genç Yaş (19-40)	9,33 ± 3,53 (3,43-16,04)	12,31 ± 3,76 (6,67-22,95) <sup>a</sup>
Orta Yaş (41-60)	7,40 ± 3,06 (2,98-12,01)	12,64 ± 5,42 (4,48-23,59) <sup>a</sup>
<b>Sigara Kullanımı</b>		
Evet	8,54 ± 3,59 (2,98-16,04)	13,39 ± 3,64 (8,46-23,59) <sup>a</sup>
Hayır	8,88 ± 3,39 (3,43-15,48)	11,81 ± 4,75 (4,48-22,95) <sup>a</sup>
<b>Çalışma Süresi (yıl)</b>		-
Kısa süre (0,5-4,5)	9,79 ± 3,01 (6,22-16,04)	
Orta süre (5-15)	9,27 ± 3,62 (3,43-15,91)	
Uzun süre (16-35)	5,69 ± 1,99 (2,98-9,07) <sup>b</sup>	
<b>Maske Kullanımı</b>		-
Evet	7,06 ± 3,95 (2,98-16,04)	
Hayır	9,22 ± 3,18 (3,17-15,91)	

Ölçümler iki kez tekrar edilmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (aralık) olarak verilmiştir. <sup>a</sup>*p* <0,05; işçi grubu kontrol grubu ile ve <sup>b</sup>*p* <0,05; uzun çalışma süreli işçiler, kısa ve orta çalışma süreli işçiler ile karşılaştırılmıştır.

#### 4.5.6. Malondialdehit Düzeylerine İlişkin Bulgular

Mesleki mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrollerin plazma MDA düzeyleri Tablo 4.17.'de gösterilmiştir. İşçilerin plazma MDA düzeyleri, kontrol grubundaki bireylerin plazma MDA düzeylerinden istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Genç yaş (19-40 yaş) grubundaki işçilerin plazma MDA düzeyleri aynı yaş grubundaki kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Orta yaş (41-60 yaş) grubundaki işçilerin plazma MDA düzeyleri aynı yaş grubundaki kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Sigara içen işçilerin plazma MDA düzeyleri sigara içen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Sigara içmeyen işçilerin plazma MDA düzeyleri sigara içmeyen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

İşçilerde ve kontrol grubundaki bireylerde yaşların ve sigara kullanım durumlarının plazma MDA düzeylerine olan etkisi incelendiğinde, yaş artışı ve sigara kullanımı ile plazma MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

İşçiler çalışma sürelerine göre (kısa (0,5-4,5 yıl), orta (5-15 yıl) ve uzun (16-35 yıl)) gruplandırılarak plazma MDA düzeylerine etkisi incelenmiştir. Uzun süreli çalışan işçilerin plazma MDA düzeyleri diğer işçiler ile kıyaslandığında istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Düşük ve orta süre çalışan işçilerin plazma MDA düzeyleri arasında korelasyon bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Koruyucu maske kullanımının işçilerin plazma MDA düzeylerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.17.** Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının plazmada MDA düzeylerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.

Değişkenler	Malondialdehit Düzeyleri	
	İşçi Grubu (n= 48)	Kontrol Grubu (n= 41)
	2,60 ± 0,60 (1,48-3,96)	2,07 ± 0,58 (1,21-3,45) <sup>a</sup>
<b>Yaş</b>		
Genç Yaş (19-40)	2,54 ± 0,63 (1,48-3,96)	2,10 ± 0,57 (1,21-3,45) <sup>a</sup>
Orta Yaş (41-60)	2,70 ± 0,53 (1,96-3,45)	2,00 ± 0,61 (1,26-3,26) <sup>a</sup>
<b>Sigara Kullanımı</b>		
Evet	2,54 ± 0,60 (1,48-3,52)	1,90 ± 0,57 (1,25-3,21) <sup>a</sup>
Hayır	2,67 ± 0,59 (1,77-3,96)	2,17 ± 0,57 (1,21-3,45) <sup>a</sup>
<b>Çalışma Süresi (yıl)</b>		-
Kısa süre (0,5-4,5)	2,18 ± 0,42 (1,48-2,89)	
Orta süre (5-15)	2,77 ± 0,59 (1,77-3,96)	
Uzun süre (16-35)	2,83 ± 0,55 (1,96-3,52) <sup>b</sup>	
<b>Maske Kullanımı</b>		-
Evet	2,81 ± 0,71 (1,86-3,96)	
Hayır	2,52 ± 0,55 (1,48-3,45)	

Ölçümler iki kez tekrar edilmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (aralık) olarak verilmiştir. <sup>a</sup>*p* <0,05; işçi grubu kontrol grubu ile ve <sup>b</sup>*p* <0,05; uzun çalışma süreli işçiler, kısa ve orta çalışma süreli işçiler ile karşılaştırılmıştır.

#### 4.5.7. 8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin Düzeylerine İlişkin Bulgular

Mesleki olarak mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrollerin plazma 8-OHdG düzeyleri Tablo 4.18'de gösterilmiştir. İşçilerin plazma 8-OHdG düzeyleri, kontrol grubundaki bireylerden istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Genç yaş (19-40 yaş) grubundaki işçilerin plazma 8-OHdG düzeyleri aynı yaş grubundaki kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Orta yaş (41-60 yaş) grubundaki işçilerin plazma 8-OHdG düzeyleri aynı yaş grubundaki kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Sigara içen işçilerin plazma 8-OHdG düzeyleri sigara içen kontrol grubuna kıyasla ve ayrıca sigara içmeyen işçilerin plazma 8-OHdG düzeyleri sigara içmeyen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

İşçilerde yaş artışı ve sigara kullanımı ile 8-OHdG düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Kontrol grubunda ise yaş artışı ile 8-OHdG düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamakla birlikte ( $p>0,05$ ), sigara içmeyen kontrol grubundaki bireylerin 8-OHdG düzeyleri sigara içen kontrol grubundaki bireylerden istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

İşçiler çalışma sürelerine göre (kısa (0,5-4,5 yıl), orta (5-15 yıl) ve uzun (16-35 yıl)) gruplandırılarak plazma 8-OHdG düzeyleri incelenmiştir. İşçilerin plazma 8-OHdG düzeyleri arasında korelasyon bulunmamıştır. ( $p>0,05$ ).

Koruyucu maske kullanımının işçilerin plazma 8-OHdG düzeylerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.18.** Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının plazmada 8-OHdG düzeylerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.

Değişkenler	8-OHdG Düzeyleri	
	İşçi Grubu (n= 48)	Kontrol Grubu (n= 41)
	32,92 ± 8,07 (19,29-52,36)	24,12 ± 7,03 (8,18-42,16) <sup>a</sup>
<b>Yaş</b>		
Genç Yaş (19-40)	33,21 ± 7,28 (21,83-50,23)	24,65 ± 6,76 (8,18-42,16) <sup>a</sup>
Orta Yaş (41-60)	32,34 ± 9,69 (19,29-52,36)	23,20 ± 7,63 (14,31-37,44) <sup>a</sup>
<b>Sigara Kullanımı</b>		
Evet	32,03 ± 7,53 (20,95-50,23)	21,16 ± 5,85 (8,18-31,94) <sup>a</sup>
Hayır	34,17 ± 8,82 (19,29-52,36)	26,02 ± 7,17 (14,31-42,16) <sup>a,b</sup>
<b>Çalışma Süresi (yıl)</b>		-
Kısa süre (0,5-4,5)	29,91 ± 5,37 (21,83-38,22)	
Orta süre (5-15)	34,47 ± 8,37 (20,65-52,36)	
Uzun süre (16-35)	33,88 ± 10,09 (19,29-50,23)	
<b>Maske Kullanımı</b>		-
Evet	34,79 ± 12,11 (19,29-52,36)	
Hayır	32,30 ± 6,31 (20,65-45,59)	

Ölçümler iki kez tekrar edilmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (aralık) olarak verilmiştir. <sup>a</sup>*p* <0,05; işçi grubu kontrol grubu ile ve <sup>b</sup>*p* <0,05; sigara içen bireyler sigara içmeyen bireyler ile karşılaştırılmıştır.

#### 4.5.8. Tümör Nekroz Faktör-alfa Düzeylerine İlişkin Bulgular

Mesleki olarak mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrollerin plazma TNF-alfa düzeyleri Tablo 4.19’da gösterilmiştir. İşçilerin plazma TNF-alfa düzeyleri, kontrol grubundaki bireylerin plazma TNF-alfa düzeylerinden istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Genç yaş (19-40 yaş) grubundaki işçilerin plazma TNF-alfa düzeyleri aynı yaş grubundaki kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Orta yaş (41-60 yaş) grubundaki işçilerin plazma TNF-alfa düzeyleri aynı yaş grubundaki kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Sigara içen işçilerin plazma TNF-alfa düzeyleri sigara içen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Sigara içmeyen işçilerin plazma TNF-alfa düzeyleri sigara içmeyen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

İşçi ve kontrol grubunda yaşların ve sigara kullanım durumlarının plazma TNF-alfa düzeylerine olan etkisi incelendiğinde, yaş artışı ve sigara kullanımı ile TNF-alfa düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

İşçiler çalışma sürelerine göre (kısa (0,5-4,5 yıl), orta (5-15 yıl) ve uzun (16-35 yıl)) gruplandırılarak lenfositlerdeki DNA hasarına etkisi de incelenmiştir. Uzun süreli çalışan işçilerin plazma TNF-alfa düzeyleri diğer işçiler ile kıyaslandığında istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Düşük ve orta süre çalışan işçilerin plazma TNF-alfa düzeyleri arasında korelasyon bulunmamıştır. ( $p>0,05$ ).

Koruyucu maske kullanımının plazma TNF-alfa düzeylerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.19.** Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının plazmada TNF-alfa düzeylerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.

Değişkenler	Tümör Nekroz Faktör-alfa Düzeyleri	
	İşçi Grubu (n= 48)	Kontrol Grubu (n= 41)
	14,73 ± 7,62 (7,81-38,69)	10,66 ± 2,63 (7,87-17,86) <sup>a</sup>
<b>Yaş</b>		
Genç Yaş (19-40)	14,53 ± 7,29 (7,81-34,88)	10,62 ± 2,58 (7,87-16,63) <sup>a</sup>
Orta Yaş (41-60)	15,13 ± 8,49 (7,93-38,69)	10,74 ± 2,79 (8,11-17,86)
<b>Sigara Kullanımı</b>		
Evet	15,47 ± 7,84 (7,81-34,88)	10,41 ± 2,15 (8,14-15,27) <sup>a</sup>
Hayır	13,70 ± 7,39 (7,93-38,69)	10,83 ± 2,92 (7,87-17,86)
<b>Çalışma Süresi (yıl)</b>		-
Kısa süre (0,5-4,5)	12,23 ± 5,36 (7,81-24,93)	
Orta süre (5-15)	12,27 ± 4,58 (7,93-22,82)	
Uzun süre (16-35)	24,15 ± 9,12 (13,05-38,69) <sup>b</sup>	
<b>Maske Kullanımı</b>		-
Evet	18,23 ± 8,53 (7,99-34,37)	
Hayır	13,57 ± 7,04 (7,81-38,69)	

Ölçümler iki kez tekrar edilmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (aralık) olarak verilmiştir. <sup>a</sup>*p* <0,05; işçi grubu kontrol grubu ile ve <sup>b</sup>*p* <0,05; uzun çalışma süreli işçiler, kısa ve orta çalışma süreli işçiler ile karşılaştırılmıştır.



#### 4.5.9. İnterlökin-1beta Düzeylerine İlişkin Bulgular

Mesleki olarak mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrollerin plazma IL-1beta düzeyleri Tablo 4.20'de gösterilmiştir. İşçi grubundaki bireylerin plazma IL-1beta düzeyleri, kontrol grubundaki bireylerden istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Genç yaş (19-40 yaş) grubundaki işçilerin plazma IL-1beta düzeyleri aynı yaş grubundaki kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Orta yaş (41-60 yaş) grubundaki işçilerin plazma IL-1beta düzeyleri aynı yaş grubundaki kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Sigara içen işçilerin plazma IL-1beta düzeyleri sigara içen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Sigara içmeyen işçilerin plazma IL-1beta düzeyleri sigara içmeyen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

İşçi ve kontrol grubundaki bireylerin yaşların ve sigara kullanım durumlarının plazma IL-1beta düzeylerine olan etkisi incelendiğinde, yaş artışı ve sigara kullanımı ile IL-1beta düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

İşçiler çalışma sürelerine göre (kısa (0,5-4,5 yıl), orta (5-15 yıl) ve uzun (16-35 yıl)) gruplandırılarak lenfositlerdeki DNA hasarına etkisi de incelenmiştir. Uzun süreli çalışan işçilerin plazma IL-1beta düzeyleri diğer işçiler ile kıyaslandığında istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Düşük ve orta süre çalışan işçilerin plazma IL-1beta düzeyleri arasında korelasyon bulunmamıştır. ( $p> 0,05$ ).

Koruyucu maske kullanımının işçilerin plazma IL-1beta düzeylerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.20.** Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının plazmada IL-1beta düzeylerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.

Değişkenler	İnterlökin-1beta Düzeyleri	
	İşçi Grubu (n= 48)	Kontrol Grubu (n= 41)
	6,14 ± 5,78 (1,70-25,37)	3,43 ± 1,93 (1,89-10,24) <sup>a</sup>
<b>Yaş</b>		
Genç Yaş (19-40)	5,47 ± 5,39 (1,70-23,69)	3,74 ± 2,25 (1,93-10,24)
Orta Yaş (41-60)	7,47 ± 6,46 (2,08-25,37)	2,89 ± 1,05 (1,89-4,78) <sup>a</sup>
<b>Sigara Kullanımı</b>		
Evet	6,15 ± 5,81 (1,70-23,69)	3,28 ± 1,87 (1,89-8,77) <sup>a</sup>
Hayır	6,13 ± 5,88 (1,88-25,37)	3,52 ± 2,00 (1,89-10,24)
<b>Çalışma Süresi (yıl)</b>		-
Kısa süre (0,5-4,5)	2,36 ± 0,63 (1,70-4,19)	
Orta süre (5-15)	5,84 ± 5,27 (1,70-23,69)	
Uzun süre (16-35)	12,51 ± 6,07 (4,17-25,37) <sup>b</sup>	
<b>Maske Kullanımı</b>		-
Evet	8,44 ± 6,57 (1,88-23,69)	
Hayır	5,37 ± 5,37 (1,70-25,37)	

Ölçümler iki kez tekrar edilmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (aralık) olarak verilmiştir. <sup>a</sup> $p < 0,05$ ; işçi grubu kontrol grubu ile ve <sup>b</sup> $p < 0,05$ ; uzun çalışma süreli işçiler, kısa ve orta çalışma süreli işçiler ile karşılaştırılmıştır.

#### 4.5.10. Clara Hücre Protein 16 Düzeylerine İlişkin Bulgular

Mesleki mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrollerin plazma CC16 düzeyleri Tablo 4.21.'de gösterilmiştir. İşçi grubundaki bireylerin plazma CC16 düzeyleri, kontrol grubundaki bireylerden istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Genç yaş (19-40 yaş) grubundaki işçilerin plazma CC16 düzeyleri aynı yaş grubundaki kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Orta yaş (41-60 yaş) grubundaki işçilerin plazma CC16 düzeyleri aynı yaş grubundaki kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Sigara içen işçilerin plazma CC16 düzeyleri sigara içen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Sigara içmeyen işçilerin plazma CC16 düzeyleri sigara içmeyen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

İşçi ve kontrol grubunda yaşların ve sigara kullanım durumlarının plazma CC16 düzeylerine olan etkisi incelendiğinde, yaş artışı ve sigara kullanımı ile CC16 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

İşçiler çalışma sürelerine göre (kısa (0,5-4,5 yıl), orta (5-15 yıl) ve uzun (16-35 yıl)) gruplandırılarak lenfositlerdeki DNA hasarına etkisi de incelenmiştir. Uzun süreli çalışan işçilerin plazma CC16 düzeyleri diğer işçiler ile kıyaslandığında istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Düşük ve orta süre çalışan işçilerin plazma CC16 düzeyleri arasında korelasyon bulunmamıştır. ( $p>0,05$ ).

Koruyucu maske kullanımının işçilerin plazma CC16 düzeylerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.21.** Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının plazmada CC16 düzeylerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.

Değişkenler	Clara Hücre Protein 16 Düzeyleri	
	İşçi Grubu (n= 48)	Kontrol Grubu (n= 41)
	528,6 ± 150,0 (259,2-980,0)	901,0 ± 247,0 (598,8-1401,2) <sup>a</sup>
<b>Yaş</b>		
Genç Yaş (19-40)	552,06 ± 153,56 (300,8-980,0)	886,51 ± 237,05 (507,5-1248,5) <sup>a</sup>
Orta Yaş (41-60)	481,60 ± 134,97 (259,2-757,8)	926,11 ± 270,11 (625,0-1401,2) <sup>a</sup>
<b>Sigara Kullanımı</b>		
Evet	530,20 ± 164,33 (298,2-980,0)	978,36 ± 270,62 (507,8-1401,2) <sup>a</sup>
Hayır	526,29 ± 131,37 (259,2-757,8)	851,49 ± 222,25 (507,5-1198,2) <sup>a</sup>
<b>Çalışma Süresi (yıl)</b>		-
Kısa süreli (0,5-4,5)	618,29 ± 151,15 (354,2-980,0)	
Orta süreli (5-15)	535,07 ± 125,80 (300,8-757,8)	
Uzun süreli (16-35)	379,03 ± 69,81 (259,2-461,3) <sup>b</sup>	
<b>Maske Kullanımı</b>		-
Evet	488,18 ± 137,31 (259,2-980,0)	
Hayır	542,03 ± 153,41 (298,2-691,8)	

Ölçümler iki kez tekrar edilmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (aralık) olarak verilmiştir. <sup>a</sup> $p < 0,05$ ; işçi grubu kontrol grubu ile ve <sup>b</sup> $p < 0,05$ ; uzun çalışma süreli işçiler, kısa ve orta çalışma süreli işçiler ile karşılaştırılmıştır.

#### 4.6. Tek Hücre Jel Elektrophorez Yöntemine İlişkin Bulgular

Mesleki olarak mermer tozuna maruz kalan işçilerin ve kontrollerinin periferik lenfositlerindeki DNA hasar dereceleri, DNA kuyruk yoğunluğu olarak verilmiştir. İşçi ve kontrol grubundaki her bir bireyin DNA hasar dereceleri Tablo 4.22.'de gösterilmiştir. Yaş, sigara kullanım durumu, çalışma süresi ve koruyucu maske kullanım durumunda göre işçi ve kontrol gruplarının lenfositlerindeki DNA hasarının değerlendirilmesine ilişkin bulgular Tablo 4.23.'te gösterilmiştir.

İşçilerin lenfositlerindeki DNA hasarı, kontrol grubundaki bireylerin lenfositlerindeki DNA hasarından istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Genç yaş (19-40 yaş) grubundaki işçilerin lenfositlerindeki DNA hasarı aynı yaş grubundaki kontrol grubuna kıyasla ve ayrıca orta yaş (41-60 yaş) grubundaki işçilerin lenfositlerindeki DNA hasarı aynı yaş grubundaki kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Sigara içen işçilerin lenfositlerindeki DNA hasarı sigara içen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Sigara içmeyen işçilerin lenfositlerindeki DNA hasarı sigara içmeyen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

İşçi ve kontrol grubunda yaş ve sigara kullanım durumlarının lenfositlerdeki DNA hasarına olan etkisi incelendiğinde, yaş artışı ve sigara kullanımı ile DNA hasarının arttığı görülse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

İşçiler çalışma sürelerine göre kısa (0,5-4,5 yıl), orta (5-15 yıl) ve uzun (16-35 yıl) gruplandırılarak lenfositlerdeki DNA hasarına etkisi incelenmiştir. Kısa, orta ve uzun süre mermer tozuna maruz kalan işçilerde kuyruk yoğunluğu sırasıyla şu şekilde bulunmuştur:  $1,46 \pm 0,54$  (0,54-2,45),  $1,43 \pm 0,63$  (0,23-2,73) ve  $2,15 \pm 0,81$  (0,70-3,38). Uzun süreli çalışan işçilerin lenfositlerindeki DNA hasarı diğer işçilerden istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Düşük ve orta süre çalışan işçilerin lenfositlerindeki DNA hasarı arasında korelasyon bulunamamıştır. ( $p>0,05$ ).

Koruyucu maske kullanımının işçilerin lenfositlerindeki DNA hasarını azaltmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ). Maskenin koruma için yeterli olmadığı veya koruyucu maske kullanımına ilişkin ankete birçok işçinin doğru cevap vermediği varsayılmaktadır.

**Tablo 4.22.** Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının lenfositlerde DNA hasarına ilişkin bulgular.

<b>İşçi Grubu</b>			<b>Kontrol Grubu</b>		
<b>No</b>	<b>Kod</b>	<b>DNA Kuyruk Yoğunluğu</b>	<b>No</b>	<b>Kod</b>	<b>DNA Kuyruk Yoğunluğu</b>
1	M004	1,84	1	K001	0,91
2	M005	0,77	2	K002	0,69
3	M006	3,38	3	K003	0,56
4	M007	1,59	4	K004	0,43
5	M008	1,87	5	K005	0,76
6	M009	1,39	6	K006	1,15
7	M010	1,71	7	K007	0,43
8	M011	0,93	8	K008	0,76
9	M012	1,63	9	K009	1,10
10	M015	1,36	10	K010	1,34
11	M016	1,40	11	K011	1,07
12	M017	1,38	12	K012	0,87
13	M018	2,45	13	K013	0,98
14	M019	1,44	14	K014	1,18
15	M020	2,72	15	K015	0,65
16	M021	2,62	16	K016	0,66
17	M022	1,40	17	K017	0,71
18	M023	0,87	18	K018	0,74
19	M024	1,72	19	K019	0,90
20	M025	0,84	20	K020	1,49
21	M026	0,84	21	K021	1,37
22	M027	1,87	22	K023	0,59
23	M028	1,86	23	K024	0,63
24	M029	1,52	24	K025	1,02
25	M030	1,65	25	K026	1,31
26	M031	1,00	26	K027	1,25
27	M032	0,86	27	K028	1,17
28	M033	0,91	28	K029	0,82

**Tablo 4.22. (devam)** Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının lenfositlerde DNA hasarına ilişkin bulgular.

<b>29</b>	M034	2,02	<b>29</b>	K030	1,02
<b>30</b>	M035	1,02	<b>30</b>	K031	0,69
<b>31</b>	M037	2,73	<b>31</b>	K032	1,52
<b>32</b>	M038	1,88	<b>32</b>	K033	1,29
<b>33</b>	M039	2,00	<b>33</b>	K034	0,93
<b>34</b>	M040	2,38	<b>34</b>	K035	0,79
<b>35</b>	M041	2,87	<b>35</b>	K036	0,95
<b>36</b>	M042	1,72	<b>36</b>	K037	1,31
<b>37</b>	M043	1,82	<b>37</b>	K038	0,95
<b>38</b>	M044	2,51	<b>38</b>	K039	1,08
<b>39</b>	M045	1,49	<b>39</b>	K040	0,58
<b>40</b>	M046	0,69	<b>40</b>	K041	1,40
<b>41</b>	M047	1,99	<b>41</b>	K042	1,01
<b>42</b>	M048	0,58			
<b>43</b>	M049	0,84			
<b>44</b>	M050	2,52			
<b>45</b>	M051	0,23			
<b>46</b>	M052	0,92			
<b>47</b>	M053	1,66			
<b>48</b>	M054	0,70			
<b>Ortalama± Ss</b>		1,59 ± 0,69	<b>Ortalama± Ss</b>		0,95 ± 0,29

Ss: Standart sapma. Sonuçlar, 100 hücre sayımından elde edilmiştir.

**Tablo 4.23.** Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının lenfositlerde DNA hasarının değerlendirilmesine ilişkin bulgular.

Değişkenler	DNA Kuyruk Yoğunluğu	
	İşçi Grubu (n= 48)	Kontrol Grubu (n= 41)
	1,59 ± 0,69 (0,23-3,38)	0,95 ± 0,29 (0,43-1,52) <sup>a</sup>
<b>Yaş</b>		
Genç Yaş (19-40)	1,57 ± 0,68 (0,23-3,38)	0,92 ± 0,28 (0,43-1,31) <sup>a</sup>
Orta Yaş (41-60)	1,64 ± 0,74 (0,70-2,72)	1,01 ± 0,32 (0,56-1,52) <sup>a</sup>
<b>Sigara Kullanımı</b>		
Evet	1,60 ± 0,74 (0,23-3,38)	0,91 ± 0,31 (0,43-1,52) <sup>a</sup>
Hayır	1,59 ± 0,65 (0,70-2,72)	0,98 ± 0,29 (0,56-1,49) <sup>a</sup>
<b>Çalışma Süresi</b>		-
Kısa süre (0,5-4,5 yıl)	1,46 ± 0,54 (0,58-2,45)	
Orta süre (5-15 yıl)	1,43 ± 0,63 (0,23-2,73)	
Uzun süre (16-35 yıl)	2,15 ± 0,81 (0,70-3,38) <sup>b</sup>	
<b>Koruyucu Maske Kullanımı</b>		-
Evet	1,66 ± 0,69 (0,70-2,52)	
Hayır	1,57 ± 0,70 (0,23-3,38)	

Sonuçlar ortalama ± standart sapma (aralık) olarak verilmiştir. <sup>a</sup> $p < 0,05$ ; işçi grubu kontrol grubu ile ve <sup>b</sup> $p < 0,05$ ; uzun çalışma süreli işçiler, kısa ve orta çalışma süreli işçiler ile karşılaştırılmıştır.



#### 4.7. Yanak Epitel Hücrelerinde Mikroçekirdek Yöntemine İlişkin Bulgular

Mesleki olarak mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrollerin yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığına dair bulgular Tablo 4.24.'te verilmiştir. Yaş, sigara kullanım durumu, çalışma süresi ve koruyucu maske kullanım durumunda göre işçi ve kontrol gruplarının yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sayısının değerlendirilmesine ilişkin bulgular Tablo 4.25.'te gösterilmiştir.

Mermer tozuna maruz kalan işçilerin yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sayısı, kontrol grubundaki bireylerin yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sayısından istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Genç yaş (19-40 yaş) grubundaki işçilerin yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığı aynı yaş grubundaki kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Ancak orta yaş (41-60 yaş) grubundaki işçilerin yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığı ile anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Sigara içen işçilerin yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığı sigara içen kontrol grubundaki bireylere kıyasla ve ayrıca sigara içmeyen işçilerin yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığı sigara içmeyen kontrol grubundaki bireylere kıyasla istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

İşçi ve kontrol grubunda yaşların ve sigara kullanım durumlarının yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığına etkisi de değerlendirilmiştir. Genç ve orta yaş gruplarında işçilerde mikroçekirdek sıklığı farklılık göstermezken ( $p>0,05$ ), kontrol grubundaki bireylerde orta yaş grubunda genç yaş grubuna göre mikroçekirdek sıklığı istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Ayrıca sigara içen işçiler sigara içmeyen işçiler ile kıyaslandığında ve sigara içen kontrol grubundaki bireyler sigara içmeyen kontrol grubundaki bireyler ile kıyaslandığında mikroçekirdek sıklığı istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Sigaranın hem işçiler hem de kontroller için mikroçekirdek sıklığını önemli ölçüde artırdığı sonucuna varılmıştır.

İşçiler çalışma sürelerine göre (kısa (0.4-4.5 yıl), orta (5-15 yıl) ve uzun (16-35 yıl)) gruplandırılarak yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığına etkisi incelenmiştir. Kısa, orta ve uzun süre mermer tozuna maruz kalan işçilerde mikroçekirdek sıklığı sırasıyla şu şekilde bulunmuştur:  $6,33 \pm 4,04$  (2-12),  $9,34 \pm 4,31$

(3-17) ve  $11,56 \pm 4,85$  (1-18). Çalışma süresi ile mikroçekerdek sıklığı arasında korelasyon bulunmuştur. Maruziyet süresi arttıkça mikroçekerdek sıklığının arttığı görülmüştür. Uzun süreli çalışan işçilerde mikroçekerdek sıklığı, kısa ve orta süreli çalışan işçilere göre istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Ayrıca mikroçekerdek sıklığında kısa ve orta süreli çalışan işçiler arasında da korelasyon tespit edilmiştir. Orta süreli çalışan işçilerin mikroçekerdek sıklığı kısa süreli çalışan işçilere göre istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Koruyucu maske kullanımının işçilerin yanak epitel hücrelerindeki mikroçekerdek sıklığını azaltmadığı gibi istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açtığı belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Bu sonucun, mikroçekerdek sıklığını artıran yaş ve sigara kullanımı gibi faktörlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

**Tablo 4.24.** Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının yanak epitel hücrelerindeki mikroçekerdek sayısına ilişkin bulgular.

İşçi Grubu			Kontrol Grubu		
No	Kod	Mikroçekerdek sıklığı	No	Kod	Mikroçekerdek sıklığı
1	M004	5	1	K001	4
2	M005	9	2	K002	5
3	M006	11	3	K003	8
4	M007	2	4	K004	4
5	M008	6	5	K005	6
6	M009	11	6	K006	2
7	M010	9	7	K007	5
8	M011	4	8	K008	7
9	M012	2	9	K009	2
10	M015	3	10	K010	8
11	M016	10	11	K011	10
12	M017	6	12	K012	3
13	M018	9	13	K013	2
14	M019	8	14	K014	5
15	M020	1	15	K015	10
16	M021	14	16	K016	4
17	M022	15	17	K017	11

**Tablo 4.24. (devam)** Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sayısına ilişkin bulgular.

18	M023	12	18	K018	2
19	M024	4	19	K019	4
20	M025	12	20	K020	2
21	M026	3	21	K021	3
22	M027	4	22	K023	4
23	M028	10	23	K024	9
24	M029	9	24	K025	10
25	M030	5	25	K026	2
26	M031	6	26	K027	5
27	M032	16	27	K028	2
28	M033	11	28	K029	8
29	M034	13	29	K030	5
30	M035	5	30	K031	3
31	M037	7	31	K032	11
32	M038	16	32	K033	6
33	M039	9	33	K034	3
34	M040	6	34	K035	4
35	M041	17	35	K036	5
36	M042	14	36	K037	5
37	M043	17	37	K038	3
38	M044	9	38	K039	4
39	M045	13	39	K040	1
40	M046	4	40	K041	3
41	M047	14	41	K042	7
42	M048	3			
43	M049	6			
44	M050	15			
45	M051	7			
46	M052	4			
47	M053	18			
48	M054	12			
<b>Ortalama± SS</b>		<b>8,9 ± 4,7</b>	<b>Ortalama± SS</b>		<b>5,1 ± 2,8</b>

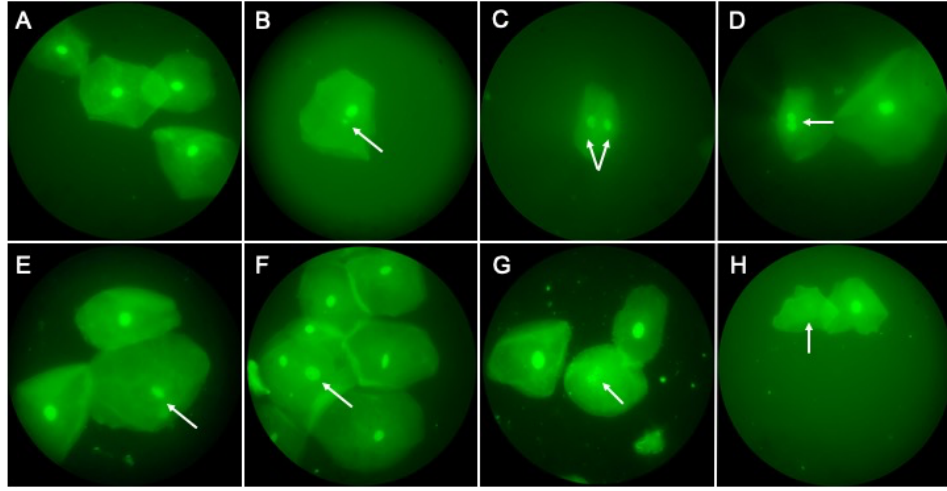
Ss: Standart sapma. Sonuçlar 2000 tane mikroçekirdek sayımından elde edilmiştir.

**Tablo 4.25.** Mermer tozuna maruz kalan işçi ve kontrol gruplarının yanak epitel hücrelerinde mikroçekerdek sıklığı değerlendirilmesine ilişkin bulgular.

Değişkenler	Mikroçekerdek Sıklığı	
	İşçi Grubu (n= 48)	Kontrol Grubu (n= 41)
	8,90 ± 4,70 (1-18)	5,10 ± 2,80 (1-11) <sup>a</sup>
<b>Yaş</b>		
Genç Yaş (19-40)	8,88 ± 4,70 (2-17)	4,06 ± 2,18 (1-11) <sup>a, b</sup>
Orta Yaş (41-60)	8,84 ± 4,74 (2-18)	6,83 ± 2,88 (2-11)
<b>Sigara Kullanımı</b>		
Evet	10,34 ± 4,7 (2-18) <sup>c</sup>	6,85 ± 2,68 (3-11) <sup>a, c</sup>
Hayır	6,80 ± 3,83 (1-13)	3,94 ± 2,21 (1-10) <sup>a</sup>
<b>Çalışma Süresi</b>		-
Kısa süre (0,5-4,5 yıl)	6,33 ± 4,04 (2-12)	
Orta süre (5-15 yıl)	9,34 ± 4,31 (3-17) <sup>d</sup>	
Uzun süre (16-35 yıl)	11,56 ± 4,85 (1-18) <sup>e</sup>	
<b>Koruyucu Maske Kullanımı</b>		-
Evet	11,15 ± 4,40 (4-18)	
Hayır	8,10 ± 4,55 (2-17)	

Sonuçlar ortalama ± standart sapma (aralık) olarak verilmiştir. <sup>a</sup> $p < 0,05$ ; işçi grubu kontrol grubu ile; <sup>b</sup> $p < 0,05$ ; genç yaş grubundakiler orta yaş grubundakiler ile; <sup>c</sup> $p < 0,05$ ; sigara içenler sigara içmeyenler ile; <sup>d</sup> $p < 0,05$ ; orta çalışma süreli işçiler, kısa çalışma süreli işçiler ile; <sup>e</sup> $p < 0,05$ ; uzun çalışma süreli işçiler, kısa ve orta çalışma süreli işçiler ile karşılaştırılmıştır.

Deney sırasında mikroçekirdek dışında binükleer, nükleer tomurcuk, piknotik, kondanse kromatin, karyohektik ve karyolitik hücreler de gözlenmiştir (Şekil 4.1.).



**Şekil 4.1.** Yanak içi epitelindeki çeşitli hücreler.

A. Normal hücre, B. Mikroçekirdek, C. Binükleer hücre, D. Nükleer tomurcuk, E. Piknotik hücre, F. Kondanse kromatin, G. Karyohektik hücre, H. Karyolitik hücre.

## 5. TARTIŞMA

Türkiye, dünya mermer rezervinin yaklaşık % 33'ünü (15 milyar m<sup>3</sup>'lük dünya rezervin 5,1 milyar m<sup>3</sup>'ünü) oluşturmakta ve dünyadaki önemli mermer üreticileri arasında yer almaktadır. Ülkemizin en önemli mermer üretim ve işleme bölgelerinden biri olan İşçehisar (Afyonkarahisar) bölgesi, üretilen mermer çeşitleri ve kalitesi ile dünya çapında bilinmektedir (2).

Mermer ocaklarında kırma, kesme, delme, düzleştirme gibi işlemler sırasında yüksek düzeyde solunabilir mermer tozu (<10 µm) oluşabilmektedir. Mesleki olarak mermer tozuna maruziyetin işçilerde önemli sağlık sorunlarına neden olduğu bilinmektedir. Solunabilir tozların toksik etkisi; toz partiküllerinin sayısına, partikül büyüklüğüne, kimyasal bileşimine ve aerodinamik özelliklerine göre değişmektedir. Mermer tozu esas olarak kalsiyum karbonattan oluşmakta ve farklı oranlarda kristal silika içermektedir. Kristal silika tahrişten akciğer kanserine kadar değişen çeşitli solunum yolu hastalıklarına neden olabilmekte ve mermer tozunun olumsuz sağlık etkilerinden kristal yapılu silikanın sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (3).

Mermer tozuna maruziyet ile ilişkilendirilen pulmoner sistem toksisitesi bazı klinik çalışmalarda gösterilmiştir (181–184). Mesleki mermer tozuna maruziyetin genotoksisite ve immünotoksisite üzerindeki etkilerine yönelik mekanistik çalışmaların oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. Bu tez çalışmasında, mermer tozunun oksidatif stres parametreleriyle birlikte genotoksisite ve immünotoksisite mekanizmalarını nasıl etkilediğini anlamaya yönelik detaylı bir araştırma yapılmıştır. Genotoksisite kan örneklerinde comet yöntemi ile ve yanak epitel hücre örneklerinde mikroçekirdek yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bunun yanı sıra oksidatif stres göstergeleri olan SOD, CAT, GR, GPx enzim aktiviteleri ile GSH, MDA düzeylerinin ve ayrıca oksidatif DNA hasar göstergesi olan 8-OHdG düzeyleri ile enflamatuvar yanıtın göstergeleri olan TNF-alfa, IL-1beta ve CC16 düzeyleri değerlendirilmiştir.

Çalışma ortamında ortaya çıkabilecek risklerin önlenmesi amacıyla uluslararası kuruluşlar tarafından havada bulunan toz seviyelerini sınırlandırıcı çeşitli standartlar belirlenmiştir. Solunabilir tozlar için maruziyet sınır değerleri, OSHA ve NIOSH tarafından 5000 µg/m<sup>3</sup> ve ACGIH tarafından 3000 µg/m<sup>3</sup> olarak belirlenmiştir (102). OSHA kristal silika için PEL değerini 50 µg/m<sup>3</sup> olarak, NIOSH ise REL

değerini  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$  olarak belirlemiştir. ACGIH'e göre kristal silika için TLV  $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$  olarak bildirilmiştir (103).

Çalışmamızda mermer işleme tesisinde bakım, cilalama, ebatlama, şekil verme, kesim, marangozluk ve seleksiyon olmak üzere yedi farklı birimdeki havadaki partikül madde konsantrasyonların ( $\text{PM}_{10}$ ,  $\text{PM}_{2,5}$ ,  $\text{PM}_{10}$  ve TSP) ölçümü yapılmıştır.  $\text{PM}_{10}$  düzeylerinin ( $2117,5 \pm 1644,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ),  $\text{PM}_{2,5}$  ( $178,8 \pm 140,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) ve  $\text{PM}_{10}$  düzeylerinden ( $91,4 \pm 125,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ortalama TSP düzeyleri  $2574 \pm 1537 \mu\text{g}/\text{m}^3$  ( $540,8 - 4870,4$ ) olarak bulunmuştur. Ortalama partikül düzeylerinin OSHA tarafından belirlenen sınır değerin ( $5000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) altında olduğu görülmektedir. Ancak, ebatlama ve kesim birimlerinde çalışan 23 işçinin (% 47,9) OSHA'nın belirlediği sınır değere çok yakın düzeyde TSP konsantrasyonlarına ( $4237 \mu\text{g}/\text{m}^3$  ve  $4870 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) maruz kaldığı ve bu düzeyin ACGIH'in belirlediği limit değeri aştığı belirlenmiştir.

Çok çeşitli ve büyük miktarlarda mermer rezervine sahip olan ülkemizde, sadece solunabilir toz ölçümlerinin zorunlu olması nedeni ile mermer tozu oluşan çalışma alanlarının ortam havasındaki kristal silika içeriği tam olarak bilinmemektedir. Dünya'nın en zengin doğal taş oluşumlarının bulunduğu Alp kuşağında yer alan Toskana bölgesinde (İtalya) mermer ocaklarında yapılan bir araştırmaya göre, mermer tozundaki kristal silika içeriğinin % 1'den az olduğu belirtilmiştir (3). Öte yandan çalışmamızın dahil edildiği İşçehisar bölgesindeki mermer tozu içeriğindeki kristal silika oranının % 1'den fazla olduğu (% 4,67) rapor edilmiştir (20). OSHA, 1980-1992 yılları arasında 255 iş yerinin % 48'inde solunabilir kristal silika düzeyinin PEL değerinin üstünde olduğunu rapor etmiştir (185). Özellikle kaya delme, kumlama gibi iş alanlarında solunabilir kristal silika seviyelerinin belirlenen limitleri aştığı belirtilmiştir (71).

Silikaya bağlı hastalıkların bilinen kesin bir tedavisi olmadığı için, maruziyetin önlenmesi, gerekli düzenlenmelerin uygulanması ve denetlenmesi önem taşımaktadır. İzin verilen maruziyet limit değerleri azaltılmadığı takdirde, mesleki silika maruziyetinin Avrupa Birliği ülkelerinde 2010-2069 yılları arasında 440,000 kanser vakasına neden olabileceği tahmin edilmektedir (186).

Çalışmamızda mermer tozuna maruz kalan işçilerin ve kontrollerin solunum fonksiyonları incelenmiştir ve radyografi değerlendirmesi yapılmıştır. Kontrol grubu

solunum fonksiyonları normal olan bireyler arasından seçilmiştir. İşçi grubumuzda önceki çalışma ile uyumlu olarak FEV1/FVC değerleri normal (% 85,96 ± 18,68) bulunmuştur (187). Bununla birlikte işçi grubunun ortalama FEV1 değerlerinin (% 59,85 ± 20,63) ve ortalama FVC değerlerinin (53,58 ± % 20,36) normalden (> % 80) düşük olduğu belirlenmiştir. Solunum fonksiyon testlerinde 14 işçinin (% 29,17) normal sınırlarda, 34 işçinin (% 71,83) obstrüktif, restriktif veya miks tipte olduğu belirlenmiştir. 30 işçinin (% 62,5) akciğer radyografileri normal bulunurken, 14 işçide (% 37,5) asimetric veya simetric lenfadenopati (% 29,2) ve 4 işçide (% 8,3) retikülonodüler opasite gözlenmiştir. Ayrıca 10 yıldan uzun süre çalışan 22 işçiden 16'sının solunum fonksiyonlarının normal sınırlarda olmadığı bulunmuştur. Bu bulgular, mermer tozuna maruz kalan işçilerin çoğunun obstrüktif ve/veya restriktif anormalliklerinin başladığını göstermektedir. Özellikle 10 yıldan daha uzun süre mesleki mermer tozuna maruz kalan işçilerde solunum fonksiyonları üzerindeki olumsuz etkilerin daha belirgin olduğu görülmüştür, fakat işçi grubumuzda silikozis teşhis edilmemiştir. Türkiye'de kristal silika işleme tesisinde çalışan 67 işçi üzerinde yapılan bir çalışmada silikozis oranı %12 olarak bulunmuştur ve mesleki toz maruziyetinin azaltılabilmesi için önlem alınması gerektiği önerilmiştir (188).

Diyarbakır'da mermer fabrikasında çalışan, yaş ortalaması 33,4 ± 6,3 yıl olan 110 işçi üzerinde yapılan bir araştırmada, mermer tozu maruziyeti ile oluşan solunum sistemi semptomları, solunum fonksiyon testi ve akciğer filmi bulguları değerlendirilmiştir. İşçiler, çalışma ortamlarındaki toz konsantrasyonlarına göre (büro 1,7 mg/m<sup>3</sup>; fayans kesim 4,6 mg/m<sup>3</sup>; blok kesim 5,2 mg/m<sup>3</sup>; cilalama 5,7 mg/m<sup>3</sup>) gruplandırılmıştır. Öksürük, balgam gibi semptomların, toz konsantrasyonunun düşük olduğu bilinen gruba göre daha sık görüldüğü tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Ayrıca FEV1, FEV1/FVC, zorlu ekspirasyonun % 25 ile % 75'i arasındaki akım (FEF % 25-75) kontrol grubuna göre belirgin düzeylerde düşük bulunmuştur. Toz konsantrasyonunun yüksek olduğu bilinen gruplarda akciğer filminde daha yüksek patolojik bulgu saptanmakla beraber, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak mermer fabrikasında on yıldan fazla çalışan işçilerde akciğer filmi bulgularına göre patolojilerin daha sık saptandığı belirtilmiştir ( $p<0,001$ ) (182).

Çalışmamızla uyumlu olarak, Afyonkarahisar'da çalışan 236 işçi (181) ve Aydın'da çalışan 50 erkek işçi (183) üzerinde mesleki mermer tozunun solunum



fonksiyonları üzerine olumsuz etkilerinin araştırıldığı çalışmalardan elde edilen sonuçlar da birbirini desteklemektedir. Sonuç olarak, işçilerde mermer tozu maruziyetinin yoğunluğu ve süresinin solunum semptomları ve akciğer filmi bulguları ile ilişkili olduğu bulunmuştur.

Oksidatif stres; biyolojik sistemlerin hücrel metabolizma sırasında oluşan reaktif oksijen türlerindeki artışa karşılık, onları detoksifiye eden antioksidanların yetersiz kalması sonucu oksidatif dengenin bozulması durumudur. Oksidatif dengesizlik genetik, metabolik ve hücrel değişikliklerin bozulmasını tetiklemektedir. SOD, CAT, GR ve GPx gibi antioksidan enzim aktivitesi ve GSH düzeyleri oksidatif stresin değerlendirilmesinde kullanılan biyogöstergeler olarak tercih edilmektedir (189).

Reaktif oksijen türlerinin özellikle de süperoksit anyonunun üretimi ve/veya yetersiz detoksifiye edilmesi oksidatif strese yol açmaktadır. Süperoksit anyonu, çeşitli enzimatik antioksidan savunma sistemleri ile detoksifiye edilmektedir. SOD, reaktif oksijen türlerine ve süperoksit anyonuna karşı en önemli antioksidan savunma sistemidir. SOD, bir süperoksit anyonunu moleküler oksijene yükseltgenmesini ve diğer bir süperoksit anyonunu ise daha az reaktif olan hidrojen peroksit indirgenmesini katalizler. Hidrojen peroksit detoksifikasyonu ise CAT ve GPx enzimleri tarafından gerçekleştirilir ve hidrojen peroksit suya parçalanır. GPx bir taraftan GSH'nin GSSG'ye dönüşümünü kataliz ederken, diğer taraftan da hidroperoksitlerin de indirgenmesini katalize ederek hücreyi oksidatif hasardan koruyan bir enzimdir. GR ise hücre içi glutatyonun indirgeme/yükseltgeme olayında önemli bir role sahiptir ve oksidatif strese karşı koruma için gerekli olan GSH/GSSG oranını yükseltir. Reaktif oksijen türleri enflamatuvar yanıtın başlatılması, ilerlemesi ve yayılmasında da rol oynayan anahtar sinyal molekülleridir.

Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif strese en duyarlı nükleik baz guanindir. 8-OHdG seviyeleri oksidatif DNA hasarı ve hücrel oksidatif stresin uygun bir göstergesidir (190). Reaktif oksijen türleri ayrıca membran lipitlerine saldırarak ve lipit peroksidasyonuna neden olarak aldehit ve ketonların oluşumuna neden olmaktadır ve bu ürünler genetik materyalde de hasara yol açmaktadır. Lipit peroksidasyonunun değerlendirilmesinde MDA yaygın olarak kullanılan bir biyogöstergedir (191).

Oksidatif stres ve enflamasyon birbirleri tarafından indüklenebilen patofizyolojik süreçlerdir (130). İnflamasyon bölgesinde polimorfonükleer nötrofiller tarafından üretilen reaktif oksijen türleri, endotel disfonksiyonuna ve doku hasarına neden olur. TNF-alfa immün sistem patojenezinde ve tümör gelişiminde rol oynayan önemli bir proenflamatuvar sitokindir. Hem prokarsinojenik hem de antikarsinojenik aktiviteleri gösterilmiştir (192). IL-1beta ise enfeksiyon ve yaralanmaya karşı konak savunma tepkileri için çok önemli olan güçlü bir pro-enflamatuvar sitokindir (193).

Bununla birlikte mesleki tozlar alveolar epitel hücrelerinde ve ayrıca makrofaj, nötrofil, lenfosit, hücresel adhezyon molekülleri, sitokinler ve kemokinler gibi immün sistem elemanlarında enflamatuvar yanıtına neden olabilmektedir. TNF-alfa ve IL-1beta gibi proenflamatuvar sitokinler enflamatuvar hücrelerin fonksiyonlarını aktive etmektedir. Böylelikle immünotoksisitenin değerlendirilmesinde bu proenflamatuvar sitokinler yararlı bulunmuştur (138).

CC16 siliyer olmayan sekretuvar Clara hücrelerinden salgılanan bir protein olup solunum sistemini oksidatif strese ve enflamasyona karşı korumaktadır. Serum CC16 düzeyinin, solunum epitel bütünlüğünü değerlendirmek ve geçirgenlik değişikliklerinin erken dönem tanısına yönelik iyi bir biyogösterge olduğu düşünülmektedir (152).

Çalışmamızda mermer tozuna maruziyetin oksidatif stres ve immün sistem parametreleri üzerine etkileri incelendiğinde işçilerde SOD, CAT, GR, GPx enzim aktiviteleri ve GSH ve CC16 düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur. MDA, 8-OHdG, TNF-alfa ve IL-1beta düzeyleri ise kontrol grubundan istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur. Maruziyet süreleri ve GSH, CC16, MDA, TNF-alfa ve IL-1beta düzeyleri arasında güçlü korelasyon görülmüştür. Maruziyet süresi arttıkça (10 yıldan uzun süre) GSH ve CC16 düzeyleri azalmıştır; MDA, TNF-alfa ve IL-1beta düzeyleri artmıştır. CC16 düzeylerindeki azalma, işçilerin solunum sisteminin oksidatif stres ve enflamasyona karşı koruma yeteneklerindeki düşüşün bir göstergesidir. Maruziyet süreleri ile SOD, CAT, GR, GPx ve 8-OHdG düzeyleri arasında bir korelasyon görülmemiştir. Maske kullanımı ve sigara içme durumu, oksidatif stres ve immün parametreleri anlamlı olarak etkilememiştir. Total kolesterol dışında biyokimyasal parametrelerde kontrol grupla karşılaştırıldığında işçilerde önemli fark bulunmamıştır. Bizim bulgularımıza paralel olarak, kristal silika içeren

mesleki toza maruz kalan seramik işçilerinde (n=99) plazma 8-OHdG düzeylerinin kontrol grubundan yüksek olduğu bildirilmiştir (187). Kristal silikaya maruz kalan maden işçilerinde (n=86) ise serum CC16 düzeylerinde önemli bir azalma rapor edilmiştir. Serum CC16 düzeylerindeki azalmanın muhtemelen kristal silika partiküllerinin solunum epiteli üzerindeki erken toksik etkilerini yansıttığı sonucuna varılmıştır (156,194). Kristal silika GPx, SOD ve enzimle indüklenebilir nitrik oksit sentaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonundaki artışla oksidatif strese yol açabilmektedir. Ayrıca, oksidanların üretimi, hücre dışı sinyal ile düzenlenen kinaz fosforilasyonu, MAPK/ERK kinaz, artan enflamatuvar sitokin (TNF-alfa, IL-1beta gibi) üretimi ve spesifik transkripsiyon faktörlerinin (nükleer faktör kappa B ve aktivatör protein-1 gibi) aktivasyonu gibi hücre sinyal yollarını indükler (195).

Mısır'da mermer tozuna maruz kalan işçilerde yapılan bir çalışmada (n = 48, erkek), işçilerde hücre aracılı bağışıklık sisteminin aktivasyonu ve oksidatif stresin biyobelirteci olan neopterin seviyeleri incelenmiştir. İşçilerin idrarındaki neopterin düzeylerinin istatistiksel anlamlı yüksek olduğu bildirilmiştir ve artan neopterin seviyelerinden mermer tozundaki kristal silika sorumlu tutulmuştur (196).

Mermer işleme tesislerindeki işçilerde farklı otoimmün hastalıklar bildirilmiştir. 70 yaşında bir mermer işçisinde Erasmus sendromu (kristal silikaya maruz kalmanın eşlik ettiği skleroz) rapor edilmiştir (197). Ayrıca, 7 yıl mermer tozu maruziyeti olan 45 yaşındaki bir bireyde Caplan sendromu (kristal silikaya maruz kalmanın eşlik ettiği romatoit artrit) bildirilmiştir (198). Silikaya kronik maruziyetinin otoimmün bozukluklar arasındaki ilişkiyi açıklayan en kabul gören teori; lenfositlerdeki apoptotik mekanizmanın bozulmasıdır. Bu durumda, TNF reseptör ailesine ait ve lenfositlerin hücre zarı üzerinde eksprese edilen bir protein olan Fas proteininin DNA fragmentasyonuna yol açan kaspaz kaskadının tetiklenmesinin esas rol oynadığı düşünülmektedir (199,200).

Comet yöntemi; genotoksisitenin değerlendirilmesinde sıklıkla tercih edilen, basit, hassas ve güvenilir bir genotoksisite yöntemidir (158,177). Genetik hasarın bir diğer göstergesi de mikroçekirdek sıklığıdır. Yanak epitel hücrelerinde mikroçekirdek yöntemi, insanlarda genetik hasarı gösteren ve girişimsel özelliğinin en az olması nedeni ile kolay uygulanabilen bir yöntemdir (169,172,201)

Mesleki mermer tozuna ve/veya silika içeren tozlara maruziyet ile ilişkili geno-

toksosite bildiren sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (191,202). Mermer tozuna maruz kalan işçilerdeki genotoksosite, doğrudan kristal silika partiküllerinden ve/veya mermer tozunun solunmasının ardından aktifleştirilmiş alveolar makrofajlardan ve nötrofillerden salıverilen serbest radikallerden kaynaklanabilir. Çalışmamızda mermer işçilerinin lenfositlerinde DNA hasarı kontrol grubundan istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ve artan DNA hasarı ile maruziyet süresi arasında güçlü bir korelasyon tespit edilmiştir. 16 yıldan fazla çalışan işçilerdeki DNA hasarı, daha az çalışan işçilerden istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur. Çalışmamızla uyumlu olarak, kristal silikaya maruz kalan dökümhane ve çömlek işçilerinin lenfositlerindeki DNA hasarı, Comet yöntemi kullanılarak belirlenmiştir ve kontrol grubundan istatistiksel anlamlı daha yüksek bulunmuştur (203). Beklenilenin aksine, çalışmamızda, koruyucu maske kullanımının işçilerde DNA hasarını etkilemediği görülmüştür. Ancak maske kullanan işçi sayısının oldukça düşük (% 25) olmasından dolayı, sonucun anlamlı olmadığı düşünülmektedir. Ayrıca koruyucu maske kullanımı ile ilgili anket sorusuna doğru cevap verilmemiş olabileceği de varsayılmaktadır.

Toskana bölgesinde (İtalya) çömlek, seramik ve mermer üretim tesislerinde çalışan kristal silika içeren mesleki toza maruz kalan 135 işçinin burun epitelindeki DNA'nın oksidatif olarak hasar gördüğünün tespit edildiği bir çalışma yapılmıştır. Elde edilen bulgular, mesleki silika maruziyetinin, çalışanlarda önemli sağlık sorunlarına yol açabilecek genotoksik hasara neden olabileceğine işaret etmektedir (204).

Yanak epitel hücrelerinde mikroçekirdek oluşumuna odaklanan sistematik inceleme ve meta analizde, kristal silika ve formaldehit gibi genotoksik kimyasallara mesleki maruziyetin mikroçekirdek sıklığını arttırdığı rapor edilmiştir. Ayrıca bu analizde maruz kalan işçilerde kanser riskinin değerlendirilmesinde biyobelirteç olarak mikroçekirdek sıklığının faydalı olabileceği öne sürülmüştür (205).

Çalışmamızda kristal silika içeren mesleki mermer tozu maruziyeti olan işçilerde yanak epitel hücrelerinde mikroçekirdek sıklığı incelenmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara göre, mermer işçilerinde mikroçekirdek sıklığının kontrol grubundan istatistiksel anlamlı yüksek olduğu belirlenmiştir. Artan mikroçekirdek sıklığı maruziyet süresi ve sigara içme ile ilişkili bulunmuştur. Mikroçekirdek oluşumu, üst solunum yolu epitel hücreleri gibi hedef dokuda görülebileceği gibi periferik kan

hücrelerinde de görülebilmektedir. Demircigil ve ark. (12) kristal silika içeren tozlara maruz kalan çeşitli işyerlerinde çalışan işçilerin (n=50) burun epitel hücrelerinde (2,9 kat) ve lenfositlerinde (2,2 kat) mikroçekirdek oluşumunun arttığını bildirmişlerdir. Bu bulgular, reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve enflamatuvar yanıt gibi dolaylı mekanizmaların genotoksisiteye yol açabildiğini göstermektedir (195,202).

Çalışmamızla uyumlu olarak, silikaya maruz kalan maden ve taş ocaklarında çalışan işçilerde (n=45) yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığının ve lenfositlerindeki DNA hasarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (206). Kristal silika içeren mesleki toza maruz kalan seramik işçilerinde (n=99) yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığının ve plazma 8-OHdG düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir. Ayrıca Comet yöntemi ile lenfositlerdeki DNA hasarının kontrol grubundan yüksek olduğu gösterilmiştir. Anlar ve ark. (187) seramik endüstrisinde mesleki toza maruziyetin genotoksik hasara yol açabildiğini belirtmiştir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mermer üretim ve işleme alanlarında kırma, kesme, delme, düzleştirme gibi işlemler sırasında oluşan mermer tozu hem insan sağlığı hem de çevre açısından önemli sorunlara neden olabilir. Toz partiküllerin solunmasının sağlık üzerine olumsuz etkileri partikülün aerodinamik özellikleri ile doğrudan ilişkilidir. Partikül boyutu küçüldükçe solunum ağacında birikme eğilimi artmakta ve solunum sisteminde toksisiteye neden olmaktadır. Alveolo-kapiller bariyeri geçerek sistemik dolaşıma girebilen ince partiküller ise kardiyovasküler ve serebravasküler sistemi olumsuz etkileyebilmektedir (37,44,66) Toz partikül maddelerin aerodinamik özelliklerinin yanı sıra kimyasal kompozisyonu da toksisite profilinin değerlendirilmesinde oldukça önemlidir.

Mermer tozu esas olarak kalsiyum karbonattan oluşur ve farklı oranlarda silika içermektedir (3). Kalsiyum karbonatın toksisitesi düşük olup mesleki ortamlarda kristal silika ile toz karışımları halinde bulunabilmesi toksisite potansiyelini artırmaktadır (19). Kalsiyum karbonata solunum yolu ile maruziyet solunum yollarının tahrişi, öksürük, hapsirik ve burun akıntısına neden olmaktadır (99). Mermer tozunun sağlık üzerine olumsuz sonuçlarından büyük ölçüde kristal yapıli silikanın sorumlu olduğu düşünülmektedir. Solunabilir kristal silika hem doğrudan sitotoksik etkisi ile hem de alveolar makrofajlarda serbest radikal oluşumunun ve enflamatuvar sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin sekresyonunu uyarılması ile sağlık üzerinde olumsuz etkilere yol açabileceği bildirilmektedir. Kristal silika tozunun (<10 µm) akciğerde birikimi “silikozis” olarak adlandırılan ilerleyici, neoplastik olmayan yapısal değişikliklere yol açan ve tedavi edilemeyen fibrotik mesleki akciğer hastalığına yol açmaktadır (71). Kristal silika maruziyetinin tüberküloz, bronşit, kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi diğer solunum yolu bozukluklarına ve akciğer kanserine neden olabileceği bildirilmiştir (1,42). Bunun yanı sıra Erasmus sendromu, Caplan sendromu ve sistemik lupus eritematozus gibi immünolojik bozukluklar ve kronik böbrek hastalıkları kristal silika maruziyeti ile ilişkilendirilmiştir (9,10).

Mermer işleme tesislerinde çalışan işçiler, yüksek düzeyde silika içeren mermer tozuna maruz kalma riski altındadır, ancak mesleki olarak mermer tozuna maruz kalan işçilerin genotoksisite ve oksidatif stres parametrelerini değerlendiren

sınırlı sayıda çalışma vardır. Çalışmamızda mesleki mermer tozu maruziyetinin oksidatif stres, genotoksisite ve immünotoksisite mekanizmalarını nasıl etkilediğine açıklık getirilmeye çalışılmıştır.

Bu tez çalışmasında bazı sınırlamalar bulunmaktadır. Çalışmamıza daha fazla sayıda mermer işletme alanı ve mesleki mermer tozuna maruz işçi dahil edilebilirdi. Ayrıca işçilerin çalışma ortamında maruz kaldıkları silika düzeyi ölçülebilirdi. Ancak ülkemizde sadece solunabilir toz ölçümleri zorunlu olduğundan mermer tozu oluşan çalışma alanlarının ortam havasındaki kristal silika içeriği belirlenememiştir. Bununla birlikte farklı mermer işleme tesislerindeki mermer tozu seviyeleri değişkenlik gösterebilmekte ve bu nedenle bu çalışmadan elde edilen bulgular tüm mermer işletmelerini yansıtmayacaktır.

Sonuç olarak, bazı sınırlamalara rağmen, bulgularımız, kristal silika içeren mermer tozuna mesleki maruziyetin oksidatif stres ve bağışıklık parametrelerini (SOD, CAT, GR, GPx enzim aktiviteleri; GSH, MDA, 8-OHdG, TNF-alfa, IL-1beta, CC16 düzeylerini) etkileyebildiğini ve DNA hasarında artışlara neden olduğunu açıkça doğrulamaktadır. Bulgularımız, mesleki mermer tozu maruziyetinde antioksidan enzim aktivitelerindeki azalmanın oksidatif strese karşı korumayı azalttığını göstermektedir. TNF-alfa ve IL-1beta düzeylerindeki artış, immün yanıtın aktivasyonunu göstermektedir. Oksidatif stres ve enflamatuvar yanıtta değişikliklerin mermer tozunun neden olduğu genotoksisiteden sorumlu olabileceği sonucuna varılmıştır.

Ülkemizde iş sağlığı ve güvenliği yönünden tozla mücadele etmek ve bu işlerde çalışanların tozun etkilerinden korunmalarını sağlamak için alınması gerekli tedbirlere dair usul ve esasların belirlendiği “Tozla Mücadele Yönetmeliği” (Resmi gazete tarihi: 05.11.2013, Resmi gazete sayısı: 28812) yürürlüğe girmiştir. Buna göre risk yönetiminde ortamda bulunan tozun çeşidi, tozun sağlık ve güvenlik yönünden tehlike ve zararları, maruziyet düzeyi, süresi ve sıklığı, OSHA standartlarına paralel olarak belirlenen mesleki maruziyet sınır değerleri (solunabilir tozlar için  $5000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ; kristal silika için  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ; kalsiyum karbonat için  $15 \text{mg}/\text{m}^3$ ), toz ölçüm sonuçları, alınması gereken önleyici tedbirler, sağlık gözetim sonuçları gibi hususlarının dikkate alınması gerektiği belirtilmiştir (104,105).

Sonuçlar, mermer endüstrisinde çalışan işçiler için immünotoksik ve genotoksik risk olasılığı olduğunu göstermektedir. Maruz kalınan mermer tozunun sağlık etkilerinden hem partiküle tozun hem de silikanın sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Mermer üretim alanlarında maruz kalınan partiküle toz seviyesinin ve ayrıca silika düzeyinin izlenmesi ve izin verilen limitlerin altında tutulması önerilmektedir. Mermer tozuna mesleki maruziyeti azaltmak için havalandırma sistemlerinin iyileştirilmesi, uygun koruyucu maskelerin kullanılması ve sınır değerlerin düşürülmesi gerekli görülmektedir.



## 7. KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Occupational and Environmental Health Team. (1999). Hazard prevention and control in the work environment: Airborne dust. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66147>.
2. Çelik MY, Sabah E. Geological and technical characterization of Isehisar (Afyon-Turkey) marble deposits and the impact of marble waste on environmental pollution. *J Environ Manage.* 2008;87(1):106-16.
3. Angotzi G, Bramanti L, Tavarini D, Gragnani M, Cassiodoro L, Moriconi L, ve ark. World at work: Marble quarrying in Tuscany. *Occup. Environ. Med.* 2005;62(6):417-21.
4. El-Gammal MI, Ibrahim MS, Badr EA, Asker SA, El-Galad NM. Health risk assessment of marble dust at marbl workshops. *Nature and Science.* 2011;9(11):144-154.
5. De Matteis S, Heederik D, Burdorf A, Colosio C, Cullinan P, Henneberger PK, ve ark. Current and new challenges in occupational lung diseases. *Eur Respir Rev.* 2017;26(146):170080.
6. Occupational Safety and Health Administration (OSHA), Safety and Health Topics / Silica, Crystalline [İnternet]. 2021 [Erişim tarihi: 16 Mart 2021]. Erişim adresi: <https://www.osha.gov/dsg/topics/silicacrystalline/>.
7. Leso V, Fontana L, Romano R, Gervetti P, Iavicoli I. Artificial Stone Associated Silicosis: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(4):568.
8. Leung CC, Yu ITS, Chen W. Silicosis. *The Lancet.* 2012;379(9830):2008-18.
9. Steenland K, Ward E. Silica: A lung carcinogen. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(1):63-9.
10. National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), Hazard review: health effects of occupational exposure to respirable crystalline silica [İnternet]. 2021 [Erişim tarihi: 9 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2002-129/>.
11. Bonassi S, Milić M, Neri M. Frequency of micronuclei and other biomarkers of DNA damage in populations exposed to dusts, asbestos and other fibers. A systematic review. *Mutat Res.* 2016;770:106-18.
12. Demircigil GC, Coskun E, Vidinli N, Erbay Y, Yilmaz M, Cimrin A, ve ark. Increased micronucleus frequencies in surrogate and target cells from workers exposed to crystalline silica-containing dust. *Mutagenesis.* 2010;25(2):163-9.
13. Dönmez-Altuntaş H, Baran M, Oymak FS, Hamurcu Z, İmamoğlu N, Özesmi M, ve ark. Investigation of micronucleus frequencies in lymphocytes of inhabitants environmentally exposed to chrysotile asbestos. *Int J Environ Health Res.* 2007;17(1):45-51.

14. Dušinská M, Barančoková M, Kažimírová A, Harrington V, Volkovová K, Staruchová M, ve ark. Does occupational exposure to mineral fibres cause DNA or chromosome damage? *Mutat Res Mol Mech Mutagen*. 2004;553(1-2):103-10.
15. Gövercin M, Tomatır AG, Evyapan F, Acikbas İ, Coşkun G, Akdag B. Elevated micronucleus frequencies in patients with pleural plaque secondary to environmental exposure to asbestos. *Genet Mol Res*. 2014;13(1):598-604.
16. Kawami M, Ebihara I. Cytogenetic damage and cell-mediated immunity in pneumoconiosis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2000;19(1-2):103-8.
17. Marini V, Michelazzi L, Cioé A, Fucile C, Spigno F, Robbiano L. Exposure to asbestos: correlation between blood levels of mesothelin and frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res*. 2011;721(1):114-7.
18. Sellappa S, Prathyumn S, Balachandar V. DNA damage induction and repair inhibition among building construction workers in South India. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2010;11(4):875-80.
19. The National Institutes of Health (NIH), PubChem Source Information Calcium carbonate [Internet]. 2021 [Erişim tarihi: 12 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Calcium-carbonate#section>.
20. Topçu İB, Bilir T, Uygunoğlu T. Effect of waste marble dust content as filler on properties of self-compacting concrete. *Constr Build Mater*. 2009;23(5):1947-53.
21. Seghir N, Mellas M, Sadowski Ł, Żak A. Effects of marble powder on the properties of the air-cured blended cement paste. *J Clean Prod*. 2018;183:858-68.
22. Kechagia P, Koutroumpi D, Bartzas G, Peppas A, Samouhos M, Deligiannis S, ve ark. Waste marble dust and recycled glass valorization in the production of ternary blended cements. *Sci Total Environ*. 2021;761:143224.
23. El-Sayed HA, Farag AB, Kandeel AM, Younes AA, Yousef MM. Characteristics of the marble processing powder waste at Shaq El-Thoaban industrial area, Egypt, and its suitability for cement manufacture. *HBRC J*. 2018;14(2):171-9.
24. T.C. Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı Çalışma ve Sosyal Güvenlik Eğitim ve Araştırma Merkezi (ÇASGEM), Meslek Hastalıkları Kılavuzu, Ankara: Özyurt Matbaacılık; 2013.
25. Klaassen CD, Casarett LJ, Doull J, editörler. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 8<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill Education; 2013.
26. T.C. Cumhurbaşkanlığı Mevzuat Bilgi Sistemi, Resmi Gazete sayı: 28509, İş Sağlığı ve Güvenliğine İlişkin İşyeri Tehlike Sınıfları Tebliği, 2012.
27. İhracat Genel Müdürlüğü Maden, Metal ve Orman Ürünleri Dairesi. Doğal Taşlar Sektör Raporu, T.C. Ticaret Bakanlığı; 2020.
28. Casarett LJ, Doull J, Klaassen CD, editörler. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 6<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill Medical Pub. Division; 2001.

29. T.C. Sosyal Güvenlik Kurumu, İstatistik Yıllıkları-İş Kazası ve Meslek Hastalıkları İstatistikleri [İnternet] 2019. [Erişim Tarihi: 9 Mayıs 2021]. Erişim adresi:[http://www.sgk.gov.tr/wps/portal/sgk/tr/kurumsal/istatistik/sgk\\_istatistik\\_yilliklari](http://www.sgk.gov.tr/wps/portal/sgk/tr/kurumsal/istatistik/sgk_istatistik_yilliklari).
30. Calvert JG. Glossary of atmospheric chemistry terms, USA: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Pure Appl Chem. 1990;62(11):2167-219.
31. United States Environmental Protection Agency (EPA), Particulate Matter (PM) Pollution [İnternet]. 2021 [Erişim Tarihi: 9 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://www.epa.gov/pm-pollution>.
32. Greenberg MI, editör. Occupational, industrial, and environmental toxicology. 2<sup>nd</sup> ed. St. Louis, Mosby; 2003.
33. Seaton A, Seaton D, Leitch AD, editörler. Crofton and Douglas's Respiratory diseases. 4th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1989;95-104.
34. Nicod LP. Pulmonary Defence Mechanisms. Respiration. 1999;66(1):2-11.
35. Uçar N, Saka D, Coşkun Ö, Sari A. Akciğerin Savunma Mekanizmaları. Solunum Hastalıkları, 2002;13:153-60.
36. Heyder J. Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery. Proc Am Thorac Soc. 2004;1(4):315-20.
37. Salvi S, Holgate ST. Mechanisms of particulate matter toxicity. Clin Exp Allergy. 1999;29(9):1187-94.
38. Stuart BO. Deposition and clearance of inhaled particles. Environ Health Perspect. 1984;55:369-90.
39. Öcal N, Bilgiç H, Uçar E. Solunum Yollarının Savunma Sistemi ve İnhalasyon Ajanlarının Atılımı. J Clin Anal Med 2015;6(suppl 2): 246-9.
40. Murray JF, Nadel JA, editörler. Textbook of respiratory medicine. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Saunders; 1994.
41. O'Callaghan C, Barry PW. The science of nebulised drug delivery. Thorax. 1997; 52(Suppl 2):31-44.
42. International Agency for Research on Cancer (IARC), Silica, some silicates, coal dust and para-aramid fibrils. Monograph on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Geneva:IARC Press;1997.
43. Cherrie JW, Brosseau LM, Hay A, Donaldson K. Low-toxicity dusts: current exposure guidelines are not sufficiently protective. Ann Occup Hyg. 2013;57(6):685-91.
44. Kelly FJ, Fussell JC. Toxicity of airborne particles-established evidence, knowledge gaps and emerging areas of importance. Philos Trans A Math Phys Eng Sci. 2020;378(2183):20190322.

45. Cassee FR, Héroux M-E, Gerlofs-Nijland ME, Kelly FJ. Particulate matter beyond mass: recent health evidence on the role of fractions, chemical constituents and sources of emission. *Inhal Toxicol.* 2013;25(14):802-12.
46. Sharma M, Maloo S. Assessment of ambient air PM and PM and characterization of PM in the city of Kanpur, India. *Atmos Environ.* 2005;39(33):6015-26.
47. Akhtar US, McWhinney RD, Rastogi N, Abbatt JPD, Evans GJ, Scott JA. Cytotoxic and proinflammatory effects of ambient and source-related particulate matter (PM) in relation to the production of reactive oxygen species (ROS) and cytokine adsorption by particles. *Inhal Toxicol.* 2010;22(sup2):37-47.
48. Schlesinger RB, Kunzli N, Hidy GM, Gotschi T, Jerrett M. The Health Relevance of Ambient Particulate Matter Characteristics: Coherence of Toxicological and Epidemiological Inferences. *Inhal Toxicol.* 2006;18(2):95-125.
49. Øvrevik J. Oxidative Potential Versus Biological Effects: A Review on the Relevance of Cell-Free/Abiotic Assays as Predictors of Toxicity from Airborne Particulate Matter. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19):4772.
50. Hougaard KS, Campagnolo L, Chavatte-Palmer P, Tarrade A, Rousseau-Ralliard D, Valentino S, ve ark. A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles. *Reprod Toxicol.* 2015;56:118-40.
51. Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, ve ark. Particulate Matter Air Pollution and Cardiovascular Disease: An Update to the Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation.* 2010;121(21):2331-78.
52. Møller P, Danielsen PH, Jantzen K, Roursgaard M, Loft S. Oxidatively damaged DNA in animals exposed to particles. *Crit Rev Toxicol.* 2013;43(2):96-118.
53. de Kok TCM, Driessens FCM, Hogervorst JGF, Briedé JJ. Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: A review of recent studies. *Mutat Res.* 2006;613(2-3):103-22.
54. Riediker M, Zink D, Kreyling W, Oberdörster G, Elder A, Graham U, ve ark. Particle toxicology and health-where are we? *Part Fibre Toxicol.* 2019;16(1):19.
55. Knaapen AM, Borm PJA, Albrecht C, Schins RPF. Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int J Cancer.* 2004;109(6):799-809.
56. Miller MR, Borthwick SJ, Shaw CA, McLean SG, McClure D, Mills NL, ve ark. Direct Impairment of Vascular Function by Diesel Exhaust Particulate through Reduced Bioavailability of Endothelium-Derived Nitric Oxide Induced by Superoxide Free Radicals. *Environ Health Perspect.* 2009;117(4):611-6.
57. Miller MR, Raftis JB, Langrish JP, McLean SG, Samueltai P, Connell SP, ve ark. Inhaled Nanoparticles Accumulate at Sites of Vascular Disease. *ACS Nano.* 2017;11(5):4542-52.
58. Perez CM, Hazari MS, Farraj AK. Role of autonomic reflex arcs in cardiovascular responses to air pollution exposure. *Cardiovasc Toxicol.* 2015;15(1):69-78.

59. Dockery DW, Pope CA, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, ve ark. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med.* 1993;329(24):1753-9.
60. Schwartz J, Dockery DW. Increased mortality in Philadelphia associated with daily air pollution concentrations. *Am Rev Respir Dis.* 1992;145(3):600-4.
61. Katsouyanni K, Touloumi G, Samoli E, Gryparis A, Le Tertre A, Monopolis Y, ve ark. Confounding and effect modification in the short-term effects of ambient particles on total mortality: results from 29 European cities within the APHEA2 project. *Epidemiol Camb Mass.* 2001;12(5):521-31.
62. World Health Organization (WHO) Review of evidence on health aspects of air pollution-REVIHAAP project, final technical report. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2013.
63. Kelly FJ, Fussell JC. Air pollution and airway disease. *Clin Exp Allergy.* 2011;41(8):1059-71.
64. Bauer M, Moebus S, Möhlenkamp S, Dragano N, Nonnemacher M, Fuchsluger M, ve ark. Urban Particulate Matter Air Pollution Is Associated With Subclinical Atherosclerosis: results from the HNR (Heinz Nixdorf Recall) study. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(22):1803-8.
65. MacIntyre EA, Gehring U, Mölter A, Fuertes E, Klümper C, Krämer U, ve ark. Air pollution and respiratory infections during early childhood: an analysis of 10 European birth cohorts within the ESCAPE Project. *Environ Health Perspect.* 2014;122(1):107-13.
66. Anderson JO, Thundiyil JG, Stolbach A. Clearing the Air: A Review of the Effects of Particulate Matter Air Pollution on Human Health. *J Med Toxicol.* 2012;8(2):166-75.
67. Heusinkveld HJ, Wahle T, Campbell A, Westerink RHS, Tran L, Johnston H, ve ark. Neurodegenerative and neurological disorders by small inhaled particles. *NeuroToxicology.* 2016;56:94-106.
68. Kim KE, Cho D, Park HJ. Air pollution and skin diseases: Adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases. *Life Sci.* 2016;152:126-34.
69. Nemery B, Bast A, Behr J, Borm PJ, Bourke SJ, Camus PH, ve ark. Interstitial lung disease induced by exogenous agents: factors governing susceptibility. *Eur Respir J Suppl.* 2001;32:30s-42s.
70. Peretz A, Checkoway H, Kaufman JD, Trajber I, Lerman Y. Silica, Silicosis, and Lung Cancer. *Isr Med Assoc J.* 2006;8(2):114-8.
71. Castranova V, Vallyathan V. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Environ Health Perspect.* 2000;108(4):675-684.
72. Fruijtier-Pöllöth C. The toxicological mode of action and the safety of synthetic amorphous silica-a nanostructured material. *Toxicology.* 2012;294(2-3):61-79.
73. Anlar HG, Bacanlı M, Başaran N. Silikanın Kullanım Alanları ve Silika Maruziyetine Bağlı Olası Toksik Etkiler. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi.* 2019;39(1):17-29.

74. Mossman BT, Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(5 Pt 1):1666-80.
75. Çımrın AH, Bahadır H, Silikozis. *Güncel Göğüs Hastalık Serisi.* 2019;7(2):74-9.
76. Nash T, Allison AC, Harington JS. Physico-Chemical Properties of Silica in Relation to its Toxicity. *Nature.* Nisan 1966;210(5033):259-61.
77. Rimola A, Costa D, Sodupe M, Lambert J-F, Ugliengo P. Silica Surface Features and Their Role in the Adsorption of Biomolecules: Computational Modeling and Experiments. *Chem Rev.* 2013;113(6):4216-313.
78. Bolis V, Fubini B, Marchese L, Martra G, Costa D. Hydrophilic and hydrophobic sites on dehydrated crystalline and amorphous silicas. *J Chem Soc Faraday Trans.* 1991;87(3):497-505.
79. Seiler HG, Sigel H, Sigel A, editörler. *Handbook on toxicity of inorganic compounds.* New York: Dekker; 1988. 1069 s.
80. Yi P, Kacew S, Kim H, Lu FC, editörler. *Lu's basic toxicology: fundamentals, target organs, and risk assessment.* Seventh edition. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2018. 647 s.
81. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) and the Environmental Protection Agency (EPA). *Toxicological Profile for Silica* [İnternet]. 2019 [Erişim tarihi: 12 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp211.pdf>.
82. Ibrahim KS, Ahmed SB, Amer NM. Study of kidney dysfunction in non-silicotic Egyptian workers. *Int J Hyg Environ Health.* 2011;214(1):53-8.
83. Hartley, D. and H. Kidd (eds.). *The Agrochemicals Handbook.* 2<sup>nd</sup> ed. Lechworth, Herts, England: The Royal Society of Chemistry, 1987.
84. Saffiotti U, Williams O, Lambert N, Daniel N, Kaighn ME, Mao Y, Shi X. Carcinogenesis by crystalline silica: animal, cellular, and molecular studies. In: Castranova V, Vallyathan V, Wallace WE, editörler. *Silica and silica-induced lung diseases.* Boca Raton, FL, CRC Press; 1996: 345–381.
85. Warheit DB, Hartsky MA. Initiating the risk assessment process for inhaled particulate materials: development of short term inhalation bioassays. *J Expo Anal Environ Epidemiol.* 1997;7(3):313-25.
86. Muhle H, Takenaka S, Mohr U, Dasenbrock C, Mermelstein R. Lung tumor induction upon long-term low-level inhalation of crystalline silica. *Am J Ind Med.* 1989;15(3):343-6.
87. Kutzman RS. *A Study of Fischer 344 Rats Exposed to Silica Dust for Six Months at Concentrations of 0, 2, 10 or 20 mg/m<sup>3</sup>.* The National Toxicology Program, New York; 1984.
88. Scheuchzuber WJ, Eskew ML, Zarkower A. Effects of prolonged inhalation of silica and olivine dusts on immune functions in the mouse. *Environ Res.* 1985;38(2):389-99.

89. Burns CA, Zarkower A, Ferguson FG. Murine immunological and histological changes in response to chronic silica exposure. *Environ Res.* 1980;21(2):298-307.
90. The Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATDR), Toxicological Profile for Silica [Internet]. 2019. [Erişim tarihi: 12 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp211.pdf>
91. Wolterbeek A, Oosterwijk T, Schneider S, Landsiedel R, de Groot D, van Ee R, ve ark. Oral two-generation reproduction toxicity study with NM-200 synthetic amorphous silica in Wistar rats. *Reprod Toxicol.* 2015;56:147-54.
92. Lewinson J, Mayr W, Wagner H. Characterization and Toxicological Behavior of Synthetic Amorphous Hydrophobic Silica. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1994;20(1):37-57.
93. Chen F, Lu Y, Demers LM, Rojanasakul Y, Shi X, Vallyathan V, ve ark. Role of hydroxyl radical in silica-induced NF-kappa B activation in macrophages. *Ann Clin Lab Sci.* 1998;28(1):1-13.
94. Ding M, Shi X, Dong Z, Chen F, Lu Y, Castranova V, ve ark. Freshly fractured crystalline silica induces activator protein-1 activation through ERKs and p38 MAPK. *J Biol Chem.* 1999;274(43):30611-6.
95. American Thoracic Society. Adverse Effects of Crystalline Silica Exposure. *Am J Respir Crit Care Med,* 1997;155:761-5.
96. Castranova V. Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(7):916-25.
97. Johnston CJ, Driscoll KE, Finkelstein JN, Baggs R, O'Reilly MA, Carter J, ve ark. Pulmonary chemokine and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of amorphous and crystalline silica. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* 2000;56(2):405-13.
98. Borm PJA, Tran L, Donaldson K. The carcinogenic action of crystalline silica: A review of the evidence supporting secondary inflammation-driven genotoxicity as a principal mechanism. *Crit Rev Toxicol.* 2011;41(9):756-70.
99. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) Pocket Guide to Chemical Hazards Limestone (calcium carbonate). [Internet]. 2019 [Erişim tarihi: 12 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0369.html>.
100. The European Chemicals Agency (ECHA), Calcium carbonate. [Internet]. 2006 [Erişim tarihi: 12 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/16050>
101. International Labour Organization (ILO) and World Health Organization (WHO), International Chemical Safety Cards (ICSCs) Calcium carbonate. [Internet]. 2020 [Erişim tarihi: 12 Mayıs 2021]. Erişim adresi: [https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p\\_version=2&p\\_card\\_id=1193](https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_version=2&p_card_id=1193).

102. Occupational Safety and Health Administration (OSHA), Silica, fused, respirable dust [Internet]. 2018 [Erişim tarihi: 12 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://www.osha.gov/chemicaldata/chemResult.html?RecNo=442>
103. Occupational Safety and Health Administration (OSHA), Silica, Crystalline, Mixed Respirable (Quartz, Cristobalite, Tridymite) [Internet]. 2020 [Erişim tarihi: 12 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://www.osha.gov/chemicaldata/chemResult.html?RecNo=278>.
104. T.C. Cumhurbaşkanlığı Mevzuat Bilgi Sistemi, Resmi Gazete Sayı: 28812, Tozla mücaadele yönetmeliği, 2013.
105. T.C. Cumhurbaşkanlığı Mevzuat Bilgi Sistemi, Sosyal Sigortalar ve Genel Sağlık Sigortası Kanunu (No: 5510). [Internet]. 2006. [Erişim tarihi 12 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://www.mevzuat.gov.tr/MevzuatMetin/1.5.5510.pdf>.
106. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;4:180-3.
107. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *J Clin Exp Investig.* 2015;6(3):331-6.
108. López-Alarcón C, Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta.* 2013;763:1-10.
109. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015;97:55-74.
110. De Martinis B. Methodology for Urinary 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine Analysis By Hplc With Electrochemical Detection. *Pharmacol Res.* 2002;46(2):129-31.
111. McDorman KS, Pachkowski BF, Nakamura J, Wolf DC, Swenberg JA. Oxidative DNA damage from potassium bromate exposure in Long-Evans rats is not enhanced by a mixture of drinking water disinfection by-products. *Chem Biol Interact.* 2005;152(2-3):107-17.
112. Poljsak B, Jamnik P, Raspor P, Pesti M. Oxidation-antioxidation-reduction processes in the cell: impacts of environmental pollution, in: N. Jerome (Ed.), *Encyclopedia of Environmental Health*, Elsevier, 2011, pp. 300e306.
113. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* 1987;1(5):358-64.
114. Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:956792.
115. Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy YSR, De B. Free Radicals, Antioxidants, Diseases and Phytomedicines: Current Status and Future Prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.* 2010; 3:91-100.
116. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Fifth edition. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press; 2015. 905 s.



117. Koca N, Karadeniz F. Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*. 2003;6:32-37.
118. Gutteridge JMC. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact*. 1994;91(2-3):133-40.
119. Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 2005;12(10):1161-208.
120. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*. 2004;266(1-2):37-56.
121. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(4):344-56.
122. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011;283(2-3):65-87.
123. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*. 2001;54(3):176-86.
124. Yin H, Xu L, Porter NA. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chem Rev*. 2011;111(10):5944-72.
125. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
126. Aslankoç R, Demirci D, İnan Ü, Yıldız M, Öztürk A, Çetin M, ve ark. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü-Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *SDÜ Tıp Fak Derg*. 2019;26(3):362-9.
127. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, ve ark. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(14):1144-70.
128. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438.
129. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010;4(8):118.
130. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Choudhary AK, Jha UK, Yadav UC, ve ark. Oxidative Stress and Antioxidants in Disease and Cancer: A Review. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(11):4405-9.
131. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res*. 2006;40(12):1250-8.
132. Reeg S, Grune T. Protein Oxidation in Aging: Does It Play a Role in Aging Progression? *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(3):239-55.
133. Melis JPM, van Steeg H, Luijten M. Oxidative DNA Damage and Nucleotide Excision Repair. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(18):2409-19.

134. Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN. 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol.* 1999;300:156-66.
135. Wang LH, Tsai AL, Hsu PY. Substrate binding is the rate-limiting step in thromboxane synthase catalysis. *J Biol Chem.* 2001;276(18):14737-43.
136. Asaduzzaman Khan Md, Tania M, Zhang D, Chen H. Antioxidant enzymes and cancer. *Chin J Cancer Res.* 2010;22(2):87-92.
137. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J Nutr.* 2004;134(3):489-92.
138. Elsabahy M, Wooley KL. Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity. *Chem Soc Rev.* 2013;42(12):5552.
139. Luster MI, Simeonova P, Gallucci R, Matheson J, Yucesoy B, Sugawara T. Overview of immunotoxicology and current applications to respiratory diseases. *Immunopharmacology.* 2000;48(3):311-3.
140. Güvenç A. Enflamatuar sitokin gen polimorfizmlerinin tip 2 diyabet ve komplikasyonlari üzerine olan etkilerinin araştırılması. [Yüksek lisans tezi]. Ankara: Ankara Üniversitesi; 2014.
141. Vilcek J. First demonstration of the role of TNF in the pathogenesis of disease. *J Immunol.* 2008;181(1):5-6.
142. Tseng W-Y, Huang Y-S, Lin H-H, Luo S-F, McCann F, McNamee K, ve ark. TNFR signalling and its clinical implications. *Cytokine.* 2018;101:19-25.
143. Çayakar A. What is Tumor Necrosis Factor Alpha ? *Turk Klin J Intern Med.* 2018;3(2):67-76.
144. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood.* 1991;77(8):1627-52.
145. Palomo J, Dietrich D, Martin P, Palmer G, Gabay C. The interleukin (IL)-1 cytokine family-Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. *Cytokine.* 2015;76(1):25-37.
146. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, ve ark. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature.* 1992;356(6372):768-74.
147. Epstein FH, Dinarello CA. Interleukin-1 and the Pathogenesis of the Acute-Phase Response. *N Engl J Med.* 1984;311(22):1413-8.
148. Sims JE, Acres RB, Grubin CE, McMahan CJ, Wignall JM, March CJ, ve ark. Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1989;86(22):8946-50.
149. McMahan CJ, Slack JL, Mosley B, Cosman D, Lupton SD, Brunton LL, ve ark. A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *EMBO J.* 1991;10(10):2821-32.
150. Colotta F, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. The type II “decoy” receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol Today.* 1994;15(12):562-6.

151. Rosenwasser LJ. Biologic activities of IL-1 and its role in human disease. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;102(3):344-50.
152. Broeckaert, Bernard. Clara cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker: Clara cell secretory protein. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(4):469-75.
153. Wong AP, Keating A, Waddell TK. Airway regeneration: the role of the Clara cell secretory protein and the cells that express it. *Cytotherapy*. 2009;11(6):676-87.
154. Bernard A, Dumont X, Roels H, Lauwerys R, Dierynck I, De Ley M, ve ark. The molecular mass and concentrations of protein 1 or Clara cell protein in biological fluids: a reappraisal. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 1993;223(1-2):189-91.
155. Bernard A, Hermans C, Van Houte G. Transient increase of serum Clara cell protein (CC16) after exposure to smoke. *Occup Environ Med*. 1997;54(1):63-5.
156. Bernard AM, Gonzalez-Lorenzo JM, Siles E, Trujillano G, Lauwerys R. Early decrease of serum Clara cell protein in silica-exposed workers. *Eur Respir J*. 1994;7(11):1932-7.
157. Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants and the Comet assay. *Mutat Res*. 2009;681(1):51-67.
158. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, ve ark. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(3):206-21.
159. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;123(1):291-8.
160. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175(1):184-91.
161. Dinçer Y, Kankaya S. Comet Assay for Determining of DNA Damage: Review. *Turk Klin J Med Sci*. 2010;30(4):1365-73.
162. Şekeroğlu ZA, Şekeroğlu V. Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim*; 2011;4(3):221-9.
163. Anlar HG. Seramik işçilerinde mesleki maruziyete bağlı olası genotoksik hasarın değerlendirilmesi. [Doktora tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2017.
164. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals-In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. Paris: OECD; 2014.
165. Uno Y, Kojima H, Omori T, Corvi R, Honma M, Schechtman LM, ve ark. JaCVAM-organized international validation study of the in vivo rodent alkaline comet assay for detection of genotoxic carcinogens: II. Summary of definitive validation study results. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015;786-788:45-76.

166. Demirel S, Zamani AG. Mikronükleus Tekniği ve Kullanım Alanları. Genel Tıp Derg. 2002;12(3):123-127.
167. Sekeroglu V, Atli Sekeroglu Z. Micronucleus test for determining genotoxic damage. Turk Bull Hyg Exp Biol. 2011;68(4):241-52.
168. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. Mutat Res. 2000;455(1-2):81-95.
169. Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. Mutat Res. 2010;705(1):11-9.
170. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals- Test No: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, Paris: OECD; 2014.
171. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals-Test No: 487 In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. Paris: OECD; 2016.
172. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, ve ark. Buccal micronucleus cytome assay. Nat Protoc. 2009;4(6):825-37.
173. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. Mutat Res. 1992;271(1):69-77.
174. Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, Burgaz S, ve ark. The HUman MicroNucleus project on eXfoLiated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. Mutat Res. 2011;728(3):88-97.
175. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, ve ark. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. Mutagenesis. 2011;26(1):125-32.
176. Aydin S, Canpınar H, Ündeğer Ü, Güç D, Çolakoğlu M, Kars A, ve ark. Assessment of immunotoxicity and genotoxicity in workers exposed to low concentrations of formaldehyde. Arch Toxicol. 2013;87(1):145-53.
177. Collins AR. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. Mol Biotechnol. 2004;26(3):249-61.
178. Thomas P, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. Methods Mol Biol. 2011;682:235-48.
179. Cao J, Liu Y, Sun H, Cheng G, Pang X, Zhou Z. Chromosomal aberrations, DNA strand breaks and gene mutations in nasopharyngeal cancer patients undergoing radiation therapy. Mutat Res. 2002;504(1-2):85-90.
180. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, ve ark. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. Eur Respir J. 2008;31(1):143-78.

181. Orman A, Ünlü M, Cirit M, Yücel A. Mermer İşçilerinde Solunum Fonksiyon Testleri, Solunum Semptomları ve Akciğer Grafisi Bulguları. *Toraks Dergisi*. 2002;3(2):188-93.
182. Sezgi C, Abakay Ö, Önder H, Selimoğlu Şen H, Abakay A, Kaya H, ve ark. The respiratory functions and radiologic findings of the marble factory workers. *J Clin Exp Investig*. 2012; 3(2): 250-4.
183. Soysal N, Sönmez HM, Karabaş MK. Aydın ilindeki mermer atölyesi çalışanlarında solunum fonksiyon testlerinin durumu. *Solunum*. 2006; 8(3):114-8.
184. Yildirim BB, Akgedik R, Akgedik S, Nazaroglu H. Pulmonary alveolar proteinosis in a marble worker. *Int J Occup Med Environ Health*. 2016;29(5):871-6.
185. Freeman CS, Grossman EA. Silica exposures in workplaces in the United States between 1980 and 1992. *Scand J Work Environ Health*. 1995;21(2):47-9.
186. Cherrie JW, Ng MG, Shafrir A, van Tongeren M, Searl A, Sanchez-Jimenez A, Mistry R, Sobey M, Corden C, Rushton L, Hutchings S. Health, socio-economic and environmental aspects of possible amendments to the EU directive on the protection of workers from the risks related to exposure to carcinogens and mutagens at work. SHEcan Summary Report. 2011, Institute of Occupational Medicine. Research Project: P937/99.
187. Anlar HG, Taner G, Bacanlı M, Iritas S, Kurt T, Tutkun E, ve ark. Assessment of DNA damage in ceramic workers. *Mutagenesis*. 2018;33(1):97-104.
188. Polatlı M, Turkan H, Akdilli A, Cildag O. Kuvvars işçilerinde silikozis riski. *Solunum Hastalıkları*. 2001;12:90-95.
189. Davies KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*. 2000;50(4-5):279-89.
190. Pilger A, Rüdiger HW. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Occup Environ Health*. 2006;80(1):1-15.
191. Wultsch G, Setayesh T, Kundi M, Kment M, Nersesyan A, Fenech M, ve ark. Induction of DNA damage as a consequence of occupational exposure to crystalline silica: A review and meta-analysis. *Mutat Res* 2021;787:108349.
192. Carbone M, Yang H. Molecular pathways: targeting mechanisms of asbestos and erionite carcinogenesis in mesothelioma. *Clin Cancer Res*. 2012;18(3):598-604.
193. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011;22(4):189-95.
194. Gu Y, He W, Wang Y, Chen J, Wang H, Gao P, ve ark. Respiratory effects induced by occupational exposure to refractory ceramic fibers. *J Appl Toxicol*. 2021;41(3):421-41.
195. Fubini B, Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med*. 2003;34(12):1507-16.

196. Gaballah I, Manawil M, El-Sherif G. Neopterin versus oxidative stress indicators among egyptian workers in marble industry. *Egypt J Occup Med*. 2015;39(1):67-83.
197. Bello S, Rinaldi A, Trabucco S, Serafino L, Bonali C, Lapadula G. Erasmus syndrome in a marble worker. *Reumatismo*. 2016;67(3):116-22.
198. Rozin AP, Toledano K. Marble pneumoconiosis associated with mixed connective tissue disease. *Intern Med Inside*. 2013;1(1):6.
199. Nagata S. Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor. *Adv Immunol*. 1994;57:129-44.
200. Peng SL. Fas (CD95)-related apoptosis and rheumatoid arthritis. *Rheumatol (Oxford)*. 2006;45(1):26-30.
201. Bonassi S, El-Zein R, Bolognesi C, Fenech M. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis*. 2011;26(1):93-100.
202. Borm PJA, Fowler P, Kirkland D. An updated review of the genotoxicity of respirable crystalline silica. Part Fibre Toxicol. 2018;15(1):23.
203. Basaran N, Shubair M, Undeger U, Kars A. Monitoring of DNA damage in foundry and pottery workers exposed to silica by the alkaline comet assay. *Am J Ind Med*. 2003;43(6):602-10.
204. Peluso MEM, Munnia A, Giese RW, Chellini E, Ceppi M, Capacci F. Oxidatively damaged DNA in the nasal epithelium of workers occupationally exposed to silica dust in Tuscany region, Italy. *Mutagenesis*. 2015;30(4):519-25.
205. Hopf NB, Bolognesi C, Danuser B, Wild P. Biological monitoring of workers exposed to carcinogens using the buccal micronucleus approach: A systematic review and meta-analysis. *Mutat Res*. 2019;781:11-29.
206. Halder A, De M. Increase in DNA damage in lymphocytes and micronucleus frequency in buccal cells in silica-exposed workers. *Indian J Occup Environ Med*. 2012;16(1):34.p

## EK-2: Orjinallik Raporu



### Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Merve Bedi Öt  
Ödev başlığı: MERMER İŞÇİLERİNDE GENOTOKSİK ETKİ MEKANİZMALARINI...  
Gönderi Başlığı: MERMER İŞÇİLERİNDE GENOTOKSİK ETKİ MEKANİZMALARINI...  
Dosya adı: Merve\_BEC\_T\_DOKTORA\_TEZ\_Turnitin\_09.06.21.pdf  
Dosya boyutu: 2.01M  
Sayfa sayısı: 134  
Kelime sayısı: 32,707  
Karakter sayısı: 193,052  
Gönderim Tarihi: 09-Haz-2021 01:11PM (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 1603379417



## MERMER İŞÇİLERİNDE GENOTOKSİK ETKİ MEKANİZMALARININ VE OKSİDATİF STRES İLE İLİŞKİLİ DEĞİŞİKLİKLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% <b>17</b>	% <b>15</b>	% <b>6</b>	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<a href="http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080">www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</a> İnternet Kaynağı	% <b>5</b>
<b>2</b>	<a href="http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080">openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</a> İnternet Kaynağı	% <b>4</b>
<b>3</b>	Merve Beciğt, Şule Çiğlekar, Mustafa Mert Başaran, Halit Buğra Koca, Sefa Çeliğk, Sevtap Aydın Diğlisiğz. "Changes in genotoxicity, inflammatory and oxidative stress parameters of workers in marble processing plants", Environmental Research, 2021 Yayın	% <b>1</b>
<b>4</b>	<a href="http://ihslc.mehmetakif.edu.tr">ihslc.mehmetakif.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>5</b>	Gülay BÖREKÇİ, Nurcan ARAS, Özlem KANDEMİR, Serap YALIN, Sevim KARAKAŞ ÇELİK, Mehmet BERKÖZ. "Investigation of the Association Between Chronic Hepatitis B and C Infections and TNF-a(-308) Gene Polymorphism", Mikrobiyoloji Bulteni, 2016	<% <b>1</b>



## EK-3 Anket Formu

### ANKET FORMU

“Mermer İşçilerinde Genotoksik Etki Mekanizmalarının ve Oksidatif Stres ile İlişkisinin Değerlendirilmesi” başlıklı bu araştırma Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı tarafından yapılmaktadır. Mesleki mermer tozuna maruziyette bazı sağlık sorunları ortaya çıkabilmektedir. Mesleki mermer tozuna maruziyete bağlı genotoksisite ve oksidatif stresle ilişkisine dair kısıtlı bilgi vardır. Bu çalışmanın amacı mermer işçilerinde mesleki mermer tozuna maruziyetin DNA hasarı üzerine etkileri ve oksidatif stresle olan ilişkisinin değerlendirilmesi ve olası toksik etki mekanizmalarına açıklık getirilmesi amaçlanmaktadır. Bu kapsamlı toksikolojik değerlendirme, iş sağlığı ve güvenliğinde risklerin öngörülmesinde, alınacak tedbirlerin belirlenmesinde ve halk sağlığının korunmasında fayda sağlayacaktır. Sizin yanıtlarınızdan elde edilecek sonuçlarla ileriye yönelik işle ilişkili hastalıkların gelişimini önlemeye yönelik öneriler planlanabilecektir. Bu nedenle soruların tümüne ve içtenlikle cevap vermeniz büyük önem taşımaktadır.

Araştırmaya katılmanız gönüllülük esasına dayalıdır. Bu form aracılığı ile elde edilecek bilgiler gizli kalacaktır ve sadece araştırma amacıyla (veya “bilimsel amaçlar için”) kullanılacaktır. Çalışmaya katılmamayı tercih edebilirsiniz veya anketi doldururken istemezseniz son verebilirsiniz.

Anket formuna adınızı ve soyadınızı yazmayınız.

### MERMER İŞÇİLERİNDE GENOTOKSİK ETKİ MEKANİZMALARININ VE OKSİDATİF STRES İLE İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

**Anketimiz 1 bölümden oluşmaktadır. 38 soruluk, 15 dk zamanınızı alacak bu çalışmada** yanıtlarınızı, soruların altında yer alan seçenekler arasından uygun olanı daire içine alarak ya da açık uçlu sorularda sorunun altında bırakılan boşluğa yazarak belirtiniz. Birden fazla seçenek işaretleyebileceğiniz sorularda, size uygun gelen bütün seçenekleri işaretleyiniz. Eğer sorunun yanıtları arasında “diğer” seçeneği mevcutsa ve yanıtınız var olan seçenekler arasında yer almıyorsa, bu durumda yanıtınızı diğer seçeneğindeki boşluğa yazınız.

Anketi yanıtladığınız için teşekkür ederiz.

Çalışma ile ilgili herhangi bir sorunuz olduğunda aşağıdaki kişi(ler) ile iletişim kurabilirsiniz:

#### **Sorumlu Öğretim üyesi:**

Doç. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

Tel: +903123052178

#### **Araştırma Ekibi**

Uzm. Ecz. Merve BECİT

Dr. Ebru KORKMAZ

Doç. Dr. Merve BACANLI

Dr. Öğr. Üyesi Şule ÇİLEKAR

Prof. Dr. Sefa ÇELİK

Çalışmaya katılmayı kabul ediyorsanız aşağıdaki kutucuğu X ile işaretleyiniz ve devam ediniz.

Kabul ediyorum.

## Anket Sorular

1. Hasta Kodu:

2. Ad Soyadı:

3. Yaş:

Boy(cm):

Kilo(kg):

4. Cinsiyet: Erkek

5. Eğitim düzeyi

İlkokul

Ortaokul

Lise

Üniversite

6. Hangi bölümde çalışıyorsunuz:

7. Ne iş yapıyorsunuz:

8. Ne kadar süredir çalışıyorsunuz:

9. Haftanın kaç günü çalışıyorsunuz:

10. Günde kaç saat çalışıyorsunuz:

11. Sigara içiyor musunuz?

Evet

Hayır

Daha önceden içtim

12. Sigara içiyorsanız günde kaç paket:.....

13. Sigara içiyorsanız kaç yıl: .....

14. Sigarayı bıraktıysanız bırakma süreniz:

15. Alkol tüketiyor musunuz?

Evet  Ne sıklıkta tüketiyorsunuz?.....

Hayır

16. Ek hastalığınız var mı?

Evet

Hayır

Evet ise hastalıklarınız nelerdir ve kaç yıldır mevcut?

.....

17. Kullandığınız ilaç var mı?

Evet

Hayır

Evet ise hastalıklarınız nelerdir? .....

### Semptom Öyküsü

.....  
.....

18. Vitamin ve mineral takviyesi alıyor musunuz?

Evet

Hayır

Evet ise hangi vitamini hangi dozda kullanıyorsunuz? .....

19. Son 1 yılda röntgen çektirdiniz mi?

Evet

Ne röntgeni çekildi, açıklayınız: .....

Hayır

20. Şu an çalışmakta olduğunuz işe başlamadan başlamadan önce astım hastalığınız var mıydı?

Evet  Evet ise kaç yıldır var? : .....

Hayır

21. Son 12 ay içinde nefes darlığı oldu mu?

Evet

Hayır

Evet ise ne zaman başladı? \_\_ (gün, ay, yıl önce başladı)

22. Son 12 ay içinde göğüste sıkışma hissi oldu mu?

Evet

Hayır

Evet ise ne zaman başladı? \_\_ (gün, ay, yıl önce başladı)

23. Son 12 ay içinde gece nefes darlığı oldu mu?

Evet

Hayır

Evet ise ne zaman başladı? \_\_ (gün, ay, yıl önce başladı)

24. Son 12 ay içinde hırıltı şikayetiniz oldu mu?

Evet

Hayır

Evet ise ne zaman başladı? \_\_ (gün, ay, yıl önce başladı)

25. Son 12 ay içinde astım atağı geçirdiniz mi?

Evet

Hayır

26. Son 12 ay içinde astım için medikal tedavi aldınız mı?

Evet

Hayır

27. Burunda ve/veya gözlerde akıntı (nezle, soğuk algınlığı dışında) şikayetiniz var mı?

Evet

Hayır

Evet ise ne zaman başladı? \_\_ (gün, ay, yıl önce başladı)

28. Alerjik duyarlılık öykünüz var mı?

Evet

Hayır

29. Ailenizde Alerjik duyarlılık öykünüz var mı?

Evet

Hayır

30. Ailenizde astım öykünüz var mı?

Evet

Hayır

**Mesleki Anamnez**

31. Temizlik maddesi olarak evde ne kullanıyorsunuz?

Deterjan:

Parlatıcı:

Beyazlatıcı:

Amonyak:

Çamaşır suyu:

Sprey:

32. Maske kullanıyor musunuz?

Evet:

Hayır:

33. Ne kadar sıklıkta kullanıyorsunuz?

Devamlı:

Ara sıra:

Hiç :

34. Hobileriniz var mı?

Evet

Hayır

Evet ise neler: .....

35. Şikayetleriniz varsa işe gelince artıyor mu?

Evet

Hayır

36. İş dışında hafta sonu şikâyetlerinizde rahatlama oluyor mu?

Evet

Hayır

37. Şikayetlerinizin işle ilgili olduğunu düşünüyor musunuz?

Evet

Hayır

38. Çalıştığınız birimde / işyerinde sizdeki şikayetlere benzer şikayeti olan var mı?

( ) Hayır yok

( ) Evet en az \_\_ kişi var



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/envres](http://www.elsevier.com/locate/envres)

## Changes in genotoxicity, inflammatory and oxidative stress parameters of workers in marble processing plants

Merve Becit<sup>a</sup>, Şule Çilekar<sup>b</sup>, Mustafa Mert Başaran<sup>c</sup>, Halit Buğra Koca<sup>d</sup>, Sefa Çelik<sup>d</sup>, Sevtap Aydın Dilsiz<sup>e,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Ataturk University, Erzurum, 25240, Turkey

<sup>b</sup> Department of Chest Diseases, Faculty of Medicine, Afyonkarahisar University of Health Sciences, Afyonkarahisar, 03030, Turkey

<sup>c</sup> Department of Otorhinolaryngology, Faculty of Medicine, Kafkas University, Kars, 36100, Turkey

<sup>d</sup> Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Afyonkarahisar University of Health Sciences, Afyonkarahisar, 03030, Turkey

<sup>e</sup> Department of Pharmaceutical Toxicology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, 06100, Turkey

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Marble dust  
Occupational exposure  
Oxidative stress  
DNA damage  
Micronucleus

### ABSTRACT

Workers in marble processing plants are at high risk of exposure to high levels of marble dust containing silica, but there are limited studies evaluating the genotoxicity and oxidative stress parameters of workers occupationally exposed to marble dust. In this study, we aimed to clarify how marble dust affects genotoxicity and immunotoxicity mechanisms alongside oxidative stress in the workers in the marble processing plants of Isehisar, Turkey. The oxidative stress and immune system parameters were determined spectrophotometrically using commercial kits. Genotoxicity was evaluated by Comet and micronucleus (MN) assays in the lymphocytes and buccal cells, respectively. The enzyme activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, and the levels of glutathione, and Clara cell secretory protein CC16 in workers (n = 48) were significantly lower than in controls (n = 41), whereas the levels of malondialdehyde, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta were significantly higher in workers. DNA damage in workers were significantly higher than in controls and there was a clear correlation between the increase in DNA damage and the duration of exposure. Marble workers had significantly higher MN frequencies when compared to controls. The results indicate the possibility of immunotoxic and genotoxic risks to workers in marble industry.

### 1. Introduction

The rapid growth of industrialization has caused accidental, occupational, and environmental exposure to various chemical substances that can be allergic, genotoxic, and even carcinogenic. High levels of dust particulates, ranging from 1 to 100 µm, are generated by the process of rock/mineral, marble, timber or fiber material, and dry grain. The occupational exposure of these dust particles can lead to various health and respiratory problems depending on the type and size of dust and duration of exposure (WHO, 1999).

Since ancient times, marble, a natural stone, has been preferred for many purposes such as shelter, protection and art, due to its durability and aesthetic appearance. Turkey constitutes approximately 33% of the world reserve (5.1 billion m<sup>3</sup> of 15 billion m<sup>3</sup> world reserves) and ranks

among the noteworthy marble producers in the world. Isehisar (Afyonkarahisar) is known as one of the most important marble production and processing plants in Turkey (Celik and Sabah, 2008).

Marble is a metamorphic rock composed of calcium carbonate with a crystalline silica of less than 1% (Angotzi et al., 2005). High levels of dust formed during crushing, cutting, sizing, or drilling in marble quarries, can cause negative consequences for environment and human health. Few studies evaluating toxicological exposure to respirable marble dust indicate that it may cause respiratory diseases such as asthma, chronic bronchitis, rhinitis, and damage to lung functions (Angotzi et al., 2005; El-Gammal et al., 2011). It is thought that crystalline silica found in the dust particles has been responsible for these health effects.

Nowadays, it is estimated that there are millions of workers in

\* Corresponding author. European Registered Toxicologist, Department of Pharmaceutical Toxicology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, 06100, Ankara, Turkey.

E-mail address: [sevtapay@hacettepe.edu.tr](mailto:sevtapay@hacettepe.edu.tr) (S. Aydın Dilsiz).

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111209>

Received 19 March 2021; Received in revised form 18 April 2021; Accepted 19 April 2021

Available online 23 April 2021

0013-9351/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

different occupational settings, exposed to respirable crystalline silica (aerodynamic diameter  $<10 \mu\text{m}$ ). Exposure is in question on about 3–5 million workers in Europe (Matteis et al., 2017); on about 2.3 million workers in the United States (OSHA-a); on more than 10 million workers in the low and middle-income countries like India and China (Leso et al., 2019). As crystalline silica is a cause of many serious diseases and mortalities, it is accepted as a major health problem in developing countries (Leung et al., 2012; Steenland and Ward, 2014). But the surveillance studies are inadequate and the reported rates are thought not to reflect the actual exposure values (Steenland and Ward, 2014).

Many pulmonary diseases such as silicosis, tuberculosis, chronic obstructive pulmonary diseases, lung and other (stomach and throat, etc.) cancers, chronic renal diseases, and autoimmune disorders have been reported to be associated with crystalline silica. The health effects of crystalline silica are mainly due to the accumulation of respirable dust particles in the lungs and the amount of quartz silica in the dust (NIOSH, 2002). Quartz and cristobalite polymorphs of crystalline silica were classified as group 1 “human carcinogen” by International Agency for Research on Cancer (IARC) in 1997 (IARC, 1997). The oxidative stress, immunotoxicity and genotoxicity are thought to play an important role in cancer pathogenesis due to exposure to silica. According to genotoxicity studies carried out with crystalline silica dust exposed-workers, it has been concluded that crystalline silica can cause DNA damage; however, the advanced studies are required in order to interpret the genotoxicity mechanisms (Bonassi et al., 2016; Demircigil et al., 2010; Donmez-Altuntas et al., 2007; Dusinská et al., 2004; Gövercin et al., 2014; Kawami et al., 2000; Marini et al., 2011; Sellappa et al., 2010). Unfortunately, there are not enough studies about the impacts of occupational marble dust exposure on genotoxicity and immunotoxicity.

Oxidative stress is a condition that results from a physiological imbalance between antioxidants and oxidants (free radicals or reactive oxygen/nitrogen species) in favor of oxidants. This imbalance triggers the deterioration of genetic, metabolic, and cellular changes. Antioxidant enzymes including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR), and glutathione peroxidase (GPx), and also antioxidants including glutathione (GSH) are useful biomarkers to evaluate the oxidative stress (Davies, 2000). Guanine is the most susceptible nucleic base to oxidative stress caused by reactive oxygen species. 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) levels is a convenient marker of oxidative DNA damage and cellular oxidative stress (Pilger and Rüdiger, 2006). Reactive oxygen species may also cause lipid peroxidation by attacking the membrane lipids. Lipid peroxidation leads to formation of aldehydes and ketones including malondialdehyde (MDA), a commonly measured biomarker in human studies. It is documented in experimental and human studies that these products cause damage to the genetic material (Wulsch et al., 2021). Concomitantly, the occupational dusts can induce an inflammatory response that involves alveolar epithelial cells and elements of the immune system, such as, macrophages, neutrophils, lymphocytes, cellular adhesion molecules, cytokines, and chemokines. Proinflammatory cytokines including tumor necrosis factor (TNF)-alpha, and interleukin (IL)-1beta activate functions of inflammatory cells. Hence, these cytokines could be helpful for the evaluation of immunotoxicity (Elsabahy and Wooley, 2013). Additionally, Clara cell secretory protein 16 (CC16), a protein secreted by non-ciliary bronchiolar Clara cells, has been shown to protect the respiratory system against oxidative stress and inflammation. CC16 concentration in serum has recently been proposed as a sensitive marker of acute or chronic disorders of respiratory epithelium (Broekaert and Bernard, 2000).

The comet (single cell gel electrophoresis) assay is simple, and highly sensitive technique for the determination of genotoxicity (Collins, 2004; Tice et al., 2000). Micronucleus (MN) frequency is another biomarker of genetic damage. Buccal micronucleus cytome assay (BMCyt) is a minimally invasive, reliable, rapid, and promising method for the assessment of DNA damage (Bonassi et al., 2011a; Ceppi et al., 2010; Tomas and Fenech, 2011).

The purpose of our study was to evaluate the genotoxicity, oxidative stress, and immune system parameters in workers in marble processing plants (e.g. marble quarries, marble factories, marble workshops) in Iscehisar (Afyonkarahisar), Turkey. The genotoxicity was determined by comet assay in blood samples and MN assay in buccal epithelial cell samples. Besides, SOD, CAT, GR and GPx enzyme activities, and GSH and MDA levels as the indicators of oxidative stress, 8-oxodG levels as an indicator of oxidative stress-related DNA damage, and TNF-alpha, IL-1beta, and CC16 levels as the indicators of inflammatory response were evaluated.

## 2. Material and methods

### 2.1. Subjects

The study population consisted of 48 male workers employed in marble processing plants of Iscehisar (Afyonkarahisar), Turkey for at least six months and 41 non-exposed male office workers (controls) of comparable age, sex, lifestyle, smoking habits and living in the same area and with no history of occupational exposure to marble dust or other chemicals (Table 1).

Before the sample collection, a detailed questionnaire (health conditions, medical history, alcohol and smoking habits) was applied. Use of protective mask, years of employment, respiratory symptoms were also recorded (Tables 1 and 2). Subjects who reported active infection, chronic diseases, radiotherapy or chemotherapy were excluded. No alcohol intake was reported for all study group.

All volunteers were informed about the aim of study and their written consent was obtained. This study was approved by the local ethics commission of Hacettepe University. The study was conducted in accordance with the ethical standards in the 1964 Declaration of Helsinki.

### 2.2. Exposure assessment

For air sampling, particulate-monitoring device Dustmate (Turnkey Instrument Ltd., UK) was used. The measuring range of the device is 0–65000  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . The instrument can simultaneously monitor the concentrations of total suspended particles and particles with different diameters (1  $\mu\text{m}$ , 2.5  $\mu\text{m}$  and 10  $\mu\text{m}$ ). Samples were collected with the principle of light scattering in accordance with the Turkish Standard (TS) 2361 “Methods for the Measurement of Air Pollution Determination of Concentration of Suspended Matter standard”.

### 2.3. Sample preparation

A total of 18 ml of peripheral blood samples were taken from each volunteer. All blood samples were stored at  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$  and processed within 6 h 5 ml of blood samples was collected in EDTA containing tubes for the

**Table 1**  
Characteristics of the study population.

	Workers (n = 48)	Controls (n = 41)
Age (years)	37.81 $\pm$ 8.50 (21–58)	38.32 $\pm$ 7.73 (21–57)
Year of working	9.81 $\pm$ 8.33 (0.5–35)	–
Protective mask usage		
Yes	12 (25%)	–
No	36 (75%)	
Smoking status		
Non-smoker	20 (41.67%)	25 (60.98%)
Smoker	28 (58.33%)	16 (39.02%) <sup>a</sup>
Cigarettes/day	16.96 $\pm$ 7.12 (10–40)	18.31 $\pm$ 3.68 (10–20)

The values are given as the mean  $\pm$  standard deviation (range). In both groups, individuals who smoked more than ten cigarettes/day for at least 1 year were considered smokers. n: Numbers of individual. <sup>a</sup>p < 0.05, compared to controls using z-test.

**Table 2**

Pulmonary function parameters and pulmonary radiography of the workers exposed to marble dust.

Parameters	Workers	
Pulmonary function tests		
Forced Expiratory Volume in 1 s (FEV1)	59.85 ± 20.63	(15–100)
Forced Vital Capacity (FVC)	53.58 ± 20.36	(13–95)
FEV1/FVC ratio	85.96 ± 18.68	(27–122)
Presence and severity of airway obstruction of workers		
Normal	14	(29.17%)
Obstructive pattern	1	(2.08%)
Restrictive pattern	23	(47.92%)
Mixed obstructive and restrictive	10	(20.83%)
Chest radiography		
Normal	30	(62.5%)
Asymmetric (unilateral) lymphadenopathy	11	(22.92%)
Symmetric (bilateral) lymphadenopathy	3	(6.25%)
Reticulonodular interstitial pattern	4	(8.33%)

The values of pulmonary function tests are given as the mean ± standard deviation (range). The values of presence and severity of airway obstruction of workers and chest radiography are given as number of workers (%).

analysis of hemogram parameters. 3 ml of blood samples were allowed to clot for the measurement of serum C-reactive protein (CRP), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL). The hemograms and serum biochemical parameters were measured immediately. 10 ml of blood samples were collected in sodium heparin containing tube and the plasma was obtained from 5 ml of the heparinized blood sample for the analysis of SOD, CAT, GR, GPx, GSH, MDA, 8-oxodG, TNF-alpha, IL-1beta, and CC16. The plasma samples were stored at -80 °C until the day of analysis. 5 ml of the remaining heparinized blood samples were used to analyze DNA damage. In addition, buccal epithelial cell samples were taken from each volunteer for the determination of MN frequencies.

#### 2.4. Analysis of biochemical parameters

The analysis of total blood counts including white blood cell (WBC), red blood cell (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelet (PLT), red cell distribution width standard deviation (RDW-SD), red cell distribution width (%), platelet distribution width (PDW), mean platelet volume (MPV), platelet-large cell ratio, procalcitonin, nucleated red blood cell (NRBC), neutrophils, monocytes, lymphocytes, eosinophil, basophils, immunoglobulin G levels were performed using the Sysmex XN-2000 hematology autoanalyzer (Sysmex Europe GmbH, Bornbarch 1, 22848, Norderstedt, Germany). The samples were analyzed in duplicate. The results were given as the mean ± standard deviation (range) and expressed as 10<sup>3</sup>/μl for WBC, PLT, neutrophils, monocytes, lymphocytes, EO, BASO, IG; 10<sup>6</sup>/μl for RBC; g/dl for HGB and MCHC; % for HCT, RDW-CV, P-LCR, PCT and NRBC; femtoliter (fl) for MCV, RDW-SD and MPV; picogram (pg) for MCH.

Inflammation marker (CRP), liver function parameters (AST, ALT), and serum lipid levels (TC, HDL) in the serum samples were determined using the Sysmex XN-2000 hematology autoanalyzer. The samples were analyzed in duplicate. The results were given as the mean ± standard deviation (range) and expressed as mg/dl for CRP, TC, and HDL; U/L for AST and ALT.

#### 2.5. Analysis of oxidative stress and immune parameters

The determination of SOD, CAT, GR, GPx enzyme activities and GSH, MDA, 8-oxodG, TNF-alpha, IL-1beta, and CC16 levels in the plasma samples were carried out spectrophotometrically using assay kits (SOD, CAT, GR, GPx, GSH, MDA from the Cayman Chemical Company (Ann

Arbor, MI, USA); 8-oxodG, TNF-alpha, IL-1beta, CC16 from Elabscience (Houston, T, USA)) with manufacturer's directions at 450 nm, 540 nm, 340 nm, 340 nm, 405 nm, 540 nm, 450 nm, 450 nm, 450 nm, and 450 nm, respectively. The samples were analyzed in duplicate. The results were given as the mean ± standard deviation (range) and expressed as U/ml for SOD; nmol/min/ml for CAT, GR, and GPx; μM for GSH and MDA; ng/ml for 8-oxodG; pg/ml for TNF-alpha, IL-1beta, and CC16.

#### 2.6. Alkaline single-cell gel electrophoresis (COMET) assay

The basic alkaline single-cell gel electrophoresis technique (Comet assay) was performed as described previously (Aydin et al., 2013, 2019; Collins, 2004). After the isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from heparinized blood samples, the cell concentrations were adjusted to approximately 2x10<sup>5</sup> cells/ml in PBS. Cell viability checked by trypan blue was higher than 85% in all cases. The cells were embedded in agarose on a microscope slide and lysed with fresh cold lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 100 mM Tris, 1% sodium sarcosinate, pH 10), with 1% Triton X-100 and 10% DMSO for 1 h at 4 °C to form nucleoids containing supercoiled loops of DNA linked to the nuclear matrix. Then, they were removed from the lysing solution, drained, and left in the electrophoresis solution (1 mM sodium EDTA and 300 mM NaOH, pH 13) for 20 min at 4 °C to allow the unwinding of DNA and expression of alkali-labile damage. Electrophoresis was carried out for 20 min at 4 °C with a current of 25 V (300 mA). After electrophoresis, the slides were neutralized and then incubated in 50%, 75% and 98% alcohol for 5 min, successively. The dried microscopic slides were stained with ethidium bromide and covered with a cover-glass prior to analysis with a Leica® fluorescence microscope under green light. The microscope was connected to a charge-coupled device camera and a personal computer-based analysis system (Comet Analysis Software, version 4.0, Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK) to determine the extent of DNA damage after electrophoretic migration of DNA fragments in the agarose gel. One-hundred nucleoids (comets) from each of duplicate slides were examined at 400x and the results were expressed as the percentage of DNA in tail (tail intensity).

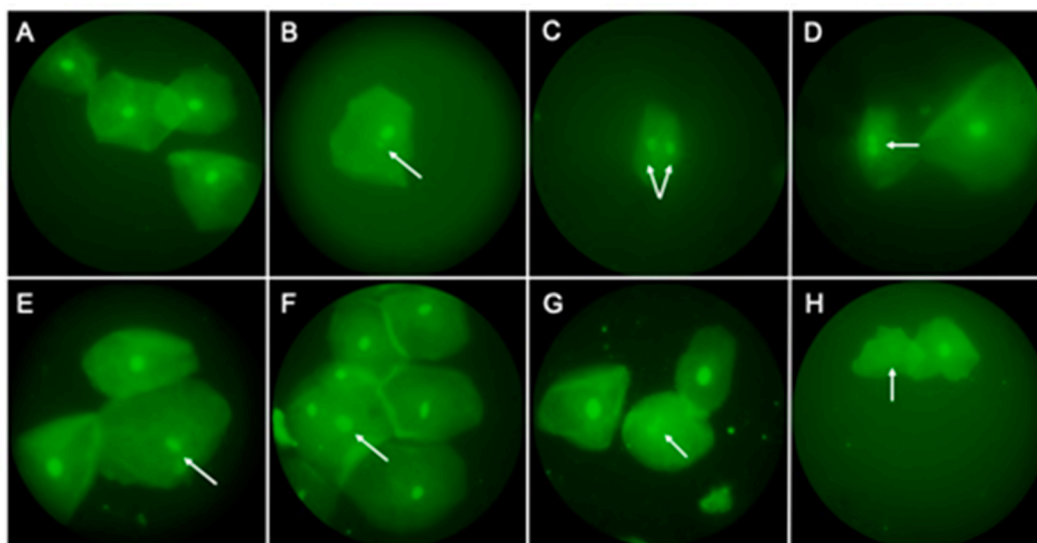
#### 2.7. Buccal micronucleus cytome (BMCyt) assay

The BMCyt assay for the determination of chromosomal genetic damage was performed according to the procedure described by Thomas and Fenech (2011) and Bonassi et al. (2011b). Volunteers were asked to rinse their mouths with distilled water and exfoliated buccal epithelial cells were collected by scraping from the mucosa of both cheek with a toothbrush. The cells were shaken in a centrifuge tube containing 10 ml of PBS. The cell suspensions were centrifuged at 1200 rpm for 5 min to remove bacteria and cell debris. The supernatant was discarded, and the procedure was repeated twice. For each sample, the cell suspension was spread on two clean and coded slides, air-dried, and then fixed in 80% methanol for 15 min. The cells were stained with acridine orange dye. For staining, the slides were covered with 0.1% acridine orange (CAS no: 10,127,023; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) and incubated for 15 min in the dark (Cao et al., 2002; Thomas and Fenech, 2011).

A total of 2000 cells per individual were classified and scored using fluorescence microscopy (Leica Microsystems DM2500, Wetzlar, Germany) equipment with a 440–490 excitation and 520 nm emission filters at 400x. Micronuclei were evaluated according to the scoring criteria described by Tolbert et al. (1992). Basal cells, binuclear cell, nuclear buds, pyknotic cell, condensed chromatin, karyorrhectic cell and karyolytic cells were excluded from evaluation of micronucleus-included cells (Fig. 1) (Thomas and Fenech, 2011).

#### 2.8. Statistical analysis

Analysis of data was performed using the program SPSS 20.0 for Windows. The normality of distribution was checked by the



**Fig. 1.** Various cells in exfoliated buccal cells. A) Basal cells, B) Micronucleus (MN)-included cell, C) Binuclear cell, D) Nuclear Buds (broken egg), E) Pyknotic cell, F) Condensed chromatin, G) Karyorrhectic cell, H) Karyolytic cell (oil-immersion 40x objective, acridine orange stain). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Kolmogorov-Smirnov test. The homogeneity of the variance was verified by the Levene test. The results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) for continuous variables and the number of cases percent (%) for categorical variables. The differences among the groups with normal distribution were determined by the one-way variance analysis (ANOVA) test. Post hoc analysis of group differences was performed by the least significant difference (LSD) test. The differences among the groups without normal distribution were evaluated by Mann-Whitney U for two groups and Kruskal-Wallis test for more than two groups. The magnitude of linear relationship was calculated by Pearson correlation analysis. For statistical analysis of BMCTy assay results, the z-test was applied for the frequency of MN. The *p*-value of less than 0.05 was considered as statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Characteristics of the study population

The characteristics (age, duration of exposure, protective mask usage (dust particle mask) and smoking habits) of the study groups were shown in Table 1. The mean ages of workers and controls were  $37.81 \pm 8.50$  years (range 21–58) and  $38.32 \pm 7.73$  years (range 21–57), respectively. The mean working duration of workers was  $9.81 \pm 8.33$  years (range 0.5–35). Only 12 (25%) workers used protective mask. The number of smokers in the workers (58.33%) (n:28) was significantly higher than smokers in the control group (39.02%) (n:16) ( $p < 0.05$ ). The average consumption of cigarettes in the workers and in the controls were  $16.96 \pm 7.12$  cigarettes/day and  $18.31 \pm 3.68$  cigarettes/day, respectively. No abnormalities in the ear and nose functions of the workers and the controls were noted. Results of pulmonary function in the workers exposed to marble dust were given in Table 2. The normal value of Forced Expiratory Volume (FEV1)/Force Vital Capacity (FVC) ratio in a healthy individual was 75–80%. An obstructive pattern was defined of FEV1/FVC ratios  $<75\%$  (GINA, 2019). In the workers, the mean FEV1/FVC ratio was found to be normal ( $85.96 \pm 18.68\%$ ). However, the percent values of FEV1 and FVC ( $59.85 \pm 20.63\%$  and  $53.58 \pm 20.36\%$ , respectively) individually were lower than the normal values ( $>80\%$ ). Thirty-four workers (71.83%) had obstructive, restrictive, or mixed pattern according to the presence and severity of airway obstruction as evaluated by FEV1 and FVC whereas 14 workers (29.17%) were found to have normal values. The chest radiography of

30 workers (62.5%) and all pulmonary functions of the control group were normal.

#### 3.2. Assessment of exposure in workers

The concentrations of airborne particulate matter (Particulate matter 1 (PM1), PM2.5, PM10 and total suspended particulate (TSP)) were measured in air samples taken from seven different units including maintenance, polishing, sizing, tumbled, cutting, and carpentry units (Table 3). Results were compared with the permissible exposure limit (PEL) value determined by Occupational Safety and Health Administration (OSHA). In general, PM10 levels ( $2117.5 \pm 1644.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) were higher than PM2.5 ( $178.8 \pm 140.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) and PM1 ( $91.4 \pm 125.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ). The mean TSP levels was found to be  $2574 \pm 1537 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (540.8–4870.4). In the sizing and cutting units, 23 workers (total 47.9%) were exposed to  $4553.5 \pm 258.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (4237–4870) dust, which are close to the limit values of  $5000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ .

#### 3.3. Biochemical parameters

The biochemical parameters of the study population were given in Table 4. There were no significant differences in all biochemical parameters except serum total cholesterol levels between workers and controls ( $p > 0.05$ ). Total cholesterol levels in the control group were found to be significantly higher than the worker group ( $p < 0.05$ ).

#### 3.4. Oxidative stress and immune parameters

The enzyme activities of SOD, CAT, GR, GPx and the levels of GSH, MDA, 8-oxodG, TNF-alpha, IL-1beta, and CC16 in plasma samples were given in Table 5. The enzyme activities of SOD, CAT, GR, GPx and the levels of GSH and CC16 in the workers were significantly lower than in the control group ( $p < 0.05$ ). MDA, 8-oxodG, TNF-alpha, and IL-1beta levels in the worker group were significantly higher than in the control group ( $p < 0.05$ ). Workers working in the marble processing plant more than 10 years had significantly lower GSH and CC16 levels and higher MDA, TNF-alpha, and IL-1beta levels ( $p < 0.05$ ). It was found that as the duration of exposure increased, GSH (regression coefficient ( $r$ ) =  $-0.516$ ) and CC16 ( $r$  =  $-0.635$ ) levels decreased, however MDA ( $r$  =  $0.406$ ), TNF-alpha ( $r$  =  $0.654$ ), and IL-1beta ( $r$  =  $0.621$ ) levels increased. There were no correlations between the duration of exposure and SOD,



**Table 3**  
Dust exposure in the marble processing plants.

	n	Mask usage	TSP ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	PM10 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	PM2,5 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	PM1 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	Limit value ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
Maintenance	3	1 (33.3%)	540.8	211.6	46.4	20.1	5000.0
Polishing	12	5 (41.7%)	2760.3	2124.8	171.9	48.1	5000.0
Sizing	5	0 (0.0%)	4237.7	3717.2	186.1	69.5	5000.0
Tumbled	6	3 (50.0%)	2389.1	2528.2	235.8	83.3	5000.0
Cutting	18	3 (16.7%)	4870.4	4640.0	450.0	368.5	5000.0
Carpentry	1	0 (0.0%)	1820.6	926.7	35.2	5.0	5000.0
Selection	3	0 (0.0%)	1401.3	673.8	126.3	45.1	5000.0
<b>Mean</b>			<b>2574.3</b>	<b>2117.5</b>	<b>178.8</b>	<b>91.4</b>	
<b><math>\pm</math>SD</b>			<b>1537.7</b>	<b>1644.5</b>	<b>140.1</b>	<b>125.1</b>	

The values of mask usage are given as number of workers (%). n: Numbers of workers; TSP: Total suspended particles; PM: Particulate matter. SD: Standard deviation.

CAT, GR, GPx, and 8-oxodG levels.

Mask usage did not change the oxidative stress and immune parameters in the workers. Smoking also did not affect these parameters in the workers and the controls.

### 3.5. DNA damage

DNA damage in the lymphocytes expressed as DNA tail intensity (% DNA in the tail) were shown in Table 6. DNA damage in the workers were found to be significantly higher than in the control group ( $p < 0.05$ ).

DNA damage in young (19–40 years) and older (41–60 years) workers and also smoker and non-smoker worker groups were higher when compared to their control groups ( $p < 0.05$ ). However, in both workers and controls, there were no significant differences between the older and young workers and also the smokers and the non-smokers.

Tail intensity were  $1.46 \pm 0.54$  (range 0.58–2.45),  $1.43 \pm 0.63$  (range 0.23–2.73), and  $2.15 \pm 0.81$  (range 0.70–3.38) in workers with short, medium and long duration of exposure, respectively. As the duration of exposure increased, DNA damage was found to be significantly higher in workers ( $p < 0.05$ ), but there were no significant differences between short and medium duration ( $p > 0.05$ ). Protective mask usage did not decrease DNA damage in workers. But the percentage of workers using protective masks is only 25% of the study group.

### 3.6. Buccal micronucleus assay

MN frequencies in the buccal exfoliated cells were shown in Table 7. Buccal MN frequency of the workers ( $8.9 \pm 4.7$ , range 1–18) were found to be significantly higher than the control group ( $5.1 \pm 2.8$ , range 1–11) ( $p < 0.05$ ).

The MN frequency of young workers was higher when compared to its controls ( $p < 0.05$ ), however there were no significant differences in the workers and controls for middle age group. In the workers, MN frequency was not different between the young and middle age group ( $p > 0.05$ ), however it increased in the middle age group when compared to the young age group ( $p < 0.05$ ).

Smoking seemed to increase MN frequencies significantly both in the workers and controls since MN frequencies were higher in the smoking workers compared to the non-smoking workers ( $p < 0.05$ ). For controls, MN frequencies were also higher in the smokers compared to the non-smokers ( $p < 0.05$ ).

MN frequencies were  $6.33 \pm 4.04$  (range 2–12),  $9.34 \pm 4.31$  (range 3–17), and  $11.56 \pm 4.85$  (range 1–18) in the workers with short, medium, and long duration of exposure, respectively. There was correlation between the duration of exposure and MN frequencies. It was found that as the exposure time increased, MN frequencies increased. MN frequencies in short-time workers (6 months–4.5 years) were found to be significantly higher than in medium-term workers (5–15 years) and long-time workers (16–35 years) ( $p < 0.05$ ). In addition, there were significant differences between short (6 months–4.5 years) and medium

duration (5–15 years) in MN frequencies ( $p < 0.05$ ).

MN frequencies were higher in the workers using protective masks when compared to non-users ( $p < 0.05$ ). Contrary to expectations, using protective mask did not affect MN frequencies and the confusing result may be due to the factors including age and smoking that increase the frequency of MN. Also, the number of workers using protective masks were lower than the workers who were not using masks.

## 4. Discussion

In the present study, we focused on the possible genotoxicity, immunotoxicity and oxidative stress parameters in workers in marble processing plants in Iscehisar (Afyonkarahisar), Turkey.

Turkey constitutes approximately 33% of the world reserve (5.1 billion  $\text{m}^3$  of 15 billion  $\text{m}^3$  world reserves) and ranks among the noteworthy marble producers in the world. Iscehisar (Afyonkarahisar), one of Turkey's most important marble production and processing region, is known worldwide in different types and quality of the marble (Celik and Sabah, 2008).

High levels of respirable dusts ( $<10 \mu\text{m}$ ) are produced while cutting, sizing, polishing, and smoothing marble. Occupational dusts exposure from marble industry is known to cause important health problems in workers. The toxic effects of respirable dusts vary according to the number of dust particles, their diameter, chemical composition and aerodynamic properties. Marble dust consists mainly of calcium carbonate and contains crystalline silica in different proportions less than 1%. Crystalline silica may cause various respiratory diseases that can range from irritation to lung cancer (Angotzi et al., 2005). Although the silica content is not very high in marble dust, it is assumed that silica may be responsible for the health effects of marble dust.

The pulmonary system toxicity related to marble dust exposure has been demonstrated in some clinical studies (Orman et al., 2002; Sezgi et al., 2012; Soysal et al., 2006; Yildirim et al., 2016); however, the studies on the effects of occupational marble dust exposure on genotoxicity and immunotoxicity are very limited. In the present study, a detailed research was conducted in order to understand how marble dust affects genotoxicity and immunotoxicity mechanisms along with oxidative stress parameters.

With the aim of preventing the risks in the workplace environment, the limit values for respirable dusts were determined as  $5000 \mu\text{g}/\text{m}^3$  by OSHA and as  $3000 \mu\text{g}/\text{m}^3$  by American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) (OSHA-b). OSHA determined the permissible exposure limit (PEL) value as  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$  and the National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), the recommended exposure limit (REL) value as  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$  for crystalline silica. ACGIH determined the time weighted average (TWA) value as  $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$  for crystalline silica (OSHA-c). In our study, the concentrations of airborne particulate matter (PM1, PM2.5, PM10 and TSP) were measured at seven different units including maintenance, polishing, sizing, tumbled, cutting, carpentry, and selection units in the marble processing plants. Turkey has a very diverse and large amounts of marble reserves, but it is not a common procedure to determine the silica content in the ambient

**Table 4**  
Biochemical parameters.

Parameters	Workers (n = 48)		Controls (n = 41)		p
WBC (10 <sup>3</sup> /μl)	7.91 ± 1.62	(4.87–11.07)	7.82 ± 1.69	(4.37–12.72)	0.809
RBC (10 <sup>6</sup> /μl)	5.35 ± 0.37	(4.66–6.67)	5.35 ± 0.55	(4.27–6.99)	0.942
HGB (g/dl)	15.48 ± 1.05	(12.5–18)	15.35 ± 1.10	(12.1–17.7)	0.578
HCT (%)	45.06 ± 2.82	(33.8–49.2)	45.12 ± 3.13	(36.2–51.3)	0.925
MCV (fl)	85.0 ± 5.39	(64.5–93.2)	84.71 ± 5.93	(62.5–94.2)	0.813
MCH (pg)	29.07 ± 2.44	(20.2–32)	28.85 ± 2.35	(19.9–32.3)	0.672
MCHC (g/dl)	34.15 ± 1.29	(31.4–36.8)	34.03 ± 0.94	(31.8–36.5)	0.625
PLT (10 <sup>3</sup> /μl)	225.2 ± 60.29	(108–388)	242.7 ± 43.37	(142–334)	0.122
RDW-SD (fl)	38.98 ± 2.13	(34.3–43.6)	39.56 ± 2.46	(34.5–44.2)	0.242
RDW-CV (%)	12.80 ± 1.11	(11.7–17.5)	13.08 ± 1.30	(11.5–18.7)	0.286
PDW (fl)	13.47 ± 1.98	(10.1–19.6)	13.29 ± 2.01	(10.4–20.4)	0.675
MPV (fl)	10.92 ± 0.84	(9.3–12.7)	10.53 ± 1.69	(1.4–13)	0.193
P-LCR (%)	32.07 ± 8.07	(0.9–48.04)	31.62 ± 6.87	(20.7–48.3)	0.780
PCT (%)	0.24 ± 0.06	(0.13–0.44)	0.26 ± 0.05	(0.16–0.35)	0.203
NRBC (%)	0 ± 0	(0–0.01)	0 ± 0	(0–0)	0.160
Neutrophils (10 <sup>3</sup> /μl)	4.83 ± 1.31	(2.49–8.54)	4.38 ± 1.36	(2.09–7.85)	0.119
Monocytes (10 <sup>3</sup> /μl)	0.52 ± 0.17	(0.33–1.32)	0.60 ± 0.13	(0.38–0.79)	0.095
Lymphocytes (10 <sup>3</sup> /μl)	2.33 ± 0.69	(1.48–4.08)	2.57 ± 0.74	(1.27–4.52)	0.115
EO (10 <sup>3</sup> /μl)	0.17 ± 0.12	(0.03–0.57)	0.21 ± 0.10	(0.03–0.48)	0.139
BASO (10 <sup>3</sup> /μl)	0.05 ± 0.02	(0.01–0.13)	0.05 ± 0.02	(0.02–0.11)	0.826
IG (10 <sup>3</sup> /μl)	0.03 ± 0.02	(0.01–0.11)	0.03 ± 0.01	(0.01–0.07)	0.677
CRP (mg/dl)	0.14 ± 0.16	(0–0.4)	0.15 ± 0.17	(0–0.6)	0.746
AST (U/l)	21.56 ± 4.14	(13.9–33.5)	20.21 ± 5.91	(11.6–41.4)	0.225
ALT (U/l)	21.68 ± 9.71	(10.1–56.3)	25.90 ± 17.09	(9.1–89.4)	0.167
TC (mg/dl)	158.7 ± 41.19	(90.8–273.6)	176.5 ± 32.90	(113.9–273.6) <sup>a</sup>	0.026
HDL (mg/dl)	39.67 ± 7.14	(27.5–57.5)	41.77 ± 11.38	(25.1–83.2)	0.310

The values are given as the mean ± standard deviation (range). <sup>a</sup>p < 0.05, compared to controls. WBC: White blood cell; RBC: Red blood cell; HGB: Hemoglobin; HCT: Hematocrit; MCV: Mean corpuscular volume; MCH: Mean corpuscular hemoglobin; MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration; PLT: Platelet; RDW-SD: Red cell distribution width standard deviation; femtoliter (fl); RDW-CV: Red cell distribution width; PDW: Platelet distribution width; MPV: Mean platelet volume; P-LCR: Platelet-large cell ratio; PCT: Procalcitonin; NRBC: Nucleated RBC; EO: Eosinophil; BASO: Basophils; IG: Immunoglobulin G; CRP: C-reactive protein; AST: Aspartate aminotransferase; ALT: Alanine aminotransferase; TC: total cholesterol; HDL: High-density lipoprotein.

air of marble dust-working areas. However, according to the study involving marble quarrying in Tuscany located in the Apuanian Alps, crystalline silica in marble dust is less than 1% (Angotzi et al., 2005). Located in the Alpine zone (same as Tuscany) where the world's richest natural stone formations, the silica content of marble dust is assumed to be less than 1%. In our workplace, PM10 levels (2117.5 ± 1644.5

**Table 5**  
Oxidative stress and immune parameters.

Parameters	Workers (n = 48)		Controls (n = 41)		p
SOD (U/ml)	0.26 ± 0.09	(0.12–0.47)	0.39 ± 0.10	(0.22–0.67) <sup>a</sup>	<0.001
CAT (nmol/min/ml)	71.25 ± 18.35	(32.94–113.85)	99.17 ± 13.98	(74.91–125.38) <sup>a</sup>	<0.001
GR (nmol/min/ml)	26.17 ± 5.86	(15.03–38.82)	34.63 ± 12.08	(17.42–79.46) <sup>a</sup>	<0.001
GPx (nmol/min/ml)	125.0 ± 14.99	(90.42–161.89)	137.0 ± 32.23	(97.71–298.40) <sup>a</sup>	0.033
GSH (μM)	8.68 ± 3.47	(2.98–16.04)	12.43 ± 4.38	(5.21–23.59) <sup>a</sup>	<0.001
MDA (μM)	2.60 ± 0.60	(1.48–3.96)	2.07 ± 0.58	(1.21–3.45) <sup>a</sup>	<0.001
8-OHdG (ng/ml)	32.92 ± 8.07	(19.29–52.36)	24.12 ± 7.03	(8.18–42.16) <sup>a</sup>	<0.001
TNF-alpha (pg/ml)	14.73 ± 7.62	(7.81–38.69)	10.66 ± 2.63	(7.87–17.86) <sup>a</sup>	<0.001
IL-1beta (pg/ml)	6.14 ± 5.78	(1.70–25.37)	3.43 ± 1.93	(1.89–10.24) <sup>a</sup>	0.003
CC16 (pg/ml)	528.6 ± 150.0	(259.2–980)	901.0 ± 247.0	(598.8–1401.2) <sup>a</sup>	<0.001

The values are given as the mean ± standard deviation (range). <sup>a</sup>p < 0.05, compared to controls. SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; GR: glutathione reductase; GPx: glutathione peroxidase; GSH: glutathione; MDA: malondialdehyde. TNF-alpha: tumor necrosis factor-alpha; IL-1beta: interleukin-1beta; CC16: clara cell secretory protein 16.

**Table 6**  
DNA damage in the lymphocytes of workers exposed to marble dust and controls.

Factors	Tail intensity (% DNA in the tail)			
	Workers (n = 48)		Controls (n = 41)	
	1.59 ± 0.69	(0.23–3.38)	0.95 ± 0.29	(0.43–1.52) <sup>a</sup>
Age				
Younger workers (19–40)	1.57 ± 0.68	(0.23–3.38)	0.92 ± 0.28	(0.43–1.31) <sup>a</sup>
Older workers (41–60)	1.64 ± 0.74	(0.70–2.72)	1.01 ± 0.32	(0.56–1.52) <sup>a</sup>
Smoking				
Smokers	1.60 ± 0.74	(0.23–3.38)	0.91 ± 0.31	(0.43–1.52) <sup>a</sup>
Non-smokers	1.59 ± 0.65	(0.70–2.72)	0.98 ± 0.29	(0.56–1.49) <sup>a</sup>
Duration of exposure (years)				
Short duration (0.5–4.5)	1.46 ± 0.54	(0.58–2.45)		
Medium duration (5–15)	1.43 ± 0.63	(0.23–2.73)		
Long duration (16–35)	2.15 ± 0.81	(0.70–3.38) <sup>b</sup>		
Using protective mask				
Yes	1.66 ± 0.69	(0.70–2.52)		
No	1.57 ± 0.70	(0.23–3.38)		

The values are given as the mean ± standard deviation (range). <sup>a</sup>p < 0.05, compared to controls; <sup>b</sup>p < 0.05, long exposure duration compared to short and medium exposure duration.

μg/m<sup>3</sup>) were higher than PM2.5 (178.8 ± 140.1 μg/m<sup>3</sup>) and PM1 (91.4 ± 125.1 μg/m<sup>3</sup>). The mean of TSP levels was 2574 ± 1537 μg/m<sup>3</sup> (540.8–4870.4) that was lower than the limit values of OSHA (5000 μg/m<sup>3</sup>). However, 23 workers (47.9%) working in sizing and cutting areas, were exposed to high TPS levels (4553.5 ± 258.4 μg/m<sup>3</sup>

**Table 7**

MN frequencies in buccal exfoliated cells of workers exposed to marble dust and controls.

Factors	MN frequencies (2000)			
	Workers (n = 48)		Controls (n = 41)	
	8.90 ± 4.70	(1–18)	5.10 ± 2.80	(1–11) <sup>a</sup>
Age				
Younger workers (19–40)	8.88 ± 4.70	(2–17)	4.06 ± 2.18	(1–11) <sup>a, b</sup>
Older workers (41–60)	8.84 ± 4.74	(2–18)	6.83 ± 2.88	(2–11)
Smoking				
Smokers	10.34 ± 4.7	(2–18) <sup>c</sup>	6.85 ± 2.68	(3–11) <sup>a, c</sup>
Non-smokers	6.80 ± 3.83	(1–13)	3.94 ± 2.21	(1–10) <sup>a</sup>
Duration of exposure (years)				
Short duration (0.5–4.5)	6.33 ± 4.04	(2–12)		
Medium duration (5–15)	9.34 ± 4.31	(3–17) <sup>d</sup>		
Long duration (16–35)	11.56 ± 4.85	(1–18) <sup>e</sup>		
Using protective mask				
Yes	11.15 ± 4.40	(4–18)		
No	8.10 ± 4.55	(2–17)		

The values are given as the mean ± standard deviation (range). <sup>a</sup>p < 0.05, workers compared to controls. <sup>b</sup>p < 0.05, younger age group compared to older age group. <sup>c</sup>p < 0.05, smokers compared to non-smokers. <sup>d</sup>p < 0.05, medium exposure duration compared to short exposure duration. <sup>e</sup>p < 0.05, long exposure duration compared to short and medium exposure duration.

(4237–4870)) that were higher than ACGIH limits (3000 µg/m<sup>3</sup>) and also very close to the limit values of OSHA.

OSHA confirmed that between the years of 1980–1992, respirable crystalline silica levels in 48% of 255 workplaces were above the PEL (Freeman and Grossman, 1995). It was stated that respirable crystalline silica levels exceeded the specified limits, especially in the work areas such as rock drilling and sandblasting (Castranova and Vallyathan, 2000). Because of the lack of a definite treatment of silica-induced diseases; prevention, implementing the necessary regulations and inspection of the workplaces for potential risks should be targeted. In addition, occupational exposure to silica was predicted to cause 440,000 cancer cases between 2010 and 2069 in the EU if the permitted exposure limits will not be reduced (Cherrie et al., 2011).

In the present study, no abnormalities were found in ear and nose functions. Pulmonary functions of control group and also the mean FEV1/FVC in workers was found to be normal (85.96 ± 18.68%), consistent with the previous studies (Anlar et al., 2018). However, FEV1 and FVC values (59.85 ± 20.63% and 53.58 ± 20.36%, respectively) individually were lower than the normal values (>80%). 14 workers (29.17%) were healthy, 34 workers (71.83%) had obstructive, restrictive or mixed pattern according to presence and severity of airway obstruction evaluated by FEV1 and FVC. The chest radiography of 30 workers (62.5%) were normal, however 18 workers (37.5%) had abnormal chest radiography including symmetric or asymmetric lymphadenopathy and reticulonodular interstitial pattern. Pulmonary functions were abnormal in 16 of 22 workers who worked for more than 10 years. These results showed that a majority of workers displayed onset of obstructive and/or restrictive pulmonary abnormalities. It appears that respiratory functions were impaired with an exposure time of more than 10 years. Silicosis was not diagnosed in our workers. In a study of conducted on 67 workers, silicosis ratio was found to be 12% of workers working in quartz processing plants in Turkey and it was recommended to take precautions to reduce dust in occupational areas (Polatli et al., 2001).

In a study conducted in workers (n = 110) in a marble processing plant in Diyarbakir, Turkey with a mean age of 33.4 ± 6.3 years old, the

respiratory symptoms, respiratory functions, and chest radiography findings related to marble dust exposure were evaluated. The workers were grouped according to dust concentrations in working air (office 1.7 mg/m<sup>3</sup>; tile cutting 4.6 mg/m<sup>3</sup>; block cutting 5.2 mg/m<sup>3</sup>; polishing mg/m<sup>3</sup>). It was found that symptoms such as cough and sputum were observed more frequently in workers exposed to high concentration of dust compared to the group which exposed to low dust concentration (office) (p < 0.05). In addition, FEV1, FEV1/FVC, forced expiratory flow (FEF) 25–75% were found to be significantly lower than control group. Although higher pathological findings were found on chest radiography in the groups with high dust concentrations, the difference was not statistically significant. It has been reported that chest radiography pathologies occur more frequently in workers working for more than ten years in the marble processing plants (p < 0.001) (Sezgi et al., 2012).

Similar to our study, the negative effects of occupational marble dust on respiratory functions were shown in the studies conducted on 236 male workers in Afyonkarahisar, Turkey (Orman et al., 2002) and 50 male workers in Aydin, Turkey (Soysal et al., 2006). In conclusion, the intensity and duration of marble dust exposure in workers are associated with respiratory symptoms and chest radiography findings.

Oxidative stress is a phenomenon caused by an imbalance between production and accumulation of oxygen reactive species (ROS) in cells and tissues, which is the ability of a biological system to detoxify these reactive products. High dose and/or inadequate removal of ROS, especially superoxide anion, results in oxidative stress. Superoxide anion is dismutated by SODs to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that is catalyzed to H<sub>2</sub>O by catalase, peroxidases, or GPx. GPx catalyzes the reduction of various hydroperoxides (e.g., H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) to H<sub>2</sub>O via oxidation of reduced GSH into its disulfide form (GSSG). GRx catalyzes the reduction of glutathione disulfide (GSSG) to the sulfhydryl form glutathione (GSH), which is a critical molecule in resisting oxidative stress and maintaining the reducing environment of the cell. ROS also represent a component of the innate immune system, and they are not only involved in the respiratory burst of neutrophils, but also signal inflammatory cell chemotaxis into sites of inflammation (Gupta et al., 2014). TNF-alpha is also a critical cytokine, which plays a pivotal role in the pathogenesis of immune disorders and tumor development. The roles of inflammatory cytokines and the immune response in cancer remain paradoxical. In the case of TNF, there is undisputed evidence indicating both procarcinogenic and anticarcinogenic activities (Carbone and Yang, 2011). IL-1beta is a potent pro-inflammatory cytokine that is crucial for host-defense responses to infection and injury (Lopez-Castejon and Brough, 2011).

In our study, the enzyme activities of SOD, CAT, GR, GPx and the levels of GSH, and CC16 in the workers were significantly lower than in control group (p < 0.05). MDA, 8-oxodG, TNF-alpha, and IL-1beta levels in the workers were significantly higher than in controls (p < 0.05). Strong correlations were found between the duration of exposure and the levels of GSH, CC16, MDA, TNF-alpha, and IL-1beta. As the duration of exposure increased (more than 10 years), GSH and CC16 levels decreased; however, MDA, TNF-alpha, and IL-1beta levels increased. The decrease in CC16 level indicates that workers may be incapable of protecting the respiratory system against oxidative stress and inflammation. There were no correlations between the duration of exposure and the levels of SOD, CAT, GR, GPx, and 8-oxodG. Mask usage and smoking did not change the oxidative stress and immune parameters. No significant differences were found in all biochemical parameters except serum total cholesterol levels. Similar to our findings, Anlar et al. (2018) reported that plasma 8-oxodG levels in ceramic workers (n = 99) exposed to complex mixture of chemicals mainly crystalline silica were higher compared to its controls. A significant reduction of serum CC16 has also been found in miner workers (n = 86) exposed to crystalline silica. They concluded that the decreases in the serum CC16 level probably reflect early toxic effects of crystalline silica particles on the respiratory epithelium. (Bernard et al., 1994; Gu et al., 2021). Crystalline silica can lead to oxidative stress with the increases in the expression of antioxidant enzymes such as GPx, SOD and the enzyme inducible

nitric oxide synthase. In addition, generation of oxidants induces cell signaling pathways such as extracellular signal-regulated kinase phosphorylation, MAPK/ERK kinase and increases the production of inflammatory cytokines (TNF-alpha, IL-1beta, etc.), and the activation of specific transcription factors (NF-kB, AP-1 etc.) (Fubini and Hubbard, 2003).

In a study (n = 48, male), the levels of neopterin, a biomarker of the activation of the cell mediated immune system and oxidative stress, were examined in the workers exposed to marble dusts. Neopterin levels in urine were reported to be significantly higher in workers (p < 0.001). and crystalline silica in marble dust was found to be responsible for the increased levels of neopterin (Gaballah et al., 2015).

Autoimmune diseases have been reported in workers in marble processing plants: Erasmus syndrome (sclerosis accompanied by crystal silica exposure) has been reported in a marble worker of 70 years old in Italy (Bello et al., 2015). In addition, Caplan syndrome (rheumatoid arthritis accompanied by crystal silica exposure) has been reported in a 45-year-old worker with history of 7 years marble dust exposure (Rozin and Toledano, 2013). The most acceptable theory that explains the relationship between autoimmune disorders of the chronic exposure of crystalline silica, is the corruption of apoptotic mechanism in lymphocytes. In this case, Fas protein, expressed in the cell membrane of lymphocytes and belongs to the TNF receptor family, is considered to be the trigger of the caspase cascade leading to DNA fragmentation (Nagata, 1994; Peng, 2006).

Only few studies have reported genotoxicity in relation to occupational exposure to marble dust and/or silica containing dusts (Borm et al., 2018; Wultsch et al., 2021). The genotoxicity in marble dust-exposed workers may be caused directly by silica particles and/or by free radicals released from activated alveolar macrophages and neutrophils following silica or particulate marble dust inhalation. In our study, DNA damage in the PMNCs of marble workers were found to be significantly higher than in the control group and there was a clear correlation between the increased DNA damage and the duration of exposure. Workers working in marble processing plants more than 16 years had significantly higher DNA damage when compared to the workers working shorter duration. Similar to our study, Başaran et al. (2003) found that DNA damage in the lymphocytes of foundry and pottery workers who were exposed silica was significantly higher when compared to control group using comet assay. Interestingly, in our study, protective mask usage did not affect DNA damage in workers. But the number of workers using masks in the study was quite low, it is thought that the result was not meaningful. The percentage of workers using protective masks is only 25% of the total workers. There is also a doubt in the answers of workers that claimed that they have been using protective masks, it is assumed that the questionnaire was not answered correctly.

Oxidative DNA damage was found to be increased in the nasal epithelium of workers (n = 135) in pottery, ceramics, and marble processing plants in Tuscany-Italy. It has been suggested that occupational silica exposure may cause genotoxic damage that can cause important health problems in workers (Peluso et al., 2015). In systematic review and meta-analysis which focused on MN formation in buccal cells, the risk estimates strongly suggested that occupational genotoxic exposures, especially to silica and formaldehyde increase the MN frequencies. It is also suggested that the frequency of buccal MN could be useful as biomarkers of cancer risk in exposed workers (Hopf et al., 2019).

In our study, we determined MN frequencies in the buccal exfoliated cells of workers exposed to marble dusts containing crystalline silica. Our results showed that marble workers had significantly higher frequencies of MN when compared to controls. Increased MN frequencies were related to the increases in smoking and duration of exposure. MN formation was not only seen in target tissues (exfoliated epithelial cells from the upper respiratory tract) but also in surrogate tissue (i.e. peripheral blood cells). Demircigil et al. (2010) found that workers (n = 50) from different workplaces exposed to crystalline silica-containing

dust have more pronounced induction of MN in nasal cells (2.9-fold) and in lymphocytes (2.2-fold). These findings indicate that the part of genotoxic effect is caused by indirect mechanisms, particularly the formation of reactive oxygen species and inflammatory reactions (Borm et al., 2018; Fubini and Hubbard, 2003).

Consisted with our study, DNA damage in the lymphocytes and MN frequencies in buccal exfoliated cells were higher in workers (n:45) exposed to silica from mines and stone quarries. (Halder and De, 2012). Anlar et al. (2018) reported the possible genotoxic damage in ceramic workers exposed to complex mixture of chemicals mainly crystalline silica. Consistent with our findings, DNA damage in the lymphocytes, MN frequencies in buccal epithelial cells, and plasma 8-oxodG levels in the workers were higher when compared to controls. They concluded that occupational chemical mixture exposure in ceramic industry may cause genotoxic damage.

Our results show that the decreases in antioxidant enzyme activities in occupational marble dust exposure may decrease the protection against oxidative stress. Moreover, the increases in TNF-alfa and IL-1beta releases indicate the activation of immune response. It is concluded that the genotoxic effects of marble dust may be caused by indirect mechanisms, particularly the changes in inflammatory responses and oxidative stress.

There were some limitations of the present study. The crystalline silica content in the ambient air of marble dust-working areas could not be determined since only respirable dust measurements are obligatory in Turkey. Also, marble dust levels in different marble processing plants may vary and therefore the estimates from this cohort may not reflect all marble industries.

## 7. Conclusions

In conclusion, despite some limitations, our findings clearly confirm that the occupational exposure of silica-containing marble dust, may affect oxidative stress and immune parameters (SOD, CAT, GR, GPx enzyme activities; GSH, MDA, 8-oxodG, TNF-alpha, IL-1beta, CC16 levels) and leads to increases in DNA damage. It seems that it is necessary to improve ventilation practices, and use suitable protective masks, as well as to reduce the limit values in order to reduce occupational exposure to silica-containing marble dust.

## Author contribution

Merve Becit: Conceptualization, Methodology, Software, Formal analysis, Investigation, Writing. Şule Çilekar: Methodology, Formal analysis. Mustafa Mert Başaran: Methodology, Software, Investigation, Writing- Reviewing and Editing. Halit Buğra Koca: Methodology, Writing- Reviewing and Editing. Sefa Çelik, Methodology, Writing- Reviewing and Editing. Sevtap Aydın Dilsiz, Conceptualization, Methodology, Software, Investigation, Resources, Writing- Reviewing and Editing, Project administration, Funding acquisition, Supervision

## Specific information

Information on funding source.

This work was supported by the Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit in Ankara, Turkey (Project number: TDK-2020-18626).

The sponsoring organization provided financial support for the supplying of experimental materials necessary for the study. The sponsoring organization did not play a role in the study design; in the collection, analysis, interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

## Ethics information

All volunteers were informed about the aim of our study and their

written consents were obtained. This study was approved by the ethics committee of Hacettepe University, Ankara, Turkey (Date: October 22, 2019 and Registration number: GO 19/975). The study was conducted in accordance with the ethical standards of the 1964 Helsinki Declaration. The ethical approval was added.

### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Acknowledgement

This work was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit in Turkey (Project number: TDK-2020-18626).

### References

- Angotzi, G., Bramanti, L., Tavarini, D., Gragnani, M., Cassiodoro, L., Moriconi, L., Saccardi, P., Pinto, I., Stacchini, N., Bovenzi, M., 2005. World at work: marble quarrying in Tuscany. *Occup. Environ. Med.* 62, 417–421.
- Anlar, H.G., Taner, G., Bacanlı, M., Iritas, S., Kurt, T., Tutkun, E., Yilmaz, O.H., Basaran, N., 2018. Assessment of DNA damage in ceramic workers. *Mutagenesis* 33 (1), 97–104.
- Aydın, S., Bacanlı, M., Anlar, H.G., Çal, T., Ari, N., Undeger Bucurğat, U., Başaran, A.A., Başaran, N., 2019. Preventive role of Pycnogenol® against the hyperglycemia-induced oxidative stress and DNA damage in diabetic rats. *Food Chem. Toxicol.* 124, 54–63, 2019.
- Aydın, A., Canpinar, H., Undeger, U., Guc, D., Colakoglu, M., Kars, A., Basaran, N., 2013. Assessment of immunotoxicity and genotoxicity in workers exposed to low concentrations of formaldehyde. *Ach. Toxicol.* 87, 145–153.
- Basaran, N., Shubair, M., Undeger, U., Kars, A., 2003. Monitoring of DNA damage in foundry and pottery workers exposed to silica by the alkaline comet assay. *Am. J. Ind. Med.* 43, 602–610.
- Bello, S., Rinaldi, A., Trabucco, S., Serafino, L., Bonali, C., Lapadula, G., 2015. Erasmus syndrome in a marble worker. *Reumatismo* 67 (3), 116–122.
- Bernard, A.M., Lorenzo-Gonzalez, J.M., Siles, E., Trujillano, G., Lauwerys, R., 1994. Early decrease of serum clara cell protein in silica-exposed workers. *Eur. Respir. J.* 7, 1932–1937.
- Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C., Fenech, M., 2011a. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis* 26, 93–100.
- Bonassi, S., Coskun, E., Ceppi, M., Lando, C., Bolognesi, C., Burgaz, S., Holland, N., Kirsh-Volders, M., Knasmueller, S., Zeiger, E., Carnesolatas, D., Cavallo, D., da Silva, J., de Andrade, V.M., Demircigil, G.C., Domínguez Odio, A., Donmez-Altuntas, H., Gattas, G., Giri, A., Giri, S., Gómez-Meda, B., Gómez-Arroyo, S., Hadjidekova, V., Haveric, A., Kamboj, M., Kurteshi, K., Martino-Roth, M.G., Montero Montoya, R., Nersesyan, A., Pastor-Benito, S., Favero Salvadori, D.M., Shaposhnikova, A., Stopper, H., Thomas, P., Torres-Bugarín, O., Yadav, A.S., Zúñiga González, G., Fenech, M., 2011b. The Human Micronucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat. Res.* 728 (3), 88–97.
- Bonassi, S., Milić, M., Neri, M., 2016. Frequency of micronuclei and other biomarkers of DNA damage in populations exposed to dusts, asbestos and other fibers. A systematic review. *Mutat. Res.* 770 (Pt A), 106–118.
- Borm, P.J.A., Fowler, P., Kirkland, D., 2018. An updated review of the genotoxicity of respirable crystalline silica. *Part. Fibre Toxicol.* 15 (1), 23.
- Broeckaert, F., Bernard, A., 2000. Clara cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker. *Clin. Exp. Allergy* 30 (4), 469–475.
- Cao, J., Liu, Y., Sun, H., Cheng, G., Pang, X., Zhou, Z., 2002. Chromosomal aberrations, DNA strand breaks and gene mutations in nasopharyngeal cancer patients undergoing radiation therapy. *Mutat. Res.* 504 (1–2), 85–90.
- Carbone, M., Yang, H., 2011. Molecular pathways: targeting mechanisms of asbestos and erionite carcinogenesis in mesothelioma. *Clin. Canc. Res.* 18, 598–604, 3.
- Castranova, V., Vallyathan, V., 2000. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Environ. Health Perspect.* 108 (4), 675–684.
- Celik, M.Y., Sabah, E., 2008. Geological and technical characterization of Isehisar (Afyon-Turkey) marble deposits and the impact of marble waste on environmental pollution. *J. Environ. Manag.* 87 (1), 106–116.
- Ceppi, M., Biasotti, B., Fenech, M., Bonassi, S., 2010. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. *Mutat. Res.* 705 (1), 11–19.
- Cherrie, J.W., Ng, M.G., Shafir, A., van Tongeren, M., Searl, A., Sanchez-Jimenez, A., Mistry, R., Sobey, M., Corden, C., Rushton, L., Hutchings, S., 2011. Health, socio-economic and environmental aspects of possible amendments to the EU directive on the protection of workers from the risks related to exposure to carcinogens and mutagens at work. *SHEcan Summary Report P937–P999*.
- Collins, A.R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 26 (3), 249–261.
- Davies, K.J.A., 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50, 279–289.
- Demircigil, G.C., Coskun, E., Vidinli, N., Erbay, Y., Yilmaz, M., Cimrin, A., Schins, R.P., Borm, P.J., Burgaz, S., 2010. Increased micronucleus frequencies in surrogate and target cells from workers exposed to crystalline silica-containing dust. *Mutagenesis* 25, 163–169.
- Donmez-Altuntas, H., Baran, M., Oymak, F.S., Hamurcu, Z., Imamoglu, N., Ozesmi, M., Demirtas, H., 2007. Investigation of micronucleus frequencies in lymphocytes of inhabitants environmentally exposed to chrysotile asbestos. *Int. J. Environ. Health Res.* 17, 45–51.
- Dusinská, M., Barancoková, M., Kazimírová, A., Harrington, V., Volkovová, K., Staruchová, M., Horská, A., Wsólóvá, L., Collins, A., 2004. Does occupational exposure to mineral fibres cause DNA or chromosome damage? *Mutat. Res.* 553, 103–110.
- El-Gammal, M.L., Ibrahim, M.S., Badr, E.A., Asker, S.A., El-Galad, N.M., 2011. Health risk assessment of marble dust at marbl workshops. *Nat. Sci.* 9 (11), 144–154.
- Elsabahy, M., Wooley, K.L., 2013. Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity. *Chem. Soc. Rev.* 42 (12), 5552–5576.
- Freeman, C.S., Grossman, E.A., 1995. Silica exposures in workplaces in the United States between 1980 and 1992. *Scand. J. Work. Environ. Health* 21 (2S), 47–49.
- Fubini, B., Hubbard, A., 2003. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic. Biol. Med.* 34 (12), 1507–1516.
- Gaballah, I.M.F., Manawil, M., El-Sherif, G.H., 2015. Neopterin versus oxidative stress indicators among egyptian workers in marble industry. *Egyptian J. Occup. Med.* 39 (1), 67–83.
- Gina, 2019. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2019. <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2019/06/GINA-2019-main-report-June-2019-wms.pdf>. (Accessed 16 March 2021).
- Gövercin, M., Tomatır, A.G., Eyyapan, F., Acikbas, I., Coşkun, G., Akdag, B., 2014. Elevated micronucleus frequencies in patients with pleural plaque secondary to environmental exposure to asbestos. *Genet. Mol. Res.* 13, 598–604.
- Gu, Y., He, W., Wang, Y., Chen, J., Wang, H., Gao, P., Yang, S., Zhu, X., Ma, W., Li, T., 2021. Respiratory effects induced by occupational exposure to refractory ceramic fibers. *J. Appl. Toxicol.* 41 (3), 421–441.
- Gupta, R.K., Patel, A.K., Shah, N., Chaudhary, A.K., Jha, U.K., Yadav, U.C., Gupta, P.K., Pakuwal, U., 2014. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 15 (11), 4405–4409.
- Halder, A., De, M., 2012. Increase in DNA damage in lymphocytes and micronucleus frequency in buccal cells in silica-exposed workers. *Indian J. Occup. Environ. Med.* 16 (1), 34–37.
- Hopf, N.B., Bolognesi, C., Danuser, B., Wild, P., 2019. Biological monitoring of workers exposed to carcinogens using the buccal micronucleus approach: a systematic review and meta-analysis. *Mutat. Res.* 781, 11–29.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1997. Silica, some silicates, coal dust and para-aramid fibrils. Monograph on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. IARC Press, Geneva.
- Kawami, M., Ebihara, I., 2000. Cytogenetic damage and cell-mediated immunity in pneumoconiosis. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 19, 103–108.
- Leso, V., Fontana, L., Romano, R., Gervetti, P., Iavicoli, I., 2019. Artificial stone associated silicosis: a systematic review. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 16 (4), 568.
- Leung, C.C., Yu, I., T. S., Chen, W., 2012. Silicosis. *Lancet* 379 (9830), 2008–2018.
- Lopez-Castejon, G., Brough, D., 2011. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22 (4), 189–195.
- Marini, V., Michelazzi, L., Cioè, A., Fucile, C., Spigno, F., Robbiano, L., 2011. Exposure to asbestos: correlation between blood levels of mesothelin and frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res.* 721, 114–117.
- Matteis, S.D., Heederis, D., Burdorf, A., Colosio, C., Cullinan, P., Olsson, A., Raynal, A., Rooijackers, J., Santonen, T., Sastre, J., Schlünssen, V., Tongeren, M., Sigsgaard, T., 2017. Current and new challenges in occupational lung diseases. *Eur. Respir. Rev.* 26 (146), 170080.
- Nagata, S., 1994. Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor. *Adv. Immunol.* 57, 129–144.
- NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health), 2002. NIOSH Hazard Review: Health Effects of Occupational Exposure to Respirable Crystalline Silica. DHHS (NIOSH) Publication, Cincinnati, OH, p. 145.
- Orman, A., Unlu, M., Cirit, M., Yucel, A., 2002. Respiratory symptoms, pulmonary function tests and chest X-rays in marble workers. *Turkish Thoracic J* 3 (2), 188–193.
- OSHA (Occupational Safety and Health Administration)-a. Safety and Health Topics/Silica, Crystalline. <https://www.osha.gov/dsg/topics/silicacrystalline/> (accessed 16 March 2021).
- OSHA (Occupational Safety and Health Administration)-b. Occupational chemical database/Silica, fused, respirable dust <https://www.osha.gov/chemicaldata/chemResult.html?RecNo=442> (accessed 16 March 2021).
- OSHA (Occupational Safety and Health Administration)-c. Occupational chemical database/Silica, crystalline, mixed respirable (quartz, cristobalite, tridymite) <https://www.osha.gov/chemicaldata/chemResult.html?RecNo=278> (accessed 16 March 2021).
- Peluso, M.E., Munnia, A., Giese, R.W., Chellini, E., Ceppi, M., Capacci, F., 2015. Oxidatively damaged DNA in the nasal epithelium of workers occupationally exposed to silica dust in Tuscany region. Italy. *Mutagenesis* 30 (4), 519–525.
- Peng, S.L., 2006. Fas (CD95)-related apoptosis and rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 45, 26–30.

- Pilger, A., Rüdiger, H.W., 2006. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 80, 1–15.
- Polatlı, M., Tukan, H., Akdilli, A., Cildag, O., 2001. Silicosis risk in quartz workers. *Res. Discl.* 12, 90–95.
- Rozin, A.P., Toledano, K., 2013. Marble pneumoconiosis associated with mixed connective tissue disease. *Intern. Med. Inside* 1 (6). <https://www.hoajonline.com/journals/pdf/2052-6954-1-6.pdf>. (Accessed 16 March 2021).
- Sellappa, S., Prathyuman, S., Balachandar, V., 2010. DNA damage induction and repair inhibition among building construction workers in South India. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 11, 875–880.
- Sezgi, C., Abakay, O., Onder, H., Selimoglu-Şen, H., Abakay, A., Kaya, H., Ayhan, M., Tannikulu, A.Ç., 2012. The respiratory functions and radiologic findings of the marble factory workers. *J. Clin. Exp. Invest.* 3 (2), 250–254.
- Soysal, N., Sonmez, H.M., Karabas, M.K., 2006. The respiratory function tests of the marble workshop workers in Aydın city. *Respiratory* 8 (3), 114–118.
- Steenland, K., Ward, E., 2014. Silica: a lung carcinogen. *CA Cancer. J. Clin.* 64 (1), 63–69.
- Thomas, P., Fenech, M., 2011. Buccal micronucleus cytome assay. *Methods Mol. Biol.* 682, 235–248.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (3), 206–221.
- Tolbert, P.E., Shy, C.M., Allen, J.W., 1992. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat. Res.* 271, 69–77.
- WHO (World Health Organization), 1999. Hazard Prevention and Control in the Work Environment: Airborne Dust. Occupational and environmental health department of protection of the human environment World Health Organization, Geneva.
- Wultsch, G., Setayesh, T., Kundi, M., Kment, M., Nersesyan, A., Fenech, M., Knasmüller, S., 2021. *Mutat. Res.* 787, 108349.
- Yıldırım, B.B., Akgedik, R., Akgedik, S., Nazaroğlu, H., 2016. Pulmonary alveolar proteinosis in a marble worker. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 29 (5), 871–876.