T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Münevver AÇIKKOL
Doç. Dr. Selda MERCAN (2. Danışman)

GLOBAL DNA METİLASYONU VE GLOBAL DNA HİDROKSİMETİLASYONU İLE TOKSİK METALLERİN İLİŞKİSİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

SEVCAN ŞEMEN
İSTANBUL, 2023

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Münevver AÇIKKOL
Doç. Dr. Selda MERCAN (2. Danışman)

GLOBAL DNA METİLASYONU VE GLOBAL DNA HİDROKSİMETİLASYONU İLE TOKSİK METALLERİN İLİŞKİSİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

SEVCAN ŞEMEN
İSTANBUL, 2023

Bu tez projesi İ.Ü.-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 49569

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince desteklerini sürekli hissetiğim

değerli danışman hocalarım

Prof. Dr. Münevver Açıkkol'a ve

Doç. Dr. Selda Mercan'a

kıymetli hocalarım

Prof. Dr. Türkan Yurdun'a ve

Prof. Dr. Emel Hülya Yükseloğlu'na,

laboratuvar çalışmalarım sırasındaki yardımlarından dolayı

Murat Yayla'ya,

İ.Ü.-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü

bünyesinde çalışan, doğrudan veya dolaylı olarak hayatımı kolaylaştıran

herkese,

her zaman yanımda olan

aileme

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Uzm. Biy. Sevcan ŞEMEN

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ **9**

TABLO LİSTESİ **10**

SİMGELER VE KISALTMALAR **11**

ÖZET **14**

SUMMARY **15**

1. GİRİŞ VE AMAÇ **16**

2. GENEL BİLGİLER **20**

2.1. Epigenetik 20

2.1.1.DNA metilasyonu 22

2.1.1.1. DNA demetilasyonu 25

2.1.1.2. DNA hidroksimetilasyonu 26

2.1.2. Histon modifikasyonları 28

2.1.3. Kodlamayan RNA'lar 29

2.1.4. Epigenetik mekanizmaların rol aldığı biyolojik süreçler 31

2.2. Çevresel Epigenetik 36

2.2.1. Metaller 39

2.2.1.1. Krom 40

2.2.1.2. Nikel 42

2.2.1.3. Kurşun 43

2.2.1.4. Kadmiyum 44

2.3. Global DNA Metilasyonu Analizi 45

3. GEREÇ VE YÖNTEM **51**

3.1. Kullanılan Alet ve Gereçler 51

3.2. Kullanılan Kit ve Kimyasal Maddeler 52

3.3. Kan ve İdrar Örneklerinin Toplanması 53

3.4. Çalışmaya Katılan Bireylere Ait Bilgiler 54

3.5. Çalışmanın Genetik Basamakları 55

3.5.1. Tam kandan DNA izolasyonu 55

3.5.2. DNA miktar tayini 57

3.5.3 Global DNA metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeyinin belirlenmesi 58

3.6. Çalışmanın İnorganik Analiz Basamakları 64

3.6.1. Çalışmada kullanılan çözeltilerinin hazırlanması 64

3.6.2. İdrarda kreatinin miktarının belirlenmesi 66

3.6.3. İdrar örneklerinin ICP-MS çalışması için hazırlanması 67

3.6.4. Analiz koşulları 67

3.6.5. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) belirleme çalışmaları 68

3.6.6. İdrar örneklerinin ICP-MS ile analizi 69

3.7. İstatistiksel Analizler 69

4. BULGULAR 71

4.1. Katılımcıların Tanımlayıcı Özellikleri 71

4.2. Çalışmanın Genetik Bulguları 73

4.2.1. Global DNA metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeylerinin belirlenmesi 73

4.2.2. Katılımcıların global 5-mC düzeyi 76

4.2.3. Sosyo-demografik faktörlerin ve yaşam alışkanlıklarının global 5-mC düzeyine etkisi 77

4.3. Çalışmanın İnorganik Analiz Bulguları 80

4.3.1. İdrar örneklerinin ICP-MS ile analizi 80

4.3.2. İdrar örneklerine ait toksik metal (Cr, Ni, Cd ve Pb) konsantrasyonları 83

4.3.3. Mesleki maruziyet süresi ile global 5-mC ve toksik metal düzeyleri arasındaki ilişki 85

4.3.4. Global 5-mC düzeyi ile demografik özelliklerin ve toksik metal düzeylerinin birbiri ile ilişkisi 88

5. TARTIŞMA 91

6. SONUÇ 104

7. KAYNAKLAR 106

ÖZGEÇMİŞ 125

EKLER 130

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Epigenetik mekanizmalar

Şekil 2.2. Gen ifadesinin düzenlenmesi

Şekil 2.3. Kanserde DNA metilasyon profili

Şekil 2.4. Epigenetik ve çevre etkileşimleri

Şekil 2.5. Çevresel kimyasalların DNA metilasyonu üzerindeki olası etki mekanizmalarına genel bakış

Şekil 4.1. %5-mC kalibrasyon eğrisi

Şekil 4.2. 5-mC standart DNA örneklerinin ve bilinmeyen örneklerin görünümü

Şekil 4.3. %5-hmC kalibrasyon eğrisi

Şekil 4.4. 5-hmC standart DNA örneklerinin ve bilinmeyen örneklerin görünümü

Şekil 4.5. Çalışma gruplarında global DNA metilasyon (%5-mC) düzeyleri

Şekil 4.6. İşçi grubunda VKİ kategorilerine göre 5-mC düzeylerinin karşılaştırılması

Şekil 4.7. İşçi grubunda eğitim düzeyine göre 5-mC yüzdelerinin karşılaştırılması

Şekil 4.8. Cr kalibrasyon eğrisi (Doğrusal aralık: 0.1-150 ng/mL; r>0.999)

Şekil 4.9. Ni kalibrasyon eğrisi (Doğrusal aralık: 0.1-150 ng/mL; r>0.999)

Şekil 4.10. Cd kalibrasyon eğrisi (Doğrusal aralık: 0.1-150 ng/mL; r>0.999)

Şekil 4.11. Pb kalibrasyon eğrisi (Doğrusal aralık: 0.2-150 ng/mL; r>0.999)

Şekil 4.12. Çalışma süresine göre global 5-mC düzeylerinin karşılaştırılması (n=160)

Şekil 4.13. Çalışma süresine göre idrar kadmiyum düzeylerinin karşılaştırılması (n=160)

Şekil 4.14. Çalışma süresine göre idrar kurşun düzeylerinin karşılaştırılması (n=160)

Şekil 4.15. Global DNA metilasyonu (%5-mC) ile idrar kurşun düzeyi arasındaki ilişki

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan alet/gereçlerin adları, marka-modelleri

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan kit ve kimyasal maddelerin listesi

Tablo 3.3. Katılımcılara ait özellikler

Tablo 3.4. "Anti-5-Metilsitozin" ve "Sekonder Antibody" karışımının hazırlanması

Tablo 3.5. 5-mC standart DNA karışımlarının hazırlanması

Tablo 3.6. Kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanılan kontrol DNA'lar ve karşılık gelen 5-hmC yüzdeleri

Tablo 3.7. ICP-MS analizinde kullanılan kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Tablo 3.8. ICP-MS cihazı çalışma koşulları

Tablo 4.1. Katılımcıların sosyo-demografik özelliklerinin ve yaşam alışkanlıklarının çalışma gruplarına göre dağılımı ve istatistiksel karşılaştırması

Tablo 4.2. Plak içi ve plaklar arası varyasyon katsayıları (%CV)

Tablo 4.3. Sosyo-demografik faktörlerin ve yaşam alışkanlıklarının global 5-mC düzeyine etkisi

Tablo 4.4. Analizi yapılan elementlerin LOD ve LOQ değerleri

Tablo 4.5. Sertifikalı referans idrar materyali analiz sonuçları

Tablo 4.6. İşçi ve kontrol grubu idrar Cr, Ni, Cd ve Pb düzeylerinin (µg/g kreatinin) karşılaştırılması

Tablo 4.7. Mesleki maruziyet (çalışma) süresi ile global 5-mC ve toksik metal düzeyleri arasındaki ilişkinin değerlendirmesi

Tablo 4.8. İşçilerin çalışma süreleri (yıl) ile global 5-mC (%), Cr, Ni, Cd ve Pb (µg/g kreatinin) düzeyleri arasındaki korelasyon

Tablo 4.9. Katılımcıların global DNA metilasyon (%5-mC) düzeyleri ile demografik özellikleri ve idrar toksik metal (Cr, Ni, Cd ve Pb) düzeyleri arasındaki korelasyon

SİMGELER VE KISALTMALAR

α-KG	α ketoglutarat
µg	Mikrogram
5-caC	5-karboksilsitozin
5-fC	5-formilsitozin
5-hmC	5-hidroksimetilsitozin
5-hmU	5-hidroksimetilurasil
5-mC	5-metilsitozin
AID	Aktivasyona bağlı deaminaz
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA düzenleme enzim kompleksi
bç	Baz çifti
BER	Baz egzisyon onarımı
Cd	Kadmiyum
CpG	Sitozin-fosfat-guanin
Cr	Krom
CV	Varyasyon katsayısı
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNMT	DNA metiltransferaz
ELISA	Enzim bağlantılı bağışıklık testi
GSH	Glutatyon
H	Histon
HAT	Histon asetiltransferaz
HDAC	Histon deasetilaz
HDM	Histon demetilaz

HMT	Histon metiltransferaz
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
ICP-MS	İndüktif olarak eşleştirilmiş plazma-kütle spektrometresi
IQR	Çeyrekler arası açıklık (Inter quartile range)
K	Lizin
KOK	Kalıcı organik kirleticiler
LINE	Uzun serpiştirilmiş nükleotit elementleri
lncRNA	Uzun kodlamayan RNA
LOD	Tespit sınırı (Limit of detection)
LOQ	Tayin sınırı (Limit of quantification)
LUMA	Luminometrik metilasyon analizi
mRNA	mesajcı RNA
MBD	Metil CpG bağlanma alanı
miRNA	Mikro RNA
n	Birey sayısı
ncRNA	Kodlamayan RNA
Ni	Nikel
nt	Nükleotit
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
Pb	Kurşun
piRNA	Piwi etkileşimli RNA
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
RSD	Bağıl standart sapma
SAH	S-adenozilhomosistein

SAM	S-adenozil-metiyonin
siRNA	Kısa karışan RNA
SS	Standart sapma
TDG	Timin DNA glikozilaz
TET	On-onbir translokasyon
VKİ	Vücut kitle indeksi

ÖZET

Son yıllarda toksik metallerle ilişkili hastalıkların etiyolojisindeki moleküler faktörlerin rolü giderek önem kazanmaktadır ve elde edilen veriler epigenetik değişiklikler ile toksik metal maruziyeti arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. Epigenetiğin hastalık süreçlerinde oynayabileceği role ek olarak, çevresel maruziyetin yararlı ve pratik bir biyobelirteci olarak da hizmet edebileceği öngörülmektedir. Çalışmamızın amacı, global DNA metilasyonu ve hidroksimetilasyonu ile toksik metaller arsındaki ilişkiyi incelemektir. Mesleki olarak toksik metal maruziyeti bulunan 160 tersane işçisi ile maruziyeti bulunmayan 55 bireyin (kontrol) idrarlarındaki Cr, Ni, Cd ve Pb konsantrasyonları ICP-MS yöntemiyle belirlenmiş olup; işçi grubunda sırasıyla ortalama 0.018±0.02, 5.71±3.03, 0.342±0.172 ve 3.55±3.12 µg/g kreatinin iken kontrol grubunda 0.013±0.004, 4.55±1.76, 0.394±0.241 ve 0.73±0.43 µg/g kreatinindir. İşçilerin kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yüksek Cr, Ni ve Pb konsantrasyonuna sahip olduğu belirlenmiştir (p<0.05). Cd için ise gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0.05). Global DNA metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeyi kanda ELISA yöntemi ile çalışılmış olup; işçi grubunda ortalama 5-mC düzeyi %6.74±1.08 ve kontrol grubunda ise %6.10±1.35'tir. İşçi grubunun global 5-mC düzeyleri (medyan=%6.70), kontrol grubu (medyan=%5.69) ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p<0.0001).

Anahtar Kelimeler: Epigenetik, global DNA metilasyonu, toksik metaller

SUMMARY

In recent years, the role of molecular factors in the etiology of toxic metal-related diseases has become increasingly important and the data obtained support the relationship between epigenetic changes and toxic metal exposure. In addition to the role that epigenetics may play in disease processes, it is predicted that it may also serve as a useful and practical biomarker of environmental exposure. The aim of our study is to examine the relationship of global DNA methylation and hydroxymethylation with toxic metals. Cr, Ni, Cd and Pb concentrations in the urine samples of 160 shipyard workers who had occupational exposure to toxic metals and 55 individuals (control) who were not exposed were determined by ICP-MS method; the mean creatinine levels in the workers were 0.018±0.02, 5.71±3.03, 0.342±0.172 and 3.55±3.12 μg/g, respectively, while it was 0.013±0.004, 4.55±1.76, 0.394±0.241 and 0.73±0.43 μg/g creatinine in the control group. It was determined that the workers had significantly higher Cr, Ni and Pb concentrations compared to the controls ($p<0.05$). There was no significant difference between the groups for Cd ($p>0.05$). Global DNA methylation and hydroxymethylation levels were studied in blood by ELISA method; the mean 5-mC level was 6.74±1.08% in the workers and 6.10±1.35% in the control group. The global 5-mC levels of the workers (median=6.70%) were significantly higher when compared to the control group (median=5.69%) ($p<0.0001$).

Keywords: Epigenetics, global DNA methylation, toxic metals

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Epigenetik, DNA dizisinden bağımsız olarak gen ifadesinde meydana gelen kalıtsal değişiklikleri ifade etmektedir. Son on yılda yapılan araştırmalar sonucunda, epigenetik olayların, özellikle yüksek organizasyonlu canlılarda oldukça önemli etkileri olduğu anlaşılmıştır (Hou ve ark., 2012). DNA metilasyonu, üstünde en çok çalışılan epigenetik mekanizmadır ve transkripsiyonel baskılama, kromatin yapının değiştirilmesi, X kromozomu inaktivasyonu, genomik damgalama, tekrarlayan ve parazitik DNA dizinlerinin baskılanması gibi önemli hücresel etkilere sahiptir (Robertson, 2005; Sayın, 2008).

Metillenme insan hücrelerinde tipik olarak, DNA'daki CG çiftleri halinde bulunan sitozinlerde meydana gelir ve bir metil grubunun DNA metiltransferaz enzimleri ile sitozindeki pirimidin halkasının 5 numaralı karbonuna kovalent olarak eklenmesi neticesinde gerçekleşir. 5-metilsitozin (5-mC), kritik öneminden ve kalıtsallık özelliğinden dolayı genomun "5. bazı" olarak anılmaktadır (Esteller ve Herman, 2002; İzmirli ve ark., 2012). İnsan DNA'sındaki CpG baz çiftlerinin %70-80'i metillenmiş durumdadır. Bu metillenmenin dokudan dokuya değiştiği bilinmektedir. Metillenmenin ökaryotik gen ifadesinin düzenlenmesinde bir etken olarak rolünün gösterilmesi bazı gözlemlere dayanmaktadır. Birincisi, bir genin metillenme derecesi ile ifade edilme derecesi arasında ters bir ilişki vardır. İkincisi, metillenme dokuya özgüdür ve bir kere gerçekleşince o dokunun bütün hücrelerine aktarılır (Çelik-Özenci, 2006; Frumkin ve ark, 2011).

Metil grubunun sitozin halkasına eklenmesi, uzun yıllar memeli genomik DNA'sında tek enzimatik modifikasyon olarak bilinmekteydi fakat çalışmalar "6. baz" olarak da isimlendirilen 5-hidroksimetilsitozinin (5-hmC) varlığını ortaya koymuştur (Dahl ve

ark., 2011). Günümüzde, DNA üzerindeki önemli bir başka epigenetik modifikasyon olarak dikkatleri üzerine çeken DNA hidroksimetilasyonunun biyolojik rolü henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir (Tellez-Plaza ve ark., 2014). Metilasyona benzer şekilde hidroksimetilasyonda; bir hidroksimetil grubu, sitozinin C5 konumundaki hidrojen atomu yerine geçmektedir. Düzeyi oldukça çeşitlilik göstermekle beraber 5-hmC günümüze kadar araştırılmış tüm dokularda ve hücre tiplerinde (özellikle beyin dokusunda yüksek seviyelerde) bulunmuştur (Li ve Liu, 2011; Globisch ve ark., 2010; Szwagierczak ve ark., 2010). Sitozin hidroksimetilasyonunun gen regülasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir ve kök hücre yenilenmesi, yaşlanma, kanser gelişimi ve ilerlemesi ve nörolojik bozukluklar gibi birçok alanda, potansiyel bir epigenetik faktör olarak son yıllarda dikkat çekmektedir (Ye ve Li, 2014; Ficz ve ark., 2011; Thalhammer ve ark., 2011).

Epigenetik mekanizmalar, dış etkiler altında genomun fonksiyonunu değiştirebilen kırılgan parametreler olduğundan günümüzde çoğu hastalığın temelinde, genotipe göre daha kararsız olan epigenetiğin yattığı düşünülmektedir (Robertson, 2005; Baccarelli ve Bollati, 2009). Geçtiğimiz birkaç on yılda, bilimsel araştırmalar sayısız insan kanser türlerini çevresel ve mesleki maruziyet ajanlarına bağlamıştır. Her yıl, çevresel kirleticiler nedeniyle 13 milyondan fazla ölüm gerçekleşmektedir ve hastalıkların yaklaşık %24'ünün engellenebilir maruziyetler sebebiyle oluştuğu tahmin edilmektedir. Hızla çoğalan kanıtlar, çevresel ajanların gen ekspresyonunu düzenleyen epigenetik mekanizmalarda değişikliğe sebebiyet vermek yoluyla hastalıklara yol açtığını göstermektedir (Hou ve ark., 2012).

Epigenetik değişikliklere neden olduğu belirlenen bazı çevresel etmenler arasında metaller, kalıcı organik kirleticiler, pestisitler, hava kirleticileri ve polisiklik aromatik

hidrokarbonlar vardır (Weinhold, 2006). Toksik metaller yaygın olarak bulunan çevresel kirleticilerdir ve arsenik, kadmiyum, cıva, kurşun, nikel gibi toksik metallerin kanser, kardiovasküler hastalıklar, nörolojik bozukluklar ve otoimmün hastalıklar gibi birçok hastalıkla bağlantılı oldukları düşünülmektedir (Martinez-Zamudio ve Ha, 2011). Son yıllarda ağır metal bağlantılı hastalıkların etiyolojisindeki moleküler faktörlerin rolü giderek önem kazanmıştır ve veriler epigenetik değişiklikler ile ağır metal maruziyeti arasındaki ilişkiyi desteklemektedir (Salnikow ve Zhitkovich, 2008).

Epigenetik, hangi bireylerin hastalığı geliştirmede daha duyarlı olacağını ve hangi maruziyetlerin risk oluşturacağını öngörmek adına biyolojik belirteçler geliştirmek için önemli bir potansiyale sahiptir. Bu noktada epigenetik değişikliklerin çevresel ajanlar tarafından değişim hızını, maruziyet yolu ve sıklığı ile epigenetik değişiklik arasındaki zamana bağlı değişimi ve ne kadar süre kalıcı olduklarını belirlemek için araştırmalara ihtiyaç vardır (Baccarelli ve Bollati, 2009).

Önemli çevresel ve mesleki maruziyet kaynakları olan toksik metallerin epigenetik değişikliklere neden olduğu düşünülmektedir ve gen ekspresyonundaki bu değişikliklerin kanser ve nörodejeneratif bozukluklar gibi ciddi ve kompleks hastalıklarla ilişkili olduğu kabul görmektedir. Doku düzeyindeki DNA metilasyon değişiklikleri hakkında oldukça geniş literatür olmasına rağmen, kan hücrelerindeki global DNA metilasyonu ve hidroksimetilasyonu gibi modifikasyonların belirlenmesinin toksik metallere maruziyeti yansıtan ve/veya gelecekteki hastalık riskini öngören ve bunların ara biyobelirteçler olarak kullanılıp kullanılamayacağı hakkında az bilgi mevcuttur. Çalışmamızda, toksik metallerle global DNA metilasyonu ve hidroksimetilasyonu arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Toksik metallere mesleki olarak maruz kalarak olumsuz sağlık sonuçları yaşama riski bulunan işçi grubuyla, kontrol grubunun idrarındaki Cr, Ni, Cd ve Pb konsantrasyonları karşılaştırılmış, ayrıca her iki grubun da global metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeyleri belirlenmiştir. Ek olarak katılımcıların sosyo-demografik özelliklerinin ve yaşam alışkanlıklarının global DNA metilasyonu ile ilişkisi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

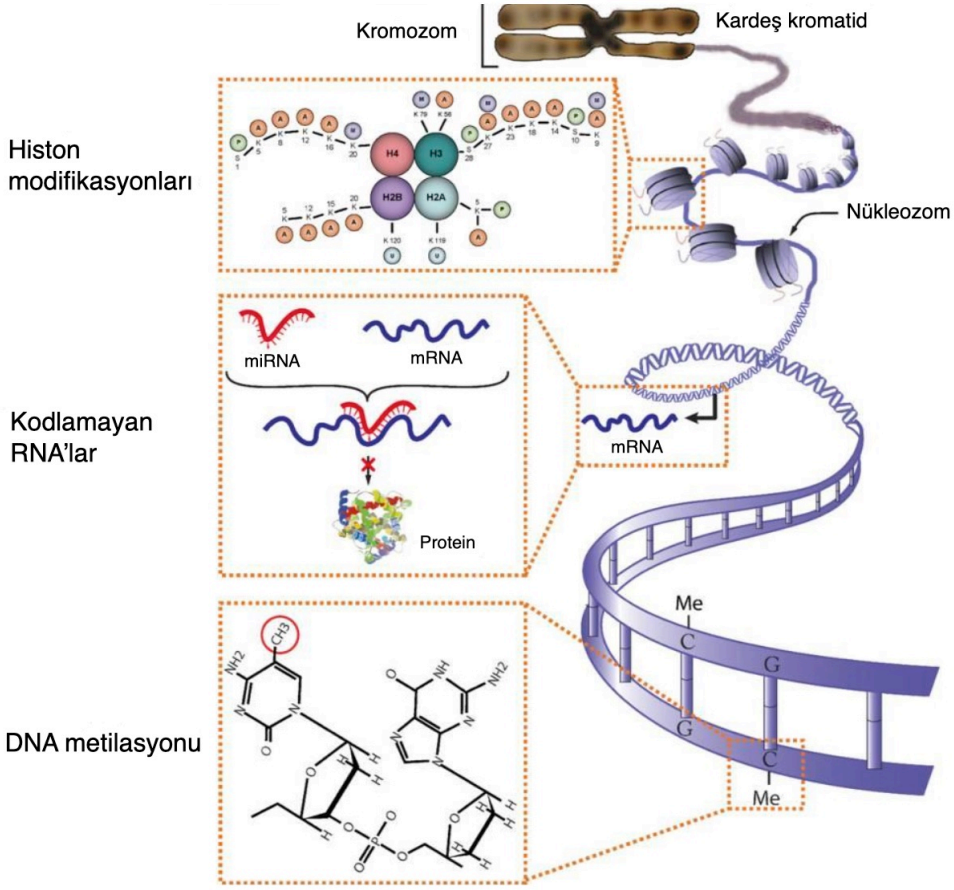
2.1. Epigenetik

Kalıtımın çevresel koşullardan etkilendiği ve ataların çevresel koşulların etkisiyle kazandığı özellikleri sonraki nesillere aktarabileceği düşüncesi ilk olarak doğabilimci Jean-Baptiste Lamarck tarafından ortaya atılmış, Lamarck'ın kazanılmış karakterlerin kalıtımı tezi oldukça büyük tartışma yaratmıştır (Kürekçi ve ark., 2017; Wang ve ark., 2017). Fakat, Mendel kalıtımının anlaşılmaya başlanması, gen kavramının tanımlanması ve DNA'nın yapısının belirlenmesiyle birlikte canlının tüm özelliklerini belirleyen bilginin DNA dizilimi olduğu ve kalıtımın sadece genler tarafından aktarıldığı düşüncesi kabul görmüştür (İnan, 2021). 21. yüzyılda ise klasik genetik teorilerin ötesine geçen epigenetik kavramının ortaya çıkmasıyla birlikte biyolojik yapı ve işlevin temel açıklayıcı kavramının gen olduğu dönem sona erdi. Kalıtım artık DNA'dan daha fazlasıdır ve bilgi bir nesilden diğerine DNA'nın temel dizisi dışında başka yollarla da aktarılabilir. Günümüzde, genetik denildiğinde gen, DNA ve kromozomla birlikte çevresel etmenler de akla gelmektedir (Bloomfield ve Hanson, 2015; İnan, 2021).

Epigenetik, genomdaki çeşitli geri dönüşümlü değişiklikleri tanımlamak için kullanılan geniş bir terimdir. Genetik kodun üstünde, epigenetik kod ek bir bilgi katmanı içerir. İlki, RNA ve protein yapısı için bir çerçeve sağlarken; epigenetik kod, DNA'nın paketlenmesinin yanı sıra gen düzenlemesini kontrol eder. Epigenetik terimi ilk olarak 1942'de, epigenetiği "genler ve fenotipi meydana getiren ürünleri arasındaki nedensel etkileşimleri inceleyen biyoloji dalı" olarak tanımlayan gelişimsel biyolog Conrad Waddington tarafından tanıtıldı (Kader ve Ghai, 2015; Tollefsbol, 2011). Epigenetiğin tanımı zaman içerisinde genetik biliminde yaşanan ilerlemelerle birlikte

değişti ve gelişti. Etimolojik olarak genetiğin üzerinde veya genetik ötesi anlamlarına gelen epigenetik günümüzde; ‘DNA dizisindeki değişikliklerle açıklanamayan, mitoz ve/veya mayoz bölünme yoluyla kalıtılabilen gen ifadesi değişikliklerini inceleyen bilim dalı’ olarak tanımlanmaktadır (Gürel ve ark., 2016).

Gen ifadesinin epigenetik düzenlemesine aracılık eden üç temel moleküler mekanizma şunlardır: (1) DNA metilasyonu; (2) histon modifikasyonları; ve (3) kodlamayan RNA'lar (Şekil 2.1). Epigenetik mekanizmalar, kendi aralarında mükemmel bir şekilde etkileşim içindedirler. Bu süreçler, çeşitli çevresel faktörlerden etkilenebilir ve düzensizlikleri birçok hastalık durumunda görülür (Baccarelli ve Bollati, 2009; Cheng ve ark., 2011).



Şekil 2.1. Epigenetik mekanizmalar (Sawan ve ark., 2008)

2.1.1. DNA metilasyonu

DNA metilasyonu hücrelerimiz için kritik bir düzenleme mekanizmasıdır ve karakterize edilmiş ilk epigenetik modifikasyondur. DNA'nın metillenebileceği 1940'lardan beri bilinmesine rağmen, bu DNA modifikasyonu ile gen ifadesinin düzenlenmesi arasındaki bağlantı ancak otuz yıl sonra kuruldu. O zamandan beri epigenetik çalışmalar, orijinal embriyonik dönemdeki gelişim bağlamından, epigenetik modifikasyonların gen ifadesindeki düzenleyici işlevinin analizine doğru ilerledi (Ospelt, 2022).

Metilasyon, insanlarda genomik DNA'nın bilinen tek kovalent modifikasyonudur ve sitozinin (C) 5. karbonuna bir metil ($-CH_3$) grubunun eklenmesi sonucu 5-metilsitozin (5-mC) oluşmasıyla gerçekleşir. Tipik olarak sitozin-fosfat-guanin (CpG) dinükleotidlerinde meydana gelir (Sayın, 2008). Normal insan DNA'sındaki 5-mC yüzdesi, toplam baz sayısının %0,75-1'ini oluşturur ve tüm CpG dinükleotitlerinin ~%70'i metiledir (Dahl ve ark., 2011; Esteller ve Herman, 2002).

DNA metilasyonu, DNA metil transferaz (DNMT) adı verilen enzimler tarafından katalizlenmektedir. Bu enzimler, metil grubu donörü olan S-adenosil-metiyonin'den (SAM) metil grubu alarak sitozinin 5. karbonuna transfer eder (Güler ve Peynircioğlu, 2016). DNMT'ların yapısı üç ana bölümden oluşur: düzenleyici N-terminal alan, katalitik C-terminal alan ve merkezi bağlayıcı bölge. Düzenleyici N-terminal alan, metillenmemiş ve yarı-metillenmiş DNA zincirlerinin ayırt edilmesinde rol oynamaktadır (Uysal ve ark., 2015).

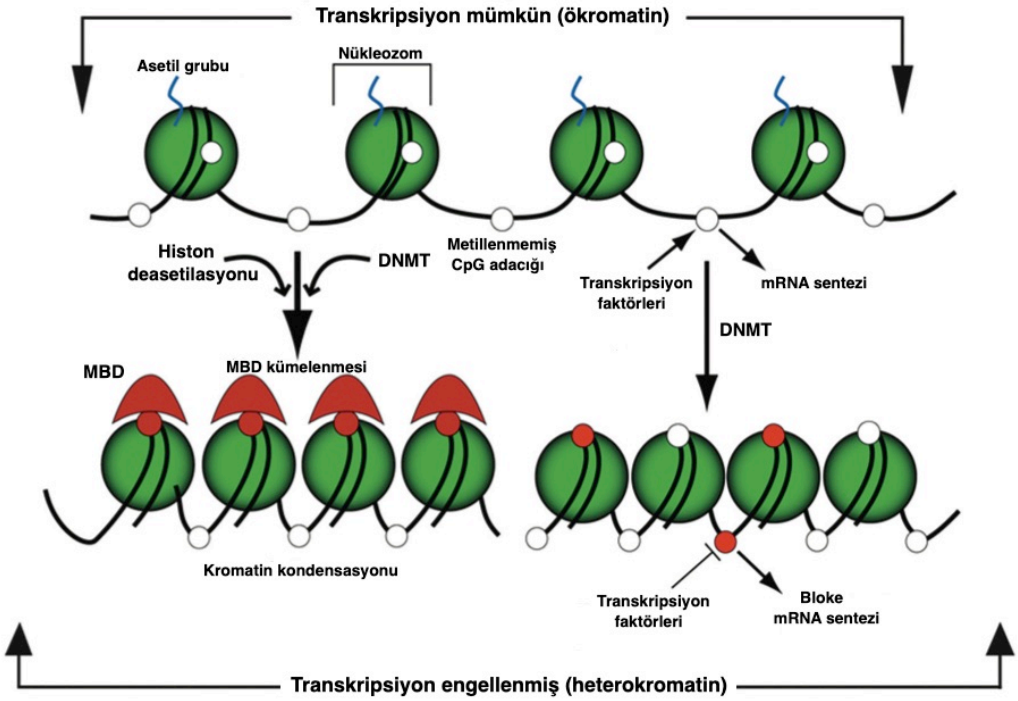
Memeli hücrelerinde metilasyon, üç ana DNA metiltransferaz tarafından kontrol edilir; DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B. DNMT1, DNA replikasyonunu takiben yarı-metillenmiş CpG bölgelerine metil grupları ekleyerek mevcut metilasyon

modellerini koruyan ana sürdürme (maintenance) enzimidir. DNMT3A ve 3B ise *de novo* metil transferazlar olarak adlandırılır ve gelişimin erken evrelerinde kurulan ilk metilasyon paternlerinin oluşturulmasından sorumludur (Cheng ve ark., 2011; Güler ve Peynircioğlu, 2016).

İnsan genomunda, CpG dinükleotitleri, GC açısından zengin ve zayıf DNA bölgeleri arasında asimetrik olarak dağılır ve tüm CpG bölgeleri metillenmez. DNA metilasyon paterni, farklı hücre tiplerinde değişiklik gösterir ve dokuya özgüdür (Sadakierska-Chudy ve ark., 2015). Genlerinin yaklaşık yarısı, genellikle ilişkili genin promotorunu ve transkripsiyon başlangıç bölgesini kapsayan 5' bölgede "CpG adacıkları" olarak adlandırılan CpG açısından zengin bir bölge içerir (Shen ve ark., 2007). CpG adacıkları ortalama 1 kb uzunluğundadır ve genomun geri kalanına göre 5 kat fazla CpG içerir. Tahmini 30.000 CpG adacığı, çoğu normal dokularda metillenmemiş olan tüm CpG'lerin %7'sini oluşturur. CpG adacıklarının normalde metillenmemiş olduğu kabul edilmiştir. İnaktif X kromozomu ve bazı damgalanmış ve dokuya özgü genler ile ilişkili adacıklar buna istisnadır (Cadieux ve ark., 2006). CpG adacıklarında yoğun bir şekilde gruplandırılmış olanlar dışında, genom boyunca tekrar dizileri ve transpozonların bulunduğu bölgelerde bulunan CpG dinükleotitleri ise metilllenmiştir. Bu sayede transkripsiyon baskılanmakta ve transpozonların genom içerisindeki hareketi engellenerek kromozomun kararlı halde kalması sağlanmaktadır (Bora ve Yurter, 2007).

DNA metilasyonu, gen ifadesini iki şekilde etkileyebilir. İlk olarak, DNA metilasyonu transkripsiyon faktörlerinin genin promotor bölgesine bağlanmasını bizzat fiziksel olarak engelleyebilir ve bu şekilde gen ifadesi baskılanır; ikincisi ve muhtemelen daha önemlisi, metillenmiş DNA, metil-CpG bağlayıcı alan proteinleri (MBD) olarak

bilinen proteinler tarafından bağlanabilir. MBD'ler daha sonra, histon deasetilazları (HDAC) ve kromatin biçimlendirici başka proteinleri lokusa çeker. HDAC, bu bölgedeki asetil gruplarını histon kuyruklarından uzaklaştırır ve böylece kromatin transkripsiyona kapalı kompakt yapıya kavuşur (Şekil 2.2) (Güler ve Peynircioğlu, 2016; Sadakierska-Chudy ve ark., 2015).



Şekil 2.2. Gen ifadesinin düzenlenmesi

DNA metilasyonu, X kromozomu inaktivasyonu ve genomik damgalama gibi teorik olarak kalıcı ya da dinamik olarak gerçekleşir. Dinamik metilasyonda, DNA metilasyonu/demetilasyonu reaksiyonları, bir organizmanın yaşamı boyunca genleri aktifleştirir veya sessizleştirir (Edwards ve Myers, 2007).

2.1.1.1. DNA demetilasyonu

Epigenetik değişiklikler kalıtsaldır fakat potansiyel olarak geri dönüşebilir. DNA demetilasyonu, 5-mC'nin tekrar sitozine geri dönüştürülmesidir (Eser ve ark., 2016). Günümüzde metil gruplarının CpG dinükleotidlerine eklenme mekanizması iyi tanımlanmış olsa da, DNA demetilasyonu mekanizması yoğun tartışmaların konusu olmaya devam etmektedir (Neidhart, 2016).

DNA demetilasyonu, pasif ve aktif olmak üzere iki yoldan gerçekleşir. Pasif demetilasyon, ardışık DNA replikasyonları sırasında DNMT1 aktivitesindeki azalmadan veya enzim yokluğundan kaynaklanır. 5-Azacytidine, pasif DNA demetilasyonuyla ilişkili iyi bilinen bir DNMT inhibitörüdür ve kanserde tümör baskılayıcı genleri demetile etmek için kullanılmaktadır (Neidhart, 2016).

Aktif demetilasyon ise enzimler yoluyla direkt olarak 5-mC üzerinde gerçekleşen reaksiyonları ve metil grubunun uzaklaştırılmasını içerir. Oksidasyon yoluyla aktif demetilasyon: TET enzimleri, 5-mC'i hidroksile ederek 5-hidroksimetilsitozin (5-hmC) oluşturur; daha ileri oksidasyon 5-formilsitozin (5-fC) ve 5-karboksilsitozin (5-caC) üretir. 5-fC ve 5-caC, timin DNA glikozilaz enzimi (TDG) ve baz ekzisyon onarımı (BER) sistemi aracılığıyla normal sitozine geri çevrilir (Eser ve ark., 2016; Sadakierska-Chudy ve ark., 2015). Deaminasyon yoluyla aktif demetilasyon: Aktivasyona bağlı deaminaz (AID)/apolipoprotein B mRNA düzenleme enzim kompleksi (APOBEC) ailesi üyeleri, 5-mC'i veya 5-hmC'i deamine ederek timin veya 5-hidroksimetilurasil (5-hmU) oluşturur. Bu ara ürünler, DNA glikozilazlar ve BER tarafından sitozin ile değiştirilir (Sadakierska-Chudy ve ark., 2015).

2.1.1.2. DNA hidroksimetilasyonu

Metil grubunun sitozine eklenmesi, uzun yıllar memeli genomik DNA'sındaki bilinen tek enzimatik modifikasyondu fakat çalışmalar 5-hmC varlığını ortaya koydu (Dahl ve ark., 2011). 5-mC'in hidroksillenmiş formu olan, 5-hmC, ilk olarak bakteriyofajlarda rapor edilmiştir ve sonrasında memeli DNA'sındaki varlığı 1970'lerin başlarında ortaya çıkarılmıştır. Fakat bu keşif, sonraki 30 yıl boyunca, 2009'da birbirinden bağımsız iki çalışmada fare Purkinje nöronları ve embriyonik kök hücrelerinin 5-hmC içerdiği tekrar yayınlanıncaya kadar, çok az ilgi görmüştür (Münzel ve ark., 2011; Sadakierska-Chudy ve ark., 2015). 5-hmC'nin başlangıçta sadece aktif DNA demetilasyon sürecinde yer aldığı düşünülürken, son araştırmalar 5-hmC'nin düzenleyici işlevlere de sahip olabileceğini göstermiştir (Richa ve Sinha, 2014).

Metillenmiş DNA'nın hidroksilasyonu on-onbir tranlokasyon (TET) enzim ailesi tarafından yürütülür. TET ailesi üç proteinden oluşmaktadır: TET1, TET2 ve TET3; bunların tümü, hem *in vivo* hem de *in vitro* 5-hmC üretmek için 5-mC'nin oksidasyonunu katalize edebilen dioksijenazlardır. 5-mC dışında, TET proteinleri alfa-ketoglutarat (α-KG) ve oksijeni kosubstrat olarak kullanır ve reaksiyon son ürünlerini (5-hmC, CO_2 ve süksinat) vermek için kofaktör olarak Fe(II) ve askorbat gerektirir. Bu nedenle, reaksiyon mekanizması TET enzimatik aktivitesine, substrat mevcudiyetine ve kofaktörlere bağlıdır. TET enzim ailesi, 5-mC'i yalnızca 5-hmC'e değil, aynı zamanda 5-fC'e ve 5-caC'e de oksitleme kapasitesine sahiptir (Efimova ve ark., 2020).

Yetişkin dokularında 5-mC seviyeleri oldukça benzerken, 5-hmC seviyeleri, dokular arasında (%0,03 ile ~%0,7) belirgin bir şekilde değişir ve merkezi sinir sistemi

dokularında en yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, genomdaki 5-hmC tüm sitozinlerin ~%0,4'ünü oluşturur (Branco ve ark., 2012; Globisch ve ark., 2010; Guibert ve Weber, 2013). Genom çapında 5-hmC profillerini değerlendiren son çalışmalar, 5-hmC'nin transkripsiyonel olarak aktif genlerin gövdesinde ve inaktif genlerin transkripsiyon başlangıç bölgelerinde zenginleştiğini gözlemlemiştir. *In vitro* analizler, gen gövdesindeki 5-hmC'nin, transkripsiyonel baskılayıcılar olarak hareket eden MBD proteinlerinin bağlanmasını engellediğini ortaya koymuştur (Sadakierska-Chudy ve ark., 2015). Ayrıca, DNMT1, 5-hmC'e zayıf bağlandığından, DNA demetilasyonunu teşvik etmesi mümkündür (Stroud ve ark., 2011). Gen gövdelerinde 5-hmC'nin varlığı, gen ekspresyon seviyeleri ile pozitif olarak ilişkilidir. Bununla birlikte, ifade edilen herhangi bir gen için, transkripsiyon seviyesinin değil, doku tipinin, 5-hmC'nin mutlak seviyelerinin ana değiştiricisi olduğu gösterilmiştir (Nestor ve ark., 2012).

DNA hidroksimetilasyonu, kök hücre yenilenmesi, yaşlanma, kanser ve nörolojik bozukluklar gibi birçok alanda, potansiyel bir epigenetik faktör olarak son yıllarda dikkat çekmektedir. Akciğer, beyin, meme, karaciğer, pankreas ve böbrek tümörlerinde azalmış 5-hmC seviyeleri tespit edilmiştir (Richa ve Sinha, 2014). Ek olarak, global 5-hmC'nin hem koroner aterosklerozun bir biyolojik belirteci hem de nörolojik bozuklukların altında yatan mekanizmalara potansiyel bir katkı maddesi olduğu öne sürülmüştür. 5-hmC'in keşfi, insan gelişimi ve hastalık oluşumundaki DNA metilasyonu algısına yeni ve önemli bir boyut eklemiştir. Fakat hala çözülmemiş birçok konu ve cevabı bilinmeyen birçok soru vardır (Cheng ve ark., 2015; Jiang ve ark., 2019).

2.1.2. Histon modifikasyonları

DNA, hücre çekirdeği içinde kromatin halinde düzenlenir. Kromatin, heterokromatin ve ökromatin olmak üzere iki fonksiyonel duruma sahip; DNA, histon proteinleri ve histon olmayan proteinleri içeren bir komplekstir. Nükleozom, DNA paketlenmesini sağlayan, gen ekspresyonunu düzenleyen ve olası epigenetik olayları mümkün kılan ilk kromatin organizasyonu seviyesidir. Kromatin, aynı genomun farklı konfigürasyonlarına izin vererek çeşitli epigenomlara ve ardından farklı fenotiplere neden olur (Villota-Salazar ve ark., 2016).

Nükleozom, kromatinin yapısal ve işlevsel temel tekrar birimidir. Her nükleozom; H2A, H2B, H3 ve H4 histon proteinlerinden ikişer tane içeren bir histon oktamerinin etrafına sarılmış 147 bç uzunluğunda DNA molekülünden oluşur (Erol ve ark., 2010). Histon H1, nükleozomlar arasında bağlayıcı DNA'ya (~50 bç) bağlanarak, genomik DNA'nın daha fazla sıkıştırılmasına yardımcı olmak için makromoleküler bir yapı meydana getirir. Histonlar, bazik ve pozitif yüklü küçük proteinlerdir, bu da onların DNA ile yakın ilişki kurmasını sağlar. Histon proteinleri, N- ve C-terminal kısımlarıyla çevrili merkezi bir küresel alandan oluşan üçlü bir yapıya sahiptir. N-terminal kısmında bulunan yapılandırılmamış kuyruk, nükleozomdan dışarı doğru çıkıntı yapar ve bu nedenle çeşitli post-translasyonel modifikasyonlara yatkındır (Sadakierska-Chudy ve ark., 2015). Histonlarda oluşan epigenetik modifikasyonlar, kromatin yapısını kapatıp sıkılaştırarak veya açıp genişleterek gen ifadesini baskılar veya aktive eder. İfadesi baskılanan genler heterokromatin yapısı içinde, aktif ifade edilen genler ise ökromatin yapısı içinde bulunur (Villota-Salazar ve ark., 2016).

Histon proteinlerinin kuyruklarındaki post-translasyonel modifikasyonlar kromatin yapısının oluşturulması, gen ifadesinin düzenlenmesi, DNA replikasyonu ve

onarımında rol oynar. Başlıca kovalent histon modifikasyonları: asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ADP-ribozilasyon, ubikitinasyon, sumolasyon, sitrülinasyon, glikozilasyon ve izomerizasyondur; ancak yakın zamanda birçok başka modifikasyon keşfedilmiştir (Erol ve ark., 2010; Villota-Salazar ve ark., 2016). En yaygın histon modifikasyonları, H3 ve H4'ün amino terminalindeki lizin (K) kalıntılarının asetilasyonu ve metilasyonudur. Histon kuyruklarında lizinlerin asetilasyonu, transkripsiyonel aktivasyon ile ilişkilidir ve histon asetil transferaz (HAT) enzimleri tarafından katalizlenir. Histon deasetilazlar (HDAC) ise histonlardan asetil gruplarını uzaklaştıran enzimlerdir. Histonların metilasyonu, lizin kalıntı pozisyonuna bağlı olarak transkripsiyonun baskılanması veya aktivasyonu ile ilişkilidir; histon metiltransferaz (HMT) ve histon demetilaz (HDM) enzimleri ile düzenlenir (Bollati ve Baccarelli, 2010; Özgür ve ark., 2020). H3K4 ve H3K36 histonlarının metilasyonu, aktif olarak transkribe genlerle ilişkiliyken, H3K9, H3K27 ve H4K20'nin metilasyonu, transkripsiyonel baskı ile ilişkilidir. Ayrıca, histon kuyrukları üzerindeki lizin kalıntıları mono-, di- veya trimetile olabilir ve H3K4, H3K9, H3K27 ve H4K20 üzerindeki metilasyon derecesi, transkripsiyonel aktivasyon veya baskılama üzerinde önemli etkiye sahiptir. Örneğin, H3K4 trimetilasyonu ve H3K9 asetilasyonu genellikle transkripsiyonel aktivasyon ile ilişkilendirilirken, H3K9 dimetilasyonu transkripsiyonel baskılama ile ilişkilidir (Arita ve ark., 2012).

2.1.3. Kodlamayan RNA'lar

Kodlamayan RNA'lar (ncRNA), proteine çevrilmeyen ancak hücrelerde gen ifadesinin düzenlenmesine katılan biyolojik olarak aktif RNA moleküleridir (Villota-Salazar ve ark., 2016). Daha önce "çöp DNA" olarak kabul edilen ncRNA'ların, günümüzde potansiyel transkripsiyonel düzenleyiciler ve çeşitli hastalıkların tedavisi

için terapötik hedefler olarak çok önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Samra ve Srivastava, 2023). Kodlamayan RNA'lar uzunluklarına ve işlevlerine bağlı olarak farklı tiplere ayrılırlar: 200 nükleotitten (nt) daha kısa olanlar, kısa kodlamayan RNA'lar olarak kabul edilir ve mikroRNA'ları (miRNA), kısa karışan RNA'ları (siRNA) ve Piwi etkileşimli RNA'ları (piRNA) içerirken, 200 nt'ten uzun olanlar uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA) olarak adlandırılır (Miguela ve ark., 2020). Gen ekspresyonunun kısa ncRNA aracılı regülasyonu iki mekanizmayı kapsar: translasyonel baskı (miRNA tarafından) ve mRNA degradasyonu (siRNA tarafından). miRNA ve hedef mRNA arasındaki tam dizi eşleşmesi, translasyonel baskı (miRNA yolu) ile sonuçlanırken, baz uyumsuzluğu, mRNA bozunma yolunu (siRNA yolu) tetikler ve mRNA bozulur (Choudhuri, 2010).

miRNA'lar, spesifik hedef mRNA'lara bağlanan ve böylece transkripsiyon sonrası gen ifadesini aşağı doğru düzenleyen yaklaşık 18-25 nt uzunluğundaki kodlamayan RNA'lardır (Samra ve Srivastava, 2023). miRNA'ları kodlayan genler, farklı türlerde genomun yaklaşık %1'ini temsil eder ve genlerin yaklaşık %30'unun en az bir miRNA tarafından düzenlendiği tahmin edilmektedir (Villota-Salazar ve ark., 2016). miRNA'lar, farklılaşma, gelişme, metabolizma, hücre döngüsü düzenlemesi, apoptoz ve yaşlanma gibi önemli hücresel süreçlerde yer alır; ayrıca, kromatin yapısını değiştirmede ve genom stabilitesinin korunmasında kilit roller oynar (Hou ve ark., 2012). piRNA'lar 26-32 nt uzunluğundadır ve germ hücrelerinde *de novo* DNA metilasyonunun transkripsiyonel düzenlemesinde yer alır ve ayrıca, retrotranspozonların susturulmasını kontrol ederek genomik stabiliteyi korur. siRNA'lar, 21-25 nt uzunluğunda olup, işlevleri yabancı nükleik asitler ve transpozonlara karşı genom bütünlüğünü korumakla ilgilidir. lncRNA'lar, transkripsiyonel ve post-translasyonel düzenleyici mekanizmalar yoluyla gen

ekspresyonunun pozitif veya negatif düzenleyicileri olarak işlev görebilir; X inaktivasyonu ve damgalama gibi önemli biyolojik süreçlerde yer almaktadırlar (Akkaya ve Dinçer, 2013; Miguel ve ark., 2020; Villota-Salazar ve ark., 2016).

2.1.4. Epigenetik mekanizmaların rol aldığı biyolojik süreçler

Epigenetik mekanizmalar, önemli birçok biyolojik sürecin düzenlenmesinde rol oynar. Bunlardan bazıları şunlardır:

Hücresel farklılaşma

Epigenetik mekanizmaların birincil işlevlerinden biri, hücre tipine özgü gen ifadesinin düzenlenmesi ve sürdürülmesidir. Bir insan, kaslarda, kemiklerde ve beyinde farklı işlevler için özelleşmiş trilyonlarca hücreye sahiptir ve bu hücrelerin her biri özünde aynı genomu taşır. Hücreler arasındaki farklılıklar, çeşitli hücre türlerinde farklı gen gruplarının nasıl ve ne zaman açılıp kapatıldığına göre belirlenir (Ospelt, 2022; Seo ve ark., 2015).

X inaktivasyonu

Embriyonik gelişim sırasında, memeli dişi hücrelerinde iki adet bulunan X kromozomlarından birisi cinsiyetler arasında dozaj telafisi için susturulur. Susturulacak X kromozomu, baskılayıcı heterokromatin ile paketlenerek, bu kromozomun üzerinde bulunan genlerin ifade edilmesi önlenir. Böylece, sadece bir X kromozomuna sahip erkeklerle, iki X kromozomuna sahip dişiler arasındaki X kromozomu dengesi sağlanmış olur. İnsanda, inaktive edilecek kromozomun seçimi rastgele yapılır; bazı hücrelerde anneden gelen X inaktif olurken, bazılarında ise babadan gelen X inaktif olur. Sonuç olarak meydana gelen canlı X kromozomları açısından mozaiktir (Dvash ve Fan, 2011).

Genomik damgalanma (imprinting)

İlginç bir şekilde, epigenetik mekanizmalar, tanımlanmış 100'den fazla gen içeren ve damgalanmış genler adı verilen belirli bir gen kümesinin ifadesini düzenlemek için evrilmiştir. Bu genler ya anneden ya da babadan gelen kromozomdan (haploid ekspresyon) ifade edilirken, normal olarak genler anneden ve babadan gelen kromozomdan (diploid ekspresyon) ifade edilir (Demirtaş ve ark., 2016; Ospelt, 2022). Gene bağlı olarak, ya anneden ya da babadan gelen kopya yumurta veya sperm oluşumu sırasında metil gruplarının eklenmesiyle epigenetik olarak susturulur. DNA metilasyonu, damgalamanın altında yatan ana mekanizma olarak kabul edilir (Seo ve ark., 2015).

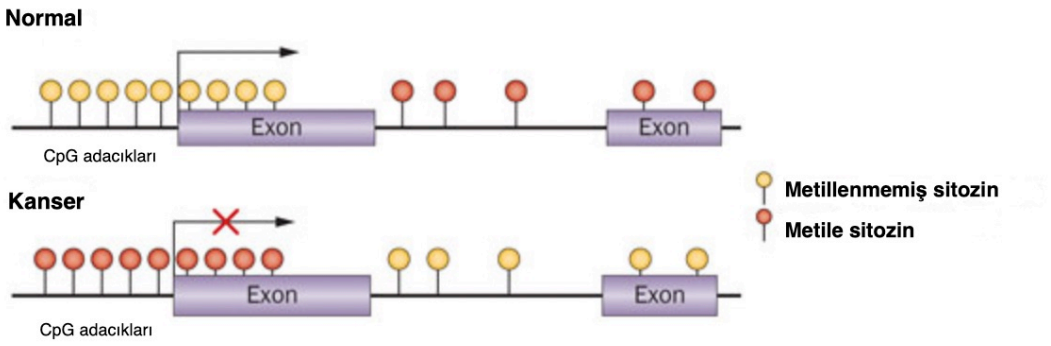
Şimdiye kadar insan ve farede en iyi karakterize edilen damgalanmış genler, baba tarafından ifade edilen insülin benzeri büyüme faktörü 2 (*Igf2*) ve anne tarafından ifade edilen *H19* (kodlamayan bir RNA'yı üreten) genidir (Seo ve ark., 2015). Bilinen damgalanmış genlerin çoğunun, memeli gelişimi sırasında büyüme, metabolizma veya davranışla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bora ve Yurter, 2007; Chao, 2011). Bu süre zarfında kaynakların anne, yavru ve kardeşler arasında dikkatli bir şekilde tahsis edilmesi gerektiğinden, kaynaklar için rekabetin bu genler üzerinde seçici baskı oluşturduğu öne sürülmektedir (Chao, 2011). Damgalanmış genlerde, susturma kaybı veya anormal ekspresyon örneğin Angelman- veya Prader-Willi sendromunda görüldüğü gibi ciddi gelişimsel eksikliklere neden olur veya Beckwith-Wiedemann sendromlu hastalarda olduğu gibi tümör gelişimi riskini kuvvetle artırır (Ospelt, 2022).

Kanser

Kanser, hücrelerimizin kontrolsüz ve sınırsız şekillerde çoğalarak başka doku veya organlara yayılmasıdır. Kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm oranı en yüksek hastalık kanserdir (Karataş ve Tunçdemir, 2021). Genetik olaylar tek başına karsinogenezi açıklamaya yeterli olmamaktadır. Epigenetik bilimi kanserin, genlerdeki bozuklukluların yanı sıra, genlerin kendi arasında ve çevreyle ilişkisine de bağlı geliştiğini göstermiştir. Dolayısıyla kanser hem genetik hem de epigenetik süreçlerdeki değişimlerin birikimiyle meydana gelen ve pek çok adımdan oluşan karmaşık bir hastalıktır. Kanserde DNA'da meydana gelen mutasyonlardan çok daha fazla epigenetik değişimlerin meydana geldiği düşünülmektedir (Akkirpik ve ark., 2017; Ayaz ve ark., 2019).

Birçok çalışmada, DNA metilasyon profilinde meydana gelen değişikliklerin karsinogenezin erken safhalarında ortaya çıktığı ve bunun kanser gelişimindeki ilk ortaya çıkan yıkıcı mekanizmalardan olduğu gösterilmiştir (Özen ve ark., 2017). Bu nedenle tedavi etkinliği için kritik bir konu olan kanserin erken tanısında önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bu değişikliklerin, girişimselliği düşük ya da hiç olmayan yöntemlerle ulaşılabilir vücut sıvılarındaki hücrelerden elde edilen DNA'da saptanabilir olması diğer bir olumlu noktadır (Akkirpik ve ark., 2017; Tang ve ark., 2016). Çeşitli kanser türlerine sahip hastalardan alınan vücut sıvıları; kolon ve pankreas kanserinde dışkı, mesane kanserinde idrar ve akciğer kanserinde balgam ve bronkoalveoler lavaj dahil olmak üzere, kanserin DNA'da anormal şekilde metillenmiş gen dizileri yoluyla saptanmasında başarıyla kullanılmıştır (Herman ve Baylin, 2003).

DNA metilasyonu ve kanser arasındaki ilişki ilk kez 1983 yılında ortaya konmuştur (Robertson, 2005). Kanser hücrelerinin DNA metilasyonu profili, normal hücrelerden çarpıcı iki farklılık gösterir (Şekil 2.3): (1) global DNA metilasyon seviyelerinde bir azalma (hipometilasyon) ve (2) promotor bölgelerdeki CpG adacıklarında hipermetilasyon (Neidhart, 2016).



Şekil 2.3. Kanserde DNA metilasyon profili

Hücre döngüsünde, DNA tamirinde ve apopitozda görev alan tümör baskılayıcı genlerin promotor bölge hipermetilasyonu, bu genlerin susturulmasına neden olur. Bu tür epigenetik mutasyon, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesine ve çoğalmasına izin vererek tümör oluşumuna yol açar (Bora ve Yurter, 2007; Estellller, 2007). Promotor bölge hipermetilasyonu nedeniyle transkripsiyonel olarak susturulmuş olduğu yaygın olarak tespit edilen genler şunları içerir: sikline bağımlı kinaz inhibitörü *p16*, hücre döngüsü inhibitörü; *MGMT*, DNA onarım geni; *APC*, hücre döngüsü düzenleyicisi; *MLH1*, DNA onarım geni; ve başka bir DNA onarım geni olan *BRCA1* (Jones ve Baylin, 2002). Tümörün tipine göre hipermetile olan tümör baskılayıcı gen sayısı ve metilasyon oranı değişmektedir. Örneğin *GSTP1* geni prostat kanserlerinde %90 metile iken akut miyeloid lösemide çoğunlukla metile değildir (Estellller, 2007; Meiers ve ark., 2007). Kanser türlerinin teşhisinde birden

çok genin metilasyon profillerinin incelenmesi epigenetik testler arasında ümit vericidir çünkü birden çok tümör baskılayıcı genin kanserli olmayan insan dokusunda promotor hipermetilasyonu tarafından nadiren susturulduğu bulunmuştur. Metilasyona duyarlı PCR yöntemleriyle çıkarılan tümör baskılayıcı gen metilasyon profili; akciğer, servikal, tiroid ve meme kanserlerini tespit etmek için başarıyla kullanılmıştır (Hoque ve ark., 2005; Riley ve Anderson, 2011; Topaloglu ve ark., 2004). Akciğer kanseri olan hastalardan alınan balgam örnekleriyle yürütülen çalışmalar, sigara içen kişilerde tümörlerin klinik olarak saptanmasından üç yıl öncesine kadar erken sürede kanserin saptanabileceğine veya gelişiminin tahmin edilebileceğine dair umut verici kanıtlar sağlamaktadır (Palmisano ve ark., 2000).

Kanserli bir hücrenin genomu, sağlıklı bir hücrenin genomundan önemli ölçüde daha az 5-mC'e sahiptir (Neidhart, 2016). Normal hücrelerde, genomun büyük bir kısmını oluşturan tekrar dizilerinin ve transpozonların CpG bölgelerinde metilasyon oranı yüksektir. Bu bölgelerin metillenmesi ile transkripsiyon baskılanmakta ve genom içi hareketlilik engellenerek kromozomun kararlı yapısı korunmaktadır. Global hipometilasyon; onkogen aktivasyonu, damgalama kaybı ve transpozon hareketliliği gibi mekanizmalar nedeniyle kromozom kararsızlığına yol açmakta ve bu da hücreyi kansere götürmektedir (Cadieux ve ark., 2006; Esteller, 2007; Robertson, 2005).

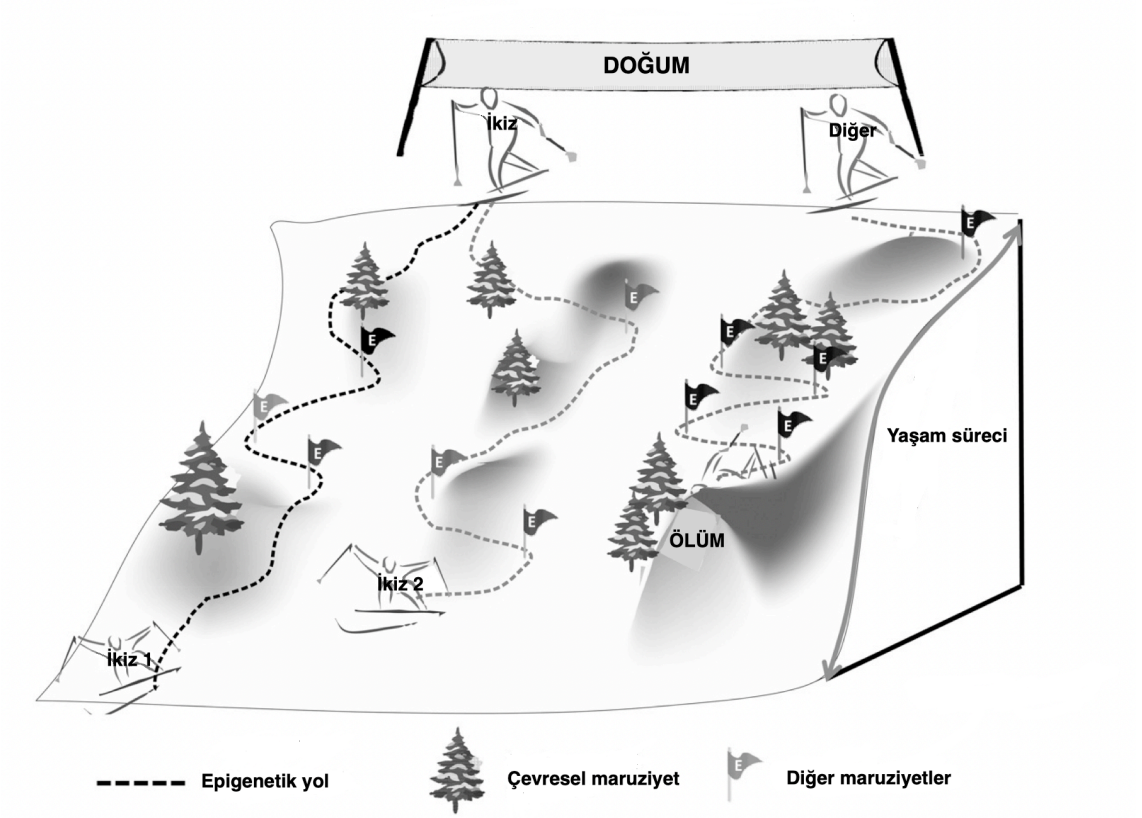
Yaşlanma

Epigenetik patern, yaşlanma sürecinde dış ve endojen faktörlere cevap olarak sporadik olarak değişir. Global DNA metilasyon seviyeleri yaşla birlikte azalmaktadır. Fakat beyin, karaciğer, kalp ve kan hücrelerinde CpG adacıkları üzerindeki toplam metilasyon seviyelerinin yaşa bağlı olarak arttığı gösterilmiştir (Sarıgöl ve Ündeğer Bucurgat, 2014). Bu durumun kanser, nörodejeneratif hastalıklar

ve ateroskleroz gibi yaşa bağlı hastalıklarla bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Özgür ve ark., 2020).

2.2. Çevresel Epigenetik

Çevresel epigenetik, çevre ile epigenom arasındaki etkileşimin fenotipi değiştirebileceği ve hastalığa yatkınlıkla ilişkili olabileceği fikrinden ortaya çıkar. Ve en önemlisi, bu değişiklikler nesiller boyunca aktarılabilir. Her birey yaşama bir bireyi belirli hastalıklara yatkın hale getirebilecek bir genom ve epigenom ile başlar. Yaşam süreci boyunca her birey, çeşitli sağlık sorunlarına yol açan çok sayıda farklı dış çevre faktörüne ve yaşam tarzına bağlı faktörlere (sigara, alkol tüketimi, yasadışı madde kullanımı, UV ışığına maruziyet vb.) maruz kalır. Maruziyete bağlı olarak, her bireyin içindeki epigenomik imzanın büyüklüğü farklı olur ve bu da genlerin ifadesinde değişikliklere yol açar. Bireyler, yaşam seyri boyunca gelişen çevre epigenom etkileşimlerine bağlı olarak, hayatı farklı hastalık yükleriyle tamamlar. Örneğin; ikizler, yaşamları boyunca deneyimledikleri tüm maruziyetlerin toplamı farklı olduğundan farklı hastalık sonuçlarına sahip olurlar (Ho ve ark., 2012) (Şekil 2.4).

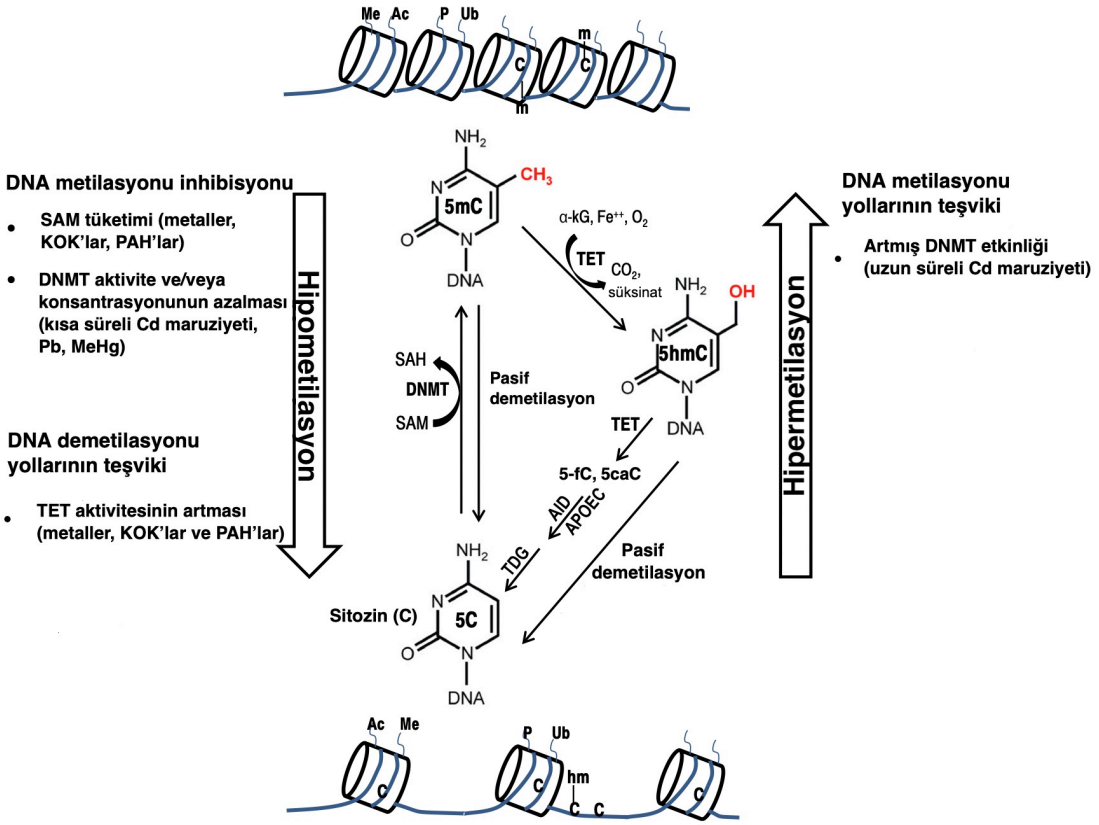


Şekil 2.4. Epigenetik ve çevre etkileşimleri (Ho ve ark., 2012)

Endokrin bozucular, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), bulaşıcı patojenler, hava kirleticileri, endüstriyel kimyasallar, pestisitler ve ağır metaller gibi çevresel faktörlerin, maruz kalma ve/veya hastalıkla ilişkili bir şekilde epigenetik değişiklikleri tetiklediği gösterilmiştir. Bu ilişkiler kanser, kalp-damar hastalıkları, solunum yolu hastalıkları, obezite, diyabet, inme ve nörodejeneratif bozukluklar gibi birçok karmaşık hastalıkta gözlenmektedir (Ho ve ark., 2012; Lorenzen ve ark. 2012; Edwards ve Myers, 2007).

Yaşam tarzına bağlı faktörlerin ötesinde, çevresel kimyasalların DNA metilasyonunun anormal düzenlenmesindeki rolü, önemli ölçüde ilgi görmektedir. DNA metilasyonu, X kromozomu inaktivasyonu, genomik damgalama, kromozom stabilitesi ve gen transkripsiyonu dahil olmak üzere birçok hücresel sürecin düzenlenmesinde yer aldığından, DNA metilasyonundaki değişiklikler, çevresel kimyasalların hastalık

yüküne olan katkısına biyolojik makullük katar. Çevresel kimyasallar tek karbon ve sitrik asit metabolizma yollarına müdahale ederek genom boyunca anormal DNA metilasyon durumuna neden olabilir (Ruiz-Hernandez ve ark., 2015). Çevresel kimyasalların DNA metilasyonu üzerindeki önerilen etki mekanizmalarının bir özeti Şekil 2.5'te gösterilmektedir.



Şekil 2.5. Çevresel kimyasalların DNA metilasyonu üzerindeki olası etki mekanizmalarına genel bakış (Ruiz-Hernandez ve ark., 2015)

Metaller, kalıcı organik kirleticiler (KOK) ve PAH'lar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu artırır ve böylece serbest radikallerin oluşumuna yol açar. ROS, kimyasallar veya metabolitleri ile konjugasyon yoluyla glutatyon (GSH) tüketimi gerçekleşir. Olağan koşullar altında, hem metiyonin hem de GSH sentez yollarına katkıda bulunan homosistein, metiyonin sentez yollarından ziyade GSH için kullanılır. Bu durum, SAM sentezinin azalmasına neden olur. SAM'in tükenmesi

potansiyel olarak DNA metilasyonunu inhibe eder ve müteakip DNA hipometilasyonuna neden olur (Lee ve ark., 2009). Kısa süreli kadmiyum, PAH, kurşun ve metil cıva maruziyeti gibi belirli çevresel kimyasallara maruz kalma, DNMT'nin enzimatik aktivitesini ve konsantrasyonlarını doğrudan azaltabilir (Cheng ve ark., 2012). Ek olarak, izositrattan α-KG üretimini uyarmak için oksidatif stres önerilmiştir. α-KG, demir ve oksijen (kofaktörler) varlığında 5-mC'nin 5-hmC, 5-fC ve 5-caC'e oksidasyonunu katalize eden TET proteinlerini aktive eder. 5-hmC, 5-fC ve 5-caC; AID, APOEC ve TDG gibi DNA onarım enzimlerini içeren hem pasif hem de aktif DNA demetilasyon yollarında bir ara ürün olarak işlev görebilir. Genel olarak, DNA hipometilasyonunu kolaylaştırır (Ruiz-Hernandez ve ark., 2015). Diğer taraftan, uzun süreli kadmiyum maruziyetinin, artan DNA metilasyonuna yol açabilecek DNMT ekspresyonunu indüklediği öne sürülmüştür (Takiguchi ve ark., 2003). Bunların yanısıra, metaller, DNA metilasyonu veya demetilasyon mekanizması ile etkileşime girebilen histon kuyruklarındaki kovalent modifikasyonlarda yer alan enzimleri modüle edebilir. Yapılan çalışmalarda; kurşun, transkripsiyonu aktive edici histon modifikasyonları ile ilişkilendirilirken, metilcıva ve nikel, transkripsiyonu baskılayıcı histon modifikasyonları ile ilişkili bulunmuştur (Cheng ve ark., 2012).

2.2.1. Metaller

Ağır metallerin insan sağlığı üzerinde zararlı etkileri vardır ve bu metallere maruz kalma, endüstriyel ve antropojenik faaliyetler ve modern sanayileşme ile artmıştır. Su, hava ve toprağın toksik metallerle kirlenmesi çevresel bir sorundur ve dünya çapında yüz milyonlarca insan etkilenmektedir. Ağır metallerle gıda kontaminasyonu, insan ve hayvan sağlığı için başka bir endişe kaynağıdır. Her yerde bulunmaları ve yok

edilemez yapıları, metalleri çevresel kirleticilerin en dirençli şekli haline getirir. Bu nedenle, insanların metallere maruz kalması kaçınılmazdır (Balali-Mood ve ark., 2021, Martinez-Zamudio ve Ha, 2011; Salnikow ve Zhitkovich, 2008).

Toksik metallere (kadmiyum, nikel, arsenik, krom vb.) kronik çevresel maruziyetin, maruz kalan kişilerde kanser, kalp-damar hastalıkları, nörolojik bozukluklar ve otoimmün hastalıklar gibi bir dizi hastalığa neden olduğu bilinmektedir (Hou ve ark., 2012). Kanserojen metaller, krom hariç, tipik olarak zayıf mutajenlerdir, bu da genetik temelli mekanizmaların metal kaynaklı karsinojenezden birincil derecede sorumlu olmayabileceğini düşündürmektedir. Metal kaynaklı karsinojenezin arkasındaki kesin epigenetik mekanizmalar henüz aydınlatılmamış olsa da, çeşitli metallere kronik maruziyetin gen regülasyonunda anormal değişikliklere neden olduğu iyi bilinmektedir (Ziech ve ark., 2010). Metallere potansiyel maruz kalma kaynakları arasında mesleki maruziyet, sanayileşmiş ülkelerdeki imalat faaliyetlerindeki büyük artış, demir dışı metallerin yüksek tüketimi ve metal içeren atık ürünlerin bertaraf edilmesindeki kötü uygulamalar yer almaktadır (Arita ve Costa, 2011).

2.2.1.1. Krom

Krom (Cr), toprakta, kayalarda ve canlı organizmalarda yaygın olarak bulunan doğal oluşumlu bir ağır metaldir. Cr, iki ana kararlı oksidasyon durumunda bulunur: trivalent krom [Cr(III)] veya hekzavalent krom [Cr(VI)]. Cr(III) insan üzerinde bazı yararlı etkiler gösterirken; Cr (VI) kanserojen bir ajan olarak tanımlanmıştır (Wang ve ark., 2012a). Çevresel Cr(VI) maruziyeti başlıca su, hava, otomobil egzozu ve sigara tüketimi yoluyla olur. Cr(VI)'ya mesleki maruziyet genellikle deri tabaklama, eritme, kaynak yapma, paslanmaz çelik üretimi ve pigment üretimi gibi endüstriyel

ortamlarda meydana gelir; mesleki Cr(VI) maruziyetinin ana yolları inhalasyon veya dermal absorpsiyondur. Kanda kromun çoğu, özellikle transferrin olmak üzere plazma proteinlerine bağlanır; kromun sadece yaklaşık %5'i serbesttir (Yang ve Black, 1994). Cr, insan vücudunda başlıca karaciğer, dalak, yumuşak doku ve kemikte birikir. Cr esas olarak üriner sistem yoluyla atılır; bu nedenle üriner Cr düzeyi, Cr emiliminin iyi bir göstergesidir. Çevresel ve mesleki Cr(VI) maruziyeti, önemli halk sağlığı sorunları haline gelmiştir. Cr(VI) maruziyeti, solunum sistemi, cilt, gastrointestinal (GI) sistem ve böbrekler üzerinde bir dizi olumsuz etkiye neden olabilir (den Braver ve ark., 2021). Akut yüksek seviyeli Cr zehirlenmesi genellikle ölümcüldür; kanıtlanmış bir antidot mevcut değildir ve tedaviler genellikle destekleyici ve semptomatiktir. Akut Cr intoksikasyonu için oral olarak uygulanan askorbik asit, şelatlayıcı reaktifler ve değişim transfüzyonu denenmiştir; ancak, mevcut kanıtlar bu tedavilerin akut Cr zehirlenmesinde uygulanmasını desteklemek için yeterli değildir. Kronik düşük doz Cr maruziyeti olan hastalar için özel bir tedaviye gerek yoktur ve hastalar daha fazla maruziyetten kaçınmalıdır (Bradberry ve Vale, 2001). Cr(VI) bileşikleri, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından Grup 1 karsinojenleri olarak sınıflandırılmıştır. Güçlü bir insan kanserojeni olarak, Cr(VI) maruziyeti, mesleki olarak maruz kalan işçiler arasında artmış akciğer kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir. Önemli kanıtlar ayrıca Cr (VI) maruziyetinin kromozom aberasyonuna, kardeş kromatid değişimlerine, gen mutasyonuna, DNA zincir kırılmalarına ve oksidatif DNA hasarına neden olabileceğini göstermiştir. Cr(VI) ile indüklenen genotoksisite ve mutajenitenin, Cr(VI) karsinojenezinin birincil mekanizmaları olduğu düşünülse de, son yıllarda artan sayıda çalışma, değişen epigenetik modifikasyonların Cr(VI) kaynaklı kansere katkıda bulunduğunu göstermiştir (Wang ve ark., 2012).

2.2.1.2. Nikel

Nikel (Ni), toprak, hava ve suda yaygın olarak bulunan ferromanyetik bir ağır metaldir. Ni, çevresel veya mesleki maruziyet üzerine çeşitli toksik etkilere sahiptir. Çevresel maruziyet esas olarak kontamine toprak, gıda, su ve hava yoluyla olur. Eşsiz fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı Ni, alaşım üretimi, galvanik kaplama ve pil üretimi gibi modern metalurji endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Mesleki maruziyet genellikle bu endüstriyel ortamlarda meydana gelir ve dünya çapında milyonlarca işçinin sağlığını tehdit eder. Ni, kirleticinin kimyasal formuna bağlı olarak insan vücuduna soluma, sindirim ve deri emilimi dahil olmak üzere birçok yoldan girebilir. Solunum, akciğer kanseri riskinin artmasıyla ilişkili olan nikele maruz kalmanın en yaygın ve en riskli yoludur. Solunan Ni parçacıkları, parçacıkların çapına, çözünürlüğüne ve miktarına bağlı olarak solunum sisteminin farklı yerlerinde biriktirilir. Suda çözünen Ni bileşikleri akciğerler tarafından emilerek kana karışır ve son olarak böbreklerden atılır. Çözünmeyen Ni bileşikleri, solunum sisteminde çok daha uzun süre kalarak solunum şikayetlerine ve hatta akciğer kanserine neden olurlar (Genchi ve ark., 2022). Nikele maruz kalmak, maruz kalınan maddenin dozuna, kimyasal özelliklerine ve maruziyet süresine bağlı olarak insan sağlığı üzerinde, kontakt dermatit, alerji, astım, kardiyovasküler fonksiyon bozukluğu, böbrek hastalıkları, akciğer fibrozu gibi çeşitli toksik etkilere neden olabilir. Akut Ni zehirlenmesi, diğer ağır metal zehirlenmelerinin tedavisinde olduğu gibi, şelatlayıcı reaktiflerle tedavi edilebilir. Ni bileşikleri IARC tarafından Grup 1 karsinojenler olarak sınıflandırılmıştır. Nikele uzun süreli maruz kalmanın, akciğer ve burun kanserleri dahil olmak üzere birçok insan kanseri türüne neden olduğu bilinmektedir. Çok sayıda çalışma, nikelin düşük mutajenik potansiyele sahip olduğunu ve nikelin ağırlıklı olarak DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kodlamayan RNA'lar

dahil olmak üzere epigenetik mekanizmalar yoluyla kansere neden olduğunu göstermiştir (Arita ve Costa. 2011; Zhao ve ark., 2022).

2.2.1.3. Kurşun

Kurşun (Pb), yer kabuğunda küçük miktarlarda bulunan doğal olarak oluşan mavimsi gri bir metaldir. Genellikle çinko, gümüş ve bakırın bulunduğu madenlerde bulunur ve bu metallerle birlikte çıkarılır. Pb çevrede doğal olarak bulunmasına rağmen, fosil yakıtların yakılması, madencilik ve imalat gibi antropojenik faaliyetler yüksek konsantrasyonların salınmasına katkıda bulunur. Kurşunun birçok farklı endüstriyel, tarımsal ve evsel uygulaması vardır (Tchounwou ve ark., 2012). Akü üretimi başta olmak üzere, pigment ve boyalarda, seramik yapımında, kablo izolasyonunda, mühimmat üretiminde, alaşımlarda ve benzin katkısı olarak kurşun kullanılmaktadır (Bakırcı ve Gedik Bakırcı, 2007). Benzin, boya ve lehimlerde Pb kullanımını yasaklayan düzenlemeler son yıllarda çevredeki kurşunu azaltmıştır (Ruiz-Hernandez ve ark., 2015). Pb maruziyetinin en yaygın kaynakları: kurşunla kirlenmiş toz partiküllerinin veya aerosollerin solunması; Pb ile kirlenmiş gıda ve suyun yutulması; metal geri dönüşümü ve pil endüstrisi gibi endüstriyel faaliyetlerle doğrudan teması içerir. Kurşunun uzun biyolojik yarı ömrü ve kümülatif özellikleri nedeniyle, Pb maruziyetinin insan sağlığı üzerindeki çeşitli olumsuz etkileri kabul edilmiştir. Vücuda giren Pb karaciğer, böbrek ve akciğer gibi yumuşak dokulara kan yoluyla taşınır ve başka bir forma dönüştürülmez. Organlara yayılan kurşunun büyük bir kısmı kemiklerde depo edilmeden önce böbrek yoluyla, az bir kısmı da ter, saç, tırnak ve safra yoluyla vücuttan atılır (Bal ve ark., 2016). Kurşuna akut maruziyet beyin hasarı, böbrek hasarı ve gastrointestinal hastalıklara neden olurken, kronik maruziyet kan, merkezi sinir sistemi, kan basıncı, böbrekler ve D vitamini metabolizması

üzerinde olumsuz etkilere neden olabilir. Yüksek Pb seviyelerine maruz kalmak beyin ve böbreklere ciddi şekilde zarar verebilir ve ölüme götürebilir (Tchounwou ve ark., 2012). Kurşunun klinik önemi kan hücreleri ve sinir hücrelerindeki kronik etkilerinden kaynaklanmaktadır. Önemli bir enzim inhibitörü olarak hücrelere geçen kurşun, selenyum ve sülfür içeren enzimlerin antioksidan etkinlik göstermesini engellemektedir (Dündar ve Aslan, 2005). Akut Pb zehirlenmesinde, genel tedavi prensipleri uygulanır. Absorbsiyonu engellemek için mide %3'lük sodyum sülfat çözeltisi ile yıkanır. Sistemik zehirlenmede hemen $CaNa_2$ EDTA ile antidot tedavisine geçilir (Vural, 2005). İnorganik Pb bileşikleri IARC tarafından Grup 2A kanserojenler olarak sınıflandırılmıştır. *İn vitro* ve *in vivo* çalışmalar, kurşun bileşiklerinin, DNA sentezi ve onarımının inhibisyonu, oksidatif hasar ve DNA bağlayıcı ve tümör baskılayıcı proteinler ile etkileşimi içeren çeşitli dolaylı mekanizmalar yoluyla genetik hasara neden olduğunu göstermiştir (Tchounwou ve ark., 2012).

2.2.1.4. Kadmiyum

Kadmiyum (Cd), antropojenik aktivitelerden dolayı çevrede yüksek seviyelerde bulunan, biyolojik olarak toksik bir geçiş metalidir. Mesleki olmayan maruziyet, tütün dumanından ve kontamine yiyecek veya suyun yutulmasından kaynaklanır (Virani ve ark., 2016). Kanda, kadmiyumun çoğu albümin ve metallotiyonein gibi taşıyıcı proteinlere bağlıdır. Cd karaciğer tarafından alınabilir, burada Cd metallotiyonein üretimini indükler ve hepatosit nekrozuna ve apoptoza neden olur. Uzun süreli Cd birikimi için ana organ böbrektir. İdrarla atılım, çok yavaş olmasına rağmen vücuttan Cd eliminasyonunun ana mekanizmasını temsil eder. Yavaş atılım nedeniyle, Cd istisnai derecede uzun bir yarılanma ömrüyle birikebilir ve bu da Cd kontaminasyonunun, maruz kalma sona erdiğinde bile onlarca yıl boyunca önemli bir

halk sağlığı sorunu olmaya devam etmesine neden olur. Kadmiyum maruziyeti iskelet, böbrek, sindirim ve solunum sistemleri gibi çoklu organ sistemlerinde hasara ve işlev bozukluğuna neden olabilir. Örneğin, kadmiyumun iskelet sistemi demineralizasyonuna ve Itai-Itai hastalığına, kemik ağrısına, fiziksel bozulmaya ve hatta kemik kırıklarına neden olduğu gösterilmiştir (Godt ve ark., 2006). Ağırlıklı olarak böbrekte biriktiğinden, kadmiyuma uzun süreli maruz kalma, proteinüri, aminoasidüri ve azalmış glomerüler filtrasyon hızı gibi böbrek fonksiyon bozukluğuyla sonuçlanabilir. Cd intoksikasyonuna yönelik tedaviler temel olarak etilendiamintetraasetik asit (EDTA), penisilamin (DPA), dimerkaprol ve ditiokarbamatlar gibi kenetleme maddelerinin kullanılmasını içerir. Plazma değişimi, acil durumlarda Cd zehirlenmesi için de kullanılabilir. Cd, IARC tarafından Grup 1 karsinojen olarak sınıflandırılmıştır. Pb maruziyeti tiroid, prostat, meme, mesane ve akciğer kanseri riskinde artış ile ilişkilidir. Çalışmalar, oksidatif stresin indüklenmesi, inhibe edilmiş DNA onarım mekanizması ve anormal gen ekspresyonu dahil olmak üzere, Cd kaynaklı karsinojenezin bazı mekanizmalarını ortaya çıkarmıştır (Zhao ve ark., 2022). Özellikle, kadmiyumun insanlar için iyi bilinen bir kanserojen olmasına rağmen, kanseri tetiklediği mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır. Cd ayrıca DNA'ya düşük afinitesi ve düşük mutajenitesi olan bir kanserojendir, bu da genotoksik olmayan yollarla etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Son yıllarda epigenetik mekanizmaların Cd karsinogenezinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Virani ve ark., 2016).

2.3. Global DNA Metilasyonu Analizi

Gelişen epigenetik alanında, DNA örneklerinin metilasyon durumunu belirlemek için global (tüm genom) ve gene özgü çeşitli yöntemler mevcuttur (Olkhov-Mitsel ve

Bapat, 2012). Bu yöntemler, ürettikleri veri türlerinde, maliyetlerinde ve örnek gereksinimlerinde önemli ölçüde farklılık gösterir. Elde edilebilecek en temel veri türü, genomda bulunan 5-mC miktarının kompozit bir ölçüsüdür (Petrov ve Riddle, 2016).

DNA metilasyonunun analizi için uygun yaklaşım, çalışmanın amaçlarına bağlı olmakla birlikte, yöntem seçerken göz önünde bulundurulması gereken birkaç önemli faktör vardır: DNA örneklerinin miktarı ve kalitesi; çalışmanın duyarlılığı ve özgüllük gereksinimleri; yöntemin sağlamlığı ve kolaylığı; özel ekipman ve reaktiflerin mevcudiyeti; maliyet (Kurdyukov ve Bullock, 2016).

Global DNA metilasyonunun belirlenmesinde kullanılan temel yöntemlerden bazıları aşağıda açıklanmaktadır.

HPLC-UV

Kuo ve ark. (1980) tarafından geliştirilen HPLC-UV (yüksek performanslı sıvı kromatografisi-ultraviyole) tekniği günümüzde halen hidrolize DNA örneğindeki deoksisitidin (dC) ve metile sitozin miktarını (5-mC) belirlemek için mevcut "altın standart" test olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, bu yöntemin faydası, özel laboratuar ekipmanına ve nispeten büyük miktarlarda (3–10 μg) DNA örneğine olan gereksinim sebebiyle ile önemli ölçüde sınırlıdır. Kısaca; DNA, nükleosit bileşenlerine hidrolize edilir, 5-mC ve dC bazları, kromatografik olarak ayrılır ve fraksiyonlar ölçülür. Daha sonra, her bir örnek için 5-mC/dC oranı hesaplanabilir ve bu, deney ve kontrol örnekleri arasında karşılaştırılabilir (Kurdyukov ve Bullock, 2016; Lisanti ve ark., 2013; Shen ve Waterland, 2007).

LC-MS/MS

Tandem kütle spektrometresi ile birleştirilen sıvı kromatografisi (LC-MS/MS), daha küçük miktarlarda hidrolize DNA örneği gerektiren, HPLC-UV'ye alternatif yüksek duyarlılığa sahip bir yöntemdir. Tüm sitozin bazlarının ~%2-%5'inin metillendiği memeli DNA'sında, LC-MS/MS, %0.05 ile %10 arasında değişen metilasyon seviyelerini tespit etmek için doğrulanmıştır. Prosedür, rutin olarak 50–100 ng DNA örneği gerektirir, ancak çok daha küçük miktarlar (5 ng) başarılı bir şekilde profillenmiştir. Bu yöntemin bir başka önemli yararı, zayıf kalitede DNA'dan olumsuz etkilenmemesidir. Bununla birlikte, gerekli uzmanlık ve ekipman sınırlıdır ve bu yüzden DNA metilasyonunu analiz etmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntem değildir (Kurdyukov ve Bullock, 2016).

Bu nedenle, global metilasyon içeriğini hesaplamak için daha az DNA ve daha kolaylıkla kullanılabilen ve ulaşılabilen ekipman gerektiren yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar, genomik tekrar elementlerinin [örneğin Alu ve uzun serpiştirilmiş nükleotit elementleri (LINE)] metilasyon durumunu belirleyen bisülfit dönüşümü-PCR temelli yöntemleri, luminometrik metilasyon analizi (LUMA) gibi metilasyona duyarlı restriksiyon analizlerini ve enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA) temelli analizleri içermektedir (Kurdyukov ve Bullock, 2016; Lisanti ve ark., 2013; Shen ve Waterland, 2007)

Alu /LINE-1 + pirosekanslama

Alu ve LINE-1 analizlerinde, bisülfitle dönüştürülmüş DNA'daki spesifik sitozinlerin metilasyon durumu genellikle DNA örnekleri arasındaki ~%5 kadar küçük farklılıkları çözebilen pirosekanslama ile ölçülür (Kurdyukov ve Bullock, 2016; Lisanti ve ark., 2013). Bisülfit dönüşümü sodyum bisülfit ile DNA’da bulunan

metillenmemiş sitozinlerin deamine olarak urasile dönüştürülmesi işlemidir. DNA'daki metillenmiş olan sitozinler reaksiyon süresince değişmeden kalır. Dönüşüm işlemi bittikten sonra Alu/LINE-1 sekansları PCR ile amplifiye edilir ve amplifiye edilmiş fragmanların metilasyon durumu pirosekanslama ile belirlenir. Pirosekanslama esnasında urasile çevrilen metillenmemiş sitozinler timin olarak, metillenmiş sitozinler ise sitozin olarak ölçülür. Teknik, Alu ve LINE-1 elementlerini ve dolayısıyla nispeten az CpG bölgesini değerlendirse de, bunun global DNA metilasyon değişikliklerini çok iyi yansıttığı gösterilmiştir (Kurdyukov ve Bullock, 2016; Lisanti ve ark., 2013; Shen ve Waterland, 2007).

LUMA

Luminometrik metilasyon analizi (LUMA), belirli bir genomda mutlak DNA metilasyon seviyelerini ölçen bir araçtır. Sadece 250-500 ng DNA girişi ile global metilasyonun kantitatif ölçümü sağlar ve referans genomik sekansı olmayan herhangi bir tür üzerinde gerçekleştirilebilir (Sant ve ark., 2012). LUMA, genel metilasyon yüzdesini tespit etmek için metilasyon duyarlılığına dayalı farklılık gösteren restriksiyon enzimleri kullanır. İki restriksiyon enzimi, HpaII ve MspI, 5′-CCGG-3 dizisini paralel olarak gerçekleştirilen reaksiyonlarla ikiye ayırır; HpaII metilasyona duyarlı olup sadece metillenmemiş alanları keserken, MspI metilasyona duyarsızdır ve hem metile hem de metillenmemiş alanları böler. Parçalanma oranı HpaII/MspI, pirosekanslama ile belirlenir ve sonuçta elde edilen oran, örneğin metilasyon içeriği ile ters orantılıdır (Kurdyukov ve Bullock, 2016; Lisanti ve ark., 2013).

ELISA

Bir enzim bağlantılı konjugat ve enzim substratı kullanılarak elde edilen renk değişimi yoluyla antijen-antikor reaksiyonlarını gösteren ve biyolojik sıvılardaki

moleküllerin varlığını ve konsantrasyonunu belirlemeye yarayan kantitatif analitik yöntemler genellikle enzim immünotestleri [enzyme immunoassay (EIA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)] olarak adlandırılır. Peptitler/proteinler, hormonlar, vitaminler ve droglar gibi çok düşük konsantrasyonlu moleküller, kendileri için geliştirilmiş antikorlara veya antijenlere karşı yüksek bir özgüllük seviyesi sergiler. Bunun nedeni, bir antikorun kendi antijeni dışındaki bir moleküle bağlanmasının neredeyse imkansız olmasıdır. Bu nedenle, bu yöntem çok düşük konsantrasyonlarda bile maddelerin hiçbir girişim riski olmadan ölçülmesi için kullanılabilir. Başka bir deyişle, bu yöntemi kullanarak belirli bir maddeye özgü olduğunu bildiğimiz antijene sahip olduğumuzda, antikorunun türünü ve miktarını belirleyebiliriz ve antikorumuz olduğunda, spesifik antijenini ve antijen miktarını bulabiliriz (Aydin, 2015; Gan ve Patel, 2013).

ELISA yönteminde kullanılan antijen, bir katı faza bağlanır. Katı faz olarak sert polistiren, polivinil ve polipropilenden yapılmış tüpler ve mikroplaklar kullanılır. Kullanılan mikroplaklar, antijeni ve antikoru uygun şekilde adsorbe edebilmeli, ancak diğer fazlardaki bileşenleri adsorbe etmemelidir. ELISA'da kullanılabilen enzimler arasında beta galaksidaz, glukoz oksidaz, peroksidaz ve alkalin fosfataz gibi substratları renkli ürünlere çevirebilme yeteneğinde olan enzimler bulunur. Enzim-substrat reaksiyonu genellikle 30-60 dakika içinde tamamlanır. Sonuçlar, kullanılan konjugatın özelliklerine bağlı olarak bir spektrofotometrede ve 400-600 nm'de ölçülür (Aydin, 2015; Yalınay Çırak, 1999).

İsviçreli bilim adamları Engvall ve Perlmann tarafından 1971 yılında radyoimmün test yöntemlerine alternatif olarak geliştirilen ELISA zamanla birçok farklı uygulama alanları bulmuş ve dünya çapında araştırma ve teşhis laboratuvarlarında rutin olarak

kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. ELISA yöntemi ile ölçülecek maddelerin yapısı ve özellikleri her zaman aynı olmadığından, ölçümün özgünlüğünü arttırmak için çeşitli ELISA tipleri geliştirilmiştir: direkt, indirekt, sandviç ve yarışmacı ELISA (Aydin, 2015; Yalınay Çırak, 1999).

Global DNA metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeyinin hızlı bir şekilde değerlendirilmesini sağlayan direkt, indirekt ve sandviç ELISA temelli farklı markalara ait kitler mevcuttur (Hamzeiy, 2014). Kısaca, DNA numunesi bir ELISA plağı üzerinde yakalanır ve metillenmiş sitozinler sıralı inkübasyon adımlarıyla tespit edilir: (1) 5-mC'e karşı sentezlenmiş bir birincil antikor; (2) işaretli bir ikincil antikor; ve daha sonra (3) kolorimetrik/florometrik tespit reaktifleri (Kurdyukov ve Bullock, 2016). Kitlerin popüler hale gelmesi, tayin için spektrofotometre kullanan 96 kuyucuklu bir formatta yüksek verim ve nispeten düşük maliyetteki basit, kısa (~3 saat) protokole bağlıdır. Ek olarak, bu kitler sadece yaklaşık 50–100 ng DNA gerektirir, bu da geleneksel HPLC analizlerine kıyasla önemli bir gelişmedir (Petrov ve Riddle, 2016).

ELISA ve diğer yöntemlerdeki gelişmelerden dolayı, global DNA metilasyon analizleri klinik araştırmalar için daha çekici hale gelmiştir. Özellikle, düşük miktarda başlangıç materyali ve yüksek verimli analiz potansiyeli klinik araştırma uygulamaları için önemlidir. Çeşitli çalışmalar, çevresel maruziyetlerin ya da ilaç tedavisinin epigenotip üzerindeki etkisini belirlemek için veya global metilasyon seviyeleri ile hastalık fenotipleri/prognozu arasındaki korelasyonu araştırmak için bu testleri kullanmaktadır. Dolayısıyla, genellikle bu yöntemler tarama araçları olarak ve global olarak gözlemlenen değişikliklerin kaynağını araştırmak için kullanılmaktadır (Petrov ve Riddle, 2016).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Alet ve Gereçler

Çalışma boyunca kullanılan alet ve gereçler ile marka ve modelleri Tablo 3.1'de verildiği gibidir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan alet/gereçlerin adları, marka-modelleri

Kullanılan Alet/Gereç	**Marka, Model**
ICP-MS (İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi) + Otomatik Örnek Yükleyici	Thermo Scientific, XSeries 2 + Cetac, ASX-520
Mikroplak Okuyucu	Poweam Medical, WHYM201
Florometre	Invitrogen™, Qubit® 2.0
Biyokimya Analizörü	BPC BioSed srl, Prime Eν
Isı Döngüleyici	Applied Biosystems, GeneAmp® PCR System 9700
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Direct-Q3
Etüv	Nüve, EN 500
Santrifüj	ALC, PK 121
Blok Isıtıcı	Wealtec Corp., HB-1
Vorteks	Nüve, NM 110
Otoklav	Nüve, OT 4060
Buzdolabı (+4 ºC)	Sharp
Derin Dondurucu (-20 ºC)	Arçelik
Derin Dondurucu (-86 ºC)	Hettich
Tek Kanallı Otomatik Pipetler (0.1-2.5 µL, 2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL)	Eppendorf
8 Kanallı Otomatik Pipet (30-300 µL)	Eppendorf

3.2. Kullanılan Kit ve Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan tüm kit ve kimyasal maddelerin adları, marka ve özellikleri Tablo 3.2'deki gibidir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan kit ve kimyasal maddelerin listesi

Malzemenin Adı	**Marka**
DNA İzolasyon Kiti	Zymo Research *Quick*-DNA™ Universal Kit
DNA Miktar Ölçüm Kiti	Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS Assay Kit
5-mC Miktar Ölçüm Kiti	Zymo Research 5-mC DNA ELISA Kit
5-hmC Miktar Ölçüm Kiti	Zymo Research Quest 5-hmC™ DNA ELISA Kit
Nitrik Asit	Merck %65 Suprapur®
İndiyum (%99.999, 1000 µg/mL, %2'lik HNO_3 içinde)	Absolute Standards
Galyum (%99.999, 1000 µg/mL, %2'lik HNO_3 içinde)	Absolute Standards
ICP-MS Çoklu Element Kalibrasyon Standardı (10 µg/mL; %2'lik HNO_3 + Tr HF içinde; Al, Sb, As, Ba, Be, Bi, B, Cd, Ca, Cr, Co, Cu, Eu, Ho, Fe, La, Pb, Li, Mg, Mn, Mo, Ni, Se, Ag, Na, Sr, Tl, Th, U, V, Yb, Zn)	High-Purity Standards
ICP-MS Tune Çözeltisi 8 (1000 µg/mL; %2'lik HNO_3 içinde; Ba, Be, Bi, Ce, Co, In, Pb, Li, Ni, U)	High-Purity Standards
Sertifikalı Referans İdrar Materyali	Sero Seronorm™ Trace elements urine L-2 (SERO210705)
Argon Gazı (%99.999)	Habaş

3.3. Kan ve İdrar Örneklerinin Toplanması

Çalışmanın etik açıdan uygunluğu İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 09.04.2015 tarihli ve 83045809/604.01/02-107623 sayılı yazı ile onaylandı (Ek 1).

Çalışmaya katılan gönüllü bireyler öncelikle çalışma hakkında bilgilendirildi ve "asgari bilgilendirilmiş gönüllü onam formunu" (Ek 2) doldurarak imzalamaları sağlandı. Bireylerin sosyo-demografik özellikleri (yaş, eğitim düzeyi, medeni hal), genel sağlık durumları ve yaşam alışkanlıkları üzerine bilgi sağlayacak olan "katılımcı bilgi formu" (Ek 3) dolduruldu. Sonrasında, katılımcılardan yetkili sağlık personeli tarafından bir tüp (2 mL EDTA'lı tüp/mor kapaklı) periferik kan örneği alındı. İdrar örnekleri ise steril, vida kapaklı idrar kaplarına en az 10 mL olacak şekilde toplandı. Kan ve idrar örnekleri analiz edilinceye kadar uygun koşullarda muhafaza edildi.

Mesleki olarak toksik metallere maruz kalan bireylerin örnekleri; İstanbul Meslek Hastalıkları Hastanesi aracılığıyla, işyeri mobil tarama hizmetleri sırasında yukarıda belirtildiği şekilde toplandı. Çeşitli meslek gruplarında çalışan (boyacı, polisajcı, çilingir, dökümcü, izolasyoncu, sac ve ince sac işçisi, raspacı ve tekneci) toplam 160 tersane işçisinden kan ve idrar örnekleri alındı. Mesleki metal maruziyeti bulunmayan bireylerin (kontrol grubu) örnekleri ise aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan sağlıklı 55 gönüllü katılımcıdan toplandı. Çalışma grubunu oluşturan bireylerin tümünün, tersane işçisi olan erkek katılımcılar olmaları nedeniyle kontrol grubu da erkek bireyler arasından seçildi.

3.4. Çalışmaya Katılan Bireylere Ait Bilgiler

Çalışmaya katılan tüm bireyler erkektir ve genel özellikleri Tablo 3.3'te yer almaktadır.

Tablo 3.3. Katılımcılara ait özellikler

	Tersane işçileri (n=160)	**Kontrol grubu (n=55)**
Yaş[1]	38.7 (20−58)	43.6 (20−66)
Vücut kitle indeksi (kg/m^2)[1]	26.8 (20−38.8)	27.3 (18.5−41.4)
Sigara kullanıcıları[2]	62 (%38.8)	24 (%43.6)
-Kullanım miktarı (paket-yıl)[1]	9.4 (0.1−28)	28.9 (0.2−125)
Alkol kullanıcıları[2]	43 (%26.9)	15 (%27.3)
Maruziyet süresi (yıl)[1]	11.2 (1−34)	−

[1]Ortalama (min-max), [2]Kişi sayısı (%)

Çalışma sonuçlarının değerlendirilmesi sırasında katılımcılara ait yaş, vücut kitle indeksi, eğitim, sigara ve alkol alışkanlığı vb. bilgiler aşağıda yer aldığı şekilde gruplandırıldı.

- Katılımcıların yaşları; "20-30 yaş", "31-40 yaş" aralığı ve "40 yaş üstü" olmak üzere 3 grupta sınıflandırıldı. Vücut kitle indeksi (VKİ); vücut kütlesinin (kg), vücut uzunluğunun metre cinsinden karesine (m^2) bölünmesiyle hesaplandı ve "<25" (normal), "25-29 arası" (fazla kilolu), "30 ve üstü" (obez) olarak gruplandırıldı.

- Sigara içme alışkanlığı; "hiç içmemiş", "bırakmış" ve "içiyor" olarak sınıflandırıldı. Sigara kullananlar arasındaki tüketim miktarı, toplam içilen miktarı yansıtan paket-yıl olarak hesaplandı: "Paket-yıl = (bir günde içilen sigara sayısı × sigara içilmekte olan yıl sayısı)/20".

- Alkol tüketimi; “hiç (içmeyenler)”, “ayda 1 kez veya daha az” ve “ayda 2-4 kez” sıklıkla içenler olarak sınıflandırıldı.

- Eğitim düzeyi ise; “ilköğretim”, “lise” ve “üniversite” mezunu olmak üzere toplam 3 gruba ayrıldı.

- Medeni hal; “bekar” ve “evli” olmak üzere iki grup olarak değerlendirildi.

- Tersane işçilerinin çalışma süreleri göz önünde bulundurularak toksik metallere maruz kalma süresi, 4 gruba ayrılarak değerlendirildi; “1-2 yıl”, “3-7 yıl”, “8-19 yıl” ve “20 yıl ve üzeri”.

3.5. Çalışmanın Genetik Basamakları

3.5.1. Tam kandan DNA izolasyonu

Tam kandan DNA izolasyonu Zymo Research “*Quick*-DNA™ Universal Kit” ile gerçekleştirildi.

DNA izolasyon kitinin içeriği:

- Solid Tissue Buffer (Mavi) (Katı Doku Tamponu) (Çalışmada doku olmadığından bu tampon kullanılmamıştır.)
- BioFluid & Cell Buffer (Kırmızı) (Biyolojik Sıvı ve Hücre Tamponu)
- Proteinase K & Storage Buffer (Proteinaz K ve Saklama Tamponu); Proteinaz K (20 mg) tüpünün içine 1.060 µL saklama tamponu ilave edildi ve vorteks yardımı ile karıştırıldı. -20 ºC’de muhafaza edildi.
- Genomic Binding Buffer (Bağlanma Tamponu)
- DNA Pre-Wash Buffer (Ön Yıkama Tamponu)
- g-DNA Wash Buffer (Yıkama Tamponu)

- DNA Elution Buffer (Elüsyon Tamponu)
- Zymo-Spin™ IIC-XL Columns (Filtre Tüpleri)
- Collection Tubes (Toplama Tüpleri)

DNA izolasyon protokolü:

1. Tam kandan 200 µL alınıp 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne kondu.
2. Üzerine 200 µL "BioFluid & Cell" tamponu ve 20 µL proteinaz K eklendi. 10-15 s vortekslendikten sonra 55 °C'de 10 dk inkübe edildi.
3. Bu karışımın üzerine 420 µL "Genomic Binding" tamponu ilave edildi ve 10-15 s vortekslendi.
4. Karışım Zymo-Spin™ IIC-XL kolona aktarıldı. 11500 rpm'de 1dk santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve kolon yeni toplama tüpüne yerleştirildi.
5. Spin kolona 400 µL "DNA Pre-Wash" tampon eklendi. 11500 rpm'de 1dk santrifüj edildi. Toplama tüpü boşaltıldı.
6. 700 µL "g-DNA Wash" tampon eklendi. 11500 rpm'de 1dk santrifüj edildi. Toplama tüpü boşaltıldı.
7. 200 µL "g-DNA Wash" tampon eklendi. 11500 rpm'de 1dk santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı.
8. Spin kolon 1.5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. 100 µL "DNA Elution" tamponu eklendi. Oda ısısında 5 dk inkübe edildikten sonra 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
9. Spin kolon atıldı, DNA izolatı içeren mikrosantrifüj tüpü ise kapatılarak -20 °C'de muhafaza edildi.

3.5.2. DNA miktar tayini

İzole edilen örneklerin DNA miktarı tayini, Qubit® 2.0 Fluorometer - Invitrogen™ cihazında, “Qubit™ dsDNA HS Assay kiti” kullanılarak yapıldı.

Kit içeriği: "Qubit™ dsDNA HS" reaktifi, "Qubit™ dsDNA HS" tamponu, Standart ♯1 (0 ng/µL) ve Standart ♯2 (10 ng/µL).

İşlem basamakları aşağıda verildiği gibidir:

1. Ölçülecek örnek sayısı ve cihazın kalibrasyonu için gerekli 2 adet standart ile birlikte toplam sayı belirlenerek, 200 µL’lik PCR tüpleri hazırlandı.
2. Miktar tayin kitinin içeriğinde bulunan "Qubit™ dsDNA HS" reaktifi, ölçümü yapılacak her örnek için 1:200 oranında "Qubit™ dsDNA HS" tamponu ile seyreltilerek çalışma çözeltisi hazırlandı. Tüplere bu çözeltiden 200 µL’lik karışımlar hazırlandı.
3. Hazırlanan çalışma çözeltisinden standartların ölçüleceği tüplere 190 µl, örneklerin ölçüleceği tüplere ise 199 µL pipetlendi.
4. İki standarttan 10’ar µL alınıp, 190 µL’lik çözelti içeren tüplere eklendi.
5. Ölçülecek örneklere ait izolatlardan da 1 µL alınıp, 199 µL’lik çözelti içeren tüplere ilave edildi.
6. Elde edilen karışımlar baloncuk oluşmamasına dikkat edilerek 2-3 sn vortekslendi ve 2 dk boyunca oda ısısında inkübe edildi.
7. Öncelikle Standart ♯1 ve ♯2’nin Qubit™ florometre cihazında DNA konsantrasyonları belirlenerek cihazın kalibrasyonu yapıldı.
8. Kalibre edilen cihazda sırasıyla örnekler ölçülerek DNA miktarları kaydedildi.

3.5.3 Global DNA metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeylerinin belirlenmesi

- **Global DNA metilasyon düzeyinin belirlenmesi**

Tam kan örneklerinden global DNA metilasyon miktarı ölçümü Zymo Research "5-mC DNA ELISA Kit" ve mikroplak okuyucu cihaz kullanılarak yapıldı.

Kit içeriği: 5-mC Coating Tampon, 5-mC ELISA Tampon, Anti-5-Metilsitozin (1 µg/µL), Sekonder Antibody (1 µg/µL), HRP Developer, Negatif Kontrol (100 ng/µL), Pozitif Kontrol (100 ng/µL) ve 96-kuyucuklu plak (12 x 8 kuyucuklu strip).
İşlem basamakları aşağıda verildiği gibidir:

Yüzeyin DNA ile kaplanması:

1. DNA örnekleri ve 7 adet standart için yeterli miktarda strip ayrıldı. (Geri kalan stripler kuru ve karanlık ortamda muhafaza edildi.)
2. Her örnek için 100 ng DNA izolatı, 200 µL'lik PCR tüpüne kondu ve "Coating" tampon ile 100 µL hacme tamamlandı. (DNA hacminin toplam hacmin %20'sini geçmemesine dikkat edildi.)
3. DNA'lar 98 ^{o}C'de 5 dk ısı döngüleyicide denature edildi. Denatürasyondan sonra hemen buzun üstüne konarak 10 dk bekletildi.
4. 100 µL denature DNA'lar plaktaki kuyucuklara eklendi, plak folyo ile kapatıldı ve 37 ^{o}C'de 1 saat etüvde inkübe edildi.

Bloke etme:

5. Tampon kuyucuklardan uzaklaştırıldı.

6. Kuyucuklar 3 kez 200 µl "ELISA" tamponu ile yıkandı. Her yıkamadan sonra plak, kurutma kağıdının üzerine ters çevrilip vurularak, tampon tamamen uzaklaştırıldı.

7. 200 µL "ELISA" tamponu kuyucuklara eklendi, plak folyo ile kapatıldı ve 37 ºC'de 30 dk etüvde inkübe edildi.

Antibody ekleme:

8. Tampon kuyucuklardan uzaklaştırıldı.

9. "Anti-5-Metilsitozin" ve "Sekonder Antibody" içeren antibody karışımı "ELISA" tamponu ile aşağıdaki tabloya (Tablo 3.4) göre hazırlandı. (Antibody karışımı son inkübasyon işlemi sırasında hazırlandı ve kullanımına kadar buzun üstünde bekletildi.)

Tablo 3.4. "Anti-5-Metilsitozin" ve "Sekonder Antibody" karışımının hazırlanması

	Seyreltme	**Hacim (µL)**	**Örnek (18 kuyucuk için)**
5-mC ELISA Tampon	N/A	(Kuyucuk sayısı + 2) 100	2000 µL
Anti-5-Metilsitozin	1:2000	Tampon Hacmi / 2000	1 µL
Sekonder Antibody	1:1000	Tampon Hacmi / 1000	2 µL

10. Her kuyucuğa 100 µL antibody karışımı eklendi. Plak, folyo ile kapatıldı ve 37 ºC'de 1 saat etüvde inkübe edildi.

Renklenme:

11. Antibody karışımı kuyucuklardan uzaklaştırıldı.

12. Kuyucuklar 200 µL "ELISA" tamponu ile 3 kez yıkandı. Her yıkamadan sonra tampon, kurutma kağıdının üzerine plak ters çevrilip vurularak tamamen uzaklaştırıldı.

13. Kuyucuklara 100 µL "HRP Developer" eklendi. Renklenme için 10-60 dk oda sıcaklığında beklendi.

14. Oluşan rengin absorbansı mikroplak okuyucu kullanılarak 405 nm dalga boyunda ölçüldü.

- **DNA örneklerindeki 5-mC yüzdesinin belirlenmesi**

DNA örneklerindeki 5-mC yüzdesini belirlemek için; kit içeriğinde yer alan negatif ve pozitif kontrol Tablo 3.5'te gösterilen hacimlerde karıştırılarak 5-mC yüzdesi bilinen standart karışımları hazırlandı ve her analizde yeni bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Her karışımın toplam hacmi 10 µL ve DNA konsantrasyonu 100 ng/µL'dir. Hazırlanan standart karışımları -20 °C'de muhafaza edildi.

Tablo 3.5. 5-mC standart DNA karışımlarının hazırlanması

5-mC yüzdesi	Negatif Kontrol (100 ng/µL)	Pozitif Kontrol (100 ng/µL)
%0	10.0 µL	0 µL
%5	9.5 µL	0.5 µL
%10	9.0 µL	1.0 µL
%25	7.5 µL	2.5 µL
%50	5.0 µL	5.0 µL
%75	2.5 µL	7.5 µL
%100	0 µL	10.0 µL

Standart DNA örneklerinin 5-mC yüzdelerine göre elde edilen absorbans değerleri ile kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Elde edilen kalibrasyon eğrisinden türetilen aşağıdaki

logaritmik regresyon eşitliği kullanılarak bilinmeyen DNA örneklerinin 5-mC yüzdeleri hesaplandı.

$$\%\mathbf{5\text{–}mC} = e^{\left\{\frac{(\mathbf{Absorbans - y\text{–}intercept})}{\mathbf{Eğim}}\right\}}$$

$e = 2{,}27182 \ldots$ (Euler sabiti)

- **Global DNA Hidroksimetilasyon düzeyinin belirlenmesi**

Tam kan örneklerinden global DNA hidroksimetilasyon miktarı ölçümü Zymo Research "Quest 5-hmC™ DNA ELISA Kit" ve mikroplak okuyucu cihaz kullanılarak yapıldı.

Kit içeriği: 5-mC Coating Tampon, 10x 5-mC ELISA Tampon, Anti-5-Hidroksimetilsitozin Poliklonal Antibody (1 mg/mL), Anti-DNA HRP Antibody (100x), HRP Developer, Kontrol DNA Seti (5 Kontrol) ve 96-kuyucuklu plak (12 x 8 kuyucuklu strip).

1x ELISA Tampon, her çalışma öncesi 10x ELISA Tampon çözeltisinin deiyonize su ile 1:10 oranında seyreltilmesiyle hazırlandı.

İşlem basamakları aşağıda verildiği gibidir:

Yüzeyin kaplanması:

1. Örnekler ve 5 adet standart için yeterli miktar strip ayrıldı. (Geri kalan stripler kuru ve karanlık ortamda muhafaza edildi.)
2. "Anti-5-Hidroksimetilsitozin Poliklonal Antibody" (1 mg/mL) "Coating" tamponu ile 1 ng/µL'ye seyreltildi.

3. 100 µL seyreltilmiş anti-5-hmC pAb kuyucuklara kondu. Plak folyo ile kapatıldı ve 37 ºC'de 1 saat etüvde inkübe edildi.

Bloke etme:

4. Tampon kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 200 µL "1x ELISA" tamponu ile 3 kez yıkandı. Her yıkamadan sonra plak, kurutma kağıdının üzerine ters çevrilip vurularak, tampon tamamen uzaklaştırıldı.
5. Kuyucuklara 200 µL"1x ELISA" tamponu eklendi. Plak folyo ile kapatıldı ve 37 ºC'de 30 dk boyunca etüvde inkübe edildi.

DNA ekleme/bağlama:

6. Her örnekten 100 ng DNA 200 µL'lik PCR tüpüne kondu ve 100 µL hacme "1x ELISA" tamponu ile tamamlandı. Kontrol DNA örneklerinden (100 ng/µl) 1 µl alındı ve 99 µL "1x ELISA" tamponu ile seyreltildi (1 ng/µl).
7. Tüm örnekler 98 ºC'de 5 dk ısı döngüleyicide denatüre edildi.
8. Denatürasyondan hemen sonra 10 dk buzun üstünde bekletildi.
9. Tampon kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Plak kurutma kağıdının üzerine ters çevrilip vurularak bütün sıvının tamamen uzaklaştırılması sağlandı.
10. 100 µL denature DNA'lar plaktaki kuyucuklara eklendi, plak folyo ile kapatıldı ve 37 ºC'de 1 saat boyunca etüvde inkübe edildi.

Anti-DNA HRP Antibody ekleme:

11. Tampon kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 200 µl "1x ELISA" tamponu ile 3 kez yıkandı. Her yıkamadan sonra tampon, kurutma kağıdının üzerine plak ters çevrilip vurularak tamamen uzaklaştırıldı.

12. "Anti-DNA HRP Antibody", "1x ELISA" tamponu ile 1:100 oranında seyreltildi. (Örneğin 20 kuyucuk için 20 µL "Anti-DNA HRP Antibody" ve 2 mL "1x ELISA" tamponu kullanıldı.)
13. Kuyucuklara 100 µl antibody karışımı eklendi. Plak folyo ile kapatıldı ve 37 ^{o}C'de 30 dk boyunca etüvde inkübe edildi.

Renklenme:

14. Tampon kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 200 µL "1x ELISA" tamponu ile 3 kez yıkandı. Her yıkamadan sonra tampon, plak kurutma kağıdının üzerine ters çevrilip vurularak tamamen uzaklaştırıldı.
15. 100 µL "HRP Developer" kuyucuklara eklendi ve 10-60 dk oda sıcaklığında renklenme için beklendi.
16. Oluşan rengin absorbansı mikroplak okuyucu kullanılarak 405 nm dalga boyunda ölçüldü.

DNA örneklerindeki 5-hmC yüzdesini belirlemek için her ölçümde örneklerle birlikte Tablo 3.6'da yer alan kontrol DNA örnekleri kullanılarak yeni bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

- **DNA örneklerindeki 5-hmC yüzdesinin belirlenmesi**

Tablo 3.6. Kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanılan kontrol DNA örnekleri ve karşılık gelen 5-hmC yüzdeleri

Kontrol DNA'lar (100ng/µL)	5-hmC yüzdesi
Kontrol A	%0
Kontrol B	%0.03
Kontrol C	%0.12
Kontrol D	%0.23
Kontrol E	%0.55

Kontrol DNA örneklerinin 5-hmC yüzdelerine karşı elde edilen absorbans değerleri ile bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Elde edilen kalibrasyon eğrisinden türetilen aşağıdaki doğrusal regresyon eşitliği kullanılarak bilinmeyen DNA örneklerinin 5-mC yüzdeleri hesaplandı.

$$\%\mathbf{5\text{–}hmC} = \frac{\mathbf{Absorbans - y\text{–}intercept}}{\mathbf{Eğim}}$$

3.6. Çalışmanın İnorganik Analiz Basamakları

3.6.1. Çalışmada kullanılan çözeltilerinin hazırlanması

%2'lik HNO_3 çözeltisi: Bir litre hacimli plastik balon jojeye az miktar ultra saf su konuldu, daha sonra 20 mL nitrik asit ilave edildi ve ultra saf su ile hacme tamamlandı. Balon joje çalkalanarak çözelti homojen hale getirildi.

Çoklu element ara stok standart çözeltisi (1 µg/mL): ICP-MS çoklu element kalibrasyon standardından (10 µg/mL) 3 mL alındı, %2'lik HNO_3 çözeltisi ile 30 mL'ye tamamlandı.

İç standart karışım çözeltisi (In+Ga; 2 µg/mL): İndiyum (In) ve galyum (Ga) standart çözeltilerinden (1000 µg/mL) 100'er µL alındı ve %2'lik HNO_3 çözeltisi ile 50 mL'ye tamamlandı.

Blank çözeltisi: %2'lik HNO_3 çözeltisi 100 µL iç standart karışımı (In+Ga; 2 µg/mL) ilave edilerek 10 mL'ye tamamlandı.

Kalibrasyon çözeltileri: Kalibrasyon çözeltileri 0.1–150 ng/mL konsantrasyon aralığında, çoklu element ara stok kalibrasyon çözeltisinin (1 µg/mL) %2'lik HNO_3 çözeltisi ile seyreltilerek iç standart karışımı (In+Ga; 2 µg/mL) ilave edilmesiyle

hazırlandı. Hazırlanan kalibrasyon konsantrasyonları ve kullanılan çözelti hacimleri Tablo 3.7'de gösterilmektedir.

Tablo 3.7. ICP-MS analizinde kullanılan kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Çoklu Element Konsantrasyonu (ng/mL)	**Çoklu Element Çözeltisi (1 µg/mL)**	**İç Standart Çözeltisi (In+Ga; 2 µg/mL)**	
Blank	-	100 µL	Kalibrasyon için hazırlanan bütün tüpler %2'lik HNO_3 ile 10 mL'ye tamamlandı ve vortekslendi.
0.1	1 µL		
0.2	2 µL		
0.5	5 µL		
1	10 µL		
2	20 µL		
5	50 µL		
10	100 µL		
20	200 µL		
50	500 µL		
100	1000 µL		
150	1500 µL		

Sertifikalı referans idrar çözeltisi: Liyolfilize halde olan sertifikalı referans idrar materyalinin (SRM) şişesi açılıp 5 mL ultra saf su ile seyreltildi ve orbital çalkalayıcıda 15 dk boyunca çalkalanarak homojen hale getirildi. Seyreltilmiş SRM, eppendorf tüplerde 500 µL'lik tek kullanımlık porsiyonlar şeklinde bölündü, her bir porsiyon +4 ºC'de muhafaza edildi. Her analiz setinde bir porsiyon sertifikalı idrar numunesi bilinmeyen örnek olarak analize dahil edildi.

ICP-MS analizinde kullanılan blank ve kalibrasyon çözeltileri günlük olarak hazırlandı. Diğer çözeltiler ise yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanıp çalışma boyunca +4 ºC'de muhafaza edildi ve kullanımlarından önce oda sıcaklığına getirildi.

Örnek alımında ve ICP-MS analizi sırasında kullanılan polipropilen malzemeler kullanım öncesinde %2'lik HNO_3 çözeltisiyle temizlendi.

3.6.2. İdrarda kreatinin miktarının belirlenmesi

İdrarda kreatinin analizi; idrardaki inorganik elementlerin "g kreatinin" miktarına göre belirlenmesi için yapılan hesaplamada kullanılmaktadır.

Toplanan idrar örneklerinin her birinin kreatinin değerleri spektrofotometrik olarak biyokimya analizöründe mg/dL konsantrasyonda aşağıda belirtildiği şekilde ölçüldü.

- Katı haldeki sodyum hidroksit (NaOH) 11.6 g tartıldı ve 1 litre hacimli cam balon jojede distile su ile hacme tamamlandı.
- Katı haldeki pikrik asit 4 g tartıldı ve 1 litre hacimli cam balon jojede distile su ile hacme tamamlandı.
- Stok NaOH ve pikrik asit çözeltileri, 1:1 oranında karıştırılarak çalışma çözeltisi elde edildi.
- 3 mg/dL olan kreatinin standart çözeltisi 2mg/dL olacak şekilde 2/3 oranında seyreltildi. 2 mL standart çözelti plastik test tüpüne pipetlenerek üzerine 1 mL distile su eklendi ve vortekslenerek kreatinin standart çalışma çözeltisi hazırlandı.
- Çalışılacak idrar örnekleri oda sıcaklığına getirildi.
- Her bir örnek için üzerlerinde örnek kodları yazan 15 mL'lik polipropilen test tüpü hazırlandı.
- Her bir örnek tüpüne 5 mL hacimli pipet ile 4900 µL distile su konuldu.
- Çalışılacak olan idrar örneği karıştırılarak homojen hale getirildi.
- Homojen hale getirilen her bir örnekten 100 µL, test tüpüne ilave edilerek

idrar örneği 1/50 oranında seyreltildi.

- Eppendorf tüp içerisine 500 µL çalışma çözeltisi ve 100 µL seyreltilmiş idrar örneği konulduktan sonra vortekslenerek karıştırıldı.
- Hazırlanan örnekteki kreatinin miktarı biyokimya analizörü ile ölçüldü. 0.5 mg/dL altında kalan sonuçlarda idrar örneği 1/10 oranında seyreltilerek yeniden çalışıldı.

3.6.3. İdrar örneklerinin ICP-MS çalışması için hazırlanması

- Buzdolabından çıkarılan idrar örnekleri oda sıcaklığına getirildi.
- 15 mL'lik falkon tüpler %2 lik HNO_3 çözeltisi ile çalkalanarak temizlendi.
- İdrar kapları hafifçe çalkalanarak idrar homojenize hale getirildi.
- İdrar örneğinden 1 mL alınıp falkon tüp içerisine pipetlendi.
- Üzerine 100 µL iç standart karışımı (In+Ga; 2 µg/mL) ilave edildi.
- %2'lik HNO_3 çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlandı.
- Tüplerin kapakları kapatıldı ve vortekslendi.
- Önce kalibrasyon çözeltileri analiz edilerek oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin ardından örneklerin ICP-MS sisteminde analizi yapıldı.
- Her 10 idrar numunesinin analizinin ardından sertifikalı idrar numunesi de bilinmeyen örnek olarak analiz edildi.

3.6.4. Analiz koşulları

Çalışmada kullanılan ICP-MS sistemi koşulları Tablo 3.8'deki gibidir.

Tablo 3.8. ICP-MS sistemi çalışma koşulları

Radyo frekans gücü	1400 W
Plazma gaz akışı	13 L/dk
Püskürteç (nebulizer) gaz akış hızı	0.86 L/dk
Soğutucu (cool) gaz akış hızı	13 L/dk
Yardımcı (auxiliary) gaz akış hızı	0.8 L/dk
Sprey odacığı (cyclonic) sıcaklığı	3 °C
Örnekleme derinliği	110
Örnek tekrarı	3
Örnek alım süresi	60 s
Torç ayarları	
Yatay	85
Dikey	173
Numune çekiş süresi (Max uptake)	30 s
Yıkama sürsi (Max wash)	50 s
Lensler	
Ayırma (Extraction) lens voltajı	-173 V
Lens 1 voltajı	-1220 V
Lens 2 voltajı	-80 V
Lens 3 voltajı	-199.2 V
Pole bias	-4
DA (Diffraction apperture)	-76.1 V
Hexapole bias voltajı	-0.6 V
Dedektör	
Survey run	0-scanning
Main run	3-peak jumping
Dwell time	0.01 s
Sweeps/replicate	100
Acquisition time	38 s

3.6.5. Tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) belirleme çalışmaları

Yapılan analizde cihazın analitik performansını değerlendirmek amacıyla tespit sınırı (LOD; limit of detection) ve tayin sınırı (LOQ; limit of quantification) hesaplandı.

LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesinde aşağıdaki eşitlikler kullanıldı.

$$\text{LOD} = 3 \text{ x SD}, \ \text{LOQ} = 10 \text{ x SD}$$

SD = iç standart ilave edilmiş blank çözeltisinin (%2'lik HNO_3) 10 tekrarından elde edilen standart sapma

3.6.6. İdrar örneklerinin ICP-MS ile analizi

İdrar örneklerindeki **krom (^{52}Cr)**, **nikel (^{60}Ni)**, **kadmiyum (^{111}Cd)** ve **kurşun (^{208}Pb)** elementlerinin konsantrasyonu yukarıda detayları ile belirtilen yöntemler ile hazırlanarak ICP-MS sisteminde belirtilen koşullarda analiz edildi.

Cihazda sinyal optimizasyonu, başlangıç performans kontrolleri 10 ng/mL'lik tune çözeltisi ile yapıldı. Daha sonra belirlenen konsantrasyonlardaki standart çözeltilerle kalibrasyon grafikleri oluşturuldu ve örnekler analiz edildi. Her bir standart ve örnek 3 kez analizedildi ve bağıl standart sapması <%15 olan sonuçların ortalaması değerlendirmeye alındı. Elde edilen element konsantrasyonları g/kreatinin değerine göre µg/g kreatinin cinsinden hesaplandı.

3.7. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics v24.0 paket programı kullanıldı. Çalışmada elde edilen veriler değerlendirilirken ortalama, standart sapma (±), medyan (ortanca), çeyrekler arası açıklık (IQR), frekans (%), en büyük ve en küçük değerlerden oluşan tanımlayıcı istatistikler hesaplandı. Veri gruplarının normal dağılım varsayımına uygun olup olmadığı Shapiro Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılım göstermeyen bağımsız ikili gruplar arasındaki farklılıklar Mann Whitney *U* testi ile ölçüldü. Normal dağılım gösteren üç ve üzeri grupların

karşılaştırmalarında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve farklılığa neden olan grubun tespitinde *post-hoc* Scheffe testi kullanılırken; normal dağılım göstermeyen üç ve üzeri grupların karşılaştırmalarında ise Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden olan grubun tespitinde Mann Whitney *U* testi kullanıldı. Niteliksel olarak belirtilen verilerin analizi Ki-Kare testi ile gerçekleştirildi. Parametreler arası ilişkiler ise Spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık $p<0.05$ olarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Katılımcıların Tanımlayıcı Özellikleri

Çalışmaya katılan gönüllü birey sayısı, mesleki olarak toksik metallere maruz kalan 160 tersane işçisi ve maruz kalmayan 55 birey (kontrol) olmak üzere 215'tir. Katılımcıların tümü erkektir ve yaşları 19 ile 66 arasında değişmekte olup ortalama 39.96±10.43 yıldır. Katılımcıların vücut kitle indeksi (VKİ) 18.2 ile 41.4 kg/m^2 arasında değişmekte olup ortalama 26.89±3.78 kg/m^2'dir. Katılımcıların sigara kullanım alışkanlıkları ve miktarı incelendiğinde; %39.1'inin (n=84) hiç sigara içmemiş, %20.9'unun (n=45) sigarayı bırakmış olduğu, %40'ının (n=86) ise aktif olarak içtiği saptanmış, aktif sigara içenlerin (n=86) toplam sigara kullanım miktarının 0.1 ile 215 paket-yıl arasında değişmekte olup ortalama 14.8±20 paket-yıl olduğu hesaplanmıştır. Alkol kullanım durumu incelendiğinde ise; %73'ünün (n=157) hiç, %19.5'inin (n=42) ayda 1 veya daha az, %7.4'ünün (n=16) ayda 2-4 kez alkol aldığı gözlenmiştir. Katılımcıların eğitim düzeyi incelendiğinde; %21.9'unun (n=47) ilköğretim, %62.8'inin (n=135) lise, %15.3'ünün (n=33) üniversite eğitimine sahip olduğu ve medeni hal durumu incelendiğinde ise; %17.7'sinin (n=38) bekar ve %82.3'ünün (n=177) evli olduğu belirlenmiştir. Mesleki olarak toksik metallere maruz kalan katılımcıların toksik metallere maruz kaldığı süre 1 ile 34 yıl arasında değişmekte olup ortalama 11.17±9.35 yıldır.

Katılımcıların sosyo-demografik özelliklerinin ve yaşam alışkanlıklarının çalışma gruplarına göre dağılımı ve istatistiksel karşılaştırması Tablo 4.1'de yer almaktadır. Yaş, sigara kullanım miktarı, eğitim düzeyi ve medeni hal dağılımı 160 işçi ve 55 kontrol arasında anlamlı olarak farklıdır ($p<0.05$). Kontrol grubunda yer alan bireyler

kısmen daha büyüktür. VKİ, sigara ve alkol alışkanlığı dağılımı açısından 2 grubun bireyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (p>0.05).

Tablo 4.1. Katılımcıların sosyo-demografik özelliklerinin ve yaşam alışkanlıklarının çalışma gruplarına göre dağılımı ve istatistiksel karşılaştırması

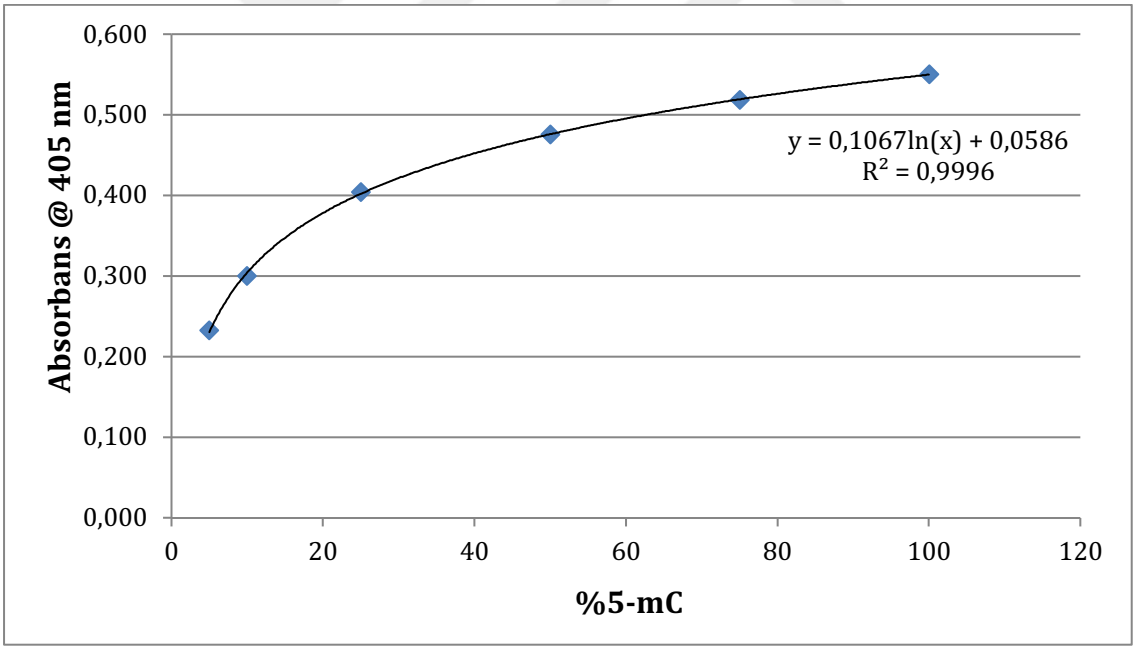
	İşçi grubu (n=160)	**Kontrol grubu (n=55)**	z^a; $\chi 2^b$	***p***
Yaş (yıl), ort±SS (medyan)	38.7±8.2 (38.0)	43.6±14.6 (46.0)	-2.451[a]	**0.014**[*]
VKİ (kg/m^2), ort±SS (medyan)	26.8±3.2 (26.5)	27.3±5.2 (26.8)	-0.395[a]	0.695
Sigara, n (%)				
Hiç içmemiş	59 (36.9)	25 (45.5)	4.561[b]	0.102
Bırakmış	39 (24.4)	6 (10.9)		
İçiyor	62 (38.8)	24 (43.6)		
Sigara miktarı (paket-yıl), ort±SS (medyan)[c]	9.4±7.0 (9.0)	28.9±32.7 (18.0)	-2.989[a]	**0.003**[**]
Alkol, n (%)				
Hiç	117 (73.1)	40 (72.7)	0.340[b]	0.844
Ayda 1 veya daha az	32 (20.0)	10 (18.2)		
Ayda 2-4 kez	11 (6.9)	5 (9.1)		
Eğitim, n (%)				
İlköğretim	20 (12.5)	27 (49.1)	79.672[b]	**<0.01**[**]
Lise	128 (80.0)	7 (127)		
Üniversite	12 (7.5)	21 (38.2)		
Medeni hal, n (%)				
Bekar	23 (14.4)	15 (27.3)	4.679[b]	**0.031**[*]
Evli	137 (85.6)	40 (72.7)		
Maruz kalınan süre (yıl), ort±SS	11.2±9.4			

[a]Mann Whitney *U* testi [b]Ki-kare testi [c]Sadece sigara içenler
[*]$p<0.05$ [**]$p<0.01$

4.2. Çalışmanın Genetik Bulguları

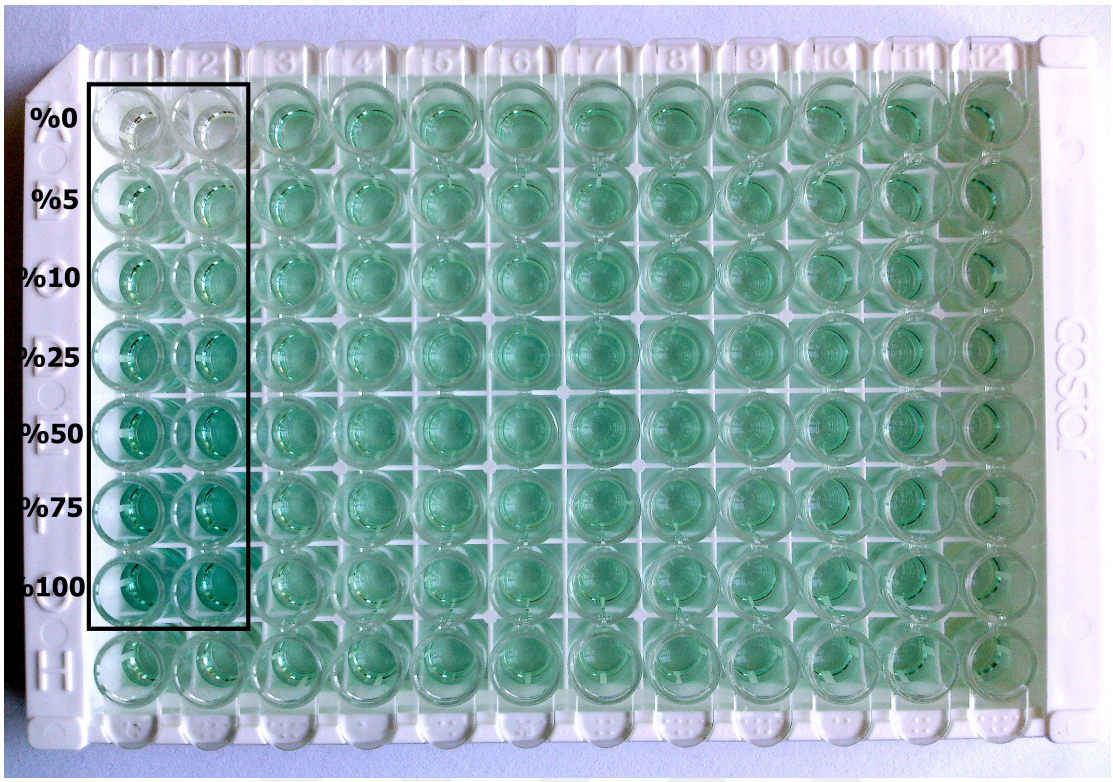
4.2.1. Global DNA metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeylerinin belirlenmesi

Çalışmaya katılan gönüllülerin kan örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra, global 5-mC düzeyleri indirekt çalışma prensibine sahip ELISA kiti kullanılarak immunolojik olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi kit içerisinde bulunan standart DNA örnekleri (%5, %10, %25, %50, %75 ve %100 5-mC) kullanılarak hazırlanmış ve Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Elde edilen eğrinin logaritmik regresyon eşitliği y=0.1067ln(x)+0.0586 ve R^2=0.9996'dır. 5-mC DNA ELISA kitinin tespit sınırı 100 ng DNA'da %0.5'tir.



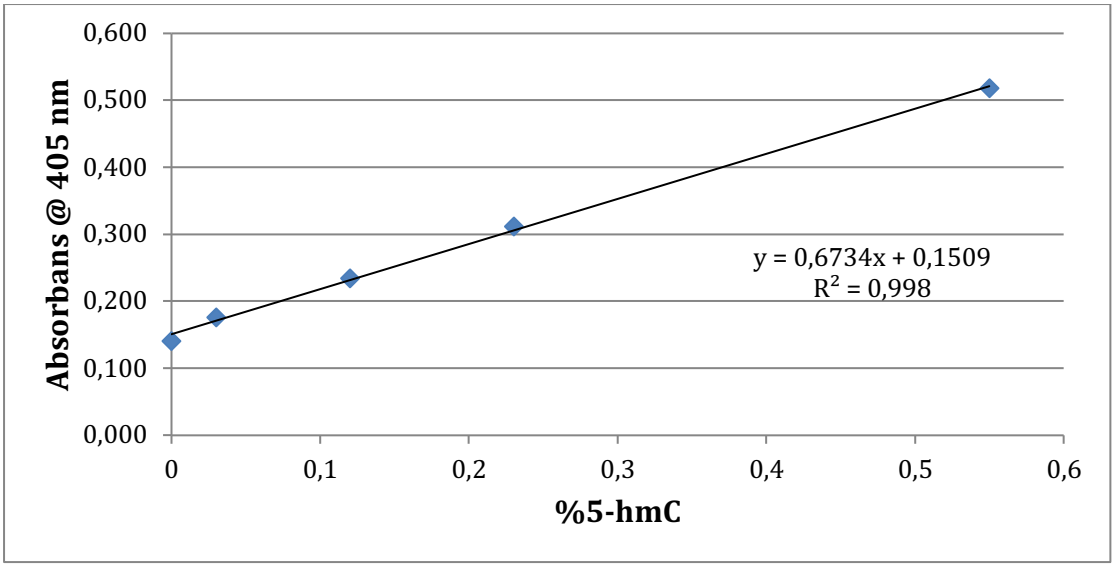
Şekil 4.1. %5-mC kalibrasyon eğrisi

5-mC kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanılan standart DNA örneklerinin ve bilinmeyen örneklerin renklenme aşamasındaki (40 dk oda sıcaklığında inkübasyon sonrası) görünümü Şekil 4.2'de yer almaktadır.



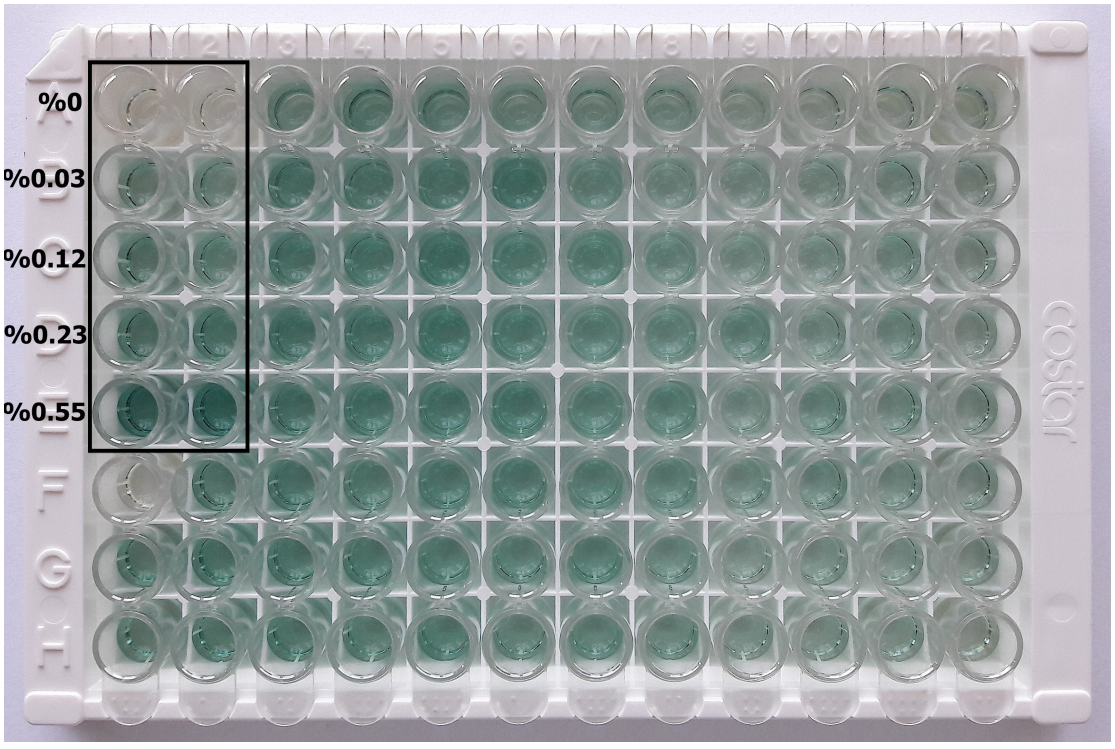
Şekil 4.2. 5-mC standart DNA örneklerinin ve bilinmeyen örneklerin görünümü

Çalışmaya katılan gönüllülerin kan örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra, global 5-hmC düzeyleri sandviç sistem ile çalışan ELISA kiti kullanılarak immunolojik olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi kit içerisinde bulunan standart (kontrol) DNA örnekleri (%0, %0.03, %0.12, %0.23, %0.55 5-hmC) kullanılarak hazırlanmış ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Elde edilen eğrinin lineer regresyon eşitliği $y=0.6734x + 0.1509$ ve $R^2=0.9980$'dir. 5-hmC DNA ELISA kitinin tespit sınırı 100 ng DNA'da %0.02'dir.



Şekil 4.3. %5-hmC kalibrasyon eğrisi

5-hmC kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanılan standart DNA örneklerinin ve bilinmeyen örneklerin renklenme aşamasındaki (40 dk oda sıcaklığında inkübasyon sonrası) görünümü Şekil 4.4'te yer almaktadır.



Şekil 4.4. 5-hmC standart DNA örneklerinin ve bilinmeyen örneklerin görünümü

Global metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeylerinin ölçülmesi için kullanılan kitlerin hassasiyetlerini belirlemek için plak içi ve plaklar arası okumaların varyasyon katsayıları (%CV) hesaplanmış ve Tablo 4.2'de sunulmuştur.

Tablo 4.2. Plak içi ve plaklar arası varyasyon katsayıları (%CV)

	%CV	
Kit	**Plak içi (n=5)**	**Plaklar arası (n=3)**
5-mC	5.6	11.1
5-hmC	46.6	52.8

5-mC kitinin plak içi (<%10) ve plaklar arası (<%15) varyasyon katsayıları güvenilir bulunmuştur. 5-hmC kitinin ise yapılan hassasiyet çalışmaları sonucunda plak içi ve plaklar arası okumalardaki yüksek değişkenlik nedeniyle güvenilir varyasyon katsayısını göstermediği hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlardaki bu yüksek tutarsızlık nedeniyle kitin kandan izole edilen DNA'daki 5-hmC yüzdesinin ölçülmesi için güvenilir olmadığına karar verilmiştir.

4.2.2. Katılımcıların global 5-mC düzeyi

Global DNA metilasyonu analizleri sonucunda tüm katılımcılara (n=215) ait kan örneklerindeki 5-mC düzeylerinin %4.35 ile %10.72 arasında değiştiği ve ortalama %6.58±1.18 olduğu belirlenmiştir. İşçi grubunda (n=160) ortalama 5-mC düzeyi %6.74±1.08 ve mesleki toksik metal maruziyeti bulunmayan kontrol grubunda (n=55) ise %6.10±1.35'tir. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda %5-mC değerleri bakımından iki grup arasında anlamlı fark saptanmıştır. İşçi grubunun global 5-mC düzeyi (medyan=%6.70) kontrol grubuna (medyan=%5.69) göre anlamlı derecede yüksektir (U=2841, z=−3.917, p<0.0001) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Çalışma gruplarında global DNA metilasyon (%5-mC) düzeyleri. Medyan (IQR: çeyrekler açıklığı): İşçi (n=160) ve kontrol (n=55) grupları için sırasıyla; %6.70 (%5.95−%7.36) ve %5.69 (%5.06−%7.01).

4.2.3. Sosyo-demografik özelliklerin ve yaşam alışkanlıklarının global 5-mC düzeyine etkisi

Çalışma kapsamında katılımcıların global DNA metilasyon düzeylerinin yaş, VKİ, sigara içme durumu, toplam sigara içme miktarı, alkol tüketimi, eğitim düzeyi ve medeni hal değişkenlerine göre anlamlı bir fark gösterip göstermediği araştırılmıştır. Bunun için istatistiksel ilişkisi hesaplanan değişkenler gruplandırılmış ve her bir değişken için %5-mC dağılımına bakılarak uygun analiz gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerin sonuçları her bir çalışma grubu için ayrı ayrı Tablo 4.3'te derlenmiştir.

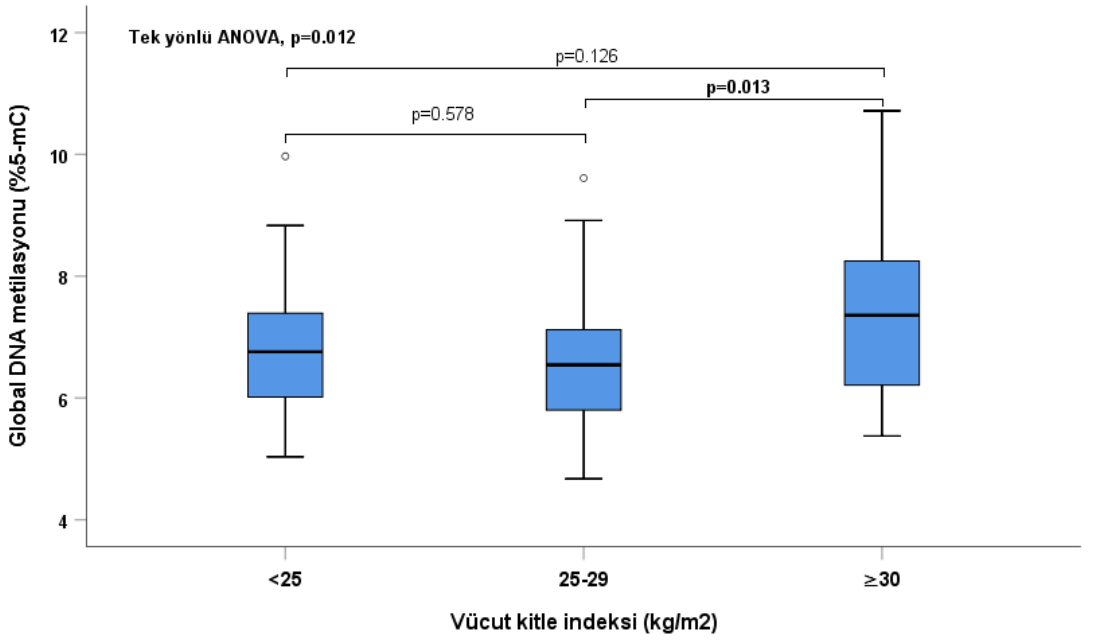
Tablo 4.3. Sosyo-demografik faktörlerin ve yaşam alışkanlıklarının global 5-mC düzeyine etkisi

Değişkenler	İşçi grubu (n=160)			Kontrol grubu (n=55)		
	%5-mC			%5-mC		
	n	Medyan (IQR[a])	*p* (*H*)[b]	n	Medyan (IQR[a])	*p* (*H*)[b]
Yaş (yıl)						
20-30	32	6.54 (5.97-7.05)	0.433 (1.673)	12	5.44 (4.76-682)	0.442 (1.635)
31-40	57	6.89 (5.92-7.56)		11	5.69 (5.03-6.67)	
>40	71	6.61 (5.87-7.29)		32	5.93 (5.19-7.40)	
VKİ (kg/m²)						
<25	46	6.78±1.02[c]	**0.012**[*]	18	5.33 (4.82-6.73)	0.446 (1.616)
25-29	94	6.58±1.00[c]	(4.541[d])	21	5.85 (5.30-6.96)	
≥30	20	7.36±1.36[c]		16	5.89 (5.05-7.20)	
Sigara						
Hiç içmemiş	59	6.79 (5.79-7.32)	0.540 (1.234)	25	5.48 (5.13-6.80)	0.895 (0.223)
Bırakmış	39	6.89 (5.94-7.56)		6	6.56 (4.55-7.91)	
İçiyor	62	6.52 (5.96-7.14)		24	5.90 (5.03-7.15)	
Sigara miktarı (paket-yıl)	97	6.79 (5.80-7.43)	0.631 (0.922)	31	5.53 (5.08-6.99)	0.859 (0.303)
0	34	6.39 (5.92-7.22)		7	6.11 (5.03-7.60)	
<10	29	6.70 (5.99-8.35)		17	5.79 (4.98-6.91)	
≥10						
Alkol						
Hiç	117	6.54 (5.97-7.05)	0.874 (0.270)	40	5.86 (5.11-7.15)	0.353 (2.084)
Ayda 1 veya daha az	32	6.88 (5.92-7.56)		10	5.31 (4.92-5.87)	
Ayda 2-4 kez	11	6.79 (5.87-7.29)		5	6.31 (5.09-7.41)	
Eğitim						
İlköğretim	20	6.24 (5.63-6.70)	**0.005**[**]	27	5.85 (5.08-7.03)	0.789 (0.473)
Lise	128	6.83 (6.09-7.46)	(10.518)	7	5.79 (5.03-7.65)	
Üniversite	12	5.68 (5.28-7.77)		21	5.48 (4.89-6.80)	
Medeni hal						
Bekar	23	6.70 (6.19-7.65)	0.466	15	5.33 (4.85-6.11)	0.123 (218.5)
Evli	137	6.67 (5.87-7.36)	(1425.50)	40	5.94 (5.11-7.15)	

[a]IQR: Çeyrekler açıklığı, [b]Kruskal Wallis testi, [c]Ort±SS, [d]*F*, [*]p<0.05, [**]p<0.01

Hem işçi hem de kontrol grubunda, yaşa, sigara içme durumuna, alkol tüketimine ve medeni hale bağlı olarak global 5-mC düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmamıştır ($p>0.1$). Bununla birlikte, kontrol grubunda VKİ ve eğitim global 5-mC düzeylerini etkilemezken, işçi grubunda etkilemektedir.

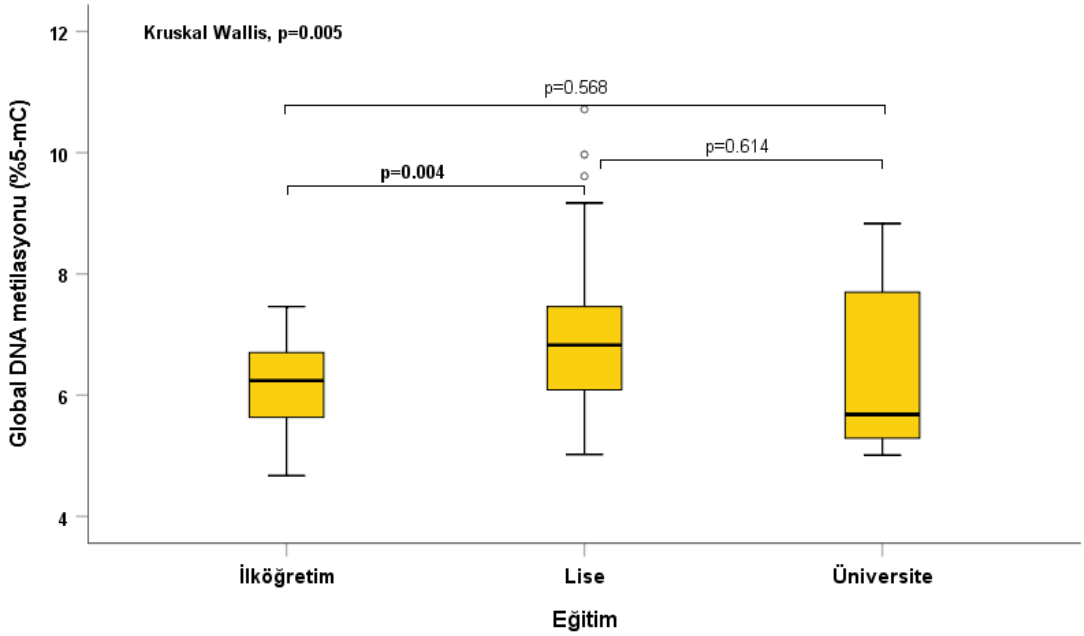
İşçi grubunda vücut kitle indeksine göre global 5-mC düzeyinde anlamlı bir farklılaşmanın olup olmadığını belirlemek amacıyla tek yönlü ANOVA kullanılmıştır. Varyans analizi sonucunda VKİ kategorileri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık hesaplanmıştır (F=4.541, p=0.012). Farklılığın kaynağını test etmek için kullanılan *post-hoc* test Scheffe'ye göre; kilolu (VKİ=25-29 kg/m^2) olan işçilerin global metilasyon düzeyinin, obez (VKİ ≥30 kg/m^2) olan işçilerden anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır (p=0.013) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. İşçi grubunda VKİ kategorilerine göre global 5-mC düzeylerinin karşılaştırılması. Kategoriler arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığı Scheffe çoklu karşılaştırma testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

İşçilerde global 5-mC yüzdesinin eğitim düzeyi kategorilerine göre farklılaşıp farklılaşmadığı ise Kruskal Wallis testi ile analiz edilmiş (H=10.518, p=0.005) ve farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla alt grupların her bir ikili kombinasyonu arasında Mann Whitney U testi uygulanmıştır. Buna göre ilköğretim

mezunu işçilerin global metilasyon düzeyi, lise mezunu işçilere göre anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur (U=768.5, p=0.004) (Şekil 4.7).

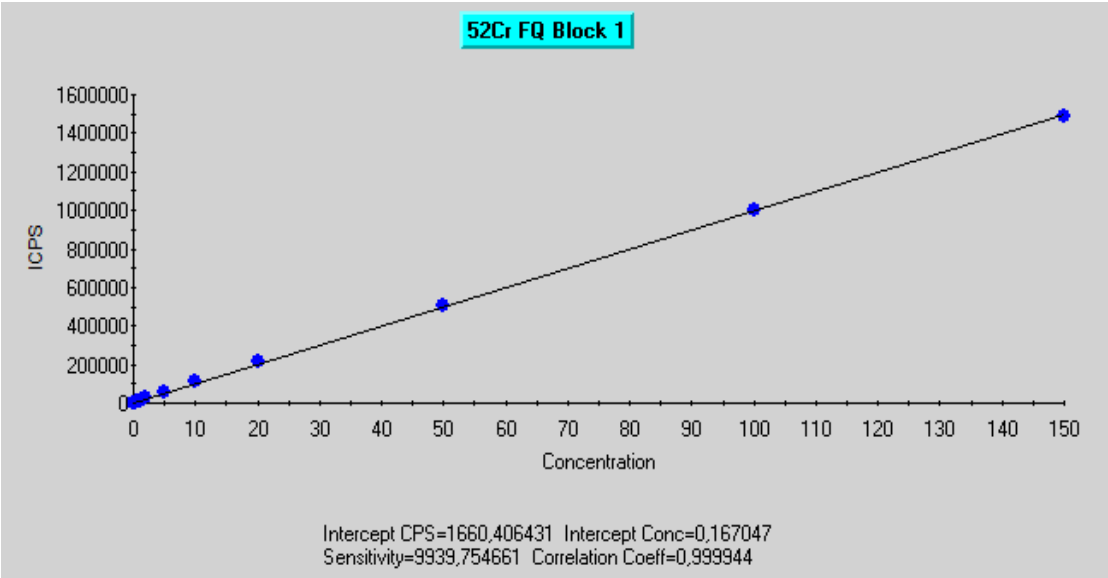


Şekil 4.7. İşçi grubunda eğitim düzeyine göre 5-mC yüzdelerinin karşılaştırılması. Eğitim düzeyleri arasındaki farklılığın istatistiksel anlamlılığı grupların ikili kombinasyonu üzerinden Mann Whitney *U* testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

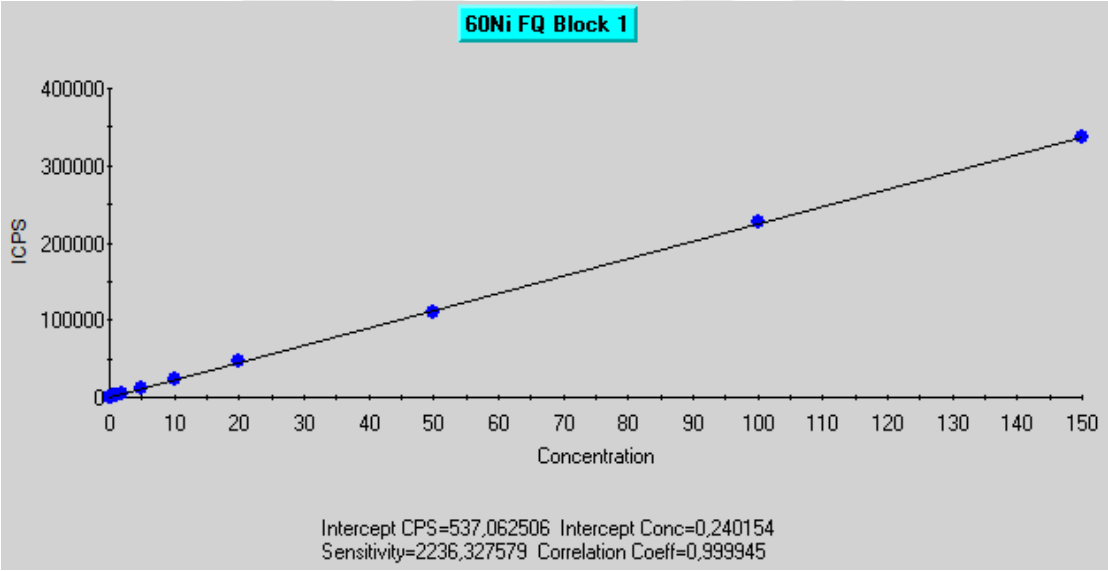
4.3. Çalışmanın İnorganik Analiz Bulguları

4.3.1. İdrar örneklerinin ICP-MS ile analizi

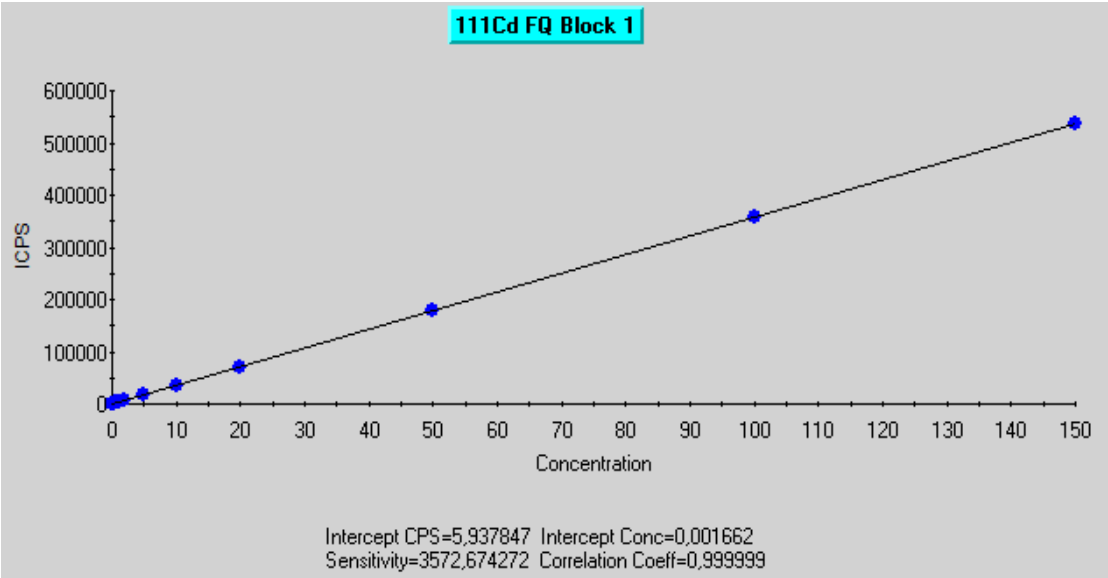
Çalışmaya katılan gönüllülerin idrar örneklerindeki toksik metal (Cr, Ni, Cd ve Pb) konsantrasyonları ICP-MS sisteminde analiz edilmiştir. Analiz edilen Pb, Cr, Ni ve Cd elementlerinin kantitatif tayininde kullanılan kalibrasyon eğrileri ve doğrusal aralıkları Şekil 4.8 – 4.11'de yer almaktadır.



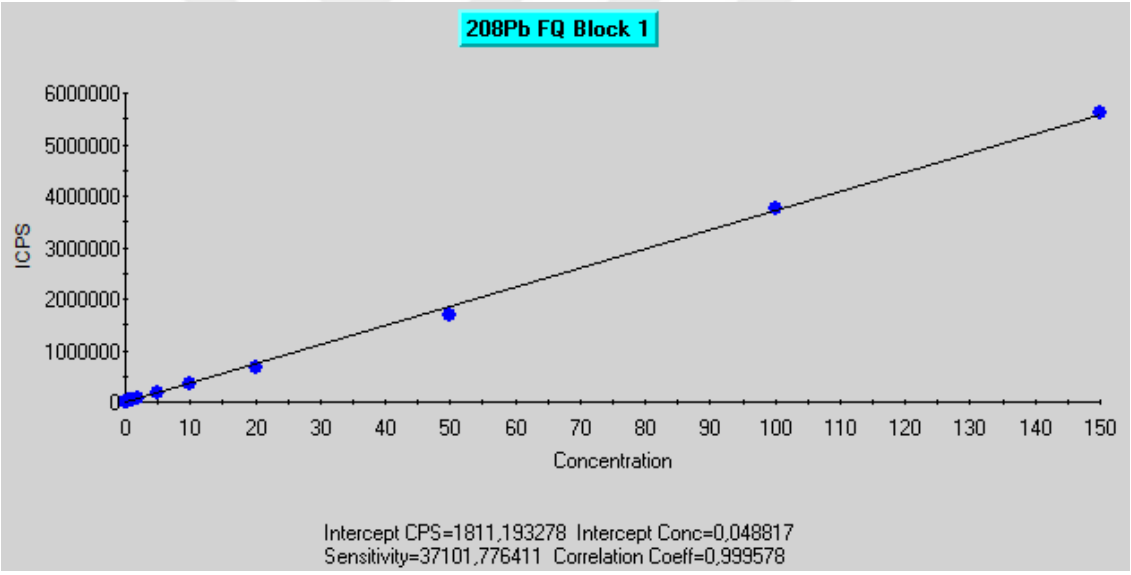
Şekil 4.8. Cr kalibrasyon eğrisi (Doğrusal aralık: 0.1-150 ng/mL; r>0.999)



Şekil 4.9. Ni kalibrasyon eğrisi (Doğrusal aralık: 0.1-150 ng/mL; r>0.999)



Şekil 4.10. Cd kalibrasyon eğrisi (Doğrusal aralık: 0.1-150 ng/mL; r>0.999)



Şekil 4.11. Pb kalibrasyon eğrisi (Doğrusal aralık: 0.2-150 ng/mL; r>0.999)

Yukarıdaki görsellerde de görüldüğü gibi çalışma kapsamında değerlendirilen tüm elementlerin korelasyon katsayısı >0.999 bulunmuş olup, doğrusal aralığı Cr, Ni ve Cd için 0.1-150, Pb için ise 0.2-150 ng/mL'dir.

Yapılan toksik metal analizinde ICP-MS sisteminin analitik performansını değerlendirmek amacıyla hesaplanan tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri ise Tablo 4.4'te yer almaktadır.

Tablo 4.4. Analizi yapılan elementlerin LOD ve LOQ değerleri

Element	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Cr	0.042	0.140
Ni	0.155	1.706
Cd	0.003	0.009
Pb	0.059	0.197

İdrardaki Cr, Ni, Cd ve Pb analizi sonuçlarının doğruluğunu kontrol etmek için kullanılan sertifikalı referans idrar materyalinin analiz sonuçları aşağıda Tablo 4.5'te gösterilmektedir.

Tablo 4.5. Sertifikalı referans idrar materyali analiz sonuçları

Element	Ortalama sertifika değeri (ng/mL)	Kabul edilebilir aralık (ng/mL)	Ölçülen değer* (ng/mL)
Cr	21.2	12.6–29.8	32.26±0.43
Ni	41.3	24.7–57.9	43.26±0.56
Cd	4.9	4.4–5.4	4.41±0.10
Pb	90.7	54.1–127.3	85.20±1.02

*Ortalama ± Standart sapma

4.3.2. İdrar örneklerine ait toksik metal (Cr, Ni, Cd ve Pb) konsantrasyonları

Çalışmaya katılan gönüllülere ait spot idrardaki Cr, Ni, Cd ve Pb konsantrasyonları idrar kreatinin değerleri ile düzeltilerek verilmiştir. Tüm katılımcılara (n=215) ait idrar örneklerindeki Cr, Ni, Cd ve Pb düzeyleri sırasıyla ortalama 0.017±0.018,

5.41±2.81, 0.355±0.193 ve 2.83±2.97 µg/g kreatinin'dir. Tersanede çalışan işçi grubunda (n=160) Cr, Ni, Cd ve Pb düzeylerinin sırasıyla 0.006-0.245, 1.02-17.02, 0.10-1.06 ve 0.37-18.93 µg/g kreatinin arasında değiştiği ve ortalama 0.018±0.02, 5.71±3.03, 0.342±0.172 ve 3.55±3.12 µg/g kreatinin; kontrol grubunda (n=55) ise sırasıyla 0.006-0.026, 1.11-9.14, 0.09-1.23 ve 0.20-2.34 µg/g kreatinin arasında değiştiği ve ortalama 0.013±0.004, 4.55±1.76, 0.394±0.241 ve 0.73±0.43 µg/g kreatinin olduğu belirlenmiştir. Her iki grupta da idrar örneklerindeki toksik metal konsantrasyon sıralaması Ni>Pb>Cd>Cr şeklindedir.

İşçi grubu ile kontrol grubunun idrar Cr, Ni, Cd ve Pb düzeyleri karşılaştırıldığında; işçi grubunda tespit edilen Cr, Ni ve Pb konsantrasyon değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptanmıştır (sırasıyla; p=0.0001, p=0.027 ve p<0.0001) (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. İşçi ve kontrol grubu idrar Cr, Ni, Cd ve Pb düzeylerinin (µg/g kreatinin) karşılaştırılması[a]

	İşçi grubu (n=160)	**Kontrol grubu (n=55)**		
	Medyan (IQR)	**Medyan (IQR)**	***U*; *z***	***p***
Cr	0.015 (0.012-0.019)	0.012 (0.010-0.016)	2864.0; -3.860	**0.0001****
Ni	4.93 (3.49-7.08)	4.25 (3.19-5.41)	3522.0; -2.206	**0.027***
Cd	0.300 (0.219-0.407)	0.300 (0.230-0.520)	4071.5; -0.825	0.409
Pb	2.50 (1.48-4.77)	0.62 (0.48-0.79)	580.0; -9.598	**<0.0001****

[a]Mann Whitney *U* testi, $^{*}p$<0.05, $^{**}p$<0.01

4.3.3. Mesleki maruziyet süresi ile global 5-mC ve toksik metal düzeyleri arasındaki ilişki

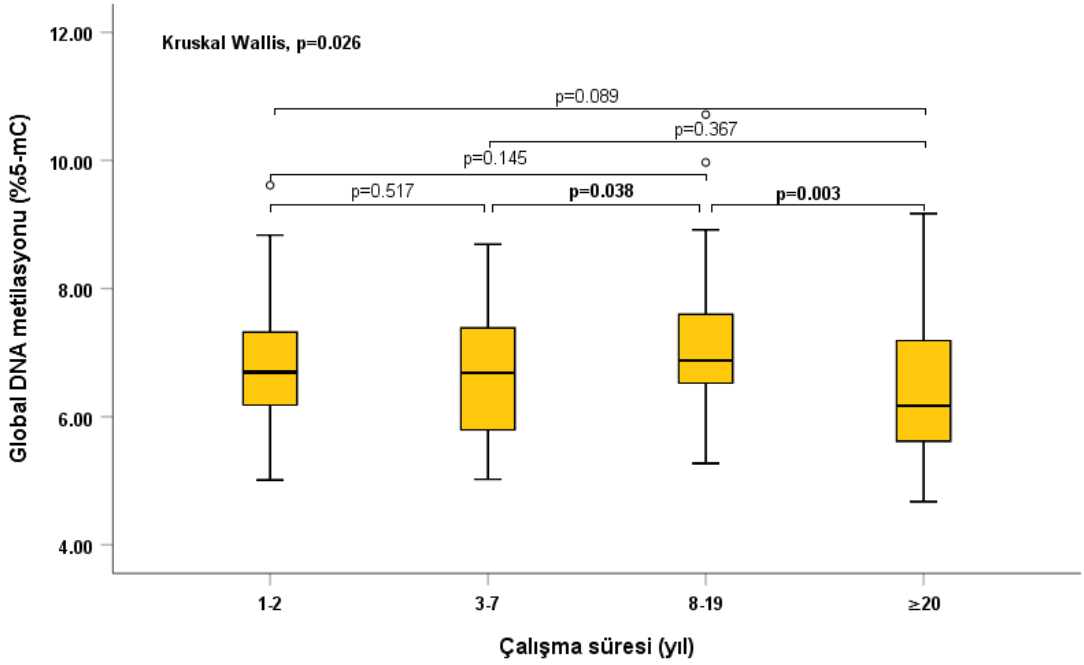
Kan örneklerine ait global 5-mC düzeylerinin işçilerin toksik metallere maruz kalma süresine göre istatistiksel farklılık değerlendirmesini yapmak üzere, işçiler çalışma sürelerine göre 4 gruba ayrılmıştır; "1-2 yıl", "3-7 yıl", "8-19 yıl" ve "≥20 yıl". Bununla birlikte, idrar örneklerine ait Cr, Ni, Cd ve Pb düzeylerinin çalışma sürelerine göre farklılaşıp farklılaşmadığı da analiz edilmiştir (Tablo 4.7). Verilerin değerlendirilmesinde, Mann Whitney *U* ve Kruskall Wallis testi kullanılmıştır.

Tablo 4.7. Mesleki maruziyet (çalışma) süresi ile global 5-mC ve toksik metal düzeyleri arasındaki ilişkinin değerlendirmesi[a]

	İşçi grubu (n=160)					
		%5-mC	Krom (µg/g kreatinin)	Nikel (µg/g kreatinin)	Kadmiyum (µg/g kreatinin)	Kurşun (µg/g kreatinin)
Çalışma süresi	**n**	**Medyan (IQR)**				
1-2 yıl	37	6.70 (6.10-7.39)	0.013 (0.011-0.018)	4.63 (3.43-6.94)	0.257 (0.180-0.312)	1.83 (0.98-3.59)
3-7 yıl	50	6.69 (5.79-7.43)	0.015 (0.012-0.020)	4.91 (3.26-6.88)	0.276 (0.233-0.374)	2.49 (1.32-4.72)
8-19 yıl	37	6.87 (6.43-7.60)	0.014 (0.012-0.019)	4.88 (3.71-7.33)	0.318 (0.269-0.433)	3.31 (2.12-4.88)
≥20 yıl	36	6.16 (5.60-7.22)	0.015 (0.012-0.019)	5.46 (4.06-7.39)	0.389 (0.280-0.509)	3.21 (1.62-5.15)
H		9.249	0.935	2.079	17.402	9.214
p		**0.026***	0.817	0.556	**0.001****	**0.027***

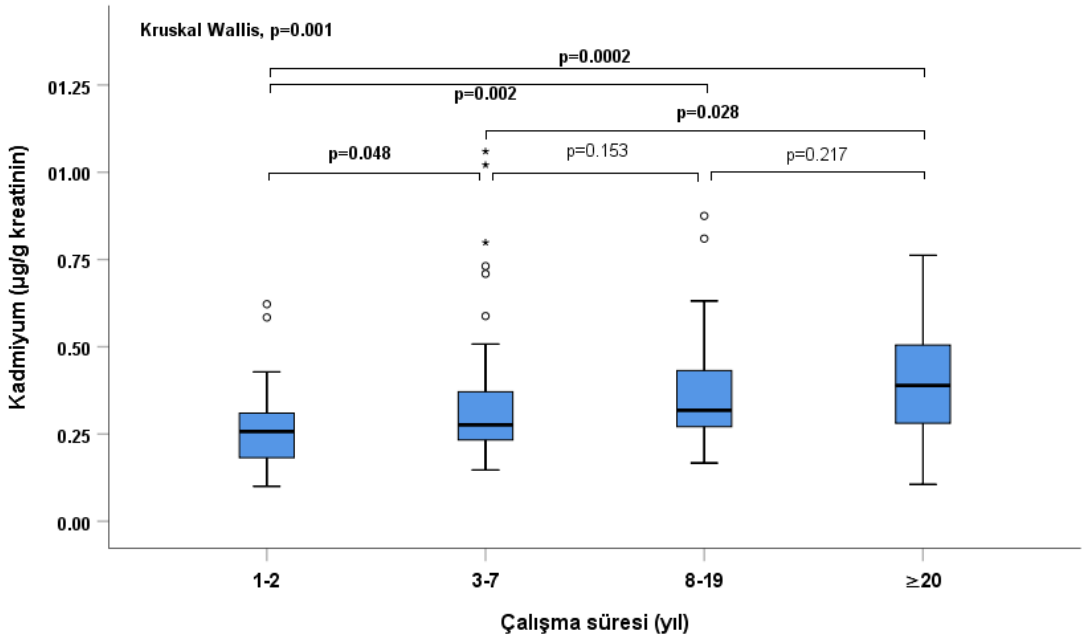
[a]Kruskall Wallis testi, $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$

Yapılan değerlendirme sonucunda global 5-mC düzeylerinin çalışma süresine göre anlamlı düzeyde farklılık gösterdiği saptanmıştır (H=9.249, p=0.026). Şekil 4.12'de de gösterildiği gibi; 8-19 yıl çalışan işçiler (medyan=%6.87) 3-7 yıl (medyan=%6.69) ve ≥20 yıl (medyan=%6.16) çalışanlara göre daha yüksek global 5-mC düzeyine sahiptir (sırasıyla p=0.038, p=0.003).



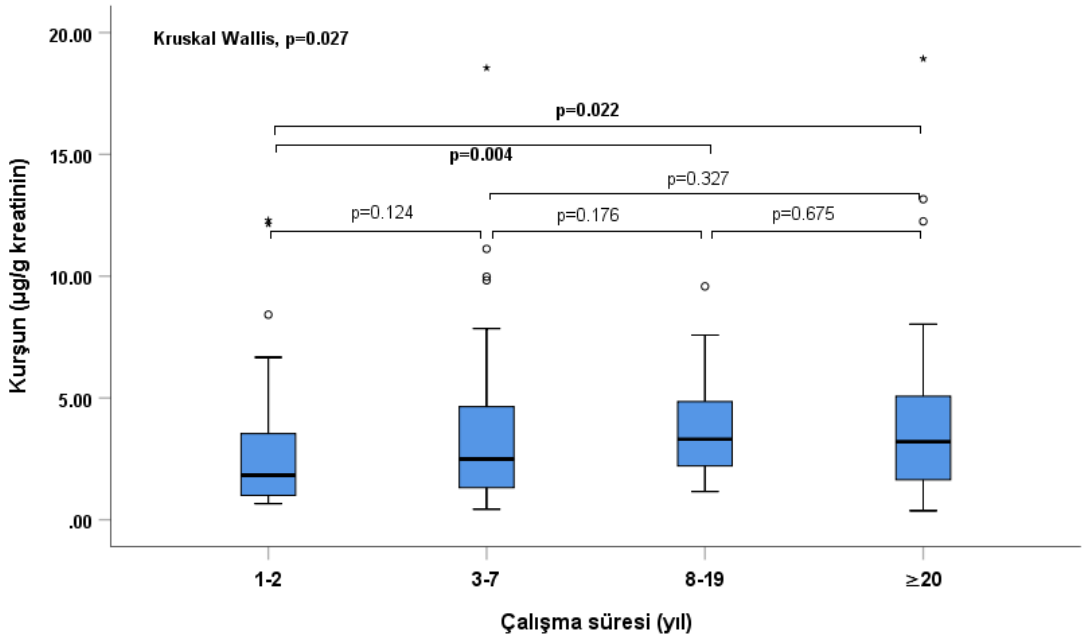
Şekil 4.12. Çalışma süresine göre global 5-mC düzeylerinin karşılaştırılması (n=160). Çalışma süreleri arasındaki farklılığın istatistiksel anlamlılığı grupların ikili kombinasyonu üzerinden Mann Whitney *U* testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

İdrar krom ve nikel düzeyleri çalışma süresine göre anlamlı bir şekilde değişmezken (p=0.817 ve p=0.556), kadmiyum ve kurşun düzeylerinin ise değiştiği tespit edilmiştir (p=0.001 ve p=0.027) (Tablo 4.7). Çalışma süreleri arasında gözlenen anlamlı farkın hangi gruplardan kaynaklandığı, çalışma sürelerinin ikili kombinasyonları dikkate alınarak Mann Whitney *U* testi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçları Şekil 4.13 ve 4.14'teki kutu grafiklerinde yer almaktadır. Şekil 4.13 incelendiğinde, mesleki maruziyet süresi (çalışma süresi) 3-7, 8-19 ve ≥20 yıl olan işçilerin idrar kadmiyum düzeyinin 1-2 yıl olanlardan ve ayrıca ≥20 yıl olan işçilerin 3-7 yıl olanlardan anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmektedir (p<0.05).



Şekil 4.13. Çalışma süresine göre idrar kadmiyum düzeylerinin karşılaştırılması (n=160). Çalışma süreleri arasındaki farklılığın istatistiksel anlamlılığı grupların ikili kombinasyonu üzerinden Mann Whitney *U* testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Bununla birlikte, idrar örneklerindeki Pb düzeyi de 8-19 ve ≥20 yıldır çalışmakta olan işçilerde 1-2 yıldır çalışan işçilere göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p<0.05) (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Çalışma süresine göre idrar kurşun düzeylerinin karşılaştırılması (n=160).

Fark analizleri dışında ayrıca, işçilerin çalışma süreleri ile global 5-mC, idrar Cr, Ni, Cd ve Pb düzeyleri arasındaki olası korelasyon Sperman korelasyon analizi kullanılarak incelenmiş (Tablo 4.8); çalışma süresi (yıl) ile idrar örneklerine ait Cd ve Pb (µg/g kreatinin) düzeyi arasında pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmış (sırasıyla; r_s=323, p<0.001; r_s=0.221, p=0.005), ancak Cr, Ni (µg/g kreatinin) ve 5-mC (%) arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir (p>0.05).

Tablo 4.8. İşçilerin çalışma süreleri (yıl) ile global 5-mC (%), Cr, Ni, Cd ve Pb (µg/g kreatinin) düzeyleri arasındaki korelasyon (n=160)

		%5-mC	Krom	Nikel	Kadmiyum	Kurşun
Çalışma süresi	r_s	-0.066	0.060	0.118	0.323	0.221
	p	0.408	0.449	0.138	**<0.001****	**0.005****

r_s: Spearman korelasyon katsayısı, $^{**}p$<0.01

4.3.4. Global 5-mC düzeyi ile demografik özelliklerin ve toksik metal düzeylerinin ilişkisi

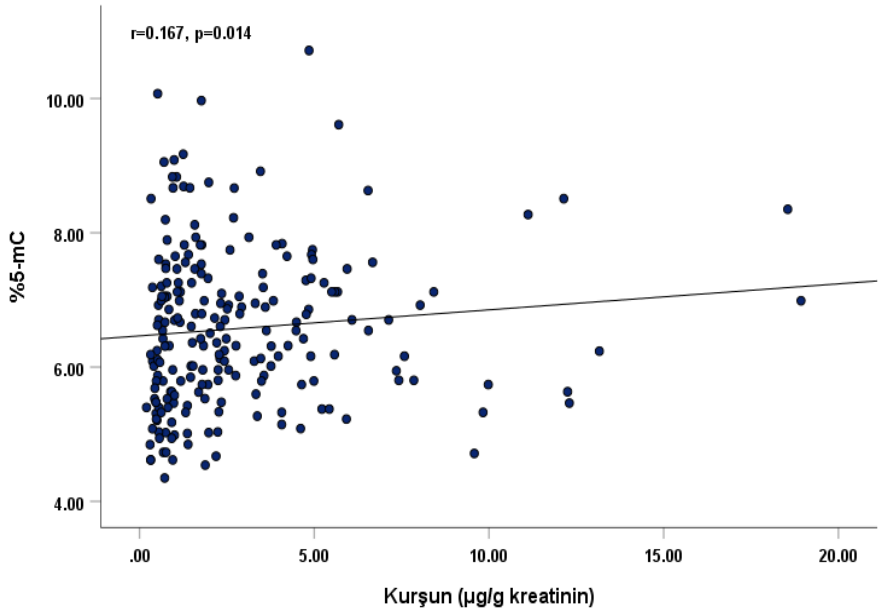
Katılımcıların global DNA metilasyon (%5-mC) düzeyleri ile demografik özellikleri ve idrardaki toksik metal (Cr, Ni, Cd ve Pb) düzeyleri arasındaki karşılıklı ilişki Sperman korelasyon testi ile incelenmiş ve analiz sonuçları Tablo 4.9'da derlenmiştir.

Tablo 4.9. Katılımcıların global DNA metilasyon (%5-mC) düzeyleri ile demografik özellikleri ve idrar toksik metal (Cr, Ni, Cd ve Pb) düzeyleri arasındaki korelasyon

	İşçi grubu (n=160)		**Kontrol grubu (n=55)**		**Tüm katılımcılar (n=215)**	
	%5-mC		**%5-mC**		**%5-mC**	
	r_s	*p*	r_s	*p*	r_s	*p*
Yaş (yıl)	-0.066	0.408	0.131	0.342	-0.030	0.662
VKİ (kg/m^2)	-0.038	0.636	0.094	0.493	-0.001	0.991
Sigara miktarı (paket-yıl)	-0.034	0.668	0.052	0.705	-0.041	0.554
Krom (µg/g kreatinin)	0.029	0.716	-0.048	0.728	0.087	0.203
Nikel (µg/g kreatinin)	-0.100	0.207	-0.033	0.810	-0.033	0.381
Kadmiyum (µg/g kreatinin)	0.063	0.425	0.093	0.499	0.060	0.381
Kurşun (µg/g kreatinin)	-0.015	0.846	-0.005	0.969	0.167	**0.014***

r_s: Spearman korelasyon katsayısı, *p<0.05

İşçi ve kontrol gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenemezken (p>0.05), tüm katılımcıların global DNA metilasyon (%5-mC) düzeyi ile idrar kurşun konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde ancak düşük düzeyde bir ilişki olduğu saptanmıştır (r_s=0.167, p=0.014) (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Global DNA metilasyonu (%5-mC) ile idrar kurşun düzeyi arasındaki ilişki (n=215)

5. TARTIŞMA

İnsan faaliyetleri nedeniyle çevreye büyük miktarlarda toksik ve kanserojen metaller salındığından, toksik metallere çevresel ve mesleki maruziyet giderek artan bir endişe kaynağıdır. İnsanlar meslekleri gereği toksik metallere maruz kalabilmekte ve toksik maddeler belirli bölgelerde havayı, toprağı veya suyu kirleterek o bölgede yaşayan nüfus için sağlık riski oluşturabilmektedir. Toksik metaller kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik bozukluklar ve otoimmün hastalıklar gibi bir dizi hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Son yıllarda, toksik metallerle ilişkili hastalıkların etiyolojisinde moleküler faktörlerin rolleri giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Artan veriler, epigenetik değişiklikleri toksik metal maruziyeti ile ilişkilendirmektedir. DNA metilasyonu, çevresel ve mesleki maruziyetlerle ilgili olarak epigenetik modifikasyonlar arasında en çok çalışılanıdır.

Çalışmamızda, global DNA metilasyon ve hidroksimetilasyonu ile Cr, Ni, Cd ve Pb konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amaçlanmıştır. Mesleki olarak bu toksik metallere maruz kalma olasılığı bulunan 160 tersane işçisi ile maruziyeti bulunmayan 55 bireyin (kontrol) idrardaki Cr, Ni, Cd ve Pb konsantrasyonları ICP-MS yöntemiyle belirlenmiş olup; işçi grubunda sırasıyla ortalama 0.018±0.02, 5.71±3.03, 0.342±0.172 ve 3.55±3.12 μg/g kreatinin iken kontrol grubunda sırasıyla 0.013±0.004, 4.55±1.76, 0.394±0.241 ve 0.73±0.43 μg/g kreatinin bulunmuştur.

Kanda global DNA metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeylerini belirlemek amacıyla ELISA yöntemi kullanılmıştır. Global hidroksimetilasyon (%5-hmC) kitinin yapılan hassasiyet çalışmaları sonucunda plak içi ve plaklar arası okumalardaki yüksek değişkenliği nedeniyle güvenilir varyasyon katsayısını göstermediği hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlardaki bu yüksek tutarsızlık nedeniyle kitin kandan

izole edilen DNA'daki 5-hmC yüzdesinin ölçülmesi için güvenilir olmadığına karar verilmiştir. ELISA temelli analizler, hızlı ve kolay uygulanabilir yöntemler olsalar da tipik olarak yüksek değişkenliğe eğilimlidir. Testler arası ve test içi değişkenliğin yüksek olmasından dolayı nispeten büyük değişiklikleri tespit etmek için uygundurlar (Kurdyukov ve Bullock, 2016). 5-hmC'in genomdaki %0,03 ile ~%0,7 düzeydeki düşük seviyeleri, DNA hidroksimetilasyonunun ELISA yöntemiyle çalışılmasını zorlaştırmıştır.

Hamzeiy, amiyotrofik lateral sklerozun (ALS) epigenetik yönünü incelediği çalışmasında, çalışmamızda kullanılan kit de dahil olmak üzere piyasadaki ELISA temelli dört farklı 5-hmC ölçüm kitini denemiş; hiçbirinin güvenilir SD ve CV göstermediği sonucuna ulaşmıştır. Ayrıca, antikorların hassasiyeti dolayısıyla kitin saklanması, taşınması, teslimat koşulları ve yerel dağıtıcıların standartları gibi faktörlerin nihai sonuçları etkileyebilecek önemli hususlar olduğunu vurgulamıştır (Hamzeiy, 2016).

Global DNA metilasyon analizleri sonucunda kan örneklerindeki 5-mC düzeyleri işçi grubunda (n=160) ortalama %6.74±1.08 ve kontrol grubunda (n=55) ise %6.10±1.35 olarak belirlenmiştir. Toksik metal maruziyeti bulunan işçilerin global 5-mC düzeyleri (medyan=%6.70), kontrol grubu (medyan=%5.69) ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p<0.0001).

Çalışmaya katılan gönüllülere ait idrar Cr, Ni, Cd ve Pb konsantrasyonları işçi grubunda sırasıyla ortalama 0.018±0.02, 5.71±3.03, 0.342±0.172 ve 3.55±3.12 µg/g kreatinin iken kontrol grubunda 0.013±0.004, 4.55±1.76, 0.394±0.241 ve 0.73±0.43 µg/g kreatinin'dir. Çalışmada yer alan gruplar arasında, idrardaki Cr, Ni ve Pb düzeylerinde beklenen farklılıklar tespit edilmiştir. İşçi grubu, kontrol grubuna kıyasla

anlamlı düzeyde yüksek Cr, Ni ve Pb konsantrasyonuna sahiptir (p<0.05). Cd için ise gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0.05).

Çalışmamızda, kandaki global 5-mC düzeyi ile idrar Cr, Ni, Cd ve Pb konsantrasyonları arasındaki karşılıklı ilişkiyi değerlendirmek için Spearman korelasyon testi kullanılmış, işçi grubunda global 5-mC düzeyi ile Cr, Ni, Cd ve Pb konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenememiştir (p>0.05). Kontrol grubunda da benzer bir sonuç elde edilirken, tüm katılımcıların sonuçları birarada değerlendirildiğinde, global DNA metilasyon düzeyi ile idrar Pb konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde düşük düzeyde ilişki olduğu saptanmıştır (r_s=0.167, p=0.014).

Hekzavalent krom, yaygın bir endüstriyel atık ürünü ve çevresel kirleticidir. Dünya çapında on milyonlarca insanın kroma maruz kaldığı tahmin edilmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, kromata inhalasyon yoluyla maruziyetin işçilerde akciğer kanseri riskini önemli ölçüde artırdığını göstermiştir (Lou ve ark., 2013). Kromata maruz kalan kişilerin akciğer kanserlerinde çeşitli genetik değişiklikler bilinmektedir, ancak kromun epigenetik etkileri hala tam olarak anlaşılamamıştır. Kromla ilişkili metilasyon, üzerinde yeterince çalışılmamış bir alan olmaya devam etmektedir ve bu ilişkileri araştırmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Takahashi ve ark., kromata maruz kalmış akciğer kanseri hastası işçilerden (n=35) ve kromata maruz kalmamış akciğer kanseri hastalarından (n=26) alınan tümörleri incelemiş; çalışma, DNA onarım geni *hMLH1*'in promotor bölge hipermetilasyonu kaynaklı baskılanmasının, kromata maruz kalan hastalarda maruz kalmayanlara göre daha yüksek olduğunu bulmuştur (Takahashi ve ark., 2005).

Aynı grup tarafından yürütülen benzer bir çalışma, kromat maruziyeti ile ilişkili 30 akciğer kanseri vakası ve kromatla ilişkisi olmayan 38 akciğer kanseri vakasında metilasyona özgü PCR yöntemi kullanarak *p16* tümör baskılayıcı geninin metilasyon durumunu incelemiştir. Araştırmacılar, *p16* promotorunun, 15 yıldan uzun bir süre mesleki olarak kromata maruz kalan işçilerde hipermetile olduğunu tespit etmiştir. *p16* geninin metilasyon durumu, maruziyet süresi 15 yıldan az olan işçilerde değişmemiştir, bu da kromatın *p16* promotoru üzerindeki etkisinin maruz kalma süresi ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir (Kondo ve ark., 2006).

Önceki çalışmalarla aynı temayı koruyan Ali ve ark., 36 kromat maruziyeti bulunan akciğer kanseri işçiden ve 25 kromat maruziyeti bulunmayan akciğer kanseri hastasından alınan tümör örneklerinde *APC, MGMT, hMLH1* genlerindeki metilasyon değişikliklerini araştırmıştır. Çalışma kromat maruziyeti bulunan akciğer kanserlerinde bulunmayanlara göre *hMLH1* ve *APC* genlerinde daha fazla metilasyon olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca, genel metilasyon durumunun bir yansıması olan ortalama metilasyon indeksi, kromatlı akciğer kanserlerinde, kromatsız akciğer kanserlerinden önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur (Ali ve ark., 2011).

Wang ve ark., kromat üretim tesisinde çalışan 115 işçi ve kontrol grubu olarak kroma maruz kalma geçmişi olmayan 60 gönüllü katılımcı ile yürüttükleri çalışmada, folat eksikliğinin genetik materyal üzerindeki zararlı etkilerini araştırmayı amaçlamıştır. Katılımcıların kan örneklerindeki Cr konsantrasyonu ICP-MS ile ölçülmüş, global DNA metilasyon düzeyi ise çalışmamızla benzer şekilde ELISA yöntemiyle belirlenmiştir. Kroma maruz kalan işçilerde global DNA metilasyon düzeyi (ort±SS=%1.48±0.67, aralık=%0.33-3.94), kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (ort±SS=%2.10±1.04, aralık=%0.46-5.74) düşük bulunmuştur (p<0.001). Sonuçlar,

kromata maruz kalan işçilerde önemli ölçüde azalmış serum folatı ile birlikte periferik kırmızı kan hücrelerinde belirgin bir Cr birikimi olduğunu göstermiştir. Çalışmamızın aksine kromat, kanserin ayırt edici özelliği olan DNA hipometilasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Yazarlar, bu ilişkinin, SAM havuzuna donör olan folat ve kromat arasındaki etkileşimden kaynaklanabileceğini, ayrıca kromatın doğrudan bir mutajen olarak etkisiyle birlikte, folat eksikliğini indükleyebileceğini ve kanserojen özelliklerini artırabileceğini ileri sürmüştür (Wang ve ark., 2012b).

Çeşitli insan, hayvan ve *in vitro* araştırmaları, nikel bileşiklerinin toksik etkilerini gösteren, insanların nikele maruz kalma tehlikesini ortaya koyan veriler sağlamaktadır. İnsanların nikele maruz kalmasıyla ilgili en büyük endişe mesleki maruziyettir (Brocato ve Costa, 2013). Lee ve ark.'nın gerçekleştirdikleri iki *in vitro* çalışmada, nikel ile muamele, hem promotor hipermetilasyonuna, hem de global DNA metilasyonunda artışa neden olmuştur (Lee ve ark., 1995; Lee ve ark., 1998). Ayrıca nikel, *in vivo* olarak da bir dizi genin hipermetilasyonu ile ilişkilendirilmiştir. *RAR-β2* ve *RASSF1A*, sırasıyla hücre büyümesine aracılık eden ve hücre döngüsünün durmasını tetikleyen tümör baskılayıcı genlerdir. Kas içine 10 mg nikel subsülfit enjeksiyonu verilen Wistar fareleri, *RAR-β2*, *RASSF1A* ve *p16* hipermetilasyonu görülen kas tümörleri geliştirmiştir (Zhang ve ark., 2011b).

Kadmiyum ve DNA metilasyonu arasındaki ilişkiyi araştıran çeşitli çalışmalarda; kadmiyum maruziyeti idrarda, kanda, aynı anda hem idrarda hem kanda ve ayak tırnağında ölçülmüştür. Söz konusu çalışmalarda global DNA metilasyonu; LINE-1 elementlerinin pirosekanslanması, ELISA yöntemi, pirosekanslama ile aday genlerde CpG bölgesine özgü DNA metilasyonu ve genom çapında mikrodizi teknolojileri kullanılarak tespit edilmiştir (Hanna ve ark, 2012; Sanders ve ark., 2014; Tajuddin ve

ark., 2013; Tellez-Plaza ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2013). Genel olarak çalışmalar, çoğunlukla kadmiyum maruziyeti ve DNA metilasyonu arasındaki pozitif ilişkilere doğru bir eğilim göstermiştir. Bu çalışmalarda elde edilen bulgular kısmen bizim çalışmamızdaki bulguları destekler niteliktedir.

Bununla birlikte, Hossain ve ark. tarafından yapılan bir araştırma, Arjantinli kadınlarda (n = 202) düşük düzeyde çevresel kadmiyum maruziyetinin global DNA metilasyonu üzerindeki etkilerini incelemiş; bulgularımızın aksine düşük idrar kadmiyumunun LINE-1 metilasyonu ile ters ilişkili olduğunu bulmuştur (Hossain ve ark., 2012).

Birkaç çalışma, kadmiyuma maruz kalma süresinin DNA metilasyon seviyelerini etkilediğini göstermiştir. Takiguchi ve ark., 1 hafta boyunca kadmiyum uygulanan sıçan karaciğer hücrelerinin DNA metilasyonunda bir azalma gösterdiğini, ancak aynı hücre hattının aynı dozla 10 hafta maruziyetten sonra DNA metilasyonunda önemli bir artış gösterdiğini gözlemlemiştir. Kısa süreli maruz kalma sonrasında bu hücrelerde DNMT aktivitesi azalırken, uzun süreli maruz kalma DNMT aktivitesini arttırmıştır (Takiguchi ve ark., 2003). İnsan embriyosu akciğer fibroblast hücrelerinin kullanıldığı başka bir çalışmada, hücreler 2 ay boyunca kadmiyum ile muamele edildiğinde, benzer şekilde DNA metilasyon seviyesinin ve DNMT aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Jiang ve ark., 2008).

Global DNA metilasyonunun kurşun kaynaklı değişiklikleri üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda sıklıkla rapor edilmektedir. Wang ve arkadaşlarının, DNA metilasyonu ve Pb maruziyeti ile genotoksisite arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmasında; kurşuna mesleki olarak maruz kalan 250 işçinin kan Pb seviyeleri atomik absorbsiyon spektroskopisi (AAS) ile analiz edilmiş, LINE-1 ve Alu tekrar

bölgelerindeki metilasyon düzeyleri pirodizileme ile belirlenmiştir. LINE-1 metilasyonunda anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, Alu metilasyonunun kan Pb düzeyi ile negatif ilişkili olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark., 2023).

Zhang ve ark., kurşuna maruz kalan 8 işçi ile yürüttükleri çalışmada Illumina Infinium EPIC BeadChip (850 K) kullanarak genom çapında (356 CpG bölgesi) metilasyon farklılıklarının oluşumunu değerlendirmiş; yüksek kan Pb düzeyi ile düşük kan Pb düzeyine sahip işçiler arasındaki DNA metilasyonunda genom çapında farklılıklar tespit etmişlerdir (Zhang ve ark., 2019).

Otomotiv aküsü fabrikasında çalışan 100 erkek işçi ile yürütülen bir başka çalışmada, kandaki Pb konsantrasyonları ICP-MS ile ölçülmüş, global DNA metilasyon yüzdesi ELISA kiti kullanılarak belirlenmiştir (ort±SS=%2.8±1.1, aralık=%1.1-6.5). Kandaki Pb konsantrasyonu artışıyla global DNA metilasyonunun anlamlı bir şekilde azaldığı raporlanmıştır (Devoz ve ark., 2017).

Çevresel kümülatif kurşun maruziyeti açısından iyi karakterize edilmiş yaşlı erkeklerden oluşan bir toplulukta (n=517) global DNA metilasyonu üzerine yapılan diğer bir çalışmada, patella kurşun seviyelerinin LINE-1 metilasyonu ile negatif ilişkili olduğu ancak tibia ve kandaki kurşunun, Alu veya LINE-1 ile ilişkili olmadığı bulunmuştur (Wright ve ark., 2010). Sözü edilen çalışmalar, Pb konsantrasyonu artışının çalışmamızın aksine global DNA metilasyonunda bir azalmaya neden olduğunu göstermektedir.

Mevcut çalışmamızla diğer çalışmaların bazıları arasındaki tutarsızlıkların olası nedenlerinin; çalışma popülasyonları (genç–yaşlı), örneklem grubunun büyüklüğü, maruz kalma yolları (mesleki–çevresel), maruz kalma seviyeleri (akut–kronik) ve

global metilasyon düzeyini yansıtan farklı belirteçler kullanılması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Epigenetik değişiklikler, çevresel faktörlere akut ve kronik şekilde maruz kalmanın etkilerinin hassas belirteçleridir. Bununla birlikte, yanıtlar genellikle doğrusal değildir ve yaşam evrelerine bağlıdır. Çevresel bir faktöre akut ve düşük dozdaki maruziyet, fetüsün duyarlılık penceresi sırasında meydana gelirse, yetişkinlerde yüksek doz maruziyetten çok daha büyük etkilere sahip olabilmektedir. DNA metilasyonu değişikliklerinin potansiyel kalıtsallığının önemi ve maternal çevresel maruziyetlerin doğum sonrası etkileri göz önüne alındığında, maternal maruziyet biyobelirteçleri ile kordon kanındaki DNA metilasyonu arasındaki ilişkiyi rapor eden çalışmalar önem kazanmaktadır (Dolinoy ve ark., 2006; Zhang ve ark., 2022).

Zhang ve ark., hamile kadınlar arasında metal maruziyeti ile oksidatif stres ve DNA metilasyonu arasındaki ilişkiyi araştırmış, 113 hamile kadının yer aldığı çalışmada, içlerinde Cr, Cd, Pb ve nikelin de bulunduğu 16 metalin konsantrasyonunu idrarda ICP-MS yöntemiyle tayin etmiştir. Global DNA metilasyon miktarı ise Alu ve LINE1 tekrar elementleri ve PCR yöntemi kullanılarak kordon kanında belirlenmiştir. Üriner metaller ile global DNA metilasyonu arasında hiçbir ilişki gözlenmemiştir (Zhang ve ark., 2022).

Gebelik dönemini kapsayan Bangladeş'teki 127 anne-çocuk ikilisini içeren bir epigenom çapında ilişkilendirme çalışmasında (EWAS) ise, hamileliğin erken döneminde anne kanındaki Cd, belirgin cinsiyet farklılıklarıyla birlikte kordon kanındaki DNA metilasyonu değişiklikleriyle ve ayrıca metilasyon değişikliklerinin bazıları da düşük doğum ağırlığı ile ilişkilendirilmiştir (Kippler ve ark., 2013).

Doğum öncesi kurşun maruziyetinin, göbek kordonu kanındaki global DNA metilasyon değişiklikleri ile ilişkili olup olmadığını belirlemeyi amaçlayan bir diğer çalışmada (n=103); maternal tibia kurşun düzeylerinin kordon kanı örneklerindeki Alu metilasyonu ve patella kurşun düzeylerinin LINE-1 metilasyonu ile ters ilişkili olduğu tespit edilmiş, kordon kanı kurşun miktarı ile global DNA metilasyonu arasında ise bir ilişki bulunamamıştır (Pilsner ve ark., 2009).

Çalışmamızda ayrıca, toksik metallerin yanı sıra sosyo-demografik faktörler ve yaşam alışkanlıklarının da global metilasyon düzeyine olan etkisi irdelenmiştir.

Birçok çalışma, global DNA metilasyonunun erkeklerde kadınlardan daha yüksek olduğunu bulmuştur (El-Maarri ve ark., 2011; Fuke ve ark., 2004; Sanchez-Guerra ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2011a; Zhu ve ark., 2012; Wilhelm ve ark., 2010). Örneğin, bir çalışmada erkeklerde kanda toplam 5-mC yüzdesi kadınlardan daha yüksek tespit edilmiştir (Fuke ve ark., 2004), ancak bu sonuç 5-mC'yi ölçen daha büyük bir çalışmada tekrarlanamamıştır (Moore ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda, katılımcılar arasında cinsiyet erkek olarak sınırlandırıldığı için, global DNA metilasyonu üzerinde cinsiyetin etkisinin olup olmadığı sonucuna varılamamıştır.

Yaşlanan hücrelerde, 5-mC içeriğinde zamana bağlı bir kayıp görülmektedir. Çalışmalarda, CpG adacıklarının metilasyon kazanma eğiliminde olduğu, oysa ada dışı CpG'lerin artan yaşla birlikte metilasyon düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir. Yaşlanmanın metilasyon üzerindeki genel etkisi, global genomik DNA metilasyon seviyesini azaltmaktır ve DNA metilasyonundaki bu yaşa bağlı bu düşüşün, doku türleri arasında da benzer olduğu saptanmıştır (Christensen ve ark., 2009; Fuke ve ark., 2004).

Yaşın global DNA metilasyonu üzerindeki etkisi Zhu ve ark. tarafından geniş çaplı bir şekilde tartışılmıştır. Yaşları 19 ile 100 arasında değişen toplam 1465 sağlıklı katılımcıyı içeren beş çalışmadan elde edilen bireysel veriler birleştirilmiş; yaş ile sağlıklı katılımcıların kanından elde edilen global 5-mC içeriği arasında ters bir ilişki olduğunu bildirmiştir (Zhu ve ark., 2012).

Çalışmamızda ise, yaşları 19 ile 66 arasında değişen katılımcı arasında her iki grup için de yaş ile global 5-mC düzeyi arasında bir ilişki saptanmamıştır. Yaşları 45 ile 75 arasında değişen bireyler üzerinde yapılan bir başka araştırmada (n=161), sonuçlarımızla uyumlu olarak global DNA metilasyonundaki yaşa bağlı eğilim istatitiksel olarak anlamlı değildir (Zhang ve ark., 2011a). Benzer şekilde, De Prins ve ark. tarafından yürütülen bir çalışmada (n=48) yaşın %-5mC üzerinde anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir (De Prins ve ark., 2013).

Epigenetik profili değiştirdiği bilinen bir başka faktör ise tütün ürünlerinin tüketilmesidir. Sigara içmek yaygın bir alışkanlıktır ve bilinen olumsuz sağlık etkilerine rağmen, nüfusun önemli bir bölümü sigara içmeye devam etmektedir. Tütün dumanı, insan vücudunu DNA hasarı, inflamasyon ve oksidatif stres yoluyla etkileyebilen ve kardiyovasküler hastalığa, kronik obstrüktif akciğer hastalığına (KOAH) ve kansere yol açabilen yaklaşık 7000 kimyasal içerir (Fragou ve ark., 2019). Sigara dumanında bulunan kimyasallara maruz kalma sonucu ortaya çıkan hücresel modifikasyonlar geniş çapta araştırılmıştır ve bunlar arasında, gen mutasyonları, kromozom sapmaları, kardeş kromatin değişimleri ve DNA sarmal kırılmaları yer almaktadır (DeMarini. 2004).

Sigara içme alışkanlığının; hiç içmemiş, bırakmış ve içiyor olarak sınıflandırıldığı çalışmamızda, hem işçi hem de kontrol grubunda, sigara içme durumuna bağlı olarak

global 5-mC düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmamıştır (p>0.1). Toplam sigara içme miktarının oldukça geniş bir aralık olan 0.1 ile 215 paket-yıl arasında değiştiği sigara içme miktarıyla, %5-mC düzeyi arasındaki ilişki değerlendirildiğinde yine her iki grup için de anlamlı bir ilişki belirlenememiştir (p>0.05).

Daha önceki bazı çalışmalarla (Awada ve ark., 2021; Chopra-Tandon ve ark., 2017; Hou ve ark., 2010; Moore ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2011a; Zhu ve ark., 2012) uyumlu olarak, çalışmamız sigara içimi ve alkol tüketimi ile kandaki global DNA metilasyonu arasındaki ilişkiyi desteklememiştir. Buna karşılık; de Araújo Costa ve ark., sağlıklı oral mukoza örneklerinde ELISA yöntemiyle, sigara içmenin global DNA metilasyon ve hidroksimetilasyon durumu üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmada; sigara içme alışkanlıklarının global DNA metilasyonunda değişikliklere yol açabileceği sonucuna varmıştır (de Araújo Costa ve ark., 2016). Ayrıca, Smith ve ark., skuamöz hücreli baş ve boyun kanseri dokularında LINE-1 metilasyon düzeylerinin, sigara ve alkol kullanımı ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu bildirmiştir (Smith ve ark., 2007). Bu çalışmalar, sigara içmenin ve alkol tüketiminin global DNA metilasyonu üzerindeki etkisinin dokuya özgü olabileceğini düşündürmüştür.

VKİ; yaşam tarzı (örn. fiziksel aktivite), çevresel faktörler (gıda bulunabilirliği ve alımı) ve genetik faktörler tarafından belirlenen karmaşık bir fenotiptir (Dick ve ark., 2014). VKİ ile kandaki LINE-1 ve Alu metilasyon seviyeleri arasındaki ilişkiyi araştıran çeşitli çalışmalar çelişkili sonuçlar göstermiştir. Bazı araştırmalarda, VKİ ile LINE-1 ve Alu metilasyonu arasında herhangi bir ilişki tespit edilememiştir (Marques-Rocha ve ark., 2016; Kim ve ark., 2010; Zhang ve ark., 2011a; Zhu ve ark., 2012). Ancak, bazı çalışmalarda ise yüksek VKİ'nin düşük LINE-1 metilasyonu ile

ilişkili olduğu bildirilmiştir (Awada ve ark., 2021; McCullough ve ark., 2015; Piyathilake ve ark., 2013). Bununla birlikte diğer bir çalışmada VKİ, LINE-1 metilasyonu ile pozitif olarak ilişkilendirilmiş; VKİ ≥40 kg/m^2 olan katılımcıların LINE-1 metilasyon seviyeleri VKİ <25 olanlara göre daha yüksek bulunmuştur (Perng ve ark., 2014). Çalışmamızda da benzer şekilde, işçi grubunda VKİ ≥30 kg/m^2 olan işçilerin global DNA metilasyon düzeylerinin VKİ=25-29 kg/m^2 olanlardan anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (p=0.013).

Eğitim düzeyi; doğum öncesi, çocukluk çağı ve yetişkin beslenmesi, sağlık hizmetleri, mahalle ortamı ve meslek dahil olmak üzere yaşam boyu sayısız çevresel koşulla bağlantılıdır ve bunların çoğu, sigara içme, stres, alkol kullanımı ve yüksek VKİ gibi davranışsal özelliklerle bağlantılıdır. Dolayısıyla bu maruziyetler, yüksek ve düşük eğitimli insanlar arasındaki farklı epigenetik modellerin potansiyel itici güçleridir (van Dongen ve ark. 2018; Zhao ve ark., 2019).

Çalışmamızda, eğitim düzeyi ile global DNA metilasyonu arasındaki ilişki değerlendirildiğinde işçi grubunda lise mezunu katılımcıların 5-mC yüzdesinin ilköğretim mezunu olanlara göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir (p=0.004). Sosyo-ekonomik durum ve global DNA metilasyonu arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalardan birinde (n=988), sonuçlarımızla uyumlu olarak eğitim erkeklerde lökosit DNA'sındaki Alu ve LINE-1 metilasyonu ile pozitif ilişkili bulunmuştur (Subramanyam ve ark., 2013). Buna karşılık, 239 katılımcının yer aldığı diğer bir çalışmada 5-mC yüzdesi ELISA yöntemi ile belirlenmiş (median=%3.3, IQR=%2.2–4.7) ve global DNA metilasyonu ile eğitim arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir (McGuinness ve ark., 2012).

Mevcut çalışmamızın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Global DNA hidroksimetilasyon düzeyleri belirlenemediğinden, Cr, Ni, Cd ve Pb metalleri ile olan ilişkisi değerlendirilememiştir. Ayrıca, yaygın olarak erişilebilen insan numunesi olan kan, diğer toksikolojik hedef dokulardaki metilasyon değişikliklerini yansıtmamaktadır. Diğer bir kısıtlılık, çalışmamıza gene özgü DNA metilasyon analizinin dahil edilmemiş olmasıdır. Hedefe yönelik analiz, belirli mekanizmalar hakkında daha fazla bilgi sağlayabilir ve biyolojik yorumlamaya yardımcı olabilir. DNA metilasyonu, birçok farklı çevresel maruziyetten etkilenebilen dinamik bir mekanizmadır. Bu nedenle, elde ettiğimiz sonuçları desteklemek için daha fazla kanıta ihtiyaç vardır. Daha yüksek katılımcı sayısı ile bulguların gen düzeyinde genişletilmesi gerektiği düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Son yıllarda, gen ekspresyonunun epigenetik düzenlemesinin moleküler mekanizmaları da dahil olmak üzere epigenetiğin çeşitli yönlerinin anlaşılmasında büyük ilerleme kaydedilmiştir, ancak çeşitli çevresel faktörlere maruz kalma ve epigenetik değişiklikler arasındaki bağıntılı ve nedensel etkiler açısından anlaşılması gereken çok şey vardır. Epigenetik, hastalık süreçlerinde oynayabileceği role ek olarak, çevresel maruziyetin yararlı ve pratik bir biyobelirteci olarak da hizmet etme potansiyaline sahiptir. Çalışmamızda, toksik metallere mesleki maruziyet nedeniyle olumsuz sağlık sonuçları yaşama riski yüksek olan işçi grubuyla kontrol grubu karşılaştırılmış; işçilerin kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yüksek Cr, Ni ve Pb konsantrasyonuna sahip olduğu belirlenmiş (p<0.05) ve işçi grubunun global DNA metilasyon düzeyi, mesleki maruziyeti bulunmayan kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p<0.0001). Günümüzde epigenetik araştırmalar hızla devam etmekte ve her geçen gün gerek araştırılan epigenetik belirteçlere gerekse kullanılan tekniklere bir yenisi eklenmektedir. Güncel araştırmalardan da anlaşıldığı üzere çalışmalar genellikle doku ve gen düzeyine indirgenmektedir. Metilasyon global düzeyde kanda tespit edildiğinde hem hipermetilasyon hem de hipometilasyon görülen bölgelerin toplam metile sitozin oranı belirlendiğinden, epigenetik değişimlerin bütünsel bir sonucu elde edilmekte iken; doku ve/veya gen düzeyinde yapılan çalışmalarda metilasyon daha spesifik bir şekilde tespit edilmekte ve değişime neden olan faktörün (toksik ajan, ilaç, stres vb.) doğrudan etkisi gözlenmektedir. Bu nedenle bu çalışmanın kısmen literatürdeki bilgiyi destekler nitelikte elde edilen bulgularının genişletilmesi gerektiği düşünülmektedir. Meslek hastalıkları kişilerin uzun vadede yaşam kalitesini doğrudan etkileyen bir husus olduğundan, gerek sağlık yönünden, gerekse özlük hakları ve hukuki çerçeveden ele alınması gereken mühim

bir konudur. Mesleki olarak ağır metallere maruz kalan işçilerin maruziyet düzeylerinin belli aralıklarla tespit edilmesi, iş güvenliği tedbirlerinin alınması ve düzenli denetimlerinin sağlanması, mesleki yıpranma değerlendirmelerinin titizlikle yapılması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

Akkaya ZY, Dinçer P. Tedavi yaklaşımlarında yeni bir dönem: Kodlamayan RNA'lar ve hastalıklar. Marmara Medical Journal 2013;26:5-10.

Akkirpik M, Dirican E, Güllü Amuran G, Ayşe Ö. Kanserde genetik üstü (epigenetik) mekanizmalar. Türk Nöroşir Derg 2017;27(2):112-121.

Ali AHK, Kondo K, Namura T, Senba Y, Takizawa H, Nakagawa Y ve ark. Aberrant DNA methylation of some tumor suppressor genes in lung cancers from workers with chromate exposure. Molecular Carcinogenesis 2011;50(2):89-99.

Arita A, Costa M. Environmental agents and epigenetics. Handbook of epigenetics. Tollefsbol TO, editör. 1. baskı Academic Press, 2011;459-476.

Arita A, Niu J, Qu Q, Zhao N, Ruan Y, Nadas A ve ark. Costa M. Global levels of histone modifications in peripheral blood mononuclear cells of subjects with exposure to nickel. Environmental Health Perspectives 2012;120(2):198-203.

Awada Z, Bouaoun L, Nasr R, Tfayli A, Cuenin C, Akika R ve ark. LINE-1 methylation mediates the inverse association between body mass index and breast cancer risk: A pilot study in the Lebanese population. Environmental Research 2021;197:111094.

Ayaz G, Şahin Ö, Ayaz U, Özdemir SM. Epigenetik ve kanser. Madde, Diyalektik ve Toplum 2019;2(1):94-103.

Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. Peptides 2015;72:4-15.

Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and environmental chemicals. Current Opinion in Pediatrics 2009;21(2):243-251.

Bakırcı N, Gedik Bakırcı L. Bir akü fabrikasında çalışan işçilerde kurşun maruziyetinin değerlendirilmesi. Marmara Medical Journal 2007;20(2):66-74.

Bal C, Büyükşekerci M, Ercan M, Torun-Güngör O, Tutkun E, Yılmaz FM. Kurşun maruziyetinin taranmasında saç ve idrar numunelerinin kullanılabilirliğinin araştırılması. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 2016;73(4):303-310.

Balali-Mood M, Naseri K, Tahergorabi Z, Khazdair MR, Sadeghi M. Toxic mechanisms of five heavy metals: mercury, lead, chromium, cadmium, and arsenic. Front Pharmacol 2021;12:643972.

Bloomfield M, Hanson C. Beyond the gene: epigenetic science in twenty-first century culture. Textual Practice 2015;29(3):405-413.

Bollati V, Baccarelli A. Environmental epigenetics. Heredity 2010;105:105–112.

Bora G, Erdem-Yurter H. Epigenetik hastalıklar ve tedavi yaklaşımları. Hacettepe Tıp Dergisi 2007;38:48-54.

Bradberry SM, Vale A. Chromium intoxication: features and management. J Toxicol Clin Toxicol 2001;39:233-235.

Branco MR, Ficz G, Reik W. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. Nat Rev Genet 2012;13:7-13.

Brocato J, Costa M. Basic mechanics of DNA methylation and the unique landscape of the DNA methylome in metal-induced carcinogenesis. Critical Reviews in

Toxicology 2013;43869:493-514.

Cadieux B, Ching T-T, VandenBerg SR, Costello JF. Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation. Cancer Res 2006;66(17):8469-8476.

Chao W. Genomic imprinting. Handbook of epigenetics the new molecular and medical genetics. Tollefsbol TO, editör. 1. baskı Academic Press, 2011;353-379.

Cheng TF, Choudhuri S, Muldoon-Jacobs K. Epigenetic targets of some toxicologically relevant metals: a review of the literature. Journal of Applied Toxicolology 2012;32:643-53.

Cheng X, Hashimoto H, Horton JR, Zhang X. Mechanisms of DNA methylation, methyl-CpG recognition, and demethylation in mammals. Handbook of epigenetics the new molecular and medical genetics. Tollefsbol TO, editör. 1. baskı Academic Press, 2011;9-24.

Cheng Y, Xie N, Jin P, Wang T. DNA methylation and hydroxymethylation in stem cells. Cell Biochem Funct 2015;33:161-173.

Chopra-Tandon N, Wu H, Arcaro KF, Sturgeon SR. Relationships between global DNA methylation in circulating white blood cells and breast cancer risk factors. Journal of Cancer Epidemiology 2017;270586.

Choudhuri S. Small noncoding RNAs: biogenesis, function, and emerging significance in toxicology. J Biochem Mol Toxicol 2010;24:195-216.

Christensen BC, Houseman EA, Marsit CJ, Zheng S, Wrensch MR, Wiemels JL ve

ark. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. PLoS Genet 2009;5:1000602.

Çelik-Özenci Ç. DNA metilasyonu ve erkek infertilitesi. Androloji Bülteni 2006;25:121-124.

Dahl C, Gronbaek K, Guldberg P. Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. Clin Chim Acta 2011;412:831-836.

de Araújo Costa L, da Silva ICB, Mariz BALA, da Silva MB, Freitas-Ribeiro GM, de Oliveira NFP ve ark. Influence of smoking on methylation and hydroxymethylation levels in global DNA and specific sites of KRT14, KRT19, MIR-9-3 and MIR-137 genes of oral mucosa. Archives of Oral Biology 2016;72:56-65.

DeMarini DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. Mutat Res 2004;567:447-74.

Demirtaş Z, Bilgi F, Mercan L. Memelilerde genomik damgalanmanın epigenetik düzenleyicileri. Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 2016;4(12):1139-1142.

den Braver-Sewradj SP, van Benthem J, Staal YCM, Ezendam J, Piersma AH, Hessel EVS. Occupational exposure to hexavalent chromium. Part II. Hazard assessment of carcinogenic effects. Regul Toxicol Pharmacol 2021;126:105045.

De Prins S, Koppen G, Jacobs G, Dons E, Van de Mieroop E, Nelen V ve ark. Influence of ambient air pollution on global DNA methylation in healthy adults: A seasonal follow-up. Environment International 2013:59;418-424.

Devoz PP, Gomes WR, De Araújo ML, Ribeiro DL, Pedron T, Greggi Antunes LM ve ark. Lead (Pb) exposure induces disturbances in epigenetic status in workers

exposed to this metal. Journal of Toxicology and Environmental Health 2017;80:1098–1105.

Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, Sandling JK, Aïssi D, Wahl S ve ark. DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. Lancet 2014;383:1990-1998.

Dolinoy DC, Weidman JR, Waterland RA, Jirtle RL. Maternal Genistein Alters Coat Color and Protects Avy Mouse Offspring from Obesity by Modifying the Fetal Epigenome. Environmental Health Perspectives 2006;114(4):567-572

Dündar Y, Aslan R. Yaşamı kuşatan ağır metal kurşunun etkileri. Kocatepe Tıp Dergisi 2005;6:1-5.

Dvash T, Fan G. Epigenetics of X chromosome inactivation. Handbook of epigenetics the new molecular and medical genetics. Tollefsbol TO, editör. 1. baskı Academic Press, 2011; 341-351.

Edwards T, Myers J. Environmental exposures and gene regulation in disease etiology. Environ. Health Perspect 2007;115:1264–1270.

Efimova OA, Koldsova AS, Krapivin MI, Tikhonov AV, Pendina AA. Enviromental epigenetics and genom fleksibility: focus on 5- hydroxymethylcytosine. International Journal of Molecular Sciences 2020;21:3223.

El-Maarri O, Walier M, Behne F, van uum J, Singer H, Diaz-Lacava A ve ark. Methylation at global LINE-1 repeats in human blood are affected by gender but not by age or natural hormone cycles. PLoS ONE 2011;6:16252.

Erol D, Elyas Z, Ünal S. Psikiyatrik hastalıkların gelişiminde epigenetik

mekanizmalar. Klinik Psikofarmakoloji Bülteni 2010;20:109-114.

Eser BE, Yazgan ÜC, Gürses SA, Aydın M. Diabetes mellitus ve epigenetik mekanizmalar. Dicle Tıp Dergisi 2016;43(2):375-382.

Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. Human Molecular Genetics 2007;16(1):R50-R59.

Esteller M, Herman J G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. The Journal of Pathology 2002;196(1):1-7.

Ficz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA ve ark. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. Nature 2011;473(7347):398-402.

Fragou D, Pakkidi E, Aschner M, Samanidou V, Kovatsi L. Smoking and DNA methylation: Correlation of methylation with smoking behavior and association with diseases and fetus development following prenatal exposure. Food and Chemical Toxicology 2019;129:312-327.

Frumkin D, Wasserstrom A, Budowle B, Davidson A. DNA methylation-based forensic tissue identification. Forensic Science International: Genetics 2011;5(5):517-524.

Fuke C, Shimabukuro M, Petronis A, Sugimoto J, Oda T, Miura K ve ark. Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. Ann Hum Genet 2004;68:196-204.

Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. J Invest Dermatol 2013;133(9):e12.

Genchi G, Carocci A, Lauria G, Sinicropi MS, Catalano A. Nickel: human health and environmental toxicology. Int J Environ Res Public Health 2020;17:679.

Globisch D, Münzel M, Muller M, Michalakis S, Wagner M, Koch S ve ark. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. PLoS ONE 2010;5:e15367.

Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A ve ark. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. J Occup Med Toxicol 2006;1:22.

Guibert S, Weber M. Functions of DNA methylation and hydroxymethylation in mammalian development. Current Topics in Developmental Biology 2013;104:47-83.

Güler C, Balcı Peynircioğlu B. DNA metilasyonu ve hastalıklarla ilişkisi. ACU Sağlık Bilimleri Dergisi 2016;2:61-68.

Hamzeiy H. Aberrant global DNA methylation in neurodegeneration: ALS and trinucleotide repeat disorders. (MSc tezi) Boğaziçi Üniversitesi, 2016.

Hanna CW, Bloom MS, Robinson WP, Kim D, Parsons PJ, Vom Saal FS ve ark. DNA methylation changes in whole blood is associated with exposure to the environmental contaminants, mercury, lead, cadmium and bisphenol A, in women undergoing ovarian stimulation for IVF. Hum Reprod 2012;27:1401-10.

Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. The New England Journal of Medicine 2003;349:2042-2054.

Ho S-M, Johnson A, Tarapore P, Janakiram V, Zhang X, Leung Y-K. Environmental epigenetics and its implication on disease risk and health outcomes. ILAR Journal 2012;53(3-4):289-305.

Hoque MO, Topaloglu O, Begum S, Henrique R, Rosenbaum E, Van Criekinge W ve ark. Quantitative methylation-specific polymerase chain reaction gene patterns in urine sediment distinguish prostate cancer patients from control subjects. J Clin Oncol 2005;23:6569-75.

Hossain MB, Vahter M, Concha G, Broberg K. Low-level environmental cadmium exposure is associated with DNA hypomethylation in Argentinean women. Environ Health Perspect 2012;120:879-884.

Hou L, Wang H, Sartori S, Gawron A, Lissowska J, Bollati V ve ark. Blood leukocyte DNA hypomethylation and gastric cancer risk in a high-risk Polish population. Int J Cancer 2010;127:1866-74.

Hou L, Zhang X, Wang D, Andrea Baccarelli A. Environmental chemical exposures and human epigenetics. International Journal of Epidemiology 2012;41:79-105.

İnan S. Genin ötesine geçmek: biyoloji eğitimde epigenetic. İnönü Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2021;8(15):74-89.

İzmirli M, Tufan T, Alptekin D. DNA metilasyonu. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi (Archives Medical Review Journal) 2012;21(4):274-282.

Jiang G, Xu L, Song S, Zhu C, Wu Q, Zhang L, Wu L. Effects of long-term low-dose cadmium exposure on genomic DNA methylation in human embryo lung fibroblast cells. Toxicology 244;2008:49-55.

Jiang D, Sun M, You L, Lu K, Gao L, Hu C ve ark. DNA methylation and hydroxymethylation are associated with the degree of coronary atherosclerosis in elderly patients with coronary heart disease. Life Sciences 2019;224:241-248.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nature Reviews Genetics 2002;3:415-428.

Kader F, Ghai M. DNA methylation and application in forensic sciences. Forensic Science International 2015;249:255-265.

Karataş M, Tunçdemir M. Mitokondriyal epigenetik ve kanser. Cerrahpaşa Med J 2021;45(2):64-79.

Kim M, Long TI, Arakawa K, Wang R, Yu MC, Laird PW. DNA Methylation as a Biomarker for Cardiovascular Disease Risk. PLoS ONE 2010;5(3):e9692.

Kippler M, Engstrom K, Mlakar SJ, Bottai M, Ahmed S, Hossain MB ve ark. Sex-specific effects of early life cadmium exposure on DNA methylation and implications for birth weight. Epigenetics 2013;8:494-503.

Kondo K, Takahashi Y, Hirose Y, Nagao T, Tsuyuguchi M, Hashimoto M ve ark. The reduced expression and aberrant methylation of p16(INK4a) in chromate workers with lung cancer. Lung Cancer 2006;53:295-302.

Konkel L. Hydroxymethylation and metals: a potential epigenetic marker for effects of toxic exposures. Environmental Health Perspectives 2014;122(9):A251.

Kurdyukov S, Bullock M. DNA methylation analysis: choosing the right method. Biology 2016;5:3.

Kürekçi GK, Bunsuz M, Önal G, Dinçer P. Kazanılmış epigenetik değişiklerin kalıtımı ve hastalıklara yatkınlıktaki rolü. İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi 2017;80(1):45-53.

Lee DH, Jacobs Jr DR, Porta M. Hypothesis: a unifying mechanism for nutrition and chemicals as lifelong modulators of DNA hypomethylation. Environ Health Perspect 2009;117:1799-802.

Lee YW, Broday L, Costa M. Effects of nickel on DNA methyltransferase activity and genomic DNA methylation levels. Mutation Research 1998;415:213-218.

Lee YW, Klein CB, Kargacin B, Salnikow K, Kitahara J, Dowjat K ve ark. Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation: A new model for epigenetic carcinogens. Mol Cell Biol 1995;15:2547-2557.

Li W, Liu M. Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues. Journal of Nucleic Acids 2011;Article ID 870726, 5 pages. doi:10.4061/2011/870726

Lisanti S, Omar WAW, Tomaszewski B, De Prins S, Jacobs G, Koppen G ve ark. Comparison of methods for quantification of global DNA methylation in human cells and tissues. PLoS ONE 2013;8(11):e79044.

Lorenzen JM, Martino F, Thum T. Epigenetic modifications in cardiovascular disease. Basic Res Cardiol 2012;107:245.

Lou J, Wang Y, Yao C, Jin L, Wang X, Xiao Y ve ark. Role of DNA methylation in cell cycle arrest induced by Cr (VI) in two cell lines. PLoS ONE 2013;8(8):e71031.

Marques-Rocha JL, Milagro FI, Mansego ML, Mourao DM, Martinez JA, Bressan J.

LINE-1 methylation is positively associated with healthier lifestyle but inversely related to body fat mass in healthy young individuals. Epigenetics 2016;11(1):49-60.

Martinez-Zamudio R, Ha HC. Environmental epigenetics in metal exposure. Epigenetics 2011;6(7):820-827.

McCullough LE, Mendez MA, Miller EE, Murtha AP, Murphy SK, Hoyo C. Associations between prenatal physical activity, birth weight, and DNA methylation at genomically imprinted domains in a multiethnic newborn cohort. Epigenetics 2015;10:597-606.

McGuinness D, McGlynn LM, Johnson PCD, MacIntyre A, Batty GD, Burns H ve ark. Socio-economic status is associated with epigenetic differences in the pSoBid cohort. International Journal of Epidemiology 2012;41:151-160.

Meiers I, Shanks JH, Bostwick DG. Glutathione S-transferase pi (GSTP1) hypermethylation in prostate cancer: review 2007. Pathology 2007;39:299-304.

Miguela V, Lamas S, Espinosa-Diez C. Role of non-coding-RNAs in response to environmental stressors and consequences on human health. Redox Biology 2020;37:101580.

Moore LE, Pfeiffer RM, Poscablo C, Real FX, Kogevinas M, Silverman D ve ark. Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. Lancet Oncol 2008;9:359-66.

Münzel M, Globisch D, Carell T. 5-Hydroxymethylcytosine, the sixth base of the genome. Angew Chem Int Ed Engl 2011;50(29):6460-6468.

Neidhart M. DNA methylation and complex human disease. 1. baskı San Diego,

CA: Academic Press, Elsevier 2016.

Nestor CE, Ottaviano R, Reddington J, Sproul D, Reinhardt D, Dunican D ve ark. Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. Genome Research 2012;22:467-477.

Olkhov-Mitsel E, Bapat B. Strategies for discovery and validation of methylated and hydroxymethylated DNA biomarkers. Cancer Medicine 2012;1(2):237-260.

Ospelt C. A brief story of epigenetics. Immunology Letters 2022;249:1-4.

Özen A, Ülgen A, Can C. Epigenetik değişiklikler ve mesane kanseri arasindaki ilişki. Bulletin of Urooncology 2017;16(1):17-21.

Özgür E, Tığlı H, Tığlı H. İnsan hastalıklarında epigenetiğin rolüne klinik bakış. IGUSABDER 2020;10:107-122.

Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman J ve ark. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. Cancer Research 2000;60:5954-5958.

Perng W, Villamor E, Shroff MR, Nettleton JA, Pilsner JR, Liu Y, Diez-Roux AV. Dietary intake, plasma homocysteine, and repetitive element DNA methylation in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases 2014;24:614-622.

Petrov TLD, Riddle NC. The evolution of new technologies and methods in clinical epigenetics research. Garcia-Gimenez JL, editor. Epigenetic biomarkers and diagnostics. Academic Press, 2016;67-89.

Pilsner JR, Hu H, Ettinger A, Sánchez BN, Wright RO, Cantonwine D ve ark. Influence of prenatal lead exposure on genomic methylation of cord blood DNA. Environmental Health Perspectives 2009;117(9):1466-1471.

Piyathilake CJ, Badiga S, Alvarez RD, Partridge EE, Johanning GL. A lower degree of PBMC L1 methylation is associated with excess body weight and higher HOMA-IR in the presence of lower concentrations of plasma folate. PLoS ONE 2013;8:e54544.

Richa R, Sinha RP. Hydroxymethylation of DNA: an epigenetic marker. EXCLI Journal 2014;13:592-610.

Riley LB, Anderson DW. Cancer epigenetics. Handbook of epigenetics the new molecular and medical genetics. Tollefsbol TO, editör. 1. baskı Academic Press, 2011; 521-534.

Robertson KD. DNA methylation and human disease. Nat Rev Genet 2005;6(8):597-610.

Ruiz-Hernandez A, Kuo C, Rentero-Garrido P, Tang W, Redon J, Ordovas JM ve ark. Environmental chemicals and DNA methylation in adults: a systematic review of the epidemiologic evidence. Clinical Epigenetics 2015;7(1):55.

Sadakierska-Chudy A, Kostrzewa RM, Filip M. A Comprehensive view of the epigenetic landscape part I: DNA methylation, passive and active DNA demethylation pathways and histone variants. Neurotox Res 2015;27:84-97.

Salnikow K, Zhitkovich A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. Chem Res

Toxicol 2008;21:28–44.

Samra M, Srivastava K. Non-coding RNA and their potential role in cardiovascular diseases. Gene 2023;851:47011.

Sanchez-Guerra M, Zheng Y, Osorio-Yanez C, Zhong J, Chervona Y, Wang S, ve ark. Effects of particulate matter exposure on blood 5-hydroxymethylation: results from the Beijing truck driver air pollution study. Epigenetics 2015;10(7):633-42.

Sanders AP, Smeester L, Rojas D, Debussycher T, Wu MC, Wright FA ve ark. Cadmium exposure and the epigenome: exposure-associated patterns of DNA methylation in leukocytes from mother-baby pairs. Epigenetics 2014;9:212-221.

Sant KE, Nahar MS, Dolinoy DC. DNA methylation screening and analysis. Methods Mol Biol 2012;889:385-406.

Sarıgöl Z, Ündeğer Bucurgat Ü. Epigenetik değişiklikler ve beslenme ilişkisi. Türkiye Klinikleri 2014;3(2):74-80.

Sawan C, Vaissière T, Murr R, Herceg Z. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. Mutation Research 2008;642:1-13.

Sayın DB. Metilasyon ve Kanser. Turkiye Klinikleri J Med Sci 2008; 28:513-524.

Seo JY, Park YJ, Yi YA, Hwang JY, Lee IB, Choo BH ve ark. Epigenetics: general characteristics and implications for oral health. Restor Dent Endod 2015;40(1):14-22.

Shen L, Kondo Y, Guo Y, Zhang J, Zhang L, Ahmed S ve ark. Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. PLoS Genet 2007;3(10):e181.

Shen L, Waterland RA. Methods of DNA methylation analysis. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care 2007;10(5):576-581.

Smith IM, Mydlarz WK, Mithani SK, Califano JA. DNA global hypomethylation in squamous cell head and neck cancer associated with smoking, alcohol consumption and stage. Int J Cancer 2007;121:1724-1728.

Stroud H, Feng S, Kinney SM, Pradhan S, Jacobsen SE. 5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells. Genome Biology 2011;12:R54.

Subramanyam MA, Diez-Roux AV, Pilsner JR, Villamor E, Donohue KM, Liu Y, Jenny NS. Social factors and leukocyte DNA methylation of repetitive sequences: the multi-ethnic study of atherosclerosis. PloS ONE 2013;8:e54018.

Szwagierczak A, Bultmann S, Schmidt CS, Spada F, Leonhardt H. Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA. Nucleic Acids Res 2010;38:e181.

Tajuddin SM, Amaral AF, Fernandez AF, Rodriguez-Rodero S, Rodriguez RM, Moore LE ve ark. Genetic and non-genetic predictors of LINE-1 methylation in leukocyte DNA. Environmental Health Perspectives 2013;121:650-656.

Takahashi Y, Kondo K, Hirose T, Nakagawa H, Tsuyuguchi M, Hashimoto M ve ark. Microsatellite instability and protein expression of the DNA mismatch repair gene, *hMLH1*, of lung cancer in chromate-exposed workers. Molecular Carcinogenesis 2005;42(3):150-158.

Takiguchi M, Achanzar WE, Qu W, Li G, Waalkes MP. Effects of cadmium on

DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. Exp Cell Res 2003;286:355-365.

Tang Q, Cheng J, Cao X, Surowy HM, Burwinkel B. Blood-based DNA methylation as biomarker for breast cancer: A systematic review. Clinical Epigenetics 2016;8:115.

Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy metals toxicity and the environment. EXS 2012;101:133-164.

Tellez-Plaza M, Tang W-y, Shang Y, Umans JG, Francesconi KA, Goessler W ve ark. Association of global DNA methylation and global DNA hydroxymethylation with metals and other exposures in human blood DNA samples. Environmental Health Perspectives 2014;122(9):946-954.

Thalhammer A, Hansen AS, El-Sagheer AH, Brown T, Schofield CJ. Hydroxylation of methylated CpG dinucleotides reverses stabilisation of DNA duplexes by cytosine 5-methylation. Chem Commun 2011;47:5325-5327.

Tollefsbol TO. Epigenetics: The New Science of Genetics. Handbook of epigenetics. Tollefsbol TO, editor. 1. baskı Academic Press, 2011;1-6.

Topaloglu O, Hoque MO, Tokumaru Y ve ark. Detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor and bronchoalveolar lavage of patients with lung cancer. Clin Cancer Res 2004;10:2284-2288.

Uysal F, Akkoyunlu G, Öztürk S. Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos. Biochimie 2015;116:103-13.

van Dongen J, Bonder MJ, Dekkers KF, Nivard MG, van Iterson M, Willemsen G ve ark. DNA methylation signatures of educational attainment. npj Science Learn

2018;3:7.

Villota-Salazar NA, Mendoza-Mendoza A, González-Prieto JM. Epigenetics: from the past to the present. Frontiers in Life Science 2016;9(4):347-370.

Virani S, Rentschler KM, Nishijo M, Ruangyuttikarn W, Swaddiwudhipong W, Basu N ve ark. DNA methylation is differentially associated with environmental cadmium exposure based on sex and smoking status. Chemosphere 2016;145:284-290.

Vural N. Toksikoloji. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi, 2005.

Weinhold B. Epigenetics: The Science of Change. Environmental Health Perspectives 2006;114(3);A160-A167.

Wang B, Li Y, Tan Y, Miao X, Liu XD, Shao C ve ark. Low-dose Cd induces hepatic gene hypermethylation, along with the persistent reduction of cell death and increase of cell proliferation in rats and mice. PLoS ONE 2012a;7:e33853.

Wang T, Meng Y, Tu Y, Zhang G, Wang K, Gong S ve ark. Associations between DNA methylation and genotoxicity among lead-exposed workers in China. Environmental Pollution 2023;316:120528.

Wang TC, Song YS, Wang H, Zhang J, Yu SF ve ark. Oxidative DNA damage and global DNA hypomethylation are related to folate deficiency in chromate manufacturing workers. Journal of Hazardous Materials 2012b;213–214:440–446.

Wang Y, Liu H, Sun Z. Lamarck rises from his grave: parental environment-induced epigenetic inheritance in model organisms and humans. Biological Reviews 2017;92(4):2084-2111.

Wilhelm CS, Kelsey KT, Butler R, Plaza S, Gagne L, Zens MS ve ark. Implications of LINE1 methylation for bladder cancer risk in women. Clinical Cancer Research 2010; 16:1682-1689.

Wright RO, Schwartz J, Wright RJ, Bollati V, Tarantini L, Park SK ve ark. Biomarkers of lead exposure and DNA methylation within retrotransposons. Environmental Health Perspectives 2010:118;790-795.

Yalınay Çırak M. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) sistemleri. Türkiye Klinikleri 1999;19(4):242-248.

Yang J, Black J. Competitive binding of chromium, cobalt and nickel to serum proteins. Biomaterials 1994;15:262–268.

Ye C, Li L. 5-hydroxymethylcytosine: A new insight into epigenetics in cancer. Cancer Biology & Therapy 2014;15(1):10-15.

Zhang C, Liang Y, Lei L, Zhu G, Chen X, Jin T ve ark. Hypermethylations of RASAL1 and KLOTHO is associated with renal dysfunction in a Chinese population environmentally exposed to cadmium. Toxicology and Applied Pharmacology 2013;271:78-85.

Zhang FF, Cardarelli R, Carroll J, Fulda KG, Kaur M, Gonzalez K ve ark. Significant differences in global genomic DNA methylation by gender and race/ethnicity in peripheral blood. Epigenetics 2011a;6(5):623-629.

Zhang J, Li M, Wu Y, Fan Y, Zhou Y, Tan L ve ark. Methylation of *RAR-β2*, *RASSF1A*, and *CDKN2A* genes induced by nickel subsulfide and nickel-carcinogenesis in rats. Biomedical and Environmental Sciences 2011b;24(2):163-71.

Zhang M, Liu C, Li WD, Xu XD, Cui FP, Chen PP ve ark. Individual and mixtures of metal exposures in associations with biomarkers of oxidative stress and global DNA methylation among pregnant women. Chemosphere 2022;293:133662.

Zhang X, He Z, Feng B, Shao H. An epigenome-wide DNA methylation study of workers with an occupational exposure to lead. Journal of Applied Toxicology 2019;39(9):1311-1319.

Zhao L, Islam R, Wang Y, Zhang X, Liu LZ. Epigenetic regulation in chromium-, nickel- and cadmium-induced carcinogenesis. Cancers 2022;14(23):5768.

Zhao W, Ammous F, Ratliff S, Liu J, Yu M, Mosley TH ve ark. Education and lifestyle factors are associated with DNA methylation clocks in older African Americans. International Journal of Environmental Research and Public Health 2019;16:3141.

Zhu ZZ, Hou L, Bollati V, Tarantini L, Marinelli B, Cantone L ve ark. Predictors of global methylation levels in blood DNA of healthy subjects: a combined analysis. International Journal of Epidemiology 2012;41:126-139.

Ziech D, Franco R, Pappa A, Malamou-Mitsi V, Georgakila S, Georgakilase AG ve ark. The role of epigenetics in environmental and occupational carcinogenesis. Chemico-Biological Interactions 2010;188:340-349.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Sevcan ŞEMEN

Doğum tarihi, yeri:

e-posta:

Yabancı dil: İngilizce

Eğitim Durumu

Yüksek Lisans: İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı, 2009

Tez çalışması: Cypermethrin'in toprak örneklerinden HPTLC yöntemi ile tayini

Lisans: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2006

Lise: Adapazarı Atatürk Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi, 2001

Bilimsel Faaliyetler

SCI, SSCI ve AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayınlanan Makaleler

Mercan S., Vehid H., **Semen S**., Çelik U., Yayla M., Engin B. An ICP-MS study for quantitation of nickel and other inorganic elements in urine samples: correlation of patch test results with lifestyle habits. Biological Trace Element Research 200 (1); 2022: 49-58.

Gazioğlu I., **Semen S.**, Acar O. O., Kolak U., Sen A., Topçu G. Triterpenoids and steroids isolated from Anatolian Capparis ovata and their activity on the expression of inflammatory cytokines. Pharmaceutical Biology 58(1): 2020; 925-931.

Semen S., Mercan S., Yayla M., Acikkol M. Elemental composition of green coffee and its contribution to dietary intake. Food Chemistry 215; 2017: 92-100.

Acikkol M., **Semen S**., Turkmen Z., Mercan S. Determination of alpha-Cypermethrin from soil by using HPTLC. JPC-Journal Of Planar Chromatography-Modern TLC 25(1); 2012: 48-53.

Hakemli Kongre/Sempozyum Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar

Mercan S., **Semen S.**, Yayla M., Vehid H. E., Türkmen Z., Çelik U., et al. Determination of jewelry-related nickel release as a reason of allergic contact dermatitis. Sixth International Conference on Environmental Management, Engineering, Planning and Economics (CEMEPE 2017), Thessaloniki, Greece, 25-30 June 2017, p. 61

Mercan S., **Semen S.**, Türkmen Z., Ertem Vehid H., Çelik U., Açıkkol M. Nickel release from imitation jewelry purchased in İstanbul: comparison of two methods 2nd Regional Meeting of The TIAFT, Antalya, Turkey, 30 October-02 November 2016

Mercan S., Çelik U., Engin B., Vehid H., **Şemen S.**, Türkmen Z., et al. Relationship between nickel urine level of nickel sensitive people and lifestyle habits. 2nd Regional Meeting of TIAFT, Antalya, Turkey, 30 October-02 November 2016, p. 21

Mercan S., **Şemen S.**, Türkmen Z., Vehid H., Engin B., Çelik U., et al. Nickel release from imitation jewelry purchased in İstanbul comparison of two methods. 2nd Regional Meeting of TIAFT, Antalya, Turkey, 30 October-02 November 2016, p. 12

Mercan S., Çelik U., Vehid H., Engin B., **Şemen S.**, Türkmen Z., et al. Urine nickel concentrations of nickel sensitive patients a comperative study in Turkey. 2nd

International Congress of Forensic Toxicology, Ankara, Turkey, 26-30 May 2016, p.222

Açıkkol M., Mercan S., **Şemen S.**, Türkmen Z. Recent problems in abuse and misuse of phentermine. 7th European Academy of Forensic Science Conference, Prag, Czech Republic, 6-11 September 2015, p. 672

Mercan S., **Şemen S.**, Vehid H., Yayla M., Türkmen Z., Açıkkol M. Nickel release from imitation earrings in Turkey according to artificial sweat test. 7th European Academy of Forensic Science Conference, Prag, Czech Republic, 6-11 September 2015, p. 467

Şemen S., Mercan S., Habip Z., Açıkkol M. Investigation of the relationship between demographic factors and global DNA methylation and hydroxymethylation levels. 7th European Academy of Forensic Science Conference (EAFS-2015), Prag, Czech Republic, 6-11 September 2015, p. 554

Mercan S., Vehid H., **Şemen S.**, Türkmen Z., Açıkkol M. Günlük yaşantıda nikel maruziyeti imitasyon küpelerdeki nikel salımının iki yöntem ile karşılaştırılması. XII. Adli Bilimler Kongresi, Isparta, Turkey, 4-06 June 2015, p. 8

Mercan S., **Semen S.**, Yayla M., Açıkkol M., Cengiz S. Elemental analysis of green coffee and its infusions by ICP-MS. World Forensic Festival, IAFS 2014, Seoul, South Korea, 12-18 October 2014, p. 94

Türkmen Z., Mercan S., **Şemen S.**, Barut T., Yayla M., Cengiz S. Organic composition profiles of wet wipes in Turkey. International Association of Forensic Sciences Conference, Seul, South Korea, 12-18 October 2014, p. 579

Semen S., Mercan S., Yayla M., Açıkkol M., Cengiz S. Determination of the elemental composition in green coffee. Balkan Academy of Forensic Sciences (BAFS), 10th Annual Meeting, Alexandroupoli, Greece, 18-21 June 2014, p. 8

Semen S., Türkmen Z., Mercan S., Açıkkol M. Determination of cypermethrin in soil by microwave assisted extraction and high performance thin layer chromatography. 10th Annual Meeting of the Balkan Academy of Forensic Sciences, Alexandrapolis, Greece, 18-21 June 2014, p. 5

Şemen S., Mercan S., Türkmen Z., Açıkkol M. Requirements of sensitive methods for pesticides analysis in soil in the field of environmental forensics. 6th European Academy of. Forensic Science Conference, Hague, Netherlands, 20-24 August 2012, p. 393

Açıkkol M., **Şemen S.**, Türkmen Z., Mercan S. Determination of cypermethrinfrom soil by HPTLC. 6th Balkan Academic Forensic Sciences Congress, Kavala, Greece, 18-21 June 2009, p. 405

Kitaplar ve Kitap Bölümleri

Semen S., Mercan S., Açıkkol M. A general overview of pesticides in soil: requirement of sensitive and current residue analysis methods. In: Soil in Criminal and Environmental Forensics, H. Kars & L. van den Eijkel, Editors, Springer, London/Berlin, Holland, 2016, pp. 163-180.

Projeler

Nickel release from imitation jewelry purchased in İstanbul: Comparison of two methods, Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Araştırmacı, 2016-2016

Yaşam alışkanlıkları ile global DNA metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeyleri arasındaki ilişkinin araştılması, Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Araştırmacı, 2015-2016

Nikel hassasiyetinin idrar düzeyinde izlenmesi: imitasyon takıların ve beslenmenin etkisi, TÜBİTAK Projesi, 213S098, Bursiyer Öğrenci, 2014-2016

Deneysel Multipl Skleroz modelinde (DAE) MSCOV'un iyileştirici etkilerinin moleküler mekanizmalarının saptanması, TÜBİTAK Projesi, 112S187, Bursiyer Öğrenci, 2012-2015

Başarılar ve Ödüller

2005-2006 Öğretim yılı bölüm birinciliği, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

2005-2006 Öğretim yılı fakülte üçüncülüğü, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi

Ek 1. Etik Kurul Onay Yazısı

Ek 2. Asgari Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu	**ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU**	**Doküman Adı:** KADB-F.23-R.00
		Yayın Tarihi: 18.04.2013
		Sayfa No: 1/1
		Onaylayan: Daire Başkanı

Çalışmanın başlığı: GLOBAL DNA METİLASYONU VE GLOBAL DNA HİDROKSİMETİLASYONU İLE TOKSİK METALLERİN İLİŞKİSİ

Bu çalışma bilimsel bir araştırma olup, amacı global DNA metilasyonu ve hidroksimetilasyonu ile toksik metaller arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

Araştırma için gönüllü bireylerden kan ve idrar örnekleri alınacaktır ve idrar örneklerinde, toksik metal konsantrasyonları, kan örneklerinde global DNA metilasyonu ve hidroksimetilasyonu miktarları belirlenecektir, hamile bireyler çalışmaya dahil edilmeyecektir. Bu çalışma için gönüllü bireylerden kan ve idrar örneklerinin alınması esnasında, bireye **herhangi bir zarar vermesi ve tehlike oluşturması söz konusu değildir**. Çalışma sırasında araştırma amacıyla yapılacak analiz giderleri için gönüllü bireyin kendisinden veya bağlı olduğu sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir **ücret talep edilmeyecektir**, **gönüllü** yazılı onay vermiş olsa da araştırmanın herhangi bir döneminde **araştırmadan vazgeçmekte özgürdür**, gönüllünün **kimlik bilgileri ve tüm kayıtları saklı tutulacaktır, araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliği gizli kalacaktır. Gerektiğinde bulgular gizli tutulmak koşulu ile hastanın kan sayımı (hemogram) bilgilerine de ihtiyaç olacaktır.**

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum ve söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Global DNA metilasyonu ve global DNA hidroksimetilasyonu ile toksik metallerin ilişkisi araştırması kapsamında alınan kan ve idrar örneklerimin;

a) *Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum*
b) İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum
c) Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum

Gönüllünün;

Adı: Soyadı: İmzası: Tarih:

Telefon no: Adres:

Sorumlu Araştırmacı
Adı, Soyadı: Sevcan Şemen İmzası: Tarih:
Tel:
e-posta: sevcansemen@gmail.com

Ek 3. Katılımcı Bilgi Formu

KATILIMCI BİLGİ FORMU

(Formdaki bilgiler saklı tutulacaktır.)

Formun Doldurulduğu Tarih:

Cinsiyetiniz: Kadın ☐ Erkek ☐

Yaşınız: **Kilonuz:** **Boyunuz:**

Medeni haliniz nedir?

Bekar ☐ Evli ☐

Çocuğunuz var mı?

Yok ☐ Var ☐ Kaç tane? .....

Eğitiminiz:

İlkokul ☐ Ortaöğretim ☐ Lise ☐ Üniversite ☐

Mesleğiniz nedir?.....

Çalıştığınız sektör nedir?.....

Bu işi kaç yıldır yapıyorsunuz?.....

Kronik bir sağlık probleminiz var mı? (Varsa aşağıdaki kutucuklardan işaretleyin.)

Şeker ☐ Tansiyon ☐ Kalp-Damar Hast. ☐ Tiroid Hast. ☐ Diğer……

Sigara kullanımı: Var ☐ Günde……

Yaklaşık kaç yıldır sigara kullanıyorsunuz? .....

Yok ☐

Bıraktım ☐

Alkol kullanımı: Yok ☐

Ayda bir veya daha az ☐

Ayda 2-4 kez ☐

Haftada 2-3 kez veya daha fazla ☐