



**T. C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNORGANİK ARSENİK VE VANADYUM BİLEŞİKLERİNİN
DETOKSİFİKASYONUNDA GLUTATYONUN ROLÜ**

YELİZ ÇAKIR

DOKTORA TEZİ

**Antakya/HATAY
MAYIS-2012**

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNORGANİK ARSENİK VE VANADYUM BİLEŞİKLERİNİN
DETOKSİFİKASYONUNDA GLUTATYONUN ROLÜ

YELİZ ÇAKIR

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Deniz YILDIZ danışmanlığında hazırlanan bu tez 29/05/2012 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Deniz YILDIZ

Başkan

Prof. Dr. Suat ERDOĞAN

Üye

Doç. Dr. Fulya ÖZTAŞ

Üye

Yrd. Doç. Dr. Erol ATAY

Üye

Yrd. Doç. Dr. Ayşe YAVUZ KOCAMAN

Üye

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. İlhan ÜREMİŞ

Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırmalar Projeleri Komisyonunca desteklenmiştir.

Proje No: 1001 D 0103

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGE DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Arsenik (As).....	4
2.1.1. Bileşikleri ve Kullanım Alanları.....	4
2.1.2. Çevrede Bulunuşu ve Zehirlenme Nedenleri.....	5
2.1.3. Bazı Önemli Organik ve İnorganik Arsenik Bileşikleri.....	9
2.1.4. Arsenik Bileşiklerinin Metabolizma ve Toksisiteleri.....	12
2.1.5. Metabolizma.....	12
2.1.6. Toksisite.....	18
2.1.7. Arsenik ve İnsan Hastalıkları.....	23
2.1.7.1. Solunum Sistemine Etkiler.....	24
2.1.7.2. Pulmoner Etkiler.....	24
2.1.7.3. Kardiyovasküler Etkiler.....	25
2.1.7.4. Gastrointestinal Etkiler.....	26
2.1.7.5. Hematolojik Etkiler.....	26
2.1.7.6. Hepatik Etkiler.....	27
2.1.7.7. Renal Etkiler.....	27
2.1.7.8. Dermal Etkiler.....	28
2.1.7.9. Nörolojik Etkiler.....	28
2.1.7.10. Üreme ve Gelişimle İlgili Etkiler.....	29
2.1.7.11. İmmünolojik Etkiler.....	30
2.1.7.12. Oksidatif ve Nitrosatif Stres.....	30
2.1.7.13. Şeker Hastalığı.....	32
2.1.7.14. Biyokimyasal Etkiler.....	33
2.1.7.15. Mutojenik ve Kanserojenik Etkiler.....	33
2.1.7.16. Genotoksik Etkiler.....	35
2.1.7.17. Arsenik Mutajenitesine Karşı Antioksidan Koruma.....	38
2.2. Vanadyum (V).....	40
2.2.1. Vanadyumun Kullanım Alanları.....	42
2.2.2. Vanadatın İnsülin Benzeri Etkileri.....	43
2.2.3. Vanadatın İnsülin Benzeri Etki Mekanizması.....	45
2.2.4. Vanadyum ve İnsan Hastalıkları.....	46
2.2.4.1. Solunum Sistemine Etkiler.....	46
2.2.4.2. Kardiyovasküler Etkiler.....	47
2.2.4.3. Gastrointestinal Etkiler.....	47
2.2.4.4. Hematolojik Etkiler.....	47
2.2.4.5. Kas-İskelet Sistemine Etkiler.....	48
2.2.4.6. Hepatik Etkiler.....	48
2.2.4.7. Renal Etkiler.....	48

2.2.4.8.	Dermal / Oküler Etkiler.....	49
2.2.4.9.	İmmünolojik Etkiler.....	49
2.2.4.10.	Nörolojik Etkiler.....	50
2.2.4.11.	Genotoksik Etkiler.....	50
2.3.	Serbest Radikaller ve Antioksidanlar.....	52
2.3.1.	Serbest Radikaller.....	52
2.3.2.	Antioksidan Sistemler.....	56
2.3.3.	Antioksidan Mekanizmalar.....	58
2.3.4.	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	58
2.3.4.1.	Vitamin C.....	58
2.3.4.2.	Vitamin E.....	59
2.3.4.3.	Karotenoidler.....	60
2.3.5.	Enzimatik Antioksidanlar.....	61
2.3.5.1.	Süperoksit Dismutaz.....	61
2.3.5.2.	Katalaz.....	62
2.3.5.3.	Glutasyon Peroksidaz.....	62
2.4.	Glutasyon Sentezi ve Önemi.....	63
2.5.	ABC Taşıyıcı Ailesi.....	68
2.5.1.	MDR1/P-gp (ABCB1).....	71
2.5.2.	LRP (Akciğer Rezistans Protein).....	72
2.5.3.	Mrp1 (ABCC1).....	72
2.5.3.1.	GS-X Konjugatlarının MRP1 ile İlişkisi.....	74
2.5.3.2.	MRP1 Fonksiyonu.....	75
3.	MATERYAL ve YÖNTEM.....	77
3.1.	Materyal.....	77
3.1.1.	Eritrositlerin Hazırlanması.....	77
3.2.	Yöntem.....	78
3.2.1.	Hücre İçi NPSH Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	78
3.2.2.	Hücre Dışı NPSH Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	78
3.2.3.	LDH Aktivitesinin Belirlenmesi.....	78
3.2.4.	GSH Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	79
3.2.5.	DMSA Uygulaması ve GSH Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	79
3.2.6.	İstatistiksel Analizler.....	80
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	81
4.1.	AsIII ve AsV ile İlgili Sonuçlar.....	81
4.2.	Vanadat ile İlgili Sonuçlar.....	100
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	117
	KAYNAKLAR.....	121
	TEŞEKKÜR.....	143
	ÖZGEÇMİŞ.....	144

ÖZET

İNORGANİK ARSENİK VE VANADYUM BİLEŞİKLERİNİN
DETOKSİFİKASYONUNDA GLUTATYONUN ROLÜ

Çalışmanın amacı, inorganik arsenik ve vanadyum bileşiklerine maruz kalan insan eritrositlerinde glutatyon düzeylerindeki değişimleri, hücre dışına glutatyon çıkışı ve glutatyon çıkışını etkileyen faktörleri araştırmaktır. Eritrositler 10 mM arsenite 4 saat süreyle maruz kaldıktan sonra hücre içi NPSH konsantrasyonu 0.767 ± 0.0017 $\mu\text{mol/ml}$ eritrosit düzeyine düşmüştür. Hücre içi NPSH konsantrasyonunun düşmesi ile birlikte, hücre dışı NPSH konsantrasyonu 4 saatte 0.481 ± 0.0005 $\mu\text{mol/ml}$ eritrosit seviyesine ulaşmıştır. Hücre dışı NPSH düzeylerindeki artışa paralel olarak, arsenite maruz kaldıktan sonra hücre dışı glutatyon düzeylerinde önemli artış olduğu saptanmıştır. 1, 5 ve 10 mM arsenite maruz kaldıktan sonra hücre dışı glutatyon konsantrasyonları 0.122 ± 0.0013 , 0.226 ± 0.003 , 0.274 ± 0.004 $\mu\text{mol/ml}$ eritrosit düzeyine ulaşmıştır. Süpernatanların meso-2,3-dimerkaptosüksinik ile muamele edilmesi hücre dışı ortamda belirlenen glutatyon konsantrasyonunun önemli oranda artmasına sebep olmuştur. MRP ve Pgp membran taşıyıcılarının inhibitörleri olan MK-571 ve verapamil gibi bileşiklerin kullanılması eritrositlerden glutatyon çıkışını azaltmıştır. Bu azalma, bahsedilen membrane taşıyıcılarının hücrelerden glutatyon çıkışında rolü olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde eritrositler 10 mM vanadata 4 saat süreyle maruz kalmaları sonucunda hücre içi NPSH düzeyi tamamen sıfırlanmıştır. Hücre içi NPSH konsantrasyonunun tamamen boşalmasıyla birlikte hücre dışı NPSH konsantrasyonu 4 saatte 0.1410 ± 0.0005 $\mu\text{mol/ml}$ eritrosit seviyesine ulaşmıştır. Hücre dışı NPSH düzeylerindeki artışa paralel olarak, vanadata maruz kaldıktan sonra hücre dışı glutatyon düzeylerinde önemli artış olduğu saptanmıştır. 1, 5 ve 10 mM vanadata maruz kaldıktan sonra hücre dışı glutatyon konsantrasyonları sırasıyla 0.0150 ± 0.001 , 0.0330 ± 0.001 , ve 0.0576 ± 0.002 $\mu\text{mol/ml}$ eritrosit düzeyine ulaşmıştır. Süpernatanların meso-2,3-dimerkaptosüksinik ile muamele edilmesi hücre dışı ortamda ölçülen glutatyon konsantrasyonunu önemli oranda arttırmıştır. Bir MRP inhibitörü olan MK-571' in kullanılmasıda eritrositlerden glutatyon çıkışını azaltmıştır. Glutatyon çıkışında gözlenen azalma, bu membran taşıyıcılarının eritrositlerden glutatyon çıkışında rolü olduğunu göstermektedir. Yine bir metilasyon inhibitörü olan periodat ile oxide edilen adenozininde hücrelerden glutatyon çıkışının azalmasına sebep olmaktadır. Hücre dışı ortamda glutatyon seviyelerindeki bu azalma glutatyon çıkışının düzgün çalışan hücresel bir metilasyon işleminin varlığını gerektirdiğini ve hücre dışı ortamda belirlenen glutatyonun bir kısmının GSH-metilarsenik ve GSH-metilvanadyum komplekslerinden kaynaklanabileceğini göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçları eritrositlerin arsenit ve vanadat'a maruz bırakıldıklarında hücre dışına serbest redükte glutatyon ve glutatyon komplekslerinin transport edildiğini göstermektedir.

2012, 144 sayfa

Anahtar Kelimeler: Arsenit, Vanadat, Glutatyon, İnsan Eritrositleri, Glutatyon transportu, MRP1, NPSH

ABSTRACT

THE ROLE OF GLUTATHIONE IN THE DETOXIFICATION OF INORGANIC ARSENIC AND VANADIUM COMPOUNDS

The objective of the present study was to investigate the change in cellular glutathione levels, glutathione release and the factors that effect the glutathione release from human erythrocytes exposed to inorganic arsenic and vanadate. Arsenite and vanadate significantly depleted intracellular nonprotein thiol level in a time- and concentration-dependent manner. The intracellular nonprotein thiol level was decreased to 0.767 ± 0.0017 $\mu\text{mol/ml}$ erythrocyte following exposure to 10 mM of arsenite for 4 hours. Extracellular nonprotein thiol level was increased concomitantly with the intracellular decrease and reached to 0.481 ± 0.0005 $\mu\text{mol/ml}$ erythrocyte in 4 hours. In parallel with the change in extracellular nonprotein thiol levels, significant increases in extracellular glutathione levels were detected. Extracellular glutathione levels reached to 0.122 ± 0.0013 , 0.226 ± 0.003 , 0.274 ± 0.004 $\mu\text{mol/ml}$ erythrocyte with 1, 5, and 10 mM of arsenite respectively. Dimercaptosuccinic acid treatment of supernatants significantly increased the glutathione levels measured in the extracellular media. Utilization of MK571 and verapamil, MRP and Pgp inhibitors, decreased the rate of glutathione efflux from erythrocytes suggesting a role for these membrane transporters in the process. In a similar manner, when the experiment were carried in the presence of vanadate the intracellular NPSH levels were completely depleted in erythrocytes exposed to 10 mM of vanadate for 4 hours. Extracellular NPSH level was increased concomitantly with the intracellular decrease and reached to 0.1410 ± 0.005 $\mu\text{mol/ml}$ erythrocyte in 4 hours. In parallel with the change in extracellular NPSH levels, significant increases in extracellular glutathione levels were detected following exposure to vanadate. Extracellular glutathione levels reached to 0.0150 ± 0.0001 , 0.0330 ± 0.001 , 0.0576 ± 0.002 $\mu\text{mol/ml}$ erythrocyte with 1, 5, and 10 mM of vanadate respectively. Dimercaptosuccinic acid treatment of supernatants significantly increased the glutathione levels measured in the extracellular media. Utilization of MK571 an MRP inhibitor decreased the rate of glutathione efflux from erythrocytes suggesting a role for this membrane transporter in the process. A known methylation inhibitor periodate oxidized adenosine decreased the rate of glutathione efflux from erythrocytes. This observed decrease in extracellular GSH levels suggest that GSH release partly requires a proper cellular methylation process and that part of GSH detected in the extracellular media may arise from GSH-arsenik and GSH-vanadium complexes. The results of the present study indicate that human erythrocytes efflux glutathione in reduced free form and in conjugated form/s that can be recovered with dimercaptosuccinic acid when exposed to arsenite and vanadate.

2012, 144 pages

Keywords: Arsenite, Vanadate, Glutathione, Human Erythrocytes, Glutathione efflux, MRP1, Free-SH

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	Alanin Aminotransferaz
ALP	Alkalen Fosfataz
AsV	Sodyum Arsenat
AsIII	Sodyum Arsenit
AsB	Arsenobetain
AsC	Arsenocholin
AST	Aspartat Aminotransferaz
ATP	Adenozin Trifosfat
BFD	Kara ayak hastalığı
CAT	Katalaz
DIDS	Disodium 4,4'-diisothiocyantostilbene-2,2'-disulfonate
DMA	Dimetil Arsinik Asittir
DMAP	4- dimetil aminofenol
DMSA	meso-2,3-dimerkaptosüksinik
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DTNB	5,5'-dithiobis (–nitrobenzoate)
EGVM	Vitaminler ve Mineraller Konusunda uzman Grup
eNOS	Endotelial nitrik oksit sentetaz
EPA	Çevre Koruma Ajansı
ETDA	Etilendiamin tetraasit
GGT	γ -glutamil transpeptidaz
G6P	Glukoz-6-fosfat
G6PD	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GS-DNP	S-(2,4-dinitrofenil)glutasyon
GSH	Redükte glutasyon
GSSG	Okside glutasyon
H ₂ O ₂	Hidrojenperoksit
2,3- DPG	2-3 Difosfogliserat
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentetaz
LDH	Laktat Dehidrogenaz
MMA	Monometil arsonik asit
MPO	Myeloperoksidaz
MT	Metalotionein
NAA	Nötron Aktivasyon Analizi
nAChR	Nikotinik asetilkolin reseptörleri
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NK	Doğal öldürücü
NO	Nitrik oksit
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentetaz
NPSH	Nonprotein Sülfidril
O ²⁻	Süperoksit
OH ⁻	Hidroksil radikali

ONOO ⁻	Peroksinitrit
⁻ OOOCR	Alkilperoksil radikali
PAD	Peyodat ile Oksitlenmiş Adenozin
PBS	Potasyum-Fosfat-Tuz tamponu
PHA	Lenfosit Fitohemaglutin
ROS	Reaktif oksijen ürünleri
SCF	Gıda Bilimsel Komitesi
SOD	Superoksit Dismutaz
TCA	Trikloroasetikasit
TMA ⁺	Tetrametil Arsonyum iyonu
TMAO	Trimetil Arsin Oksit
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	AsIII ve AsV bileşiklerinin moleküller yapısı.....	10
Şekil 2.2.	Bazı metilenmiş arsenik ve organoarsenik Bileşikleri.....	11
Şekil 2.3.	Arsenik metilasyonu.....	13
Şekil 2.4.	İnorganik arseniğin metabolizması.....	15
Şekil 2.5.	Arsenik tarafından pirüvat dehidrojenaz enzimin inhibisyonu.....	21
Şekil 2.6.	Arsenolizis.....	21
Şekil 2.7.	Arsenik aracılıklı hücre sinyalizasyonu.....	24
Şekil 2.8.	Guandin bazının (G) hidroksil radikal ile reaksiyonu.....	37
Şekil 2.9.	Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama.....	52
Şekil 2.10.	Serbest radikal oluşum reaksiyonları, oksidan ve antioksidan enzimler.....	54
Şekil 2.11.	Antioksidanların serbest radikalleri nötralize etmesi.....	56
Şekil 2.12.	Reaktif Oksijen Türlerinin ve Antioksidanların Lokalizasyonu.....	57
Şekil 2.13.	Reaktif oksijen türleri ve antioksidanlar arasındaki ilişki.....	59
Şekil 2.14.	Glutasyonun Kimyasal Yapısı.....	64
Şekil 2.15.	Glutasyon Sentezi.....	66
Şekil 2.16.	ABC Taşıyıcısının Yapısı.....	69
Şekil 2.17.	MRP1' in Yapısı.....	73
Şekil 4.1.	AsV ve AsIII ile muamele edilen eritrositlerin NPSH konsantrasyonlarındaki azalma.....	82
Şekil 4.2.	AsV ve AsIII ile muamele edilen eritrositlerden NPSH çıkışı.....	83
Şekil 4.3.	Eritrositlerdeki NPSH düzeylerinin AsIII konsantrasyonuna bağlı Değişimi.....	84
Şekil 4.4.	Eritrositlerden NPSH çıkışının AsIII konsantrasyonuna bağlı değişimi.....	85
Şekil 4.5.	AsIII'ün hücre membranına etkisi.....	87
Şekil 4.6.	Eritrositlerde AsIII tarafından azaltılan hücre içi NPSH seviyelerine glukozun etkisi.....	88
Şekil 4.7.	AsIII ile muamele edilen eritrositlerde hücre dışı NPSH seviyelerine glukozun etkisi.....	89
Şekil 4.8.	AsIII ile muamele edilen eritrositlerde hücre içi NPSH seviyelerine sıcaklığın etkisi.....	90
Şekil 4.9.	AsIII ile muamele edilen eritrositlerde hücre dışı NPSH seviyelerin sıcaklığın etkisi.....	91
Şekil 4.10.	AsIII ile muamele edilen eritrositlerden GSH çıkışı.....	94
Şekil 4.11.	Eritrositlerdeki GSH düzeylerinin AsIII konsantrasyonuna bağlı değişimi.....	95
Şekil 4.12.	AsIII ile muamele edilen eritrositlerde GSH çıkışına MK571'in etkisi..	96
Şekil 4.13.	AsIII ile muamele edilen eritrositlerde GSH çıkışına PAD'in etkisi.....	97
Şekil 4.14.	AsIII ile muamele edilen eritrositlerde GSH çıkışına verapamilin etkisi.....	98
Şekil 4.15.	AsIII ile muamele edilen eritrositlerde DMSA uygulamasından sonra hücre dışı GSH seviyeleri.....	99
Şekil 4.16.	Vanadat ile muamele edilen eritrositlerde NPSH seviyeleri.....	101

Şekil 4.17.	Vanadat ile muamele edilen eritrositlerden NPSH çıkışı.....	102
Şekil 4.18.	Vanadatın hücre membranına etkisi.....	103
Şekil 4.19.	Vanadat ile muamele edilen eritrositlerde hücre içi NPSH seviyelerine DIDS'in etkisi.....	104
Şekil 4.20.	Vanadat ile muamele edilen eritrositlerde hücre dışı NPSHs seviyelerine DIDS' in etkisi.....	105
Şekil 4.21.	Vanadat ile muamele edilen eritrositlerde hücre içi NPSH seviyelerine glukozun etkisi.....	107
Şekil 4.22.	Vanadat ile muamele edilen eritrositlerde hücre dışı NPSH seviyelerine glukozun etkisi.....	108
Şekil 4.23.	Vanadat ile muamele edilen eritrositlerde hücre içi NPSH seviyelerine sıcaklığın etkisi.....	109
Şekil 4.24.	Vanadat ile muamele edilen eritrositlerde hücre dışı NPSH seviyelerine sıcaklığın etkisi.....	110
Şekil 4.25.	Vanadat ile muamele edilen eritrositlerden GSH çıkışı.....	111
Şekil 4.26.	Eritrositlerdeki GSH düzeylerinin vanadat konsantrasyonuna bağlı değişimi.....	112
Şekil 4.27.	Vanadat ile muamele edilen eritrositlerden GSH çıkışına MK571' in etkisi.....	114
Şekil 4.28.	Vanadat ile muamale edilen eritrositlerde GSH çıkışına PAD'ın etkisi.	115
Şekil 4.29.	Vanadat ile muamale edilen eritrositlerde DMSA uygulamasından sonra hücre dışı GSH seviyeleri.....	116

ÇİZELGE DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Önemli Bazı ABC Taşıyıcı Proteinleri.....	70

1. GİRİŞ

Arsenik bileşikleriyle kontamine olmuş içme suyu ve yiyeceklere uzun süre maruz kalmak ciddi sağlık riskleri oluşturan dünya çapında bir problemdir. Arsenik bileşiklerine yer altı sularının kontaminasyonu ile maruz kalındığı ileri sürülmüştür (Chiou ve ark., 1995; Das ve ark., 1995). Bunun yanında, pestisidlere maruz kalmış sebzelerin tüketilmesi veya arsenikleri içeren pestisidlerin ağız yoluyla alınması da diğer bir yoldur (Kersjes ve ark., 1987; Kingston ve ark., 1993). Pentavalent arsenat (AsV) ve trivalent arsenat (AsIII), arsenik bileşiklerinin içme suyunu kontamine eden en yaygın formlarıdır. Bu tür bileşiklere maruz kalmanın sonucu zehirlenme ve kanser olabilmektedir (Ishinishi ve Ark., 1986; Chan ve Huff, 1997). AsV daha yüksek stabilitesi dolayısıyla içme suyu kontaminasyonunda en yaygın şekilde bulunan formdur. Buna karşılık AsIII daha reaktiftir ve thiol grupları ile bağlanabilir. Bu şekilde bazı protein ve enzimlerin yapısındaki sülfidril gruplarına bağlanarak onların aktivitelerini inhibe eder (Knowles ve Benson, 1983). Fakat AsV bu şekilde etki etmez. AsV yapısal olarak inorganik fosfata benzerlik göstermekte ve hücre içinde fosfat gerektiren enzimatik reaksiyonları sekteye uğratabilmektedir (Dixon, 1977; Hughes, 2002). AsV ve AsIII'in toksik etkilerini gösterdiği diğer bir mekanizma da hücrelerde oksidatif strese yol açmaktır. Daha önceki çalışmalar AsV ve AsIII'a maruz kalmanın antioksidanlar tarafından baskılanabilen reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve oksidatif stresle sonuçlandığını göstermiştir (Nordenson ve Beckman, 1991; Lantz ve Hays, 2006). Genellikle hücre içi glutatyonun (GSH) tükenmesi hücrelerin redoks durumunu değiştirir ve toksik koşullar oluşturur. İnorganik arsenik bileşiklerinin hücre GSH seviyelerinde azalmaya sebep oldukları gösterilmiştir (Winski ve Carter, 1995).

Arsenata yapısal benzerlik gösteren vanadat (V) insülin benzeri etkileri olan bir iz element olarak bilinmektedir (Shechter ve Karlsh, 1980; Meyerovitch ve ark., 1987). Çeşitli deneysel şartlarda vanadatin hücrelere glukoz girişini arttırdığı gösterilmiş ve dolayısıyla vanadat antidiyabetik bir iz element olarak tanımlanmıştır (Goldfine ve ark., 1995; Shechter, 1999). Normal olarak insülin membranda bulunan insülin reseptörüne (IR) bağlanır ve bu bağlanma reseptör otofosforilasyonunu, dolayısıyla hücre içi sinyal mekanizmasını başlatır (Cheatham ve Kahn, 1995; White, 1997). Vanadatin insülin benzeri etkiler gösterdiğinin ispatlanmasına rağmen bu etkiyi nasıl gösterdiği tam olarak

anlaşılamamıştır. Yapılan bazı çalışmalarda vanadatın insülin reseptör aktivasyonunu gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Tamura ve ark., 1984; Fantus ve ark., 1994). Vanadatın insülin benzeri etkilerini IR aktivasyonu olmadan da gösterebildiği ispatlanmıştır (Green, 1986; D'Onofrio ve ark., 1994). Diğer bir çalışmada vanadatın insülin reseptör otofosforilasyonunu arttırmadığını ancak insülin bağlanmasıyla fosforile edilen reseptörün defosforilasyonunun vanadat tarafından engellendiği saptanmıştır (Okada ve ark., 1998). Bu gözlenen etki vanadatın çok iyi tanımlanmış olan fosfataz enzimi inhibitörü olmasından kaynaklanmaktadır.

Vanadat hücre içerisinde bir çok fosfataz enzimini aktivitesini inhibe edebilmektedir (Swarup ve ark.,1982; Gregory ve ark., 1997). Vanadat hücrelerde Ca-ATPaz aktivitesini inhibe etmekte ve hücre içerisinde kalsiyumun akümüle olmasına yol açmaktadır (Varecka ve Carafoli, 1982; Varecka ve ark., 1997). Normalde hücre içi kalsiyum konsantrasyonları çok sıkı şekilde kontrol altında tutulmaktadır. Hücre içerisinde kalsiyum artışı birçok biyolojik olay için bir sinyal teşkil edebilmektedir (Kass ve Orrenius, 1999). Vanadat bunların dışında toksik etkiler de gösteren bir elementtir. Vanadatın toksik etkilerinin genellikle artan serbest radikal üretimi dolayısıyla indüklenen oksidatif strese kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Vanadatla muamele edilen bazı hücre kültürlerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve tiyo barbitürik asit reaktif materyallerin miktarının arttığı gösterilmiştir (Cortizo ve ark., 2000). Ayrıca yine vanadat hücrelerde GSH düzeylerini de azaltmaktadır (Younes ve Strubelt, 1991). GSH glutamat, sistein ve glisin amino asitlerini ihtiva eden önemli bir tripeptittir. Hücreler genel olarak oldukça yüksek konsantrasyonlarda GSH ihtiva etmektedirler. GSH hücre içerisinde eriyebilir bir antioksidan olarak fonksiyon görmekte ve bir çok serbest radikalin ortamdaki uzaklaştırılmasında rol oynamaktadır (Clemens ve Waller, 1987; Gille ve Sigler, 1995). Bunun dışında yine GSH, glutatyon S-transferaz tarafından katalize edilen konjugasyon reaksiyonlarıyla bir çok ksenobiyotiğin hücrelerden uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (Eckert ve Eyer, 1986; LaBelle ve ark., 1986). GSH bu fonksiyonlarıyla, hücreleri serbest radikallerin ve hücreye zararlı diğer moleküllerin toksik etkilerinden korumaktadır.

Arsenat ve vanadat hücrelerde oksidatif stresi tetikleyebilmektedir. Ancak arsenat ve vanadat tarafından tetiklenen oksidatif stresin mekanizması tam olarak aydınlatılmış değildir. Arsenat ve vanadat uygulamasıyla hücre içi GSH düzeyinin

azaldığı bilinmektedir. Ancak GSH kaybının temel nedenleri tamamiyle aydınlatılmış değildir. Arsenat (As) ve vanadat (V) hücre içine alındıktan sonra bunlar Arsenat (III) ve Vanadat (IV) formlarına redüklenmektedir. Bu olayda GSH elektron kaynağı olarak kullanılmakta ve GSSG'ye dönüşmektedir. Arsenat ve vanadat varlığında hücre içi GSH düzeyindeki azalmanın genel olarak arsenat ve vanadat redüksiyonundan kaynaklandığına inanılmaktadır. Hücre içi GSH konsantrasyonundaki azalma glutatyon-S-transferazın etkisi de tam olarak bilinmemektedir. Arsenik bileşiklerinin hücre içi GSH seviyelerine etkisi detaylı olarak araştırılmış ve hücre içi GSH seviyelerini önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir. Ancak, AsV ve AsIII maruz kalan eritrositlerde GSH'in redüklenmiş formda eritrositlerden dışarıya çıkışı araştırılmamıştır. Buna ilave olarak vanadatın hücrelerden dışarıya GSH transportunu indükleyip indüklemediği şimdiye kadar araştırılmamıştır.

Bu çalışmanın temel amacı inorganik arsenik ve vanadyum bileşiklerine maruz kalan insan eritrositlerinde GSH düzeylerindeki değişimleri, hücre dışına GSH çıkışı ve GSH çıkışını etkileyen faktörleri araştırmaktır. Sonuçlar arsenat ve vanadat uygulamasından sonra hücre içi GSH kaybının nedenlerinin aydınlatılması açısından önemli olacaktır. Ayrıca hücre içi GSH kaybının nedenlerinin anlaşılması eritrositlerde arsenat ve vanadatın detoksifikasyon mekanizmalarının aydınlatılmasına yardımcı olacaktır. Arsenit karaciğer hücrelerinden çeşitli GSH-arsenik kompleksleri şeklinde atılmaktadır. Ancak arsenit uygulaması sonrasında bu tür komplekslerin eritrositlerden atılıp atılmadığı ile ilgili araştırma yapılmamıştır. Benzer şekilde vanadat uygulaması sonucunda hücre içi GSH'in azaldığı bilinmektedir. Ancak GSH kaybına katılan mekanizmalar hala tamamiyle aydınlatılamamıştır. Yine vanadat uygulaması sonucunda GSH-arsenik kompleksleri şeklinde çeşitli GSH-vanadyum komplekslerinin oluşup oluşmadığı araştırılmamıştır. Dolayısıyla bu çalışmada arsenat, arsenit ve vanadatın hücrelerden dışarıya serbest GSH ya da çeşitli GSH-metal komplekslerinin hücre dışına transport edilip edilmediği ile ilgili bulgulara ulaşabilmek amaçlanmıştır. Bu tür bulgularla insan hayatında önemli etkileri olan bu oxoanyonların metabolizmaları ve etkileri hakkında daha geniş bilgi sağlanmış olacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Arsenik

Arsenik, kimyasal elementler Periyodik Tablosunun 33. elementidir ve resmi olarak metaloid sınıfında yer almasına, yani hem bir metalin hem de bir ametalin bazı özelliklerini sergilemesine karşın çoğu zaman bir metal olarak ve toksikoloji bağlamında bir ağır metal olarak da anılmaktadır (Mandal ve Suzuki, 2002). Atom ağırlığı 74,9 g/mol, yoğunluğu 5,79 g/cm³'tür. Tabiatta yaygın olarak bulunmaktadır. Yer kabuğunun yaklaşık % 0.0005'ini oluşturur (Encyclopedia of Science and Technology, 1982). Arsenik, doğada metalik hale ilişkin üç alotropik formda, α (sarı), β (siyah), γ (gri) ve birkaç iyonik formda bulunmaktadır. İ.Ö. 4. yy' dan beri bilinen arsenik, element olarak ancak 17. yy'da tanımlanabilmiştir. Yazılı belgelere göre arseniği ilk kez serbest element halinde tanımlayan, 1649'da oksidini taş kömürü ile ısıtarak arsenik elde etmiş olan Alman Eczacı Johann Schroeder'dir (Denizli, 2008).

Arseniğin en yaygın oksitlenme sayıları, elementin hem ortamda hem de insan vücudunda organik ve inorganik bileşikleri oluşturabildiği +5, +3 ve -3'tür (Orloff ve ark, 2009). Element; oksijen, sülfür ve klor gibi diğer elementler ile kombinasyon halinde inorganik arsenik olarak, hidrojen ve karbon ile birleştiğinde ise organik arsenik olarak anılmaktadır. Çoğu arsenik bileşiğinin rengi ya da kokusu olmadığı için arseniğin besinlerde, suda ya da havada varlığı kolay belli olmamaktadır. Bu nedenle elementin toksik özelliği yapısı da dikkate alındığında insan sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Aslında, uzun ve kötü geçmişinin sonucu olarak arsenik ismi çoğunlukla zehir ile eş anlamlı olarak görülmektedir (Mandal ve Suzuki, 2002). Arsenik, doğada her yerde bulunmaktadır ve bolluğu düşünüldüğünde yerkabuğunda yirminci, deniz suyunda on dördüncü ve insan vücudunda on ikinci sıradadır.

2.1.1. Arsenik Bileşikleri ve Kullanım Alanları

Arsenik, elementel, gaz (Arsin, AsH₃), organik ve inorganik formlarda bulunur. Arsenik element halinde toksik olarak düşünülmez, fakat bileşikleri toksiktir. En toksik

formu gaz formudur. Doğada en yaygın bulunan formu inorganik arsenik trioksittir (As_2O_3).

Arsenik bileşiklerinden As_2O_3 rodentisit (fare zehiri); bakır arsenit, sodyum arsenit, kalsiyum arsenit gibi +3 ve kurşun arsenat, sodyum arsenat, kalsiyum arsenat gibi +5 değerlikli anorganik arsenik bileşikleri insektisit olarak kullanılmaktadır. Dimetil arsenik asit tuzları $[(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2^-]$, herbisit olarak kullanılan organik As bileşikleridir. Potasyum asit arsenat (KH_2AsO_4 , Macquers tuzu) deri ve kağıt endüstrisinde; ayrıca arsenik bileşikleri seramik, cam, boya, cila, emaye, vernik ve lastik endüstrisinde kullanılırlar. Organik arsenik bileşikleri (difenil klorarsin, betaklorvinil klor arsin-LE-WISITE) I. Dünya Savaşı'nda savaş gazları olarak kullanılmışlardır. Arsin (AsH_3), bazı maden yataklarının nemlendirilmesi sırasında oluşan çok toksik bir gazdır. Organik arsenik bileşiklerinden arsefenamin [salvarsan- $(\text{As}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{OHNH}_2).2\text{HCl}$] frengi tedavisinde kullanılmıştır (Denizli, 2008).

2.1.2. Çevrede Bulunuşu ve Zehirlenme Nedenleri

Çeşitli inorganik arsenik bileşikleri (AsO_4^{3-}) veya arsenitler (AsO_2^-) suda, toprakta ya da besinlerde bulunurken arsenik trioksit (As_2O_3), havada en yaygın bulunan inorganik arsenik bileşiğidir (Magalhaes, 2002; Chou ve ark., 2007). Mikroelektronik endüstrisindeki yaygın kullanımının sonucu olarak galyum arsenit (GaAs), insan sağlığını da olumsuz yönde etkileyebilen bir inorganik arsenik bileşiğidir.

Arseniğin ve diğer metallerin en büyük kaynağı genellikle besinlerdir. Başlıca besinsel formlar ise deniz mahsulleri, pirinç, mantarlar ve kümes hayvanlarıdır (Smedley ve Kinniburgh, 2002; Jones, 2007; Petroczi ve Naughton, 2009; Nepusz ve ark., 2009). Deniz mahsüllerinde fazla arsenik bulunmasına rağmen bu, çoğunlukla, diğerlerinden daha az zararlı olan arsenobetain olarak adlandırılan bir organik formda bulunmaktadır. Arsenik zehirlenmesi, çoğunlukla, endüstriyel maruziyet, bozulmuş şarap veya kaçak üretilen içkiden ya da kasıtlı uygulamalardan dolayı meydana gelmektedir.

Yakın geçöişte, tedavi amaçlı olarak bilerek arsenik ile desteklenen geleneksel Çin bitkisel ürünlerinin sağlık için ciddi bir tehdit unsuru olabileceği rapor edilmiştir

(Martena ve ark., 2010). Kütle spektrometresi, Hollanda piyasasında satılan test edilmiş 292 örneğin % 20'sinin hem arsenik hem de kurşun ve civaya ilişkin güvenlik seviyelerini belirgin bir şekilde aştığını ortaya koymuştur.  in ve Tibet tıbbında hazırlanan geleneksel bitkisel ilaçların, yerel otoritelerce sıkı kontrollerinin gerekli olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

G z farlarının üretiminde kozmetik endüstrisinde kullanılan renk pigmentleri, çoğu zaman, arsenik de dahil olmak üzere toksik elementleri içermektedir (Sainio ve ark., 2000).

G zkapaklarının derisi çok hassastır ve göz farlarının kullanımı, egzamalara yol açabilmektedir. Ayrıca, arsenik partikülleri suda   z nelebilmektedir ve bu nedenle ıslak cilt yoluyla perkütan absorbsiyona uğrayabilmektedir. Arsenik, yüksek konsantrasyonda, perkütan absorbsiyon yoluyla dolaşım sistemine girdiğinde karsinogenez için potansiyel bir risk teşkil edebilmektedir. Mevcut toksikoloji verileri temel alınarak, kozmetik ürünlerin 5 ppm'den daha az metal katışık içermesi tavsiye edilmiştir.

Su, toprak veya besin içerisinde bulunduğu için, mideye alınmış arsenik hızlı bir şekilde insan vücuduna diffüz olabilmektedir. Arsenik tozları içeren hava solunduğunda toz zerreciklerinin çoğu, akciğerlerin dış yüzeyinin üzerine yerleşmektedir (Chen ve ark., 2006). Deri yoluyla vücuda giren materyal aracılığıyla arseniğe maruz kalım çok az meydana gelmektedir ve dolayısıyla bu yolla ortaya çıkan arsenik zehirlenmesine ilişkin düşük bir risk bulunmaktadır.

Arseniğin çoğunluğu, basit bir difüzyon mekanizması yoluyla üç değerli inorganik formunda As (III) vücuda girmektedir (Cohen ve ark., 2006). Sadece küçük bir miktar pentavalan inorganik arsenik, enerji bağımlı bir taşıma sistemi yoluyla hücre zarlarından geçebilmektedir, bunun ardından da hemen üç değerli arseniğe indirgenmektedir.

Arseniğin hem organik hem de inorganik formları, idrar ile vücuttan atılmaktadır. Dolayısıyla, arseniğin bir kısmı birkaç ay, hatta daha uzun süre vücutta kalmasına rağmen çoğu inorganik arsenik, birkaç gün sonra dışarı atılmaktadır

(Aposhian ve ark., 2000 a,b). Organik arseniğin büyük kısmı, daha hızlı bir şekilde ve genellikle birkaç gün içinde dışarı atılmaktadır.

Özellikle +5 değerlikli bileşikleri toprakta diğer arsenik türlerine oranla daha fazla bulunur. Toprakta 0.1- 40 ppm aralığında rastlamak mümkündür. Topraktaki organik maddelere bağlı olarak da bulunan arsenik, organik maddelerin okside olmasıyla suya ve oradan bitkilere geçer.

Bitkilerdeki arsenik miktarı, bitkinin bulunduğu coğrafi konum, topraktaki arsenik miktarı ve çevresel etmenlere bağlı olarak farklılık gösterir. Deniz bitkilerindeki arsenik derişimi daha yüksektir. Bazı yosun türlerinde bu oran daha da artmaktadır. Deniz ürünlerinde arsenik miktarı tolerans sınırı olan 2.6 ppm üstünde olabilir.

Element halinde arseniğin kullanım alanı oldukça kısıtlıdır. Daha çok tüfek saçmalarına yuvarlak biçim vermek için kurşuna element halinde arsenik katılmaktadır. Tunç kaplamacılığında, fişekçilikte ve bazı alaşımların yüksek sıcaklıklara direncini artırmak amacıyla arsenikten yararlanılır. As-72, As-74 ve As-76 gibi radyoaktif izotopları ise tıpta tanı yöntemlerinde kullanılır.

Besinlerdeki miktarı, topraktan geçen arsenik nedeni ile yüksek düzeylere ulaşabilir. Geçmişte arsenikle zehirlenmeler intihar ve kasıtlı ölümlerde görölmekteydi. Ortaçağda arsenik sözcüğü zehir sözcüğü ile eş anlamda kullanılıyordu. Renksiz, kokusuz arsenik trioksitin (As_2O_3), yiyecek ve içeceklerde fark edilmemesi ve zehirlenme belirtilerinin kolera, anemi gibi hastalıklara benzerliği ile tercih nedeni olmuştur. Ancak analitik toksikolojideki gelişmeyle zehirlenmenin kimyasal olarak tanımlanabilmesi ile zamanımızda arsenikle zehirlenmeler azalmıştır. Günümüzde arsenik zehirlenmeleri nadiren kaza ile veya bileşiklerinin tedavide kullanılması nedeniyle olmaktadır. İngiltere'de arsenikle kirlenmiş sülfürik asitin bira yapımında kullanılması ile görülen zehirlenme olayı bilinen en önemli örnektir.

Arsenikli bileşiklerin tarımda pestisit olarak kullanılması uygulayıcılarda olduğu kadar, meyve ve sebzelerdeki kalıntıları yiyenlerde de zehirlenmelere neden olabilir. Kurşun ve kalsiyum arsenat veya arsenitler toprağa sıkıca bağlanır ve yavaş yavaş su ve bitkilere geçerler. Tütünde bu nedenle, As miktarının 13 mg/L'ye kadar yükselebileceği gösterilmiştir. Besin kaplarından geçen arsenikle de zehirlenme olabilir.

Arsenik yeryüzünde geniş dağılımı olan, doğal olarak bulunan bir elementtir. Doğada serbest halde az miktarda olsa da arseniği, arsenit ve arsenat filizleri şeklinde

içeren mineraller daha yaygındır (Bissen ve Frimmel, 2003; Thirunavukkarasu ve ark., 2005). Doğal yollarla arseniğin, bağlı olduğu kayalardan, minerallerden ve maden filizlerinden çözünmesi ile su ortamına geçmesi mümkündür. Antropojenik olarak ise metal sanayi, cam ve seramik endüstrisi, lastik üretimi, boya sanayi (matbaa mürekkebi, tekstil boyları), petrol rafinasyonu, organik ve inorganik kimya sektörleri gibi arsenik içeren atıkların çıktığı ve yeterince kontrol edilmediği endüstriler arsenik kirliliğine neden olabilirler (Banerjee ve ark., 1999; Viraraghavan ve ark., 1999; Bissen ve Frimmel, 2003). Ayrıca, bazı deterjanların yapısından da arseniğin özellikle sulara karışması söz konusudur (Banerjee ve ark., 1999; Viraraghavan ve ark., 1999). Buna ilave olarak, içinde çeşitli arsenik bileşikleri bulunabilen tarımsal mücadele ilaçlarının (pestisit, herbisit gibi) kullanılması da sulardaki arseniğin diğer kaynaklarıdır. Özellikle tarımsal aktivitelerden arseniğin yüzeysel ve yeraltı sularına karışması muhtemeldir. Arsenik toksik özellikte bir madde olup toksisite derecesi, arsenik bileşiklerinin kimyasal ve fiziksel şekline, vücuda girişine, alınan miktarına ve alınma süresine, gıda içindeki reaksiyonu etkileyen elementlerin varlığına, yaş ve cinsiyete bağlıdır. Organik arsenik vücuttan kolaylıkla atılabildiği ve sağlığa etkileri önemsiz olduğundan arıtma işlemleri inorganik arseniğin giderimine yöneliktir. İnorganik arsenik bileşikleri ve değerlikleri, redoks koşullarına ve suyun pH'na bağlı değişmekte ve genel olarak, AsV formunda yüzeysel sularda, AsIII olarak yeraltı sularında görülmektedir.

Yeraltı suyunun arsenik ve diğer metallerle kirlenmesi, dünyanın çeşitli bölgelerindeki canlıların sağlığını ciddi bir şekilde etkilemiştir. Arsenik kaynaklı kirlenmenin en yoğun örneklerinin bir kısmı, yaklaşık 43 milyon insanın arsenik dolu suyu içmekte olduğunun ortaya çıkarıldığı Bangladeş ve Hindistan'da Batı Bengal'de meydana gelmektedir (Chowdhury ve ark., 2000). Bu amaçla, konsantrasyonların 50–3200 µg/L aralığında ölçülmüş olmasına karşın WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından önerilen sudaki arsenik limiti 10 µg/L'dir (WHO bilgi formu no. 210, Mayıs 2001) (Bhattacharya ve ark., 2003). WHO'nun ilan ettiği 10 µg/L limit değeri Japonya, Laos, Moğolistan, Namibya, Suriye, Amerika Birleşik Devleti (ABD) ve Avrupa Birliği (AB) ülkeleri tarafından da ulusal standart olarak adapte edilmiştir. Ancak, AB'ne yeni katılan ülkelerin bu standartları karşılama hususunda ciddi sorunlar yaşamaları beklenmektedir. Bu ülkelerin ulusal standartlarını AB standartları ile uyumlaştırmak için ilave zaman ve desteğe ihtiyaç duyması kaçınılmazdır.

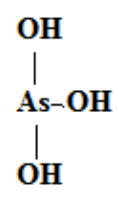
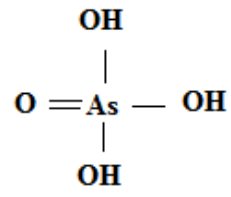
Ülkemizde 2005 yılına kadar arsenik parametresi ile ilgili uygulanan yasal düzenleme Türk Standartları Enstitüsü'nün İçme ve Kullanma Sularına İlişkin Standartlarıdır. Bu standarda göre maksimum arsenik miktarı 50 µg/L'dir. Ancak, gerek WHO, gerek EPA ve AB ülkelerinde arsenik standartlarına ilişkin yapılan düzenlenmeler ülkemizde de benimsenmiş; içme ve kullanma suları hakkında 17 Şubat 2005 tarihinden itibaren geçerli olan arsenik parametresinin maksimum konsantrasyonu 10 µg/L olarak açıklanmıştır. Yapılan düzenlemenin uygulanması için üç yıllık bir zaman öngörmüş ve bu sürenin sonunda içme ve kullanma amaçlı kullanılacak suların maksimum arsenik konsantrasyonunu 10 µg/L olacak şekilde gerekli önlemlerin alınmasını zorunlu kılmıştır.

Yapılan düzenlemeler ülkemiz özelinde de arsenik kirlenmesine karşı önlemler alınmasını gerekli kılmıştır. Özellikle Batı ve İç Anadolu Bölgesi'ndeki bazı yerleşimlerimizde jeolojik oluşumlara bağlı olarak standardın üzerinde arsenik konsantrasyonları ölçülmüştür. 2006 yılından bu yapılan çalışmalarda ülkemizde inorganik arsenik bakımından zengin coğrafyalar olduğuna değinilmiş ve özellikle Kütahya-Emet-Hisarcık Havzası ile Nevşehir Havzasında ölçülen yüksek arsenik miktarlarına (20-200 µg/L) dikkat çekilmiştir (Dölgen ve Alpaslan, 2009).

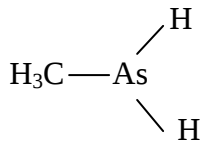
2.1.3 Bazı Önemli Organik ve İnorganik Arsenik Bileşikleri

İnorganik arsenik hem As(III) hemde As(V) türlerini kapsayan bir terimdir (Hung ve ark., 2004). İnorganik arsenik türleri arsenat ve arsenit, organik türlerinden bazıları ise metilenmiş türleri olan arseno betain (AsB), arsenokolin (AsC) monometil arsonik asit (MMA), dimetil arsinik asit (DMA), trimetil arsin oksit (TMAO) ve tetrametil arsonyum iyonudur (TMA⁺).

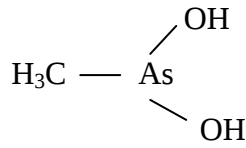
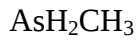
Arsenit, arsenat, MMA ve DMA sularda bulunan arsenik türleridir. Arseniğin MMA ve DMA gibi organik türleri çok az toksik etki göstermesine rağmen inorganik arsenik türleri yüksek toksisiteye sahiptir. Bunun yanı sıra arsenobetain ve arsenokolin gibi büyük molekül yapısına arsenik türleri toksik değildir (Carrero ve Tyson, 1998).

**AsIII****AsV****Şekil 2.1.** AsIII ve AsV bileşiklerinin moleküler yapısı

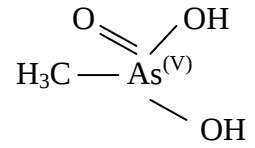
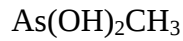
Metillenmiş Arsenik Bileşikleri



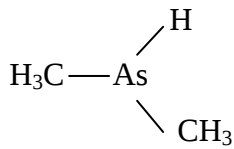
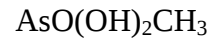
Metilarsin



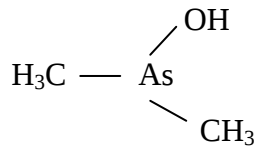
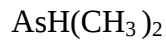
Monometilarsenöz asit



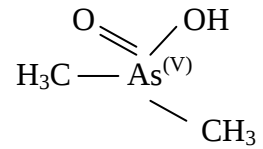
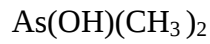
Monometilarsonik asit



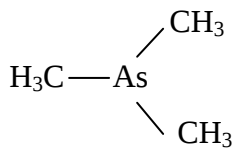
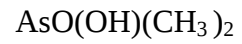
Dimetilarsin



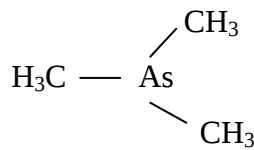
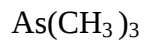
Dimetilarsenöz asit



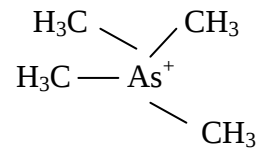
Dimetilarsinik asit



Trimetilarsin



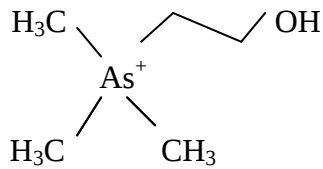
Trimetilarsinoksit



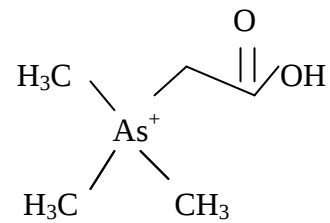
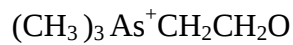
Tetrametilarsonyum iyonu



Organoarsenik Bileşikleri



Arsenokolin



Arsenobetain



Şekil 2.2. Bazı metillenmiş arsenik ve organoarsenik bileşikleri

2.1.4. Arsenik Bileşiklerinin Metabolizma ve Toksisiteleri

2.1.5. Metabolizma

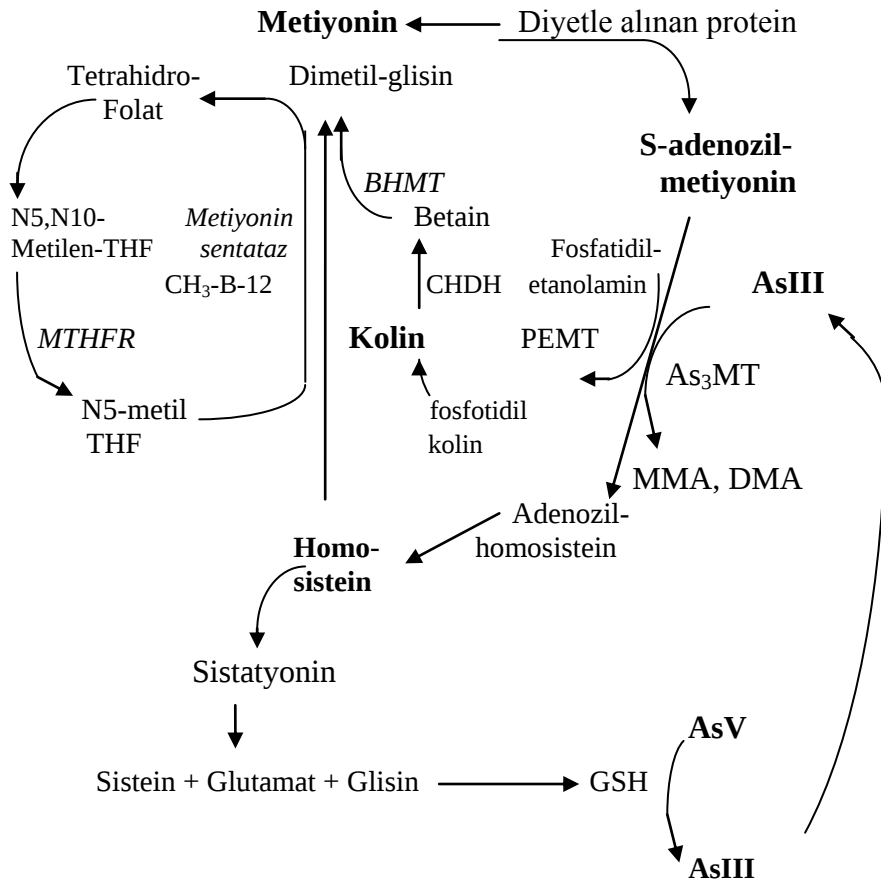
İnsanlar; besinler, sular ve diğer çevresel ortamlarda pek çok farklı formdaki inorganik ve organik arsenik türlerine maruz kalmaktadır. Arsenik formlarının her birinin farklı fiziksel ve kimyasal özellikleri ve biyolojik elde edilebilirliği vardır. Bu nedenle hayvan ve insanlardaki arsenik bileşiklerinin kinetiklerine ve metabolizmasına yönelik çalışma, karmaşık bir konudur. Diğer metallerle ve metaloidlerle karşılaştırıldığında ortaya çıkan, türler arasındaki büyük farklılıklar da arsenik metabolizmasını karakterize etmektedir.

Arsenik alım yolları; solunum yolu ve sudaki, içeceklerdeki, topraktaki ve yiyeceklerdeki arsenik için ise oral yoldur. Arsenik bileşikleri için dermal absorpsiyon oranlarına yönelik az sayıda araştırma yürütülmektedir. Mevcut bilgiler absorpsiyon oranlarının deri yoluyla alınımın genelde düşük ($< \%10$) olduğunu, fakat bazı arsenik formları için daha yüksek oranların gözlemlenebildiğini göstermektedir. Wester ve ark. (1993), H_3AsO_4 'ün sudan ve topraktan perkütan absorpsiyonu üzerinde çalışmışlardır. Al yanaklı şebekelerde arsenik alımı $\% 6$ ile $\% 2$ arasında değişmektedir. Bunun yanında insan kadavra derisinin 24 saatlik bir süre içinde uygulanan dozun yaklaşık $\% 1-2$ 'sini absorbe ettiği de rapor edilmiştir.

Hem inorganik arsenitin (iAsIII) hem de inorganik arsenatın (iAsV) laboratuvar hayvanlarının plasentasını geçtiği görülmüştür (Lugo ve ark., 1969; Bollinger ve ark., 1992). Bu sonuç, yüksek arsenik içeren içme suyuna ($\sim 200 \text{ ug/L}$) maruz kalan anne-bebek çiftlerinin kordon kanında ve anne kanında ($\sim 9 \text{ ug/L}$) benzer arsenik konsantrasyonları bulunduğunu gözlemlemiş olan Concha ve ark. (1998) tarafından yürütülen bir çalışma ile doğrulanmıştır. Daha eski çalışmalar DMA'nın farelerin plasentasını geçebildiğini (Stevens ve ark., 1977) ve organo-arsenik yem katkı maddesi Roxarsone'ın (3-nitro-4-hidroksifenilarsenik asit) yumurtalarda biriktiğini göstermiştir (Chiou ve ark., 1997). Fakat, yakın zamanda toplanan insan veya hayvan verileri, bu bulguları doğrulamaya elverişli değildir.

Mideye alınmış inorganik arseniğin biyolojik elde edilebilirliği; nasıl (yiyecek, su, içecekler veya toprak içinde) mideye girdiği, arsenikli bileşenin kendisinin çözünürlüğü ve mide-bağırsak yolunda diğer gıda bileşenlerinin ve besinlerin olması matrisine bağlı olarak değişecektir. Arseniğin doku dağılımları; kan perfüzyonu, doku

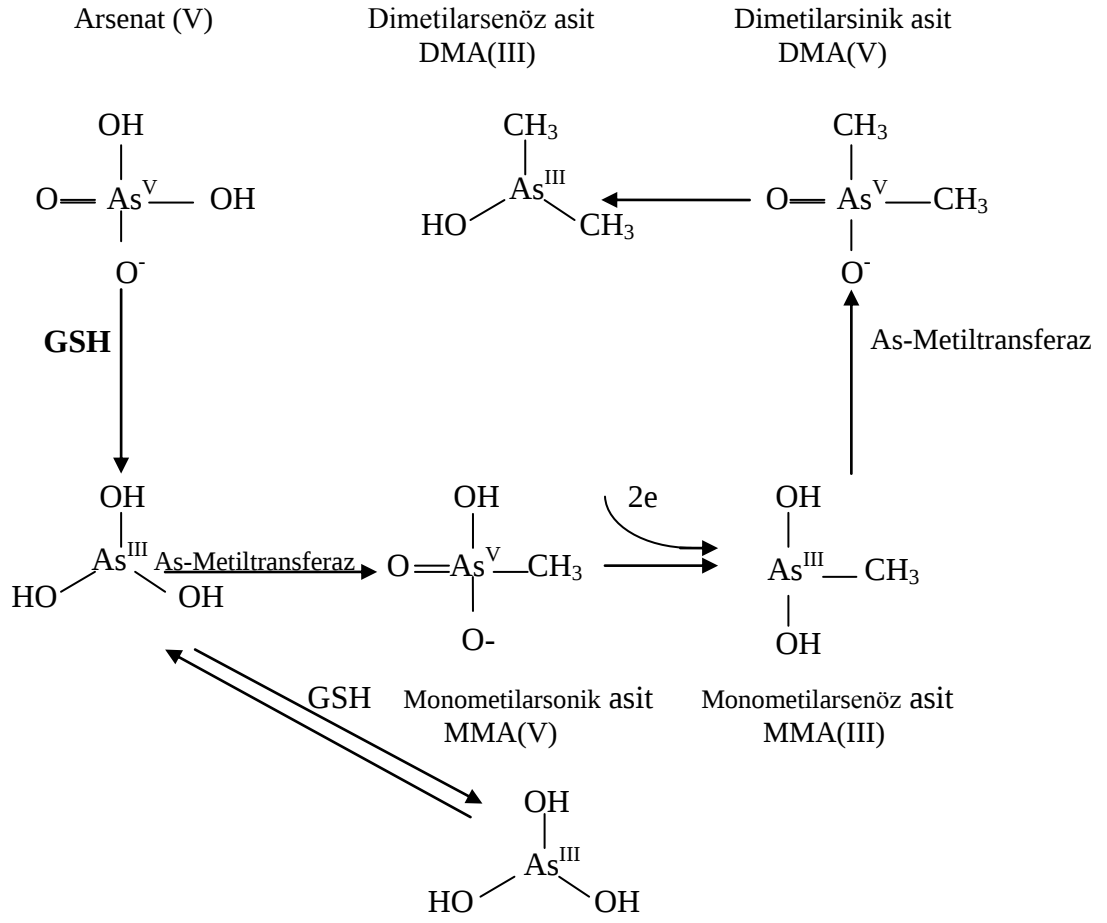
hacimleri, yayılma katsayıları, membran özellikleri ve doku afinitelerine bağlıdır. Yaşayan organizma içinde mideye alınan arseniğin akıbeti; (1) plazmadaki iAsV ve iAsIII arasındaki oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarına ve (2) karaciğerdeki ardışık metilasyon reaksiyonlarına bağlıdır. İnorganik arsenik, insanda *in vivo* olarak metillenmiştir. Arsenat hızlı bir şekilde, kısmen metil grupları eklenmiş olan arsenite indirgenmektedir. Metilasyonun esas yeri, arsenik metiltransferaz enzimlerinin metil verici olarak S- adenozil-metiyonin ve esas kofaktör olarak GSH ile metilasyon prosesine aracılık ettiği yer olan karaciğer gibi görünmektedir.



Şekil 2.3. Arsenik metilasyonu

İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalar, metilasyonun yaklaşık 0.2-1 mg/kg (günlük 0.003-0.015 mg As/kg) doz sınırlarıyla başlayabileceğini öne sürmektedir (Nagvi ve ark.,1994). Raie (1996), NAA kullanarak Glasgow (İskoçya)'daki bebeklerdeki (1 günden 5 aya) ve yetişkinlerdeki doku arsenik seviyelerini karşılaştırmıştır. Bebeklerde ve yetişkinlerde karaciğer, akciğer ve dalaktaki ortalama arsenik seviyeleri (mg/kg veya ug/g kuru ağırlık) karşılaştırıldığında sonuç sırasıyla şu şekildedir: 0.0099'a 0.048, 0.007'ye 0.044 ve 0.0049'a 0.015. Bu veriler, yaşla birlikte arseniğin dokularda biriktiğini ortaya koymaktadır ve bu da laboratuvar hayvanlarında yapılan gözlemlerle tamamen tutarlı bir bulgudur (Marafante ve ark., 1982).

İnsanlarda normal koşullar altında, mideye aşırı inorganik arsenik alımının olmadığı durumlarda, üriner boşaltım yaklaşık olarak % 20 inorganik arsenik, % 20 MMA VE % 60 DMA'dan oluşmaktayken hayvan çalışmalarının çoğunda DMA, esas metabolittir. İnorganik arsenik, yaşayan organizma içinde MMA ve DMA metil gruplarına eklenmektedir ve DMA esasen değiştirilmemiş bir formda atılırken, plazmadaki sirkülasyon sırasında MMA kısmen absorbe edilmektedir ve absorbe edilen bu MMA ayrıca, DMA metil grubuna eklenmektedir (Buchet ve ark., 1981; Vahter ve ark., 1984). Yakın zamandaki çalışmalar (Le ve ark., 2000; Mandal ve ark., 2001) hem MMA^V hem de DMA^V'in üç değerli analogları olan monometilarsonus aside (MMA^{III}) ve dimetilarsonus aside (DMA^{III}) indirgendini ve idrar yoluyla atıldığını rapor etmişlerdir.



Şekil 2.4. İnorganik arseniğin metabolizması

Arsenobetain absorbe edilmekte ve değiştirilmeden vücuttan atılmaktadır (Vahter ve ark., 1983; Brown ve ark., 1990). Diğer organo-arsenikler için benzer çalışmalar mevcut değildir. İnsanda radyoaktif olarak işaretlenmiş (As⁷⁴) arsenat ile ilgi çalışmalar, 48 saat içinde dozun % 38'inin idrar içerisinde ve tümünün % 58'inin 5 gün içerisinde vücuttan atıldığını göstermektedir (Tam ve ark., 1979). 500 ug As'yi arsenit halinde midesine almış olan kişilerde, dozun % 33'ü 48 saat içinde idrar içerisinde ve % 45'i 4 gün içerisinde vücuttan atılmıştır Günlük olarak mideye alınan inorganik arseniğin yaklaşık % 60-70'inin idrar içerisinde vücuttan atıldığı tahmin edilmektedir (Buchet ve ark., 1981).

Dil balığı ile birlikte yenilen organik arseniğin yaklaşık % 76'sı, 8 gün içerisinde idrar içinde vücuttan atılmaktadır (Tam ve ark., 1982). Fakat daha sonraki bir çalışmada (Marafante ve ark.,1987), DMA'nın (0.1 mg As/kg) tek bir oral dozunun % 3.5'inin 3 gün içerisinde TMAO olarak idrar içinde elimine edildiğini belirtmiştir. İnsanların, TMA veya TMAO' yu deniz mahsulleri içinde değil de tek başına belirli bir biçimde tükettiği hiçbir metabolizma çalışması tanımlanmamaktadır. Yamauchi ve ark. (2004), laboratuvarlarında yürütölen çoklu çalışmalardan, hamsterlara organo-arsenikallerin oral yolla uygulanmasının ardından biyolojik yarı ömürleri hesaplamıştır. Yarı ömürleri MMA için 7.4 saat, DMA için 5.6 saat, TMAO için 5.3 saat, TMA için 3.7 saat ve arsenobetain için 6.1 saat olarak açıklamışlardır. İnsanlardaki organo-arsenikler için safra ile atılım veya diğer eliminasyon yolları konusuna vurgu yapan hiçbir çalışma tanımlanmamaktadır.

Arsenik, idrar ve dışkıdan ziyade diğer yollarla vücuttan (örneğin ter ile) atılmasına rağmen bu atılım yolları genellikle minördür. Arsenik, keratin içeren dokularda birikebildiği için deri, sa ve tırnaklar da potansiyel minör boşaltım yolları olarak düşünölebilmektedir (Benko ve ark., 1971). Yapılan alışmalar, düşük seviyelerde de olsa arseniğin insan sütü içerisinde vücuttan atılabildiğini göstermektedir (Grandjean ve ark., 1995; Concha ve ark., 1998).

Arseniğe maruz kalmayı tanımlamak ve miktarını belirtmek için en sık kullanılan üç biyobelirteç; sa veya tırnaklardaki toplam arsenik, kan arsenik ve idrardaki toplam veya türleşen arsenik metabolitleridir. Arsenik (üç değerli form olarak); deri, sa ve tırnaklar gibi keratince zengin dokularda biriktiği için geçmişte

arseniğe maruz kalmanın indikatörleri olarak saç ve tırnaklardaki arsenik seviyelerinden yararlanılmaktadır (Benko ve ark., 1971).

Normalde inorganik arsenik, çok çabuk bir şekilde insan kanından atılmaktadır. Bu nedenle kan arseniği, sadece çok yakın zamandaki ve/veya nispeten yüksek düzeyde maruz kalmanın, örneğin zehirlenme vakalarının (Ellenhorn, 1997) veya kronik stabil maruz kalmanın (içme suyu kaynaklı durumlarda) bir indikatörü olarak kullanılmaktadır. Çalışmalar, genelde kan arseniğinin içme suyunda, özellikle de düşük seviyelerde, arseniğe maruz kalma ile pek ilişkili olmadığını göstermektedir.

Arseniğe maruz kalmanın diğer biyobelirteçlerinde olduğu gibi, idrardaki arsenik seviyeleri, besinler, su ve topraklar (ATSDR, 1993) yoluyla mideye alımın yanı sıra solunum yoluyla maruz kalmadan da kaynaklanabilmektedir. Fakat, arsenik hızlı bir şekilde metabolize edilip idrar içerisinde vücuttan atıldığından dolayı arseniğe en son maruz kalımı göstermek için en uygun olan idrardaki seviyelerdir. İdrardaki arsenik metabolitlerinin toplamı (inorganik arsenik + MMA + DMA), toplam arsenik ve inorganik arseniğin hepsi arseniğe en son maruz kalımın biyobelirteçleri olarak kullanılmaktadır. Daha eski çalışmaların çoğunda, arseniğe en son maruz kalımın bir biyobelirteci olarak toplam üriner arsenikten yararlanılmaktadır. Bu yaklaşım, giderek daha nadiren görülmektedir; çünkü bazı gıda maddelerinde önemli miktarlarda bulunan bazı organo-arsenik bileşikleri (örneğin, neredeyse nontoksik bileşik olan arsenobetain), büyük ölçüde değişmeden idrar içerisinde vücuttan atılmaktadır (Cullen ve ark., 1989; Le ve ark., 1994). Gönüllü insanlar tarafından deniz ürünlerinin (deniz balıkları, kabuklu hayvanları, çift kabuklu yumuşakçalar, deniz yosunları) tüketimine, artan toplam üriner arsenik boşaltımı eşlik etmekte olduğundan toplam üriner arsenik kullanılarak inorganik arseniğe maruz kalımın bu koşullar altında değerlendirilmesi, inorganik arseniğe maruz kalımın olduğundan fazla tahmin edilmesiyle sonuçlanacaktır (Buchet ve ark., 1996).

Toplam üriner arseniğin kullanımında var olan inorganik arseniğe maruz kalımın etkisini araştırmak için yapılan çalışmaların çoğu, idrarda türleşen metabolitleri ölçmektedir ve a maruz kalımın bir göstergesi olarak ya inorganik arsenikten ya da arsenik metabolitlerinin toplamından (inorganik arsenik + MMA + DMA) yararlanılmıştır. Fakat, idrar toplamadan önce en az 3 gün deniz ürünlerinin tüketilmesi yasaklanmazsa ve/veya dikkatli bir şekilde bir beslenme kaydı alınmazsa bundan

alınacak sonuçlar yanıltıcı olabilmektedir. Bunun iki nedeni vardır. İlk olarak, bazı deniz ürünlerinde, arsenik metabolitleri olan MMA ve DMA, özellikle de DMA, oldukça yüksek miktarlarda bulunmaktadır. İkincisi, deniz yosunlarında ve bazı çift kabuklu yumuşakçaların içinde mevcut olan arseno-şekerler, daha sonra idrar içinde vücuttan atılan DMA'ya (vücudun kendisi veya bağırsak mikrobiyotası tarafından) kapsamlı bir şekilde metabolize edilmektedir (Le ve ark., 1994; Ma ve Le, 1998).

2.1.6. Toksisite

Toksisite de arseniğin kimyasal formları ve oksidasyon durumları daha önemlidir. Toksisite; fiziksel durum, gaz, çözünme veya toz parçacık boyutu, hücrelerin içine emilim oranı, eliminasyon oranı, toksik bileşen içindeki kimyasal sübstitüentlerin doğası ve hastanın önceki var olan durumu gibi diğer etmenlere de bağlıdır. Arsenikallerin toksisitesi şu sırayla azalmaktadır: arsinler > iAsIII > arsenooksitler (org AsIII) > iAsV > arsonyum bileşenleri > As (Hindmarsh ve McCurdy, 1986). Son zamanlarda Vega ve ark. (2001), arseniklerin toksisite sırasının şu şekilde olduğunu söylemektedir: $iAs^{III} > monometilarsin\ oksit\ (MMAO^{III}) > DMA^{III}GS > DMA^V > MMA^V > iAs^V$. Metilasyonun başlıca detoksifikasyon yolu olduğu genel olarak kabul görmekteyken son zamanlardaki çalışmalar, metil gruplara eklenen metabolitlerin, arseniğe maruz kalım ile ilişkilendirilen olumsuz etkilerden kısmen sorumlu olabileceğini öne sürmektedir (Vega ve ark., 2001).

Laboratuvar hayvanlarında yapılan çalışmalar, arseniğin toksisitesinin formuna ve oksidasyon durumlarına bağlı olduğunu göstermiştir. Çözünür inorganik arsenikallerin organik olanlardan ve iAsIII'lerin de iAsV'lerden daha toksik olduğu genel olarak kabul edilmektedir (Maeda, 1994). Düşük ve orta düzeyde maruz kalım durumunda, arseniğin uzun vadeli dağılım modelinin daha çok maruz kalma biçimine, tavşan ve marmoset maymunlarındaki iAsIII veya iAsV'e, bağlı olduğunu belgeleyen az sayıda rapor bulunmaktadır (Marafante ve ark., 1985; Vahter ve Marafante, 1985). Fakat Maeda (1994), iAsV'in hem hayvanlar hem de insanlar için iAsIII'ten daha az toksik olduğunu, ama bitkiler için toksik olabileceğini söylemiştir. Kronik ve akut arsenik toksisitesi konusunda az sayıda literatür bulunmasına rağmen, arsenik endemik alanlardaki kronik arsenik toksisitesi konusundaki türe özgü epidemiolojik çalışmalar oldukça azdır (Saha ve ark., 1999; Saha, 2001) . Chatterjee ve ark. (1995), Batı Bengal,

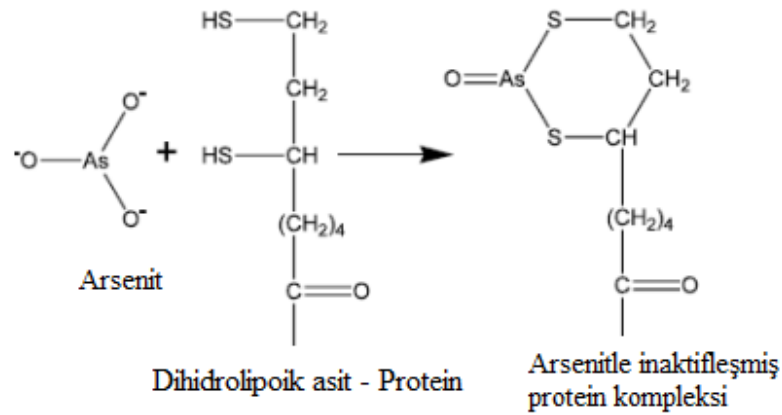
Hindistan'ın arsenikten etkilenen bölgelerinde, en toksik türlerin, iAsIII'ün, toplam arsenik seviyesinin yaklaşık % 50'si dolaylarında yer altı suyunda mevcut olduğunu bildirmiştir. Bangladeş'in arsenikten etkilenen bölgelerinde iAsIII'ün modal oranı, toplam arseniğin % 50'si ile % 60'ı arasında gibi görünmektedir (BGS and DPHE, 2001). Tayvan'ın arsenikten etkilenen bölgelerinde, Chen ve ark. (1994), üç kuyudaki ortalama arsenik, özellikle iAs^{III}, konsantrasyonunun kara ayak hastalığı (BFD) bölgesinde 671 ± 149 ug/l olduğunu bildirmiştir. iAsIII'ün iAsV'e oranı 2.6:1'di. Ama yukarıda bahsedilen çalışmaların hiçbiri, kronik arsenik toksisitesi konusundaki yayınlarında arseniğe ait hiçbir türe özgü toksisitesi belgelememiştir. Dolayısıyla arsenikten etkilenen endemik alanlarda arseniğin türe özgü kronik toksisitesini izah etmek için arseniğin türe özgü toksisitesine dair daha fazla çalışma gerekmektedir.

Popülasyon temelli çalışmalarda inorganik arseniğin (iAs) metabolitlerindeki arseniğin oksidasyon durumlarını belirleyen yeni analitik yöntemlerin kullanımının; maruz kalma, metabolizma ve toksisite arasındaki bağa yeni anlayışlar getirmesi olasıdır (Le ve ark., 2000; Del Roza ve ark., 2001). Arsenikten etkilenen endemik alanlarda arseniğin türe özgü kronik toksisitesi konusunda çalışmalar bulunmamasına rağmen, hayvan ve insan hücre hatlarındaki arsenik türe özgü toksisitesine dair son zamanlardaki bazı dökümanlar, üç değerli arsenikallerin pentavalan arsenikallerden daha toksik olduğunu öne sürmektedir. İnsanlarda, mideye alınan iAs kapsamlı bir şekilde metabolize edildiği için iAs'ye kronik maruz kalma, metil ve dimetil gruplara eklenen arsenikallere kronik maruz kalma ile sonuçlanmaktadır. İnorganik arseniğin bir biyolojik dönüşümü (biyotransformantı) olan MMA^{III}, insan hepatositlerindeki inorganik arsenitten 26 kata kadar daha toksiktir (Petrick ve ark., 2000). Lin ve ark. (1999), MMA^{III}, tiyoredoksin redüktazın bir *in vitro* inhibitörü olarak iAs^{III}'ten 100 kattan fazla daha potanttir. Dolayısıyla MMA^{III}'ün oluşumu, hem iAsV'in hem de iAsIII'ün toksifikasyonunu temsil ediyor gibi görünmektedir. Ayrıca *in vitro* çalışmalar, MMA^{III} ve DMA^{III}'ün, iAsIII gibi, GSH kompleksleri oluşturabileceğini ve bunların en az iAs^{III} kadar toksik olduğunu ortaya koymuştur (Styblo ve ark., 1997; Styblo ve ark., 2000). Yakın zamandaki diğer bir *in vitro* çalışma, iAsIII ve iAsV ile karşılaştırıldığında, MMA^{III}'ün insan hücrelerine (hepatositler, epidermal keratinositler ve bronşiyal epitelyal hücreler) karşı daha sitotoksik olduğunu göstermiştir (Styblo ve ark., 2000). Araştırmacılar, yüksek metilasyon kapasitesinin, hücreleri, üç değerli

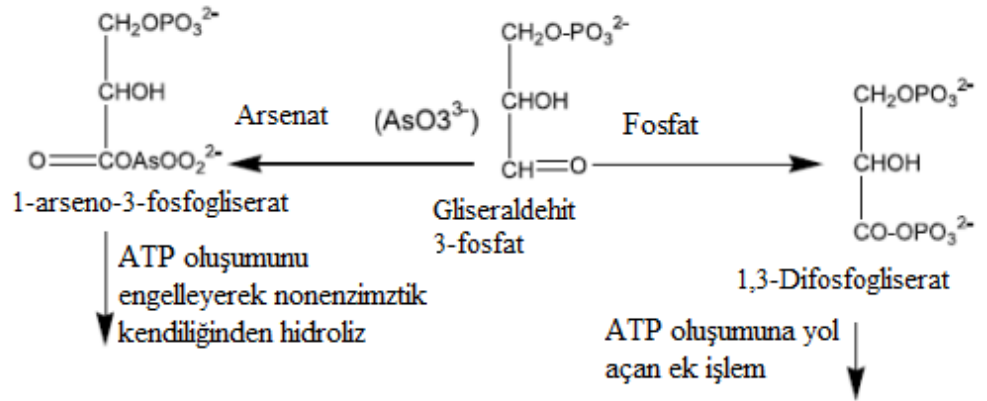
arsenikallerin akut toksisitesinden korumadığı sonucuna varmıştır. Vega ve ark. (2001), insan epidermal keratinisitleriyle yapılan *in vitro* bir deneyde üç değerli arseniklerin, hücre proliferasyonunda bir artışa sebep olduğunu, ancak pentavalan arsenikallerin böyle bir artışa sebep olmadığını söylemiştir. En son *in vitro* çalışmalardan bir diğeri, tek hücre jel (SCG, ‘comet’) deneyinden yararlanarak insan periferik lenfositlerindeki, metil gruplara eklenen üç değerli arsenikallerin (MMA^{III} ve DMA^{III}) sebep olduğu DNA hasarını değerlendirmiştir (Mass ve ark., 2001). Tek hücre jel (SCG) deneyindeki kuyruk momenti için konsantrasyon-tepki eğrisinin eğimleri temelinde bakıldığında, MMA^{III} ve DMA^{III} , iAsIII’ ten sırasıyla 77 ve 386 kat daha toksiktir. Yazarların vardığı sonuca göre, MMA^{III} ve DMA^{III} var olabilen tek genotoksik arsenik türü olmamasına rağmen arseniğin genotoksik olan doğrudan hareketli formları olarak düşünülmüştür.

Bir elementin en yaygın toksik şekli, enzim sistemlerinin inaktivasyonudur ve bu, biyolojik katalist görevi görmektedir (Dhar ve ark., 1997). iAsV, enzimlerin etkin bölgeleri ile doğrudan reaksiyona girmemektedir (Johnstone, 1963). Toksik etkisini göstermeden önce ilk olarak iAsIII’e *in vivo* olarak indirgenmektedir (Pauwels ve ark., 1965; Ginsburg ve ark., 1963). Aposhian (1989), üç değerli arseniğin hücrelerdeki nonesansiyel sülfhidril gruplara bağlanmasının, arsenik detoksifikasyonu için önemli olan bir yolu temsil edebileceğini varsaymıştır.

Özellikle enzim içinde birbirine yakın –SH-grubu olduğunda üç değerli arsenik, –SH ve –OH gruplarına bağlanarak enzimleri inhibe etmektedir. Sitrik asit devrinde hücresel enerji üreten enzimler, olumsuz etkilenmektedir. İnhibisyon oluşturan etki, piruvat dehidrojenazın iAsIII ile kompleksleşmesi yoluyla inaktivasyonuna dayanmaktadır. Bu yolla, adenosin-5-trifosfatın (ATP) oluşması da engellenmektedir. Enzim sistemi kapsamında, çeşitli enzimler ve kofaktörler, lipoik aside sahip enzimin bir proteinli molekülü, yer almaktadır. iAsIII’ün ortamda bulunduğu durumlarda, AsIII tiyol gruplardan iki hidrojen atomunun yerini almakta, bir dihidrolipoliarsenit kelat kompleksi oluşturmaktadır; bu da devam eden enzimatik aktivite için gerekli olan dihidrolipol grubun reoksidasyonunu engellemektedir ve bu önemli enzimin aktivitesi engellenmiş olmaktadır. Bunun bir sonucu olarak, kandaki piruvat miktarı artmakta, enerji üretimi azalmakta ve sonuçta hücre, yavaş yavaş zarar görmektedir (Belton ve ark., 1985). Reaksiyonlar aşağıda gösterilmektedir.



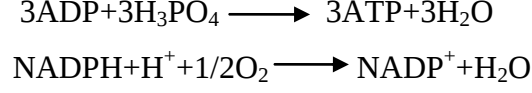
Şekil 2.5. Arsenik tarafından pirüvat dehidrojenaz enzimin inhibisyonu



Şekil 2.6. Arsenolizis

iAs^{III} ve sülfür arasındaki güçlü bağ, arseniğin keratin dokuları olan saç ve tırnakta birikmesinin nedeni olabilir. Üç değerli arseniğin, saçtaki keratinin bölgesel yakınlık ile çevrelenen stabil bir yapı oluşturmasını önermiştir. Arsenik; piruvat oksidaz, S-aminoasit oksidaz, kolin oksidaz ve transaminaz gibi enzimleri inhibe etmektedir. iAs^{III} , elementin daha toksik formu olarak kabul edilse de arsenat olarak iAs^{V} , fosfat ile yarışarak yıkıcı olabilmektedir. Örneğin arsenat, oksidatif fosforilasyonu ayırmaktadır. Oksidatif fosforilasyon, aynı zamanda indirgenmiş

nikotinamid adenin dinükleotit (NADPH) okside edilirken ATP'nin üretildiği süreçtir (Dixon, 1997).



Arsenat, stabil olmayan ve hidrolizi non-enzimatik olarak geçirmiş olan ADP'nin bir arsenat esterini üreterek bu sürece engel olmaktadır. Bu süreç, arsenoliz olarak adlandırılmaktadır. Dolayısıyla enerji metabolizması, inhibe edilmektedir ve glikoz-6-fosfattan daha çok glikoz-6-arsenat üretilmektedir. Arsenat, ayrıca DNA'daki fosfor formlarının yerine geçebilmektedir ve bu, DNA onarım mekanizmasını inhibe edecek gibi görünmektedir. Bir arsenodiester bağı, normal fosfodiester bağdan, çok büyük olasılıkla daha zayıf olacağı için bu tür bir hareket, arseniğin klastojenitesini açıklayabilmektedir. Ancak, arsenatın DNA ile birleştiğini gösterecek hiçbir doğrudan kanıt bulunmamaktadır (Elder ve Davies, 1993).

Fosfat konsantrasyonlarının yüksek olduğu ortamlarda, biyotaya (biyota, bir bölgede yaşayan canlı türlerinin biri) karşı arsenat toksisitesi genellikle indirgenmektedir. Arsenikle kirlenmiş ortamlar, sınırlı tür zenginliği ve çeşitliliği ile nitelendirilmektedir. Eğer arsenat seviyeleri yeterince yüksekse sadece direnç gösteren türler var olabilmektedir (WHO, 2001).

Arsenik ve selenyum, vücut içinde birbirlerine karşı antagonistiktir ve her biri, bir diğerrinin toksisitesini yok etmektedir. Arsenik aynı zamanda, selenyumun insan metabolizmasındaki önemli rolüne de engel olabilmektedir. Arsenik, selenyumun hareketini inhibe etmektedir ve bu da selenyuma bağlı bir enzim olan glutatyon peroksidazın sistemde gözle görülür eksikliğine neden olmaktadır (Kenyon ve ark., 1997).

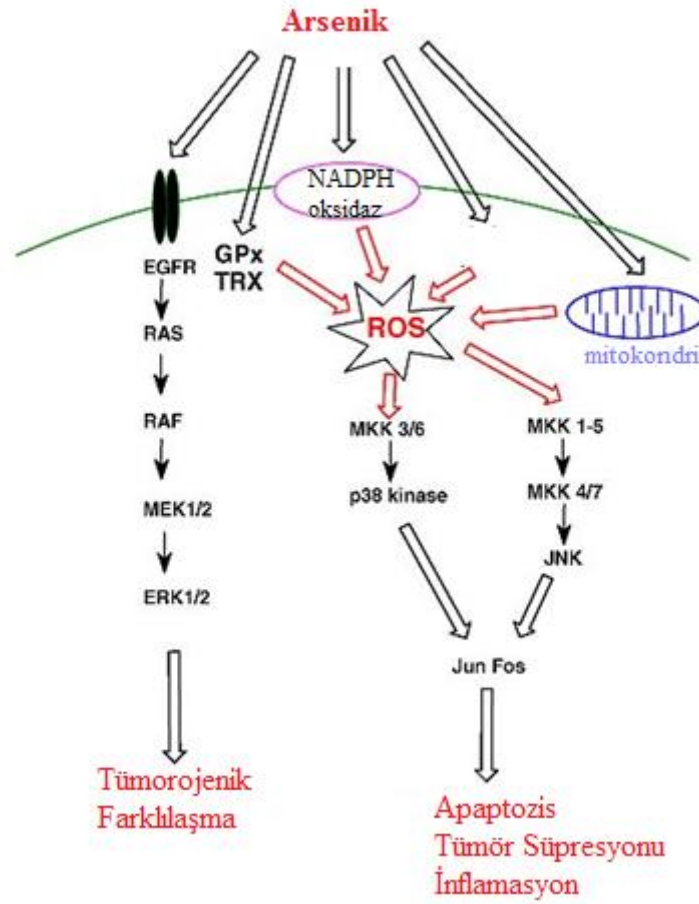
Arsenik, metalotionein (MT) seviyelerinde artışlara neden olmuştur. Bununla birlikte, arseniğin, düşük moleküler ağırlığa sahip, sistin zengini, metal bağlayıcı bir protein olan MT tarafından detoksifiye edilip edilemeyeceği bilinmemektedir (Kreppel ve ark., 1994). Fakat MT'deki çinko kaynaklı artışlar ise, çinko ile ön tedavi gören farelerdeki arsenik letalitesine karşı korunmadan sorumlu değil gibi görünmektedir. Arsenik toksisitesine karşı olan bu toleransa ilişkin mekanizma, bilinmiyor olsa da

Çinko ile n tedaviye, artan arsenik eliminasyonu eşlik etmektedir (Ramos ve ark., 1995).

2.1.7. Arsenik ve İnsan Hastalıkları

İnorganik arseniğe kronik maruz kalım; mide-bağırsak yolu, solunum yolu, deri, karaciğer, kardiyovasküler sistem, hematopoetik sistem, sinir sistemi, vb. etkileri birtakım sağlık problemlerine yol açabilmektedir. Deride pigmentasyon değişimleri, hiperkeratoz ve deri kanseri başlangıcının arseniğin ilaçlar ve içme suyu yoluyla tüketime bağlanabilmektedir. Ayrıca, organo-arseniklere oral yolla maruz kalan insanlardaki toksikolojik etkilere ilişkin yayımlanmış hiçbir bilgi bulunmamaktadır. Çeşitli i ve dış organların arseniğe maruz kalımının sağlığa etkileri, aşağıda özetlenmektedir (WHO, 2001).

Arsenik kaynaklı genotoksisite, hücresel genetik materyalin bütünlüğünün oksidanlar ya da serbest radikal türleri tarafından değiştirilmesini gerektirebilmektedir. Son zamanlarda yapılan pek çok çalışma, arsenik kaynaklı serbest radikal ve oksidatif stres üretiminin, oksidatif hassasiyete sahip sinyalizasyon yolları aracılığıyla hücre hasarına ve hücre ölümüne neden olabileceğine ilişkin deneysel kanıt sunmuştur (şekil 2.7; De Vizcaya-Ruiz ve ark., 2009). Arseniğe maruz kalım; çeşitli kanser türleri (Miller ve ark., 2002), kardiyovasküler hastalık (Navas-Acien ve ark., 2005), diyabet (Dıaz-Villaseğor ve ark., 2007), sinir hastalıkları (Vahidnia ve ark., 2007) ve dermal etkiler (Cohen ve ark., 2006) ile ilişkilendirilmiştir.



Şekil 2.7. Arsenik aracılıklı hücre sinyalizasyonu. (De Vizcaya-Ruiz ve ark., 2009). (EGFR, epidermal büyüme faktör reseptörü; Ras, GPx, glutatyon peroksidaz; Trx, tiyoredoksin; JNK, c-Jun N-terminal kinazlar, MKK, Mitojenle aktive edilmiş protein kinazlar).

2.1.7.1. Solunum Sistemine Etkileri

Doğal yollarla ya da meslek dolayısıyla inorganik arseniğe maruz kalan insanlarda; larenjit, soluk borusu bronşiti, rinitis, farenjit, nefes darlığı, göğüs sesleri (krepitasyonlar ve/veya ronki), burun tıkanıklığı ve nazal septumun perforasyonu görülmektedir (Milton ve ark., 2001).

2.1.7.2. Pulmoner Etkiler

İçme suyundaki artan arsenik konsantrasyonlarına kronik maruziyet durumunda kronik arseniğin alınımı, kötü huylu olmayan pulmoner hastalık oluşumunda rolü

olduğurapor edilmiştir. Borgono ve ark. (1977), arsenikle kirlenmiş içme suyunun bulunduğu (0.80 mg/L) Antofagasta, Şili’de ikamet eden 180 kişi ile yapılan bir kohort çalışmada normal deriye sahip 36 deneğin % 3.1’i ile karşılaştırıldığında ‘anormal deri pigmentasyonu’ görülen 144 deneğin % 38.8’inin kronik öksürükten şikayet ettiğini bildirmiştir. Batı Bengal, Hindistanda’ki içme suyunda bulunan arsenik ile ilgili bir çalışmada, Guha Mazumder ve ark. (1997), arsenik hiperpigmentasyon görülen 156 hastanın 89’unda (% 57’sinde) bir öksürük şikayeti olduğunu belirtmiştir. Bu hastaların 17’si üzerinde uygulanan akciğer fonksiyon testlerinde 9 hastada (% 53) restriktif akciğer hastalığı; 7 hastada (% 41) ise kombine obstruktif ve restriktif hastalık görülmüştür.

2.1.7.3. Kardiyovasküler Etkiler

Arsenik toksisitesinin kardiyovasküler anormallikler, Raynaud hastalığı, miyokard infarktüsü, miyokard depolarizasyonu, kardiyak aritmileri, kan damarlarının genişlemesi ve tıkanması ve kara ayak hastalığı (BFD) gibi etkilerini genellikle hem kalp hem de periferik arteriyel ağaç ortaya koymaktadır. Tayvan’daki çalışmalar, içme suyu yoluyla arseniğe maruz kalma, gözlenen etkilere maruz kalımın hem süresi hem de düzeyine ilişkin önemli maruz kalım-tepki ilişkileri ile birlikte BFD’nin eşlik ettiğini; bu durumun, sonunda ekstremitelerde (özellikle ayak parmakları ve ayaklarda) şiddetli ağrılı kangren oluşumuna yol açan ve genellikle uzvun kesilmesini gerektiren, el ve ayaklarda giderek artan bir dolaşım kaybı ile karakterize edildiğini açıkça göstermektedir (Lagerkvist ve Linderholm, 1988). Zaldivar (1974), 0.60 mg As/L içeren su tüketen çocuklarda miyokard infarktüsü ve atardamar kalınlaşması görüldüğünü rapor etmiştir. Tayvan’da bulunan BFD’nin aşırı derecedeki formu ve yüksek tekrarlanma sıklığı, diğer bölgelerde gözlemlenmemektedir. Dolayısıyla yetersiz beslenme ve eş zamanlı maruz kalımlar gibi diğer faktörlerin hastalığın patofizyolojisinde rol oynaması muhtemeldir (WHO, 2001). Bunun tam tersine, arseniğe maruz kalım ile serebrovasküler hastalıklar arasındaki ilişki için sadece sınırlı kanıt bulunmaktadır. En dikkat çeken Chiou ve arkadaşlarının yaptıkları Tayvan kökenli birkaç çalışma (1997), arseniğe artan maruz kalım ile birlikte serebrovasküler hastalıktan ölüm riskinin yükseldiğini göstermektedir. Ayrıca, diğer ülkelere gelen

alışmalar, Tayvan'daki çalışmaların bulgularına yönelik yalnızca son derece sınırlı destek sağlamaktadır. Chen ve ark. (1995), uzun süre arseniğe maruz kalımın insanlarda hipertansiyonu tetikleyebileceğini öne sürmüştür. Ayrıca Rahaman ve ark.'da (1999), Bangladeş'te arsenikten etkilenen insanlarda hipertansiyonun tetiklendiğini bildirmiştir.

2.1.7.4. Gastrointestinal Etkiler

İnorganik arsenikallerin mide-bağırsak yolundan emiliminin etkinliği, suda çözünürlüklerine bağlıdır. Bazı gastrointestinal semptomlar, şiddetli dozda arseniğin mideye alımına bağlı arsenik intoksikasyonunun genel ve belirgin özellikleridir. Daha düşük dozda arsenikten kaynaklanan subakut arsenik zehirlenmesi; kuru ağız ve boğaz, mide yanması, mide bulantısı, karın ağrıları ve krampları ve orta dereceli ishal şeklinde kendini göstermektedir. Düşük dozda arseniğin kronik olarak mideye alımı, semptomatik gastrointestinal rahatsızlık olmadan meydana gelebilmekte veya sırasıyla üst ve alt abdominal rahatsızlık hissi ile birlikte hafif bir özofajit, gastrit veya kolit üretebilmektedir (Nagvi ve ark., 1994). Anoreksi, emilim bozukluğu ve kilo kaybı olabilmektedir (Goebel ve ark., 1990).

2.1.7.5. Hematolojik Etkiler

Hematopoetik sistem, hem kısa hem de uzun süre arseniğe maruz kalımdan da etkilenmektedir. Anemi (normokromik normositer, aplastik ve megaloblastik) ve lökopeni (granülositopeni, trombositopeni, miyeloid, miyelodisplazi), zehirlenmenin genel etkileridir ve akut (Armstrong ve ark., 1984), intermediyat (Franzblau ve Lilis, 1989) ve kronik oral maruz kalımlardan kaynaklandığı bildirilmektedir (Glazener ve ark., 1968). Bu etkiler, eritropoezin kan hücreleri üzerindeki doğrudan hemolitik veya sitotoksik etkileri veya bir supresyonundan dolayı olabilmektedir (Lerman ve ark., 1980). Kronik olarak günde 0.07 mg As/kg'e veya daha azına maruz kalan insanlarda bu tür etkilerin hiçbirine rastlanmamaktadır. Nispeten yüksek dozlardaki arseniğin insanlarda kemik iliği depresyonuna yol açtığı bildirilmektedir. Winski ve Carter (1998), *in vitro* model üzerinde inorganik arsenit ve arsenatın insan eritrosit morfolojisindeki etkisini incelemiştir. Değerlendirmelerine göre, insan eritrositleri

arsenata karşı, arsenite oranla, 1000 kat daha fazla hassastır. Yapılan bir çalışma, DMA'nın DMA^{III} formundaki RBC'ler tarafından alındığını ve dışa akan arsenik DMA^V olursa, bu alım ve dışa akış oranlarının, hayvan türlerine bağlı olduğunu belgelemektedir (Shiobara ve ark., 2001).

Hemoliz mekanizması, hücre içi GSH'nin azalmasına yol açarak fare ve sıçanlardaki Fe²⁺ ve Fe³⁺'dan elde edilen hemosiyanindeki sülfhidril grupların oksidasyonu ile sonuçlanmaktadır. Hemoglobinin, hücrelerin oksijen alımını azaltarak arsenikle birleşmekte; terapi ise kuluçkaya engel olmaktadır (Saha ve ark., 1999).

2.1.7.6. Hepatik Etkiler

Karaciğer, arseniği biriktirme eğilimi gösterdiği için hepatik tutulum, aylar veya yıllar boyunca devam eden bir kronik maruz kalım komplikasyonu olarak açıklanmaktadır (Winski ve Carter, 1998). Kronik arsenik kaynaklı hepatik değişimler arasında siroz, sirozsuz portal hipertansiyon, yağlı dejenerasyon ve primer hepatik neoplazi yer almaktadır. Hastalar; kanayan özofagus varisleri, asit, sarılık veya basit bir genişlemiş hassas karaciğer, mitokondriyal hasar, bozulan mitokondriyal fonksiyonlar ve porfirin metabolizması (Sanatra, 1999; Guha Mazumder, 2001) yağlı infiltrasyon, kolanjit, kolesistit ve akut sarı atrofi ile şişkin (Winship, 1984) ve hassas karaciğer durumları ile birlikte tıbbi yardıma başvurmaktadır (Chakraborty ve Saha, 1987; Ding ve ark., 1987). Fowler solüsyonunu kullanmış olan hastalarda bazen kan analizi, yüksek düzeyde hepatik enzimlerini, hepatik yağlı infiltrasyonu ve karaciğer sirozunu ortaya çıkarmıştır (Franzblau ve Lilis, 1989).

2.1.7.7. Renal Etkiler

Tekrarlanan maruziyeti böbreklerde karaciğer gibi inorganik arseniği biriktirecektir. Böbrekler, pentavalan arseniğin önemli bir dönüşüm alanı olmasının yanı sıra arseniğin vücuttan dışa atılımı için de esas yoldur (Armstrong ve ark., 1984). İnsanlarda, böbrekler diğer çoğu organ sistemine nazaran arseniğe karşı daha az hassas gibidir. Organo-arsenikallerin insan renal sistemi üzerindeki etkilerine dair bir rapor bulunmamaktadır. Böbrekteki arsenik hasar alanları; kılcal damarlar, tübüller ve glomerülleri kapsamaktadır ve bu durum, hematuri ve proteinli idrara, oligüriye, gerçek bir renal bozukluk riski taşıyan şoka ve dehidrasyona, kortikal nekroza ve kansere yol

açmıştır (Giberson ve ark., 1976; Gerhardt ve ark., 1978; Clarkson, 1991; Hopenhayn-Rich ve ark., 1998).

2.1.7.8. Dermal Etkiler

Arseniğe kronik maruz kalım; arsenikoz için tanı kriterleri olarak sıklıkla kullanılan, hiperkeratoz ve hiperpigmentasyon da dahil olmak üzere deri üzerinde lezyonların gelişmesine yol açmaktadır (McCarty ve ark., 2007). Arseniğe maruziyeti takip eden dermal etkiler, arsenik zehirlenmesinin ilk evrelerinin özellikleridir. Arsenik kaynaklı kanserler sonradan ortaya çıkabilmektedir ve bazen semptomların gelişmesi on yıllar sürebilmektedir (Lage ve ark., 2006).

Cilt sorunları insanların günde 0.01-0.1 mg As/kg veya daha fazla dozda arsenik içeren içme suyu tüketmiş olduğu bazı epidemiyolojik çalışmalarda belgelenmektedir (Tondel ve ark., 1999; Guha mazumder, 2001). Günde 0.003-0.01 mg As/kg'lık kronik dozlara maruz kalımın hiçbir dermal etkisi veya diğer etkileri bulunmamaktadır (Southwick ve ark., 1981; Valentine ve ark., 1985). Özellikle vücutta cildin biraz daha koyu renk olma eğilimi gösterdiği alanlarda hiperpigmentasyon meydana gelebilmektedir (Shannon ve Strayer, 1989). Arsenikten kaynaklı ilk eritromatoz kızarıklık; aktinik keratoz, avuç içlerinin ve ayak tabanlarının hiperkeratozu, papilomatoz, tekrarlayan pruritik ürtiker epizodları, ya da hatta ciltte gözle görülür bir kızarıklığın olmadığı genelleşmiş pruritis, arsenik olmayan benzer tümörlerden histolojik olarak ayırt edilemeyen bazal hücreli karsinom veya skuamöz hücreli karsinom, ve 'Mees' veya 'Aldrich-Mees' çizgileri olarak adlandırılan enine beyaz indentasyonların olduğu el ve ayak tırnaklarının görüldüğü safhaya gelebilmektedir (Adams, 1990).

2.1.7.9. Nörolojik Etkiler

Yapılan bazı çalışmalar, inorganik arseniğin insanlarda alımın sinir hasarıyla sonuçlanabildiğini göstermektedir. Akut yüksek maruz kalım (günde 1 mg As/kg veya daha fazla) genelde baş ağrısı, uyuşukluk, zihin bulanıklığı, halüsinasyon, nöbet geçirme ve koma semptomlarının görüldüğü ensefalopatiye neden olmaktadır (Grantham ve Jones, 1977). Orta dereceli ve kronik maruz kalımlar (günde 0.05-0.5 mg

As/kg) ellerde ve ayaklarda hissizlik olarak başlayan, fakat daha sonra ağrılı bir ‘karıncalanma’ hissine, el veya ayak bileği felcine, asimetrik çift yönlü frenik sinire ve uyuşukluk, reflekslerin kaybı ve kas zayıflığına yol açarak hem duyuşal hem de motor sinirlerin periferik nöropatisine dönüşebilen simetrik periferik nöropatiye neden olmaktadır (Wagner ve ark., 1979; Morton ve Coron, 1989; Bansal ve ark., 1991; Base ve ark., 1996).

2.1.7.10. Üreme ve Gelişimle İlgili Etkiler

80 yılı aşkın bir süredir, inorganik arseniğin plasenta engelini kolaylıkla geçtiği ve fetüs gelişimini etkilediği bilinmektedir (Squibb ve Fowler, 1983). Organik arsenikler, plasentadan kolay geçmiyor gibi görünmektedir ve plasenta içinde depolanmaktadır (Leonard ve Lauwerys, 1980). Artan fetal, yeni doğan ve doğum sonrası ölümleri ve düşük doğum ağırlıklarındaki, düşüklerdeki, ölü doğumlardaki, preeklampsideki ve konjenital malformasyonlardaki yükselişlerle beraber çeşitli türlerdeki malformasyonların deneysel indüksiyonuna dair çok fazla belge bulunmaktadır (Squibb ve Fowler, 1983).

İnorganik arseniğin mideye alınımının insanlarda anormallikle neden olup olamayacağı konusu iyice anlaşılmamaktadır. Boston’daki bir vaka-kontrol çalışmasına göre, içme suyuındaki arsenik ile doğuştan kalp rahatsızlıkları arasında genel kapsamda hiçbir ilişki bulunmamaktadır; fakat aorta koarktasyonu ile bir ilişkisi olduğu belirtilmektedir (Zierler ve ark., 1988).

Bazı araştırmacıların bulgularına göre, hamilelik süresine arsenik tozuna maruz kalmış olan annelerin bebeklerinde konjenital malformasyon olayının sıklığı beklenenden daha yüksektir ve bu bebekler ortalama doğum ağırlığının altındadır (Nordstrom ve ark., 1978; Nordstrom ve ark., 1979; Nordstrom ve ark., 1979). İsveç’te bir bakır izabe tesisinin yakınında yaşamış olan kadınlarda çocuk düşürme vakası, Doğu Massachusetts’te ve uzaklığın bir işlevi olarak azalma eğilimi göstermektedir. Birkaç çalışmada, arsine neden olmuş olan yarı iletken endüstrisinde çalışmış olan kadınlarda düşük sayısında bir artış olduğu rapor edilmiştir (La Dou, 1983; Calabrese ve ark., 1987).

2.1.7.11. İmmünolojik Etkiler

Arseniğe solunum yoluyla maruz kalmanın bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri konusunda önemli çalışmalar bulunmamaktadır. Kömür yakan bir elektrik santralinde arseniğe maruz kalan işçilerin serum immunoglobulin seviyelerinde herhangi bir anormallik saptanmamaktadır (Benko ve ark., 1988). Düşük dozda arsenit (2×10^{-6} M) ve arsenatta (5×10^{-6} M) kültür yapılmış insan lenfositlerinin fitohemaglutinin (PHA) ile indüklenmiş stimülasyonu arsenitle birlikte % 49, arsenatla birlikte ise % 19 artmaktadır; ama yüksek dozda arsenit (1.9×10^{-5} M) ve arsenatta (6×10^{-4} M) PHA ile indüklenmiş stimülasyon, bağışıklık tepkisindeki bir bozuklukla tamamen engellenmektedir (McCabe ve ark., 1983).

Gonsebatt ve ark. (1994), ortalama 37 ug/L arsenik konsantrasyonu içeren içme suyu tüketen 33 bireydeki lenfosit-yenileme yeteneğini karşılaştırmıştır. Arseniğe maruz kalan deneklerin periferik kan lenfosit sayısı, kontrol grubundakilere kıyasla kısmen artmaktadır ($3.1 \pm 1.0 \times 10^6$ ya $2.6 \pm 1.1 \times 10^6$).

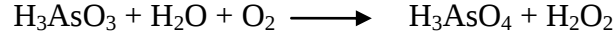
2.1.7.12. Oksidatif ve Nitrosatif Stres

Arsenik toksisitesine ilişkin pek çok çalışma, reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türlerinin canlı hücrelerdeki inorganik arsenik metabolizması sırasında üretilmesini önermiştir (Shi ve ark., 2004).

Arsenik, mitokondriyal bütünlükte morfolojik değişimlere ve mitokondriyal membran potansiyelinde hızlı bir düşüşe neden olmaktadır. Mitokondriyal değişiklikler, süperoksit anyon radikalini kontrolsüz rasgele meydana geldiği başlıca alanlar olarak ele alınmaktadır. Glutasyon tükenmesi, ksenobiyotiklere karşı hücrenin oksidan savunmasından kaynaklanabilir ve süperoksit radikalden kaynaklanan ardışık mekanizmaları, hücrelerin arsenik toksisitesine olan hassasiyetinde bir artışa yol açabilmektedir (Valko ve ark., 2005; Cohen ve ark., 2006). Arseniğe maruz kalan insanlarla ve hayvanlarla yapılan hem canlı içi hem de canlı dışı çalışmalara dayanan deneysel sonuçlar; peroksit radikallerinin ($ROO^{\bullet}$), süperoksit radikalini ($O_2^{\bullet-}$), singlet oksijenin (1O_2), hidroksil radikalini ($^{\bullet}OH$), hidrojen peroksidin (H_2O_2), dimetil arsenik radikalini $[(CH_3)_2As^{\bullet}]$, kan non-protein sülfhidrillerinin ve/veya oksidan kaynaklı

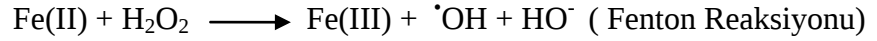
DNA hasarının oluşumundaki artışın gerekliliğinin olası olduğunu göstermektedir (Flora ve ark., 2007). Tüm bu reaktif türlerin oluşumundan sorumlu gerçek mekanizma, tam olarak yeni açıklığa kavuşturulmuştur.

H₂O₂ üretiminin ilginç bir yolunun As(III)'ün As(V)'e oksidasyonunu içermesi önerilmiştir; bu, fizyolojik şartlar altında, H₂O₂ oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Valko ve ark., 2005).



Yukarıdaki reaksiyon, $-40.82 \text{ kcal mol}^{-1}$ ($-170.87 \text{ kJ mol}^{-1}$)'lük H₂O₂ oluşumu için tahmini bir standart reaksiyon serbest enerji değişimi ile eksergonik ve spontandır.

Hidrojen peroksit, serbest bir radikal türü değildir; fakat bir organizma demirle aşırı yüklendiğinde (hemokromatozis, hemolitik anemi ve hemodiyaliz durumlarında olduğu gibi) 'serbest mevcut demir'in yüksek hücrel konsantrasyonlarının, hidrojen peroksidin ayrışmasında Fe(II)'nin katılımıyla gösterildiği gibi (Fenton reaksiyonu), oldukça reaktif hidroksil radikalleri üreterek sağlığa zararlı etkileri olabilmektedir:



Hidroksil radikal, sulu bir ortamda 1 ns'den daha kısa bir yarı ömür ile oldukça reaktif bir reaktif oksijen türüdür (ROS) (Valko ve ark., 2007). Dolayısıyla canlı içi üretildiğinde oluşum alanına yakın bölgelerde reaksiyon göstermektedir. DNA'nın çevresindeki $\cdot\text{OH}$ oluşumu, DNA'nın deoksiriboz temeli ile veya DNA bazları ile reaksiyona giren bu radikalın değişmiş (hasar görmüş) bazlar veya dizi aralıkları üretmesine yol açabilmektedir. Fenton reaksiyonuna göre; canlı içinde üretilen hidroksil radikallerin çoğunluğu, hidrojen peroksidin metal katalizli ayrışmasından kaynaklanmaktadır (Naughton ve ark., 1993).

Arseniğe maruz kalım, reaktif oksijen türlerinin yanı sıra reaktif nitrojen türlerinin (RNS) oluşumunu da başlatabilmektedir. NO'nun arsenik kaynaklı üretimini tanımlayan birtakım çelişkili sonuçlar rapor edilmiştir ve bunlardan bir tanesi,

hepatositlerdeki ve insan karaciğer hücrelerindeki NO üretiminde arsenik kaynaklı hiçbir artışın olmadığı sonucuna ulaşmıştır. Bu da, sitokinle uyarılmış insan karaciğer hücrelerinde ve hepatositlerde uyarılabilir NO sentaz gen ekspresyonunu engellemiştir (Germolec ve ark., 1996; Hughes, 2002; Flora ve ark., 2008). Fakat, diğer bir çalışmada, arsenitin, sıçan pulmoner arter düz kas hücrelerinde uyarılabilir NO sentaz gen ekspresyonunu engellediği söylenmiştir (Kodavanti ve ark., 1998). EPR spektroskopisinden elde edilen sonuçlara göre, düşük seviyelerde arsenit ($<5 \mu\text{M}$) ile yapılan üçüncü bir çalışma, benzer bir şekilde, Ca(II) 'nin hücre içi konsantrasyonlarında hiçbir değişiklik ya da hiçbir NO üretimi kaydetmemiştir (Barchowsky ve ark., 1999).

2.1.7.13. Şeker hastalığı

Şeker hastalığı, arseniğe maruz kalan içme suyuyla ilişkilendirilmiştir. Lai ve ark. (1994), güney Tayvan'da yaşayan 891 yetişkinde şeker hastalığının tekrarlanma sıklığı ile vücuda alınan inorganik arsenik arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Çalışmalarının sonuçlarına göre, Taype'de yaşayanlarla ve bütün Tayvan nüfusuyla karşılaştırıldığında BFD'nin salgın olduğu alanlarda yaşayanlarda şeker hastalığının tekrarlanma sıklığında iki katı bir artış bulunmaktadır (yaş ve cinsiyet ayarlamalarının sonrasında). Tsai ve ark. (1999), yerel ve ulusal oranlara kıyasla, dört ilçede arseniğe maruz kalan nüfus arasında şeker hastalığından kaynaklı aşırı bir ölüm oranı olduğunu belirtmiştir. Tayvan BFD sahasında ikamet eden kişilerden oluşan bir grupta şeker hastalığının oluş sıklığı, içme suyundaki arseniğe giderek artan maruz kalım ile ilişkilendirilmektedir (Tseng ve ark., 2000).

Rahman ve ark. (1998; 1999), arseniğe maruz kalımın bir indikatörü olarak keratoz varlığını kullanırken ve Bangladeş'te içme sularının içinde arseniğe (prevalans oranı = 5.9) maruz kalanlarda diyabet riskinin arttığını ortaya koyarken Lewis ve ark. (1999), Utah'taki ölüm oranına yönelik çalışmada, içme suyu içerisinde artan seviyelerde arseniğe maruz kalan kadın ve erkeklerde diyabet kaynaklı ölümlerin sayısında belirgin bir fazlalık bulamamıştır. İki mesleki çalışma ve Rönnskär grubunda yapılan, vakaya atıfta bulunan bir çalışma, Bangladeş'teki cam işçileri arasındaki şeker hastalığı ile arseniğe maruz kalım arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır (Axelson ve ark., 1978; Rahman ve ark., 1996).

2.1.7.14. Biyokimyasal etkiler

Arsenik bileşenlerinin, insanlarda 200'den fazla enzimi inhibe ettiği bilinmektedir (Abernathy ve ark., 1999). Kulanthaivel ve ark. (1990), fenilarsin oksit (PAO) ve komşu tiyol grupların katalitik etkisini, insan plasental Na^+ -H değişiricisinin Na^+ ve H^+ çıkışını inhibe ettiğini belirtmiştir (Abernathy ve ark., 1999). Sheabar ve Yanni (1989), arsenitin insan kan enzimleri üzerindeki *in vitro* etkilerini araştırmıştır. Glutamil piruvat transaminazın % 70-% 80 inhibisyonu bulunmaktadır ve glutatyon peroksidaz da 0.8 mg As/1'den olumsuz yönde etkilenmektedir. Ayrıca, kan glikoz-6 fosfatı ve kolinesteraz tamamen inhibe edilmektedir. Diğer çalışmalar; sodyum arsenitin, insan Hela hücrelerinin hücresel hem oksijenazında belirgin bir artışa neden olduğunu göstermektedir (Taketani ve ark., 1989). Arsenit, piruvat veya alfa-ketoglutaratın NAD-bağlı oksidasyonunu inhibe ettiği karaciğerde hızlı ve kapsamlı bir şekilde birikmektedir. Bu durum, üç değerli arseniğin bu substratların oksidasyonu için gerekli olan komşu tiyoller ile kompleks oluşturmasıyla meydana gelmektedir (Squibb ve Fowler, 1983).

Değişen DNA onarımının arsenik karsinogenezinin nedeni olduğu teorisi özellikle kabul edilir bir teoridir; çünkü arsenit gibi üç değerli arsenik türleri, hem ditiyollere hem de serbest sülfhidril gruplara güçlü bir şekilde bağlanabilmektedir (Sunderman, 1978; Dixon, 1997). Bu tür protein bağlanması; inhibe edilmiş DNA onarımına, temel genetik alanlardaki mutasyonlara veya artan hücre proliferasyonuna neden olabilmektedir ve daha sonra bu durum, inhibe edilmiş DNA onarımı vasıtasıyla bunu takip eden mutasyonlara yol açabilmektedir.

2.1.7.15. Mutojenik ve kanserojenik etkiler

Mutageniz; DNA hasarının indüksiyonunu ve basit gen mutasyonları arasında değişiklik gösterebilen geniş çeşitlilikte genetik değişikliği (kromozom yapı ve sayı anormalliklerinde çok büyük ölçüde gözle görülür değişikliklerin olduğu DNA baz çifti) kapsamaktadır. Bu değişikliklerin bazıları, sonraki nesillere aktarılabilen genetik hasara neden olabilmekte ve/veya bazıları ise maruz kalan nesilde kansere veya onun getirdiği problemlere neden olabilmektedir (Hoffman, 1991).

Arseniğe maruz kalım dozları ile kromozom sapmalarının son sıklığı arasındaki rastlantısal zayıf korelasyon durumu; arseniğin, DNA onarımını engelleyerek geniş ölçüde genetik hasarın oluşumunu kolaylaştırmış olması yönünde açıklanmaktadır (Bencko ve ark., 1988). Oksijen radikallerini uzaklaştıran süperoksit dismutaz ve katalaz gibi enzimler, arseniğin genotoksik etkisi için muhtemel bir temel belirleyerek arsenik kaynaklı DNA hasarına karşı koruma sağlıyor gibi görünmektedir (Nordenson ve Beckman, 1991).

100 yıldan uzun bir süredir, arsenikli ilaçlar ile kronik tedavi gören hastalarda hem bazal hücreli hem de skuamöz hücreli cilt karsinomlarının oluş sıklığının büyük ölçüde arttığı gözlemlenmektedir. Bu arsenikal cilt kanserleri, genellikle arsenisizmin dermatolojik belirtilerinin olduğu durumlarda ortaya çıkmaktadır. Bir kısmında, özünde arsenikal olarak kabul edilen iç neoplazmlar bulunmaktadır (Chen ve ark., 1988; Morales ve ark., 2000). Popülasyonun alt kümelerinin arsenikle kirlenen içme suyuna maruz kaldığı Japonya, Bangladeş, Batı Bengal-Hindistan, Şili ve Arjantin dahil olmak üzere dünyanın diğer kesimlerinden, çeşitli alanlarda (özellikle akciğer, deri, mesane, böbrek ve karaciğerde) artan kanser riskine ilişkin raporlar bulunmaktadır (Hopenhagen-Rich ve ark., 1996). Utah'taki Mormonlar arasında kanser oluş sıklığına dair Lewis ve ark. (1998), tarafından yapılan çalışmada, erkekler ve kadınlar arasında akciğer ve mesane kanserinin yol açtığı aşırı ölümlere dair hiçbir kanıt bulunamamıştır. Fakat; çalışma, hem erkeklerde hem de kadınlarda böbrek kanserinden istatistiksel olarak önemli olmasa da kısmen artan bir ölüm oranına (sırasıyla SMR = 1.75 ve 1.60) işaret etmektedir. Solunum yoluyla maruz kalmaya ilişkin en önemli çalışmalar; Tacoma (Washington, ABD), Anakonda (Montana, ABD) ve Rönnskär (İsveç)'teki üç bakır izabe tesisinden elde edilen verilere dayanmaktadır. Bu üç grubun tümünde, artan maruz kalımla beraber akciğer kanseri riskinde istatistiksel olarak belirgin bir artış olduğu ortaya konmaktadır.

Nordberg ve Anderson (1981), Lee-Feldstein (1986), arsenatın fosfat yerine DNA kapsamına dahil edildiği başka bir mekanizma önermiştir. Bu açıklama, etkili olması açısından DNA sentezi sırasında arsenatın mevcut olması gerektiği yönündeki gözlemlerle tutarlıdır. Arsenat-fosfat bağı, normal fosfodiester bağından daha zayıf olacağı için bu, arseniğin neden klastojenik olduğunu da açıklamaktadır (Jacobson-Kram ve Montalbano, 1985).

2.1.7.16. Genotoksik Etkileri

Onarım inhibisyonu, komutajenesitenin temel bir mekanizması ve de büyük olasılıkla arseniğin kokarsinojenisitesi olabilmektedir (Okui ve Fujiwara, 1986). Üç değerli ve pentavalan arsenik ile indüklenmiş kromozom sapma sıklıklarına ilişkin kıyaslar göstermektedir ki üç değerli formlar, pentavalan formlara göre çok daha fazla toksik ve genotoksiktir (Barrett ve ark., 1989). Fakat memeli ve insan hücrelerinin kullanıldığı deneylerde DMA genotoksiktir ve hem mitotik ölüm hem de tetraploidlerin indüklenmesinde TMAO daha potent, MMA ise DMA'dan daha az potanttir (Endo ve ark., 1992; Eguchi ve ark., 1997; Moore ve ark., 1997). Bazı çalışmalarda organo-arsenikler için belirtilen yüksek mitotik toksisitenin, hücrenin mikrotübül organizasyonu üzerindeki büyük yıkıcı etkilerinin bir fonksiyonu olduğu öne sürülmektedir (Bernstam ve Nriagu, 2000).

İnorganik arsenikallerin genotoksitesini belirlemeyi amaçlayan çok sayıda canlı içi ve canlı dışı çalışma yapılmıştır (Yamanaka ve ark., 2004; Cohen ve ark., 2006). İnsan fibroblastları, lökositleri, lenfositleri ve hamster embriyo hücreleri üzerine yapılan canlı dışı çalışmalar; arseniğin kromozom bozukluklarına ve kardeş kromatid değişimine neden olduğunu göstermiştir (Helleday ve ark., 2000). İnsan, fare ve hamster hücrelerini kullanan benzer çalışmalar; DNA hasarının olası bir artışını, DNA onarımını artırmayı ya da DNA sentezinin engellenmesini araştırmıştır.

İnsanlarla ilgili çalışmalar, hem solunum yoluyla maruz kalımın (Nordenson ve ark., 1978) hem de oral yolla maruz kalımın (Nordenson ve ark., 1979) sonrasında periferik lenfositlerdeki kromozom bozukluklarının ortalamanın üstünde bir oranda olduğunu saptamıştır. Bu çalışmalar, dikkatlice yorumlanmalıdır; çünkü birçok durumda sadece birkaç denek vardır ve diğer kimyasallara maruz kalımdan kaynaklanan etkiler de sonuçları etkileyebilmektedir.

Tayvan'da yaşayan insanlarda vücuda alınan arseniğin genotoksik etkileriyle ilgili araştırmalar, incelenmekte olan farklı tür hücrelerden ve üzerinde çalışılan popülasyonların karşılaştığı farklı maruziyet düzeylerinden kaynaklı olarak, farklı sonuçlar vermiştir. Arsenik kaynaklı cilt kanseri, beraberinde p53 mutasyonlarında, UV

kaynaklı cilt kanserinde bulunanlardan çok daha yüksek bir oran ortaya koymuştur (Hsu ve ark., 1999).

Kan arseniği seviyelerinin kontrol grubundakinden beş kat daha yüksek olduğu Hindistan'daki bir cam tesisindeki işçiler arasında arseniğe mesleki maruziyetin, lökositlerde artan DNA hasarına yol açtığı rapor edilmiştir (Vuyyuri ve ark., 2006).

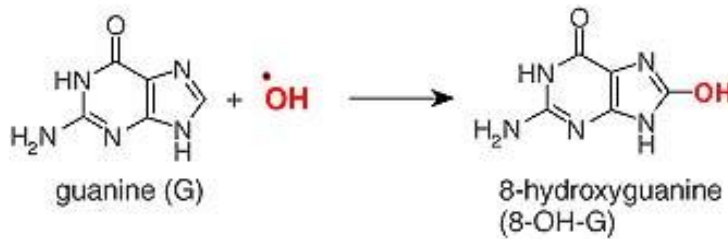
2-3 hafta boyunca oral dozlarda sodyum arsenat (günde 4 mg As/ kg) verilen sıçanlarda kromozom anomalilerinin meydana geliş sıklığında bir artış saptanmıştır (Datta ve ark., 1986). Fakat, 2 aylık bir süre boyunca sodyum arsenit verilen farelerden alınan kemik iliği hücrelerinde ve spermatogonide kromozom bozukluklarında hiçbir artış saptanmamıştır (Poma ve ark., 1987).

Organik arseniğin genotoksitesisi de ayrıntılı bir şekilde araştırılmıştır (Kuroda ve ark., 2004). DMA; tek dizi DNA aralıkları, apürinik ve apirimidinik alanlar, DNA bazlarının oksidasyonu ile belgelendiği gibi oksidatif stresteki bir artış, DNA-protein çapraz bağlarının oluşumu ve kromozom bozuklukları da dahil olmak üzere birtakım genotoksik etkilere yol açmaktadır (Kitchin, 2001). Arseniğin klastojenik etkileri, arseniğin sülfhidril protein gruplarına olan yüksek afinitesine dayandırılmıştır. Birtakım testler, sadece DMA'nın değil, aynı zamanda roksarsonun (3-nitro, 4-hidroksifenilarsonik asit) da mutasyonlara ve DNA dizi aralıklarına neden olabileceğini göstermektedir. MMA ile yapılan canlı dışı çalışmalar, kromozom bozukluklarının, mutasyonlarının ya da programlanmamış DNA sentezinin meydana geliş sıklığında önemli artışlara erişmemiştir. Ayrıca ~1500 mg/kg'lik oral dozlarda DMA verilen farelerin ve sıçanların akciğer ve diğer dokularında artan bir miktarda DNA dizi aralıkları saptanmıştır (Okada ve Yamanaka, 1994); bu etki, bazı aktif oksijen türlerinin oluşumu ile ilişkili gibi görünmekteydi. Aralıklar, büyük ölçüde 24 saat içinde onarıldığı için herhangi bir sağlık riskiyle ilişkili olup olmadığı belirsizdir.

İçme suyundan arseniğe maruz kalan Tayvan'daki hastalardaki arsenik kaynaklı cilt kanserlerindeki p53 mutasyonlarına ilişkin bir çalışma, UV kaynaklı cilt kanserlerinde görülenlere kıyasla yüksek bir oranda p53 mutasyonlarına ve farklı türlerde p53 mutasyonlarına erişmiştir; benzer sonuçlara farelerde erişilmiştir (Salim ve ark., 2003).

Hayvanlarla yapılan bazı çalışmalar, birkaç hafta boyunca oral dozlarda sodyum arsenat verilen sıçanlarda kromozom bozuklukluğu sıklığında bir artış olduğunu göstermiştir (Datta ve ark., 1986). Fakat diğer çalışmalar, sodyum arsenit verilen farelerdeki kemik iliği hücrelerinde veya spermatagonide saptanan kromozom bozukluklarında herhangi bir tutarlı artış olduğunu teyit etmemiştir (Poma ve ark., 1987). Dolayısıyla kesin bir sonuç çıkarmak için mevcut veriler çok sınırlıdır.

Üzerinde en kapsamlı olarak çalışılan DNA lezyonu, DNA oksidasyonunun başlıca ürünlerinden biri olan ve hidroksil radikalın guaninle reaksiyonundan kaynaklanan 8-OH-G oluşumudur (Şekil 2.8; Valko ve ark., 2006). 8-OH-G, oksidatif olarak hasar gören DNA'nın hassas bir genotoksik göstergesidir. Artan üriner 8-OH-G ile asosiyasyonlar, arseniğe maruz kalıma da eşlik etmiştir. Yukarıda betimlendiği üzere arsenik, metilasyon yoluyla metabolize edilmektedir. Karsinojenite de dahil olmak üzere, As kaynaklı toksisite için bir duyarlılık faktörü olan metilarsonik asit (MMA), monometile edilmiş As metabolitinin idrar içindeki yüksek bir konsantrasyonu; 8-OH-G'nin benzer şekildeki yüksek üriner konsantrasyonları ile ilişki göstermiştir (Hu ve ark., 2006). İlginç şekilde, klinik çalışmalar temelinde, As'nin bilinen pro-oksidatif etkileri kabul edilerek, 1200 µg/l'e kadar olan üriner-As düzeyleri ile çok çeşitli As'ye maruz kalım için 8-OH-G'nin üriner-As ile olan asosiyasyonlarının kadmiyuma orta dereceli maruz kalımdan daha zayıf olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla 8-OH-G, As kaynaklı oksidatif stres için; Cd için ve diğer metallere kaynaklanan oksidatif stres için olduğu kadar hassas bir biyogösterge olmayabilir (Engström ve ark., 2010).



Şekil 2.8. Guandin bazının (G) hidroksil radikal ile reaksiyonu.

2.1.7.17. Arsenik Mutajenisitesine Karşı Antioksidan Koruma

Antioksidan enzimler, oksidatif hasara karşı hücrel savunmanın birinci basamağı olarak ele alınmaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT), oksijene maruz kalan hücrelerdeki en önemli, ilk basamak antioksidan savunmadır. CAT, hidrojen peroksidin su ve oksijene ayrışmasını katalize ederken SOD, superoksidin oksijen ve hidrojen peroksida dismutasyonunu katalize etmektedir. Arsenikle intoksike olan sıçanlar, artan süperoksit radikal anyon üretimine bağlanan indirgenmiş SOD aktivitesini ortaya çıkarmıştır (Valko ve ark., 2005).

Serbest radikal kaynaklı hasara karşı hücrel savunma sisteminin ikinci bir basamağı, tiyol bazlı bir antioksidan sistem tarafından sağlanmaktadır (Manna ve ark., 2008). Arsenik toksisitesinden dolayı azalan GSH havuzlarının ve artan lipid peroksidasyon seviyelerinin, GSH üreten enzim GR'nin aktivitesinde bir düşüş ile beraber GST ve GPx'in aktivitelerinde bir artışa yol açtığı anlaşılmıştır.

Zerdeçaldan, antioksidan ve antimutajenik aktivitesi için fitokimyasal, kürkümininin rolünü değerlendirmek amacıyla Batı Bengal'de (nüfusunun içme suyunun içinde yüksek seviyelerde arseniğe maruz kaldığı bir bölge) bir alan deneyi başlatılmıştır (Biswas ve ark., 2010). Bölgedeki gönüllülerden alınan kan örnekleri, belirgin DNA hasarını ve azalan antioksidan aktivitesini ortaya koymuştur. Fakat, 3 ay boyunca dozajın ardından kürkümin kapsülleri verilerek, DNA hasarı azaltılmış, ROS üretimi ve lipid peroksidasyon durdurulmuş ve kan plazmasının antioksidan aktivitesi artırılmıştır; böylece arsenikten kaynaklanan DNA hasarına karşı kürküminin koruyucu rollere sahip olabileceği ileri sürülmüştür.

Arsenik zehirlenmesi için bilinen en etkili tedavi, şelasyon tedavisidir; fakat İngiliz anti-levizit merhemi, sodyum 2,3-dimerkaptopropane-1-sülfonat, meso 2,3-dimerkaptosüksinik asit gibi maddeler, istenmeyen bazı yan etkilerle sonuçlanmaktadır (Flora ve ark., 2007). Antioksidanlarla beraber şelatlaştırıcı maddenin de eklenmesinin optimum etkileri elde etmede faydalı olabileceği ortaya konulmuştur.

Diğer bir çalışma; Wistar sıçanlarının kemik iliği hücrelerindeki polikromatik eritrositlerde mikroçekirdeklerin oluşturulmasında sodyum arsenitin (ROS üretimi yoluyla genotoksik etkileri ile bilinmektedir) genotoksik etkilerini rapor etmiştir

(Balakumar ve ark., 2010). 30 gün boyunca içme sularının içinde 100 ppm sodyum arsenit verilen sıçanlara ağızdan uygulanan α -tokoferol (vücut ağırlığının 400 mg/kg'i) ve askorbik asit (vücut ağırlığının 200 mg/ kg'i) suplementasyonu, hücresel antioksidan sistem üzerinde koruyucu bir etki ve arsenik kaynaklı mikroçekirdek oluşumunda bir modülasyon göstermiştir.

2.2. Vanadyum (V)

Vanadyum ilk kez 1813 yılında İspanyol mineralojist Del Rio tarafından keşfedilerek çeşitli oksidasyon reaksiyonlarında uğradığı renk değişikliği nedeniyle ‘pankrom’ olarak adlandırılmıştır. Daha sonra 1831 yılında İsveçli kimyager Nils Gabriel Sefstrom bu minerale Alman güzellik, gençlik ve bereket sembolü olan Vanadis’ten esinlenerek ‘vanadyum’ adını vermiştir (Beers ve Berkow, 1999).

Vanadyum çelik parlaklığında, gri renkte olan bir metaldir. Atom numarası 23 atom ağırlığı 50.95 g/mol ve özgül ağırlığı 6.1 g/cm³’tür. 1710 °C’ de erir ve 3000 °C’ de kaynar. Bileşiklerinde +3, +4, +5 oksidasyon basamaklarında bulunur. Oksijen, hava ve oksidleyici ajanlar varlığında +5, askorbik asit gibi indirgeyici ajanlar varlığında +4 değerliklidir. pH 7.4’teki fizyolojik koşullarda vanadyum anyonik şekli olan vanadat (VO_3^- , VO_4^{3-}) formunda, + değerlikli vanadyum ise vanadil (VO^{+2}) formunda bulunur. Metalik vanadyum havada karardır ve seyreltik asit veya bazların çoğundan etkilenebilir. Saf metal soğukta işlenebilecek yumuşaklıktadır ve işlendiğinde de gerilme direnci artar. Az miktarlardaki oksijen, azot veya karbon varlığında metal oldukça sertleşir. Vanadyum, doğal şekilde metalik vanadyum olarak değil, yaklaşık 70 mineral formunda ortaya çıkmaktadır. Büyük ölçüde kayalara, toprağa ve daha az bir oranda suya dağılmaktadır (Chasteen, 1983; Kustin ve ark., 1983). Ayrıca vanadyum, ham petrol yağlarının madeni bileşenlerinden biridir (Schiff ve Graham, 1984). Havadaki vanadyuma mesleki maruz kalım madencilikte, petrokimya sanayisinde ve kömür ve yağ yakıtlı tesislerde meydana gelmektedir (Waters, 1977). Çoğu besinde az miktarda vanadyum (<1 ng/g) bulunmasına rağmen genel nüfus için vanadyuma maruz kalımın ana kaynağı besinlerdir (Barceloux, 1999). Vanadyumun birçok deniz canlısındaki temel elementlerden biri olduğu keşfedildiğinden bu yana vanadyum, beslenme uzmanlarının ilgisini çeken bir konu olmuştur (Almedeida ve ark., 2001). Vanadyumun insanlar için gerekli olduğu belirtilmemiştir ve hiçbir besinsel değeri yoktur. Dolayısıyla beslenme ihtiyacı ya da alımına yönelik tavsiyeler belirlenmemiştir. Gıda Bilimsel Komitesi (SCF), vanadyumun gerekliliğini destekleyen kanıtların henüz oluşturulmuş olduğunu belirtmiştir (SCF, 1993). Gıda ve Beslenme Kurulu tarafından günde 1.8 mg maksimum alım düzeyi belirlenmiştir (FNB, 2001). Fakat Vitamin ve Mineraller Konusunda Uzman Grup (EGVM), şu anki mevcut verilerin güvenilir bir üst alım

düzeyi belirlemek için yetersiz olduğunu belirtmiştir (EGVM, 2003). Son yıllarda, steroid kaynaklı osteoporozun tedavisi için anabolik maddeler olarak, ilaca dirençli tümörler için antidiyabetik ajanlar ya da kemoterapötikler olarak vanadyum bileşenlerinin kullanımı önerilmiştir (Yasui ve ark., 2000; Capella ve ark., 2002; Hulley ve ark., 2002). Fakat, Domingo (2002) tarafından incelenen toksik etkiler, vanadyum içeren ilaçların insanlara uygulanmasını engellemiştir. Hayvan deneylerinde vanadyumun kemiklerde, böbrekte, karaciğerde ve akciğerde biriktiği ve testislere de ulaştığı görülebilmektedir (IARC, 2006). Karaciğer ve böbrek hücreleri içerisinde vanadyum; hücre çekirdeğinde, mitokondride ve sitoplazmada bulunmuştur. Vanadyum bileşenleri kan-plasenta ve kan-testis bariyerlerini geçebilmektedir (Altamirano-Lozano ve ark., 1996; Morgan ve El-Tewil, 2003).

İnsan vücudundaki total vanadyum havuzunun 100–200 µg civarında olduğu düşünülmektedir. Biyolojik sistemlerde vanadyum en fazla vanadat (+5) ve vanadil (+4) formlarında bulunur. Plazmada vanadyum her iki değerlikte de bulunabilir. Yaklaşık % 90'ı başta transferin olmak üzere proteine bağlı olarak bulunur. Alınan vanadyumun çoğu midede katyonik vanadile dönüşür ve duodenumdan bu formda geçer. İntraperitoneal enjeksiyondan sonra vanadyum sırasıyla kemik, böbrek ve karaciğerde birikir. Kemik, vanadyumun esas depo edildiği yerdir. Vanadyum karbonhidrat metabolizmasını glikoz taşınması, glikoz taşıyıcısının translokasyonu, glikolizis ve glikolitik enzimler, glikoz oksidasyonu, glikoz atımı ve glikojen sentezini kapsayan birçok açıdan etkilemektedir (Taş ve Dirican, 2003; Çiçek ve ark., 2007).

Vanadyumun insüline benzer etkileri lipid metabolik yolları, protein metabolizması ve mitogeneze de uzanmaktadır. Mineral Vanadyumun *in vivo* ve *in vitro*da çeşitli insülinomimetik ve antidiyabetik etkilerine dikkat çekilmektedir. Bu özelliklerine ilişkin mekanizmanın insülin uyarı iletim yolundaki çeşitli post-reseptör olayların bileşimiyle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Vanadyum kemikte depo edilmekte fakat kemik yapısı ve gücü üzerine etkisinin olup olmadığı ise bilinmemektedir. Pek çok çalışmada, vanadyumun bir fosfat analogu olduğu ve fosfatazların inhibisyonu ile defosforilasyonu önleyerek insülin reseptörünün distalinde serin/tirozin kinazı aktive ettiği belirtilmiştir. Yapılan çalışmaların sonuçları ilerde vanadyumun diyabet tedavisinde kullanılabileceği yönündedir (Beers ve Berkow, 1999; Taş ve Dirican, 2003; Çiçek ve ark., 2007).

Günlük normal diyetle 15–30 µg kadar vanadyum sağlanmaktadır. Ancak diyet haricinde solunum yolu ile de alınmaktadır. Aşırı alınımı toksik etki yapmakta, semptomları da kendini göz ağrısı, bronşit, dermatit olarak göstermektedir. Askorbik asidin vanadyum toksisitesini önlediği de belirtilmektedir. Kabuklu deniz hayvanları, mantar, maydanoz, dereotu ve karabiber vanadyumun en zengin kaynaklarıdır (Aksoy, 2000).

Tabiatta çok dağılmış olarak bulunması biyolojik öneminin olduğunu gösterir. Mesela, deniz hıyarı gibi bazı deniz yaratıklarının kanında mevcuttur. Deniz suyunda 100 ton su başına 0.3 gr vanadyum bulunur. Vanadyum (deniz üzümü, gömlekliler ve en az bir mantar türü olmak üzere (Kneifel ve Bayer, 1986) yaşayan bazı organizmaların bünyesinde de belirlenmiş, fakat işlevi tam olarak aydınlatılamamıştır (Justin ve Macara, 1982).

2.2.1. Vanadyumun Kullanım Alanları

Vanadyum en çok çelik endüstrisinde tüketilmektedir. Otomobil endüstrisi, uzay araçları ve uçak sanayisinde titanyumlu alaşımlarla birlikte vanadyum kullanılmaktadır. Son zamanlarda ABD’de kıyı ötesi petrol sondaj borularında vanadyumlu alaşımlar kullanılmaya başlanmıştır. Rusya’da yüksek basınçlı gaz borularının yapımında kullanılan, ancak giderek bu alanda tüketimi azalan vanadyum alaşımları, karbon ve manganlı diğer alaşımların paslanmaya karşı direncini artırdığı için özel boru yapımında kullanılmaya devam edilmektedir. Vanadyumun gelişen son kullanım alanları ise; gözlük camları ve büyük bina camlarının ultraviyole ışıklara karşı filtrasyonu ve A vitamini tabletlerin yapımı olarak sayılabilir (Miller ve ark., 1984).

Vanadyum üretiminin % 90’dan fazlası demir ve çelik alaşımlarında kullanılır. Yapı çelikleri % 0.03-0.2 arasında vanadyum içerirler. Bu az orandaki vanadyum ilavesi çeliklerin mekanik özelliklerini iyileştirir. Nitekim vanadyum çelikleri özel yerlerde mesela uçak motorlarının parçalarında, yay ve dişlilerde kullanılır. % 4 kadar vanadyum içeren çelikler, alet çelikleridir. Bunların sertlik, dayanıklılık ve sağlamlıkları yüksektir. Kimya endüstrisinde vanadyum bileşikleri katalizör olarak kullanılırlar. Örneğin naftalinin oksidasyonla fitalitik anhidrite dönüştürülmesinde ve benzer reaksiyonlarda, aynı zamanda amonyakın nitrik okside oksitlenmesinde kullanılırlar. V_2O_5 bileşiği,

sülfirik asit üretiminde, kükürt dioksitten kükürt trioksit elde edilmesinde katalizör olarak geniş çapta kullanılmaktadır. Vanadyum tuzları fotoğrafçılıkta, boya olarak seramiklerde, renk verici olarak cam sanayinde ve ultraviyole ışınlarının geçişini engelleyici olarak kullanılırlar. Mürekkep yapımında kullanılan az miktardaki vanadyum bileşikler mürekkebe çabuk kuruma özelliği verir (Miller ve ark., 1984).

VO₄ grubu, ATP' deki terminal fosfat bağlarını bölen enzimler hariç, çok güçlü bir inhibitördür. Vanadyum iyonunun, ayrılma reaksiyonunun geçiş basamağında benzer bir rol oynadığına inanılmaktadır.

2.2.2. Vanadatın İnsülin Benzeri Etkileri

Streptozotosinle diabet oluşturulan ratlarının vücut ağırlıkları kontrollere oranla önemli ölçüde düşer. Fakat içme sularına vanadat katılarak tedaviye alınan diabetik ratların vücut ağırlıklarında değişme olmamaktadır. Diabetik ratlarda kontrollere oranla 3-4 kat artan kan glukoz düzeyi vanadat tedavili ratlarda normal düzeyine inmektedir. Ratlarda streptozotosin enjeksiyonunu takiben vanadat tedavisine başlandığında diabet oluşmadığı gözlenmiştir. Yüksek dozlu vanadat tedavisi örneğin 0.8 mg/ml hipoglisemiye neden olduğundan uzun süreli normoglisemi sağlayamaz. Deney ratlarında vanadatın dolaşımdaki konsantrasyonu 1.2-1.4 µg/ml arasındadır. Ratlar katabolik durumlarını korumakta, normoglisemi sağlanamadığı gibi vanadat atılımı, dokularda vanadat birikimi ve ölüm görülebilmektedir (Heyliger ve ark., 1985; Meyerovitch ve ark., 1987). Ratlara 0.2 mg/ml gibi düşük dozda vanadat tedavisi uygulandığında, uzun süreli normoglisemi sağlandığı görülmüştür ve ratların katabolik durumdan anabolik duruma geçtikleri gösterilmiştir. Vanadatın dolaşım konsantrasyonu 0.7-0.9 µg/ml olduğundan normoglisemik etkisi optimum düzeydedir. Yüksek dozda vanadatın serum transaminaz düzeyi artışıyla gösterildiği gibi hepatik fonksiyon bozukluğu yapmasına karşılık düşük dozda vanadatın herhangi bir toksik etki yapmadığı gösterilmiştir (Meyerovitch ve ark., 1987).

Vanadat tedavisi sırasında insülin düzeyi artma göstermemektedir, aksine insülin salınımı vanadat tarafından inhibe edilmektedir. Vanadatın, hücre membranından glukoz transportunu hızlandırarak veya tam tersi bir etki ile çalıştığını ileri süren

görüşler vardır (Partridge ve ark., 1979; Ninfali ve ark., 1983; Bosch ve ark., 1987; Rodriguez –Bil ve ark., 1989).

Diabetik ratlarda gözlenen depressif kardiyak performansında vanadat tedavisi ile normale döndüğü gösterilmiştir. Vanadat insüline benzer şekilde glikozu düşürdüğü gibi kardiyak performansı da koruduğu gösterilmiştir. Vanadatın bu etkiyi, insüline benzer bir şekilde diabetik hayvanların myokard metabolizmasını mekanik değişimlerden koruduğu, düşen serum düzeyinin myokardiyal değişimleri önlediği ve vanadatın diabetiksiz kontrollerde gösterilen pozitif inotropik etkisinin diabetik kardiyak fonksiyon bozukluğunu önlediği şeklinde açıklanmaktadır.

Vanadat, eritrositlerde glukoz tüketimini artırmaktadır. Bu fonksiyonu intraselüler 2,3-difosfoglisarat yıkımıyla oluşan büyük pirüvat yüklemesiyle sağladığı sanılmaktadır. Vanadat eritrositlerdeki primer etkisini bu hücrelerdeki en bol organik fosfata 2,3-DPG utilazasyonunda görev alan fosfogliseromutaz ve bifosfogliseromutaz ile etkileşime girerek göstermektedir. 2,3- DPG' tın 3- fosfogliserik asite dönüşümünü katalizleyen bu enzimlerin aktivasyonunu sağlayan vanadat böylece eritrositlerde glikolizi hızlandırmaktadır (Ninfali ve ark., 1983).

Vanadat izole rat adipositlerinde heksoz transportunu stimüle etmektedir. Adipositlerde 2-deoksiglikoz transportunda vanadatın oluşturduğu artış, hızlandırılmış heksoz transport inhibitörü olan sitokalsin B ile inhibe edilir. Vanadat ve insülin 2-deoksiglikoz transportu üzerinde katlamalı stimülen etki göstermekte, transport sisteminin insülin ile daha önce aktive edildiği hücrelerde ise vanadat heksoz transportunu etkilememektedir. Bu veriler, vanadatın glukoz ve analogları için insüline hassas, hızlandırılmış heksoz transport sistemini spesifik bir şekilde aktive ettiğini göstermiştir. Bu etkisini fosfotransferaz ve oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarıyla interaksiyona girerek sağladığı düşünülmektedir. Etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

İnsülin ve vanadat adipositlerde glikojen sentaz aktivitesini benzer oranlarda arttırmaktadır. Vanadatın glikojen sentaz üzerindeki etkisi enzimin fosforilasyonunu azaltmasıyla açıklanmıştır. Glikojen sentaz birçok bölgesinden fosforilasyon ve defosforilasyonu azaltılmasıyla açıklanabilir. Glikojen sentaz birçok bölgesinden fosforilasyon ve defosforilasyon mekanizmasıyla regüle edilir. Vanadat, rat hepatositlerinde insüline ters etkiyerek glikojen fosforilazı aktive etmekte, böylece

glikojen sentazın inaktivasyonuna neden olmaktadır. Bu da vanadatın adiposit ve iskelet kasında gözlenen insülin benzeri etkilerine zıt düşmektedir (Bosch ve ark., 1987). Fare diyaframında vanadatın glikojen sentezini stimüle ettiği gösterilmiş, bu etkisinin insülin reseptör kinaz aktivitesinin stimilasyonundan bağımsız olduğu savunulmuştur (Strout, 1989).

2.2.3. Vanadatın İnsülin Benzeri Etki Mekanizması

Vanadat, insülin gibi insülin reseptörünün 95000 daltonluk subünitesindeki fosforilasyonunu artırmaktadır. Vanadatın insülin benzeri etkilerinin çoğu insülin reseptörüyle etkileşimine bağlansa da etkisini insülin reseptöründen bağımsız gösterdiğine dair çalışmalar son yıllarda ağırlık kazanmıştır (Strout, 1989; Green, 1986). Adipositlerde tripsin uygulaması insülin reseptörünün insülin bağlama kapasitesini yok eder. Tripsin bu etkisini reseptörünün alfa subunitini inhibe ederek veya en azından insülin bağlama bölgesinde değişikliğe yol açarak sağlamaktadır. Bu tip hücrelerde vanadatın glukoz transportunu stimüle etmesi, etkisini reseptörün alfa subünitesini ile interaksyona girerek göstermediğini kanıtlanmıştır. Bu durumda vanadatın beta subunit fosforilasyonunu arttırarak insülin benzeri etki gösterdiği hipotezi doğru olduğu ileri sürülmüştür. Başka bir çalışmada, adipositler tripsin varlığında kronik insülin inkübasyonuna tutulduğunda reseptörün beta subunitinin insülin bağlama kapasitesini % 60 oranında bloke edildiği ileri sürülmüştür. Bu tip hücrelerle normal hücreler arasında vanadatın glukoz transportunu stimüle edici etkisinin farksız olması, etkisini beta subuniti üzerinden de gösterdiğini kanıtlamıştır. Bu sonuçlar vanadatın insülin reseptörünün tirozin kinaz aktivitesini ve fosforilasyonunu artırdığını gösteren çalışmayla ters düşmüştür. Vanadatın glukoz transportundaki regülator etkisi bir ünsülsiz reseptör proteinin fosforilasyonunu artırması sonucu olmuş olabilir. Vanadatın adipositlerde maksimum etkisini pentoz fosfat yolunda göstermesi etki mekanizmasının postinsülin reseptörüne bağlı olabileceğini göstermiştir (Green, 1986; Duckworth, 1988).

2.2.4. Vanadyum ve İnsan Hastalıkları

2.2.4.1. Solunum Sistemine Etkileri

İki gönüllüden yararlanan deneysel bir çalışma, doğru maruz kalım düzeylerini ortaya koymuştur ve vanadyum pentoksit olarak 0.06 mg vanadyum/m³'e akut bir maruz kalım sonrasında mukus oluştuğunu ve öksürmenin meydana geldiğini göstermiştir (Zenz ve Berg, 1967). Öksürme ve mukus oluşumunun başlaması, 7-24 saat gecikmiştir. Solunum fonksiyon testleri normal bulunmuştur. Bu LOAEL, 0.0002 mg vanadyum/m³'ün akut inhalasyon MRL'sini hesaplamak için kullanılmıştır. Vanadyum, çelik yapımında kullanılmaktadır ve yanan fuel oilden salınmaktadır; dolayısıyla vanadyum pentoksit tozlarına mesleki maruz kalım çoğunlukla metalurji ve kazan temizlemeden kaynaklı olmaktadır. Bir gün gibi az bir süre (Levy ve ark., 1984; Musk ve Tees, 1982; Thomas ve Stiebris, 1956; Zenz ve ark., 1962) veya 6 ya da daha fazla yıl gibi uzun bir süre (Wyers, 1946; Vintinner ve ark., 1955; Sjoeborg, 1956; Lewis, 1959; Orris ve ark., 1983) boyunca değişik seviyelerde vanadyum pentoksit tozlarına maruz kalan işçilerde; öksürük, hırıltılı solunum, göğüs ağrısı, burun akıntısı veya boğaz ağrısı gibi hafif solunum sıkıntısı görülmektedir. Kronik olarak maruz kalan işçilerle yapılan bir çalışma, burun mukozasında artan nötrofilleri ortaya koymuştur (Kiviluoto ve ark., 1979; 1980; 1981). Daha şiddetli patoloji rapor edilmemiştir. Semptomlar, maruz kalım sona erdikten sonraki günler veya haftalar içerisinde tersine çevrilmiştir. Solunum yoluyla maruz kalmanın mesleki ortamlarda ağır bastığı düşünülmektedir; fakat ağız (mukosiliyer klerens), toplam maruz kalmaya katkıda bulunabilmektedir. Maruz kalım düzeyi veya sürekliliğin tepki şiddeti ile olan ilişkisini değerlendirmek amacıyla veri saptanmamıştır. Kronik etkiler, nadiren rapor edilmiştir. Hayvan verileri, insanlarla ilgili bulguları desteklemektedir ve vanadyum bileşiklerinin solunum için zehirli maddeler olduğuna yönelik ek kanıt sağlamaktadır. 6 saat boyunca vanadyum pentoksit olarak 2.8 mg vanadyum/m³ soluyan maymunlar, 1 gün sonra artan pulmoner direnç göstermiştir ve bu durum 0.3 mg vanadyum/m³'te görülmemiştir (Knecht ve ark., 1985). Bu maymunlarda bronkoalveoler lavajda polimorfonükleer lökositlerde de önemli bir artış olmuştur, dolayısıyla toplam hücre sayımlarında artış olmuştur. 2 hafta boyunca günde 6 saat bizmut ortovanadat soluyan farelerde akciğer ağırlığında artışlar ve alveolar makrofajların, akciğer lipidlerinin ve tip II pnömositlerin

yığılmasındaki bir artış ile kendini gösteren alveolar proteinozis görülmüştür (Lee ve Gillies, 1986). 8 ay boyunca günde bir saat maruz kalan tavşanlarda nefes darlığı görülmüştür (Sjoeberg, 1950).

2.2.4.2. Kardiyovasküler Etkiler

Tam olarak belgelenmeyen maruz kalım düzeylerinde vanadyum pentoksit tozlarına kronik olarak maruz kalan işçilerin kan basıncı değerleri normal bulunmuştur (Vintinner ve ark., 1955). Bu çalışmada diğer kardiyovasküler parametrelerin hiçbiri incelenmemiştir, ama başka bir çalışma, vanadyum işçilerinde normal elektrokardiyogramlar ortaya koymuştur (Sjoeberg, 1950). 8 ay boyunca günde bir saat vanadyum pentoksit maruz kalan tavşanlarda kardiyovasküler hasara ilişkin histopatolojik kanıt görülmemiştir (Sjoeberg, 1950), fakat bu çalışma kardiyovasküler fonksiyona dair kapsamlı bir inceleme sunmamaktadır.

2.2.4.3. Gastrointestinal Etkiler

Akut olarak vanadyum pentoksit tozlarına maruz kalan gönüllülerin hiçbir gastrointestinal şikayeti olmamıştır (Zenz ve Berg, 1967). Yağ yakıcıların küllerindeki vanadyuma maruz kalmış olan insanlarda da gastrointestinal semptomlar görülmemiştir (Sjoeberg, 1950). Bir çalışma, fabrikalarda kronik olarak vanadyum tozlarına maruz kalan işçilerin bazen bulantı ve kusmadan şikayet ettiğini ortaya koymuştur (Levy ve ark., 1984), fakat bu semptomların birtakım sebepleri (diğer maddelere maruz kalım gibi) olabilmektedir ve doğrudan vanadyuma bağlanamamaktadır. Bu kişiler muhtemelen tozların bazılarını da yutmuştur. 8 ay boyunca yüksek düzeylerde (200 mg/m^3) vanadyum pentoksit tozlarına maruz kalan tavşanların gastrointestinal sisteminde az oranda histopatolojik hasar görülmüştür (Sjoeberg, 1950).

2.2.4.4. Hematolojik Etkiler

Vanadyum tozlarına kronik olarak maruz kalan işçilerin yanı sıra akut olarak maruz kalan gönüllülerin de (Zenz ve Berg, 1967) hematolojik değerleri normaldi

(Kiviluoto ve ark., 1981a; Sjöberg, 1950; Vintinner ve ark., 1955). Histolojik muayeneye göre, vanadyum pentoksit tozlarına akut ya da kronik olarak maruz kalan tavşanlar, kemik iliğinde hiçbir değişiklik göstermemiştir (Sjöberg, 1950).

2.2.4.5. Kas-İskelet Sistemine Etkileri

Vanadyum pentoksitde maruz kalan işçilerle yapılan bir çalışmada kas kuvveti değişmemiştir (Vintinner ve ark., 1955). Solunum yoluyla maruz kalım sonrasında hayvanlarda kas-iskelet sistemine etkilerine ilişkin hiçbir çalışma tespit edilmemiştir.

2.2.4.6. Hepatik Etkiler

0.01-0.5 mg/m³'lük vanadyum tozlarına kronik olarak maruz kalan işçilerde, olası karaciğer hasarını belirlemek için yaygın olarak kullanılan dört enzim ALP, AST, ALT ve LDH (serum alkalin fosfataz, aspartat aminotransferaz, alanin amino-transferaz ve laktat dehidrojenaz) normal serum seviyelerindeydi (Kiviluoto ve ark., 1981a). 8 ay boyunca vanadyum pentoksit tozlarına maruz kalan tavşanlar, karaciğerde bir miktar yağ dejenerasyonu göstermiştir (Sjöberg, 1950). Fakat, karaciğer fonksiyonu test edilmemiştir ve araştırmacı tarafından açıklama yapmaksızın, karaciğer değişikliklerinin özel bir öneme sahip olmadığını belirtilmiştir.

2.2.4.7. Renal Etkiler

0.01-0.5 mg/m³'lük vanadyum tozlarına kronik olarak maruz kalan işçilerde, olası böbrek hasarını belirlemek için yaygın olarak kullanılan 18 enzim ve diğer maddeler normal serum seviyelerinde belirlenmiştir (Kiviluoto ve ark., 1981b). Kronik olarak vanadyuma maruz kalan, diğer çalışmalardaki işçilerde böbrek hastalığını belirlemek için kullanılan maddeler (kastlar, protein seviyeleri, üre) normal idrar seviyelerinde bulunmuştur (Sjöberg, 1950; Vintinner ve ark., 1955).

Akut ya da kronik olarak vanadyum pentoksit tozlarına maruz kalan tavşanlar, böbrekte yağ dejenerasyonu göstermiştir; fakat araştırmacı, açıklama yapmaksızın, bunu vanadyuma bağlamamıştır (Sjöberg, 1950). Vanadyuma solunum yoluyla maruz

kalımın ardından hayvanlarda hepatik etkilere ilişkin başka hiçbir çalışma tespit edilmemiştir.

2.2.4.8. Dermal/Oküler Etkiler

Fabrikalarda kronik olarak vanadyum tozlarına maruz kalan işçilerde solunum güçlüğüne ek olarak hafiften orta derecelere doğru değişen düzeylerde göz irritasyonu belirlenmiştir (Sjoeberg, 1950; Vintinner ve ark., 1955; Thomas ve Stiebris, 1956; Lewis, 1959; Levy ve ark., 1984). Vanadyum tozuna kısa süreli maruz kalım da konjunktivite neden olabilmektedir (Zenz ve ark., 1962). Bazı işçilerde görülen diğer önemli periferik bulgu ise dilin yeşil bir renk almasıdır ve bu durum doğrudan vanadyum birikimine bağlanmıştır. Kontrollerle karşılaştırılırsa işçilerde, deri iltihabında hiçbir artış yoktur (Vintinner ve ark., 1955), fakat bazı işçilerde ciltte döküntüler olmuştur (Orris ve ark., 1983).

Vanadyum pentoksit tozlarına akut ya da kronik olarak maruz kalan tavşanlar da konjunktivit (şiddeti belirtilmemiştir) göstermiştir (Sjoeberg, 1950).

Vanadyum maden tozuna maruz kalan işçilerde kilo kaybı da rapor edilmiştir (Vintinner ve ark., 1955).

2.2.4.9. İmmünolojik Etkiler

Tespit edilen tek insan verisi, fabrikalarda belirtilmemiş seviyelerde vanadyum tozlarına kronik olarak maruz kalan işçilerin deri üzerinde ya da solunum sisteminde hiçbir önemli alerjik reaksiyon belirtisi göstermediğini ortaya koymuştur (Sjoeberg, 1950). Fakat bu, immünolojik fonksiyona ilişkin yeterli bir değerlendirme olarak düşünülemez.

Akut ya da kronik olarak vanadyum pentoksit tozlarına maruz kalan tavşanlar, dalakta histopatolojik değişiklikler göstermemiştir (Sjoeberg, 1950); fakat bu, bağışıklık sisteminin tam bir değerlendirmesi değildir.

2.2.4.10. Nörolojik Etkiler

Akut olarak maruz kalan gönüllülerin hiçbir nörolojik şikayeti olmamıştır (Zenz ve Berg, 1967). Vanadyum tozlarına maruz kalan işçilerin çoğunda, olumsuz majör nörolojik belirtiler rapor edilmemiştir (Vintinner ve ark., 1955; Sjoeborg, 1956). Fakat bazı işçiler; başdönmesi, depresyon, baş ağrısı veya parmakların ve kolların titremesi şikayetinde bulunmuştur (Vintinner ve ark., 1955; Levy ve ark., 1984) ama bunların özellikle vanadyuma maruz kalımdan kaynaklı olup olmadığı belli değildir.

8 ay boyunca vanadyum pentoksida maruz kalan tavşanlar, beyinde patolojik değişimler göstermemiştir (Sjoeborg, 1950). Nörolojik fonksiyonu test eden başka hiçbir hayvan çalışması tespit edilmemiştir. Solunum yoluyla maruz kalımın ardından insanlarda ya da hayvanlarda ortaya çıkan sağlığa yönelik etkilere ilişkin hiçbir çalışma tespit edilmemiştir.

2.2.4.11. Genotoksik Etkiler

Vanadyum bileşenlerinin genotoksitesisi hakkındaki bilgi tartışılır niteliktedir ve farklı etki mekanizmalarına dayanmaktadır. Araştırmacılar tarafından vanadyumun beş değerli ve dört değerli formlarının, bakterilerde mutajenik olmadığı (Leonard ve Gerber, 1994); V79 hücrelerinde ise ya zayıf bir şekilde mutajenik ya da hiç mutajenik olmadığı bildirilmiştir (Galli ve ark., 1992; Cohen ve ark., 1992; Zhongve ark., 1994). Genotoksik etkilerin vanadyum bileşenleri ile indüksiyonundaki etki şekillerinden biri, reaktif oksijen türlerinin üretimi ve/veya DNA-protein çapraz bağlarıdır (Shi ve ark., Cohen ve ark., 1992; Sakurai, 1994; Stemmler ve Burrows, 2001). İnsan lenfositlerindeki ve fibroblastlarındaki komet deneyi ile canlı dışında vanadyum pentoksidin ve sodyum metavanadatın DNA'ya hasar veren etkisi gözlenmiştir (Rojas ve ark., 1996; Ivanecsits ve ark., 2002). Vanadyum pentoksidin kronik intraperitoneal (i.p.) uygulamasının ardından farelerin sperminde ve çeşitli somatik dokularda da komet deneyi ile DNA hasarı indüksiyonu ölçülmüştür (Altamirano-Lozano ve ark., 1993; Altamirano-Lozano ve ark., 1999). Fakat, vanadyum bileşenlerinin klastojenik potansiyeli hakkındaki bilgi tartışılır niteliktedir. Sodyum metavanadat, amonyum metavanadat, sodyum ortovanadat ya da vanadil sülfat ile, insan lenfosit kültürlerinde

hiçbir klastojenite bulunamamıştır (Migliore ve ark., 1993). Buna karşın CHO hücrelerindeki üç vanadyum bileşeni, yapısal kromozom bozukluklarına neden olmuştur (Owusa-yaw ve ark., 1990). Fare kemik iliği hücrelerinde sadece vanadil sülfatın klastojenik olduğu bildirilmiştir (Ciranni ve ark., 1995).

Vanadyum bileşenlerinin anöjenik potansiyeli için mevcut olanlardır. Vanadyum bileşikleri cdc25 fosfatazları da dahil olmak üzere tirozin fosfatlarının (Tracey, 2000) ve dinein ATPazın güçlü inhibitörleridir (Winkelhaus ve Hauser, 1997; Ochi, 2002); bu durum hatalı kromozom ayrılmasına uygun iç fonksiyonu ve predispoze hücrelerine engel olduklarını ifade etmektedir. Maya çalışmaları, dört değerli ve beş değerli vanadyumun neden olduğu anöploidi indüksiyonunu ortaya koymuştur (Galli ve ark., 1991). Canlı içinde fare kemik iliği hücrelerinde (Migliora ve ark., 1993) ve insan lenfosit kültürlerinde de vanadyum bileşenleri aracılığıyla kromozom bozukluklarının sayısal olarak azaldığı fark edilmiştir (Ciranni ve ark., 1995; Mailhes ve ark., 2003). Vanadyum bileşenleri tarafından oluşturulan mikroçekirdekler (MN), CREST ya da FISH etiketleme ile sentromerlerin varlığı gösterilerek kromozom kaybına bağlanmıştır (Migliora ve ark., 1993; Zhong ve ark., 1994; Migliora ve ark., 1999). Sitogenetik analizler için kemik iliği hücreleri alınan aynı farelerden alınan ikincil oosit örneklerinde, prematüre anafaz oranlarında doza bağlı belirgin bir artış gözlenmiştir (Mailhes ve ark., 2003). Attia ve ark. (2005), prematüre anafaz oluşumunun temelinde yatan mekanizmanın, sodyum ortovanadat ile domuz oositlerinin partenogenetik aktivasyonuna, yani protein tirozin kinaz aktivitelerinde bir artışa aracılık eden mekanizmanın aynısı olduğunu varsaymaktadır. Yükseltilmiş kinaz aktiviteleri, siklin B bozunumu olmaksızın maturasyonu destekleyen faktörde (MPF) bir azalma ile sonuçlanmıştır. Mailhes ve ark. (2003); fare oositlerinde gözlenen sitogenetik değişimlerin, oosit maturasyonu sırasında kinaz/fosfataz dengesindeki vanadat ile ilişkili pertürbasyonları yansıttığı ve dolayısıyla hatalı kromozom ayrılması potansiyeli taşıdığı sonucuna varmışlardır.

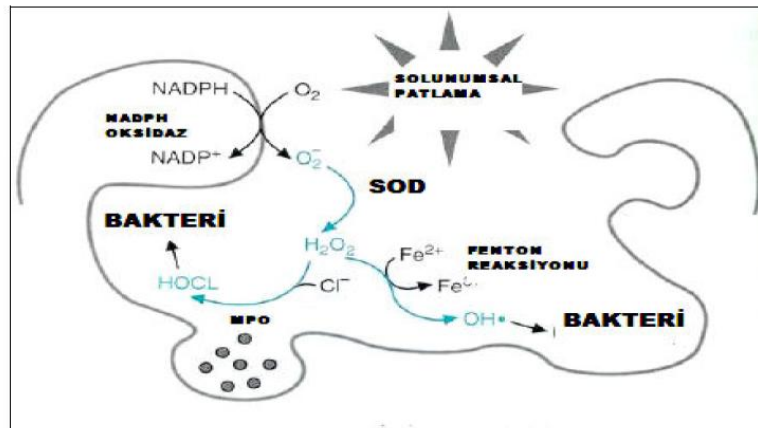
2.3. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

2.3.1. Serbest Radikaller

Yapılarında eşleşmemiş elektron içeren atom, atom grubu veya moleküllere serbest radikal denir. Serbest radikaller sıklıkla transfer zincirinde veya oksidazlar aracılığıyla meydana gelen elektronların transferi ile oluşabildikleri gibi, moleküldeki bağların homolitik olarak parçalanması sonucu elektronlardan her birinin farklı atomlar üzerinde kalmasıyla da üretilebilirler. Ayrıca iyonize radyasyon da serbest radikal kaynaklarından biridir (Cherubini ve ark., 2005).

Serbest radikaller aşırı üretilmeleri halinde toksiktirler ve hücrelerdeki lipidleri, proteinleri ve DNA'yı oksitleyerek peroksidasyona ve modifikasyona neden olabilirler. Bu olaya “oksidatif stres” denir (Basu, 1999). Ayrıca vücutta bağışıklık sistemine ait hastalıklar, yaşlanma, ateroskleröz, iskemik hasar, hipertansiyon, nörolojik hastalıklar, akciğer ve karaciğer hastalıkları, göz hastalıkları, mutajenezis, karsinogenezis, infeksiyöz hastalıklar ve ürolojik hastalıklar gibi hastalıklara da neden olabilirler (Kaneko ve ark., 1980; Zima ve ark., 1995).

Reaktif oksijen türlerinin biyolojik sistemlerde yararlı etkilerinin yanında zararlı etkileri de vardır (Valko ve ark., 2004). Serbest radikallerin yararlı etkilerine, hücreiçi-hücrelerarası sinyal iletiminde önemli roller oynamaları örnek olarak verilebilir. Makrofajlar ve nötrofiller, IL-12 ve TNF- α ile uyarıldıklarında patojenlere karşı bakterisidal etkilerini ürettikleri ROS ile gösterirler (Şekil 2.4) (Aoki ve Xing, 2004).

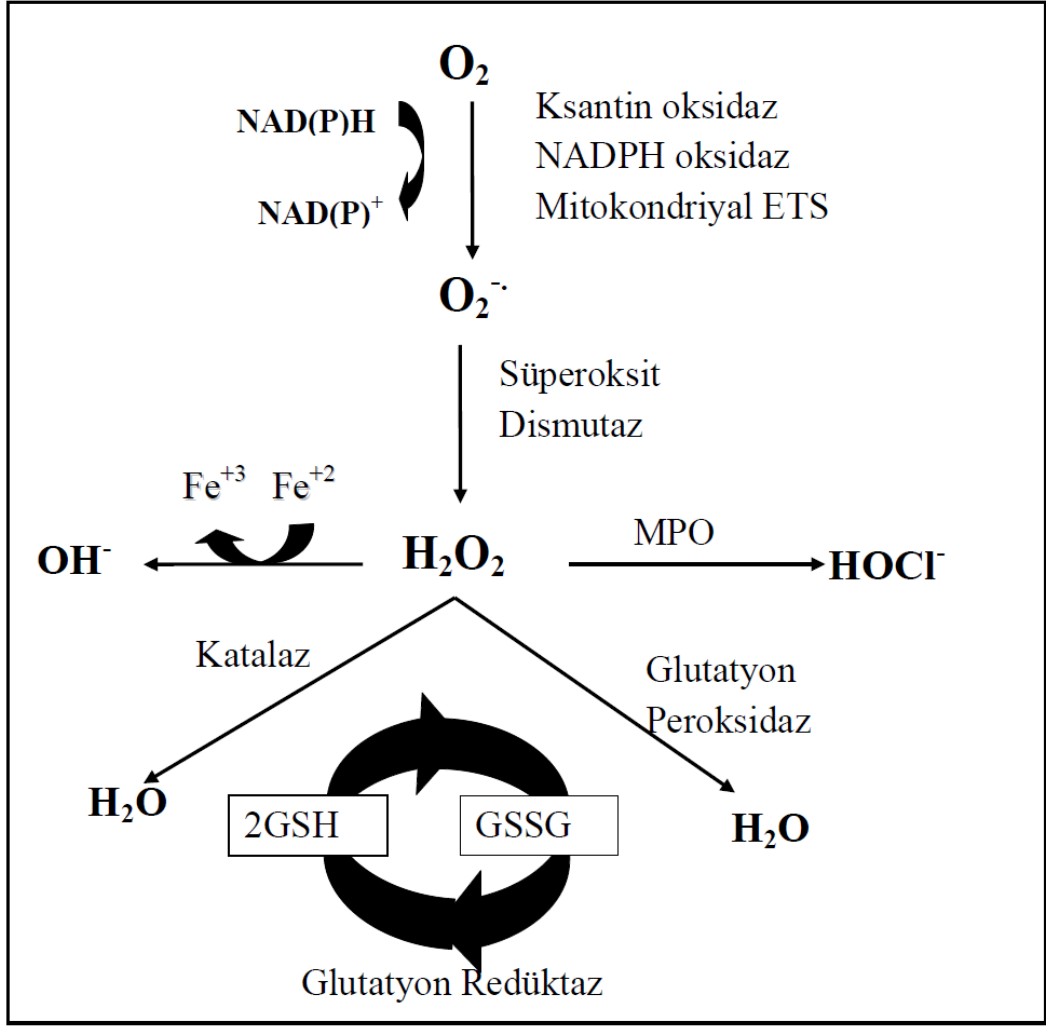


Şekil 2.9. Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama

Serbest radikaller somatik hücelere ve bağışıklık sistemine saldıran molekülledir. Antioksidanlar da bu serbest radikallerin etkilerini nötrallze eden, kanser, kalp hastalıkları ve erken yaşlanmaya neden olabilecek zincir reaksiyonlarını engelleyen molekülledir (Zima ve ark., 1995). Oksidasyona neden olan serbest radikaller temel olarak oksijen kaynaklı metabolitler, (süperoksit anyonları O_2^- , hidrojen peroksit H_2O_2 , hidroksil radikali (OH), hipokloröz asit, kloraminler, azot dioksit, ozon ve lipit peroksitlerdir (Basu, 1999). Serbest radikal olusumuna sigara, herbisit ve pestisitler, çözücüler, petrokimya ürünleri, ilaçlar, güneş ısınları, X-ısınları, hatta yiyeceklerde bulunan bazı bileşikler neden olur. Egzersizler de oksijen kullanımındaki artışla beraber serbest radikal oluşumuna neden olurlar (Conn ve ark., 1991).

Oksijen, iki elektronu eşleşmemiş şekilde bir konfigürasyona sahiptir. Bu yüzden biradikal olarak değerlendirilmektedir. Oksijen molekülü reaktif olmamasına rağmen diğer radikallerle reaksiyona girme özelliğine sahiptir. Oksijen, iki elektronu eşleşmemiş şekilde bir elektron dağılımına sahiptir (Vincent ve ark., 2004). Oksijen molekülü tek elektron alarak süperoksiti (O_2^-), iki elektron indirgenmesi ile hidrojen peroksiti (H_2O_2) meydana getirir. Süperoksit, doğrudan zararlı bir serbest radikal olmamakla birlikte, geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi ve H_2O_2 kaynağı olarak önemli bir yere sahiptir. Süperoksit fizyolojik pH'da kendiliğinden ya da süperoksit dismutaz (SOD) ile katalize edilen bir reaksiyonla H_2O_2 oluşturabilir (Vincent ve ark., 2004). Oluşan H_2O_2 ile demir tuzlarının reaksiyonu birçok radikalın oluşumuna zemin hazırlar.

Fenton reaksiyonunda O_2^- öncelikle bir metal (Cu^{+2} veya Fe^{+3}) iyonu ile reaksiyona girer böylece indirgenmiş metal ve O_2 meydana gelir. Daha sonra indirgenen metal iyonu H_2O_2 ile reaksiyona girerek başlangıçtaki metal iyonunu ve hidroksil radikalini (OH^-) oluşturur. H_2O_2 , OH^- radikalini meydana getirmek için Cu^{+2} ile Fe^{+2} iyonuna oranla daha çok reaksiyona girer. Hidroksil radikali canlı hücelerde bulunan polisakkaritler, aminoasitler, fosfolipidler, DNA bazları ve organik asitler gibi pek çok molekülle reaksiyona girebilir (Sies, 1997). Hidrojen peroksit, myeloperoksidaz enzimi (MPO) katalizörlüğünde Cl^- ile reaksiyona girerek daha güçlü bir radikal olan hipokloriti ($HOCl^-$) meydana getirir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Serbest radikal oluşum reaksiyonları, oksidan ve antioksidan enzimler (Temple ve ark., 2005).

$HOCl^{\cdot}$, alkilperoksil radikali ($^{\cdot}OOCR$), $O_2^{\cdot-}$ ve $OH^{\cdot}$ ile birlikte lipid peroksidasyonunu başlatan oksijen radikalidir (Patockova ve ark., 2003). Lipid peroksidasyonu, membranlarda bulunan doymamış yağ asitlerinin (PUFA) serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler gibi çeşitli ürünlere yıkılması sonucu oluşur. Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktiftir. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer birimlerine hasar verirler (Halliwell, 1991). Ortamda artmış olarak bulunan reaktif oksijen türleri nitrik oksit (NO) ile birleşip peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$) oluşumuna yol açmaktadır. Peroksinitritin doğrudan DNA

hasarına yol açarak apoptotik yolları tetiklemesi söz konusudur. NO memeli canlı hücreleri tarafından uygun miktarda üretildiğinde konak savunması, nöronal iletişim, yangı ve vasküler regülasyon gibi fizyolojik süreçlerde anahtar sinyal molekülü olarak görev yapar (Guo ve ark., 2001). Bunun yanında aşırı ve kontrol edilemeyen NO sentezi, insanlarda birçok ölümcül hasara neden olabilir. Bunların arasında en önemlileri inme, diyabet, nörodejenerasyon, artrit ve kronik yangı bulunmaktadır (Ebadi ve Sharma, 2003). Nitrik oksit, NO sentetaz (NOS) adı verilen enzimler vasıtasıyla L- arjininden sentezlenen, kolaylıkla hücre içine ve hücre membranlarına difüze olup moleküler hedeflerle reaksiyona girebilen küçük, kısmen kararlı bir serbest radikal gazdır (Şekil 2.4). Farklı genlerden kaynaklanan ve değişik sinyal yollarıyla regüle edilen 3 tip NOS enzimi bulunmaktadır. Bunlar nöronal (nNOS), sitokin ve lipopolisakkarit-uyarılabilir (iNOS) ve endotelial (eNOS) nitrik oksit sentetazdır (Shimomura-Shimizu ve ark., 2005).

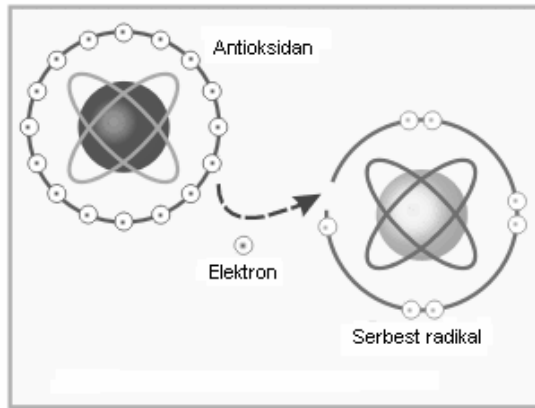
Nitrik oksitin doğrudan etkisi daha ılımlı olmakla beraber, O_2^- ile birleşip NOO^- oluşturarak olumsuz etkisini artırmaktadır. Peroksinitrit proteinlerdeki tirozin artıklarını nitrotirozinleri oluşturmak için modifiye eder. Nörofilamentlerin ve aktin gibi yapısal proteinlerin nitrasyonu patolojik şartların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. İnsanlarda ateroskleroz, myokardiyal iskemi, septik ve hasarlı akciğerler, yangısal bağırsak hastalığı ve amiotropik lateral skleroz gibi durumlarda nitrotirozinlerin ortaya çıktığı bildirilmektedir (Maeda ve Akaike, 1998; Coleman, 2001).

Reaktif oksijen türleri mitokondriyal solunum zinciri, sitokrom P450 (Blanck ve ark., 1991), ksantin oksidaz, aldehit oksidaz, siklooksijenaz, monoamin oksidaz, NADPH oksidaz gibi oksidatif enzimler (Toykuni, 1999; De Groot, 1994); ferrohemooglobin veya myogloblin gibi hem proteinlerinin otooksidasyonu ile oluşabilir. Bu hücrel kaynakların yanı sıra radyasyon, UV ışınları, sigara ve bazı ilaçlar çevresel serbest radikal kaynakları olarak sayılabilir. Oksidanların özellikle ROS'lerin aşırı birikmesiyle oluşan oksidatif stres (Opara ve ark., 1999), membran lipidlerindeki doymamış yağlardaki bağları koparıp membran viskozitesini ve geçirgenliğini artırır, ayrıca membran seçiciliğini de değiştirir (Prasad ve ark., 1989). Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun başlangıcında yer alan O_2^- , enzim aktivasyonlarında bozulmaya ve iyon transferinde aksaklıklara neden olurken, Fe^{+2} iyonu ile reaksiyona girip

proteolizise neden olabilir (Giles ve ark., 2003). DNA’da ise; şeker halkalarında kopmalar sonucu mutasyonlar, bazlardaki modifikasyonlara bağlı transkripsiyon hataları, zincir kırılmaları ile protein sentezinde inhibisyonlara neden olur, böylece hücre ölüme gidebilir (Evans ve ark., 2003; Giles ve ark., 2003). Serbest radikaller; vücutta ayrıca bağışıklık sistemine ait hastalıklar, yaşlanma, nörolojik hastalıklar, ateroskleroz, hipertansiyon, iskemik hasar, karsinogenez, mutajenez, enfeksiyöz, karaciğer, akciğer, göz ve ürolojik hastalıklara da neden olabilir (Zima ve ark., 1995).

2.3.2. Antioksidan Sistemler

Serbest radikaller somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine saldırırlar. Antioksidanlar da bu serbest radikallerin etkilerini nötralize eden kanser, kalp hastalıkları ve erken yaşlanmaya neden olabilecek zincir reaksiyonlarını engelleyen moleküllerdir (Şekil 2.11).

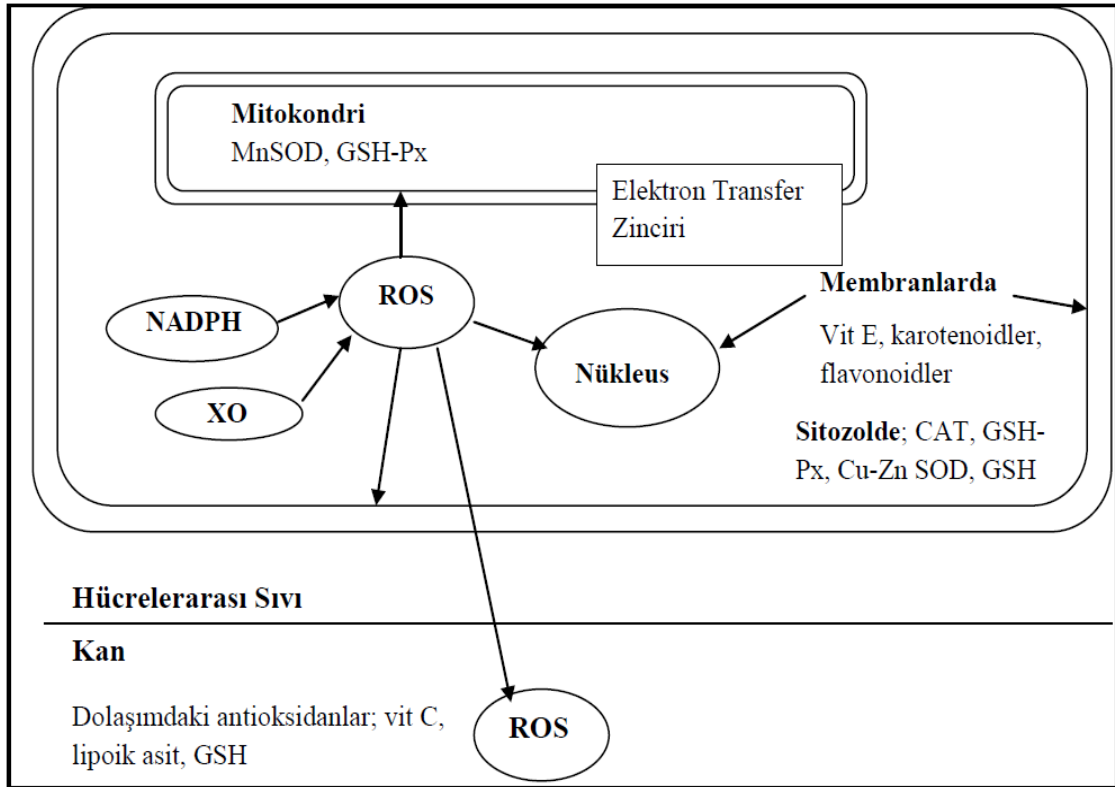


Şekil 2.11. Antioksidanların serbest radikalleri nötralize etmesi.

Hücreleri ROS’a karşı koruyan birçok enzimatik ve non-enzimatik mekanizma bulunmaktadır. O_2^- ’i etkisizleştiren SOD, H_2O_2 ’i hidrolize eden katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) sistemleri ve paraoksanaz (PON); reaktif yan ürünleri ve lipid aldehydleri yok eden glutatyon transferazlar, çeşitli ROS’lerini elimine eden metallotioninler, hem oksijenazlar; oksidatif reaksiyonları başlatan Fe^{+2} gibi geçiş

metallerini bağlayan seruloplazmin ve ferritin bunların arasında sayılabilir. Enzimatik olmayan antioksidanlar düşük moleküler ağırlıklı glutatyon (GSH), vitamin E, askorbat, vitamin A, ubiquinon, ürik asit ve bilirubindir (Yu, 1995; Halliwell, 1999).

Bakır-çinko SOD (Cu-Zn SOD) sitozolde ve mitokondriyi saran iki zarın arasında bulunurken, manganez içeren SOD (Mn-SOD) ise mitokondriyal matrikste yer alır. Her iki enzim de ROS kaynaklı toksisitenin engellenmesinde önemlidir (Fridovich, 1997). CAT öncelikle peroksizomlarda bulunmaktadır. İki hidrojen peroksitin reaksiyona girip su ve moleküler oksijen oluşturduğu tepkimeyi kataliz eder.



Şekil 2.12. Reaktif oksijen türlerinin ve antioksidanların lokalizasyonu (Fineud ve ark., 2006).

Glutatyon peroksidaz sistemi, GSH-Px, glutatyon redüktaz (GR) enzimlerini ve GSH ile NADPH'ı içeren birçok elemandan meydana gelmektedir. GSH bu sistemin

önemli parçalarından biridir. Glutasyon transferazın kofaktörü olarak ilaç ve kimyasalların ve reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılmasına yardımcı olmaktadır. Bütün bu fonksiyonlarından dolayı GSH muhtemelen hücredeki en önemli non-enzimatik antioksidandır (Parke, 1999), (Şekil 2.13).

2.3.3. Antioksidan Mekanizmalar

Oksidanları inaktif hale getiren maddelere antioksidanlar denir. Normal sağlıklı kişilerde serbest radikaller/antioksidanlar denge halindedir. Antioksidanlar 4 farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler.

1. Scavenging (temizleme) etkisi: Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan bu etki enzimler tarafından yapılır.
2. Quencher (baskılama) etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklindeki bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.
3. Onarma etkisi: Oksidatif hasar görmüş biyomoleküller onarılır.
4. Zincir koparma etkisi: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklindeki bu etki hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır (Sözmen, 2002, Taysi ve ark., 2002, Cherubini ve ark., 2005).

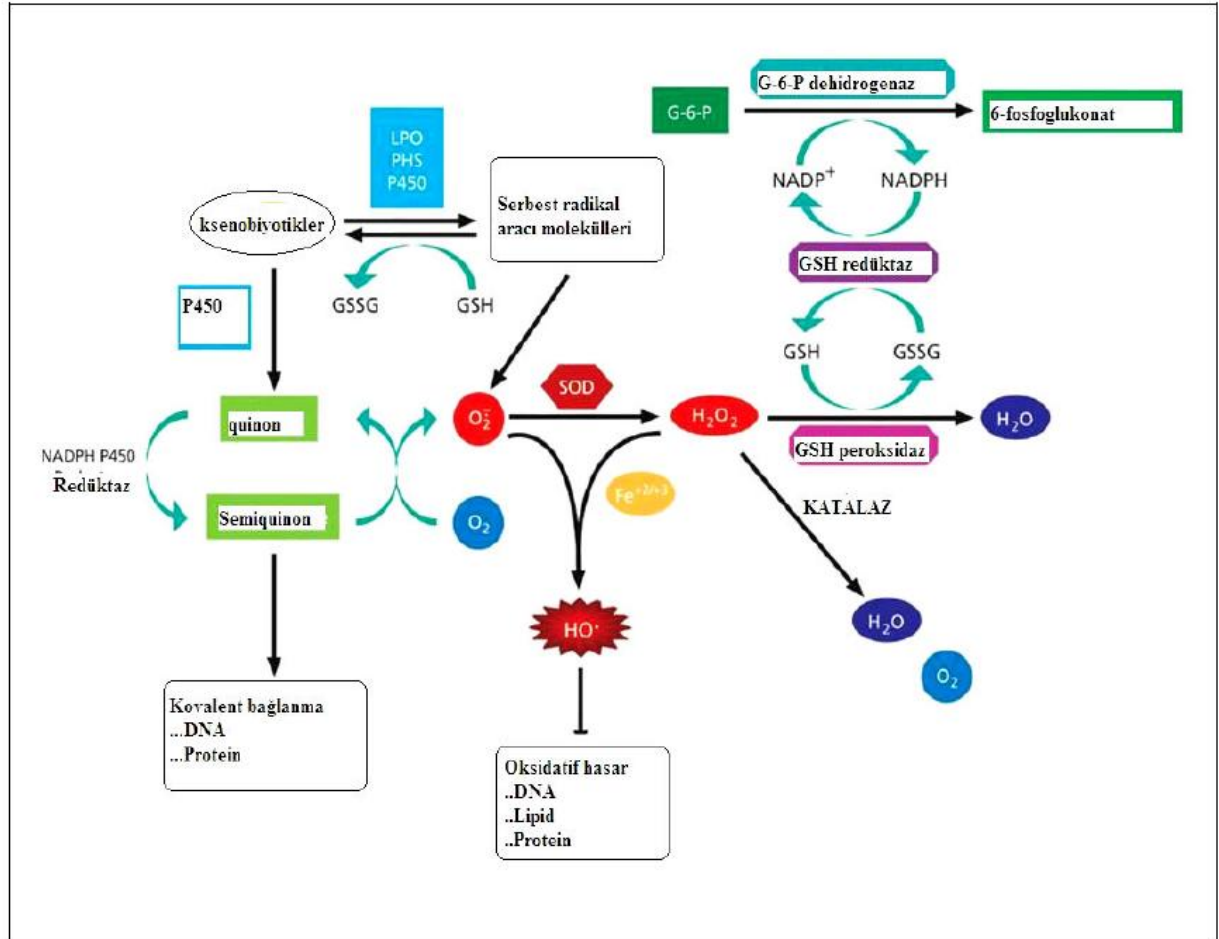
2.3.4. Enzimatik olmayan antioksidanlar

Organizmalarda enzimatik antioksidanların gibi vitaminler de serbest radikallerin zararlı etkilerinin ortadan kaldırılmasında önemli rol alır. Vitaminler non-enzimatik antioksidanlar kısmında yer alır. Bunlar içerisinde vitamin C, karotenoidlerden köken alan vitamin A ve vitamin E en başta gelen antioksidan vitaminlerdir.

2.3.4.1. Vitamin C

Vitamin C, akciğerler ve göz lensi gibi su içeriği yüksek organ ve dokularda bulunan güçlü bir antioksidan sistemi oluşturur. Vitamin E ile birlikte lipoproteinlerde

ve hücre membranında bulunan α -tokoferoksil radikalının β -tokoferole redüklenmesini sağlar (Carr ve Frei, 1999; Kojo, 2004).

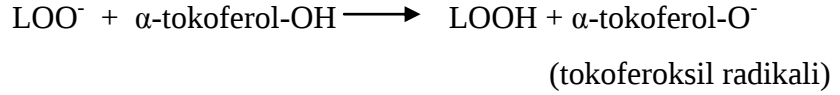


Şekil 2.13. Reaktif oksijen türleri ve antioksidanlar arasındaki ilişki.

2.3.4.2. Vitamin E

Vitamin E, tokoferol yapısında olup α , β , γ , δ olmak üzere dört farklı tipin karışımı şeklinde bulunabilir ve yağda çözünür özelliğe sahiptir. Vitamin E'nin en aktif formu olan α -tokoferol çok kuvvetli bir antioksidandır ve hücre membran fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkilerinden

korur. Vitamin E, O_2^- , OH^- , lipid peroksil radikallerine ve diğer radikallere bir elektron vererek zararsız formlara dönüşümlerini sağlar. Lipid peroksil radikallerini yıkarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırdığı için zincir kırıcı bir antioksidan olarak da görev görür (Burton ve Ingold, 1989; Priyor, 2000). Yapısında bulunan fenolik OH^- gruplu aromatik halka vitaminin aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır (Burton ve Ingold, 1989).



2.3.4.3. Karotenoidler

Karotenoidlerin en önemli kaynağı bitkiler olup doğal pigmentlerin büyük oranda dağılmış gruplarından biridir. Genellikle kırmızı, turuncu ve sarı renklidir. Olgun bitkilerde klorofil içeriğinin azalmasıyla domates, karpuz, portakal gibi çoğu meyvenin renkleri ortaya çıkar. Karotenoidler bitkilerin fotosentezi için ışık toplama, özellikle de yıkıcı fotooksidasyona karşı koruyucu olarak gereklidir. Karotenoidler ticari gıda maddelerine kimyasal sentezle üretilen saf bileşikler ya da doğal ekstraktlar şeklinde renklendirici olarak eklenirler (Cadenas ve ark., 1996). Karotenoidler tetraperten ailesinden olup doğada 600'den fazla çeşidi bulunur. Bitki, alg, mantarlar ve bakteriler tarafından sentezlenebilirken, insanlar ve hayvanlar vücutlarında sentezleyemeyip besinlerle dışarıdan alırlar. İnsan ve hayvanlarda, karotenoidler, diğer antioksidanlarla beraber veya onları tetikleyerek peroksil ve singlet oksijen radikallerinin etkisi ile oluşan fotooksidatif sürece karşı görev alırlar. Karotenoidlerin, hayvan denemelerinde (Giron ve ark., 1997; Kim ve ark., 1998; Okajima ve ark., 1998) ve insanlarda *in vitro* kanser hücrelerinin inhibisyonunda (Pastori ve ark., 1998; Amir ve ark., 1999) rol aldığı saptanmıştır.

Karotenoidlerin özellikleri ve fonksiyonları onların kimyasal yapısına bağlıdır. Fotosentezde olduğu gibi enerji transfer reaksiyonlarında en önemli faktörün özellikle tekli ve konjuge çift bağlı bir sistemle 40 C'luk ünitenin ($C=C$) kuyruk kuyruğa bağlanması ile şekillenen tetraterpen yapısında uzamalarının bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Molekölün bu özelliği singlet oksijen toplamalarına izin verir.

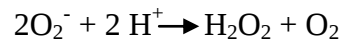
Karotenoidlerin bu radikal toplama özellikleri sayesinde, çoğu epidemiyolojik çalışmalarda, kanser, kalp rahatsızlıkları, dejeneratif göz hastalıkları gibi ciddi rahatsızlıklara karşı koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (Stahl ve Sies, 2005; Küçük ve ark., 2002; Kozuki ve ark., 2000). Yüksek oranda likopence sebze ve meyve alınımları insanları en yaygın görülen akciğer, mide, kolon, göğüs ve prostat kanserlerinin oluşumunu engellediği birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (Van Poppel, 1993; Van Poppel ve Gooldbohm, 1995; Giovannucci, 1999; Dorgan ve ark., 2000; Erhardt ve ark., 2003). Karotenoidler, yapılarındaki çift bağların eşleşmemiş elektronlarla bağlanması sonucu antioksidan aktivitesi gösterirler. Yüksek konsantrasyonlarında lipidleri peroksidasyon zararından korurlar (Mortensen ve ark., 2001).

Kandaki yüksek likopen konsantrasyonu prostat kanseri (Liu ve ark., 2001), sindirim sistemi kanseri (De Stefani ve ark., 2000), pankreas kanseri (Burney ve ark., 1989), uterus kanseri (VanEenwyk ve ark., 1991) ve kalp krizi (Clinton, 1998) riskinin düşürülmesinde etkilidir.

2.3.5. Enzimatik Antioksidanlar

2.3.5.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Antioksidan enzimlerden en önemlisidir. SOD eritrosit, hepatosit ve beyin hücrelerinin mitokondri matriksinde bulunur. Kararlı bir yapıya sahiptir. Superoksiti H_2O_2 ve O_2 çeviren reaksiyonu katalizleyen bir metalloenzimdir (McIntyre ve ark., 1999).



Süperoksit anyonunun üretimi ile serbest radikal reaksiyonları tetiklenir. SOD hücrel kompartmanlardaki O_2^- düzeylerini kontrol altında tutar. Bu enzimlerin aktif merkezlerinde bulunan aminoasitlerin çeşitliliği, kofaktör ve diğer bazı özelliklerine göre farklı izoformları bulunmaktadır. Üç farklı izoformu vardır (Landis ve Tower, 2005).

Bunlar;

1. Mitokondriyal SOD (Mn-SOD): Kofaktörü mangandır.
2. Sitoplazmik SOD (Cu-Zn SOD): Kofaktörleri çinko ve bakırdır. Bu enzimin aktivitesinden bakır, stabilitesinden ise çinko sorumludur.
3. Ekstrasellüler SOD (EC-SOD): Tetramerik yapıdadır. Heparin ve heparin sülfat gibi glikozaminoglikanlara eğilim gösterir. Bu enzim de aktivitesi için bakıra, stabilitesi için çinkoya ihtiyaç duyar (Mates ve ark., 1999). Ancak yapılan araştırmalarda genellikle tümünü kapsayan enzim (total SOD) aktivitesi ölçülür.

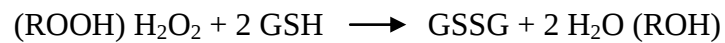
2.3.5.2. Katalaz (CAT)

Eritrositlerin sitoplazmasında ve hepatositlerin mitokondrisinde bulunurken, diğer hücrelerin peroksizomlarında yer alır (Armstrong, 1998) ve H_2O_2 'i H_2O ve O_2 'e indirgeyerek etkisiz hale getirir (McIntyre ve ark., 1999). Karaciğer ve eritrositler katalazın en yüksek aktiviteye sahip olduğu yapılardır. CAT hücreyi respiratuvar patlamalara karşı da koruyucu olarak hizmet eder. Katalazın indirgeyici aktivitesi H_2O_2 yanı sıra metil-, etilhidroksiperoksitler gibi küçük moleküllü lipid hidroperoksitleri de içine alır.



2.3.5.3. Glutasyon peroksidaz (GPx)

GSH-Px antioksidan enzimlerin en aktif olanıdır. Hücre içi hidroperoksitleri yok etmekle sorumludur (Armstrong, 1998). H_2O_2 'i suya indirgeyerek methemoglobin oluşumunu engeller (Kalaycıoğlu ve ark., 1998) ve membran lipidlerini peroksit anyonuna karşı koruyarak hücre membranının bütünlüğünü korur. E vitamini ile sinerjik etkileşimi söz konusudur. GSH-Px ayrıca büyüme, gelişme ve üreme için gerekli bir iz element olan selenyum yapılarında bulundurulur. Selenyum eksikliğinin, bu enzimin aktivitesini azalttığı bilinmektedir (Brigelius-Flohe, 1999).



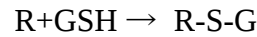
GSH ise önemli bir hücre içi antioksidandır. Redükte edilmiş şekli, serbest radikallerinin inhibisyonunda (Boehme ve ark., 1992), indirgenmiş sülfidril gruplarının stabilizasyonunda ve tokoferol ile askorbatın rejenerasyonunda görevlidir (Armstrong, 1998). Ayrıca GSH-Px'in kofaktörü olarak da görev yapar (Boehme ve ark., 1992).

2.4. Glutasyon Sentezi ve Önemi

Glutasyon (γ -glutamilsisteinilglisin), düşük moleküler ağırlıklı bir tripeptittir. GSH, glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşur, ilk olarak 1921 yılında Hopkins tarafından keşfedilmiştir. Daha önce glutamil ve sisteinden ibaret bir dipeptid olduğu düşünülmüş ve 1929 yılında kristal halde elde edildikten sonra yapısının tripeptid olduğu anlaşılmıştır. 1935 yılında ise Harrington ve Meod tarafından γ -L glutamil-sistein-glisin halinde sentez edilmiştir (Gözükara, 2001; Sies, 1999).

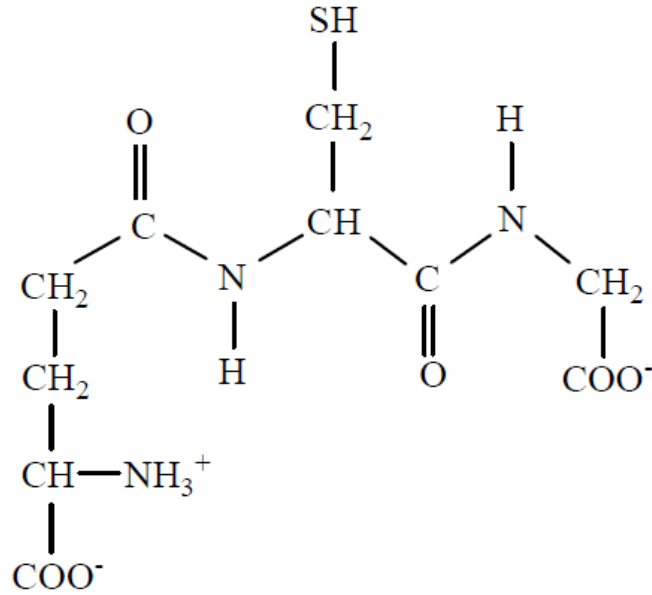
Glutasyon N-terminal glutamatın α -peptidil olmayan bir bağ aracılığıyla sisteine bağlandığı bir atipik tripeptit olup birçok enzim aktivitesi için gereklidir. Glutasyon ve glutasyon redüktaz enzimi, birçok protein ve polipeptid hormonların disülfid bağlarının oluşumuna iştirak ederler.

Glutasyon genelde GSH olarak kısaltılır. SH sisteinin sülfidril grubuna iştirak eder ve molekülün alışveriş yapan kısmıdır. Potansiyel olarak zehirli bazı elektrofilik ksenobiyotikler aşağıdaki reaksiyonlarda gösterildiği gibi nükleofilik GSH ile konjuge olurlar.



Burada R toksik potansiyele sahip olan bir elektrofiliktir. Bu reaksiyonları katalize eden enzimlere glutasyon-S-transferazlar denilir ve bunlar karaciğer sitozolünde yüksek, diğer dokularda daha düşük miktarlarda bulunurlar.

Şekil 2.14' te glutasyonun kimyasal yapısı verilmiştir. Moleküler ağırlığı 307.9 gram olan bu bileşik tüm bitki ve hayvan hücrelerinde bulunmaktadır. Hücre içi antioksidan olarak görev yaptığı bilinmektedir. GSH'daki peptidil γ -bağlantısı, tripeptid yapısını aminopeptidazların yıkımından korur (Gözükara, 2001).

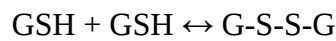


Şekil 2.14. Glutatyonun kimyasal yapısı (γ -glutamil sisteinil glisin)

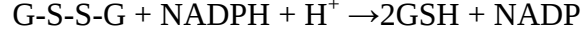
Glutatyon, sistein, glisin ve glutaminden γ - glutamilsistein sentaz ve glutatyon sentetaz enzimlerinin birbirini takip eden faaliyetleri sonucunda sentezlenir (Griffith, 1999). DNA ve protein sentezleri enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, detoksifikasyon, hücre içi ve dışı taşıyım gibi hücre fonksiyonları dışında başlıca antioksidan olarak hücre savunmasında da önemli rol alır (Ulakoğlu ve ark., 1998).

GSH, amino asit taşıyıcısı olarak ve hücre proteinlerindeki $-SH$ gruplarının indirgenmiş halde tutulmasında rol oynar. Böylece eritrositleri oksidatif hasardan korur (Onat ve ark. 2002).

GSH glutatyon peroksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonda toksik potansiyeli olan hidrojen peroksitin dekompozisyonuna katılır. Enzimlerin çok önemli grupları olan SH gruplarının redüklenmiş durumda kalmalarına yardım eden önemli bir hücre içi indirgeyicidir. GSH redükleyici bir ajan olarak etkili olduğundan SH okside olur ve glutatyonun diğer bir molekülüyle bir disülfid bağı oluşturur.



G-S-S-G ürünü okside glutatyondur. Gerektiğinde G-S-S-G’de NADPH’ı kullanan bir reaksiyon ile glutasyon redüktaz tarafından GSH’a redüklenebilir.



Bu reaksiyon bilhassa kırmızı kan hücrelerinde önemlidir. Bu hücrelerde G6P dehidrogenaz aktivitesi düşüklüğünde olduğu gibi NADPH düzeyleri düşük ise o zaman yukarıdaki reaksiyon ile redüklenmiş GSH yeterli miktarlarda rejenere olmaz. GSH’nin indirgenmiş düzeyleri peroksitlerin kırmızı kan hücrelerinde birikmesine yol açar ve bunların kırmızı hücre membran lipidleri üzerine olan oksidatif etkilerinden dolayı hemoliz meydana gelebilir. Böbreklerde bazı aminoasitlerin membranlardan naklinde bir taşıyıcı olarak GSH’yı kapsayan bir metabolik döngü ortaya konmuştur. Bu döngünün ilk reaksiyonu şöyledir:



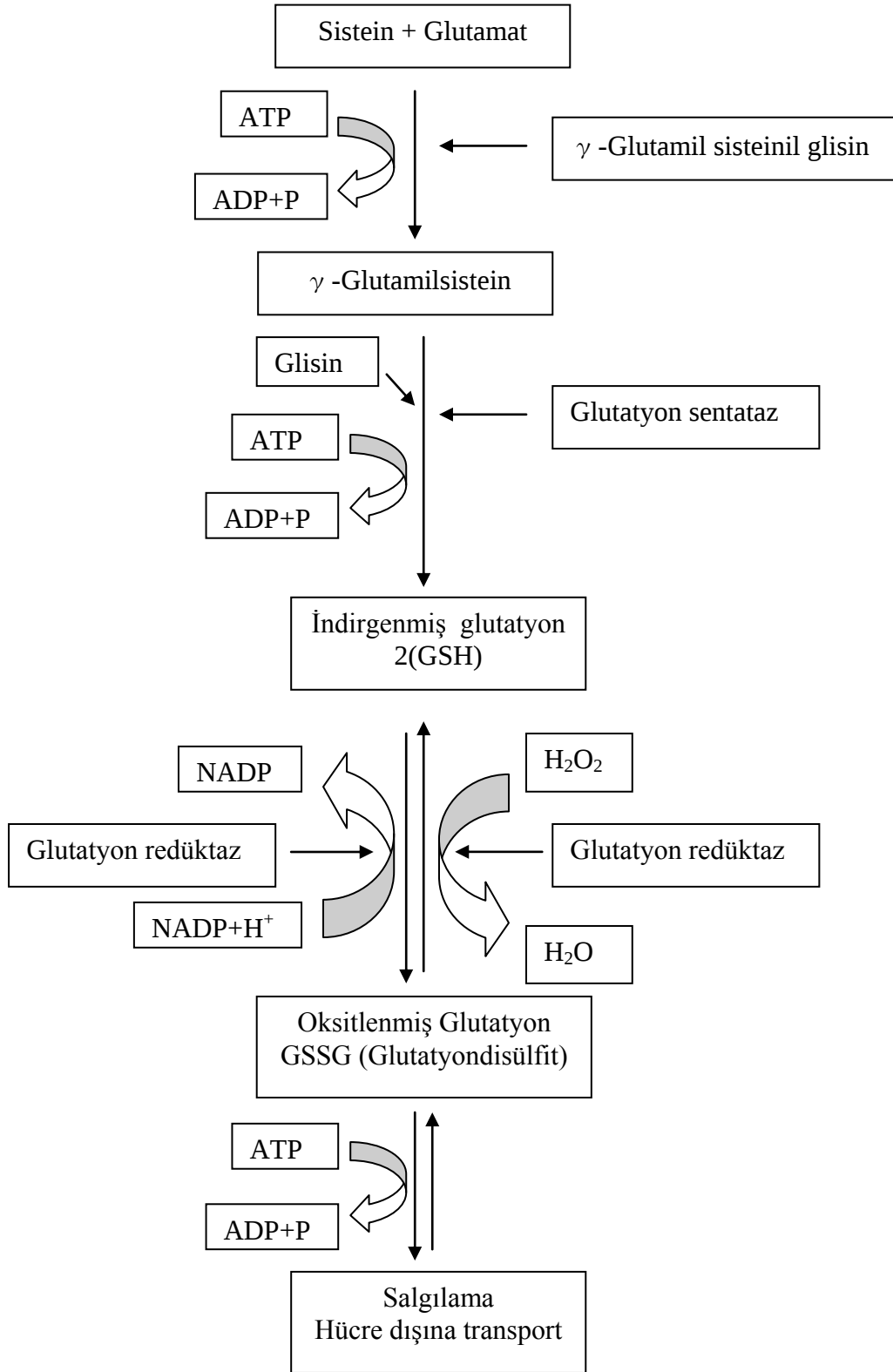
Bu reaksiyon bazı aminoasitlerin plazma membranından transferlerine yardım eder. Ardından aminoasit GSH ile yeniden sisteinilglisinden sentezlenmektedir. Yukarıdaki reaksiyonu katalize eden enzim γ - glutamil-transferaz (GGT)’dir.

Hücrelerde glutasyon konsantrasyonu sabit tutulup bu miktarın 1-8 mM arasında olduğu belirtilmektedir (Griffith, 1999; Labbella ve ark., 1986).

Glutasyon sentezi 2 basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta, glutamil sistein sentetaz enzimi, glutamat ve sisteinden, glutamilsistein oluşumunu katalizler. İkinci basamakta ise glutasyon sentetaz, glisinglutamilsisteinden glutasyonu oluşturur.

Glutasyon negatif feed-back ile glutamilsistein oluşum hızını ve böylelikle kendi sentezini denetler. Bu sentez sırasında bir molekül glutasyon için 2 ATP’ nin hidrolizi gerekmektedir. Sekil 2.15’de glutasyon sentezi verilmiştir.

Birçok enzim glutasyonu etkilemezken pankreatik karboksipeptidazlar glutatyondan glisini kopararak yapıyı bozmaktadır. Eriyebilir bir antioksidan olan glutasyon lipid peroksidasyonu ve ilaçların toksik etkilerine karşı hücrelerin savunmasında görev almaktadır (Ulakoğlu ve ark., 1998).



Şekil 2.15. Glutatyon sentezi (Ulakoğlu ve ark., 1998)

Bunun yanında birçok kimyasalın toksik etkisinin inhibe edilmesinde ve hücre hasarının engellenmesinde önemli bir role sahiptir.

Glutasyon sentetaz aracılığıyla hücrelerde bir kere sentezlenen glutasyon biyolojik zarlardan transporta maruz kalır. GSH salınımı karaciğerde gerçekleşir (Murray ve ark.,2003). Hücrelerde, lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres durumunda hızlıca okside olur ve GSSG formuna dönüşür. GSSG formu aktif taşıma ile hücreden uzaklaştırılır. Glutasyonun insan eritrositlerinde yarı ömrünün 3-4 gün olduğu belirtilmiştir (Olive ve Board, 1994).

Eritrositler yüksek miktarda glutasyon içerir (Kalra ve ark., 1981). Glutasyon eritrosit membranı için hayati öneme sahip bir bileşik olup, oksidatif stres altında hemoglobin ve diğer tiyol içeren proteinlerin bozulmasını önler (Srivastava ve ark., 1970). Glutamat, sistin ve glisin eritrosit hücrelerine taşınarak GSSG'un azalan konsantrasyonunun yeniden redüklenmesi için kullanılır (Ohtsuka ve ark., 1988).

Yaşlı eritrositler yeterli NADPH sentezi yapamadıkları için hemen hemoliz olurlar. Yeterli NADPH üretilmediğinden zardaki –SH gruplarının oksidasyonu ve lipid radikal etkileşimi sonucu peroksidasyon oluşumuyla eritrosit zarı lize olur (Murray ve ark., 2003).

Oksidatif stres vücudun oksidan–antioksidan dengesini bozarak hücre içi antioksidan olan GSH azalmaya ve hücrelerin yoğun bir şekilde oksijen radikallerine maruz kalmasına sebep olmaktadır (Onat ve ark. 2002). Bunun sonucunda membran lipidleri ve hücrenin çeşitli yapısal proteinlerinde hasar oluşumu meydana gelmektedir. Oksidan– antioksidan dengenin bozulması sonucunda ortamda biriken GSSG'de –SH içeren yapılarla etkileşerek hasar oluşumu meydana gelmektedir (Ulakoglu ve ark., 1998).

İnsanlarda Alzheimer veya Parkinson gibi serebro vasküler hastalıkların glutasyonun indirgenme yükseltgenme basamaklarındaki bir bozukluktan ya da glutasyon eksikliğinden kaynaklandığı bilinmektedir (Wegrzynoicz ve ark., 2007).

Antikanser ilaçların etkisi incelenirken, ilaç direnci, DNA tamiri (özellikle topoizomerez) ve GSH'ın etkileri üzerinde yoğunlaşmıştır (Kouvar ve ark., 1998). Yapılan çalışmalar ile glutasyonun antikanser ilaçların detoksifikasyonunda rol oynadığı, ilaç dirençli insan kanser hücrelerinde artmış GSH düzeyleri ile gösterilmiştir (Demirtas ve ark., 1997; Nogato ve ark., 2001).

2.5. ABC Taşıyıcı Ailesi

ABC (ATP Bağlayıcı Kaset) taşıyıcı ailesi üyeleri transmembran proteinleri olup enerjiye bağımlı olarak çalışırlar. Hücrede taşımaya aracılık eden proteinler ATP ile çalışan pompalar olup P, F, V ve ABC süper ailesi olarak sınıflandırılırlar.

V tipi ATP pompası : Lizozomların yüksek asiditelerini sağlamak üzere lizozomal vakuoler zarlar arasındaki proton pompası olarak görev yapar.

F tipi ATP pompası : Hücre için ATP üretiminde kullanılan proton pompası olarak özellikle iç mitokondriyal zar ve kloroplastın tilakoid zarında görev yapar.

P tipi taşıma ATP pompası : Na^+ - K^+ pompası, Ca^{2+} pompası, H^+ pompası olarak görev yapar.

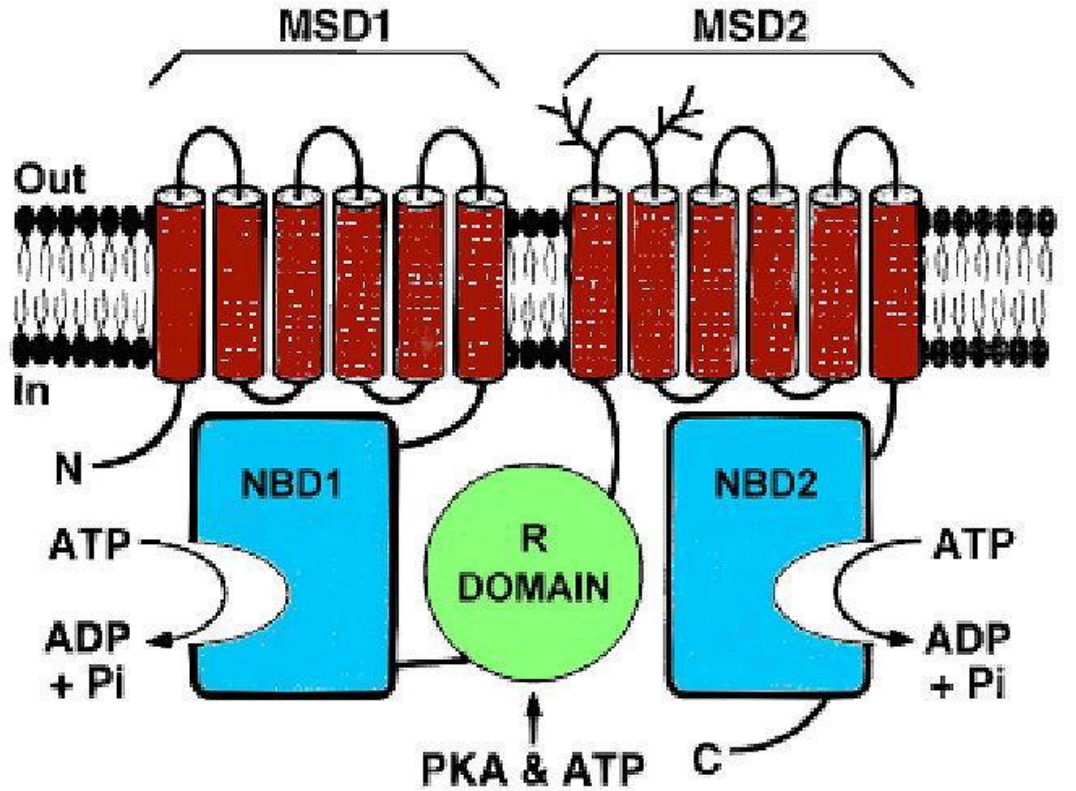
ABC Süper ailesi : Büyük ve farklı pompa aileleri ATP bağlayıcı motif karakteristikleriyle ya da kasetleriyle adlandırılırlar.

Özgül taşıyıcı proteinlerin görev aldığı aktif taşıma, ilaçların hücre içinden atılımında önemli yollardan birisini oluşturur. ABC taşıyıcıların aşırı ekspresyonları, kemoteropatik ilaçların atılımıyla ilişkili olduğundan bu proteinler çoklu ilaç direnç (multidrug resistance) proteinleri olarak adlandırılmıştır. Bu protein ailelerinin üyeleri arsenik bileşiklerinin hücre dışı ortama çıkmasında rol almaktadırlar. Çalışmamızda MRP1 ve Pgp membran taşıyıcılarının arsenit ve vanadat bileşiklerinin GSH'e bağlı bir yolla hücre dışına atılmasında rolleri olup olmadığına bakılmıştır. Tümör hücrelerinde kanser ilaçlarına karşı dirençten sorumlu olduğu bilinen bu proteinlerin ayrıca karaciğer, böbrek, ovaryum, akciğer gibi dokularda da sentezlendiği ve ksenobiyotiklere karşı savunma mekanizması oluşturduğu gösterilmiştir. İlk olarak 1976 yılında taşıyıcı protein ailesinden P-glikoprotein'in (MDR-1) aşırı ekspresyonu kanser ilaçlarına dirençli tümör hücrelerinde gösterilmiştir. Daha sonra bu proteinin 7. Kromozom üzerinde bulunan MDR-1 geni tarafından kodlandığı bulunmuştur.

Çoklu ilaç direncinden ve ksenobiyotiklerin hücreden taşınmasından sorumlu olan ATP bağlayıcı taşıyıcı proteinlerin (ABC ailesinin) insanda 49 üyesi bulunmaktadır. Bu ailenin üyeleri, aralarındaki dizi benzerliklerine göre ABCA(12 üye), ABCB (11 üye), ABCC (13 üye), ABCD (4 üye), ABCE (1 üye), ABCF (3 üye), ABCG (5 üye) olmak üzere 7 alt aileye ayrılır. Üyelerin sadece 14 tanesinin ilaç taşıma görevi saptanmıştır. Şu ana kadar, ATP bağlayıcı taşıyıcı protein ailesinin en büyük grupları 9

protein çeşidine sahip MRP ile 7 protein çeşidine sahip MDR'dir (Dean, 2001; Deen, 2005).

ABC taşıyıcı protein ailesi üyeleri, en az bir ATP bağlayıcı bölge (nükleotid bağlayıcı bölge) ve en az bir transmembran bölge (TM) içermektedir. Nükleotid bağlayıcı bölge (NBD) üç korunmuş motif içerir; Walker A (WA), Walker B (WB) ve LSGGQ (C motifi). WA ve WB motiflerinin ATPaz aktiviteleri mevcuttur. ABC taşıyıcılarının aktivitesi, iki NBD ile ATP arasındaki kooperatif ilişkiye bağlıdır ve bir NBD'den WA ve WB motifleri tarafından oluşturulmuş iki aktif bölge arasında ATP sandviç yapısı ile belirlenir. ABCC proteinlerinin iki NBD'si fonksiyonel olarak eşit değildir. NBD1, NBD2'den daha büyük ATP bağlayıcı afiniteye sahiptir ve NBD2 NBD1'den daha büyük ATP hidroliz etme kapasitesine sahiptir (Dean, 2001, Deen, 2005)(Şekil 2.16).



Şekil 2.16. ABC taşıyıcısının yapısı (Dean, 2001)

Tablo 2.1. Önemli bazı ABC taşıyıcı proteinleri

Taşıyıcı Protein	Lokalize olduğu Doku	Lokalize Olduğu membran	Substratları	İnhibitörleri
ABCB1	Karaciğer, böbrek, bağırsak, beyin, testis, adrenal bez, uterus, ovaryum		Siklosporin A, eritromisin, GF120918, ivermektin loperamid, vinkristin, verapamil, digoksin, doksorubisin, vinblastin, mitoksantron, topotekan, indinavir	kafein, simetidin, kortizol, morfin, digoksin, deksametazon, doksorubisin, ergotamin, eritromisin, pantaprozol, verapamil, vinkristin, probenecid
ABCC1 (MRP1)	Bağırsak, beyin, böbrek, akciğer, testis	Bazolateral	GS-X ve diğer konjugatlar Doksorubisin, vinblastin, vinkristin, methotreksat, paklitaksel	Siklosporin A, V-104, MK-571, Probenecid
ABCC2 (MRP2/CMOAT)	Karaciğer, bağırsak, böbrek	Apikal	Cisplatin, doksorubisin, etoposid, vinkristin, metotreksat, indinavir, ritonavir, arsenik, Kadmiyum, okratoksin A, SN-38	Siklosporin, furosemid, GF120918, okratoksin A, pravastatin, probenesid, vinkristin
ABCG2 (BCRP)	Plasenta, Beyin	Apikal	Doksorubisin, etoposid, metotreksat, mitoksantron, topotecan, aktinomisin D, simetidin, estrone, progesteron, testosteron	Siklosporin A, digoksin, deksametazon, doksorubisin, estrone, fumitremorgin C, novobiosin, omeprazol

ABC taşıyıcıları ilaç direnç metabolizmasında etkilidirler. ABC taşıyıcılarının aşırı ekspresyonu, hücre içi ilaç (antrasiklinler, epidoflotoksinler, vinka alkaloidleri gibi kemoterapötik ilaçların atıklarının) konsantrasyonunu azaltır; dolayısı ile de bu durum ilaç direncine sebep olur. Bir çok MDR proteini ilaç atık pompası gibi çalışabilir; sonuçta toksik bileşenlerin hücre içi konsantrasyonu azaltılır. Akciğerde MRP1 ve P-gp ekspresyonunun, küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) 'ndeki bağlantısı özellikle çalışılmıştır. ABC taşıyıcıları hayati her hücre de vardır ve fizyolojik olarak ksenobiyotiklerin temizlenmesinde merkezi rol oynar. İnsan akciğerinde MRP1 ve P-gp'nin ekspresyonu; endojen veya eksojen toksik bileşenlerin akciğere girmesine karşı korunmasında önemli olabilir. Akciğer ve trakea gibi bir bariyer fonksiyonu olan dokularda bazı ABC taşıyıcılarının yüksek transkripsiyonel aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Akciğerde ABC taşıyıcılarının önemli rolleri vardır. ABC taşıyıcıları arasında kistik fibroz transmembran konduktans regülör (CFTR) protein de vardır ve CFTR gen mutasyonları, kistik fibrozun gelişiminden sorumludurlar. ABCA1'deki mutasyonlar, Tangier hastalığına yol açarken, ölümcül olabilen ABCA3 mutasyonları yeni doğanda surfaktan üretim yokluğuna sebep olur. (Deen, 2005).

2.5.1. MDR1/P-gp (ABCB1)

MDR1/Pgp geni kromozom 7q21.12'de lokalize olmuştur. İlaç direnci mekanizmasında hücrenin yüzeyinde yer alan, 170 kDa büyüklüğünde fosfoglikoprotein yapıda bir pompadır. P-gp ksenobiyotikler tarafından geliştirilmiş olup genel olarak, çevresel etkiye karşı hücredeki savunmada rol oynar. Karaciğer ve bağırsak gibi sekresyon yapan organlarda apikalde eksprese edilir ve bir kaç hidrofobik substrat ve vinblastin, doksorubicin, etoposid içeren anti kanser ilaçların transportunda rol alır. P-gp, Akciğerde, silial epitelin apikalindeki hücrelerde veya ciliallerin birleştiği kanalda ve bronşial gland hücre serilerinin lateral ve apikal yüzeyinde eksprese edilir. Fakat mukus salgılayan goblet hücrelerinde, pnomositlerde P-gp bulunmamış; Alveollerde monosit kaynaklı makrofajda bulunmuştur. P-gp özellikle epitel hücrelerin apikalinde depolanır ve barsak kanalından lümene içeriğin taşınmasında rol oynar. Pgp'nin akciğerdeki fonksiyonu henüz tam olarak bilinmemektedir. Son yıllarda P-gp'nin klor

kanallarını aktive eden ve kanal aktivitesine sahip hücre hacminin regülasyonun da rol oynadığı bulunmuştur. Fizyolojik etkisi ise hala açık değildir (Deen, 2005).

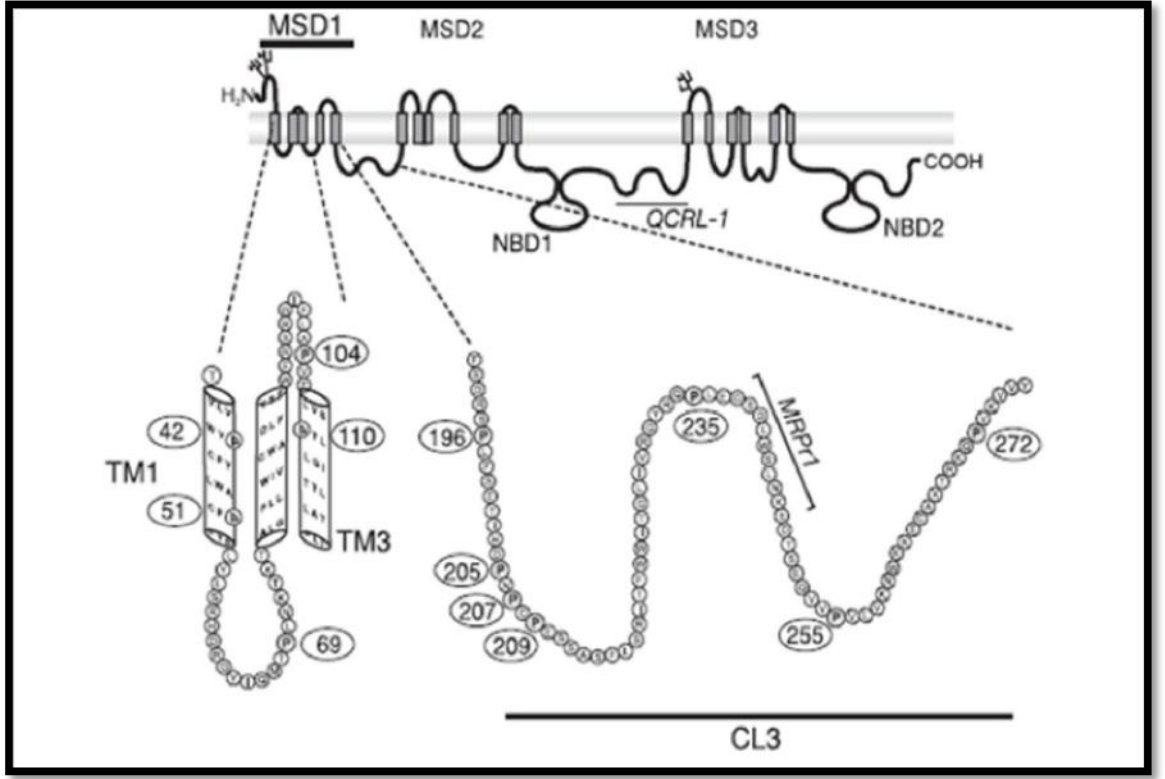
2.5.2. LRP (Akciğer Rezistans Protein)

Çoklu ilaç direncinden sorumlu bir diğer moleküldür. Bu molekül bir çok farklı ilaca karşı direnç oluşumundan sorumludur ve 16.kromozom üzerinde lokalize bir gen tarafından kodlanmaktadır. LRP, ilacı spesifik veziküllere oradan da hücre dışına pompalamaktadır. Çoklu ilaç direncinden sorumlu moleküllerin gen ifade düzeylerinde artış ilaç direncinin göstergesidir. 2 veya 3 genin aynı anda gen ifadesinin olması sağ kalımı azaltmaktadır.

2.5.3. MRP1 (ABCC1)

Yıllarca MDR1'in ilaç direnci ile ilişkili tek ABC taşıyıcı proteini olduğu düşünülmüş ancak MDR1'in aşırı ekspresyonu olmayan, ilaca dirençli hücre hatlarını tanımlayan raporlar, diğer MDR ilişkili proteinlerin varlığına işaret etmiştir. Bu durum ise daha sonra MRP1 olarak ikinci bir ilaç dirençli ABC taşıyıcısının tanımlanmasını sağlamıştır. MDR1 ve MRP1 yapısal ve fonksiyonel olarak benzerdirler fakat buna rağmen aynı olmayan bir grup anti kanser ilacına direnç geliştirir. Bununla birlikte bu proteinler aminoasit özelliklerinin % 20'sinden azını paylaşırlar ve MDR1 ile MRP1 farklı mekanizmalar vasıtası ile ilaç direnci geliştirirler.

MRP1, 16.kromozomda lokalize 31 exondan oluşan ABCC1 geni tarafından kodlanır; hem hücre zarında hem de endoplazmik retikulum membranında yer alır (Uesaka, 2007). Akciğer kanserinde artmış gen ifade düzeyleri görülmekte olup taksan direncinden sorumludur. MRP antagonistleri kullanılmaktadır. Ayrıca glutatyon azaltan ilaçlarda direnci azaltmak amacıyla kullanılmaktadır. MRP1, ~200 amino asitlik üçlü N-terminal MSD1 içerir ve üçüncü MSD bölgesi beş amino (N) ucu glikozile olmuş ekstraselüler beş TM heliksinden oluşur. MRP ilişkili taşıyıcılar beş bölge ile (uzun MRP'ler) 17 TM alfa heliksi içerirler (**Şekil 2.17**).



Şekil 2.17. MRP1'in yapısı (İto, 2003).

Diğer MRP ilişkili proteinler MRP4 (ABCC4) ve MRP5 (ABCC5) korunmuş dört bölge yapısıyla sadece 12 TM heliksine (kısa MRP'ler) sahiptirler. MRP1'in gen ifade düzeylerindeki artış ve ilaç direnci arasında kuvvetli bir ilişki kurulmuştur. MRP1'in gen ifade düzeylerinin artışı, azalmış intraselüler konsantrasyonlarla sonuçlanan ATP bağımlı ilaç atıklarının seviyesini yükseltir. Bununla birlikte yüksek MRP1 gen ifade düzeyleri, genellikle hücrelerden atılan ilaç miktarıyla doğru orantılı değildir ve bazen, MRP1 gen ifade düzeylerinin yüksek olduğu hücreler artmış ilaç atıklarını dahi göstermezler. Hassas kopyalarıyla kıyaslandığında gerçek MRP1 gen ifade düzeylerinin yüksek olduğu ilaca dirençli hücreler (doksorubicin ya da daunorubicin), floresan ilaçlarının intraselüler veziküler formlar içerisinde birikimi ile farklı ilaç dağılımları gösterirler. MRP1 ve intraselüler doksorubicin dağılımı arasındaki doğrudan ilişki, MRP1 inhibitörü MK-571 kullanılarak gösterilmiştir. Direnç

durumunda yüksek MRP1 gen ifade düzeylerine sahip kopyalarda doksorubicin ileri derecede sitoplazmik dağılım gösterirken, hassas hücrelerde, doksorubicin nükleusta birikmiştir. Dirençli hücrelerin MK-571 ile işlem görmesi doksorubicinin nükleus içinde yeniden dağılımı ile sonuçlanmıştır. Bir çok antikanser ilaç sitotoksik aktivite ortaya çıkarırken MRP1, ilaçların çekirdeğe girmesinin önüne geçmiştir. MRP1, plazma membranındaki lokalizasyonunun yanında, golgi aparatından kesilerek elde edilmiş sekretuar vesiküllerin intraselüler membranlarında da bulunur. MRP1 substratı olan di nitro fenil glutatyonun (DNP-GS) ilaca dirençli hücrelerin veziküllerinde yer aldığı görülmüştür. Bu sonuçlar, MRP1'in intraselüler olarak aktif ilaç atıklarının yanında, intraselüler veziküllerde ilaçların zehirsizleştirilmesi mekanizmasına aracılık ettiğini göstermektedir (Ito 2003; Yoshioka, 2009).

2.5.3.1. GS-X Konjugatlarının MRP1 İle İlişkisi

MRP1, tümörlerde ilaç atık pompası gibi fonksiyon görebilir, bu mekanizma ATP'ye bağımlı olarak organik anyonlar ve inorganik anyonların taşınmasında görevlidir. Organik anyonların MRP1 tarafından taşınması, konjuge olmuş metabolitlerin ve GSH glukuronit ve sülfat ile konjuge olmuş ürünlerin faz II ksenobiyotik metabolizması ile taşınmasını içerir. Organik ya da inorganik konjugatların hepsi MRP1 tarafından taşınmazlar; bu konjugatlardan hangisinin taşınıp taşınmayacağını belirleyen kimyasal özellikler açık değildir. *In vitro* ve *in vivo* olarak MRP1 tarafından taşınan ilk ve halen en iyi karakterize edilmiş fizyolojik GSH konjugatı ise sisteinil LTC₄ 'tür. Anti kanser ilaçlarına direnç mekanizmasında çoklu ilaç direnci devreye girer. İlaç direnci, eşzamanlı olarak, ilişkili olmayan birçok ilaca karşı gelişebilir; bu durum ise MDR (Çoklu İlaç Direnci) olarak adlandırılmaktadır. İlaçların hücre içine alınması difüzyon taşınma ve endositoz ile hücre dışına atılması ise MDR (ABCB1), MRP (ABCC1) ve MXR (ABCG2) olarak adlandırılan üç pompa tarafından gerçekleştirilir.

MDR1 ve MRP1 proteinleri daha ayrıntılı incelenecek olursa farklı lokalizasyon ve görevlerinin olduğu ortaya çıkmaktadır (Leier, 1996).

2.5.3.2. MRP1'in Fonksiyonu

MRP1,

- 1) Hücre içinde zehirsizleştirme reaksiyonları sonunda oluşan metabolitleri dışarıya atarak ksenobiyotik metabolizmasında;
- 2) Vincristin, daunorubicin, metatraksat içeren kimyasal ilaçları hücreden dışarıya atarak ilaç dirençliliği mekanizmasında;
- 3) Araşidonik asit türevlerinden olan sisteinil lökotrien (LT)C₄'ün ve GSH konjugatlarını hücre dışına taşıyarak inflamasyonda;
- 4) Konjuge steroidler, E2 17 β G, Ostroron-3-sülfat, Dehidroepiandrosterone 3-sülfat'ı hücre dışına taşıyarak hormon metabolizmasında;
- 5) Oksidatif stres ürünlerinden 4-HNE ve GSSG'yi hücre dışına atarak oksidatif stres ve apoptozda fonksiyon gören ATP' ye bağımlı olarak çalışan bir transmembran proteindir.

MRP1 gen ifade düzeylerinin, gama glutamil sisteinden bağımsız olan hücresel GSH seviyelerini belirlediği bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, fare akciğerlerinde Pgp'nin yanında MRP1 de yüksek seviyede tespit edilmiştir. MRP1 (-/-) farenin normal olarak geliştiği; yaşayabilirliği, fertilite özelliği ve serumdaki kimyasal parametreleri yanında hematolojik ve histolojik alanları açısından da MRP1 (+/+) ve MRP1 (-/-) fareler arasında fark tespit edilmediği belirtilmiştir. Bununla birlikte MRP1 (-/-) farenin kilo kaybı ve ölüme sebep olan etoposid gibi birçok ilaçların maruziyetlerine çok duyarlı olduğu saptanmıştır. MRP1 (-/-) farede GSH seviyelerinin özellikle akciğer, böbrek, kalp, testis ve iskelet kaslarında yükseldiği belirtilmiştir. Karaciğer ve ince bağırsak gibi az miktarda MRP1 eksprese eden organlarda GSH seviyeleri ise değişmemiştir. GSH miktarındaki artışın tripeptid GSH üretimi için oranı sınırlayan enzim olan Gama Glutamil Sistein sentezinin (γ GCS) yüksek seviyeleriyle ilişkili olmadığı saptanmıştır. MRP1 ekspresyonu, gama glutamil sisteinden bağımsız olan hücresel GSH seviyelerini belirlediğinden, MRP1'in GSH metabolizmasında rol oynadığı belirtilmiştir.

Yüksek MRP1 ekspresyonunun apoptozun artmasıyla sonuçlanabileceği verapamil deneyleriyle, MRP1 transfekte edilmiş bebek hamster böbreklerinde gösterilmiştir. Verapamilin apoptoz yapıcı ajan gibi rol oynadığı deneyde MRP1 negatif hücreler ve mutant MRP1 transfekte edilmiş kontrol hücreleri karşılaştırılmış, bu

duruma MRP1 tarafından GSH'ın taşınması sırasında hücre içi GSH'ın azalması eşlik etmiştir. Aslında ekstraselüler GSH miktarının yükselmesi ile hücreyi ölümden koruyan mekanizmanın, MRP1 pozitif tümörlerin tedavisi için değerli olabileceği ortaya sürülmüştür.

Yürtülen bu tez çalışmasında inorganik arsenik ve vanadyum bileşiklerinin detoksifikasyonunda GSH kullanımına etkisi izole insan eritrositlerinde analiz edildi.

3. MATERYAL VE YÖNTEM:

3.1 Materyal

Sodyum Arsenat (AsV), Sodyum Arsenit (AsIII), Sodyum orto Vanadat, 5,5'-Dithiobis (-nitrobenzoate) (DTNB), Disodium 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonate (DIDS), NADH, MK571, Sodyum pirüvat, peyodat ile oksitlenmiş adenozin, Verapamil, meso-2,3-dimerkaptosüksinik (DMSA) asit Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, U.S.A.)'dan elde edildi.

GT10; GSH ölçüm kiti Oxford Biomedical Research Inc. (Oxford, MI, USA)'dan elde edildi.

Spektrofotometrik ölçümler için, Shimatzu 1200 spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.

Eritrositlerin Hazırlanması :

Bu çalışma MKÜ Tıp Fakültesi Bölgesel Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Kan (yaklaşık olarak 500 ml) sağlıklı gönüllü vericiler, bilgilendirildikten sonra rızalarıyla ticari kan torbalarında toplandı. Kan 2500 g de 5 dk santrifüj edilerek plazma ve eritrositler birbirinden ayrılmıştır. Plazma ve beyaz kan hücrelerini ihtiva eden tabaka ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen eritrosit peleti üç defa 2 hacim Potasyum-Fosfat-Tuz tamponuyla (PBS) (9 hacim 0.15 M NaCl, 1 hacim 0.1 M Potasyum Fosfat Tampon, pH 7.4) yıkanmış ve deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Hücre İçi NPSH Konsantrasyonlarının Belirlenmesi :

0.25 ml yıkanmış eritrosit 1ml Krebs Ringer Fosfat (KRP) tamponunda (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM Glucose, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4) içerisinde değişik konsantrasyonlarda arsenit veya vanadat varlığında ve sodyum-glukonat-HEPES tamponunda AsV varlığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler 2500 g' de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Eritrositlerdeki NPSH konsantrasyonları Sedlak yöntemi ile belirlendi ve tanımlandı (Sedlak ve Lindsay, 1963). Kısaca 100 µl eritrosit 100 µl Sodyum Fosfat EDTA tamponunda (0.01 M sodyum fosfat / 0.005 M EDTA) hazırlanmış % 10 luk TCA içinde parçalandı. Parçalanmış eritrositler 12.000 g de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda 100 µl süpernatant 1.9 ml Tris-EDTA (400 mM Tris Base, 20 mM EDTA, pH 8.9) tamponunda 0.6 µmol / ml DTNB ile muamele edildi. Örneklerin absorbansı 412 nm' de ölçüldü ve NPSH konsantrasyonları 13.1 ekstrinsiyon katsayısı kullanılarak hesaplandı.

3.2.2 Hücre Dışı NPSH Konsantrasyonlarının Belirlenmesi :

0.25 ml yıkanmış eritrosit 1 ml sodyum- glukonat-HEPES ve KRP tamponunda değişik konsantrasyonlarda AsV ve AsIII ve vanadat varlığında ve yokluğunda değişik zaman aralıklarında 37 °C su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edildi ve süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı. Temiz tüplere aktarılan süpernatantlar % 50 lik TCA ile muamele edildi ve 12.000 g' de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatandaki NPSH konsantrasyonları tanımlanmış yöntemle ölçüldü.

3.2.3 LDH Aktivitesinin Belirlenmesi :

Laktat dehidrojenaz aktivitesi AsIII ve vanadata maruz kalmış eritrositlerin süpernatantlarında Welder ve Acosta tarafından tanımlanan yöntemle belirlendi. (Welder ve Acosta, 1994). 100 µl örnek temiz tüpe aktarıldı üzerine 200 µl NADH solusyonu (

10 ml 0.1 M fosfat tamponu içinde çözülmüş 2.5 mg/ml NADPH), 2500 µl 0.1 M fosfat tamponu ve pirüvik asit (1mg/ml) eklendi. Absorbanstaki değişimler 4 dk boyunca kaydedildi. Bozulmamış eritrositlerin total sitoplazmik LDH aktivitesi distile su içinde eritrositler hemoliz edilerek benzer şekilde ölçüldü.

3.2.4 GSH Konsantrasyonlarının Belirlenmesi :

Süpernatantlardaki GSH konsantrasyonlarının belirlenmesinde kolorometrik bir ölçüm kiti kullanıldı. Bu metod sonuçta renkli bir yapı oluşan kimyasal bir reaksiyona dayandı. Kısaca AsIII ve vanadata maruz bırakılan eritrositlerin süpernatantları toplanarak konsantre MPA eklenerek santrifüj edildi ve sağlanan solusyonlarla inkübe edildi. Örnekler optik okuyuculu bir spektrofotometrede 400 nm de ölçüldü. Örneklerin GSH konsantrasyonları, bilinen GSH miktarlarıyla hazırlanan bir GSH standart eğrisinden elde edilen bilgilere dayanılarak hesaplandı.

3.2.5 DMSA Uygulamasından Sonra GSH Konsantrasyonlarının Belirlenmesi:

0.25 ml yıkanmış eritrosit 1 ml KRP tamponunda değişik konsantrasyonlarda AsIII ve vanadat varlığında ve yokluğunda 4 saat boyunca 37 °C su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler 2500 g' de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı. 0.5 mM ve 1.5 mM DMSA varlığında 30 dakika 37 °C su banyosunda inkübe edildi. Süpernatantlardaki GSH konsantrasyonlarının belirlenmesinde kolorometrik bir ölçüm kiti kullanıldı (GT10; GSH ölçüm kiti Oxford Biomedical Research MI, USA). Analitik GSH ölçümü üreticinin verdiği prosedüre göre yapıldı.

3.2.6 İstatistiksel Analizler

Çalışmada Student-Newman-Keuls Multiple Comparision ve tek yönlü değişim analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Testler, istatistiksel bilgi yöntemine dayalı olarak yürütülmüştür. Tüm testler üçlü örneklerle uygulanmıştır. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve $\pm$ standart sapması olarak verilmiştir ve $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

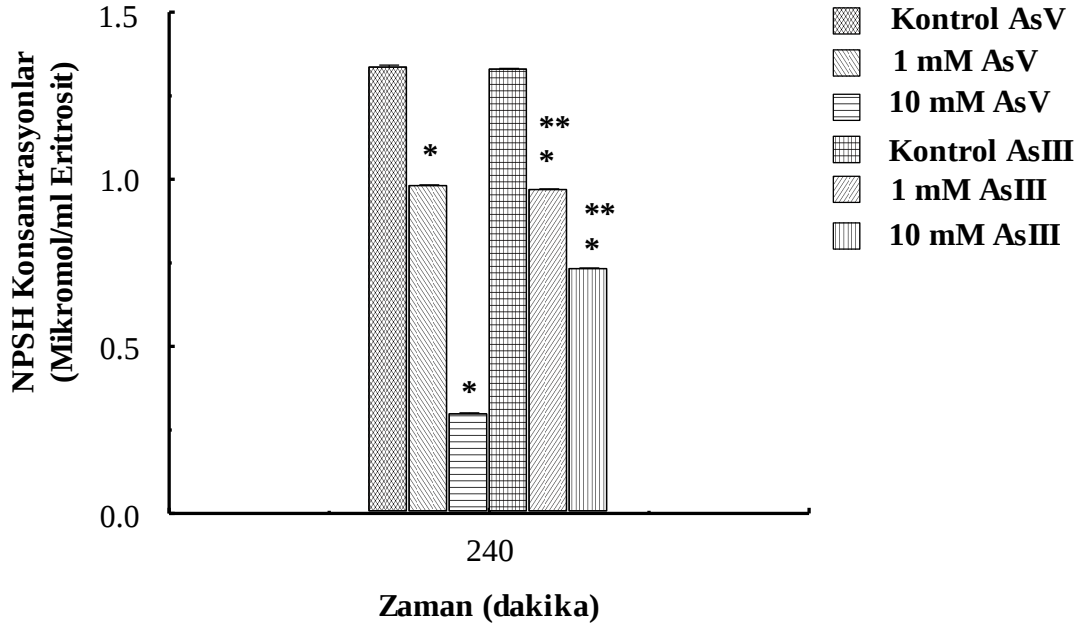
4. ARAŞTIRMA BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 AsV ve AsIII ile İlgili Sonuçlar:

Önceki çalışmalarda AsV'in inorganik fosfata benzerliği dolayısıyla enzimatik reaksiyonlara ve transport olaylarına karıştığı gösterilmiştir. İnorganik fosfata ek olarak klor iyonlarının da AsV alınımlarını etkilediği gösterilmiştir. Bu nedenle, başlangıçta deneyler iki ayrı tampon sisteminde gerçekleştirildi. Tampon sistemlerinden birisi hem fosfat hem klor iyonlarını ihtiva ederken (KRP), diğer tampon sistemi ise her iki iyonu da içermemektedir (sodyum-glukonat-HEPES). İki farklı tamponda eritrositlerin AsV ile muamele edilmesi sonucunda NPSH konsantrasyonlarındaki azalmanın, KRP tamponuna kıyasla sodyum-glukonat-HEPES tamponu kullanıldığında daha fazla olduğu görüldü (Şekil 4.1). NPSH konsantrasyonlarındaki azalmanın AsIII'e kıyasla AsV' ta daha fazla olduğu görüldü. Bu farklılığın nedeni; GSH' nun hücrelerdeki AsV' ın AsIII redüksiyonunda büyük ölçüde kullanılmasından kaynaklandığı söylenebilir. AsIII böyle bir redüksiyona uğramaz ve bu sayede hücrel GSH düzeyleri korunmuş olur.

Sonuçlar KRP tampon içerisinde fosfat ve klor iyonlarının eritrositlere AsV girişini azalttığını göstermektedir. Bundan dolayı sonraki çalışmalar hücre içerisine daha fazla AsV girişini sağlamak açısından sodyum-glukonat-HEPES tamponu içerisinde gerçekleştirildi. Daha sonraki çalışmalarımızda AsV ve AsIII' e maruz kalan eritrositlerde hücre dışına NPSH çıkışı araştırıldı (Şekil 4.2). Sonuçlar AsV ve AsIII' ün hücre dışı NPSH düzeylerini önemli derecede artırdığını göstermiştir.

AsV ve AsIII in hücre içi ve hücre dışı NPSH seviyelerine etkilerini karşılaştırdıktan sonra, AsIII'in farklı konsantrasyonlarının NPSH çıkışına etkileri araştırıldı. Bu amaçla eritrositler farklı konsantrasyonlarda AsIII içeren KRP tamponunda inkübe edildi. Daha sonra hücre dışı ve hücre içi ortamda NPSH konsantrasyonları belirlendi (Şekil 4.3, Şekil 4.4). Sonuçlar 250 μ M gibi çok düşük AsIII konsantrasyonunda bile hücre içi NPSH' lerde önemli bir azalma ve hücre dışı NPSH' lerde yükselme olduğunu göstermiştir.



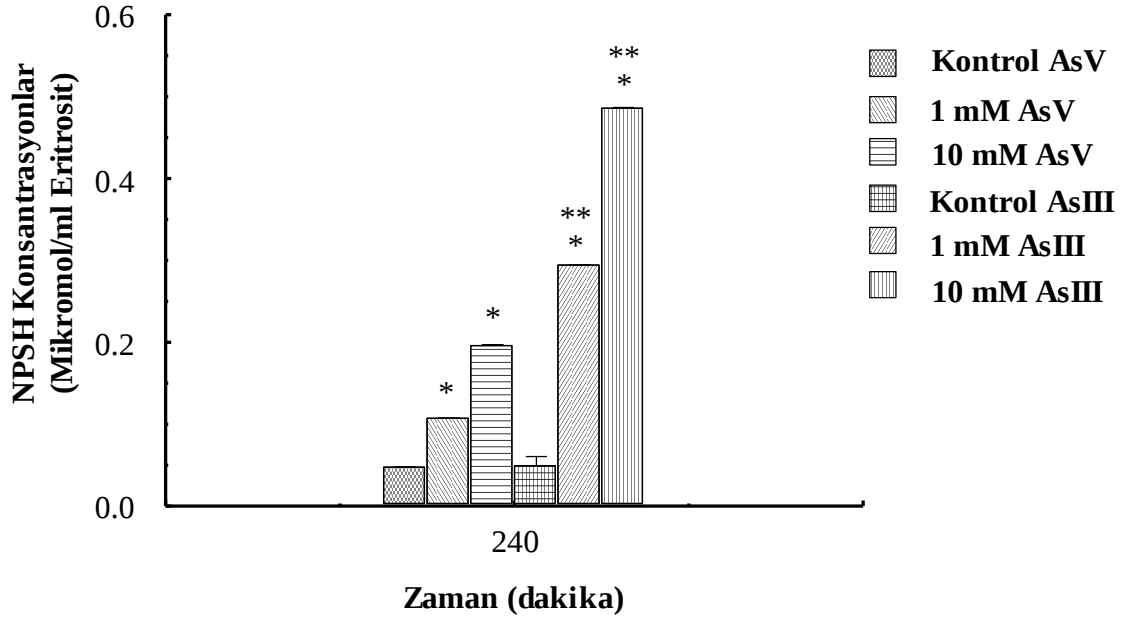
Şekil 4.1. AsV ve AsIII ile muamele edilen eritrositlerde hücre içi NPSH seviyeleri:

Eritrositler farklı konsantrasyonlarda AsV ve AsIII içeren KRB tamponu ya da Na-Glukonat-HEPES tamponunda belirtilen zaman periyodu süresince inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar uzaklaştırıldı. Eritrositler iki hacim fosfat tamponu ile yıkandı. Yıkanan eritrositlerde hücre içi NPSH seviyeleri tespit edildi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$$p < 0.05$$

* Kontrol grubundan önemli derecede farklı olan değer

** AsV grubundan önemli derecede farklı değer

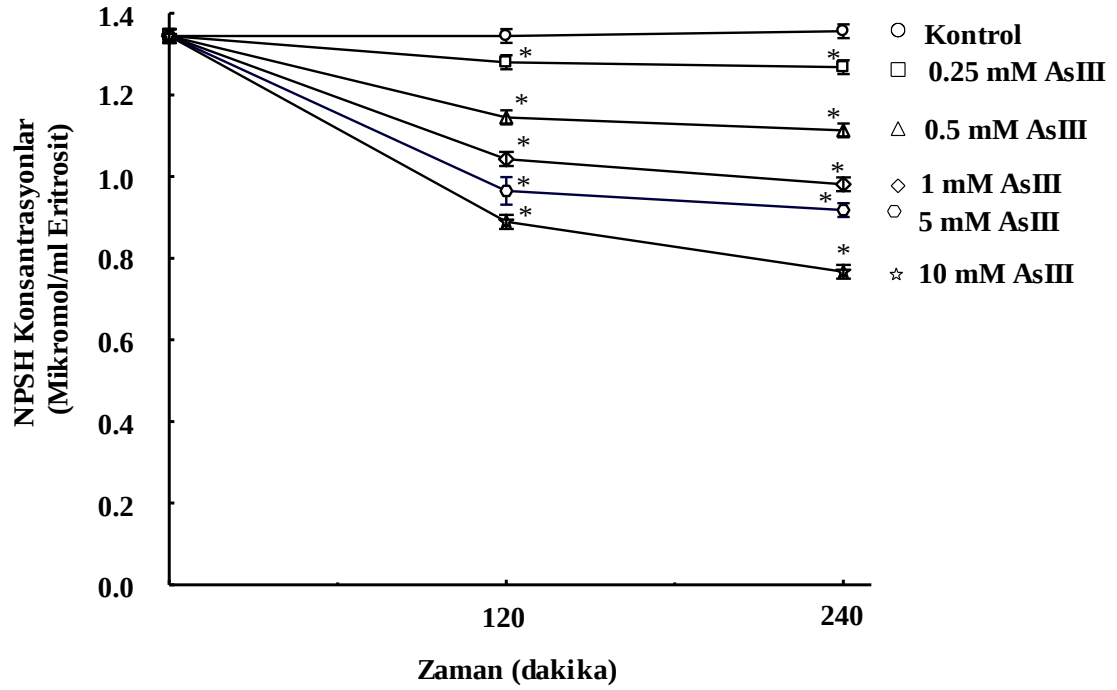


Şekil 4.2. AsV ve AsIII ile muamele edilen eritrositlerde hücre dışı ortamda NPSH seviyeleri: Eritrositler farklı konsantrasyonlarda AsV ve AsIII içeren Na-Glukonat-HEPES tamponu ya da KRP tamponunda 240 dk süresince inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar temiz bir tüpe aktarıldı. Bu süpernatantlarda NPSH düzeyleri belirlendi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Kontrol grubundan önemli derecede farklı olan değer

** AsV grubundan önemli derecede farklı değer

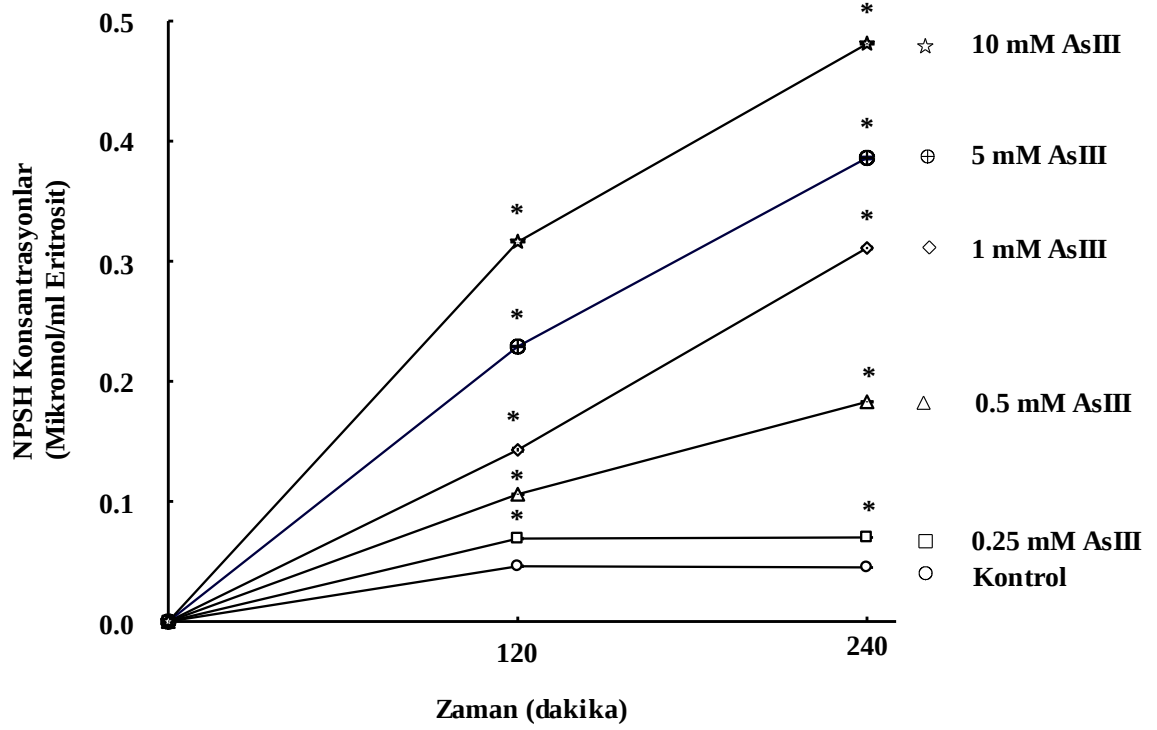


Şekil 4.3. AsIII ile muamele edilen eritrositlerde, hücre içi NPSH seviyeleri:

Eritrositler belirtilen konsantrasyonlarda AsIII içeren KRP tamponunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar uzaklaştırıldı ve eritrositler iki hacim fosfat tamponu ile yıkandı. Yıkanan eritrositlerde NPSH düzeyleri tespit edildi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Kontrol grubundan önemli derecede farklı olan değer



Şekil 4.4. AsIII ile muamele edilen eritrositlerde hücre dışı ortamda NPSH seviyeleri: Eritrositler belirtilen konsantrasyonlarda AsIII içeren KRP tamponunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda eritrositler santrifüj edilerek süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı ve bu süpernatantlarda NPSH düzeyleri belirlendi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

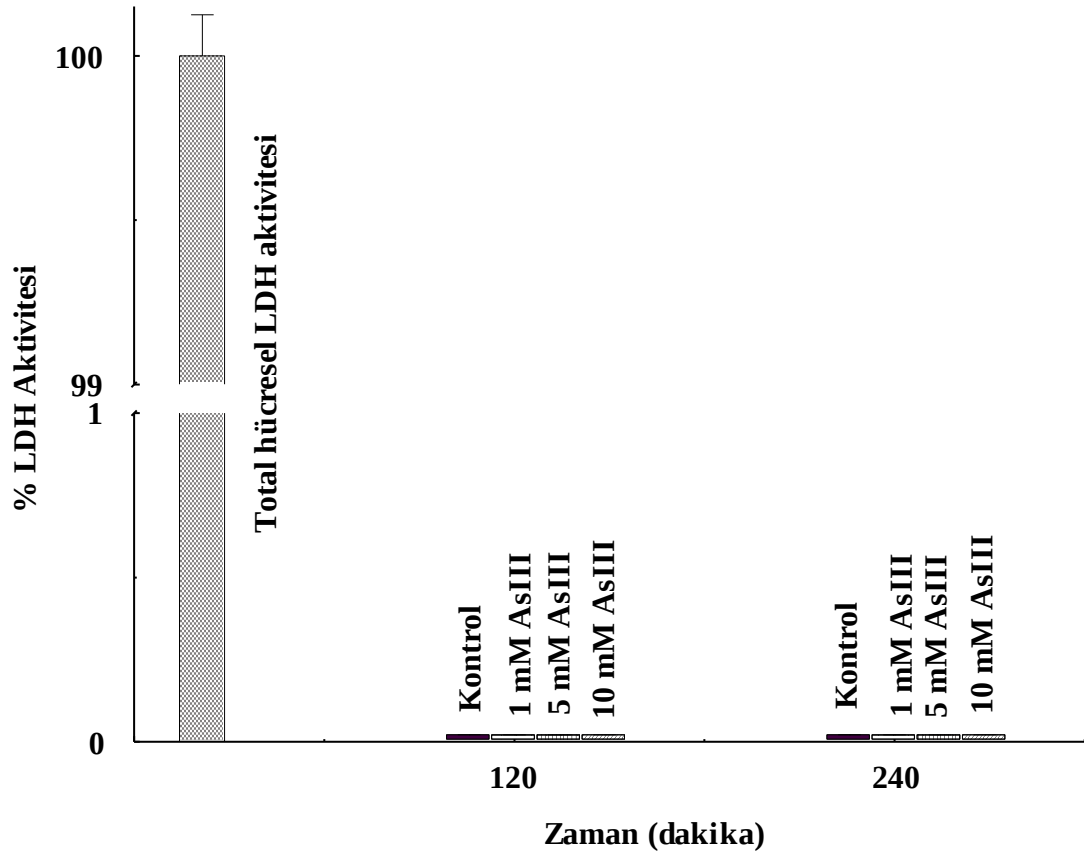
$$p < 0.05$$

* Kontrol grubundan önemli derecede farklı olan değer

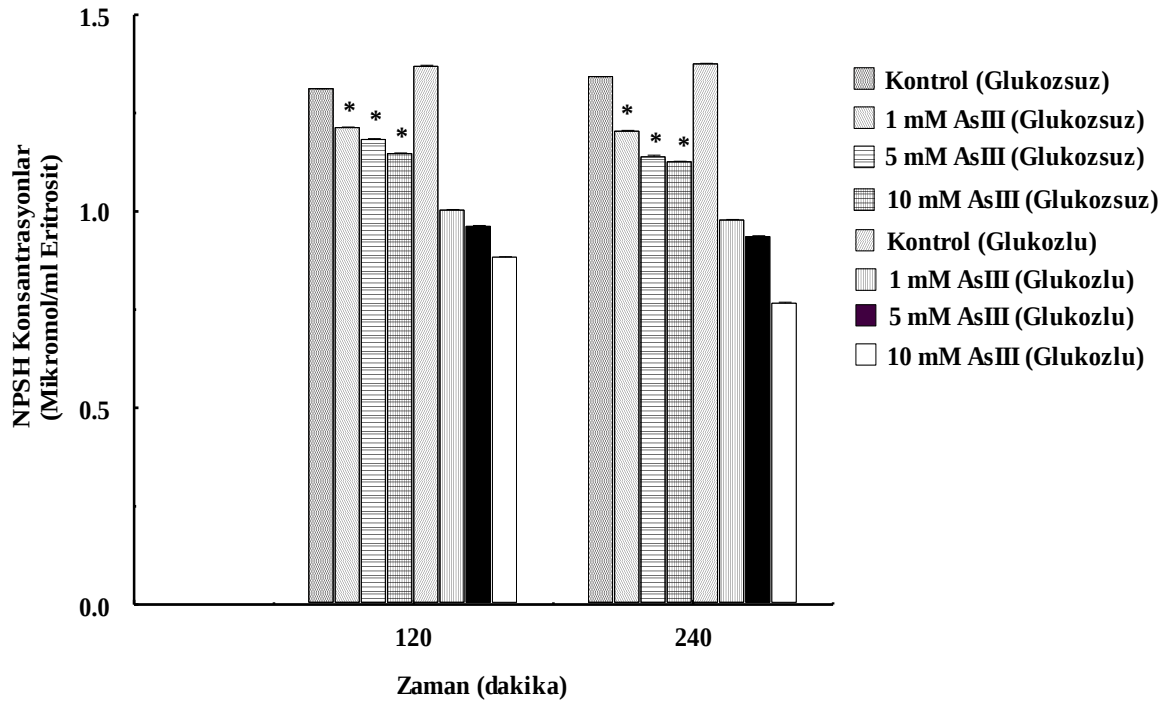
Eritrositlerden NPSH çıkışının membran hasarına bağlı olup olmadığının gösterilmesi için hücre dışı ortamda LDH aktiviteleri ölçülmüştür. Sonuçlar hücre dışı ortamda LDH aktivitelerinin artmadığını göstermiştir. Bu da eritrositlerin AsIII ile muamele edilmesi sonucunda membran hasarı olmadığını göstermektedir (Şekil 4.5). Dolayısıyla hücre dışı ortamda belirlenen NPSH' lerin membran hasarı sonucu eritrosit dışına çıkmadığı, aksine NPSH' lerin arsenit varlığında indüklenen membrana transport yolu ile hücre dışına çıktığı ileri sürülebilir.

Daha sonraki çalışmamız da AsIII tarafından indüklenen hücre içi ve hücre dışı NPSH konsantrasyonlarındaki değişimin enerjiye bağlı olup olmadığını göstermek için yapılmıştır. Bu amaç için eritrositler glukoz varlığında ve yokluğunda farklı konsantrasyonlarda AsIII içeren KRP tamponunda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücre içi ve hücre dışı NPSH seviyeleri ölçüldü. Glukoz yokluğunda AsIII ile muamele edilen eritrositlerde hücre içi NPSH seviyelerinin daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.6). Diğer yandan glukoz yokluğunda hücre dışı ortamdaki NPSH seviyelerinde ise azalma görülmüştür (Şekil 4.7). Bu sonuçlar AsIII tarafından indüklenen hücre içi ve hücre dışı NPSH seviyelerindeki değişimlerin enerjiye bağlı olduğunu göstermektedir.

Daha sonraki çalışmalarımız da AsIII ile muamele edilen eritrositlerde hücre içi ve hücre dışı NPSH seviyelerine sıcaklığın etkisini araştırıldı. Bu amaçla eritrositler farklı konsantrasyonlarda AsIII varlığında ve yokluğunda KRP tamponunda 4, 20 ve 37 °C' de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücre içi ve hücre dışı NPSH seviyeleri ölçüldü. Sonuçlar AsIII ile muamele edilen eritrositlerin 37 °C' nin altındaki sıcaklıklarda inkübe edilmesi durumunda, hücre içi ve hücre dışı NPSH seviyelerindeki değişimin önemli derecede inhibe edildiğini göstermiştir. (Şekil 4.8, Şekil 4.9). Bu durum AsIII ile muamele edilen eritrositlerde NPSH seviyelerinin hücre içinde azalmasının ve hücre dışında artmasının biyolojik olarak aktif olaylar olduğunu göstermiştir.



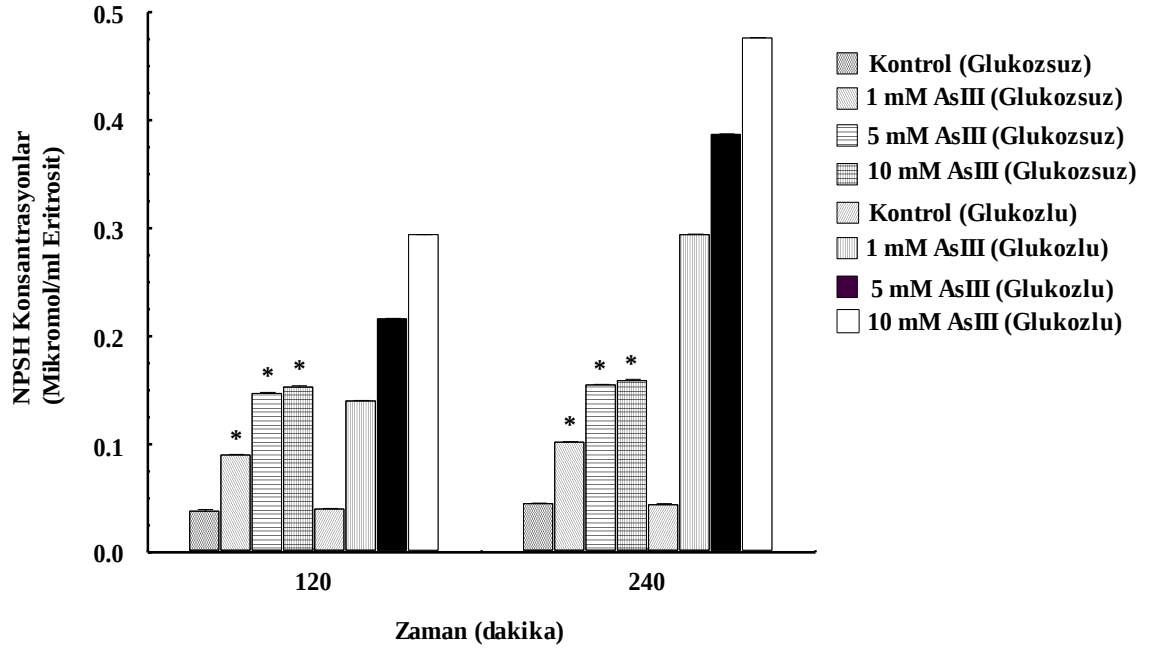
Şekil 4.5. AsIII'ün hücre membranına etkisi: Eritrositler belirtilen konsantrasyonlarda AsIII içeren KRP tamponunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı ve LDH aktiviteleri süpernatantlarda ölçüldü. Bozulmamış eritrositlerin total sitoplazmik LDH aktivitesi distile su içinde eritrositler hemoliz edilerek benzer şekilde ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir. AsIII' e maruz kalmış eritrosit süpernatantlarındaki LDH aktivitesi kontrol düzeylerinden önemli derecede farklı bulunmamıştır.



Şekil 4.6. AsIII ile muamele edilen eritrositlerde hücre içi NPSH seviyelerine glukozun etkisi: Eritrositler farklı konsantrasyonlarda AsIII içeren KRP tamponunda glukoz varlığında ve yokluğunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar uzaklaştırıldı ve eritrositler iki hacim fosfat tamponu ile yıkandı. Yıkanan eritrositlerde NPSH düzeyleri tespit edildi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

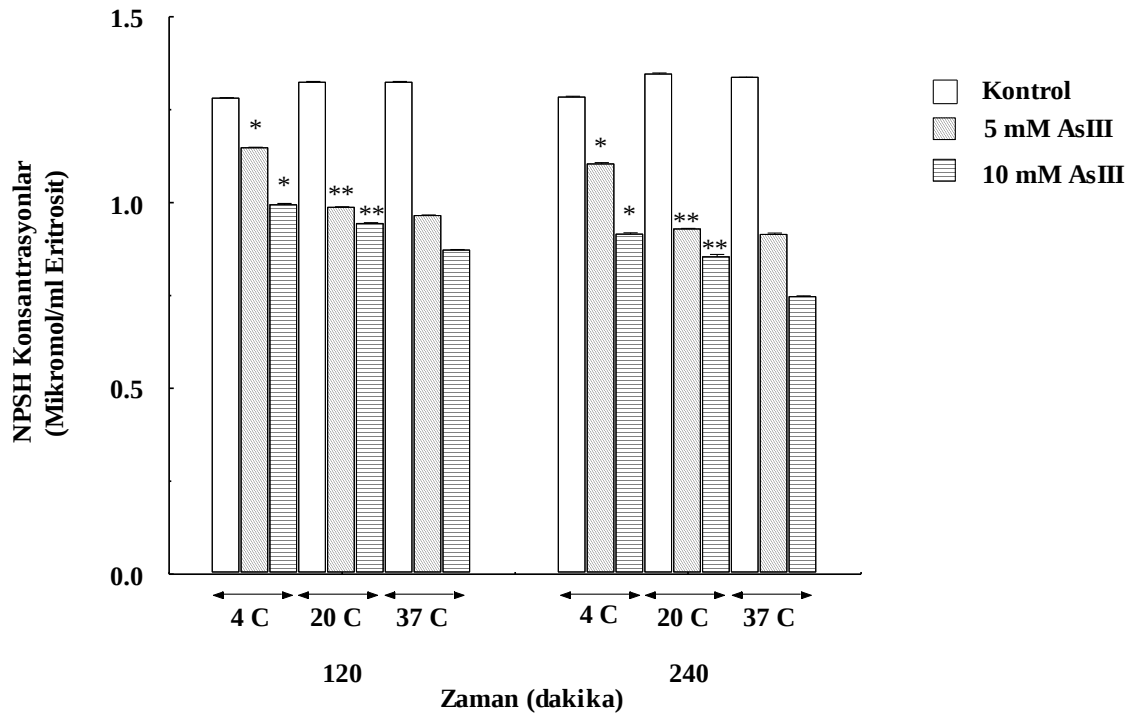
* Glukozlu gruplardan önemli derecede farklı olan değer



Şekil 4.7. AsIII ile muamele edilen eritrositlerde hücre dışı ortamda NPSH seviyelerine glukozun etkisi: Eritrositler farklı konsantrasyonlarda AsIII içeren KRP tamponunda glukoz varlığında ve yokluğunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı ve bu süpernatantlarda NPSH düzeyleri belirlendi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Glukozlu gruptan önemli derecede farklı olan değer

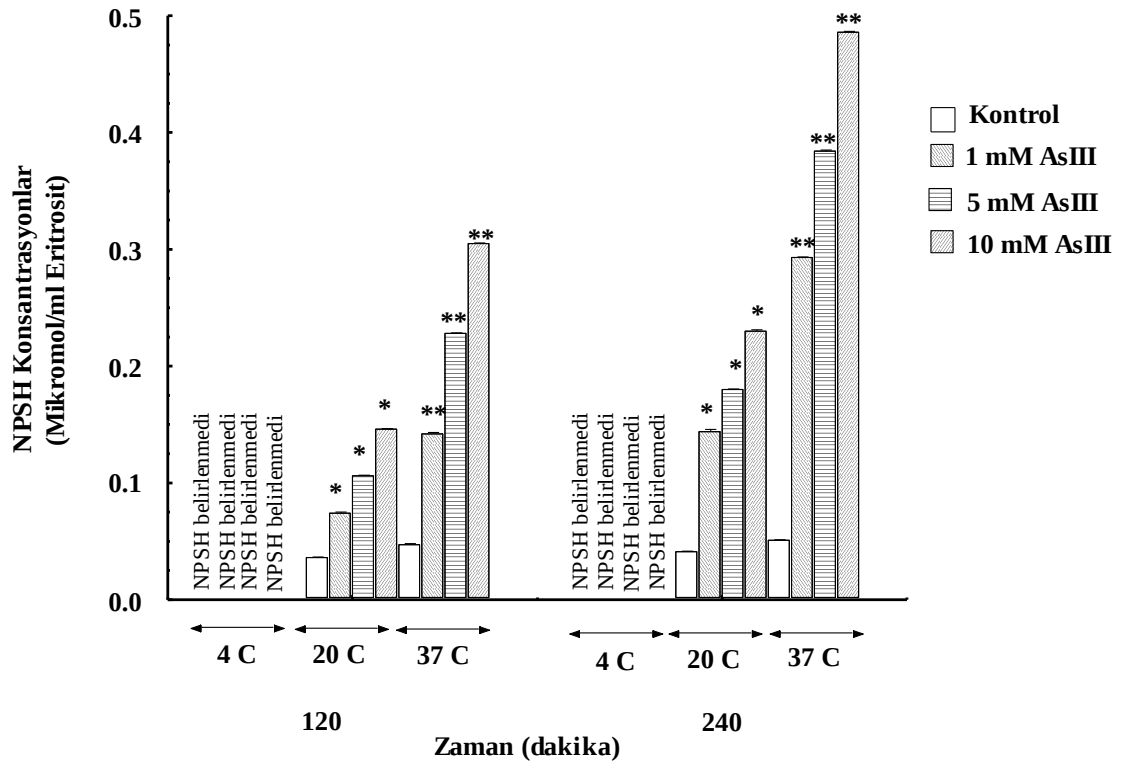


Şekil 4.8. AsIII ile muamele edilen eritrositlerde hücre içi NPSH seviyelerine sıcaklığın etkisi: Eritrositler farklı konsantrasyonlarda AsIII içeren KRP tamponunda farklı sıcaklıklarda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar uzaklaştırıldı ve eritrositler iki hacim fosfat tamponu ile yıkandı. Yıkanan eritrositlerde NPSH düzeyleri tespit edildi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* 20 °C ve 37 °C gruplarından önemli derecede farklı olan değer

** 37 °C gruplarından önemli derecede farklı değer



Şekil 4.9. AsIII ile muamele edilen eritrositlerde hücre dışı ortamda NPSH seviyelerine sıcaklığın etkisi: Eritrositler farklı konsantrasyonlarda AsIII içeren KRP tamponunda glukoz varlığında ve yokluğunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda eritrositler santrifüj edilerek süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı ve bu süpernatantlarda NPSH düzeyleri belirlendi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir. $p < 0.05$

* 4 °C gruplarından önemli derecede farklı olan değer

** 4 °C ve 37 °C gruplarından önemli derecede farklı değer

GSH eritrositlerdeki NPSH konsantrasyonun büyük bölümünü oluşturmaktadır. Bununla birlikte hücre dışı ortamdaki NPSH artışının tamamıyla AsIII tarafından indüklenen GSH transportuna bağlamak zordur. Bu nedenle eritrositlerin AsIII ile muamele edilmesinden sonra hücre dışı ve hücre içi ortamda direkt GSH ölçümleri yapıldı. Sonuçlar hücre dışı ortamda belirlenen NPSH' nin önemli bir miktarının GSH olduğunu göstermektedir (Şekil 4.10, Şekil 4.11). Bu da AsIII' ün eritrositlerden GSH transportunu indüklediğini göstermektedir. Eritrositler 10 mM AsIII' e 4 saat maruz kaldıktan sonra NPSH seviyesi 0.481 ± 0.0005 $\mu\text{mol/ml}$ eritrosit olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte aynı konsantrasyonda AsIII ve aynı inkübasyon periyodundan sonra GSH düzeyleri 0.274 ± 0.004 $\mu\text{mol/ml}$ eritrosit olarak tespit edilmiştir. Bu durum Arsenik bileşiklerine maruz kalan eritrositlerin asit eriyebilir serbest-SH içeren bazı bileşikler ürettiği ve bunları hücre dışına transport ettiğini göstermektedir. Bunlar homosistein ya da sistein olabilir.

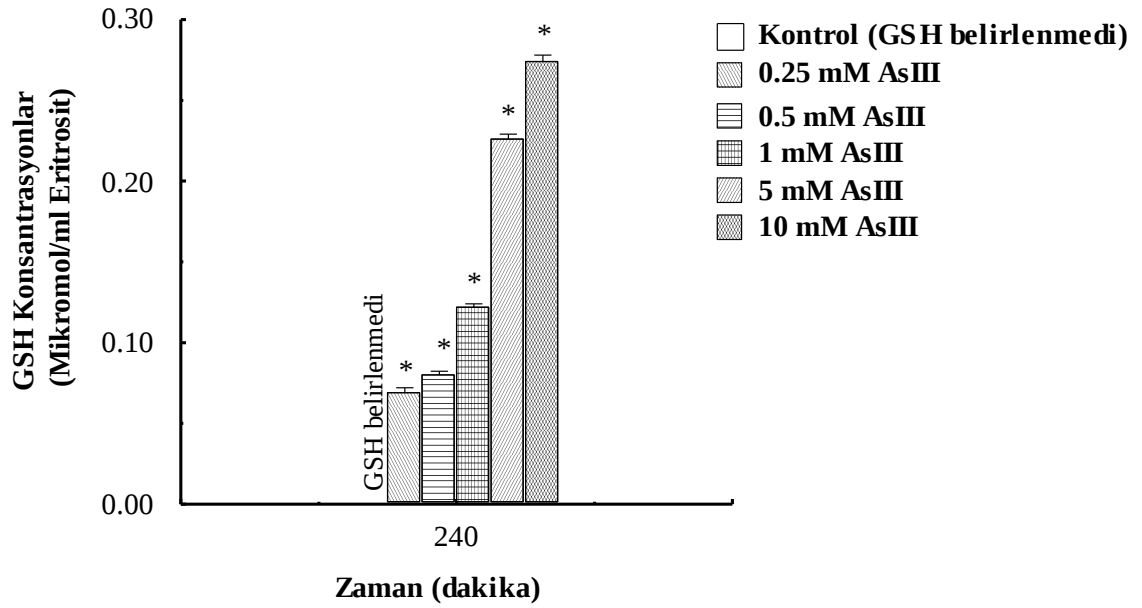
Eritrositlerden GSH atılımında MRP membran taşıyıcılarının rolü olup olmadığını göstermek için MRP1 inhibitörü olan MK-571 varlığında da ölçülmüştür. Bu amaçla 1 mM AsIII ile farklı konsantrasyonlarda MK-571 içeren KRP tamponunda 4 saat süresince inkübe edildi. Inkübasyondan sonra hücre dışı GSH seviyeleri ölçüldü. Sonuçlar (Şekil 4.12) MK-571' in eritrositlerden GSH çıkışını önemli derecede inhibe ettiğini göstermiştir. Bu da hücreden redükte GSH çıkışında MRP' lerin rol aldığını göstermektedir. Fakat MK-571 çıkış işlemini tamamen inhibe etmemiştir.

Çalışmamızda bir metilasyon inhibitörü olan periodat ile oxide edilen adenosinin hücrelerden GSH çıkışına etkiside araştırıldı. Bu amaçla eritrositler 1 mM AsIII içeren KRP tamponunda PAD varlığında ve yokluğunda inkübe edildi. Inkübasyondan sonra hücre dışı GSH seviyeleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlara göre, metilasyon inhibitörünün kullanılması hücre dışında belirlenen GSH konsantrasyonlarının azalmasına sebep olmuştur (Şekil 4.13). Bu da hücrelerden GSH çıkışının görece olarak düzgün işleyen metilasyon olaylarına bağlı olduğunu göstermektedir. Arsenik metilasyon ürünlerine örnek olarak MMA ve DMA gösterilebilir. Daha sonraki çalışmalarda yine metilarsenoz diglutatyonun $[\text{CH}_3\text{As}(\text{SG})_2]$ ve dimetilarsenoz glutatyonun $[(\text{CH}_3)_2\text{AsSG}]$ oluştuğunda göstermiştir. Bu ürünler enzimler tarafından katalize edilen ve glutatyonun da yer aldığı bir reaksiyonla

oluşmaktadır. $\text{As}(\text{SG})_3$ teşekülü ise AsIII ve glutatyon gerektiren bir reaksiyonla ortaya çıkmaktadır. Bu reaksiyonlar hücre içi glutatyonun tüketilmesindeki başlıca yollardır.

Eritrositler AsIII ile muamele edildiğinde hücrelerde GSH çıkışı belirlenmektedir. Daha önce yapılan bir araştırmada arsenitin DMSA tarafından etkili bir şekilde GSH' i $\text{As}(\text{SG})_3$ kompleksinden ayırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda eritrositler 1 mM AsIII içeren KRP tamponunda inkübe edildi ve daha sonra 0.5 ve 1.5 mM DMSA ile muamele edildi. GSH düzeyleri belirlendi.

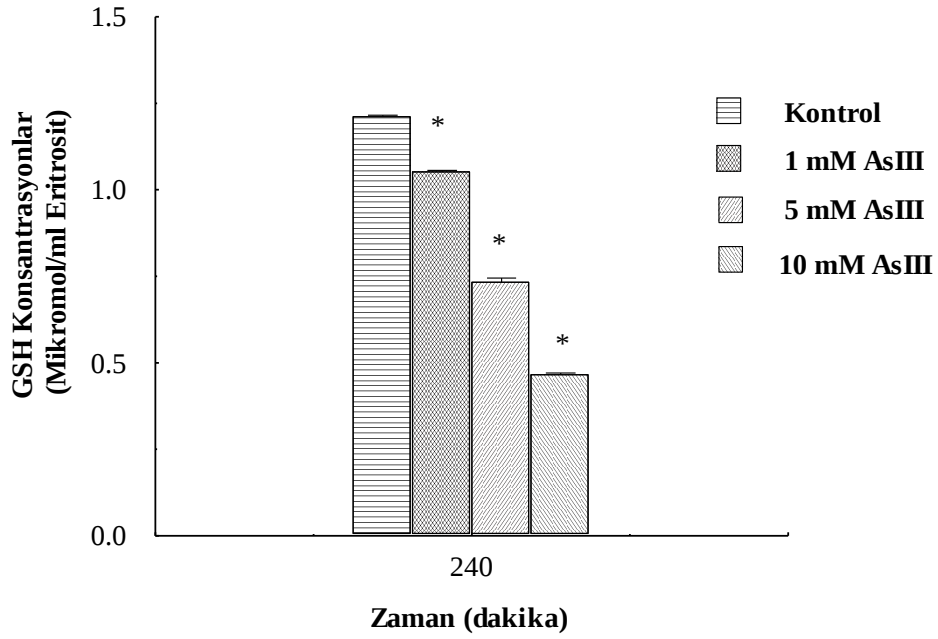
Eritrositlerden GSH atılımında Pgp membran taşıyıcılarının rolü olup olmadığını göstermek için Pgp inhibitörü olan verapamil varlığında ve yokluğunda GSH ölçülmüştür. Sonuçlar (Şekil 4.14) verapamilin eritrositlerden GSH çıkışını önemli derecede inhibe ettiğini göstermiştir. Bu da hücreden redükte GSH çıkışında Pgp' lerin rol aldığını göstermektedir. Fakat verapamil çıkış işlemini tamamen inhibe etmemiştir.



Şekil 4.10. AsIII ile muamele edilen eritrositlerden hücre dışı ortamda GSH seviyeleri: Eritrositler farklı konsantrasyonlarda AsIII içeren KRP tamponunda 240 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda eritrositler santrifüj edilerek süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı ve bu süpernatantlarda GSH düzeyleri belirlendi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Kontrol grubundan önemli derecede farklı olan değer

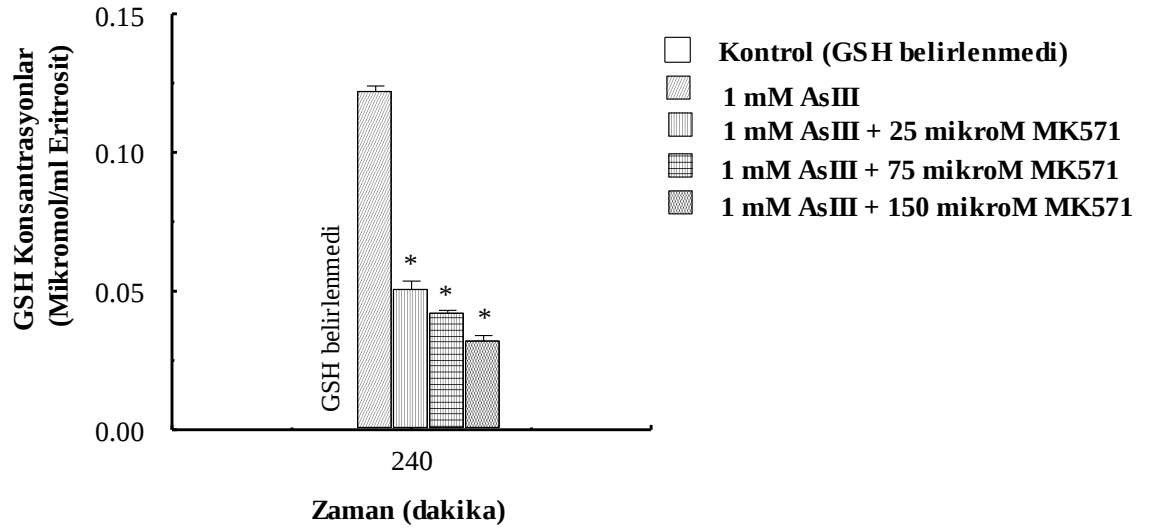


Şekil 4.11. AsIII ile muamele edilen eritrositlerde, hücre içi GSH seviyeleri:

Eritrositler belirtilen konsantrasyonlarda AsIII içeren KRP tamponunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar uzaklaştırıldı ve eritrositler dört hacim fosfat tamponu ile yıkandı. Yıkanan eritrositlerde GSH düzeyleri tespit edildi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

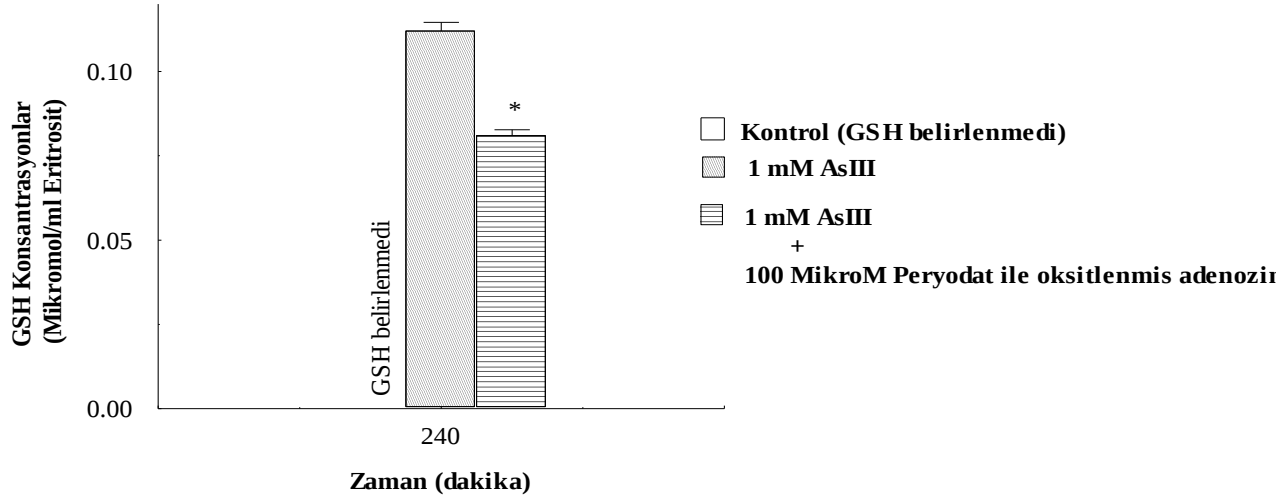
* Kontrol grubundan önemli derecede farklı olan değer



Şekil 4.12. AsIII ile muamale edilen eritrositlerde hücre dışı ortamda GSH seviyelerine MK571'in etkisi: Eritrositler 1 mM AsIII içeren KRP tamponunda MK571 varlığında ve yokluğunda 240 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı ve bu süpernatantlarda GSH düzeyleri belirlendi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

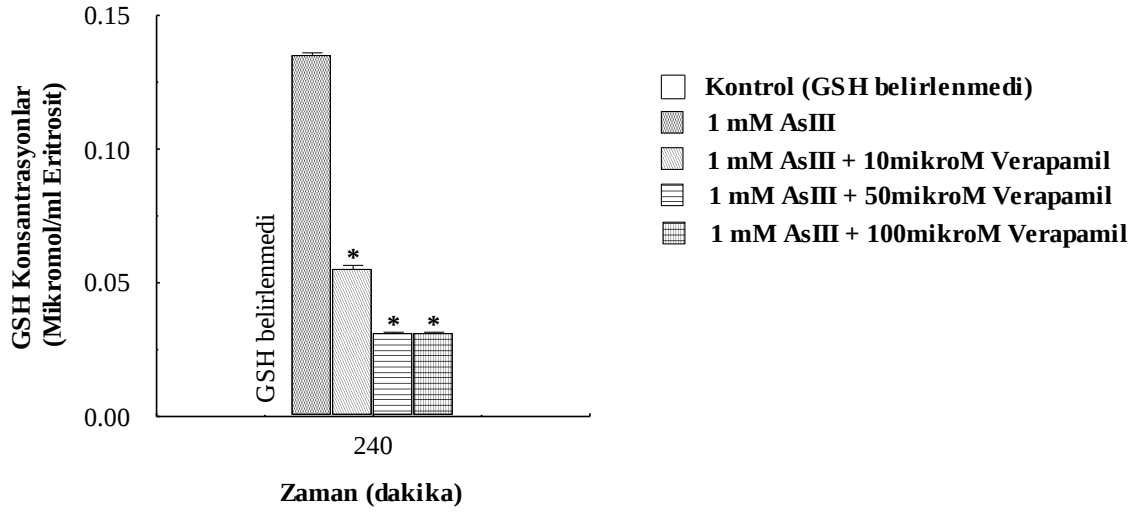
* Kontrol ve 1 mM AsIII gruplarından önemli derecede farklı olan değer



Şekil 4.13. AsIII ile muamale edilen eritrositlerde hücre dışı ortamda GSH seviyelerine PAD'ın etkisi: Eritrositler 1 mM AsIII içeren KRP tamponunda PAD varlığında ve yokluğunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı ve bu süpernatantlarda GSH düzeyleri belirlendi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmistir.

$p < 0.05$

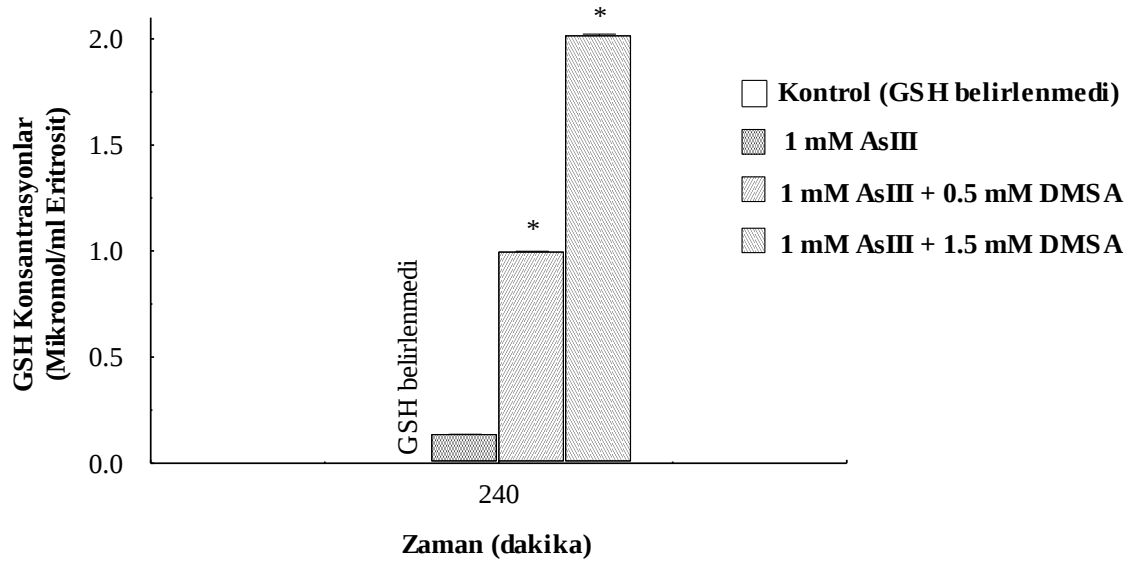
* Kontrol ve 1 mM AsIII gruplarından önemli derecede farklı olan değer



Şekil 4.14. AsIII ile muamale edilen eritrositlerde hücre dışı ortamda GSH seviyelerine verapamilin etkisi: Eritrositler 1 mM AsIII içeren KRP tamponunda verapamil varlığında ve yokluğunda 240 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı ve bu süpernatantlarda GSH düzeyleri belirlendi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Kontrol ve 1 mM AsIII gruplarından önemli derecede farklı olan değer



Şekil 4.15. AsIII ile muamale edilen eritrositlerde DMSA uygulamasından sonra hücre dışı ortamda GSH seviyeleri: Eritrositler 1 mM AsIII içeren KRP tamponunda 240 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı. Bu süpernatantlara 0.5 ve 1.5 mM DMSA eklendi ve 37 °C 30 dakika inkübe edildi. Bu süpernatantlarda GSH düzeyleri belirlendi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

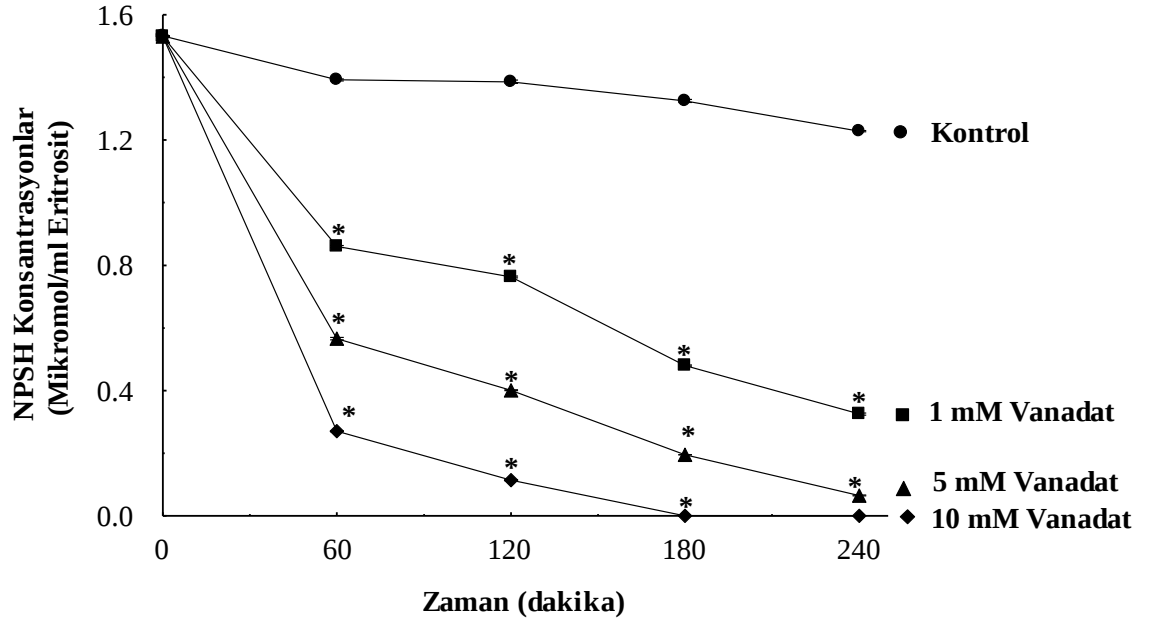
* Kontrol ve 1 mM AsIII gruplarından önemli derecede farklı olan değer

4.2 Vanadat ile İlgili Sonuçlar:

Başlangıçta vanadatın etkisiyle meydana gelen hücre içi ve hücre dışı NPSH konsantrasyonlarındaki değişimler araştırıldı. Bu amaçla eritrositler farklı konsantrasyonlarda vanadat içeren KRP tamponunda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücre içi ve hücre dışı ortamda NPSH konsantrasyonları belirlendi (Şekil 4.16, Şekil 4.17). Sonuçlar vanadatın hücre içi NPSH' lerde önemli bir azalma ve hücre dışı NPSH' lerde artış olduğunu göstermiştir.

Eritrositlerden NPSH çıkışının membran hasarına bağlı olup olmadığının gösterilmesi için hücre dışı ortamda LDH aktiviteleri ölçülmüştür. Sonuçlar hücre dışı ortamda LDH aktivitelerinin artmadığını göstermiştir. Bu da eritrositlerin vanadat ile muamele edilmesi sonucunda membran hasarı olmadığını göstermektedir (Şekil 4.18). Dolayısıyla hücre dışı ortamda belirlenen NPSH' lerin membran hasarı sonucu eritrosit dışına çıkmadığı, aksine NPSH' lerin vanadat varlığında indüklenen membran transport yolu ile hücre dışına çıktığı ileri sürülebilir.

Vanadat insan eritrositlerine fosfat alımını da sağlayan klor bikarbonat taşıyıcıları tarafından alınmaktadır (Nemeti and Gregus, 2004). Bu nedenle klor bikarbonat taşıyıcılarının inhibitörü olan DIDS' in, vanadat tarafından değiştirilen hücre içi ve hücre dışı NPSH konsantrasyonlarına etkisi olup olmadığı araştırıldı. Sonuçlar DIDS varlığında hücre içi NPSH seviyelerinin önemli derecede korunduğunu ve hücre dışı ortamda NPSH artışının inhibe edildiğini göstermiştir (Şekil 4.19, Şekil 4.20). Bu sonuçlar, vanadatın bahsedilen etkilerini gösterebilmesi için önce hücre içine alınması gerektiğine işaret etmektedir.

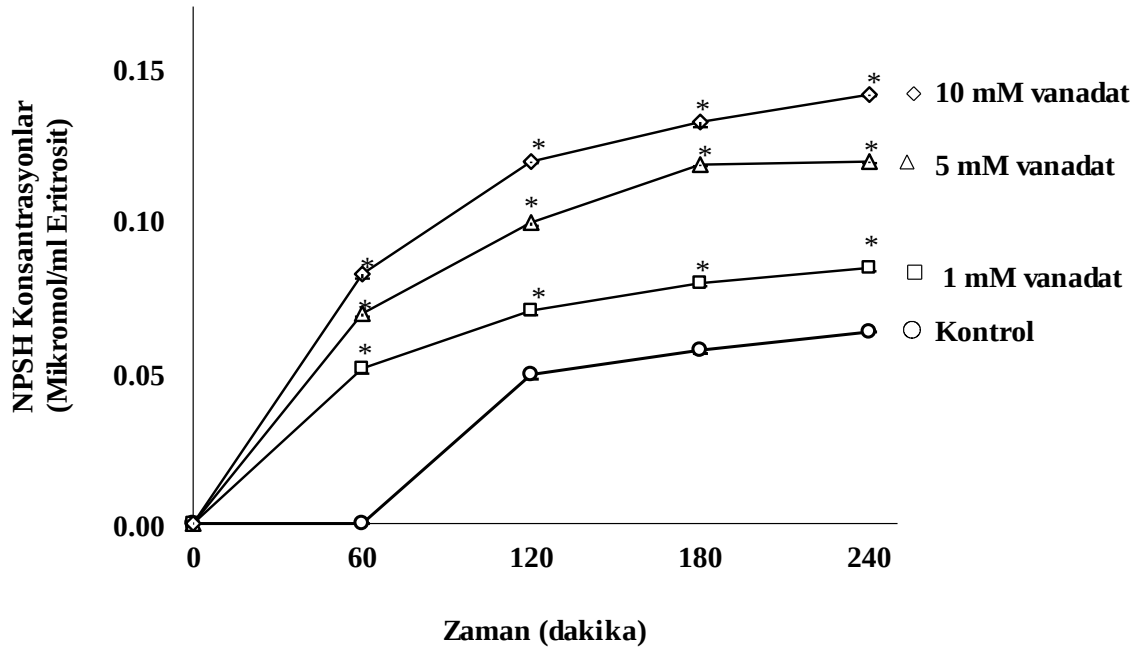


Şekil 4.16. Vanadat ile muamele edilen eritrositlerde hücre içi NPSH seviyeleri:

Eritrositler belirtilen konsantrasyonlarda vanadat içeren KRP tamponunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar uzaklaştırıldı ve eritrositler iki hacim fosfat tamponu ile yıkandı. Yıkanan eritrositlerde NPSH düzeyleri tespit edildi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

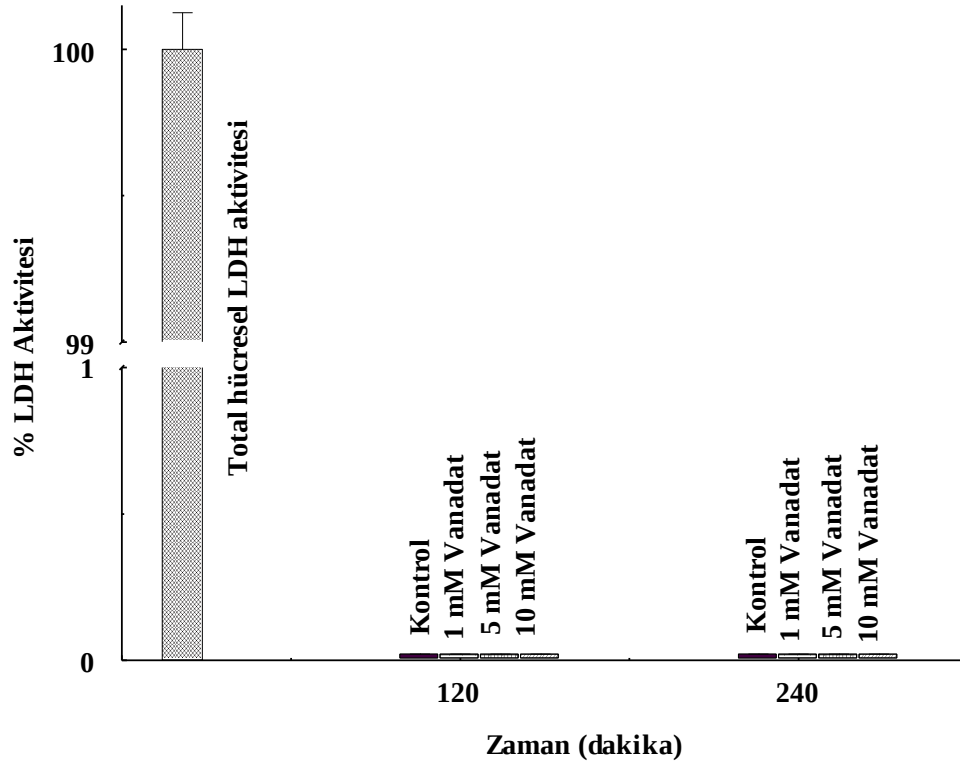
* Kontrol grubundan önemli derecede farklı olan değer



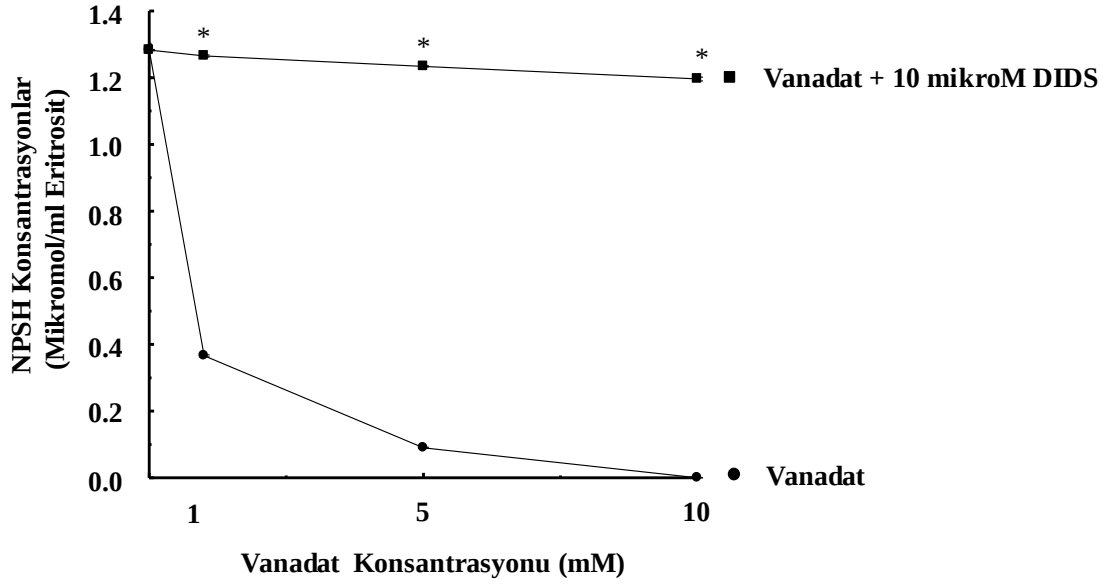
Şekil 4.17. Vanadat ile muamele edilen eritrositlerden hücre dışı ortamda NPSH seviyeleri: Eritrositler belirtilen konsantrasyonlarda vanadat içeren KRP tamponunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda eritrositler santrifüj edilerek süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı ve bu süpernatantlarda NPSH düzeyleri belirlendi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Kontrol grubundan önemli derecede farklı olan değer



Şekil 4.18. Vanadatın hücre membranına etkisi: Eritrositler belirtilen konsantrasyonlarda vanadat içeren KRP tamponunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı ve LDH aktiviteleri süpernatantlarda ölçüldü. Bozulmamış eritrositlerin total sitoplazmik LDH aktivitesi distile su içinde eritrositler hemoliz edilerek benzer şekilde ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir. Vanadata maruz kalmış eritrosit süpernatantındaki LDH aktivitesi kontrol düzeylerinden önemli derecede farklı bulunmamıştır.

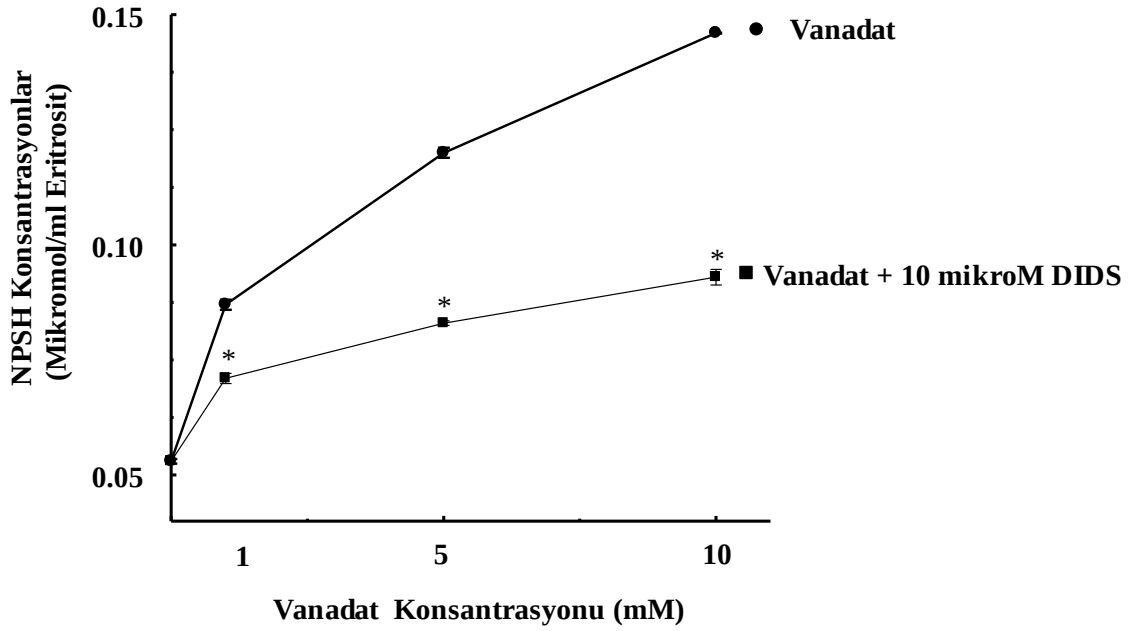


Şekil 4.19. Vanadat ile muamele edilen eritrositlerde hücre içi NPSH seviyelerine

DIDS'in etkisi: Eritrositler belirtilen konsantrasyonlarda vanadat içeren KRP tamponunda DIDS varlığında ve yokluğunda 240 dk süresince inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar uzaklaştırıldı ve eritrositler iki hacim fosfat tamponu ile yıkandı. Yıkanan eritrositlerde NPSH seviyeleri belirlendi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Vanadat gruplarından önemli derecede farklı olan değer



Şekil 4.20. Vanadat ile muamele edilen eritrositlerde hücre dışı ortamda NPSH seviyelerine DIDS' in etkisi: Eritrositler belirtilen konsantrasyonlarda vanadat içeren KRP tamponunda DIDS varlığında ve yokluğunda 240 dk süresince inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı ve bu süpernatantlarda NPSH düzeyleri belirlendi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

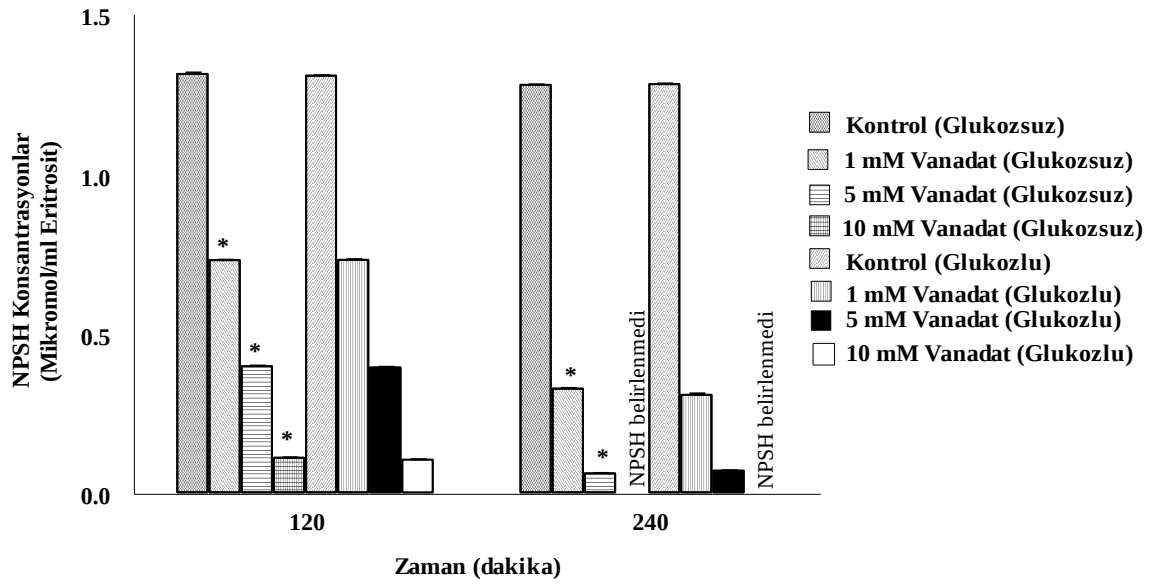
$p < 0.05$

* Vanadat gruplarından önemli derecede farklı olan değer

Daha sonraki çalışmamız vanadat tarafından indüklenen hücre içi ve hücre dışı NPSH konsantrasyonlarındaki değişimin enerjiye bağlı olup olmadığını göstermek için yapılmıştır. Bu amaç için eritrositler glukoz varlığında ve yokluğunda farklı konsantrasyonlarda vanadat içeren KRP tamponunda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücre içi ve hücre dışı NPSH seviyeleri ölçüldü. Glukoz yokluğunda vanadat ile muamele edilen eritrositlerde hücre içi NPSH seviyelerinin daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.21). Diğer yandan glukoz yokluğunda hücre dışı ortamdaki NPSH seviyelerinde ise azalma görülmüştür (Şekil 4.22). Bu sonuçlar vanadat tarafından indüklenen hücre içi ve hücre dışı NPSH seviyelerindeki değişimlerin enerjiye bağlı olduğunu göstermektedir.

Daha sonraki çalışmalarımızda vanadat ile muamele edilen eritrositlerde hücre içi ve hücre dışı NPSH seviyelerine sıcaklığın etkisi araştırıldı. Bu amaçla eritrositler farklı konsantrasyonlarda vanadat varlığında ve yokluğunda KRP tamponunda 4, 20 ve 37 °C’ de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücre içi ve hücre dışı NPSH seviyeleri ölçüldü. Sonuçlar vanadat ile muamele edilen eritrositlerin 37 °C’ nin altındaki sıcaklıklarda inkübe edilmesi durumunda, hücre içi ve hücre dışı NPSH seviyelerindeki değişimin önemli derecede inhibe edildiğini göstermiştir. (Şekil 4.23, Şekil 4.24). Bu durum vanadat ile muamele edilen eritrositlerde NPSH seviyelerinin hücre içinde azalmasının ve hücre dışında artmasının biyolojik olarak aktif olaylar olduğunu göstermiştir.

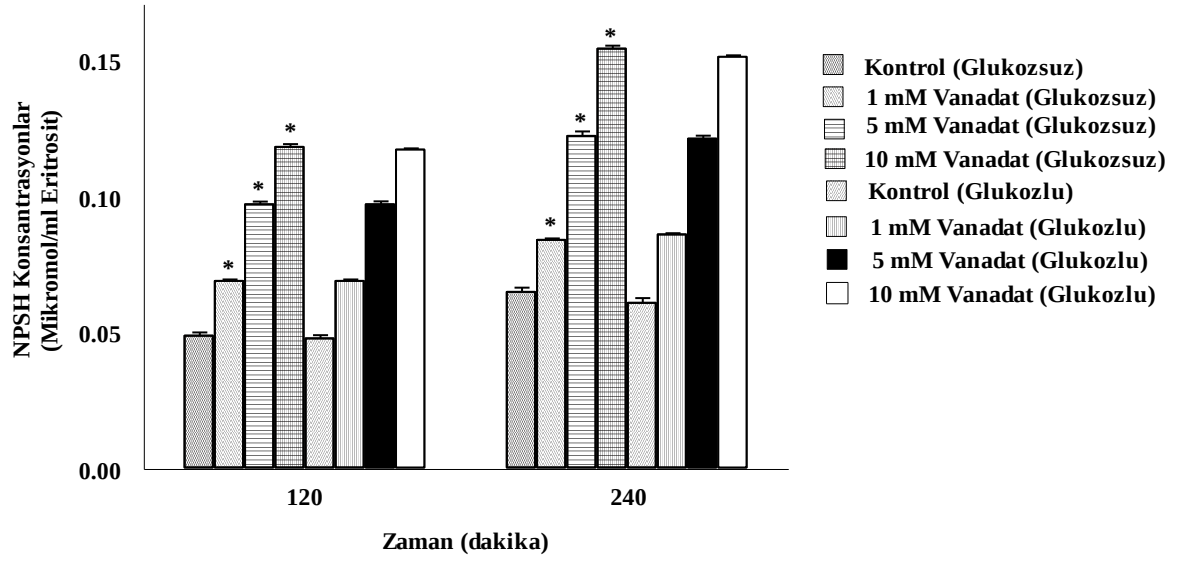
Ortamdaki NPSH artışının tamamıyla vanadat tarafından indüklenen GSH transportuna bağlamak zordur. Bu nedenle eritrositlerin vanadat ile muamele edilmesinden sonra hücre dışı ve hücre içi ortamda direkt GSH ölçümleri yapıldı. Sonuçlar hücre dışı ortamda belirlenen NPSH’nin önemli bir miktarının GSH olduğunu göstermektedir. Bu da vanadatın eritrositlerden GSH transportunu indüklediğini göstermektedir. Eritrositler 10 mM vanadata 4 saat maruz kaldıktan sonra hücre içi NPSH seviyesi 0.1410 ± 0.005 $\mu\text{mol/ml}$ eritrosit olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte aynı konsantrasyonda vanadat ve aynı inkübasyon peryodundan sonra hücre içi GSH düzeyleri 0.0 ± 0.0 $\mu\text{mol/ml}$ eritrosit olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.25). Eritrositler 1, 5 ve 10 mM vanadata 4 saat maruz kaldıktan sonra hücre dışı ortamdaki GSH seviyeleri 0.0150 ± 0.001 , 0.0330 ± 0.001 , 0.0576 ± 0.002 $\mu\text{mol/ml}$ eritrosit olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.21. Vanadat ile muamele edilen eritrositlerde hücre içi NPSH seviyelerine glukozun etkisi: Eritrositler farklı konsantrasyonlarda vanadat içeren KRP tamponunda glukoz varlığında ve yokluğunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar uzaklaştırıldı ve eritrositler iki hacim fosfat tamponu ile yıkandı. Yıkanan eritrositlerde NPSH seviyeleri belirlendi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

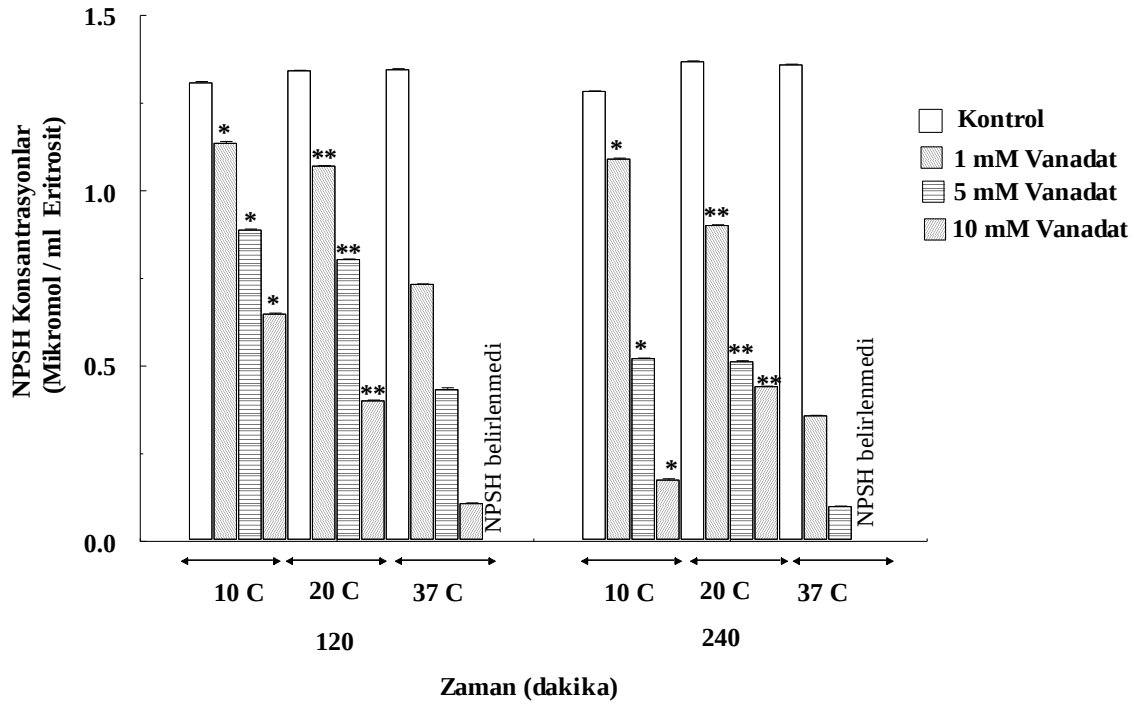
* Glukozlu gruplardan önemli derecede farklı olan değer



Şekil 4.22. Vanadat ile muamele edilen eritrositlerde hücre dışı ortamda NPSH seviyelerine glukozun etkisi: Eritrositler farklı konsantrasyonlarda vanadat içeren KRP tamponunda glukoz varlığında ve yokluğunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı ve bu süpernatantlarda NPSH seviyeleri belirlendi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Glukozlu gruptan önemli derecede farklı olan değer

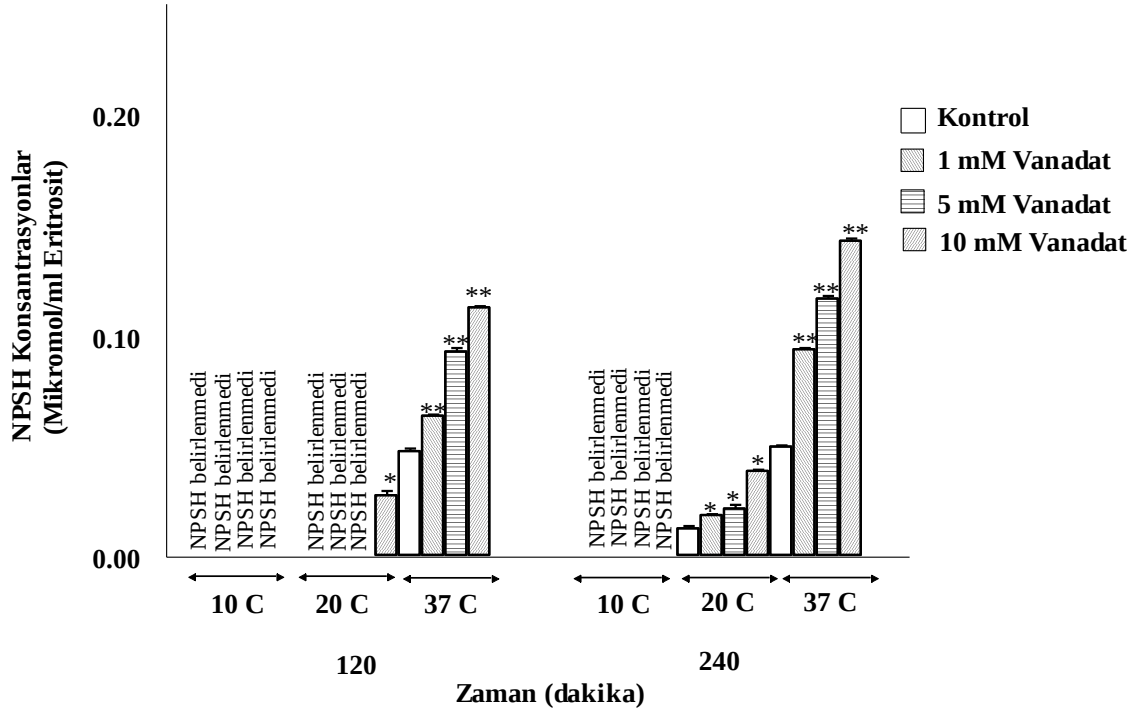


Şekil 4.23. Vanadat ile muamele edilen eritrositlerde hücre içi NPSH seviyelerine sıcaklığın etkisi: Eritrositler belirtilen konsantrasyonlarda vanadat içeren KRP tamponunda farklı sıcaklıklarda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar uzaklaştırıldı ve eritrositler iki hacim fosfat tamponu ile yıkandı. Yıkanan eritrositlerde NPSH düzeyleri tespit edildi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* 20 °C ve 37 °C gruplarından önemli derecede farklı olan değer

** 37 °C gruplarından önemli derecede farklı değer

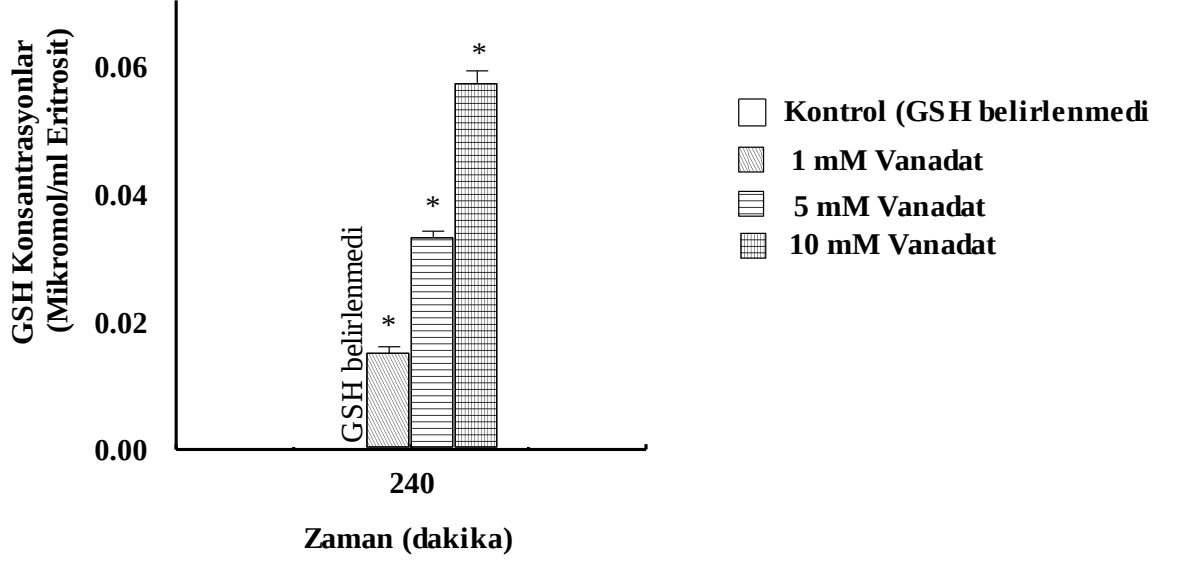


Şekil 4.24. Vanadat ile muamele edilen eritrositlerde hücre dışı ortamda NPSH seviyelerine sıcaklığın etkisi: Eritrositler farklı konsantrasyonlarda vanadat içeren KRP tamponunda glukoz varlığında ve yokluğunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda eritrositler santrifüj edilerek süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı ve bu süpernatantlarda NPSH düzeyleri belirlendi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* 4 °C gruplarından önemli derecede farklı olan değer

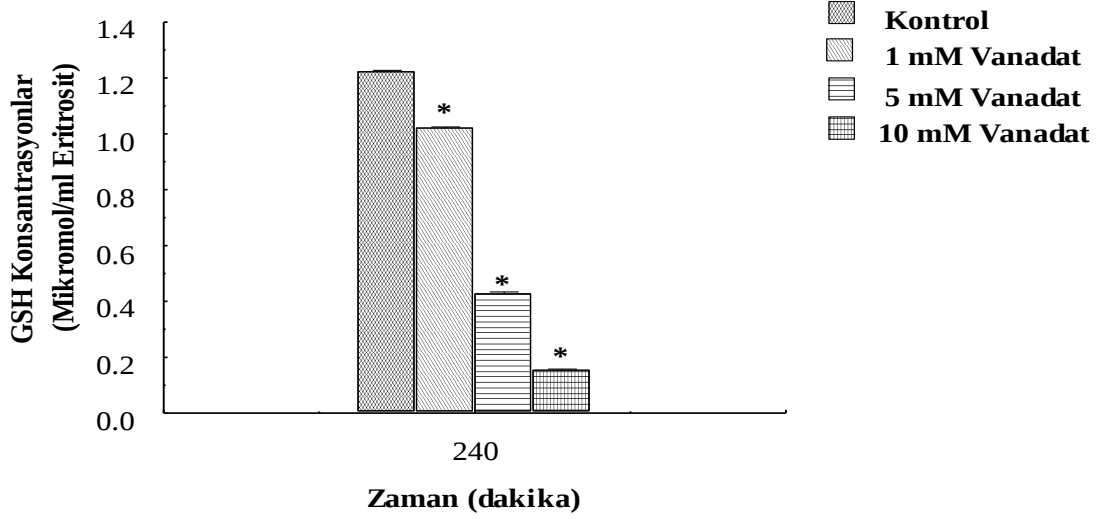
** 4 °C ve 37 °C gruplarından önemli derecede farklı değer



Şekil 4.25. Vanadat ile muamele edilen eritrositlerde hücre içi GSH seviyelerindeki değişim: Eritrositler farklı konsantrasyonlarda vanadat içeren KRP tamponunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı bu süpernatantlarda GSH seviyeleri belirlendi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Kontrol grubundan önemli derecede farklı olan değer



Şekil 4.26. Eritrositlerdeki GSH düzeylerinin vanadat konsantrasyonuna bağlı değişimi: Eritrositler belirtilen konsantrasyonlarda vanadat içeren KRP tamponunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar uzaklaştırıldı ve eritrositler dört hacim fosfat tamponu ile yıkandı. Yıkanan eritrositlerde GSH düzeyleri tespit edildi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

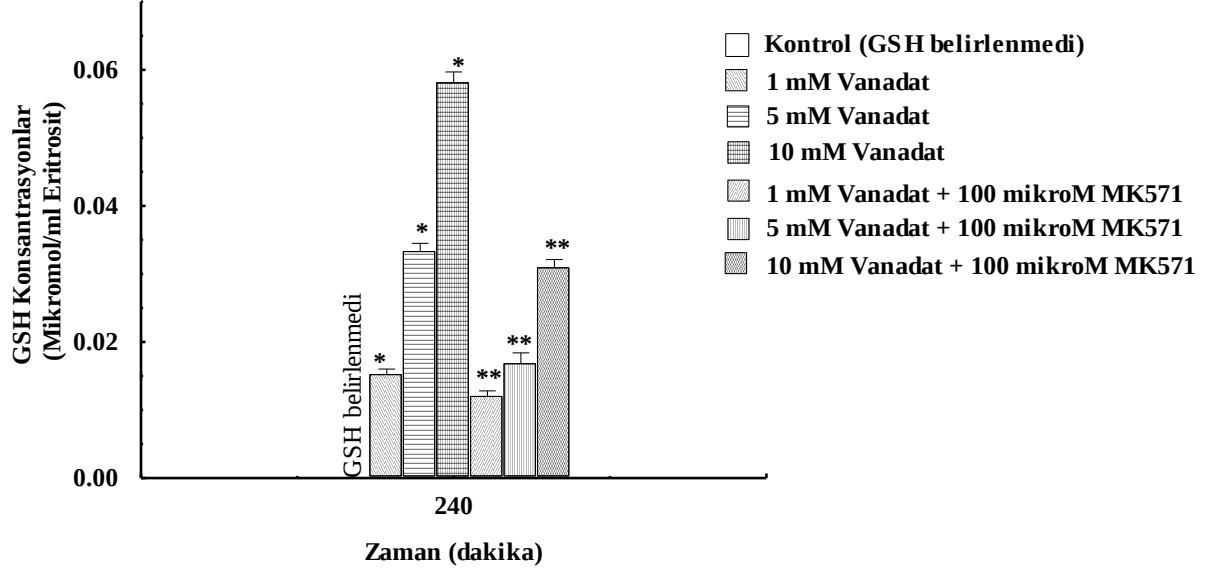
$p < 0.05$

* Kontrol grubundan önemli derecede farklı olan değer

Eritrositlerden GSH atılımında MRP membran taşıyıcılarının rolü olup olmadığını göstermek için MRP1 inhibitörü olan MK-571 varlığında GSH seviyeleri ölçülmüştür. Bu amaç için eritrositler farklı konsantrasyonlarda vanadat ve 100 mikromolar MK-571 içeren KRP tamponunda inkübe edildi ve hücre dışı ortamda GSH konsantrasyonları belirlendi (Şekil 4.27). Sonuçlar MK-571 eritrositlerden GSH çıkışını önemli derecede inhibe ettiğini göstermiştir. Bu da hücreden redükte GSH çıkışında MRP'lerin rol aldığını fakat işlemi tamamen inhibe etmediğini göstermektedir.

Çalışmamızda yine bir metilasyon inhibitörü olan periodat ile okside edilen adenosinin, vanadat ile muamele edilen hücrelerden GSH çıkışına etkisini araştırıldı. Bu amaçla eritrositler 10 mM vanadat içeren KRP tamponunda PAD varlığında ve yokluğunda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücre dışı GSH seviyeleri ölçüldü. Sonuçlar metilasyon inhibitörünün kullanılmasının hücre dışında belirlenen GSH konsantrasyonlarının azalmasına sebep olduğunu göstermiştir (Şekil 4.28). Bu da hücrelerden GSH çıkışının görece olarak düzgün işleyen metilasyon olaylarına bağlı olduğunu göstermektedir. Yine bu durum hücre dışında belirlenen GSH'in bir kısmının GSH-metilvanadat komplekslerinden geldiğini göstermektedir.

Çalışmamızda muhtemel GSH-vanadyum ya da GSH-metilvanadat komplekslerinin bulunup bulunmadığını göstermek için DMSA kullanıldı. Bu amaçla eritrositler 10 mM vanadat içeren KRP tamponunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı. Bu süpernatantlara 0.5 ve 1.5 mM DMSA eklendi ve 37 °C 30 dakika inkübe edildi. Bu süpernatantlarda GSH düzeyleri belirlendi. Vanadatta muamele edilmiş eritrosit süpernatantlarına DMSA uygulanması süpernatantlarda belirlenen GSH seviyelerini önemli derecede arttırmıştır (Şekil 4.29). Vanadata maruz kalmış eritrositlerde hücre dışına GSH çıkışı daha önce belirlenmemiştir. Bu sonuçlar da eritrositlerin serbest GSH'a ilave olarak GSH-vanadyum ya da GSH-metilvanadat komplekslerini de dışarı attığını göstermektedir.

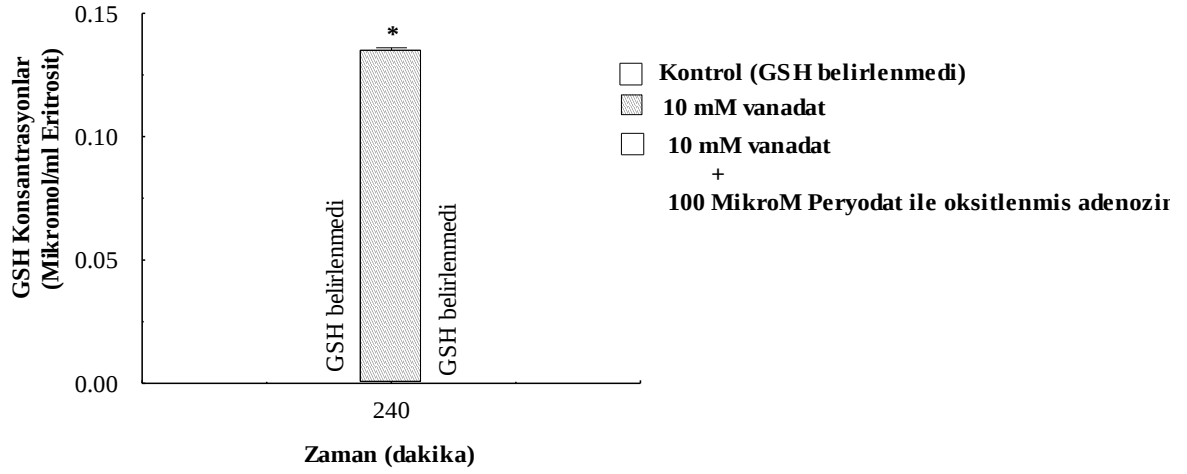


Şekil 4.27. Vanadat ile muamele edilen eritrositlerde hücre dışı ortamda GSH seviyelerine MK571' in etkisi: Eritrositler farklı konsantrasyonlarda vanadat içeren KRP tamponunda MK571 varlığında ve yokluğunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı ve bu süpernatantlarda GSH düzeyleri belirlendi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Kontrol grubundan önemli derecede farklı olan değer

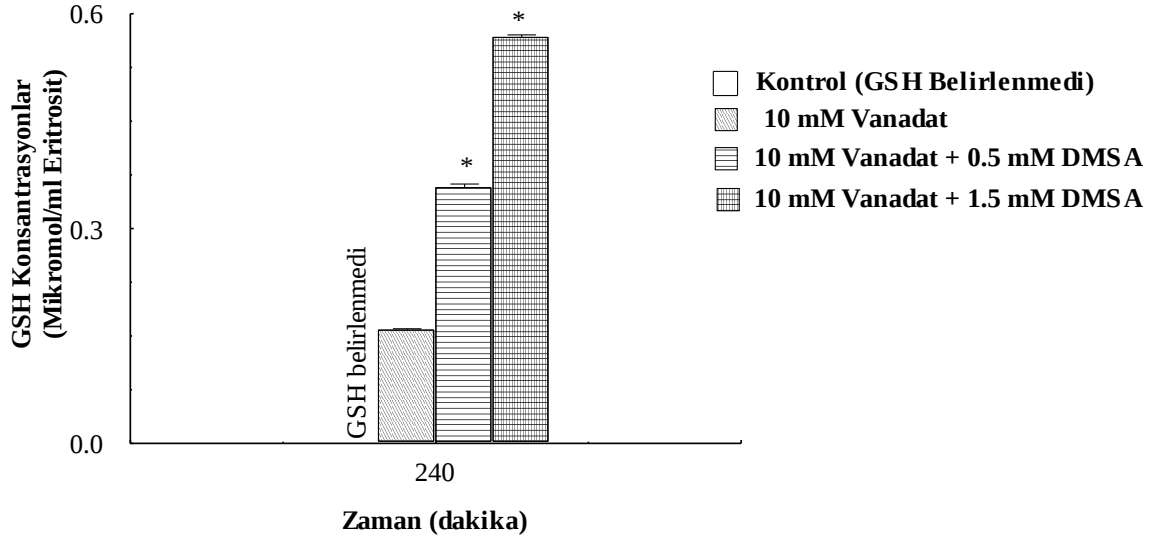
** Kontrol ve Vanadat gruplarından önemli derecede farklı olan değer



Şekil 4.28. Vanadat ile muamale edilen eritrositlerde hücre dışı ortamda GSH çıkışına PAD'ın etkisi: Eritrositler 10 mM vanadat içeren KRP tamponunda PAD varlığında ve yokluğunda 240 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı ve bu süpernatantlarda GSH düzeyleri belirlendi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Kontrol ve 10 mM vanadat + 100 Mikrom PAD gruplarından önemli derecede farklı.



Şekil 4.29. Vanadat ile muamale edilen eritrositlerde DMSA uygulamasından sonra hücre dışı ortamda GSH seviyeleri: Eritrositler 10 mM vanadat içeren KRP tamponunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı. Bu süpernatantlara 0.5 ve 1.5 mM DMSA eklendi ve 37 °C 30 dakika inkübe edildi. Bu süpernatantlarda GSH düzeyleri belirlendi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Kontrol ve 10 mM vanadat gruplarından önemli derecede farklı olan değer

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Ratların AsV ve AsIII maruz kalmaları sonucunda safra non protein tiyol (NPSH) seviyelerinin doza bağlı olarak arttığı bildirilmiştir (Gyurasics ve ark., 1991). Daha sonraki çalışmalar, eritrositler ve diğer hücreler tarafından alınan arsenik bileşiklerinin hücre içi metabolik süreçlerini göstermiştir. Hücreler AsV'ı tiol bağlı mekanizma ile AsIII'e redüklemektedirler (Nemeti ve ark., 2003; Nemeti ve Gregus, 2005). Dolayısıyla hücrelerde gözlemlediğimiz GSH konsantrasyonlarının düşüşü AsV in AsIII'e dönüştürülmesindeki GSH kullanımı olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalar yine AsV ve AsIII uygulamasından sonra protein-GSH karışık disülfidlerinin (ProSSG) oluştuğunu göstermiştir. Bu da hücre içi GSH kaybının diğer bir yolu olarak karşımıza çıkmaktadır (Winski ve Carter, 1995). Bunlara ilave olarak AsV ve AsIII hücrelerde metilasyona uğramaktadırlar. Bunlara örnek olarak monometilarsonik asit AsV ve dimetilarsonik asit AsV verilebilir. (Braman ve Foreback, 1973). Yapılan çalışmalarla iki tane organoarsenik bileşiği tanımlandı. Bunlar monometilarsonus asid MMA(III) ve dimetilarsonus asid DMA(III)'tir (Aposhian ve ark., 2000; Mandal ve ark., 2001). Daha sonraki çalışmalar da yine metilarsonoz diglutatyonun $[CH_3As(SG)_2]$ ve dimetilarsonoz glutatyonun $[(CH_3)_2AsSG]$ oluştuğunu göstermiştir (Kala ve ark., 2000; Suzuki ve ark., 2001). Bu ürünler enzimler tarafından katalize edilen ve glutatyonun yer aldığı bir reaksiyonla $As(SG)_3$ oluşturmaktadır (Hayakawa ve ark., 2005; Naranmandura ve ark., 2006). AsIII'e maruz kalındığında, $As(SG)_3$ teşekülü ve glutatyon ihtiva eden metilasyon ürünleri hücre içi glutatyonun tüketilmesindeki başlıca yollardır.

Hücrelerde gözlemlediğimiz GSH azalmasının sebebi AsV'in tiol bağlı mekanizma ile AsIII'e redüklenmesi olabilir. Çalışmamızda, AsV ve AsIII ile muamele edilen eritrositlerden hücre dışı ortamda redükte glutatyon belirlenmiştir. Dolayısı ile AsV ve AsIII ile muamele edilen eritrositlerden redükte durumda GSH çıkışı da hücre içi GSH kaybının ilave bir nedeni olabilir. Daha önceki yapılan çalışmalar eritrosit membranının fizyolojik şartlarda GSH'a geçirgen olmadığını göstermiştir (Kondo ve ark., 1980). Bu anlamda çalışmamız AsIII'in eritrositlerden GSH çıkışını tetikleyen olayları indüklediğini göstermektedir.

Çalışmalar da aşırı miktarda MRP1 salgılayan akciğer kanser hücrelerinde AsIII'e bağlı olarak GSH'ı dışarı attıkları gösterilmiştir (Leslie ve Haimeur, 2004). Fakat AsV uygulaması sonucunda eritrositlerden GSH çıkışı ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır. AsV ve AsIII'e maruz kalan eritrositlerden GSH çıkışını AsIII'le birlikte veya AsIII'in metabolik ürünleriyle birlikte oldukları sürülmüştür. Eritrositler dışında diğer hücreler kullanılarak yapılan çalışmalarda AsIII'e maruz bırakılmaları sonucunda hücrelerin dışarıya GSH çıkışına sebep olduğu gösterilmiştir. AsIII ratlarda safra ve karaciğer perfusatlarında GSH seviyelerinin artmasına sebep olmuştur (Anundi ve ark., 1982; Gyurasics ve ark., 1991). Daha sonraki çalışmalarda Chinese Hamster Ovary hücrelerinin ve akciğer kanser hücrelerinde AsIII'e bağlı olarak GSH'ı dışarı attıkları gösterilmiştir (Zaman ve ark., 1995; Huang ve Lee, 1996). Tavşan eritrosit lizatlarında As(SG)₃ oluşumu NMR spektroskopisi ile gösterilmiştir (Delnomdedieu ve ark., 1994). Ancak bu çalışmada GSH'nun eritrositlerden çıkışı ve inhibisyon ortamında eritrositlerde belirlenmesi gerçekleştirilmemiştir. Daha önce yapılan bir araştırmada arsenitin DMSA tarafından etkili bir şekilde GSH'ı GSH-kompleksinden ayırdığı ve süpernatanlarda belirlenen GSH seviyelerini önemli derecede artırdığı gösterilmiştir. Bu kompleksler, muhtemelen As(SG)₃, [CH₃As(SG)₂] ve [(CH₃)₂AsSG] olabilir.

AsIII uygulaması sonucunda hücrelerden GSH atılımının mekanizmasında MRP1 ve MRP2'nin rol aldığını gösteren çalışmalar devam etmektedir (Kala ve ark., 2000; Leslie ve ark., 2004). İnsan eritrosit membranında MRP1 aktivitesi olduğu bilinmektedir (Abraham ve ark., 2001a; Klokouzas ve ark., 2003). Eritrosit membranında MRP2 aktivitesi olmadığı rapor edilmiştir. İnsan eritrosit membranında düşük düzeyde Pgp aktivitesi vardır (Abraham, ve ark., 2001b). MRP1 ve Pgp ABC taşıyıcı protein ailesi üyeleridir. Arsenit ve vanadat MRP1 inhibitörü olan MK-571 ve Pgp inhibitörü olan verapamil varlığında, eritrositlerden GSH çıkışının güçlü şekilde inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu da hücreden redükte GSH çıkışında hem MRP1 hem de Pgp'lerin rol aldığını göstermektedir.

Literatürde MRP1 taşıyıcıları tarafından hücreden dışarı atılan ürünlerin yapısı hakkında tartışmalar sürmektedir. Bazı çalışmalar MRP taşıyıcılarının GSH ve AsIII'ü konjuge bir formda hücre dışına attığını savunmaktadır. Bazı çalışmalar da AsIII dışarı atılırken GSH'ında dışarı atıldığını savunmaktadır (Zaman ve ark., 1995; Salerno ve ark., 2002; Leslie ve Haimeur, 2004).

Hücreler tarafından alınan vanadat (V) başlangıçta vanadil (IV) haline redükte edilir. Bu olayda GSH elektron kaynağı olarak kullanılmakta ve GSSG'ye dönüşmektedir. Vanadat varlığında hücre içi GSH miktarlarındaki azalmanın genel olarak vanadat redüksiyonundan kaynaklandığına inanılmaktadır (Younes ve Strubelt, 1991). Böylece vanadat uygulanan hücrelerdeki GSH konsantrasyonlarının düşüşü vanadatin vanadile dönüştürülmesindeki GSH kullanımı olduğunu göstermektedir. Çalışmalar yine vanadat uygulamasından sonra protein-GSH karışık disülfidlerinin oluştuğunu göstermiştir. Bu da hücre içi GSH kaybının diğer bir yolu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Çalışmamızda kullandığımız en yüksek vanadat konsantrasyonu ile hücre içi NPSH düzeyi tamamen sıfırlanmıştır. Bu durum vanadat verilmesi sonucunda GSH'nun tüketilmesi olarak yorumlanabilir. Bununla birlikte vanadat uygulaması sonucunda hücre dışı ortamda da önemli NPSH tespit edilmiştir. Bu NPSH'nin önemli kısmının GSH olduğu daha sonraki çalışmalarımızda gösterilmiştir. Dolayısıyla hücre içi GSH kaybının diğer bir yolu olarak hücrelerden dışarıya GSH atıldığı ileri sürülebilir.

Daha önceki çalışmalar insan eritrositlerinde ve diğer hücre tiplerinde fosfatın sodyuma bağlı fosfat transport sistemleri tarafından alındığını göstermiştir (Abraham ve ark., 1992; Elmariah ve Gunn, 2003). Vanadat insan eritrositlerine fosfat alımını da sağlayan klor bikarbonat taşıyıcıları tarafından alınmaktadır. Bu nedenle klor bikarbonat taşıyıcılarının inhibitörü olan DIDS vanadat transportunu da etkileyecektir. Bu görüşü destekleyen sonuçlar DIDS kullanılarak yapılan deneylerle de desteklenmiştir. Vanadat ile birlikte DIDS kullanıldığında hücre içi NPSH seviyeleri daha yüksek kalmış bununla birlikte hücre dışı NPSH miktarı azalmıştır.

İnsan eritrosit membranında MRP1 aktivitesi olduğu bilinmektedir (Abraham ve ark., 2001a; Klokouzas ve ark., 2003) Eritrosit membranında MRP2 aktivitesi olmadığı rapor edilmiştir (Abraham, ve ark., 2001b). Çalışmamızda MRP1 inhibitörü olan MK-571'in eritrositlerden vanadat tarafından indüklenen GSH çıkışını azalttığı gösterilmiştir. Glutasyon çıkışında gözlenen azalma, bu membran taşıyıcısının eritrositlerden GSH çıkışında rolü olduğunu göstermektedir.

Daha önce yapılan bir araştırmada vanadat benzeri bir molekül olan arsenitin DMSA tarafından etkili bir şekilde GSH'i $As(SG)_3$ kompleksinden ayırdığı gösterilmiştir. Çalışmamızda benzer şekilde muhtemel GSH-vanadat ya da GSH-

metilvanadat komplekslerinin var olup olmadığını göstermek için DMSA kullandık. Vanadatla muamele edilmiş eritrosit supernatantlarına DMSA uygulanması süpernatantlarda belirlenen GSH seviyelerini önemli derecede arttırmıştır. Bu sonuçlar, eritrositlerin serbest GSH'e ilave olarak GSH-Vanadat ya da GSH-metilvanadat komplekslerininide dışarı attığını göstermektedir.

Daha önceki yapılan çalışmalar eritrosit membranının fizyolojik şartlarda GSH'a geçirgen olmadığını göstermiştir (Kondo ve ark., 1980). Bu anlamda çalışmamız vanadatın eritrositlerden GSH çıkışını tetikleyen olayları indüklediğini göstermektedir. Vanadat hücre içerisine alındıktan sonra vanadil ve diğer metile edilmiş moleküller olmak üzere bir çok ürün verecek şekilde metabolize edilir. Bu anlamda bir metilasyon inhibitörünün kullanılması, vanadat metabolizmasında metilasyon olayının ve sonrasında da metilvanadat-GSH komplekslerinin oluşup oluşmadığını gösterebilecektir. Metilasyon inhibitörü olan periodat ile oxide edilen adenosinin kullanılması hücre dışında belirlenen GSH konsantrasyonlarının azalmasına sebep olmuştur. Buda hücrelerden GSH çıkışının görel olarak düzgün işleyen metilasyon olaylarına bağlı olduğunu göstermektedir. Yine bu durum hücre dışında belirlenen GSH'ın bir kısmının MMA-(GSH)₂ ya da DMA-GSH'ten kaynaklandığını göstermektedir.

Arsenik ve vanadyum bileşikleriyle birlikte görünen GSH çıkışının çalışılması için eritrositler oldukça uygun bir deney sistemi oluşturabilir. Çünkü eritrositler karaciğer ve diğer çekirdeğe sahip hücrelerden çok daha az komplike bir sistemdir. Sonuç olarak çalışmamız insan eritrositlerinin karaciğer ve diğer çekirdekli hücreler gibi arsenik ve vanadyum uygulaması sonucunda GSH çıkışını gerçekleştirdiğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Abernathy, C. O., Liu, Y. P., Longfellow, D., Aposhian, H. V., Beck, B., Fowler, B., Goyer, R., Menzer, R., Rossman, T., Thompson, C., Waalkes, M., 1999. **Arsenic: Health effects, mechanisms of actions, and research issues**. Environ. Health Perspect., 107: 593–597.
- Adams, R.M., 1990. **Occupational Skin Disease**, 2nd ed., Saunders, Philadelphia, p. 147.
- Aksoy, M., 2000. **Beslenme Biyokimyası**. Hatipoğlu Yayınları, 506-562.
- Almedeida, M., Filipe, S., Hunianes, M., Mala, M.F., Melo, R., Severino, N., Silva, J.A., Fruesto da Silva, J.J. and Wever, R., 2001. **Vanadium haloperoxidases from brown algae of the Laminariaceae family**, Phytochemistry, 57: 633–642.
- Altamirano-Lozano, M., Alvarez-Barrera, L. and Roldan-Reyes, E., 1993. **Cytogenetic and teratogenic effects of vanadium pentoxide on mice**, Med. Sci. Res., 21: 711–713.
- Altamirano-Lozano, M., Alvarez-Barrera, L., Bassurto- Alc'antara, F., Valverde, M. and Rojas, E., 1996. **Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice**, Teratog. Carcinog. Mutagen, 16: 7–17.
- Altamirano-Lozano, M., Valverde, M., Alvarez-Barrera, L., Molina, B. and Rojas, E., 1999. **Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V₂O₅) in male mice. Effects in several mouse tissues**, Teratog. Carcinog. Mutagen, 19: 243–255.
- Amir, H., Karas, M., Giat, J., Danilenko, M., Levy, R., Yermiahu, T., Levy, J., Sharoni, Y., 1999. **Lycopene and 1,25-dihydroxyvitamin-D₃ cooperate in the inhibition of cell cycle progression and induction of differentiation in HL-60 leukemic cells**. Nutr cancer, 33: 105-112.
- Aoki, N., Xing, Z., 2004. **Use of cytokines in infection**. Expert Opin Emerg Drugs, 9: 223-236.
- Aposhian, H.V., 1989. **Biochemical toxicology of arsenic** Rev. Biochem. Toxicol., 10: 99-265.
- Aposhian, H. V., Zheng, B., Aposhian, M.M., Le, X.C., Cebrian, M.E., Cullen, W.R., Zakharyan, R.A., Ma, M., Dart, R.C., Cheng, Z., Andrewes, P., Yip, L., O'Malley, G.F., Maiorino, R.M., Voorhies, W.V., Healy, S.M. and Titcomb, A., 2000. **DMPS-arsenic challenge test. II. Modulation of arsenic species, including monomethylarsonous acid (MMA(III)), excreted in human urine**. Toxicol, Appl. Pharmacol., 165(1): 74-83.
- Aposhian, H.V., Gurzau, E.S., Le, X.C., Gurzau, A., Healy, S.M., Lu, X., Ma, M., Yip, L., Zakharyan, R.A., Maiorino, R.M., Dart, R.C., Tircus, M.G., Gonzalez-Ramirez, D., Morgam, D.L., Avram, D. and Aposhian, M.M., 2000. **Occurrence of monomethylarsonous acid in urine of humans exposed to inorganic arsenic**. Chem. Res. Toxicol., 13(8): 693-7.
- Armstrong, C.W., Stroube, R.B., Rubio, T., Beckett, W.S., 1984. **Outbreaks of fatal arsenic poisoning caused by contaminated drinking water**, Arch. Environ. Health, 39: 274-279.
- Armstrong, D.A., 1998. **Methods in molecular biology**, Volume 108, Humana press., Toronto.

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR, 1993. **Toxicological profile for arsenic**, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Georgia, U.S. Department of Health and Human Services, TP-92/02.
- Attia, S.M., Schmid, T.E., Badary, O.A., Hamada, F.M. and Adler, I.-D., 2002. **Molecular cytogenetic analysis in mouse sperm of chemically induced aneuploidy: studies with topoisomerase II inhibitors**, *Mutat. Res.*, 520:1-13.
- Attia, S.M., Badary, O.A., Hamada, F.M., Hrab'e de Angelis, M., Adler, I.-D., 2005. **Orthovanadate increased the frequency of aneuploid mouse sperm without micronucleus induction in mouse bone marrow erythrocytes at the same dose level**. *Mutation Research*, 583: 158-167.
- Axelsson, O., Dahlgren, E., Jansson, C.D., Rehnlund, S.O., 1978. **Arsenic exposure and mortality: A case-referent study from a Swedish copper smelter**, *Brit. J. Ind. Med.*, 35: 8-15.
- Balakumar, B.S., Suresh, R., Venugopal, R., 2010. **Modulatory effects of ascorbic acid and α -tocopherol on arsenic induced micronuclei formation**, *Int. J. Pharmacol.*, 6: 676-680.
- Banerjee, K., Helwick, R.P. ve Gupta, S., 1999. **A treatment process for removal of mixed inorganic and organic arsenic species from groundwater**. *Environmental Progress*, 18(4): 280-284.
- Bansal, S.K., Haldar, N. and Dhand, U.K., 1991. **Phrenic neuropathy on arsenic poisoning**. *Int J. Dermatol.*, 30: 304-306.
- Barceloux, D.G., 1999. **Vanadium**, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 37(2): 265-78.
- Barchowsky A., Klei L.R., Dudek E.J., Swartz H.M., James P.E., 1999. **Stimulation of reactive oxygen, but not reactive nitrogen species, in vascular endothelial cells exposed to low levels of arsenite**. *Free Radic. Biol. Med.*, 27: 1405-1412.
- Barrett, J.C., Lamb, P.W., Wang, T.C., Lee, T.C., 1989. **Mechanisms of arsenic-induced cell transformation**, *Biol. Trace Elem. Res.*, 21:421-9.
- Base, D., Das Gupta, J., Mukherjee, A. and Guha Mazumder, D.N., 1996. **Chronic neuropathy due to arsenic intoxication from geo-chemical source-a five year follow up**. *Anei, J.*, 1: 45-47.
- Basu, T.K., 1999. **Potential role of antioxidant vitamins**. *Kitap: Basu T.K, Temple N.J, Garg M.L, Antioxidants in human health and disease*, CABI Publishing, 15-17, New York.
- Beers, M., Berkow, R., 1999. **The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. Section 23. Chapter 307. Poisoning**. Whitehouse Station, NJ: Merck, Co.
- Benko, V., Dobisova, A. and Macaj, M., 1971. **Arsenic in the hair of a non-occupationally exposed population**, *Atmos. Environ.*, 5: 275-79.
- Belton, J.C., Benson, N.C., Hanna, M.L., Taylor, R.T., 1985. **Growth inhibition and cytotoxic effects of three arsenic compounds on cultured Chinese hamster ovary cells**, *J. Environ. Sci. Health*, 20: 37-72.
- Benko, V., Wagner, V., Wagnerova, M., Batora, J., Hyg. J., 1988. **Immunological profiles in workers of a power plant burning coal rich in arsenic content**, *Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, 32(2) : 137-146.
- Bernstam, L. and Nriagu, J., 2000. **Molecular aspects of arsenic stress**, *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.*, 3:293-322.
- BGS ve DPHE, 2001. **Arsenic contamination of groundwater in Bangladesh**. BGS Technical Report, WC: 00-19.

- Bhattacharya R., Chatterjee D., Nath B., Jana J., Jacks G., Vahter M., 2003. **High arsenic groundwater: mobilization, metabolism and mitigation - an overview in the Bengal delta plain**, Mol. Cell. Biochem., 253: 347–355.
- Bissen, M., Frimmel, F.H., 2003. **Arsenic- a review. Part I: Occurrence, toxicity, speciation, mobility**. Acta hydrochimica et hydrobiologica, 31(1):9-18.
- Biswas J., Sinha D., Mukherjee S., Roy S., Siddiqi M. and Roy, M., 2010. **Curcumin protects DNA damage in a chronically arsenic-exposed population of West Bengal**, Human Exp. Toxicol., 29: 513–524.
- Blanck J., Ristau O., Zhukov A.A., Archakov A.I., Rein H. and Ruckpaul K., 1991. **Cytochrome P-450 spin state and leakiness of the monooxygenase pathway**, Xenobiotica, 21(1): 121-135.
- Bollinger, C.T., Van Zijl P., Louw, J.A., 1992. **Multiple organ failure with the adult respiratory distress syndrome in homicidal arsenic**, Respiration 59: 57-61.
- Borgono, J.M., Vincent, P., Venturino, H., 1977. **Arsenic in the drinking water of the city of Antofagasta: epidemiological and clinical study before and after the installation of the treatment plant**. Environ Health Perspect. 19: 103-105.
- Bosch, F., Arino, J., Gomez-Foix, A.M., Guinovart, J., 1987. **Glycogenolytic, noninsulin-like effects of vanadate on rat hepatocyte glycogen synthase and phosphorylase**, J. Bio. Chem., 262: 218-222.
- Brigelius, R., Muckel, C., Akerboom, T.P., Sies, H., 1983. **Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide**, Biochem Pharmacol. 32: 2529-2534.
- Brown, R.M., Newton, D., Pickford, C.J., Sherlock, J.C., 1990. **Human metabolism of arsenobetaine ingested with fish**. Hum. Exp. Toxicol., 9: 41-46.
- Buchet, J.P., Lauwerys, R., Roels, H., 1981. **Comparison of the urinary excretion of arsenic metabolites after a single oral dose of sodium arsenite, monomethylarsonate, or dimethylarsinate in man**. Int. Arch. Occup. Environ. Health, 48: 71-79.
- Buchet, J.P., Lauwerys, R. and Roels, H., 1981. **Urinary excretion of inorganic arsenic and its metabolites after repeated ingestion of sodium metaarsenite by volunteers**. Arch. Occup. Environ. Health, 48: 111-118.
- Buchet, J.P., Lison, D., Ruggeri, M., Foa, V., Elia, G., 1996. **Assessment of exposure to inorganic arsenic, a human carcinogen, due to the consumption of seafood**. Arch Toxicol., 70(11): 773–778.
- Burton, G.W., Ingold, K.U., 1989. **Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant**. Ann NY acad sci., 570: 7-22.
- Cadenas, E., Packer, L., 1996. **Handbook of antioxidants**. Marcel dekker., New York.
- Calabrese, E.J., Kostecki, P., and Gilbert, C., 1987. **How much dirt do children eat? An emerging environmental health question**. Comments on Toxicology, 1(3-4): 229-241.
- Capella, L.S., Gefe, M.R., Silva, E.F., Affonso-Mitidieri, O., Lopez, A.G., Rumjanek, V.M. and Capella, M.A., 2002. **Mechanisms of vanadate-induced cellular toxicity: role of cellular glutathione and NADPH**. Arch. Biochem. Biophys, 406: 65–72.
- Carr, A., Frei, B., 1999. **Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions?** FASEB J., 13: 1007-1024

- Carreo, P. E., Tyson, J. F., 1998. **Speciation of Organic and Inorganic Arsenic in Water by Flow Injection Hydride Generation Electrothermal Atomization Atomic Absorption Spectrometry with In-Atomizer Trapping and Successive Retention of Asv and Tetrahydroborate(III) on an Anion Exchange Resin.** Unpublished Data, University of Massachusetts, Amherst, USA.
- Chakraborty, A.K., Saha, K.C., 1987. **Arsenical dermatosis from tubewell water in West Bengal.** Indian J Med., 85:326–334.
- Chan P.C., Huff J., 1997. **Arsenic carcinogenesis in animals and in humans: Mechanistic, experimental, and epidemiological evidence,** Environ Carcino Ecotox Rev., 15: 83-122.
- Chasteen, N.D., 1983. **The biochemistry of vanadium,** Struct. Bond, 53: 107–137.
- Chatterjee, A., Das, D., Mandal, B.K., Toy Chowdhury, T., Samanta, G., Chakraborti, D., 1995. **Arsenic in ground water in six districts of west Bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world,** Analyst, 120: 643-650.
- Cheatham, B. and Kahn, C.R., 1995. **Insulin action and the insulin signaling network,** Endocr Rev. Apr., 16(2): 117-42.
- Chen, S.L., Dzung, S.R., Yang, M.H., Chiu, K.H., Shieh, G.M., Wai, C.M., 1994. **Arsenic species in groundwaters of the blackfoot disease area, Taiwan.** Environ. Sci. Technol., 28(5): 877–881.
- Chen, C.J., Hsueh, Y.M., Lai, M.S., Shyu, M.P., Chen, S.Y., Wu, M.M., Kuo, T.L., Tai, T.Y., 1995. **Hypertension Increased prevalence of hypertension and long-term arsenic exposure.** Hypertension, 25: 53–60.
- Chen, C.J., Wu, M.M., Lee, S.S., Wang, J.D., Cheng, S.H. and Wu, H.Y., 1988. **Atherogenicity and carcinogenicity of high-arsenic artesian well water. Multiple risk-factors and related malignant neoplasms of blackfoot disease.** Arteriosclerosis, 8: 452–460.
- Chen, M., Ma, L.Q., Hoogeweg, C.G., Harris, W.G., 2001. **Arsenic background concentrations in Florida surface soils: determination and interpretation .** J. Environ. Forensics., 2:117-126.
- Chen W., Yang J., Chen J. and Bruch J., 2006. **Exposures to silica mixed dust and cohort mortality study in tin mines: exposure–response analysis and risk assessment of lung cancer,** Am. J. Ind. Med., 49: 67–76.
- Cherubini, A., Ruggiero C., Polidori, M.C. and Mecocci, P., 2005. **Potential markers of oxidative stress in stroke,** Free Radical Biology and Medicine, 39(1): 841-852.
- Cohen, S.M., Arnold, L.L., Eldan, M., Lewis, A.S. and Beck, B.D., 2006. **Methylated arsenicals: the implications of metabolism and carcinogenicity studies in rodents to human risk assessment,** Crit. Rev. Toxicol., 36: 99–133.
- Chiou, H.Y., Hsueh, Y.M., Liaw, K.F., Horng, S.F., Chiang, M.H., Pu, Y.S., Lin, J.S.N., Huang, C.H. and Chen, C.J., 1995. **Incidence of internal cancers and ingested inorganic arsenic: a seven-year follow-up study in Taiwan.** Cancer Res., 55: 1296-300.
- Chiou, P.W.S., Chen, K.L., Yu, B., Sci, J., 1997. **Effects of roxarsone on performance, toxicity, tissue accumulation and residue of eggs and excreta in laying hens.** J Sci Food Agric, 74: 229–236.

- Chou, S., Harper, C., Ingberman, L., Lladós, F., Colman, J., Chappell, L., Osier, M., Odin, M., Sage, G., 2007. **Toxicological Profile for Arsenic**. US Department of Health and Human Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Chowdhury, U.K., Biswas, B.K., Chowdhury, T.R., Samanta, G., Mandal, B.K., Basu, G.C., Chanda, C.R., Lodh, D., Saha, K.C., Mukherjee, S.K., Roy, S., Kabir, S., Quamruzzaman, Q. and Chakraborti, D., 2000. **Groundwater arsenic contamination in Bangladesh and West Bengal, India**. Environ. Health Perspect, 108: 393–397.
- Ciranni, R., Antonetti, M., Migliore, L., 1995. **Vanadium salts induce cytogenetic effects in in vivo treated mice**, Mutat. Res. 343:53–60.
- Clarkson, T.W., 1991. **Inorganic and organometal pesticides**, in: W.J. Hayes Jr. (Ed.), Handbook of Pesticide Toxicology, Academic Press, San Diego, p. 545–552.
- Clemens, M. R., Waller, H. D., 1987. **Lipid peroxidation in erythrocytes**, Chemist. and Phy. of Lipids, 45: 251-268.
- Cohen, M.D., Klein, C.B. and Costa, M., 1992. **Forward mutations and DNA-protein crosslinks induced by ammonium metavanadate in cultured mammalian cell**, Mutat. Res. 269: 141–148.
- Coleman, J.W., 2001. **Nitric oxide in immunity and inflammation**, International Immunopharmacology, 1(8): 1397-1406.
- Concha, G., Nermell, B., Vahter, M., 1998. **Exposure to inorganic arsenic metabolites during early human development**. Toxicol. Sci., 44: 185-190.
- Concha, G., Vogler, G., Nermell, B. and Vahter, M., 1998. **Low-level arsenic excretion in breast milk of native Andean women exposed to high levels of arsenic in the drinking water**. Int. Arch. Occup. Environ. Health, 71(1): 42-46.
- Conn, P.F., Schalch, W., Truscott, T.G., 1991. **The singlet oxygen and carotenoid interaction**. J. Photochem. Photobiol. B., 11(1): 41-47.
- Cortizo, A.M., Bruzzone, L., Molinuevo, S., Etcheverry S.B., 2000. **Possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines**. Toxicology, 147(2): 89-99.
- Cullen, W.R., Reimer, K.J., 1989. **Arsenic speciation in the environment**. Chem. Rev., 89: 713-764.
- Çiçek, B., Inanç, N., Şahin, H., 2007. **Vanadium and its Interaction with Diabetes**. Sendrom, 19(12): 25-31.
- Das, D., Chatterjee, A., Mandal, B.K., Samanta, G., Chakraborti, D., 1995. **Arsenic in ground water in six districts of West Bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world. Part 2. Arsenic concentration in drinking water, hair, nails, urine, skin-scale and liver tissue (biopsy) of the affected people**. Analyst, 120: 917-924.
- Datta, S., Talukder, G., Sharma, A., 1986. **Cytotoxic effects of arsenic in dietary oil primed rats**. Sci. Cult., 52: 196–198.
- De Groot H., 1994. **Reactive oxygen species in tissue injury**, Hepatogastroenterology, 41: 328-332.
- De Vizcaya-Ruiz, A., Barbier, O., Ruiz-Ramos, R. AND Cebrian, M.E., 2009. **Biomarkers of oxidative stress and damage in human populations exposed to arsenic**. Mutat. Res. 674: 85–92.

- Del Razo, L.M., Styblo, M., Cullen, W.R., Thomas, D.J., 2001. **Determination of trivalent methylated arsenicals in biological matrices.** Toxicol. Appl. Pharmacol. 174: 283-293.
- Demirtaş, D., Gökteş, M., Karcı, B., Bilgen, V., 1997. **Kanserli dokuda glutatyon düzeyi araştırılmasının önemi.** Ege Tıp Dergisi 36(3-4): 109-11.
- Denizli, A., 2008. **Ağır metal toksikolojisi,** Atatürk Üniversitesi Ders Yayınları, No:237.
- Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets, R., 2001. **The Human ATP-binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily.** Genome Res. 2001 Jul;11(7):1156-66.
- Deen, M.V.D., Elisabeth, G.E. de Vries, Timens, W., Scheper, R.J., Timmer-Bosscha H., Postma, D.S., 2005. **ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters In Normal And Pathological lung.** Respiratory Research, 6: 59.
- Dhar, R. K., Biswas, B. K., Samanta, G. S., Mandal, B. K., Chakraborti, D., Roy, S., Jafar, A., Islam, A., Ara, G., Kabir, A. W., Ahmed, S. A., Hadi, S. A., 1997. **Groundwater arsenic calamity in Bangladesh.** Current Science, 73: 48-59.
- Díaz-Villaseñor, A., Burns, A.L., Hiriart, M., Cebrián, M.E., Ostrosky-Wegman, P., 2007. **Arsenic-induced alteration in the expression of genes related to type 2 diabetes mellitus.** Toxicol. Appl. Pharmacol. 225: 123-133.
- Ding, G., Sun, G., Fen, Z., Li, L., Li, C., 1987. **Epidemiologic research of cancer in exposed cadmium, lead and arsenic workers.** J. China Med. Univ., 16: 368-371.
- Ding, W., Hudson, L.G., Liu, K.J., 2005. **Inorganic arsenic compounds cause oxidative damage to DNA and protein by inducing ROS and RNS generation in human keratinocytes.** Mol Cell Biochem., 279(1-2): 105-12.
- Dixon, H.B.F., 1977. **The biochemical action of arsonic acids, especially as phosphate analogues.** Adv Inorg Chem., 44: 191-227.
- Dixon, H.B.F 1997. **The biochemical action of arsonic acids especially as phosphate analogues.** Adv. Inorg. Chem. 44: 191-227.
- Domingo, J.L., 2002. **Vanadium and tungsten derivatives as antidiabetic agents: a review of their toxic effects,** Biol. Trace Elem. Res. 88:97-112.
- D'onofrio, F., Le M.Q., Chiasson, J.L., Srivastava, A.K., 1994. **Activation of mitogen activated protein (MAP) kinases by vanadate is independent of insulin receptor autophosphorylation,** FEBS Lett., Mar 7;340(3): 269-75.
- Dorgan, J.F., Sowell, A., Swanson, C.A., Potischman, N., Miller, R., Schussler, N., Stephenson, H.E., 2000. **Dose-Response Effects of Lycopene on Selected Drug-Metabolizing and Antioxidant Enzymes in the Rat.** Cancer Lett, 154(2): 201-210.
- Dölgen, D., Alpaslan, M.N., 2009. **Appropriate arsenic removal strategies for drinking water systems in Turkey.** Proceedings, International workshop on Urbanization, Land Use, Land Degredation and Environment, Workshop II-Environment, 169-175, Denizli, Turkey.
- Duckworth, W.C., 1988. **Insulin-like effects of vanadate in isolated rat adipocytes.** Endocrinology. 122:2285-2289.
- Ebadi, M., Sharma, S.K., 2003. **Peroxynitrite and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of parkinson's disease,** Antioxidants & Redox Signaling. 5(3): 319-335.
- Eckert, K., Eyer, P., 1986. **Formation and transport of xenobiotic glutathione-S-conjugates in red cells.** Biochem. Pharmacol., 35: 325-329.

- Eguchi, N., Kuroda, K., Okamoto, A., Horiguchi, S., 1997. **Metabolites of arsenic induced tetraploids and mitotic arrest in cultured cells.** Arch. Environ. Contam. Toxicol., 32: 141–145.
- EGVM (Expert Group on Vitamins and Minerals), 2003. **Report on safe upper levels for vitamins and minerals**, London, pp. 246–252.
- Ellenhorn, M.J., 1997. **Arsenic, in: ellenhorn's medical toxicology: diagnosis and treatment of human poisoning**, 2nd ed., Williams and Wilkins, Baltimore, p. 1538.
- Endo, G., Kuroda, K., Okamoto, A., Horiguchi, S., 1992. **Dimethylarsenic acid induces tetraploids in Chinese hamster cells.** Bull Environ Contam Toxicol. 48:131-137.
- Engström, K.S., Vahter, M., Johansson, G., Lindh, C.H., Teichert, F., Singh, R., Kipler, M., Nermell, B., Raqib, R., Strömberg, U., Broberg, K., 2010. **Chronic exposure to cadmium and arsenic strongly influences concentrations of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in urine.** Free Radic. Biol. Med., 48: 1211–1217.
- Erhardt, J.G., Meisner, C., Bode, J.C., 2003. **Lycopene, beta-carotene and colorectal adenomas.** Am J clin nutr., 78(6): 1219-1224.
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., Grodsky, G.M., 2003. **Are oxidative stress –activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -Cell dysfunction.** Diabetes. 52: 1-8.
- Fantus, I.G., Ahmad, F., Deragon, G., 1994. **Vanadate augments insulin-stimulated insulin receptor kinase activity and prolongs insulin action in rat adipocytes. Evidence for transduction of amplitude of signaling into duration of response** Diabetes. Copyright by American Diabetes Association 43(3): 375-383.
- Flora, S.J.S., Bhadauria, S., Kanan, G.M., Singh, N., 2007. **Arsenic induced oxidative stress and the role of antioxidant supplementation during chelation: a review.** J. Environ. Biol. 28: 333–347.
- Flora, S.J.S., Mittal, M., Mehta, A., 2008. **Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy**, Indian J. Med. Res. 128: 501–523.
- Finaud, J., Lac, G., Filaire, E., 2006. **Oxidative stress: Relationship with exercise and training**, Sports Medicine, s. 35 (4): 327-358.
- FNB (Food and Nutrition Board), 2001. **Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc**, Institute of Medicine, National Academy Press, Washington DC, USA, pp. 532–553.
- Franzblau, A., Lilis, R., 1989. **Acute arsenic intoxication from environmental exposure.** Arch. Environ. Health 44:385.
- Fridovich, I., 1997. **Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters**, The Journal of Biological Chemistry, p. 272(30): 18515–18517.
- Galli, A., Villosi, R., Floorio, R., Della Croce, C., Del Carratore, R., Morichetti, E., Giromini, L., Rosellini, D., Bronzetti, G., 1991. **Genotoxicity of vanadium compounds in yeast and cultured mammalian cells**, Teratog. Carcinog. Mutagen. 11: 75–183.
- Gerhardt, R.E., Hudson, J.B., Rao, R.N., Sobel, R.E., 1978. **Chronic renal insufficiency from cortical necrosis induced by arsenic poisoning.** Arch. Intern. Med., 138: 1267-1269.

- Germolec, D.R., Yoshida, T., Gaido, K., Wilmer, J.L., Simeonova, P.P., Kayama, F., Burleson, F., Dong, W., Lange, R.W. and Luster, M.I., 1996. **Arsenic induces overexpression of growth factors in human keratinocytes**, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 141: 308–318.
- Giberson, A., Vaziri, N.D., Mirahamadi, K., Rosen, S.M., 1976. **Hemodialysis of acute arsenic intoxication with transient renal failure**. *Arch. Intern. Med.*, 136:1303-1304.
- Giles, N.M., Giles, G.I., Holley, J.E., Gutowski, N.J. and Jacob, C., 2003. **Targeting oxidative stress-related diseases: Organochalcogen catalysts as redox sensitizers**. *Biochemical Pharmacology*, p. 66:2021-2028.
- Gille, G., Sigler, K., 1995. **Oxidative stress and living cells**. *Folia Microbiol.*, 40(2): 131-152.
- Giovannucci, E., 1999. **Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: review of the epidemiologic literature**. *J Natl cancer inst.*, 91: 317-331.
- Giron, Y.E., Rise, M., Levy, J., 1997. **Effect of lycopene enriched tomato oleoresin on 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene-induced rat mammary tumors**. *Cancer detect prevent.*, 21: 118-123.
- Ginsburg, J.M., Lotspeich, W.D., 1963. **Interrelations of arsenate and phosphate transport in the dog kidney**. *Am. J. Physiol.*, 205: 707-714.
- Glazener, F.S., Ellis, J.G., Johnson, P.K., 1968. **Electro cardiographie findings with arsenic poisoning**. *Calif. Med.*, 109: 158-162.
- Goldfine, A.B., Simonson, D.C., Folli, F., Patti, M.E. and Kahn, C.R., 1995. **In vivo and in vitro studies of vanadate in human and rodent diabetes mellitus**, *Mol Cell Biochem.* 153: 217–231.
- Goldfine, A.B., Simonson, D.C., Folli, F., Patti, M.E. and Kahn C.R., 1995. **Metabolic effects of sodium metavanadate in humans with insulin-dependent and noninsulin-dependent diabetes mellitus in vivo and in vitro studies**, *J Clin Endocrinol Metab.* . 80: 3311–3320.
- Goebel, H.H., Schmidt, P.F., Bohl, J., Tettenborn, B., Kramer, G., Guttman, L., Neuropathol, J., 1990. **Polyneuropathy due to acute arsenic intoxication: biopsy studies**. *J. Neuropathol Exp. Neurol*, 49: 137-149.
- Gonsebatt, M.E., Vega, L., Montero, R., Garcia-Vargas, G., Del Razo, L.M., Albores, A. and Cebrian, M.E., 1994. **Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water**. *Mutat. Res.*, 313: 293-299.
- Goyer, R.A., 1991. **Toxic effect of metals**, in: M.O. Amdur, J. Doull, C.D. Klaassen (Eds.), *Toxicology*, Pergamon., Press, New York, pp. 629–633.
- Gözükara, E. M., 2001. *Biyokimya. İ.Ü. Yayınları*, Malatya.
- Grandjean, P., Weihe, P., Needham, L.L., Burse, V.W., Patterson, D.G., Sampson, E.J., Jorgensen, P.J., Vahter, M., 1995. **Relation of a seafood diet to mercury, selenium, arsenic, and polychlorinated biphenyl and other organochlorine concentrations in human milk**. *Environ. Res.*, 71: 29-38.
- Grantham, D.A., Jones, J.F., 1977. **Arsenic contamination of water wells in Nova Scotia**. *J. Am. Water Works Assoc.*, 69: 653-657.
- Green A., 1986. **The insulin-like effect of sodium vanadate on adipocyte glucose transport is mediated at a post-insulin-receptor level**. *Biochem J.*, 238(3): 663-669.

- Gregory, H., Susana, L., John, K., Jason, M., Paul, P., Brian, K., George, T., Michael, J., Gresser, S., Chidambaram, R., 1997. **Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate.** Journal of Biological Chemistry, 272(2): 843-851.
- Griffith, O. W., 1999. **Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis.** Free Radical Biology and Medicine, 27:922-935.
- Guha Mazumder, D.N., Das Gupta, J., Santra, A., Pal, A., Ghose, A., Sarkar, S., Chattapadhaya, N., Chakraborti, D., 1997. **Non-cancer effects of chronic arsenicosis with special reference to liver damage.** in: C.O. Abernathy, R.L. Calderon, W.R. Chappell (Eds.), Arsenic-Exposure and Health Effects, Chapman and Hall, London, p. 112.
- Guha Mazumder, D.N., 2001. **Arsenic and liver disease.** J. Indian Med. Assoc., 99: 311-320.
- Guha Mazumder, D.N., 2001. **Clinical aspects of chronic arsenic toxicity.** J. Assoc. Phys. India, 49: 650-655.
- Guo, H., Cai, C.Q., Schroeder, R.A., Kuo, P.C., 2001. **Osteopontin is a negative feedback regulator of nitric oxide synthesis in murine macrophages,** The Journal of Immunology, 166: 1079-1086.
- Halliwell, B., 1991. **Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease.** The American Journal of Medicine, 91(3): 14-22.
- Halliwell, B., 1999. **Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning).** Free radical research, 31(4): 261-272.
- Helleday, T., Nilsson, R., Jenssen, D., 2000. **Arsenic and heavy metal ions induce intrachromosomal homologous recombination in the hprt gene V79 Chinese hamster cells.** Environ. Mol. Mutagen., 35: 114-122.
- Heyliger C.E., 1985. **Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardia performance of diabetic rats.** Science, 237:1474-1477.
- Hindmarsh, J.T., McCurdy, R.F., 1986. **Clinical and environmental aspects of arsenic toxicity.** Crit. Rev. Clin. Lab.Sci., 23: 315-347.
- Hoffman, G.R., 1991. **Genetic toxicology,** in: M.O. Amdur, J. Doull, C.D. Klaassen (Eds.), Toxicology, Pergamon Press, 201-225 . New York.
- Hopenhayn-Rich, C., Biggs, M.L., Fuchs, A., Bergoglio, R., Tello, E.E., Nicolli, H., Smith, A., 1996. **Bladder cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Argentina.** Epidemiology, 7: 117-124.
- Hopenhayn-Rich, C., Biggs, M.L., Smith, A.H., 1998. **Lung and kidney cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Córdoba, Argentina.** Int. J. Epidemiol., 27: 561-569.
- Hsu, C.H., Yang, S.A., Wang, J.Y., Yu, H.S., Lin, S.R., 1999. **Mutational spectrum of p53 gene in arsenic-related skin cancers from the blackfoot disease endemic area of Taiwan.** Br. J. Cancer, 80: 1080-1086.
- Hu, C.W., Pan, C.H., Huang, Y.L., Wu, M.T., Chang, L.W., Wang, C.J., Chao, M.R., 2006. **Effects of arsenic exposure among semiconductor workers: a cautionary note on urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine.** Free Radic., Biol. Med., 40: 1273-1278.
- Hughes, M.F., 2002. **Arsenic toxicity and potential mechanisms of action,** Toxicology Letters, 133(1): 1-16.

- Hulley, P.A., Conradie, M.M., Langeveldt, C.R., Hough, F.S., 2002. **Glucocorticoid-induced osteoporosis in the rat is prevented by the tyrosine phosphatase inhibitor, sodium orthovanadate**. *Bone*, 31: 220–229.
- Hung, D.Q., Nekrassova, O., Compton, R.G. 2004. **Analytical methods for inorganic arsenic in water: a review**. *Talanta*. 64: 269-277.
- Hutchinson, J., 1887. **Arsenical cancer**. *Br. Med. J.*, 2: 1280-1281.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 2006. Monograph 4, Section 86, Vanadium, in press.
- Ishinishi, N., Tsuchiya, K., Vahter, M., Fowler, B.A., 1986. **Arsenic**. In **handbook on the toxicology of metals**. 2nd ed. (L. Friberg, G. F. Nordberg, and V. Vouk, Eds.), Elsevier Science, 43–83, New York.
- Ito, K.I., Weigl, K.E., Deeley, R.G., Cole, S.P.C., 2003. **Mutation Of Proline Residues In The NH2-Terminal Region Of The Multidrug Resistance Protein, MRP1 (ABCC1):121 Effects On Protein Expression, Membrane Localization, And Transport Function**. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)/Biomembranes*, 1615(1-2): 103-114.
- Ivanecsis, S., Pilger, A., Diem, E., Schaffer, A., Ruediger, H.W., 2002. **Vanadate induces DNA strand breaks in cultured human fibroblasts at doses relevant to occupational exposure**, *Mutat. Res.*, 519: 25–35.
- Johnstone, R.M., 1963. **Sulfhydryl agents: arsenicals**, in: R.M. Hochster, J.H. Quastel (Eds.), *Metabolic Inhibitors: A Comprehensive Treatise*, vol. 2, Academic Press, New York, pp. 99–118.
- Jacobson-Kram, D., Montalbano, D., 1985. **The reproductive effects assessment group's report on the mutagenicity of inorganic arsenic**. *Environ. Mutagen.*, 7: 787-804.
- Jones FT. 2007. **A broad view of arsenic**. *Poultry Sci.*, 86: 2–14.
- Justin, K., Macara, I. G., 1982. *Comments Inorg. Chem.*, v.1,1.
- Kass, G.E., Orrenius, S., 1999. **Calcium signaling and cytotoxicity**. *Environ Health Perspect.*, 1:25-35.
- Kauvar, L. M, Morgan, A.S., Sanderson, P.E., 1998. **Glutathione based approaches to improving cancer treatment**. *Chemico – Biological Int.*, 111-112: 225-238.
- Kaneko, J.J., Harwey, J.W., Brust, M.L., 1980. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 3rd Ed., London, Academic Press, Inc. Ltd.
- Kersjes, M.P., Maurer, J.R., Trestrail, J.H., McCoy D.J., 1987. **An analysis of arsenic exposures referred to the blodgett regional poison center**. *Vet Hum Toxicol.*, 29: 75-78.
- Kim, J.H., Do, H.J., Wang, W.H., Machaty, Z., Han, Y.M., Day, B.N., Prather, R.S., 1999. **A protein tyrosine phosphatase inhibitor, sodium orthovanadate, causes parthenogenetic activation of pig oocytes via an increase in protein tyrosine kinase activity**. *Biol. Reprod.* 61: 900–905.
- Kim, Y.C., Araki, S., Kim, D.J., Park, C.B., Takasuka, N., Baba-Toriya, H., Ota, T., Nir, Z., Khachik, F., Shimidzu, N., Tanaka, Y., Osawa, T., Uraji, T., Mukorashi, M., Nishino, H., Tsuda, H., 1998. **Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on Mouse colon carcinogenesis after 1,2-dimethylhydrazine initiation**. *Carcinogenesis*, 19: 81-85.
- Kozuki, Y., Miura, Y., Yagasaki, K., 2000. **Inhibitory effects of carotenoids on the invasion of rat ascites hepatoma cells in culture**. *Cancer lett.*, 151(1): 111-5.

- Kucuk, O., Sarkar, F.H., Djuric, Z., Sakr, W., Pollak, M.N., Khachik, F., Banerjee, M., Bertram, J.S., Wood, D.P. Jr., 2002. **Effects of lycopene supplementation in patients with localized prostate cancer.** *Exp biol med.*, 227(10): 881-885.
- Kingston, R.L., Hall, S., Sioris, L., 1993. **Clinical observations and medical outcome in 149 cases of arsenate ant killer ingestion.** *Clin Toxicol*, 31: 581-91.
- Kitchin, K.T., 2001. **Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 172: 249–261.
- Kiviluoto, M. 1980. **Observations on the lungs of vanadium workers.** *Br J Ind Med.*, 37: 363-366.
- Kiviluoto, M., Pyy, L., Pakarinen, A., 1979. **Serum and urinary vanadium of vanadium-exposed workers.** *Scand J Work Environ Health*, 5: 362-367.
- Kiviluoto, M., Pyy, L., Pakarinen, A., 1981. **Serum and urinary vanadium of workers processing vanadium pentoxide.** *Int Arch Occup Environ Health* 48:251-256.
- Knecht, E. A., Moorman, W. J., Clark, J. C., Lynch, D. W., Lewis, T. R., 1985. **Pulmonary effects of acute vanadium pentoxide inhalation in monkeys.** *Am. Rev. Respir. Dis.*, 132: 1181-1185.
- Knowles, F.C., Benson, A.A., 1983. **The biochemistry of arsenic.** *Trends Biochem Sci.*, 8: 178–180.
- Kojo, S., 2004. **Vitamin C, basic metabolism and its function as an index of oxidative stres.** *Curr med chem*, 11, 1041-1064.
- Kreppel, H., Liu, J., Liu, Y., Reichl, F.X., Klaassen, C.D., 1994. **Zinc-induced arsenite tolerance in mice.** *Fundam. Appl. Toxicol.*, 23: 32-37.
- Kulanthaiivel, P., Simon, B.J. and Leibach, F.H., 1990. **An essential role for vicinal dithiol groups in the catalytic activity of the human placental Na⁺-H⁺ exchanger.** *Biochim. Biophys. Acta.*, 1024: 385-389.
- Kustin, K., McLeod, G. C., Gilbert, T. R., Briggs, L. B. R., 1983. **Vanadium and other metal ions in the physiological ecology of marine organisms.** *Structure and Bonding* 53:139–160.
- Kodavanti, U.P., Hauser, R., Christiani, D.C., Meng, Z.H., McGee, J., Ledbetter, A., Richards, J., Costa, D.L., 1998. **Pulmonary responses to oil fly ash particles in the rat differ by virtue of their specific soluble metals,** *Toxicol. Sci.*, 43: 204–212.
- Kuroda, K., Yoshida, K., Yoshimura, M., Endo, Y., Wanibuchi, H., Fukushima, S., Endo, G. 2004. **Microbial metabolite of dimethylarsinic acid is highly toxic and genotoxic.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 198: 345–353.
- La Dou, J., 1983. **Potential occupational health Hazards in the microelectronics industry.** *Scand. J. Environ. Health.*, 9: 42-46.
- Labelle, E.F., Singh, S.V., Srivastava, S.K., Awasthi, Y.C., 1986. **Dinitrophenyl glutathione efflux from human erythrocytes is primary active ATP dependent transport.** *Biochem. J.*, 238: 443-449.
- Lage, C.R., Nayak, A., Kim, C.H., 2006. **Arsenic ecotoxicity and innate immunity.** *Integr. Comp. Biol.*, 46: 1040–1054.
- Lagerkvist, B.E.A., Linderholm, H., Nordberg, G.F., 1988. **Arsenic and Raynaud's phenomenon.** *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 60: 361-364.

- Lai, M.S., Hsueh, Y.M., Chen, C.J., Shyu, M.P., Chen, S.Y., Kuo, T.L., Wu, M.M., Tai, T.Y., 1994. **Ingested inorganic arsenic and prevalence of diabetes mellitus.** *Am. J. Epidemiol.*, 139:484-492.
- Lantz, C.R., Hays, A.M., 2006. **Role of oxidative stress in arsenic.** *Induced Toxicity Drug Metabolism Reviews*, 38(4): 791-804.
- Le, X.C., Cullen, W.R., Reimer, K.J., 1994. **Speciation of arsenic compounds in some marine organisms.** *Environ. Sci. Technol.*, 28: 1598-1604.
- Le, X.C., Cullen, W.R., Reimer, K.J., 1994. **Human urinary arsenic excretion after one-time ingestion of seaweed, crab, and shrimp.** *Clin. Chem.*, 40: 617-624.
- Le, X.C., Ma, M., Cullen, W.R., Aposhian, H.V., Lu, X., Zheng, B., 2000. **Determination of monomethylarsonous acid, a key arsenic methylation intermediate, in human urine.** *Environ. Health Perspect.*, 108: 1015-1018.
- Le, X.C., Lu, X., Ma, M., Cullen, W.R., Aposhian, H.V., Zheng, B., 2000. **Speciation of key arsenic metabolic intermediates in human urine.** *Anal. Chem.*, 72: 5172-5177.
- Lee, K. P., Gillies, P. J., 1986. **Pulmonary response and intrapulmonary lipids in rats exposed to bismuth orthovanadate dust by inhalation.** *Environ. Res.*, 40: 115-135.
- Lee-Feldstein, A., 1986. **Cumulative exposure to arsenic and its relationship to respiratory cancer among copper smelter employees.** *J. Occup. Med.*, 28: 296-302.
- Leier, I., Jedlitschky, G., Buchholz, U., Center, M., Cole, S.P., Deeley, R.G., Keppler, D., 1996. **ATP-dependent Glutathione Disulphide Transport Mediated By The MRP gene-encoded conjugate export pump.** *Biochem J.*, 314(2): 433-437.
- Leonard, A., Lauwerys, R.R., 1980. **Carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity of arsenic.** *Mutat. Res.*, 75: 49-62.
- Leonard, A., Gerber, G.B., 1994. **Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds.** *Mutat. Res.* 317: 81-88.
- Lerman, B.B., Ali, N., Green, D., 1980. **Megaloblastic dyserythropoietic anemia following arsenic ingestion.** *Anal. Clin. Lab. Sci.*, 10: 515-517.
- Levy, B.S., Hoffman, L., Gottsegan, S., 1984. **Boilermakers' bronchitis.** *J Occup Med.*, 26: 567-570.
- Lewis, C.E., 1959. **The biological effects of vanadium. II. The signs and symptoms of occupational vanadium exposure.** *AMA Arch Ind Health* 19:497-503.
- Lewis, D.R., Southwick, J.W., Scanlan, L.P., Rench, R.L., Calderon, J., 1998. **The feasibility of epidemiologic studies of waterborne arsenic. A mortality study in Millard County, Utah.** *J. Environ. Health*, 60: 14-19.
- Lewis, D.R., Calderon, R., Southwick, J.W., Ouellet-Helstrom, R., Rench, J., 1999. **Drinking water arsenic in Utah: A cohort mortality study.** *Environ. Health Perspect.*, 107: 359-365.
- Lin, S., Cullen, W.R., Thomas, D.J., 1999. **Methylarsenicals and arsinothiols are potent inhibitors of mouse liver thioredoxin reductase.** *Chem. Res. Toxicol.*, 12: 924-930.
- Lugo, G., Cassady, G., Palmisano, P., 1969. **Acute maternal arsenic intoxication with neonatal death.** *Ann. J. Dis. Child* 117:328-330.
- Ma, M., Le, S.C., 1998. **Effect of arsenosugar ingestion on urinary arsenic speciation.** *Clin. Chem.*, 44: 539-550.

- Maeda, S., 1994. **Biotransformation of arsenic in the freshwater environment**, in: **J.O. Nriagu (Ed.), Arsenic in the Environment Part I, Cycling and Characterization**, John Wiley and Sons, New York, 155–188.
- Maeda, H., Akaike, T., 1998. **Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation and cancer**. *Biochemistry*, 63(7): 854-865.
- Magalhaes, M.C.F., 2002. **Arsenic. An environmental problem limited by solubility**, *Pure Appl. Chem.* 74: 1843–1850.
- Mandal, B.K., Ogra, Y., Suzuki, K.T., 2001. **Identification of dimethylarsinous and monomethylarsonous acids in human urine of the arsenic-affected areas in West Bengal, India**. *Chem. Res. Toxicol.*, 14: 371-378.
- Mandal, B.K. and Suzuki, K.T., 2002. **Arsenic round the world: a review**. *Talanta*, 58: 201–235.
- Manna, P., Sinha, M., Sil, P.C., 2008. **Arsenic-induced oxidative myocardial injury: protective role of arjunolic acid**. *Arch. Toxicol.*, 82: 137–149.
- Marafante, E., Bertolero, F., Edel, J., Pietra, R., Sabbioni, E., 1982. **Intracellular interaction and biotransformation of arsenite in rats and rabbits**. *Sci. Total Environ.*, 24:27-39.
- Martena, M.J., Van Der Wielen, J.C., Rietjens, I.M., Klerx, W.N., De Groot, H.N., Konings E.J., 2010. **Monitoring of mercury, arsenic, and lead in traditional Asian herbal preparations on the Dutch market and estimation of associated risks**. *Food addit., Contam, Part A Chem, Ana, control expos, risk assess*, 27: 190–205.
- Marafante, E., Vahter, M., Envall, J., 1985. **The role of the methylation in the detoxication of arsenate in the rabbit**. *J. Chem. Biol. Interact.*, 56: 225-238.
- Marafante, E., Vahter, M., Norin, H., Envall, J., Sandstrom, M., Christakopoulos, A., Ryhage, R., 1987. **Biotransformation of dimethylarsinic acid in mouse, hamster and man**. *J. Appl. Toxicol.*, 7: 111-117.
- Mass, M.J., Tennant, A., Roop, B.C., Cullen, W.R., Styblo, M., Thomas, D.J., Kligerman, A.D., 2001. **Methylated trivalent arsenic species are genotoxic**. *Chem. Res. Toxicol.*, 14: 355-361.
- McCabe, M., Nowak, M., Maguire, D., 1983. **The effects of arsenic compounds on human and bovine lymphocyte mitogenesis**. *Environ. Res.*, 31 : 323-331.
- McCarty, K.M., Chen, Y.C., Quamnuzzaman, Q., Rahman, M., Mahiuddin, G., Hsueh, Y.M., Su, L., Smith, T., Ryan, L., Christiani, D.C., 2007. **Arsenic methylation, GSTT1, GSTM1, GSTP1 polymorphisms and skin lesions**, *Environ, Health Perspect.* 115: 341–345.
- Meyerovitch, J., Farfel, Z., Sacky, Y., Shechter, Y., 1987. **Oral administration of vandaate normalized blood glucose levels in streptozotocin-treated rats: characterization and mode of action**. *J Biol Chem.*, 262: 6658–6662.
- Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C., LoJacono, F., 1993. **Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe**. *Mutat. Res.*, 319: 205–213.
- Miller, S.A., Hambley, T.V, Taylor, J.C., 1984. **Crystal and molecular structure of a natural vanadyl porphyrin**. *Aust. J. Chem.*, 37: 761-766.
- Milton, A.H., Hasan, Z., Rahman, A., Rahman, M., 2001. **Chronic arsenic poisoning and respiratory effects in Bangladesh**. *J. Occup. Health*, 43 : 136-140.

- Miller, W.H. , Schipper, H.M., Lee, J.S, Singer, J., Waxman, S., 2002. **Mechanisms of action of arsenic trioxide**. *Cancer Res.*, 62: 3893–3903.
- Moore, M.M., Harrington-Brock, K., Doerr, C.L., 1997. **Relative genotoxic potency of arsenic and its methylated metabolites**. *Mutat. Res.*, 386: 279-290.
- Morales, K.H., Ryan, L., Kuo, T.L., Wu, M.M., Chen, C.J., 2000. **Environ. Risk of internal cancers from arsenic in drinking water**. *Health Perspect.*, 108:655-661.
- Morgan, A.M., El-Tewil and S.O., 2003. **Effects of ammonium metavanadate on fertility and reproductive performance of adult male and female rats**, *Pharmacol. Res.* 47:75–85.
- Morton, W.E., Coron, G.A., 1989. **Encephalopathy: an uncommon manifestation of workplace arsenic poisoning?** *Am. J. Ind. Med.*, 15(1): 1-5.
- Morton, W.E., Dunnette, W.E., 1994. **Arsenic in the Environment. Part 11: Human Health and Ecosystem Effects**, in: J.O. Nriagu (Ed.), John Wiley and Sons, New York, pp. 17–34.
- Murray, R., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., 2003. **Harper's Biochemistry**. McGraw-Hill Companies., New York.
- Musk, A.W., Tees, J.G., 1982. **Asthma caused by occupational exposure to vanadium compounds**. *Med J Aust.*, 1: 183-184.
- Nagvi, S.M., Vaishnavi, C., Singh, H., 1994. **Toxicity and metabolism of arsenic in vertebrates**, in: J.O. Nriagu(Ed.), **Arsenic in the Environment. Part II: Human Health and Ecosystem Effects**. John Wiley and Sons, New York, pp. 55–91.
- Naughton, D.P., Grootveld, M., Blake, D.R., Guestrin, H.R., Narajanaswamy, R., 1993. **An optical hydroxyl radical sensor**. *Biosens. Bioelectron.*, 8: 325–329.
- Navas-Acien, A., Sharrett, A.R., Silbergeld, E.K., Schwartz, B.S., Nachman, K.E., Burke, T.A. and Guallar, E., 2005. **Arsenic exposure and cardiovascular disease: a systematic review of the epidemiologic evidence**. *Am. J. Epidemiol.* 162: 1037–1049.
- Nemeti, B., Gregus, Z., 2004. **Glutathione-dependent reduction of arsenate in human erythrocytes a process independent of purine nucleoside phosphorylase**. *Toxicological Sciences*, 82(2): 419-428.
- Nepusz, T., Petroczi, A. and Naughton, D.P., 2009. **Food alert patterns for metal contamination analyses in seafoods: longitudinal and geographical perspectives**, *Environ. Int.* 35: 1030–1033.
- Ninfali, P., et al, 1993. **Vanadate effects glucose metabolism of human erythrocytes**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 226, 441-7.
- Nordberg, G.F., Anderson, O., 1981. **Metal interactions in carcinogenesis: enhancement, inhibition**. *Environ. Health Perspect.*, 40: 65-81.
- Nordenson, I., Beckman, L., 1991. **Is the genotoxic effect of arsenic mediated by oxygen free radicals**. *Human Heredity*, 41: 71–73.
- Nordstrom, S., Beckman, L., Nordenson, I., 1978. **Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. I. Variations in birth weight**. *Hereditas*, 88: 43-46.
- Nordstrom, S., Beckman, L. and Nordenson, I., 1979. **Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. VI. Congenital malformations**. *Hereditas*, 90: 297-302.

- Nordenson, I., Beckman, L., 1991. **Is the genotoxic effects of arsenic mediated by oxygen free radicals?** Hum. Hered., 41: 71-73.
- Nordenson, I., Beckman, G., Beckman, L., Nordström, S., 1978. **Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden: II. Chromosomal aberrations in workers exposed to arsenic**, Hereditas 88: 47-50.
- Nordenson, I., Salmonsson, S., Brun, E. and Beckman, G., 1979. **Chromosome aberrations in psoriatic patients treated with arsenic**, Hum. Genet. 48: 1-6.
- National Research Council's (NRC), 1999. **Arsenic in Drinking Water**. National Academy Press, Washington DC.
- Nriagu, J.O. and Pacyna, J.M., 2000. **Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water, and soils by trace metals**. Nature, 333: 134-139.
- Ochi, T., 2002. **Role of mitotic motors, dynein and kinesin, in the induction of abnormal centrosome integrity and multipolar spindles in cultured V79 cells exposed to dimethylarsinic acid**. Mutat.Res., 499: 73-84.
- Ohutsuka, Y., Kondot, T., Kawakami, Y., 1988. **Oxidative stresses induced the cystine transport activity in human erythrocytes**. Biochemical and biophysical research communications, 155: 160-166.
- Okada, Y., Yoshida, M., Baba, S., Shii, K., 1998. **Development of vanadate sensitive human erythrocytes insulin receptor tyrosine phosphatase assay**, Diabetes Res Clin Pract., 41(3): 157-63
- Okada, S., Yamanaka, K., 1994. **Induction of lung-specific DNA damage by methylarsenics via the production of free radicals**. In **Arsenic in the Environment**. Nriagu J (ed.). John Wiley and Sons, New York.
- Okajima, E., Tsutsumi, M., Ozono, S., Akai, H., Denda, A., Nishino, H., 1998. **Inhibitory effect of tomato juice on rat urinary bladder carcinogenesis after N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosinamine initiation**. Jpn J cancer res., 89: 22-26.
- Okui, T., Fujiwara, Y., 1986. **Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the co-mutagenic effect in V79 Chinese hamster cells**. Mutat. Res., 172: 69-76.
- Olive, C., Board, P., 1994. **Glutathione S-conjugate transport by cultured human cells**, Biochim. et Biophys. Acta, 1224: 264-268.
- Onat T, Emerk K, Sözmen EY (eds). 2002. **İnsan. Biyokimyası**. Palme Yayıncılık, 547-86, Ankara,.
- Opara, E.C., Abdel-Rahman, E., Soliman, S., Kamel, W.A., Souka, S., Lowe, J.E., 1999. **Depletion of total antioksidan status capacity in type II Diabetes**. Metabolism, 48(11), 1414-1417.
- Orloff, K., Mistry, K., Metcalf, S., 2009. **Biomonitoring for environmental exposures to arsenic**. J Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev. 12: 509-524.
- Orris, P., Cone, J., McQuilkin, S., 1983. **Health hazard evaluation report HETA 80-096-1359, Eureka Company, Bloomington, Illinois**. Cincinnati, OH: U.S. Department of Health and Human Services. National Institute for Occupational Safety and Health; report no. 80-096. Available from: NTIS, Springfield, VA; PB 85-163574.
- Orvig, C., Thompson, K.H., Battle, M., McNeill, J.H., 1995. **Vanadium compounds as insulin mimics**. Met. Ions Biol. Syst., 31: 575-594.

- Owuso-Yaw, J., Cohen, M.D., Fernando, S.Y., Wei, C.I., 1990. **An assessment of the genotoxicity of vanadium.** *Toxicol. Lett.*, 50: 327–336.
- Parke, D.V., 1999. **Nutritional antioxidants and disease prevention; mechanism of action.** In: **antioxidants in human health and disease.** CABI Publishing, UK.
- Pastori, M., Pfander, H., Boscoboinik, D., Azzi, A., 1998. **Lycopene in association with a-tocopherol inhibits at physiological concentrations poliferation of prostate carcinoma cells.** *Biochem biophys res commun*, 250: 582-585.
- Patockova, J., Marhol, P., Tüмова, E., Krsiak, M., Rokyta, R., Stipek, S., Crkovska, J., Andel, M., 2003. **Oxidative stress in the brain tissue of laboratory mice with acute post insulin hypoglycemia,** *Physiological Research*, 52: 131-135.
- Partridge R., Tolman, E.L., Barris, E., Burns, M., Pansini, A., 1979. **Effects of vanadium on glucose metabolism in vitro,** *Life sci.*, 25: 1159-1164.
- Pauwels Borst, G.W.F., Peter, J.K., Jager, S., Wijffels, C.C.B., 1965. **A study of the arsenate uptake by yeast cells compared with phosphate uptake.** *Biochim. Biophys. Acta*, 94: 312-314.
- Petrack, J.S., Ayala-Fierro, F., Cullen, W.R., Carter, D.E., Aposhian, H.V., 2000. **Monomethylarsonous acid (MMA(III)) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 163: 203-207.
- Petroczi, A., Naughton, D.P., 2009. **Mercury, cadmium and lead contamination in seafood: a comparative study to evaluate the usefulness of target hazard quotients.** *Food Chem. Toxicol.*, 47: 298–302.
- Poma, K., Degraeve, N., Susanne, C., 1987. **Cytogenetic effects in mice after chronic exposure to arsenic followed by a single dose of ethylmethane sulfonate.** *Cytologia*, 52: 445–449.
- Prasad, K., Karla, J., Chan, P., Chaudhary, A.K., 1989. **Effect of Oxygen Free Radicals on Cardiovascular Function at Organ and Cellular Levels.** *American Heart Journal*, 117: 1196-1202.
- Rahman, M., Wingren, G., Axelson, O., 1996. **Diabetes mellitus among Swedish art glass workers- an effect of arsenic exposure?** *Scand. J. Work Environ. Health*, 22: 146-149.
- Rahman, M., Tondel, M., Ahmad, S.A., Axelson, O., 1998. **DiabetAAs mellitus associated with arsenic exposure in Bangladesh.** *Am. J. Epidemiol.*, 148: 198-203.
- Rahman, M., Tondel, M., Ahmad, S.A., Chowdhury, I.A., Faruquee, M.H., Axelson, O. 1999. **Hypertension and arsenic exposure in Bangladesh.** *Hypertension* 33: 74-78.
- Rahman, M., Tondel, M., Chowdhury, I.A., Axelson, O., 1999. **Relations between exposure to arsenic, skin lesions, and glucosuria.** *Occup. Environ. Med.*, 56: 277-281.
- Raie, R.M., 1996. **Regional variation in As, Cu, Hg, and Se and interaction between them.** *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 35: 248-252.
- Ramos, O., Carrizales, L., Yanez, L., Mejia, J., Batres, L., Ortiz, D., Diaz-Barriga, F., 1995. **Arsenic increased lipid peroxidation in rat tissues by a mechanism independent of glutathione levels.** *Environ. Health Perspect.* 103 (1): 85-88.
- Rojas, E., Valverde, M., Herrera, L.A., Altamirano-Lozano, M. and Ostosky-Wegman, P., 1996. **Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluated by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes.** *Mutat. Res.*, 359: 77–84.

- Sabbioni, E., Pozzi, G., Pintar, A., Cassella, L. and Garattini, S., 1991. **Cellular retention cytotoxicity and morphological transformation by vanadium(IV) and vanadium(V) in BALB/3T3 cell lines.** *Carcinogenesis*, 12: 47–52.
- Saha, K.C., Saha, J.C., Dikshit, A.K., Bandyapadhyay, M., 1999. **A Review of Arsenic Poisoning and its Effects on Human Health.** *Environ. Sci. Technol.*, 29: 281–313
- Saha, K.C., 2001. **Seventeen years experiences in arsenicosis in West Bengal, India,** in: Chappell, W.R., Abernathy, C.O., Calderon R.L. (Eds.), **Arsenic Exposure and Health Effects.** Elsevier Science, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Tokyo, pp. 387–396.
- Sainio, E.L., Jolanki, R., Hakala, E., Kanerva, L., 2000. **Metals and arsenic in eye shadows.** *Contact Dermat.*, 42: 5–10.
- Sakurai, H., 1994. **Vanadium distribution in rats and DNA cleavage by vanadyl complexes: implication for vanadium toxicity and biological effects.** *Environ. Health Perspect.*, 102: 35–36.
- Salim, E.I., Wanibuchi, H., Morimura, K., Wei, M., Mitsushashi, M., Yoshida, K., Endo, G., Fukushima, S., 2003. **Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in p53 heterozygous knockout and wild-type C57BL/6J mice.** *Carcinogenesis*, 24: 335–342.
- Santra, A., Das Gupta, J., De, B.K., Roy, B., Guha Mazumder, D.N., 1999. **Hepatic manifestations in chronic arsenic toxicity.** *Indian J. Gastroenterol.*, 18: 152–155
- Santra, A., Maiti, A., Das, S., Lahiri, S., Charkaborty, S.K., Guha Mazumder, D.N., 2000. **Hepatic damage caused by chronic arsenic toxicity in experimental animals.** *Clin. Toxicol.*, 38: 395–405. SCF (Scientific Committee on Food), 1993. **Reports of the Scientific Committee on Food**, Nutrient and energy intakes for the European Community, Thirty First Series, EC, Luxembourg.
- SCF (Scientific Committee on Food), 1993. **Nutrient and energy intakes for the European Community, Reports of the Scientific Committee on Food**, Thirty First Series, EC, Luxembourg.
- Schiff, L.J., Graham, J.A., 1984. **Cytotoxic effect of vanadium and oil-fired fly ash on hamster tracheal epithelium.** *Environ. Res.*, 34: 390–402.
- Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1963. **Determination of sulfhydryl groups in biological samples.** *Analytical Biochem.*, 25: 192–205.
- Shannon, R.L., Strayer, D.S., 1989. **Arsenic-induced skin toxicity.** *Hum. Toxicol.*, 8: 99–104.
- Sheabar, F.Z. and Yanni, S., 1989. **In vitro effects of cadmium and arsenite on glutathione peroxidase, aspartate and alanine aminotransferases, cholinesterase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in blood.** *Vet. Hum. Toxicol.*, 31: 528–531.
- Shechter, Y., Karlisch, S.J.D., 1980. **Insulin-like stimulation of glucose oxidation in rat adipocytes by vanadyl (IV) ions.** *Nature*, 284: 556–558.
- Shechter Y., 1999. **Insulin-mimetic effects of vanadate. Possible implications for future treatment of diabetes.** *Diabetes*, 39: 1–5
- Shi, X., Jiang, H., Mao, Y., Ye, J., Saffiotti, U., 1996. **Vanadium(IV) mediated free radical generation and related 2'-deoxyguanosine hydroxylation and DNA damage.** *Toxicology*, 106: 27–38.

- Shi, H., Hudson, L.G., Ding, W., Wang, S., Cooper, K.L., Liu, S., Chen, Y., Shi, X., Liu, K.J., 2004. **Arsenite causes DNA damage in keratinocytes via generation of hydroxyl radicals**. *Chem. Res. Toxicol.*, 17(7): 871-878.
- Shi, H., Shi, X., Liu, K.J., 2004. **Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis**. *Mol. Cell. Biochem.*, 255: 67-78.
- Shimomura-Shimizu, M., Sugiyama, K., Muroi, M. and Tanamoto, K., 2005. **Alachlor and carbaryl suppress lipopolysaccharide-induced iNOS expression by differentially inhibiting NF- κ B activation**. *Biochemical and biophysical research communications*, 332(3): 793-799.
- Shiobara, Y., Ogra, Y., Suzuki, K.T., 2001. **Animal species differences in the uptake of dimethylarsinous acid (DMAIII) by rat blood cells**. *Chem. Res. Toxicol.*, 14: 1446-1452.
- Sies, H., 1997. **Oxidative stress: oxidants and antioxidants**. *Experimental Physiology*, 82(2): 291-295.
- Sies, H., 1999. **Glutathione and its role in cellular functions**. *Free radical biology and medicine*, 27: 916-921.
- Sözmen, E.Y., 2002. **Yaşlanma biyokimyası. Onat T, Emerk K, Sözmen EY (Eds) İnsan Biyokimyası**. Palme yayıncılık, Ankara, 665-674.
- Sjöberg, S.G., 1956. **Vanadium dust, chronic bronchitis and possible risk of mphysema**. *Acta Med Scand*, 154: 381-386.
- Smedley, P.L., Kinniburgh, D.G., 2002. **A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters**. *Appl. Geochem.*, 17: 517-568.
- Smith, A.H., Arroyo, A.P., Guha Mazumder, D.N., Kosnett, M.J., 2000. **Arsenic induced skin lesions among Atacamenno people in northern Chile Despite Good Nutrition and centuries of exposure**. *Environ. Health Perspect.*, 108: 617-620.
- Southwick, J.W., Western, A.E., Beck, M.M., 1981. **Community health associated with arsenic in drinking water in Millard Country, Utah**. Cincinnati, OH. Health Effects Laboratory, EPA-600/1-81-064, NTIS No. PB82-108374, USEPA
- Squibb, K.S., Fowler, B.A., 1983. **The toxicity of arsenic and its compounds, in: Fowler (Ed.) B.A., Biological and Environmental Effects of Arsenic**, Elsevier, New York, pp. 233-269.
- Srivastava, K.S., Beutler, E., 1970. **Glutathione metabolism of the erythrocyte**, *Biochem. J.*, 119: 353-357.
- Stahl, W., Sies, H., 2005. **Bioactivity and protective effects of natural carotenoids**. *BBA molecular basis of disease*, 1740(2): 101-107.
- Stankiewicz, P.J., Tracey, A.S., 1995. **Stimulation of enzyme activity by oxovanadium complexes, in: Sigel, H., Sigel, A. (Eds.), Metal Ions in Biological System, Vanadium and its Role in Life**. Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong, 31: 249-285.
- Stemmler, A.J. and Burrows, C.J., 2001. **Guanine versus deoxyribose damage in DNA oxidation mediated by vanadium(IV) and vanadium(V) complexes**. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 6: 100-106.
- Stevens, J.T., Hall, L.L., Farmer, J.D., DiPasquale, L.C., Chernoff, N. Durham, W.F., 1977. **Disposition of 14C or 74As-cacodylic acid in rats after intravenous, intratracheal, or peroral administration**. *Environ. Health Perspect.*, 19: 151-157.

- Strout, H.V., 1989. **The insulin-mimetic effect of vanadate is not correlated with insulin receptor tyrosine kinase activity nor phosphorylation in mouse diaphragm.** *Endocrinology*, 124: 1918-24.
- Stybło, M., Serves, S.V., Cullen, W.R., Thomas, D.J., 1997. **Comparative inhibition of yeast glutathione reductase by arsenicals and arsenothiols.** *Chem. Res. Toxicol.*, 10:27-33.
- Stybło, M., Del Razo, L.M., Vega, L., Germolec, D.R., LeCluyse, E.L., Hamilton, G.A., Reed, W., Wang, C., Cullen, W.R., Thomas, D.J., 2000. **Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells.** *Arch. Toxicol.* 74: 289-299.
- Sunderman, F.W., 1978. **Carcinogenic effects of metals.** *Fed. Proc.*, 37: 40-46.
- Squibb, K. S., Fowler, B. A., 1983. **The toxicity of arsenic and its compounds.** In **B. A. Fowler (Ed.), Biological and Environmental Effects of Arsenic.** Elsevier, New York, pp 233-269.
- Swarup, G., Cohen, S., Garbers, D.L., 1982. **Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate.** *Biochem Biophys Res Commun.*, 107(3): 1104-1109.
- Taketani, S., Kohno, H., Yoshinaga, T., Tokunaga, R., 1989. **The human 32-kDa stress protein induced by exposure to arsenite and cadmium ions is heme oxygenase.** *FEBS letters*, 245(1-2): 173-176.
- Tam, G.K.H., Charbonneau, S.M., Bryce, F., Pomroy, C., Sandi, E., 1979. **Metabolism of inorganic arsenic (74As) in humans following oral ingestion.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 50: 319-322.
- Tam, G.K.H., Charbonneau, S.M., Brice, F., Sandi, E., 1982. **Excretion of a single oral dose of fish-arsenic in man.** *Bull Environ Contam Toxicol.*, 28 :669-673
- Tamura, S., Brown T.A., Whipple J.H., Fujita, Y., Dubler, R.E., Cheng, K., Larner, J., 1984. **A novel mechanism for the insulin-like effect of vanadate on glycogen synthase in rat adipocytes.** *J. Biol. Chem.*, 259(10): 6650-6658.
- Taş, S., Dirican, M., 2003. **Vanadyum ve Diyabet.** *Türkiye Klinikleri Tıp Dergisi*; 23(2): 162-165.
- Taysi, S., Polat, F., Gul, M., Sari, R.A., Bakan, E., 2002. **Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis.** *Rheumatology international*, 21(5): 200-204.
- Temple, M.D., Perrone, G.G., Dawes, I.W., 2005. **Complex cellular responses to reactive oxygen species.** *Trends in cell biology.*, 15(6): 319-326
- Thirunavukkarasu, O.S., Subramanian, K.S., Chaalal, O., Islam, M.R., (2005): **Arsenic removal in drinking water- Impacts and novel removal Technologies.** *Energy sources*, 27: 209-219.
- Thomas, D.L., Stiebris, K., 1956. **Vanadium poisoning in industry.** *Med J Aust.*, 1: 607-609.
- Tondel, M., Rahman, M., Magnuson, A., Chowdhury, I.A., Faruquee, M.H., Ahmad, S.A., 1999. **The relationship of arsenic levels in drinking water and the prevalence rate of skin lesions in Bangladesh.** *Environ. Health Perspect.*, 107: 727-729.
- Tracey, A.S., 2000. **Hydrooxamido vanadates, aqueous chemistry and function in protein tyrosine phosphatases and cell cultures.** *J. Inorg. Biochem.*, 80: 11-16.

- Tsai, S.M., Wang, T.N., Ko, Y.C., 1999. **Mortality for certain diseases in areas with high levels of arsenic in drinking water.** Arch. Environ. Health, 54: 186-193.
- Tseng, C.H., Chong, C.K., Heng, L.T., Tseng, C.P. and Tai, T.Y., 2000. **The incidence of type 2 diabetes mellitus in Taiwan.** Diabetes Res. Clin. Pract., 50 (Suppl. 2):61-64
- Toykuni, S., 1999. **Reactive oxygen species induced molecular damage and its implication in pathology.** Pathol Int, 49: 19-102.
- Uesaka, H.F., 2007. **Genetic Variations And Haplotype Structures Of The ABC Transporter Gene ABCC1 In A Japanese Population Drug Metab. Pharmacokinetic.** 22(1): 48-60.
- Ulakoğlu, E. Z., Gümüştaş, M. K., Belce, A., Altuğ, T., Kökoğlu, E., 1998. **Strese bağlı mide mukozası hasarında endojen glutatyon tüketiminin enerji metabolizması ile ilişkisi,** Cerrahpasa J.Med., 29(3): 127-131.
- Vahidnia, A., Van Der Voet, G.B., De Wolff, F.A., 2007. **Arsenic neurotoxicity – a review.** Hum. Exp. Toxicol., 26: 823-832.
- Vahter, M., Envall, J., 1983. **In vivo reduction of arsenate in mice and rabbits.** Environ. Res. 32: 14-24.
- Vahter, M., Marafante, E., Dencker, L., 1984. **Tissue distribution and retention of ⁷⁴As-dimethylarsinic acid in mice and rats.** Arch. Environ. Contam. Toxicol., 13: 259-264.
- Vahter, M., Marafante, E., 1985. **Reduction and binding of arsenate in marmoset monkeys.** Arch. Toxicol., 57: 119-124.
- Valentine, J.L., Reisbord, L.S., Kang, H.K. Schluchter, M.D., 1985. **Arsenic effects of population health histories, in: Mills, C.F., Bremner, I.M., Chesters, K.J. (Eds.), Trace elements in man and animals.** Commonwealth Agricultural Bureau, Slough, UK, pp. 289-294.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J., 2004. **Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence.** Mol Cell Biochem., 266(1-2): 37-56.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T., 2005. **Metals, toxicity and oxidative stres.** Curr. Med. Chem., 12: 1161-1208.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.** Chem. Biol. Interact., 160: 1-40.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** Int. J. Biochem. Cell Biol., 39: 44-84.
- Van Poppel, G., 1993. **Carotenoids and cancer: an update with emphasis on human intervention studies.** Eur J cancer, 29A: 1335-1344.
- Van Poppel, G., Gooldbohm, R.A., 1995. **Epidemiologic evidence for carotene and cancer prevention.** Am J clin nutr., 62, 1393-402.
- Varecka, L., Carafoli, E., 1982. **Vanadate- induced movements of Ca and K in human red blood cells,** J. Biol. Chem., 257: 7414-7421.
- Varecka, L., Peterajová, E., Sevcík, J. 1997. **Ca(2+)-activated K⁺ channel and the activation of Ca²⁺ influx in vanadate-treated red blood cells,** Gen Physiol Biophys., 16(4): 339-357.

- Vega, L., Styblo, M., Patterson, R., Cullen, W., Wang, C., Germolec, D., 2001. **Differential effects of trivalent and pentavalent arsenicals on cell proliferation and cytokine secretion in normal human epidermal keratinocytes.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 172(3): 225-232.
- Vincent, A.M., Russell, J.W., Low, P., Feldman, E.L., 2004. **Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy.** *Endocrine reviews*, 25(4): 612-628.
- Vintinner, F.J., Vallenias, R., Carlin, C. E., Weiss, R., Macher, C., Ochoa, R., 1955. **Study of the health of workers employed in mining and processing of vanadium ore.** *AMA Arch Ind Health*, 12: 635-642.
- Viraraghavan, T., Subramanian, K.S., Aruldoss, J.A., 1999. **Arsenic in drinking water-problems and solutions.** *Water Science and Technology*, 40(2): 69-76.
- Vuyyuri, S.B., Ishaq, M., Kuppala, D., Grover, P., Ahuja, Y.R., 2006. **Evaluation of micronucleus frequencies and DNA damage in glass workers exposed to arsenic.** *Environ. Mol. Mutagen.*, 47: 562-570.
- Wagner, S.L., Malinder, J.S., Morton, W.E., Braman, R.S., 1979. **Skin cancer and arsenical intoxication from well water.** *Arch. Dermatol.*, 115: 1205-1207.
- Waters, M.D., 1977. **Toxicology of vanadium,** *Adv. Mod. Toxicol.*, 2: 147-189.
- Wegrzynowicz, M., Hilgier, W., Dybel, A., Oja, S.S., 2007. **Upregulation of cerebral cortical glutathione synthesis by ammonia in vivo and in cultured glial cells: The role of cystine uptake,** *Neurochemistry international*, 75:1s.
- Welder, A. and Acosta, D. 1994. **Enzyme leakage as an indicator of cytotoxicity in cultured cells,** *Methods in toxicology*. 18: 46-49
- Wester, R.C., Maibach, H.I., Sedik, L., Melendres, J., Wade, M., 1993. **In vivo and in vitro percutaneous absorption and skin decontamination of arsenic from water and soil.** *Fundam. Appl. Toxicol.*, 20: 336-240.
- White, M.F., 1997. **The insulin signalling system and the IRS proteins,** *Diabetologia*. Jul;40 Suppl 2:S2-17.
- WHO, 1988. **Vanadium.** *Environmental Health Criteria* 81, World Health Organization, Geneva.
- WHO, 2001. **Arsenic and Arsenic Compounds.** *Environmental Health Criteria* 224, 2nd ed., World Health Organisation, Geneva.
- Winkelhaus, S. and Hauser, M., 1997. **Ortho-vanadate affects both the tyrosination/detyrosination state of spindle microtubules and the organization of XTH-2 spindles,** *Eur. J. Cell Biol.* 73: 306-331.
- Winship, K.A., 1984. **Toxicity of inorganic arsenic salts.** *Adv. Drug React.*, 3: 129-160.
- Winski, S.L., Carter, D.E., 1995. **Interactions of rat red blood cell sulfhydryls with arsenate and arsenite.** *J. Toxicol Environ Health*, 46(3): 379-97.
- Winski, S.L., Carter, D.E., 1998. **Arsenate toxicity in human erythrocytes: characterization of morphologic changes and determination of the mechanism of damage.** *J. Toxicol Environ Health*, 53(5): 345-55.
- Wyers, H., 1946. **Some toxic effects of vanadium pentoxide.** *Br. J. Ind. Med.*, 3: 177-182.
- Yamanaka, K., Kato, K., Mizoi, M., An, Y., Takabayashi, F., Nakano, M., Hoshino, M., Okada, S., 2004. **The role of active arsenic species produced by metabolic reduction of dimethylarsinic acid in genotoxicity and tumorigenesis.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 198: 385-393.

- Yamauchi, H., Aminaka, Y., Yoshida, K., Sun, G., Pi, J., Waalkes, M.P., 2004. **Evaluation of DNA damage in patients with arsenic poisoning: Urinary 8-hydroxydeoxyguanine.** Toxicology and Applied Pharmacology, 198: 291-296.
- Yasui, H., Takechi, K., Sakurai, H., 2000. **Metallokinetic analysis of disposition of vanadyl complexes as insulin-mimetics in rats using BCM-ESR method.** J. Inorg. Biochem., 78: 185-196.
- Younes, M., Strubelt, O., 1991. **Vanadate-induced toxicity towards isolated perfused rat livers: the role of lipid peroxidation.** Toxicology, 66(1): 63-74.
- Yoshioka M., Sagara H., Takahashi F., Harada N., Nishio K., Mori A., Ushio H., Shimizu K., Okada T., Ota M., Ito Y.M., Nagashima O., Atsuta R., Suzuki T., Fukuda T., Fukuchi Y., Takahashi K., 2009. **Role Of Multidrug Resistance-Associated Protein 1 In The Pathogenesis Of Allergic Airway Inflammation.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol., 296: 30-36.
- Yu, B.P., 1995. **Cellular defenses against damage from reactive oxygen species.** Physiol. rev., 74(1): 139-162.
- Zaldivar, R., 1974. **Arsenic contamination of drinking water and food stuffs causing endemic chronic poisoning.** Beitr. Pathol., 151: 384-400.
- Zenz, C., Bartlett, J.P., Thiede, W.M., 1962. **Acute vanadium pentoxide intoxication.** Arch Environ Health, 5: 542-546.
- Zenz, C., Berg, B.A., 1967. **Human responses to controlled vanadium pentoxide exposure.** Arch Environ Health, 14: 709-712.
- Zhong, B.Z., Gu, Z.W., Wallace, W.E., Whong, W.Z., Ong, T., 1994. **Genotoxicity of vanadium pentoxide in Chinese hamster V79 cells.** Mutat. Res., 321: 35-42.
- Zierler, S., Theodore, M., Cohen, A., 1988. **Chemical quality of maternal drinking water and congenital heart disease.** Int J Epidemiol 17(3): 589-594.
- Zima, T., Crkovska, J., Merta, M., , Stipek, S., Nemecek, K., Tesar, V., 1995. **Activity of the antioxidant enzymes, glutathione peroxidase, on outosomal dominant polycystic kidney disease patient.** Biochemical molecular biology international, 35(4): 699-704.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında büyük titizlik, sabır ve özveriyle bana destek olan, yol gösteren danışman hocam sayın Prof. Dr. Deniz YILDIZ'a (M.K.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanı) çalışmalarımın düzenli ilerlemesinde bana yardımcı olan Züleyha Çivi, Hüseyin Doğru, Hasan Yıldız, Samim Kayıkçı, Serhat Yıldız, bana desteğini esirgemeyen Dr. Mehmet Ali Edipoğlu, Dr. Bayram Kerkez, Dr. Çiğdem Mansuroğlu, Doç. Dr. Muharrem Güneş, Dr. Mehmet Onur Yücel, Eylem Beyazıt, Gökçen Kılınç, Gülay Duran, Deniz Yeşiloğlu ve gösterdikleri maddi, manevi destek ve anlayıştan dolayı Neval-Edib, Deniz, Mine ÇAKIR'a ve Filiz-İrfan Yabancı'ya ve her şeyden önce varlıklarıyla bana güç veren Mehmet Efe ve Duru Yabancı'ya teşekkürlerimi bir borç bilirim.

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Hatay'ın Samandağ ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Samandağ'da tamamladım. 1997 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Tıbbi Laboratuvar Bölümünden mezun oldum. 2001 yılında Antakya SSK Hastanesinde laborant olarak göreve başladım. 2001 Yılında dikey geçiş sınavıyla Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne başladım. 2004 yılında mezun oldum. 2005 yılında, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Genel Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım. 2008 yılında mezun oldum. Eylül 2008'de doktora başladım. Halen Antakya Devlet Hastanesi Acil Biyokimya laboratuvarında çalışmaktayım.