

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İNSAN ERİTROSİTLERİNDE GLUTAMAT HOMEOSTAZI VE N-METİL D-ASPARTAT RESEPTÖR MODULASYONUNUN METİL CIVA TOKSİSİTESİNDE ETKİSİ

NURSEMA ATEŞ

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANA BİLİM DALI

ARALIK 2025


GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

İNSAN ERİTROSİTLERİNDE GLUTAMAT HOMEOSTAZI VE N-METİL D-ASPARTAT RESEPTÖR MODULASYONUNUN METİL CIVA TOKSİSİTESİNDE ETKİSİ

Ecz. Nursema ATEŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANA BİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ARALIK 2025

ETİK BEYAN

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

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

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

Nursema ATEŞ
18/12/2025

İNSAN ERİTROSİTLERİNDE GLUTAMAT HOMEOSTAZI VE N-METİL D-ASPARTAT RESEPTÖR MODULASYONUNUN METİL CIVA TOKSİSİTESİNDE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Nursema ATEŞ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2025

ÖZET

Metil cıva (MeHg) başta balık tüketimi olmak üzere çevresel olarak insanların maruz kaldığı en toksik ağır metallerden biridir. Maruziyet sonrası MeHg'nin yaklaşık %98,1'i eritrositlerde biriktiği için eritrositlerdeki cıva yükü vücuttaki MeHg birikiminin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Merkezi sinir sisteminde iyi tanımlanmış olan N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin, eritrosit membranında da fonksiyonel olarak bulunduğu gösterilmiş; bu çalışma, MeHg'nin insan eritrosit toksisitesinde N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin rolü olup olmadığı, özgün bir NMDA/GluN2B alt birim antagonisti olan lityum karbonatın (Li_2CO_3) MeHg toksisitesine karşı koruyucu etkisinin bulunup bulunmadığını araştırmak amacı ile planlanmıştır. Sağlıklı gönüllülerden elde edilen tam kan örnekleri EPA'nın önerdiği kan cıva seviyeleri dikkate alınarak, 2,5–5–10 µg/L konsantrasyonlarında MeHg tek başına veya 1,2 mM terapötik dozda Li_2CO_3 ile *in vitro* olarak inkübe edildi. 6 saat ve 24 saatlik inkübasyon süreleri sonunda % hemoliz, redükte glutatyon (GSH), total nitrit+nitrat (NOx) ve ekstrasellüler Ca^{2+} düzeyleri ölçüldü. İnsan eritrositlerinin NMDA reseptörlerinin MeHg tarafından aşırı uyarılması her iki süre sonunda da anlamlı düzeyde hemoliz artışı, GSH azalması, NOx ve eritrosit içi Ca^{2+} artışı ile sonuçlandı. Li_2CO_3 uygulandığında ise, MeHg'ya bağlı intraeritrositer Ca^{2+} girişi ve oksidatif stres belirgin biçimde azalmış, hemoliz oranlarında iyileşme gözlenmiştir. Bulgular, eritrositlerde MeHg toksisitesinin NMDA reseptör aracılı olduğunu ve psikiyatrik bozukluklarda kullanılan Li_2CO_3'ın, terapötik dozda NMDA reseptörlerinin GluN2B alt birimini bloke ederek, MeHg kaynaklı hemolizi hafifletebileceğini göstermektedir. Bu çalışma, eritrositlerde NMDA reseptör blokajının, MeHg kaynaklı toksisiteye karşı potansiyel koruyucu etkisi olduğunu ortaya koyan ilk özgün çalışmadır.

Bilim Kodu	:	1021
Anahtar Kelimeler	:	İnsan eritrositi, metil cıva toksisitesi, N-metil D-aspartat reseptörü, lityum, glutamat, glutatyon, nitrik oksit
Sayfa Adedi	:	106
Danışman	:	Prof. Dr. Ayşe Başak ENGİN

EFFECT OF GLUTAMATE HOMEOSTASIS AND N-METHYL D-ASPARTATE RECEPTOR MODULATION ON METHYL MERCURY TOXICITY

(M. Sc. Thesis)

Nursema ATEŞ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

December 2025

ABSTRACT

Methyl mercury (MeHg) is one of the most toxic heavy metals which humans are exposed to environmentally, especially through fish consumption. Since approximately 98,1% of MeHg accumulates in erythrocytes after exposure, mercury load in erythrocytes is considered as an indicator of MeHg accumulation in the body. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, which are well defined in the central nervous system, have been shown to be functionally present in the erythrocyte membrane; This study aimed to investigate whether the N-methyl D-aspartate (NMDA) receptors have a role in MeHg toxicity in human erythrocytes and a specific GluN2B subunit antagonist lithium carbonate (Li_2CO_3) has a protective effect against MeHg toxicity. Considering EPA-recommended blood mercury levels, the whole blood samples obtained from healthy volunteers were treated in vitro with MeHg at concentrations of 2,5–5–10 µg/L, alone or with the therapeutic dose of 1,2 mM Li_2CO_3. The hemolysis %, reduced glutathione (GSH), total nitrite (NOx) and total Ca^{2+} levels were measured after 6 and 24 hours of incubation. Overstimulation of NMDA receptors in human erythrocytes by MeHg resulted in a significant increase in hemolysis %, NOx and intraerythrocytic Ca^{2+} and decrease in GSH in both time periods. When administered with Li_2CO_3, MeHg-induced intracellular Ca^{2+} flow and oxidative stress were significantly reduced, and hemolysis rates were improved. Findings indicate that MeHg toxicity in erythrocytes is associated with NMDA receptor-mediated mechanisms and that Li_2CO_3, used mainly in psychiatric disorders, can attenuate MeHg-induced hemolysis by blocking the GluN2B subunit of NMDA receptors at therapeutic doses. This is the first study revealing that NMDA receptor blockade has a potential protective pathway against MeHg-induced toxicity.

Science Code	:	1021
Key Words	:	Human erythrocyte, methyl mercury toxicity, N-methyl D-aspartate receptor, lithium, glutathione, nitric oxide
Page Number	:	106
Supervisor	:	Prof. Dr. Ayşe Başak ENGİN

TEŞEKKÜR

Bu tezin ortaya çıkış sürecinde bilgi, sabır ve yönlendirmeleriyle çalışmama yön veren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ayşe Başak ENGİN'e içtenlikle teşekkür ederim. Bilimsel bakış açımı geliştirmemde, araştırma disiplinimi şekillendirmemde ve karşılaştığım güçlükleri aşmamda sağladığı destek benim için son derece değerliydi.

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma, lisansüstü eğitimim boyunca sağladıkları akademik katkılar, eleştirel yaklaşımları ve sundukları öğrenme ortamı için ayrıca teşekkür ederim.

Laboratuvar ve çalışma ortamını paylaştığım araştırma görevlisi arkadaşlarıma, kan örneklerini toplamamı kabul eden gönüllülere özellikle teşekkür etmek isterim.
Bugüne kadar bana gösterdikleri sabrı, anlayışları ve koşulsuz destekleriyle her zaman yanımda olan anneme, babama ve ablama da tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

ÇİZELGELERİN LİSTESİ x

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xi

RESİMLERİN LİSTESİ xii

SİMGELER VE KISALTMALAR xiii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Cıva ve Bileşikleri 3

2.1.1. Cıva bileşikleri ve biyolojik etkileri 4

2.1.2. Cıvanın doğadaki döngüsü 7

2.1.3. Cıva maruziyeti 10

2.2. Metil Cıvanın Toksikokinetiği 13

2.3. Metil Cıvanın Toksisitesi 15

2.4. Eritrositlerin Yapısı ve Görevleri 18

2.4.1. Eritrositlerin metabolik özellikleri 20

2.4.2. Eritrositlerde oksidatif stres ve antioksidan savunma 21

2.5. Eritrosit ve Metil Cıva Toksisitesi 29

2.5.1. Eritrosit iyonotropik membran reseptörleri ve hemoliz 31

3. GEREÇ ve YÖNTEM 37

Sayfa

3.1. Biyolojik Örneklerin Temini 37

3.2. Deney Tasarımı 37

3.2.1.Ön deneyler 37

3.2.2. Asıl doz grupları deneyleri 39

3.3. Analiz Yöntemleri 40

3.3.1. Cıva düzeyleri tayini 40

3.3.2. Hemoliz oranlarının tayini 42

3.3.3. Glutatyon Tayini 43

3.3.4. Nitrit + Nitrat Tayini 47

3.3.5. Total Ca^{2+} tayini 49

3.4. İstatistiksel Analiz 51

4.BULGULAR 53

4.1. ICP-MS ile Cıva Tayini Bulguları 53

4.2. Ön Deney Bulguları 54

4.2.1.İnkübasyon süresi ön deney bulguları 54

4.2.2. MeHg doz belirleme ön deney bulguları 57

4.3. Deney Bulguları 59

4.3.1. %Hemoliz tayini bulguları 59

4.3.2. Glutatyon tayini bulguları 61

4.3.3. Nitrit + Nitrat tayini bulguları 61

4.3.4. Total Ca^{2+} tayini bulguları 63

Sayfa

4.4. Eritrositlerde MeHg maruziyetinde Li_2CO_3'ın hemolizden koruma mekanizması 64

4.5. Eritrositlerde Toksik dozlarda MeHg maruziyetinde Li_2CO_3'ın etkisi..... 66

5. TARTIŞMA..... 67

EKLER..... 99

ÖZGEÇMİŞ…… 106

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. Biyolojik sistemlerde karşılaşılan yaygın reaktif türler 24

Çizelge 3.1. Ön deneylerin MeHg doz belirleme çalışma planı 38

Çizelge 3.2. Asıl deneylere ait 6 ve 24 saat inkübasyonda çalışma planı 39

Çizelge 3.3. Mikrodalga yaş yakma cihaz parametreleri 41

Çizelge 3.4. GSH tayini için hazırlanan reaksiyon ortamı 46

Çizelge 4.1. Serum Örneklerinde Hg miktarları 54

Çizelge 4.2. Zamana karşı %hemoliz, GSH, NOx ortalama ± standart hata değerleri 54

Çizelge 4.3. MeHg ve MeHg + Li_2CO_3 maruziyetinin 6. saat sonunda eritrosit GSH, NOx ve hemoliz düzeylerine etkisi (doz belirleme ön çalışması) 57

Çizelge 4.4. İnsan eritrositlerinde MeHg'ya maruziyetin 6. saati sonunda GSH, hemoliz, NOx ve Ca^{2+} düzeylerine etkisi 59

Çizelge 4.5. İnsan eritrositlerinde MeHg'ya maruziyetin 24. saati sonunda GSH, hemoliz, NOx ve Ca^{2+} düzeylerine etkisi 60

Çizelge 4.6. İnsan eritrositlerinin Li_2CO_3'a maruziyetinin 6. saat ve 24. saat sonunda GSH, hemoliz, NOx ve Ca^{2+} düzeylerine etkisi 65

Çizelge 4.7 Lityumun eritrositi ilk 6 saatte MeHg toksisitesinden koruma oranı 65

Çizelge 4.8 Lityumun eritrositi ilk 24 saatte MeHg toksisitesinden koruma oranı 65

Çizelge 4.9. Toksik düzeyde MeHg maruziyetinin 6. saat sonunda eritrosit GSH, NOx ve hemolize etkisi 66

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Eritrositte major antioksidan kapasiteyi oluşturan glutatyonun rejenerasyon mekanizması 25

Şekil 4.1 Cıva analizine ait kalibrasyon grafiği 53

Şekil.4.2. İnkübasyon süreleri sonunda ortalama % hemoliz değerleri 55

Şekil 4.3. İnkübasyon süreleri sonunda ortalama GSH (µM) değerleri..... 55

Şekil 4.4. İnkübasyon süreleri sonunda ortalama (NOx) (mM) değerleri 56

Şekil 4.5. Eritrositlerde 6 saat inkübasyonda MeHg ve MeHg + Li_2CO_3 kombinasyonunda GSH, %Hemoliz ve NOx dağılımı 58

Şekil 4.6 İnsan eritrositlerinde MeHg ve MeHg+ Li_2CO_3'ya maruziyetin 6. ve 24. saatlerinde %hemolize etkisi..... 60

Şekil 4.7. İnsan eritrositlerinde MeHg ve MeHg+ Li_2CO_3'ya maruziyetin 6. ve 24. saatlerinde GSH miktarına etkisi 61

Şekil 4.8. NOx kalibrasyon eğrisi grafiği 62

Şekil 4.9. İnsan eritrositlerinde MeHg ve MeHg+ Li_2CO_3'ya maruziyetinin 6. ve 24. saatlerinde [NOx] miktarına etkisi 63

Şekil 4.10. İnsan eritrositlerinde MeHg ve MeHg+ Li_2CO_3'ya maruziyetinin 6. ve 24. saatlerinde tCa^{2+} düzeylerindeki değişim 64

Şekil 5.11. Eritrositte glutatyon metabolizması 68

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 2.1. Cıvanın çevredeki maruziyet döngüsü 8

Resim 2.2. Eritrosite kalsiyumun transportu …….. 28

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	**Açıklamalar**
µg	Mikrogram
µg/L	1 litre başına düşen mikrogram madde miktarı
µM	1 litre çözelti başına çözünen mikromol madde miktarı
ppt	Trilyonda bir birim
ppm	Milyonda bir birim
µg/kg	1 kg'daki mikrogram ağırlık
mg/m^3	1 m^3'teki miligram ağırlık
µm	Mikrometre
µm^3	Mikrometreküp
mg/dL	1 desilitreye düşen miligram madde miktarı
°C	Santigrat
%	Yüzde

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
2,3-BPG	2,3-bisfosfogliserat
ACGIH	Amerikan Devlet Endüstriyel Hijyenistleri Konferansı
ALT	Alanin aminotransferaz
AMPA	Alfa-Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4 izoksazol propiyonik Asit
AMPK	Adenozin mono-fosfatla aktive protein kinaz
Ast	Aspartat aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
ATSDR	Toksik Maddeler ve Hastalık Kayıt Ajansı
Ca^{2+}	Kalsiyum iyonu

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
Cat	Katalaz
CH_3Hg	Monometil cıva
Cys	Sistein
DTNB	5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
EPA	Çevre Koruma Ajansı
Ery-Hg	Eritrosit Cıva Yükü
EU-OEL	Avrupa Birliği Mesleki Maruziyet Limitleri
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	Gıda ve İlaç Ajansı
Fe^{+2}	Ferröz demir
Fe^{+3}	Ferrik demir
FMN	Flavin mono nükleotid
G6PD	Glikoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
GA	Glutamin aminohidrolaz
GLAST	Glutamat/aspartat taşıyıcısı
GLT-1	Glutamat taşıyıcısı-1
GLUN2B	N-metil D-aspartat reseptör 2B alt tipi
GLUT1	Glukoz taşıyıcısı 1
GPx	Glutatyon peroksidaz
GR	Glutatyon redüktaz
GS	Glutamin sentetaz
GSH	İndirgenmiş Glutatyon
GSSG	Okside Glutatyon
GST	Glutatyon S-Transferaz
H_2O_2	Hidrojen peroksit
Hb	Hemoglobin
Hcy	Homosistein

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
Hg	Cıva
$HgCl_2$	Cıva klorür
ICP-MS	İndüktif eşleştirilmiş plazma kütle spektrometresi
iHg	İnorganik cıva
JECFA	Gıda Katkıları FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi
Li_2CO_3	Lityum karbonat
LOAEL	Toksik Etkinin Görüldüğü En Düşük Değer
MDA	Malondialdehit
MeHg	Metil Cıva
MeHgCl	Metil Cıva klorür
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
Na^+/K^+-ATPaz	Sodyum potasyum adenozin trifosfataz
NAC	N-Asetilsistein
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NIOSH	Ulusal İş Sağlığı ve Güvenliği Enstitüsü
NIPHE	Hollanda Ulusal Halk Sağlığı ve Çevre Enstitüsü
NMDA	N-Metil-D-Aspartat
NOS	Nitrik oksit sentaz
[NOx]	[Nitrit + Nitrat]
NOX	NADPH oksidaz
OSHA	İş Sağlığı ve Güvenliği Kurumu
PLD	Fosfolipaz D
PPP	Pentoz fosfat yolu
PTDI	Geçici Tolere Edilebilir Günlük Alım
PTWI	Geçici Tolere Edilebilir Haftalık Alım
RfD	Oral Referans Dozu
RNS	Reaktif Azot Türleri
SLC	Sodium-Lithium Countertransport Activity
SOD	Süperoksit Dismutaz

1. GİRİŞ

Cıva (Hg), doğal kaynaklar ve endüstri, cıva madenciliği, hastaneler, aşılar ve evsel atıklar gibi insan faaliyetleri yoluyla çevreye salınan toksik bir ağır metaldir. İnorganik cıva sıvı ortamda, en toksik maddelerden biri olan organik formu metil cıvaya (MeHg) dönüşebilir. Cıvanın organik formu, balıklarda, yumuşakçalarda, kabuklularda ve insanlar tarafından tüketilen diğer organizmalarda birikmektedir[1]. Eritrositlerin içindeki cıva yükü (Ery-Hg), esas olarak vücutta MeHg'nin birikiminin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle Eritrositlerde "Ery-Hg" miktarı MeHg tutulmasının bir belirteci olarak kullanılmaktadır [1, 2]. Yakın zamanda Brezilyalı balıkçılarda yapılan bir çalışmada kan ve idrardaki toplam cıva düzeylerinin yüksek olduğu, eritrositlerde lipid peroksidasyonunda (malondialdehit; MDA) ve protein oksidasyonunda artış, buna karşılık toplam tiyolde, redükte glutatyon (GSH)'da ve eritrosit redoks (GSH/GSSG oranı) oranında azalma olduğu gösterilmiştir. Antioksidan sistem enzimleri olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (Cat), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon S-transferaz (GST) aktiviteleri cıvaya maruz kalan grupta azalmıştır. Ayrıca, bu grupta hemoglobin oksijen alımının azaldığı ve oksidatif stresin dolaylı bir belirtisi olarak hücre zarının ozmotik kırılganlığının arttığı ve eritrosit zarında hasar meydana geldiği belirlenmiştir [3].

Cıvanın en toksik ağır metallerden biri ve yaygın bir çevre kirleticisi olduğu kabul edilmektedir. Cıva klorür ($HgCl_2$), gastrointestinal sistemden kolayca emilerek kana karışır ve eritrositlerle etkileşime girer. $HgCl_2$ maruziyeti ile hemoglobindeki ferröz demirin ferrik forma oksidasyonu sonucu oksijen taşıyıcı özelliğini kaybeden methemoglobin oluşur. $HgCl_2$ ile karşılaşan eritrositlerde, süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, peroksinitrit ve nitrik oksit oluşumu doza bağlı olarak artarken membran redoks sistemi inhibe edilir ve membran bütünlüğü bozularak hemoliz başlar. Eritrositlerde glikoz metabolizmasının iki ana yolu olan glikoliz inhibe olurken ve pentoz fosfat yolu (PPP) da önce aktive olur. Hücredeki Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat indirgenmiş formun (NADPH) düzeyini ve antioksidan GSH rejenerasyonunu korumak için gerekli olan glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) aktivitesi de azalır [4]. Eritrosit membranında eksprese edilen ve hemolizde rol oynayan başlıca iyonotropik membran reseptörleri alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit (AMPA) ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleridir. AMPA reseptör inhibisyonu, insan eritrositlerine Ca^{2+} girişini düzenleyerek eritrosit

ölümünü önler [5]. MeHg'nin neden olduğu oksidatif eritrosit hasarında rol oynadığını düşündüğümüz NMDA reseptörünün yüksek düzeyde Ca^{2+} geçirgenliğinin azaltılmasında, NMDA reseptör non-spesifik veya özgün antagonistlerinin kullanımı gündeme gelmiştir. NMDA reseptör antagonistleri tarafından inhibe edilen NMDA reseptör aracılı kalsiyum girişi, eritrositlerdeki NMDA reseptörlerinin fonksiyonel bütünlüğünün gösterilmesi bakımından son derece önemlidir[6]. NMDA reseptörünün içerdiği GluN2B alt biriminin aşırı aktivasyonu, oksidatif stres aracılı hücre hasarına yol açar. Yapılan literatür taramasında, cıva maruziyetine bağlı hemolizde NMDA reseptör aracılı oksidatif stresin önlenmesi konusunda herhangi bir çalışma bulunmamakla birlikte, nöronlarda nonspesifik antagonistlerle yapılan çalışmalar, özgün ve terapötik dozlarda NMDA reseptör antagonistlerinin kullanılmasının, eritrositlerde oksidatif stres aracılı hemolizin önlenmesinde etkin olabileceğini düşündürmektedir. İnsanlarda bipolar bozukluklarda tedavi amacı ile kullanılan özgün bir NMDA reseptör GluN2B antagonisti olan lityum dikkate alınarak, "Methyl mercury and lithium and erythrocyte" anahtar kelimelerle yapılan son 20 yıllık literatür taramasında, tez çalışmamızın sunumu olan "Poster Presentations P33: Systemic toxicology: P33-02 N. Ateş, A.B. Engin, O. Alp, A. Engin 3. Effect of glutamate homeostasis and N-methyl-D-aspartate receptor modulation on methyl mercury toxicity. Toxicology Letters, Volume 411, Supplement, September 2025, Page S432" dışında herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, ilk kez klinik uygulamada bipolar depresyon için birinci basamak tedavi olarak önerilen ve özgün bir NMDA reseptör GLUN2B alt ünite antagonisti olan lityumun *in vitro* koşullarda MeHg maruziyetine karşı oksidatif stres ve hemolizi önleyip önlemediği araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Cıva ve Bileşikleri

Cıva (Hg), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından halk sağlığını tehlikeye atan on önemli kimyasaldan biri olarak görülmektedir [7]. Oda sıcaklığında sıvı halde bulunup, cıvanın periyodik cetveldeki "Hg" sembolü, Latince akışkan sıvı ve gümüş anlamına gelen "hydragyros" kelimesinden köken almıştır [8]. Cıva yerkabuğunda doğal olarak bulunan bir elementtir. Elementel cıva (Hg^0) toksiktir ve atmosferde kolayca dağılır. Volkanik faaliyetler, su kütlelerinin hareketi, orman yangınları, kayaların ayrışması gibi doğal süreçler sırasında buhar olarak çevreye yayılabilir[9]. Bununla beraber endüstriyel faaliyetler, kömürle çalışan elektrik santralleri, atık yakma tesisleri, çeşitli metallerin çıkarılmasındaki madencilik operasyonları da çevreye Hg salınımını arttıran antropojenik kaynaklardır[7, 9]. Endüstrideki ilerlemeler sonrası dünyadaki toplam Hg üretiminin yaklaşık üçte ikisi 1900'den sonra gerçekleşmiş olup, küresel Hg döngüsüne insan kaynaklı girdilerin 20. yüzyıldan itibaren en az üç kat arttığı tespit edilmiştir [10]. Bununla birlikte 21. yüzyıl itibariyle endüstriyel kullanımı giderek azalma eğilimi göstermiştir ve 2019 yılında tüketimin kırk tonun altında olduğu düşünülmektedir [11].

Cıva bileşikleri modern teknolojik ürünlerin ve plastiklerin üretiminde katalizör olarak, termometre ve barometre gibi çeşitli ölçü kontrol aletleri, elektrikli aletlerin üretimi, çimento sanayi, floresan aydınlatmalar, klor-kostik soda üretimi, tarım ilaçlarında fungisit olarak, boya ve kâğıt sanayi olmak üzere çeşitli kullanım alanlarına sahiptir [12]. Daha önceleri diş hekimliğinde amalgam dolguda, diş tozları, diş macunları ve farmasötik ajanlarda (antibiyotikler, cıva diüretikleri) kullanılmıştır ancak güncel terapötik uygulamaları artık mevcut değildir [13]. Günümüzde ise birçok kullanımı (alkalin piller, elektronik anahtarlar ve aydınlatma uygulamaları, mantar ilaçları ve böcek ilaçları, boyalar ve pigmentler, termometreler ve tıbbi cihazlar) büyük ölçüde azaltılmış olsa da [12] cıva hala antiseptik, tıbbi koruyucu ve mantar öldürücü olarak kullanılmaktadır[14]. Cıva veya cıva bileşikleri içeren çeşitli kozmetik ürünler, kişisel tüketim ürünlerinde (cilt rengini açıcı kremler ve sabunlar, bitkisel preparatlar, laksatifler, dövme boyaları, sanat boyaları ve makyaj boyaları) ve aşılar gibi tıbbi ürünlerde koruyucu olarak kullanımı mevcuttur [15, 16].

2.1.1. Cıva bileşikleri ve biyolojik etkileri

Dünya üzerinde bulunan tek sıvı metal olan Hg, bir ağır metal olup olarak elementel, inorganik ve organik bileşikler olmak üzere üç farklı şekilde sınıflandırılabilir. Bu cıva türleri çevrede ve biyolojik sistemlerde, Hg^0 (metalik), Hg^{2+} (merkürik) ve Hg^{1+} (merküröz) olmak üzere üç oksidasyon durumunda bulunur [17]. Cıva bileşikleri biyolojik süreçleri etkileme potansiyelleri, toksikokinetik-toksikodinamik özellikleri ve çevresel maruziyet yolları bakımından farklılıklar göstermektedir.

Cıva bileşiklerine insan maruziyeti; gıdaların yutulması, mesleki olarak cıva buharının solunması veya deriden maruziyeti sonucu emilimi, endüstriyel atıkların işlenmesi ve ilaçlar ya da kozmetik kullanımı sonucu gerçekleşebilir. Benzer şekilde cıva bileşiğinin formuna bağlı olarak sindirim sistemi, solunum sistemi ve topikal olarak deriden emilim gibi yollarla insan vücudunda farklı hızlarda emilime uğrar [18].
Genellikle farklı cıva formlarına maruziyet, emilim, dağılım ve hedef organ toksisitesinin yolunu belirler. Diş hekimliğinde 19. yüzyıldan beri kullanılan amalgam dolgular cıva maruziyetinde önemli bir potansiyel tehlike oluşturmuştur. Cıvanın yanında bakır, kalay, çinko ve gümüşten oluşan amalgam dolgu %50 oranında ağırlıkça cıva içerir [19]. Elementel cıva sıfır oksidasyon durumunda olup oda sıcaklığında sıvı halde bulunan tek metaldir. Oda sıcaklığında uçucu hale geçebilir ve cıva buharı olarak adlandırılan tek atomlu bir gaz açığa çıkarır [13]. Bu nedenle dental amalgam yapımında kullanılan cıvadan salınan yüksek cıva buharı sebebiyle hastalara ve diş sağlığı çalışanlarına olan etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda, kontrol grubuna göre amalgam ile sürekli çalışan bir grup olarak diş sağlığı personelinde daha yüksek cıva seviyeleri görülmüştür. Türkiye'de aynı hastanede çalışan diş hekimleri, diş teknisyenleri ve sağlık personeli olmayan kontrol grubu arasında yapılan bir çalışmada diş hekimlerinin ve amalgamla çalışan diğer diş sağlığı çalışanlarının plazmadaki cıva miktarları kontrol grubuna göre anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuş, diş hekimlerinin plazma Hg seviyeleri ve yaptıkları amalgam dolgu sayısı arasında korelasyon olduğu görülmüştür [20]. Başka bir çalışmada diş hekimlerinin idrarlarındaki cıva düzeylerinin, kontrol grubundakilerine göre ortalama 4 kat fazla, el ayak tırnaklarında ve saçlarında da 2 kat daha fazla olduğu bulunmuştur [21]. Amalgam dolgulu bireylerde idrarla Hg atılımındaki artışlar, maruz kalma süresi ve dolgu yüzey alanıyla ilişkilidir. Diş tedavisi gören 8-10 yaş arası çocukların idrar örneklerinde cıva düzeylerini inceleyen bir çalışmada

1,5 µg/L olan başlangıç cıva düzeyinin, tedavinin ikinci yılında yaklaşık 3,2 µg/L'ye yükseldiği görülmüştür [22].

Oral olarak maruz kalınan Hg^0 sindirim sisteminden önemli ölçüde emilmez ve dışkı ile neredeyse tamamen atılır. Buna karşın yüksek buhar basıncına sahip olması nedeniyle solunan cıva buharı %80 oranında akciğerden emilerek hızla dokulara dağılır[19]. Akciğerlerden emilen cıva**,** kan dolaşımına geçerek plazmada tespit edilebilir. Kan dolaşımına girdikten sonra cıva böbreklerde glomerüler filtrasyona uğrayarak inorganik cıva halinde idrarla atılır veya karaciğere taşınarak ve burada glutatyon ile kompleksler oluşturur. Oluşan kompleks moleküller cıvanın safraya geçişini kolaylaştırır ve sonuçta dışkı ile atılmasına yol açar [23]. Emilim sonrası inorganik cıvaya (Hg^{2+}) oksitlenmesi nedeniyle beyin ve böbreklerde tutulabilir. Bu nedenle merkezi sinir sistemi (MSS) ve böbrekler toksik etkilerin görüldüğü en hassas hedeflerdir [24].

Yüksek konsantrasyonlarda inhalasyonla akut Hg^0 maruziyeti, nefes darlığı dahil olmak üzere solunum sıkıntısına, kronik maruziyeti ise titreme, sanrılar, hafıza kaybı ve nörobilişsel bozukluklar dahil MSS semptomlarına neden olabilir [25]. MSS'de birikimi sonucu titremeler, eretizm (anormal sinirlilik veya stimülasyona yanıt verme), duygusal değişkenlikler, uykusuzluk gibi çeşitli nörolojik ve davranışsal bozukluklar, görme bozuklukları, güçsüzlük, ekstremitelerde koordinasyon bozukluğu gibi bir takım nörotoksik belirtilerin görülmesine sebep olur [12]. Böbreklerdeki etkileri ise geçici proteinüri, idrarda asit atılımında değişiklikler, hematüri, oligüri ve akut böbrek yetmezliği olarak ortaya çıkabilir[13]. Bunun yanında metalik cıva yüksek lipofilik özelliği nedeniyle plasenta bariyerini geçerek fetüsün beynine ulaşabilir. Beş gün boyunca cıva buharına maruz kalan hamile sincap maymunları üzerinde yapılan deneyler, yavruların beyinciklerindeki cıva konsantrasyonunun anne konsantrasyonunun %25'i olduğunu göstermiştir [26]. Hg'nin plasentayı ve kan-beyin bariyerini geçme yeteneği, potansiyel olarak fetal ve erken çocukluk gelişimini ve ergenlik döneminde ve hatta ergenliğe kadar olan dönemi etkileyebilir [27, 28].

İnorganik cıva (iHg) bileşikleri monovalan (Hg^+) ve divalan (Hg^{2+}) olmak üzere iki farklı oksidasyon durumunda bulunur. Hg^{2+} iyonu, tiyol grupları gibi biyolojik olarak birçok önemli molekülle kararlı kompleks oluşturabilir [25]. Hg diğer bileşiklerle birleşerek katı haldeki tuzları (cıva asetat, cıva klorür, cıva nitrat, cıva oksit, cıva sülfür vb.) halinde iHg bileşiklerini oluşturur. Bunlardan en bilineni $HgCl_2$ olup suda çözünürlüğü yüksektir ve

oldukça koroziftir [17, 29]. iHg tuzları gastrointestinal sistemden zayıf bir şekilde emilir. Korozif etkisi yüksek olduğundan, gastrointestinal sistemde hasar oluşturur ve kusma, ishal gibi semptomlara yol açar [29]. Esas olarak idrar ve dışkı ile organizmadan atılırlar. Bunun yanında böbreklerde proksimal tübüldeki luminal membranlardan sistein S-konjugatları şeklinde renal tutulumları nedeniyle inorganik cıva türleri özellikle nefrotoksisite gösterirler [30]. Memeli hayvanlar üzerinde yapılan bir deneyde cıva buharı ve inorganik cıva tuzları arasındaki fark gösterilmiştir. Cıva buharına maruz kalan maymunların beyinlerinde, damar yoluyla eşdeğer miktarda $HgCl_2$ verilen maymunlara göre %25 daha fazla cıva bulunurken, böbreklerinde %78 daha az cıva bulunmuştur[31]. iHg'nin vücutta yarılanma süresi ($t_{1/2}$) yaklaşık 60 gündür. Letal dozu ise 1-4 gram arasındadır [32]. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA), kan Hg seviyelerinin 5,8 µg/L'nin altında olmasını önermektedir [33].

İnorganik cıva (iHg) zehirlenmesi sonucu çeşitli vaka çalışması raporlarında insanlarda akut böbrek yetmezliği, nefrotik sendrom, oligüri, proteinüri gibi böbrek fonksiyonlarında bozulmalar bildirilmiştir [29, 34]. iHg zehirlenmesinin tipik kaynaklarından biri kozmetiklerdir. 2000'de yapılan bir çalışmada Meksika'daki kadınlarda cilt beyazlatma ve akne tedavisi için kullanılan bir krem sonrasında cıva zehirlenmesine bağlı semptomlar gözlenmiştir [35]. Beyazlatıcı kozmetik ürünlerin kullanımı sonucu inorganik cıvaya maruziyetin artmasının nefropatiye ve sonunda nefrotik sendroma neden olabileceği düşünülmektedir [36]. İnorganik cıvanın laboratuvar hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda nörolojik ve renal etkilerine ek olarak hematolojik, kardiyovasküler, immünolojik ve üreme üzerine toksik etkileri de olduğu görülmüştür. Ancak insanlarda bu etkilere yönelik epidemiyolojik çalışmalar kısıtlıdır ve akut zehirlenmeler sonrası vaka raporlarından elde edilen verilerle desteklenmektedir [34].

Cıva diğer metallerden farklı olarak iyonik bağ yerine kovalent bağ oluşturmaya eğilimlidir. Cıvanın bir veya iki karbon atomuna kovalent bağlanmasıyla kararlı organometalik bileşikler oluşur [30]. Organik cıva türlerine cıvanın metil, etil, fenil gibi fonksiyonel alkil grubuyla birleşmesiyle oluşan bileşikler örnek verilebilir. Bunlar arasında en sık karşılaşılan formlar metil ve etil cıvadır. Tiyomersal düşük miktarlarda bazı aşı ve ilaçlarda koruyucu madde olarak kullanılmaktadır ve metabolize edildiğinde etil cıva ve tiyosalisilata parçalanır [37]. WHO, etil cıvanın mevcut dozlarda insan sağlığı açısından risk oluşturduğuna dair yeterli kanıt bulunmadığını belirtmiştir ancak tiyomersalin otizmle ilişkili olabileceğine dair

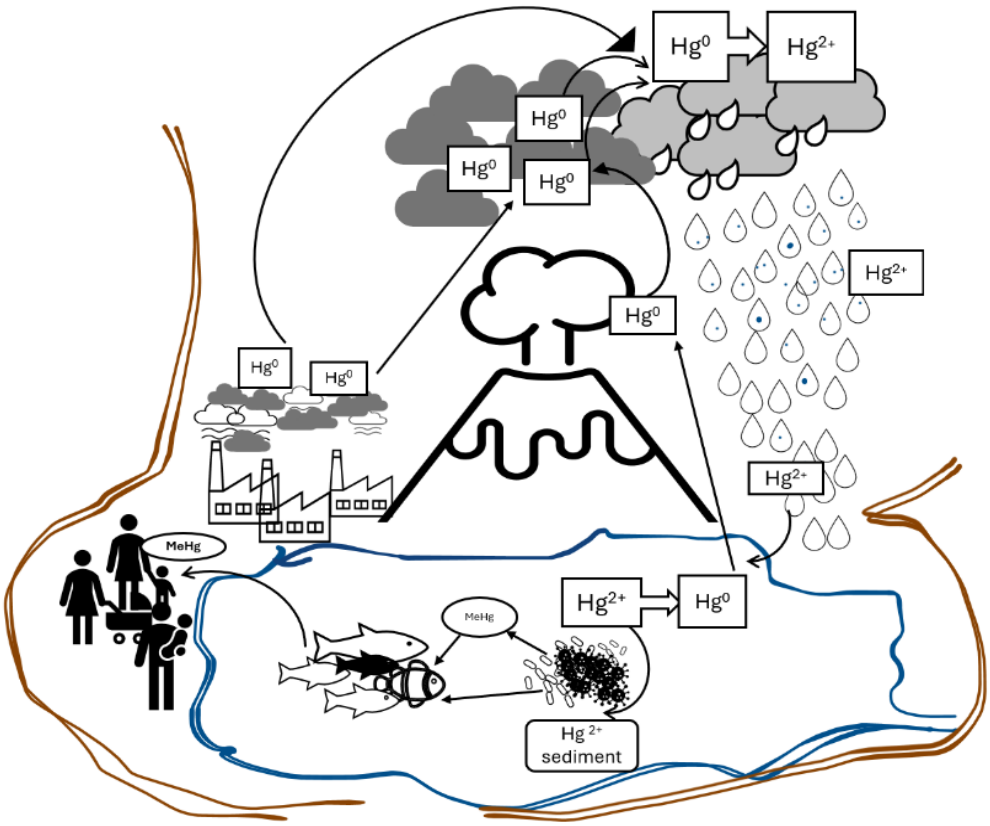
endişeler nedeniyle aşılarda kullanımı kısmen azaltılmış ya da son verilmiştir [7]. Farklı cıva formlarının toksisitesinin artan sırası $Hg^0 < Hg^{2+}$, $Hg^+ < CH_3$-Hg olarak kabul edilmektedir [38]. İnsanların ve hayvanların en fazla maruz kaldığı en tehlikeli organik form mono metil cıvadır (CH_3Hg) [37]. CH_3Hg^+ gastrointestinal sistem tarafından kolayca emilir ve daha sonra sistemik dolaşıma girer, bu da cıva iyonlarının hedef organlara iletilmesini kolaylaştırır.

2.1.2. Cıvanın doğadaki döngüsü

Cıva çevrede doğal olarak var olan bir elementtir ve doğadaki döngüsü nedeniyle ortadan kaldırılması mümkün değildir. Cıva bileşikleri günümüzde hava, su, toprak, biyota, yüzey-yeraltı suları ve tortuda bulunabilmektedir. Cıvanın ekosistemlerdeki hareketi volkanik patlamalar, okyanuslar ve topraktan buharlaşması sonucu atmosfere salınan cıva buharının (Hg^0) yayılması ile başlar. Hem doğal hem de insan kaynaklı süreçler cıvayı hava, su ve toprağa salabilir ve atmosfere salınım genellikle cıvanın çevreye girmesinin birincil yoludur [39]. Genel olarak, su, toprak ve sedimentte inorganik cıva formu baskınken organik cıva türlerinden MeHg insan ve doğa yaşamında baskın olan türdür [37]. Atmosferdeki cıvanın ise %99'undan fazlası Hg^0 formundadır [17]. Cıva buharı kimyasal olarak kararlı bir gazdır, bu nedenle çevrede salınım alanından çok uzak yerlerde bulunabilir. Bu da onun yarıküreler arasında taşınmasına ve uzun süreler çevrede kalıcı bir kirletici olmasına sebep olur [40]. Atmosferdeki Hg^0, suda çözünebilir inorganik Hg^{2+} formuna oksitlenir ve yağmur suları ile yeryüzüne dönerek su kütlelerine karışır [41]. Cıva biyolojik ve kimyasal süreçlerle tatlı su ve okyanus sularında anaerobik bakteriler tarafından monometil ve dimetil cıvayı içeren organik cıva formlarına dönüştürülür. Oluşan MeHg planktonla başlayan, ardından otçul balıklarla devam eden ve son olarak etçil balıklar ve deniz memelilerine kadar yükselen sucul besin zincirine girer [41, 42]. Cıvanın metilasyonu doğadaki döngüsünü etkileyen önemli bir süreçtir. Esas olarak sedimentlerde ve oksijensiz su ortamlarında meydana geldiği bilinmektedir. Sülfat indirgeyen bakterilerin genellikle inorganik bileşiklerin organik cıva bileşiklerine dönüşümünde yer aldığı düşünülmektedir. Metilasyon süreci yüksek sıcaklık, düşük pH, anaerobik koşullar, yüksek organik madde içeriği ve uygun sülfat (200–500 μM) konsantrasyonu gibi destekleyici faktörler gerektirmektedir[43]. İnorganik cıvanın aksine MeHg, sucul organizmalar tarafından verimli bir şekilde absorbe edilir. Bu nedenle balıklarda, diğer su organizmalarında, pirinçte ve sucul bitki örtüsünde genellikle yüksek seviyelerde cıva tespit edilebilir [42]. Metilasyona ek olarak Hg döngüsünün dikkate

alınması gereken diğer özellikleri ise biyokonsantrasyon (su kütlesi boyunca askıda kalan maddeler ve planktonların Hg açısından zenginleşmesi), biyoakümülasyon (balıklarda yaşam süresi boyunca Hg düzeylerinin artması) ve biyomagnifikasyondur (trofik besin zinciri boyunca Hg düzeylerinin ve MeHg yüzdesinin artması) [43]. Bu bağlamda biyoakümülasyon çevresel ve biyolojik etmenler sonucu bir organizma içindeki MeHg'nin net birikimini ifade ederken, biyomagnifikasyon MeHg'nin ardışık seviyelerde besin zincirindeki aşamalı birikimini ifade eder [44].

Doğal salınım ve antropojenik faaliyetler nedeniyle ekosistemlerin cıva ile kirlenmesi dünya genelinde bir endişe kaynağı olmuştur. Fosil yakıtların, biyoyakıtların ve atıkların yanması, antropojenik Hg emisyonlarının %35-77'sini oluşturur. Bu emisyonların yaklaşık yarısı, ABD'de kömürle çalışan enerji santrallerinden kaynaklanır. Enerji santrallerinden salınan elementel Hg atmosferde 2 yıla kadar kalabilir ve toprağa ve suya yerleşmeden önce farklı bir yarımküreye taşınabilir [45, 46]. Çin dünyada en fazla Hg yayan ülkedir [47].



Resim 2.1. Cıvanın çevredeki maruziyet döngüsü

Metilasyonla organik cıva oluşumu sonrası hareketli hale gelen MeHg, balık ve deniz ürünleri tüketimiyle nüfusun maruziyet düzeyinin artmasına sebep olur. Bu nedenle suya salınımlar atmosferik emisyonlardan kaynaklanan kirlilikten daha büyük sorun teşkil eder [40]. Sucul besin zinciri boyunca MeHg'nin biyoakümülasyon sonucu ton balığı, köpekbalıkları gibi balık yiyen büyük balıklarda ve biyomagnifikasyonuyla memeliler ve kuşlarda da yüksek konsantrasyona ulaşır [48]. Balıklardaki toplam cıva konsantrasyonlarının %80–100'ünün MeHg formunda olduğu, diğer deniz ürünlerinde ise bu oranın %50–80 arasında değiştiği bildirilmiştir[49]. Dünya genelinde yapılan çalışmalarda balık etindeki cıva seviyeleri genellikle 0,01 ile 4 mg/kg arasında olup, suyun pH ve redoks potansiyeli ile balık türleri, yaşı, boyutları, habitat ve coğrafi bölge gibi faktörlere bağlı olarak bu konsantrasyonlar değişebilmektedir. Cıva, sucul besin zincirinde biyomagnifikasyon gösterdiğinden, kral uskumru, turna balığı, köpek balığı, kılıç balığı, büyük ton balığı gibi büyük yırtıcı balıklar ile foklar ve dişli balinalar daha yüksek cıva seviyelerine sahiptir[50, 51]. 2014 ile 2017 yılları arasında yapılan bir çalışmada Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından farklı balıkçılık alanlarında bulunan ve İtalya'ya ithal edilen kılıç balığı örneklerinde cıva miktarları hesaplanmış ve FAO/WHO tarafından belirlenen Geçici Tolere Edilebilir Günlük Alım Miktarı (PTDI) (0,57 µg/kg/gün) ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen değerler çocuklarda MeHg alımının yetişkinlerden daha yüksek bulunarak (0,97 µg/kg/gün) FAO/WHO tarafından belirlenen PTDI değerini aşması nedeniyle özellikle çocuklara yönelik tehlike oluşturduğunu göstermiştir [52]. Akdeniz balıklarında yapılan bir çalışmada, cıva konsantrasyonlarının Atlantik balıklarına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Akdeniz balıklarında gözlemlenen konsantrasyonlarının Geçici Tolere Edilebilir Haftalık Alım Miktarlarına (PTWI) ekstrapolasyonu, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi'nin (EFSA) yetişkinler ve çocuklar için önerdiği eşik değerlerden sırasıyla %110 ve %140 daha yüksek alım miktarları göstermiştir [53].

Son sistematik incelemeler, insanların cıvaya maruz kalma düzeylerinin en yüksek olduğu bölgelerden birinin de Güney Amerika, özellikle de Amazon nehir kıyısı nüfusu olduğunu göstermektedir. Amazon nehir kıyısı nüfusunun ana protein kaynağı olarak balıklardaki cıva kirlilik düzeyleri balık yiyen balık türleri özelinde 0,36–0,66 ppm, otçul türlerde ise 0,03 ppm seviyelerinde bulunmuştur. Nehir kıyısında yaşayanların beslenmeleri etçil balık türleri üzerine eğilim gösterdiğinden, haftalık ortalama 340 µg'nin üzerinde toplam cıva maruziyetinin WHO tarafından önerilen düzeyin üzerinde olduğu görülmüştür[54].

2.1.3. Cıva maruziyeti

Doğa yaşamının yanında toplum sağlığını da etkileyen cıvanın zararlı etkileri ve taşıdığı yüksek riskler, tarihsel olarak 1950 ve 1970'lerde meydana gelen cıva zehirlenmesi vakalarıyla daha iyi anlaşılmıştır. 1950'lerde Japonya'nın Minamata kentinde MeHg ile kontamine olmuş balıkların tüketilmesi ve 1970'lerde Irak'ta MeHg içeren fungisit ile ilaçlanmış tahıldan yapılan ekmeklerin tüketilmesi sonucu insanlarda ciddi nörolojik hasarlar meydana gelmiştir [41]. Meydana gelen bu iki salgın sonrası akut ve kronik cıva maruziyeti sonucu meydana gelen toksisitenin bilimsel ve düzenleyici çalışmalarına olan ihtiyacı doğurmuştur.

Analitik yöntemlerdeki ilerlemelerle cıva bileşiklerinin neden olduğu zehirlenme belirti ve semptomlarını popülasyondaki cıva seviyeleriyle ilişkilendirmek mümkün hale gelmiştir. Buna yönelik Irak'taki zehirlenme vakaları ile ilgili parestezi, ataksi ve görme değişiklikleri 500 µg/L seviyesinin altında, konuşma bozuklukları, görme ve işitme bozuklukları 1000 µg/L seviyesinin altında ve ölüm 3000 µg/L kan cıva seviyesinin altında gözlemlenmemiştir [55]. Iraktaki salgın sonrasında, hamilelikleri sırasında kontamine ekmeği tüketen kadınlarda hamilelik dönemindeki saç cıva konsantrasyonu ile çocuklarda prenatal MeHg maruziyeti sonucu meydana gelen nörogelişimsel bozukluklar ilişkili bulunmuştur. 81 hamile kadından 22'sinin kanındaki 500 µg/L'ye seviyeye denk gelen saç cıva konsantrasyonlarında (4125 µg/g) parestezi ve daha şiddetli belirtiler görülmüştür [56].

Dünya çapında birçok resmi kuruluş, insanlarda olumsuz sağlık etkileri nedeniyle MeHg alımına karşı koruyucu amaçla kılavuz değerleri belirlemiştir. Bu değerler, bir bireyin vücut ağırlığı başına (µg/kg) bir haftada tüketimi güvenli kabul edilen maksimum MeHg miktarını ifade etmek için kullanılan PTWI değerleridir. Ortak Gıda Katkı Maddeleri WHO/FAO Uzman Komitesi (JECFA) 2007 yılında MeHg için PTWI değerini 1,6 µg/kg olarak belirlemiştir; bu, 60 kg ağırlığında bir yetişkin için haftalık yaklaşık 96 µg alıma denk gelmektedir. EPA 2007'de bu değeri daha temkinli biçimde 0,7 µg/kg (42 µg/hafta) olarak önermiştir. Benzer şekilde Kanada Sağlık Bakanlığı 1,4 µg/kg (84 µg/hafta), Japonya Gıda Güvenlik Komisyonu 3,3 µg/kg (198 µg/hafta), Hollanda Ulusal Halk Sağlığı ve Çevre Enstitüsü (NIPHE) 0,7 µg/kg (42 µg/hafta), Toksik Maddeler ve Hastalık Kayıt Ajansı (ATSDR) 2,1 µg/kg (126 µg/hafta) ve İlaç ve Gıda Ajansı (FDA) 3,5 µg/kg (210 µg/hafta) olarak referans değerler bildirmiştir[35]. Buna göre Çevre Koruma Ajansı (EPA) günlük

alınmasına izin verilen oral referans dozunu (RfD) 0,1 µg/kg/gün, ATSDR minimum risk seviyesini (MRL) 0,3 µg/kg/gün, Dünya Sağlık Örgütü (WHO/JECFA komitesi) PTWI değerini doğurgan kadınlar için günlük 1,6 µg/kg/hafta ve genel popülasyon içinse 3,3 µg/kg olarak belirlemiştir [12, 49, 54, 57].

Cıva maruziyetine bağlı meydana gelen etkileri değerlendirmede biyobelirteçlerden faydalanılır. Biyobelirteçler, biyolojik sistemlerde veya örneklerde (vücut sıvıları, hücreler veya dokular) gösterge niteliğindeki ölçülebilen hücresel, biyokimyasal bileşenler, yapılar, süreçler ve işlevler olarak tanımlanan sinyallerdir [58]. Biyobelirteçlerin, olumsuz bir etkiyi belirlemedeki yararlılığı, toksik maddenin etki gösterdiği rolüyle yakından ilişkilidir [59]. Cıva maruziyetinin en yaygın biyobelirteçleri saç, idrar ve kandaki toplam Hg düzeylerinin ölçümlerini kapsayan endojen belirteçlerdir[1]. Plasental kordon kanı, dışkı, anne sütü veya tırnaklardaki Hg düzeyleri gibi diğer biyobelirteçler, belirli durumlarda yararlı oldukları kanıtlanmış olsa da nadiren kullanılır.

Mesleki olarak maruz kalmayan popülasyonda, cıva düzeyleri çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Örneğin idrardaki cıva seviyelerinin bireydeki amalgam yüzeylerinin sayısıyla ilişkili olduğu ve dental amalgam yüzeyinden ortalama günlük cıva emiliminin 3-17 µg arasında olduğu gösterilmiştir[60].

Mesleki maruziyeti olmayan popülasyonda balık tüketimi yoluyla alınan MeHg vücutta farklı dokularda değişen oranlarda birikmektedir. EPA ve WHO tarafından önerilen haftalık MeHg referans alım dozlarına (0,7 µg/kg-1,6 µg/kg) göre 60 kg ağırlığındaki bir birey için sırasıyla 42 µg/hafta ve 98 µg/hafta alıma karşılık gelmektedir. Bu değerlere göre belirlenen referans MeHg alım miktarı sonrasında, farklı dokulardaki toplam cıva içeriği farklı olup; saçta 1–2,3 µg/g, beyinde 0,02–0,046 µg/g, kanda 4-9 µg/L olarak hesaplanmıştır [54]. İnsan saçında izin verilen cıva konsantrasyonunun en yüksek 6 µg/g olduğu WHO tarafından belirtilmektedir[12]. Saçtaki normal Hg seviyeleri 1 ile 2 µg/g arasında değişmektedir, ancak büyük miktarda balık tüketen kişilerde saç Hg seviyeleri 10 µg/g'yi aşabilir. Yetişkinlerde nörotoksik etkiler için toksik etkinin görüldüğü en düşük değer (LOAEL) ise 50 µg/g olarak belirlenmiştir[9, 13]. Cıvanın maruz kalma düzeyleri normalde saç, kan ve idrarda cıva düzeyleri ölçülerek değerlendirilir ancak; MeHg keratinin sülfidril gruplarına bağlanır ve saçta birikerek metal yükünün %80'inden fazlasını oluşturur [1]. Saç, beyin ve kandaki MeHg düzeyleri 250:5:1 oranında bir dağılım gösterir [61]. Saçtaki Hg konsantrasyonu,

MeHg'ye maruziyeti belirlemede girişimsel olmayan bir şekilde tayin etmek için uygun bir belirteçtir [1]. Saç telinin farklı bölümlerinden hareketle geriye dönük çalışmalar yapılabilmesi, anne saçındaki Hg düzeylerinin fetüs kanındaki Hg düzeyleri ile ilişkili olarak doğum öncesi maruziyete yönelik risk değerlendirmesini sağlaması, saçtaki Hg düzeylerini ölçmenin getirdiği avantajlardır [9]. İdrardaki Hg miktarı işyeri ortamlarından veya diş amalgam yüzeyinden kaynaklanan Hg^0 maruziyetlerini yansıtan güvenilir bir biyobelirteçtir [62]. Hg^0 maruziyeti sonrası böbrek hücrelerinde birikir ve Hg^{2+} formuna okside olarak idrarla atılır. Bu nedenle idrardaki cıva düzeyleri, akut ya da kronik maruziyetlerin ardından vücut yükünü dolaylı olarak yansıtabilir ancak MeHg maruziyetinde atılımın böbreklerden sınırlı olması ve MeHg'nin esas olarak kanda bulunması nedeniyle idrar uygun bir biyobelirteç olarak değerlendirilmez[1, 13]. Eritrositlerdeki cıva konsantrasyonu toplam maruziyetin güvenilir bir göstergesi olarak kabul edilir [61]. Balık tüketen popülasyonlarda, tam kandaki Hg seviyelerinin genellikle MeHg maruziyetini yansıttığı düşünülmektedir [1, 63]. Yüksek derecede kontamine balık tüketmeyen bireylerde kan düzeyleri genellikle 5–10 µg/L arasında, balık tüketimi sınırlı popülasyonlarda ise 2 µg/L'nin altındadır [9, 64]. Kandaki MeHg'nin yaklaşık %90'ı eritrositlerde hemoglobine bağlı olarak yer alırken, elementel ve inorganik cıva türleri (Hg^0 ve Hg^{2+}) eritrosit ve plazma arasında daha dengeli dağılır [1, 61]. Plazmadaki cıva düzeyi toplam kan cıvasının %5–35'i arasında yaş, diyet gibi bireysel özelliklere bağlı olarak değişebilir[65]. Doğum öncesi dönemde kordon kanı Hg düzeyleri, fetüsün MeHg'ye maruziyetini ölçmede kullanılsa da; fetal kan düzeylerinin anne kan konsantrasyonlarından 1,5-2 kat daha yüksek olduğu bilindiğinden, doğum öncesi maruziyeti değerlendirmek için tercih edilen biyobelirteç anne kanıdır [9, 66].

EPA referans kan cıva konsantrasyonunun 5,8 µg/L seviyesinin altını güvenli olarak önermiştir [37]. Bazı çalışmalarda ise kontrol grubundaki kan cıva konsantrasyonları yaklaşık 1 µg/L olarak bildirilmiştir [9]. Cıvaya maruz kalan işçilerde veya Çin'de cıva kirliliğinin olduğu bölgelerde yaşayanlarda 7-10 µg/L seviyelerinde olduğu görülmüştür[64, 67]. New York'ta yapılan bir biyoizleme çalışmasında, kan cıva konsantrasyonlarının 2,73 µg/L ve düzenli balık tüketen yetişkinlerde 5,65 µg/L 'ye ulaştığı bulunmuştur [68].

Mesleki maruziyet de cıvaya maruz kalmanın en önemli yoludur. Özellikle el işçiliği ve küçük ölçekli altın madenciliği, mesleki olarak Hg'ye maruz kalmanın başlıca kaynaklarıdır. Bu faaliyetler birçok ülkede yasaklanmış olmasına rağmen milyonlarca insan cevherden altın çıkarmak için bu yöntemleri kullanmaya devam etmektedir [69]. Amalgam yakma

alanlarının etrafındaki hava genellikle çok yüksek seviyelerde cıva buharı içerir ve WHO'nun belirlediği maruz kalma sınırlarını aşar [70]. Çocuklar ayrıca amalgam yakma işlemine katılımları veya amalgam yakma bölgelerine yakın bulunmaları nedeniyle toksik Hg seviyelerine maruz kalma riski altındadır. Bu çocukların bazılarının uzun süreli nörolojik bozukluklar sergilediği gösterilmiştir[71]. Bu nedenle, çalışanların maruziyetini kontrol altında tutmak için ulusal ve uluslararası kuruluşlar, ortamdaki cıva buharı miktarı için sınır değerler belirlemiştir. Bu sınır değerler; Avrupa Birliği Mesleki Maruziyet Limitleri (EU-OEL) 8 saatlik maruziyet halinde 0,02 mg/m^3, İş Sağlığı ve Güvenliği İdaresi (OSHA) 0,1 mg/m^3, ABD Ulusal İş Sağlığı ve Güvenliği Enstitüsü (NIOSH) 10 saatlik maruziyet halinde 0,05 mg/m^3, Amerikan Devlet Endüstriyel Hijyenistleri Konferansı (ACGIH) 8 saatlik maruziyet halinde 0,025 mg/m^3, Türkiye'de ise Kimyasal Maddelerle Çalışmalarda Sağlık ve Güvenlik Önlemleri Hakkında Yönetmelik gereğince 8 saatlik maruziyet halinde izin verilen limit 0,02 mg/m^3 olarak belirtilmiştir [72-76].

2.2. Metil Cıvanın Toksikokinetiği

Doğada cıvanın alkilasyonu sonucu hem metil hem etil cıva oluşumu mümkün olsa da organik cıva türleri arasında MeHg su ekosisteminde ve balıklar dahil olmak üzere deniz canlıları arasında en fazla bulunan ve tespit edilebilen türdür[77]. Metilasyon, reaktif elektrofilik bileşiklerin toksisitesini azaltmak için adaptif bir yol olarak ortaya çıkan biyolojideki yaygın bir reaksiyondur [78].

MeHg'nin toksikolojik olarak önemi; hücrelere ve insan vücudunun farklı bölgelerine emilim için geçirdikleri biyolojik dönüşümler ve bunu sağlayan kimyasal özellikleriyle ilgilidir. CH_3Hg^+ ve Hg^{2+} katyonları sistein(Cys) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) dahil olmak üzere tiyol gruplarına yönelik (-SH) yüksek kimyasal afiniteye sahiptir [79].

Metil ve inorganik cıva ile yapılan çalışmalar belirli küçük moleküler tiyollerle oluşan kompleks bileşiklerin hücre içinde oluşturulan ve membran taşıyıcıları üzerinde taşınan endojen tiyol konjugatlarını yapısal olarak taklit ettiğini göstermiştir [80, 81]. Biyolojik sistemlerdeki tüm cıva iyonlarının redükte glutatyon (GSH), sistein (Cys), homosistein (Hcy), N-Asetilsistein (NAC) ve albümin gibi tiyol içeren moleküllere bağlı olduğu kabul edilmektedir. Cıva iyonlarının inorganik tuzlar veya bağlı olmayan "serbest" bir iyonik halde bulunma olasılığı son derece düşüktür [82]. MeHg vücuda alındıktan sonra Cys ile kararlı

bir bağ oluşturur ve bu yapı metiyonin aminoasidine yapısal olarak benzerdir. Oluşan MeHg-Cys kompleksi, metiyoninin hücre içine alımında rol oynayan taşıyıcı proteinler için bir substrat olarak tanınır ve hücrelere girişi ve hücre içinde hareketi moleküler taklit mekanizması sonucu gerçekleşir[81].

İnsanlarda MeHg maruziyetinin başlıca kaynağı kontamine balık ve deniz ürünleri tüketimidir. Tüketilen ürünlerin cinsi ve günlük miktarına bağlı olarak kandaki MeHg oranının balık tüketim miktarı ile doğru orantılı olarak arttığı görülmüştür[83]. Kontamine olmuş gıdaların tüketiminden sonra cıva insanda sindirim sisteminden kolayca emiliyor olsa da son çalışmalar emilimin MeHg için %12-79 ve Hg^{2+} için %49-69 arasında değiştiğini ve %100'ün altında olduğunu göstermektedir[84]. Gastrointestinal sistemden emilimi yüksek oranda MeHg-Cys veya MeHg-sistein-glisin (MeHg-CysGly) konjugatı halinde gerçekleşir [85]. MeHg-Cys konjugatının oluşması ve lipofilik özellik göstermesi dokulara taşınmasına aracılık ederek kan-beyin bariyeri ve kan-plasenta geçişini hızlandırır. Fetal kandaki MeHg anneninkinden daha yüksek konsantrasyonda olup gelişmekte olan fetüs MeHg'ye oldukça duyarlıdır [86].

MeHg'nin vücuttaki metabolizması, onun vücutta dağılımını ve toksisitesini belirleyen kritik bir süreçtir. Emilimi takiben MeHg karaciğere taşınır ve ardından tüm vücut dokularına, özellikle de MSS ve plasentaya 2-3 saat içinde dağılır. Beyne giriş mekanizması MeHg'nin sistein konjugatı oluşturması ve bu yapının yapısal olarak metiyonin amino asidini taklit etmesi ile açıklanır[85]. Beyne girdikten sonra, MeHg çok yavaş bir şekilde Hg^{2+}'ye biyotransforme olur; ancak toksik etkiden sorumlu nihai formunun yüksek olasılıkla MeHg olduğu düşünülmektedir [87, 88].

MeHg emildikten ve karaciğere ulaştıktan sonra karaciğer hücrelerinden GSH ile bir kompleks oluşturularak safraya taşınır[23, 24]. MeHg-GSH kompleksi, safraya salgılandıktan sonra, hücre dışı enzimler tarafından amino asitlerine parçalanarak tekrar MeHg-Cys kompleksi oluşur ve gastrointestinal sistem üzerinden kan dolaşımına yeniden emilir. Bu dönüşümle enterohepatik döngüsünü tamamlar[89, 90]. Safraya salgılandıktan sonra GSH gama-glutamiltransferaz ve dipeptidazlar tarafından katabolize edilerek glutamat, sistein, glisin ve sistein S-konjugatlarına dönüşür ve bunlar safradan kısmen geri emilir. Metil cıvanın da safra ile bir GSH kompleksi olarak salgılanması, benzer bir intrahepatik döngüye girdiğinden atılımını geciktirir. Safraya GSH-MeHg geri kazanımı

safradan emilemeyen GSH-MeHg'ye nazaran önemli ölçüde düşüktür. Çünkü GSH, GSH-MeHg kompleksinin kanaliküler veziküllere alımını rekabetçi bir şekilde inhibe eder ve "GSH dışa akış sistemi" metil cıvanın hücrelerden uzaklaştırılmasını sağlar[91]. Sistein kompleksi olarak hücreye giriş ve GSH yoluyla çıkış, metil cıvanın hücreden atılım mekanizmasını açıklamaktadır [61]. Karaciğerden MeHg'nin kompleks oluşturularak safraya salgılanması ve bağırsağa geçmesi sonrasında iki şekilde metabolize olur; safradaki kompleks enterohepatik dolaşıma girer, bağırsakta tekrar MeHg-Cys kompleksi halinde geri emilimi cıvanın vücutta kalış süresini uzatır[61]. İkinci dönüşümde ise bağırsak mikrobiyotası tarafından demetilasyona uğrar ve inorganik cıvaya (Hg^{2+}) dönüştürülür. Bu dönüşüm karbon-cıva bağı parçalanarak sağlanır [92]. Ayrıca karaciğerde NADPH–sitokrom P450 redüktaz ve fagositik hücrelerin de MeHg'yı inorganik cıvaya çevirebildiği gösterilmiştir[93]. Ortaya çıkan inorganik cıva, özellikle beyinde, kan-beyin bariyerini kolay geçemediği için uzun süre kalıcıdır. Vücutta inorganik cıvadan tekrar MeHg sentezi ise anlamlı düzeyde gerçekleşmez[94].

Vücuttan MeHg atılımı yavaş bir şekilde gerçekleşir. Emilimden sonra %90'ı safra yolu üzerinden feçesle atılır[85]. Toplam vücut yükünün günde yaklaşık %1'i dışkı ve böbrek yolu ile uzaklaştırılır, bunun içinde idrar yoluyla atılım toplam eliminasyonun %10'undan azdır [95]. Tüm vücut için biyolojik yarı ömrü ise yaklaşık 70 gündür[85].

2.3. Metil Cıvanın Toksisitesi

MeHg'ye bağlı olarak meydana gelen toksik etkiler ilk kez 1953 ile 1956 yılları arasında Japonya'nın Kumamoto eyaletindeki Minamata Körfezi'nde keşfedildi ve Minamata hastalığı olarak adlandırıldı. Körfezdeki cıvanın asetaldehit ve vinil bileşikleri üreten fabrika atıklarından geldiği anlaşılmıştı [96]. Bölge sakinlerinde yaklaşık 705 ppm cıva seviyeleri tespit edildi [97]. Sonrasında Minamata ile benzer şekilde balık tüketimiyle ilişkili ikinci MeHg zehirlenmesine bağlı vakalar 1964-65 yıllarında Niigata kentinde gerçekleşti. 1994'e kadar tanı kriterlerine göre Minamata hastalığı ile ilişkili olarak 1769 vaka ve 2946 ölüm resmi olarak kaydedildi[96].

Minamata hastalığının belirgin semptomları ortaya çıkmadan önce haftalar veya aylar geçebilir [98]. Japon hükümeti tarafından 1977'de kurulan bir komite Minamata hastalığının teşhisi için resmi kılavuzlar ortaya koymuştur [96]. Bu kılavuzlara göre hastalığın tipik semptomları ekstremitelerin terminal kısımlarına duyu eksikliği, ataksi, dengesizlik, görme

alanının daralması, yürüme ve koşma bozuklukları, kas güçsüzlüğü, titremeler, anormal göz hareketleri, işitme bozukluğu ve bunlara bazen eşlik eden zihinsel bozukluklar, tat ve koku duyularında kayıplar olarak kaydedilmiştir [96, 98].

Minamata hastalığına dair patolojik çalışmalar MSS'nin birincil hasar bölgesi olduğunu doğrulamıştır. MeHg'nin tiyol gruplarına olan yüksek afinitesi, sistein içeren protein ve peptitlerin tüm hücre içi kompartmanlarda yapısal ve fonksiyonel değişime duyarlı hale gelmesi nedeniyle MeHg'nin nörotoksik etkilerinde moleküler hedeflerinin rol oynadığı öne sürülmüştür [98]. *In vitro* sonuçlar, MeHg'nin konsantrasyonunun nöronal ölüm şeklini belirlemede kritik bir faktör olduğunu göstermektedir. Yüksek MeHg seviyeleri (5–10 μM) mitokondriyal aktivitenin bozulmasına, mitokondrinin enerjisinin azalmasına ve plazma membranının parçalanmasına neden olurken[51], düşük MeHg (≤1 μM) konsantrasyonlarına maruz kalındığında beyincik hücrelerinin ölümünün esas olarak apoptoz sonucu gerçekleştiği görülmüştür [99]. MeHg'nin neden olduğu nörotoksisitenin; makromolekül sentezinin (DNA, RNA ve protein) inhibisyonu, mikrotübül bozulması, nörotransmitter fonksiyonunun bozulması sonucu hücre içi Ca^{2+} artışı, oksidatif stres ve glutamat homeostazının değişmesi ve NMDA reseptörlerinin aktivasyonuna bağlı eksitotoksisite olmak üzere hücresel ve moleküler mekanizmaları olduğu düşünülmektedir [100].

MeHg nörotoksisitesi, dünya çapında meydana gelen zehirlenme olayları ve düşük konsantrasyonda maruziyetle ilgili çalışmalar sonucu belirlenmiştir. İlk kez Minamata vakalarında MeHg'nin fetus üzerindeki nörogelişimsel etkileri de daha iyi anlaşılmıştır. Annelerde belirgin semptomlar görülmezken bebeklerde felç, zekâ geriliği ataksi, konuşma bozuklukları, uzuv deformasyonları gibi MSS rahatsızlıkları görülmüştür[2]. Daha sonra Irak'ta meydana gelen vakalarda ise Minamata bölgesinden daha yüksek konsantrasyonda akut cıva maruziyeti sonucu zehirlenen çocuklarda duyu bozuklukları, felç ve zihinsel bozukluklar gibi nörotoksik etkiler görüldü [2]. Yeni Zelanda ve Faroe Adaları'ndaki çocuklarda, Japonya ve Irak'taki zehirlenme olaylarına kıyasla çok daha düşük MeHg konsantrasyonlarında maruz kalınsa da zekâ, dil, görsel-uzamsal beceriler, kaba motor beceriler, hafıza ve konsantrasyon bozuklukları görülmüştür[101-103]. Ancak sonraki çalışmalarda, doğum sonrası düşük miktarda gıda kaynaklı MeHg maruziyetiyle nörolojik etkiler arasında net bir nedensellik kanıtlanmamıştır; yalnızca bazı bilişsel testlerde (örneğin toplama yapma, sayı-eşleme) etkiler gözlenmiştir [104]. Kore'de 6–10 yaş arası 1778 çocukta yapılan çalışmada MeHg düzeyiyle dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu

(DEHB) arasında ilişki bulunmazken [105], Çin ve Hong Kong'da MeHg düzeyleri arttıkça DEHB prevalansının arttığı [106]; İspanyol çocuklarda ise saç cıva düzeyinin görsel-uzamsal yeteneklerle ilişkili olduğu rapor edilmiştir[107].

MeHg'nin yüksek dozlarda akut ve düşük dozlarda kronik toksik etkileri ortaya çıkar. Tarihsel olarak Minamata ve Irak vakaları geniş ölçüde belgelenmiş olsa da güncel çalışmalar daha düşük dozların bile nörolojik, böbrek ve kardiyovasküler riskler taşıyabileceğini ortaya koymaktadır. MeHg hem deney hayvanları hem insanlarda hücre içi sinyal yollarını bozarak nöral kök hücrelerin proliferasyonunu engeller; bu da nöron sayısının azalmasına yol açar ve nörogenez sürecini bozar [108]. Düşük dozlarda bile DNA sentezinin baskılanması, gen ekspresyonunun değişmesi, hücre içi kalsiyum dengesinin bozulması, protein fosforilasyonundaki değişiklikler ve oksidatif stres artışıyla ilişkili nörodejeneratif hastalıkların (Parkinson, Alzheimer, ALS) ortaya çıkmasına sebep olabilir[109]. Başka bir çalışmada daha yüksek MeHg maruziyetinin arteriyel kan basıncında artışa neden olduğuyla ilgili sonuçlar elde edilmiştir. Danimarkalılara kıyasla daha fazla balık tüketen bir kohortta, Grönlandlıların, Danimarkalılara kıyasla kanlarında daha yüksek cıva düzeyi, daha yüksek nabız basıncı ve daha düşük diyastolik kan basıncına sahip oldukları gösterilmiştir[110]. Cıvanın MSS ve kardiyovasküler sistem üzerindeki toksik etkilerinin reaktif türlerin üretiminin artışı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. MeHg iHg^{2+}'ye metabolizasyonu ile oksidasyon ve redüksiyona uğramaktadır. MeHg'nin parçalanması esnasında reaktif türler oluşur ve hücre zarının lipit peroksidasyon zincirini aktive ederek hücrelere ciddi zarar verebilir[111]. Reaktif türlerin artması, antioksidan enzimlerin aktivitesinde azalmaya neden olur. Bununla beraber Hg'nin sülfidril gruplarına yüksek afinitesi de, glutatyon peroksidaz aktivitesinde azalmaya ve birçok reseptörün hücre içi sinyal iletiminde girişime yol açabilir[37]. Ayrıca, MeHg'nin fosfolipaz D (PLD) aktivasyonunu indükleme kapasitesine sahip olduğu, PLD aktivitesindeki artışın da birçok kanserde rol oynadığı gösterilmiştir [112]. Amerika Ulusal Araştırma Konseyi (National Research Council) raporunda cıva maruziyetinin kardiyovasküler hastalıklar üzerinde etkisi olduğunu belirtmiştir. MeHg'nin toksik etkilerinin kalpte birikerek kan basıncının yükselmesine neden olduğunu ve çeşitli zehirlenmelerde anormal kalp atışı, anormal elektrokardiyogram ve miyokardit vakalarının bildirildiğini kaydetmiştir [64].

Kanda inorganik cıva (iHg) önemli ölçüde artana kadar idrarla atılır ve genellikle kan iHg değeri düşüktür. Bu nedenle eritrositlerdeki cıva (tHg) konsantrasyonu esasen MeHg

maruziyetini yansıtır [85]. Dolayısıyla MeHg'nin sistemik toksik etkilerinin ana hedefi eritrositlerdir; MeHg'nin emilimi gerçekleştikten sonra kandaki cıvanın %90'dan fazlası eritrositlerde birikir [1]. Bunun nedeni MeHg'nin sistein ve glutatyon ile oluşturduğu S-konjugatlarının eritrositlerde MeHg'nin emilimini ve konsantrasyonunu kolaylaştıran membran taşıyıcıları için substratları olmasıdır [79, 80]. Vücuttaki MeHg çoğunlukla eritrositlerdeki hemoglobine bağlanır ve eritrosit konsantrasyonu plazma konsantrasyonunun yaklaşık 20 katıdır [50].

MeHg sülfidril grupları arasında kolayca yer değiştirerek hemoglobin ile kompleks oluşturması eritrositlerde geçici olarak tutulmasına olanak tanır [113]. Maruziyetinin ardından kanda MeHg eritrosit/plazma konsantrasyonu 17-26 kat arasında değişen oranlarda daha fazla eritrositlerde yoğunlaştığını göstermiştir [114]. Yapılan klinik çalışmalarda insanlarda balık tüketimi sonrası emilen cıvanın tamamının MeHg olduğu ve kandaki büyük çoğunluğunun eritrositlerde lokalize olduğu gözlemlenmiştir[114, 115]. Benzer şekilde, ölümcül dimetilcıva zehirlenmesi vakasında maruziyet sonucu eritrositlerdeki cıva konsantrasyonunun plazmaya kıyasla 10-20 kat daha yüksek olduğu rapor edilmiştir[116]. Bu bulgular MeHg'nin, kanda açık bir şekilde eritrositlerde birikme eğiliminde olduğunu ortaya koymaktadır. Eritrositler, hastalıkların ve tedavilerin izlenmesinde rol oynadıkları için önemli sağlık göstergeleridir. Cıvaya yönelik araştırmalar genellikle meydana getirdiği nörotoksisite, çevredeki zararlı etkileri, ekosistemde ve hayvanlardaki düzeylerine ve insan biyobelirteçleri üzerine odaklanır ancak eritrositlerde birikimi ve eritrositlerin yapısını nasıl etkilediği veya değiştirdiği konusundaki çalışmalar yetersizdir.

2.4. Eritrositlerin Yapısı ve Görevleri

Eritrositler dolaşımdaki kan hacminin %40-45'ini oluşturur. Vücutta oksijenin ve karbondioksitin taşınmasında temel olarak görevli hücrelerdir. Bunun yanında karbondioksitin dokulardan akciğere taşınmasında, kanda sabit pH'nın korunmasında ve dokulara kan akışının düzenlenmesinde rol oynarlar[117]. İnsan eritrositleri kemik iliğinde veya fetal karaciğerde hematopoetik kök hücrelerinden gelişir. Eritroblastlar, spesifik bir büyüme faktörü olan eritropoetinin etkisi altında çekirdeklerini kaybederler ve bu çekirdekler, makrofajlar tarafından yutulur[118]. Çekirdeksiz retikülositler kan dolaşımına salınır. Sonunda hücresel organelleri parçalanarak çekirdeğin kaybedilmesi, hemoglobin ve

bir hücre iskeleti destek sisteminin edinilmesinden sonra olgun bir eritrosit haline dönüşürler[117, 118].

Eritrositler, bir plazma zarı ile sınırlanan, 8 µm çapında ve 2 µm kalınlıkta disk şeklinde bikonkav yapıdaki kan hücreleridir. Eritrosit sitoplazmasında, dolaşım sistemindeki kan gazlarının taşınması için gerekli olan hemoglobin (Hb) molekülleri bulunur. Hücre içi sıvısı olan sitozol hacmi, membran tarafından düzenlenir ve 300 mOsmol/kg'da ortalama 94 $\mu m^{3'}$tür. Olgun eritrositlerin membranı protein, çift katlı fosfolipit ve altında bulunan iki boyutlu spektrin molekülü ağından oluşur ve %49 protein, %43 lipid, %8 karbonhidrat içerir. Fosfolipit çift tabakası ve spektrin ağının bileşik özellikleri, sağlıklı eritrosit morfolojisini oluşturur ve zara elastik özelliklerini kazandırır[119]. Eritrositlerin hücre iskeleti bikonkav yapının işlevinde ve yüzey alanı/hacim oranının korunmasında önemli rol oynar. Eritrositler çok küçük kılcal damardan ilerlemek için geri dönüşümlü bir deformasyona uğrasa da yapısal bütünlüğünü korur. Hücre yaklaşık %250'ye kadar uzayabilir, ancak yüzey alanında %3–4'lük artış bile hemolize yol açar . Bu yüzden şekil değişiklikleri zar yüzey alanı artmadan gerçekleşir [120]. Zarın bileşimi ve ona eşlik eden hücre iskeleti ona gerekli esnekliği ve dayanıklılığı sağlar. Eritrosit membranı esas olarak kolesterol ve fosfolipitlerden oluşan bir çift lipit tabaka ve bu tabakaya gömülü transmembran proteinlerin, membranın iç tarafında hücreye yapısal bütünlük sağlayan aktin ve spektrin tetramerleriyle bağlanarak oluşturduğu birleşik yapıdan oluşur [121]. Eritrosit zarında yer alan proteinler zar yapısı ve işlevi açısından zara integral ve periferik proteinler olmak üzere iki gruba ayrılır. İntegral proteinler zar tabakasına gömülüdür ve hem hücre içi hem hüre dışı ile etkileşim halindedir. Bu proteinler arasında glikoforinler, Rh proteinleri, Band3 (anyon taşıyıcı), akuaporin 1 (su taşıyıcı), Glut1 (glikoz ve L-dehidroaskorbik asit taşıyıcı), sodyum pompası, Na^+-K^+-ATPaz, Ca^{2+}ATPaz, Mg^{2+}-ATPaz, Na^+-K^+-$2Cl^-$ taşıyıcı, Na-$2Cl^-$ taşıyıcı, Na^+-K^+ taşıyıcı, K^+-Cl^- taşıyıcı, gibi iyon taşıyıcı proteinler ve Gardos kanalı bulunur[120]. Periferal proteinler ise zara esneklik ve mekanik desteği sağlayan spektrin ve aktin gibi hücre iskeletini oluşturan proteinlerdir. Bu proteinler zarın yüzeyine tutunur ancak lipit tabakası içine girmez [122]. Böylece integral proteinler madde taşınımı ve hücre tanınması gibi işlevleri yürütürken, periferik proteinler zarın mekanik desteğini sağlayarak eritrositin şeklini korur. Spektrin tetramerleri ile aktin kompleksleri arasındaki bağlantıların herhangi bir şekilde bozulması, eritrositlerin şekil değişimine neden olabilir [121]. Eritrosit zarının hasar görerek Hb hücre dışına sızması sonucu, Hb miktarının ölçülmesi hücresel hasarın göstergesi olarak sıklıkla kullanılmaktadır [123].

Eritrositlerde oksijenin taşınması, tetramerik temel hücre içi bir protein olan Hb tarafından gerçekleştirilir. Olgun bir eritrosit, sitozolik proteinlerin %95'ini oluşturan yaklaşık 270 milyon Hb molekülü içerir [124]. Hb proteinini oluşturan 2α ve 2β zinciri olmak üzere dört globin polipeptit zincirinin her biri bir hem grubu içerir ve bir oksijen molekülünü bağlama kapasitesine sahiptir [125]. Hem, α-metilen köprüleri ile bağlanmış pirol içeren siklik bir tetra piroldür. Hem merkezinde bir Fe^{2+} atomu bulunur ve O_2'nin hem'e geri dönüşümlü bağlanmasına izin verir. Hb'nin biyolojik aktivitesi Fe^{2+}'nin Fe^{3+}'e oksidasyonu durumunda kaybolur. Bu protein aynı zamanda dokularda üretilen CO_2'nin akciğerlerle değişimini de kolaylaştırır [126, 127]. Hb, eritrositlerdeki baskın olan kimyasal bileşendir ve eritrositin toplam kütlesinin %33'ünü, kuru kütlesinin %94'ünü ve protein kütlesinin %97'sini oluşturur. Belirli kimyasal ajanların etkisi altında Hb; methemoglobin (metHb), S-nitrosohemoglobin, karboksihemoglobin, sülfohemoglobin, siyanomethemoglobin gibi türevlere dönüşür. Bu türevler oksijen taşıyamazlar. Bunlardan özellikle methemoglobin ve S-nitrosohemoglobin, oksidatif süreçlerde önemli bir rol oynar[128].

2.4.1. Eritrositlerin metabolik özellikleri

Eritrositler çekirdek, mitokondri ve diğer organelleri bulunmamasına rağmen oldukça karmaşık bir metabolik sisteme sahiptir. Eritrositlerdeki ATP, NADH ve 2,3-bisfosfogliserat (2,3-BPG) biyokimyasal reaksiyonlarda oluşan temel moleküllerdir [129]. Mitokondrileri bulunmadığından eritrositlerde ATP üretimi anaerobik glikoliz yoluyla gerçekleşir. Üretilen ATP zarda yer alan iyon pompalarının çalışması için gerekli enerjiyi sağlar. Böylece hücrenin iyon dengesi ve hacim kontrolü düzenlenir[130]. Glikoliz sırasında üretilen 2,3-BPG oksijenli hemoglobine bağlanarak oksijenin dokulara salınmasını kolaylaştırır [130, 131]. Glikoliz, ayrıca pirüvatın laktata dönüşümü için gerekli olan NADH'yi üretir. NADH, hem demiri Fe^{3+} durumunda olan ve oksijen taşıyamayan methemoglobini indirgeyen methemoglobin redüktaz için gerekli bir substrat görevi görür [132]. Glikoz alternatif olarak pentoz fosfat yoluyla metabolize edilerek, NADPH üretilebilir[129]. Eritrositlerin vücutta oksijeni taşıması, Hb'deki potansiyel olarak zararlı olabilecek Fe varlığı, endojen ve eksojen reaktif oksijen türlerine maruz kalmasına neden olur. Bu da oksidatif stres yaratarak proteinlerin bozulmalarına yol açar ve oksijen taşıma yeteneğini zayıflatabilir[113]. Pek çok doku ve hücrede pentoz fosfat yolunun temel substratları nükleotid sentezi için kullanılan pentoz şekerleridir. Ancak eritrositlerde çekirdek ve organeller bulunmadığından nükleik

asit sentezi gerçekleşmez. Bu nedenle pentoz fosfat yolunun eritrositlerdeki ana rolü redoks homeostazının ve hücresel bütünlüğün korunması için kritik öneme sahip olan NADPH'yi üretmektir[133]. G6PD enzim eksikliği pentoz fosfat yolunun aktivitesini bozar [134]. G6PD eksikliğinde NADPH üretimi azalır ve eritrositler oksidatif strese duyarlı hale gelir; bu durum hemolize yol açabilir[135].

NADPH üretimi ile GSH devamlılığı sağlanır. GSH eritrosit zarının oksidatif hasar görmesini önler [130]. NADPH ayrıca eritrositlerde tiyoredoksin sistemlerinin indirgenmesi, NADPH oksidazlar, nitrik oksit sentazlar ve ferrireduktazlar dahil olmak üzere çeşitli enzimler için substrat görevi görerek redoks homeostazının korunmasında kilit rol oynar[129].

Eritrosit metabolizması enerji üretimi, oksijen taşınımı ve oksidatif stres dengesini ince bir koordinasyonla sürdürür. Bu bağlamda cıva maruziyeti, eritrosit metabolizmasında meydana gelebilecek olumsuz etkiler açısından büyük önem taşır. MeHg'nin hücresel düzeyde lipit peroksidasyonunun artması, reaktif oksijen türleri oluşumu ve GSH tüketimi, hücre zarı bütünlüğünün bozulması, Ca^{2+} ve glutamat homeostazının bozulması gibi çeşitli biyolojik süreçleri olumsuz etkilediği *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiştir [136]. Dolayısıyla, yukarıda tanımlanan glikoliz ve pentoz fosfat yoluna bağlı redoks denge mekanizmalarının bozulması, MeHg maruziyeti durumunda eritrositlerde oksidatif hasarın önemli bir kaynağı haline gelir.

2.4.2 Eritrositlerde oksidatif stres ve antioksidan savunma

Mitokondri eksikliğine rağmen, eritrositlerin yüksek oksijen ve demir içeriği, sürekli reaktif türlerin oluşumuna ve oksidatif strese yatkın olmasına yol açar. Reaktif türler; radikal veya radikal olmayan kimyasallar olarak aktif molekülleri adlandırmak için kullanılan bir terimdir. Oksijen ve azottan türetilen reaktif türler, genellikle sırasıyla reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) olarak tanımlanır[137]. Bununla beraber reaktif türler klor, brom, demir ve kükürt türlerini de içerecek şekilde genişletilmiştir [138]. ROS ve RNS, oksijen ve azottan türeyen, ona kıyasla daha reaktif olan bileşiklerdir. Süperoksit radikal anyonu ($O_2^{\bullet-}$) ve hidroksil radikalinin (•OH) yanında hidrojen peroksit (H_2O_2), hipokloröz asit (HOCl) ve peroksi nitrit/peroksi nitröz asit ($ONOO^-$/ONOOH) gibi O_2'nin bazı radikal

olmayan türevlerini de içerir [137]. Yaygın reaktif oksidan türleri ve biyolojik sistemlerdeki etkileşimleri özet halinde belirtilmiştir (bkz. Çizelge 2.3.)

Prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki denge, redoks durumunu ifade eder. Serbest radikaller ve diğer reaktif türler hücre içi reaksiyonlarda sürekli üretilir. Reaktif oksijen ve nitrojen radikalleri oluşumuna karşı hücrelerde buna yönelik antioksidan sistem gelişmiştir. Oksidatif stres, reaktif oksijen ve nitrojen radikallerinin aşırı sentezi ve antioksidan kapasitenin bunu karşılayamaması sonucu ortaya çıkar [139]. Bu durum redoks dengesinin bozulması olarak tanımlanır[140].

Eritrositlerde membran içindeki çoklu doymamış yağ asitleri, oksijenden zengin bir ortam ve demirden zengin Hb, eritrositleri oksidatif hasara duyarlı hale getirir[126]. Arteriyel kandaki yüksek miktarda O_2 ve hem Fe içeriği oksitleyici radikallerin oluşmasına yol açar. Oksidatif stres eritrositlerin kendisine zarar verebilse de bu hücrelerden ayrılan büyük miktarlardaki ROS'nin yarattığı etki, vücudun diğer bileşenlerine zarar verebilecek ciddi bir potansiyele sahiptir [141]. Eritrositlerde glikoliz ve pentoz fosfat yolakları ile yakından ilişkili, hücrede oluşan H_2O_2 ve $O_2^{\bullet-}$ türlerinin dengelenmesinde görev alan çok sayıda enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan molekül mevcuttur. Bu antioksidan mekanizmalar; serbest radikalleri temizleyen ve peroksitleri ortadan kaldıran enzimatik (katalaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, glutatyon-6-fosfat dehidrojenaz) ve detoksifikasyon ile antioksidan korumada rol oynayan enzimatik olmayan (GSH, C vitamini, E vitamini, melatonin) bileşenleri içerir [142].

Küçük boyutu ve hidrofobisitesi nedeniyle NO• hücre zarlarından neredeyse hiç engellenmeden geçer. Süperoksitler NADPH oksidazlar (NOX) tarafından da üretilir. NOX enzimleri elektron verici olarak NADPH'yi kullanarak moleküler oksijeni süperoksit anyonuna dönüştürür[143]. Süperoksitin iyonik yapısı nedeniyle hücre zarından difüzyonu sınırlıdır. Peroksinitrit ise başlı başına güçlü bir oksitleyici moleküldür, ancak çözeltideki CO_2 ile hızla reaksiyona girerek daha güçlü oksidanlar olan azot dioksit ($NO_2^{\bullet}$) ve karbonat radikalini ($CO_3^{\bullet-}$) verir[144]. Azot dioksit hücre zarlarından çok hızlı yayılır ve esas olarak hücre içi tiyollerle ancak aynı zamanda zardaki lipitlerle de reaksiyona girer [145, 146]. Karbonat radikalleri hücre zarlarından yayılamaz ve tercihen proteinlerle reaksiyona girer [147].

Oksijenlenmiş Hb önemli seviyelerde ROS üretebilir. Oksijenlenmiş Hb günde %1-3 oranında oto-oksidasyona uğrayarak oksijen taşıyamayan metHb oksidasyonuna ve süperoksit oluşumuna neden olur [141]. Eritrositlerde H_2O_2 ve $O_2^{\bullet-}$ türlerinin başlıca oluşum kaynağı NADPH oksidaz, süperoksit dismutaz (SOD), Hb'nin oto-oksidasyonu ve serbest Fe'dir [126]. Oluşan $O_2^{\bullet-}$ temelde SOD tarafından H_2O_2'e dönüştürülür. H_2O_2 seviyeleri SOD yanında, katalaz (Cat), peroksiredoksin/tiyoredoksin sistemi ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile kontrol edilir[148, 149]. Katalazlar H_2O_2'in su ve oksijene dönüşmesini katalize ederek hücreleri oksidatif hasardan koruyan enzimlerdir. İnsan katalazları bir tetramer olarak organize olur. Dört hem grubu içerir ve her alt birimde bir tane olmak üzere dört NADPH molekülüne bağlanır [150]. SOD'lar süperoksit radikallerinin orantısız olarak bulunmalarını engellemek üzere reaksiyonları katalizleyen antioksidan enzimlerdir ve bu nedenle de hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan ilk bariyerdir. Cat H_2O_2'yi su ve oksijene indirgerken, ona bağlı NADPH ise enzimi oksidatif hasardan korur [151].

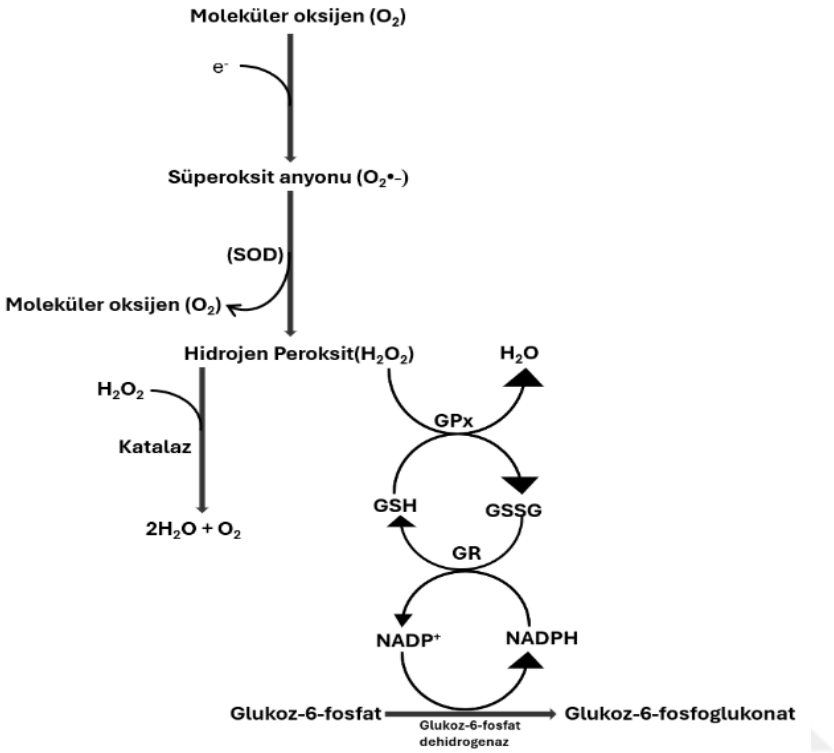
Glutatyon peroksidazlar (GPx'ler), değişen substrat ve elektron verici özgüllüklerine sahip hidroperoksitlerin indirgenmesini katalize eden bir enzim ailesidir. Kırmızı kan hücrelerinde en bol bulunan izoform, tahmini konsantrasyonu 1,5 μM olan GPx1'dir[152]. Glutatyon peroksidazlar (GPx1 ve GPx4) redoks homeostazının diğer temel enzimleri olup, lipit hidroperoksitleri alkollere, hidrojen peroksiti ise suya indirgerler[153]. Oksitlenmiş haldeki GPx indirgenmesi eritrositte bol miktarda bulunan GSH tarafından sağlanır. GSH doğrudan bir antioksidan görevi de görebilir [154]. Glutatyon redüktaz (GR), piridin nükleotid-disülfür oksidoredüktaz enzim ailesine ait bir flavoproteindir. Yapısal olarak, FAD, NADPH ve GSSG'ye özgü bağlanma bölgelerine sahip dimerik bir proteindir. GSSG GR aracılığıyla tekrar GSH'a dönüştürülür. GSH yenilenmesi yalnızca pentoz fosfat yolundan sağlanan NADPH tarafından beslenir [155]. GSH düzeyi ayrıca glikolizden üretilen ATP ile yürütülen sentez yoluyla da korunabilir. Bu sentez L-glutamil-L-sisteinil-glisinden oluşan tripeptit sentezidir [155].

Çizelge 2.1. Biyolojik sistemlerde karşılaşılan yaygın reaktif türler [137]

ROS	**Kimyasal Formül**	**Temel Özellikler / Reaktivite**
Süperoksit radikal anyonu	$O_2^{\bullet-}$	Orta derecede reaktif; Fe^{3+}/Cu^{2+} iyonlarını indirger; NO• ile hızla reaksiyona girerek peroksi nitrit ($ONOO^-$) oluşturur; hidroperoksit (ROOH) üretir ve Fe–S enzimlerine zarar verebilir.
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Kararlı; tiyoller ve metal iyonları ile reaksiyona girer; Fenton reaksiyonu ile •OH oluşturur, katalaz ve peroksidazlarla metabolize edilir.
Hidroksil radikali	•OH	Aşırı derecede reaktif; yakındaki tüm moleküllerle reaksiyona girer, CO_2 ile peroksimonokarbonat oluşturur.
Peroksi nitrit / Peroksi nitröz asit	$ONOO^-$/ ONOOH	Tiyoller ve geçiş metalleri ile reaksiyona girer; nitrosoperoksikarbonat ($ONOOCO_2^-$) oluşturur; biyomolekülleri okside eder, NO_3^- ve CO_2'ye ayrışabilir.
Karbonat radikal anyonu	$CO_3^{\bullet-}$	CO_2 ve •OH veya peroksi nitritten oluşur; guanin, tirozin, triptofanı okside eder; orta derecede reaktif.
Hipohalöz asitler	HOCl, HOBr	Güçlü oksidanlardır; özellikle tiyoller ve metiyonin ile reaksiyona girer; sekonder kloramin/bromamin ve tiyosiyanat türevleri oluşturur.
Tekil oksijen	$^1O_2$	Radikal olmayan uyarılmış oksijen formudur; ışık veya peroksil radikal reaksiyonlarıyla oluşur, porfirinler, bilirubin gibi biyomolekülleri okside eder.
Azot dioksit radikali	$NO_2^{\bullet}$	Peroksi nitrit veya nitrit oksidasyonu sonucu oluşur; elektron bakımından zengin bileşikleri (askorbik asit ve tiyoller) hızla okside eder, nitrozatif strese katkıda bulunur.

Eritrositler aynı zamanda RNS olan nitrik oksit (NO) kaynağıdır. Nitrik oksit hem sinyal iletiminde hem de redoks dengelemesinde kritik rol oynar. Eritrositlerde NO, nitrat–nitrit–NO indirgenme yolu ve nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığıyla üretilir[153]. NOS enzimleri, L-arginin ve oksijeni kullanarak L-sitrülin ve NO üretir. Bu süreç NADPH'ye bağımlıdır ve flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mono nükleotid (FMN), kalmodulin, tetrahidrobiopterin gibi kofaktörler gerektirir. Nitrat-nitrit-NO yolu ise, nitratın önce nitrite ve daha sonra NO'ya indirgenmesiyle gerçekleşir [156]. Plazmadaki nitrit ve NO eritrosite

difüze olur ve hemoglobinle hızla reaksiyona girer. Oksijenlenmiş hemoglobin, NO ile reaksiyona girerek methemoglobin ve nitrat oluştururken, deoksijenize hemoglobin nitriti NO'ya indirger ve nitrosohemoglobin oluşturur[157].



Şekil 2.1 Eritrositte major antioksidan kapasiteyi oluşturan glutatyonun rejenerasyon mekanizması (Süperoksit anyonu, SOD tarafından H_2O_2'ye dönüştürülür. H_2O_2 ise katalaz veya GPx tarafından suya indirgenir. GSSG, GR aracılığıyla NADPH kullanılarak yeniden GSH formuna dönüştürülür. G6PD koenzimi, NADPH ile pentoz fosfat yolunda G6PD tarafından rejenere edilir. (SOD: süperoksit dismutaz, GPx:Glutatyon peroksidaz, GR: glutatyon redüktaz, GSH: redükte glutatyon, GSSG: okside glutatyon NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat indirgenmiş form, $NADP^+$: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksitlenmiş form)

Diyetle alınan nitratların eritrositlerde nitroso tiyol, nitrosohemoglobin ve nitrit düzeylerini artırdığı gösterilmiştir[156]. Dolayısıyla eritrositler hem reaktif azot türlerinin üretiminde hem de tüketiminde rol alan dinamik hücrelerdir.

Eritrositler glutamat sentezlemek için üç enzim içerir: alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz(AST) ve glutamin aminohidrolaz (GA). ALT ve AST α-ketoglutarattan glutamat sentezlerken, GA glutaminden glutamat sentezler. Eritrosit zarı glutamat geçirgen olmamasına karşın hem α-ketoglutarat hem de glutamine geçirgen olduğundan, her üç mekanizma da hem hücre içi glutamat seviyelerini ve hem de

glutamattan sentezlenen GSH seviyelerini etkiler[158].GSH eritrosit içinde sentezlenir. Eritrositlerde diğer redoks moleküllerinin miktarları hücre dışı kaynaklara bağlıyken yalnızca GSH hücre içinde sentezlenir. Eritrositlerde en yüksek konsantrasyonda bulunan molekül olup antioksidan korumada büyük öneme sahiptir[159, 160].

İnsan eritrositleri glutatyon sentezini desteklemek için sürekli bir glutamat desteğine ihtiyaç duyar, ancak glutamat ve aspartat eritrosit zarını geçemediğinden eritrosit dışından taşınamadığı gibi eritrosit içinden de dışına taşınamaz. Aslında glutatyon biyosentez hızı, GA'nın glutamat üretme kapasitesinden önemli ölçüde daha yüksektir. Glutatyon biyosentezine talep, glutamat üretim hızından yaklaşık 8 kat daha yüksektir [158].

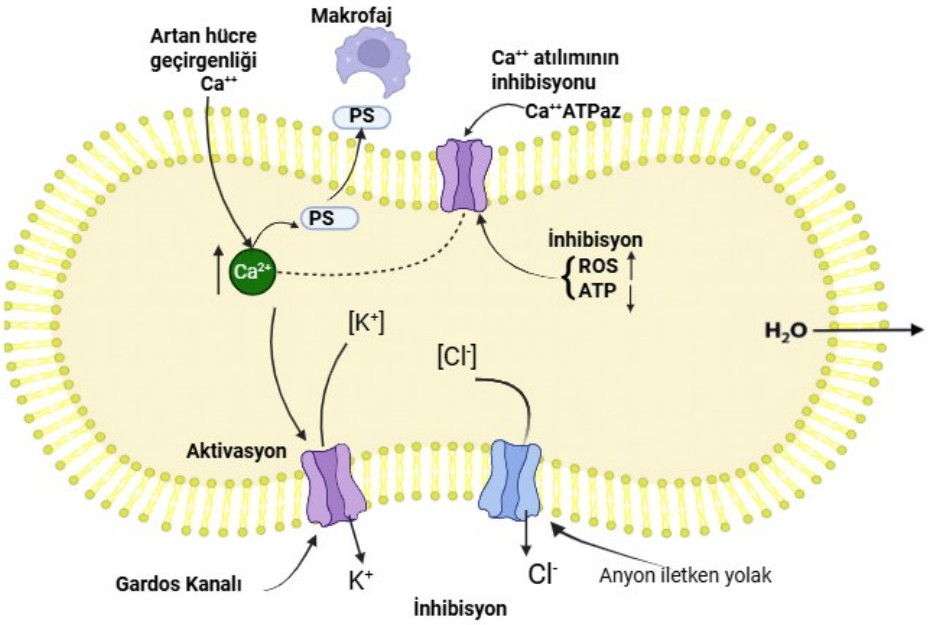
Redoks homeostazının korunması, glikoliz ve pentoz fosfat yolunun etkin olmasıyla ilişkilidir. Bu iki yol eritrositlerdeki GSH metabolizması ve detoksifikasyon sürecini korumada gerekli olan ATP, NADH ve NADPH üretimini sağlar. Glikozla beslenen glikoliz ve pentoz yolu eritrositlerde paralel olarak çalışır [161]. Eritrositlerde oksidatif stresle mücadelede, membran yapısının korunmasında ve fizyolojik fonksiyonların devamının sağlanmasında redoks homeostazı kritik öneme sahiptir.

Eritrosit deformabilitesi, eritrositlerin damarlardan geçebilmek için esnek yapısını koruması ve şekil değiştirip eski haline dönebilme yeteneğini ifade eder. Oksidatif stresin membran proteinlerinde meydana getirdiği hasar, eritrosit biçimini etkiler [162]. Eritrosit membranı iyon pompaları, kanallar ve taşıyıcılar gibi pek çok işlevi olan protein içerir. Bunlar arasında GLUT1 , akuaporinler, band3, çoklu ilaç direnç proteini 1 (MRP1), kalsiyum pompası ve sodyum-potasyum pompası oksidatif strese bağlı eritrosit bütünlüğünü ve yaşam süresini etkileyen en önemli membran proteinleridir [129]. Eritrositlerde GLUT1 plazmadan glikoz taşınmasından sorumludur[163]. GLUT1'in glikoza affinitesi oldukça yüksektir ve beyin gibi glikoz tüketen organlara taşınması büyük önem taşır[164]. Akuaporinler eritrositlerde su taşınmasını sağlar ve H_2O_2'nin plazmadan difüzyonunu kolaylaştırır[165]. Band3 eritrosit zarında en bol bulunan protein olup Cl^- anyonu ile bikarbonatın değişiminden sorumludur. Hem kan pH dengesinin hem de eritrosit zar bütünlüğünün korunmasında rol oynar[166]. MRP1 ATP kullanarak GSSG'nin eritrosit dışına taşınmasında rol oynar. Devam eden oksidatif stres durumunda hücre içinde azalan GSSG'nin GSH'a dönüşümünün ve sonuçta eritrosit membran korumasının azalması nedeniyle hemolize duyarlılık artar [167]. Kalsiyum ve sodyum-potasyum pompaları ATP kullanarak ozmotik basıncın azalmasını ve

eritrositin deforme olmasını engeller [168, 169]. Eritrositlerin mekanik strese maruz kalması, iyon kanal proteini Piezo1 aracılığıyla hücre içi Ca^{2+} akışını artırır[170]. Potasyumun dışarı akışı, membrandaki K-Cl taşıyıcılar ve KCNN4 olarak da bilinen ve kalsiyuma duyarlı Gardos kanalları tarafından kolaylaştırılır[171]. Piezo1, kalsiyumun eritrosite girmesine izin vererek Gardos kanallarının aktivasyonunu tetikler, bu da potasyumun dışarı akışını ve su kaybını sağlar[172]. Bu nedenle Gardos kanalları ve Piezo1, eritrositlerin fonksiyonu ve ömrü için yaşamsal öneme sahip olan osmotik basınç ve hücre hacminin korunmasında kritik rol oynayan proteinlerdir[173].

Eritrositlerde oksidatif stresin etkisi; lipit peroksidasyonu sonucu membran lipit ve proteinlerinin yapısının bozulması ve membran bütünlüğünü bozulması şeklinde ortaya çıkar. Membran bütünlüğünün bozularak zarın sertleşmesi ve osmotik dengenin bozulması hemolize ve son olarak eritrosit ölümüne yol açabilir [174]. Apoptoz ile eritrosit ölümü arasındaki temel fark, eritrositte organel bulunmaması ve eriptozun odak noktasının eritrosit zarı olmasıdır[175].

Eritrosit zarındaki kolesterol hidrofobiktir ve esterleşmemiş bir formda serbest halde bulunur. Fosfolipit kristalleşmesine ve çift tabakanın sertleşmesine yol açabilecek stres koşulları altında dahi zar akışkanlığını kontrol eder. Fosfolipitler membranda asimetrik olarak yerleşmiştir. Fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin iç tabakada, sfingomielin ve fosfatidilkolin ise dışta bulunur. Asimetrik hemostazın korunmasından flipaz ve flopaz enzimleri sorumludur. Flipazlar, fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamini aktif olarak iç kısma taşırken, flopazlar dış katmana taşınmasından sorumludur [122]. Eritrosit membranı genellikle düşük kanal aktivitesi gösterir ve başlıca klorür iyonuna (Cl^-) geçirgendir. Ancak osmotik büzülme, oksidatif stres, enerji tükenmesi gibi durumlar seçici olmayan katyon kanalları açar. Bu durum Ca^{2+} ve tek değerli katyonların (Na^+) girişine ve GSH düzeyinin azalmasına yol açar [176]. Eritrositlerde Ca^{2+} kanalları ve Ca^{2+} tarafından düzenlenen kanalla; Gardos kanalı, seçici olmayan voltaj bağımlı katyon kanalı, Piezo1, NMDA reseptörü, VDAC, TRPC kanalları, $Ca_V2.1$'dir. Bunlar arasında Gardos kanalı ve Piezo1 eritrosit zarındaki en iyi bilinen iyon kanallarıdır [177].



Resim 2.2. Eritrosite kalsiyumun transportu (Rifkind ve Nagababu, 2013'ten uyarlanmıştır[178]) Artan membran geçirgenliği sonucu hücre içine Ca^{2+} girişi artar. Yükselen intraeritrositer Ca^{2+} düzeyi Gardos kanalını aktive ederek K^+ kaybına yol açar; ROS artışı Ca^{2+} birikimini güçlendirir. Hücrede iyon kaybı ve su çıkışı büzüşmeye neden olur. Artan Ca^{2+}, fosfatidilserinin (PS) dış yüzeye taşınmasını tetikleyerek makrofajlar tarafından tanınmayı ve eritrosit fagositozunu sağlar. (PS: fosfatidilserin; ROS: reaktif oksijen türleri, ATP: Adenozin Trifosfat)

Hücre içi Ca^{2+} artışı membranın rastgele dağılımını ve kaybını teşvik eden eritrosit fosfatidilserinin dışsallaşmasına yol açan eritrosit scramblazın uyarılmasına neden olur [179]. Son olarak Gardos kanalı aktivasyonu hücre içi K^+ konsantrasyonunun azalmasına yol açar. Bu konsantrasyon azalması, dış yüzeyde fosfatidilserin maruziyetini hızlandırır ve hemolizi geciktirir. ROS'ndeki artış eritrosit zarının yırtılarak Hb'nin seruma salınmasıyla hızlı hemolizi tetikler. Çok miktarda serbest Hb böbrek tübülerinde birikerek çökebilir böylece böbrek fonksiyonları bozulabilir [179]. Hemoliz meydana gelmeden önce eriptozun tetiklenmesi, eritrositleri temizlemek için önemli bir mekanizmadır [176].

Fosfatidilserinin dışsallaşması, eritrositlerin makrofajlar tarafından tanınması ve temizlenmesine yol açar [175]. Eriptoz hücre küçülmesi, membranda değişiklikler ve moleküllerin bozulmasıyla karakterize, fosfatidilserinin dışsallaşması ile sonuçlanan bir hücre ölümü sürecidir[180, 181]. Membran hasarı ile ilişkili olarak; reaktif türlerin kaspaz-3 aktivasyonu sonucu band3'ün yıkımına [182] ve membran zarının iç yüzeyindeki fostatidilserinin hücre dışına çıkmasına[183] neden olduğu görülmüştür. Oksidatif stresin

neden olduğu Gardos kanal ve Piezo1 düzensizliği; eriptozu tetikleyen hücre için Ca^{2+} seviyelerinin artmasına yol açabilir[184]. Eritrositlerde cıva maruziyetinin Gardos kanallarının geçici aktivasyonuna, eritrosit K^+ kaybına ve su çıkışına bağlı sonuç eritrosit büzülmesine ve eritrosit dış yüzeyinde fosfatidilserin maruziyetine yol açtığı görülmüştür[185].

2.5. Eritrosit ve Metil Cıva Toksisitesi

Eritrositlerin ksenobiyotiklere ve bunlar arasında ağır metallere maruziyeti sonrası meydana gelen oksidatif hasar; lipit peroksidasyonu ve protein yapı değişiklikleri sonucu membran bütünlüğünün ve fonksiyonunun bozulmasına, sonuç olarak hücrelerin hemolizine neden olmaktadır [186]. Sıçan eritrositlerinde yapılan çalışmada MeHg alımına yönelik iki aşamalı bir model geliştirilmiştir; MeHg-Cys, MeHg-merkaptoalbumin, MeHg-GSH kompleksleri ve bunların karışımlarının hücre içine alınma kinetiği incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar MeHg komplekslerinin MeHg-Cys alımının kolaylaştırdığını, üç bileşiğin karışımları arasında en yavaş hızda MeHg-Cys alımının gerçekleştiğini göstermiştir[187]. MeHg'nin eritrositlere alımında rol oynayan mekanizmaların organik anyon taşıyıcılar, kolaylaştırılmış D-glikoz taşıma sistemi, sisteinle kolaylaştırılmış taşıma, Cl^- iyon taşıyıcısı aracılığıyla olabileceği düşünülmektedir [188]. MeHg'nin sistein gibi -SH grubu içeren tiyol bileşiklerine affinitesi olduğu bilinmektedir. MeHg'nin hücredeki durumu bu bağlanmadan sonra kısmen sisteinin metabolizmasıyla ilişkilidir [189]. Wu'nun ratlarda MeHg ve tiyol kongujatlarının (MeHg-Cys, MeHg-GSH) eritrositlerde alım mekanizmaları üzerine yaptığı çalışmalar; MeHg alımında tek bir taşıyıcı değil, birden fazla transport sisteminin rol aldığını ortaya koymuştur[189-191]. Wu'nun rat eritrositlerinde yapılan çalışmalarında; MeHg-Cys ve MeHg-GSH konjugatlarının başlıca probenesid ile inhibe edilen organik anyon taşıma sistemi aracılığıyla, sıcaklık bağımlı olarak alındığı görülmüştür. Bunun yanında, sitoklasin B'ye duyarlı kolaylaştırılmış D-glukoz taşıma sistemi, Ca^{2+}, oubain ve Na^+-Mg^{+2} iyon dengesine duyarlı ve ATP bağımlı taşıma sistemlerinin de MeHg–Cys kompleksinin taşınmasında rol oynayan alım yolakları olduğu gösterilmiştir[189]. MeHg'nin kanda 0,1 mM maruziyetinde eritrositler ve plazma arasındaki dağılımı ve eritrositlerden plazmaya ve tiyol grubu içermeyen ortama salınımı in vitro olarak incelendiğinde; MeHg'nin %98,1'i eritrositlerde, %1,9'u ise plazmada bulunmuştur. İntraselüler MeHg'nin yalnızca %0,6'sının zarlara bağlandığı tespit edilmiştir [192]. Bu nedenle eritrositlerdeki toplam cıva yükü MeHg maruziyetinin bir ölçütü olarak da kullanılır, çünkü tam kandaki MeHg büyük oranda

eritrositlerde birikmektedir [12]. MeHg'nin safra üzerinden GSH konjugatları şeklinde atılımı nedeniyle[24], GSH senteziyle ilişkili genlerin polimorfizmi ve bireyler arası farklılıklar MeHg birikimini ve atılım kapasitesini etkileyebilir [193]. MeHg merkezinde içerdiği pozitif yüklü Hg^{+} atomu nedeniyle, elektronlara yüksek bağlanma eğilimi gösterir. Bu nedenle nükleofilik merkezi olan selenol (-SeH) veya tiyol (-SH) grup taşıyan enzimler ve GSH, MeHg toksisitesinden etkilenen temel moleküler hedeflerdir [194]. Cıvaya maruz kalan insan eritrositlerinde protein ve lipit oksidasyonu ile ilişkili olarak protein karbonil düzeyi ve tiyobarbarbitürik asit reaktif bileşiklerinin (TBARS) düzeylerinin arttığı ancak GSH seviyelerinin ve GSH ilişkili GPx, GR, glutatyon-S-transferaz, G6PD enzimlerinin aktivitelerinin azaldığı görülmüştür [195].

Günlük balık tüketimiyle maruz kalınan dozlarda MeHg uygulanan Wistar ratlarında eritrosit GPx ve GSH seviyelerinin sırasıyla %12 ve %17 düştüğü tespit edilmiştir [196]. İnsan eritrositlerinde *in vitro* Hg maruziyeti sonucu oksidatif stres göstergesi olarak malondialdehit (MDA) düzeylerinde artış ve eritrosit SOD, CAT ve GPx aktivitelerinde düşüş görülmüştür [197]. Kronik cıvaya maruz kalan işçilerde eritrosit antioksidan sistemindeki değişiklikler incelendiğinde, hala maruz kalan işçilerde kontrol grubuna kıyasla, GSH düzeyleri daha düşük ve Cat aktivitesi daha yüksek olarak gözlemlenmiştir [198]. Mesleki cıva maruziyetiyle ilişkili olarak; insan eritrositlerinde antioksidan enzim aktivitesi incelendiğinde G6PD, GR, SOD aktivitesinin sırasıyla %23,9; %18,8 ve %5 azaldığı tespit edilmiştir [199]. Memeli eritrositlerinde hücre içi antioksidan GSH düzeyleri ve SOD, GPx etkinliğinin eritrositlerin ömrünü belirlemede etkisi olduğu, eritrosit ömrü ile pozitif bir korelasyon ilişkisi olabileceği düşünülmektedir [200]. Balık eritrositlerinde metal maruziyeti doza bağlı olarak incelendiğinde kadmiyum (Cd), kurşun(Pb) ve arsenik (As) arasında en yüksek toksik etki en düşük EC50 değeriyle cıvaya bağlı olarak gelişmiştir. Cıva maruziyeti sonrasında eritrositlerde ROS üretiminin arttığı, antioksidan enzimlerinden GR, Cat ve SOD gen ifadesinde önemli ölçüde artış görülmüştür. Bununla beraber deniz levreği eritrositlerinde MeHg'ye maruz kalma, eriptoz sürecinde etkili olabilecek μ-kalpain, (calp1) mRNA transkripsiyonunda bir artış meydana getirmiştir [201].

GSH; glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinin glutamilsistein ligaz ve GSH sentetaz enzimleri tarafından katalize edilen reaksiyonlar sonucu sentezlenir. Glutamin, NADPH üretimi sürecinde GSH'ın substratı olan glutamata metabolize edilir ve hücre içi NADPH'yi koruyarak antioksidan bir rol oynar [202]. Bu da onu GSH homeostazı için önemli bir amino

asit haline getirir. Hücre içi azalan GSH ve glutamin seviyeleri redoks ortamındaki değişikliklere katkıda bulunarak eritrosit bütünlüğünü tehlikeye atar ve hemolize yol açabilir[203]. Mevcut veriler, cıvanın antioksidan savunma sisteminde rol oynayan enzimlerin/enzimatik olmayan proteinlerin veya serbest radikal temizleyicilerin işlevini bozarak antioksidan kapasiteyi azalttığı ve hücre içi ortamın oksidatif olmaya daha yatkın hale geldiği fikrini desteklemektedir [136].

2.5.1. Eritrosit iyonotropik membran reseptörleri ve hemoliz

Eritrositlerde hemolizde rol oynayan başlıca iyonotropik membran reseptörleri AMPA ve NMDA reseptörleridir. Eritrosit ömrünün sınırlı olması çekirdek eksikliğinden kaynaklanır. Çekirdek eksikliğinin diğer önemli sonucu da düzenli apoptoza uğramamalarıdır. Hemolize yol açan hacim artışının öncesinde belirgin eritrosit küçülmesinin yaşandığı iki fazlı hacim değişikliği söz konusudur. Eritrosit hacminin küçülmesi eritrosit içine Ca^{2+} akışıyla tetiklenir. Bu Ca^{2+} akışı, Ca^{2+}'ya duyarlı K^+ ve Cl^- kanallarını aktive eder. Hasara uğrayan eritrositler fagositozu tetikler ve bunların kan dolaşımından atılması hızlanır, dolayısı ile intravasküler hemoliz önlenir [204]. Eritrosit membranında eksprese edilen AMPA reseptörleri GluA1-GluA4 olmak üzere dört farklı alt birimden oluşan heteromerik katyon kanallarıdır. Eğer bunlarda GluA1 ve GluA2 ekspresyonu olmazsa, AMPA reseptörleri sadece Ca^{2+} geçirgen katyon kanalları olarak işlev görür. Eritrositlerde, Ca^{2+} geçirgen katyon kanallarının aktivasyonu, hücre büzülmesi ve hücre zarının bozulması ve ardından hücre yüzeyinde fosfatidilserin açığa çıkmasıyla karakterize olan eritrosit ölümü ile sonuçlanır.

Farmakolojik olarak AMPA reseptör inhibisyonu, insan eritrositlerine Ca^{2+} girişini değiştirerek eritrosit ölümünü önler [5].

Eritrositlerde, Ca^{2+} geçirgen katyon kanallarının eksprese edilmesi ve bu kanalların aşırı aktivasyonu, eritrosit yüzeyinde fosfatidilserin açığa çıkmasıyla karakterize olan eritrosit ölümünü tetikler [176, 205-207]. NMDA reseptörleri ligand-voltaj bağımlı, seçici olmayan iyon kanalı özelliğine sahip birden fazla alt üniteden oluşan kompleks bir yapıdır. Bu alt üniteler, reseptör aktivitesini değiştiren, endojen ve eksojen ligandlar aracılığıyla düzenlenen farklı bağlanma bölgeleri içerir [208]. Reseptör aktivasyonu için endojen ko-ligand glisin (veya D-serin) glutamatın reseptöre etkin bir biçimde bağlanması için gereklidir ve bu da kanalı açan konformasyonel değişikliklere yol açar [209]. Glutamata ek olarak

homosistein, homosisteik asit de gibi diğer agonistlerin bağlanması da Ca^{2+} alımını tetikler [210]. Reseptör aktivitesi ayrıca voltaj bağımlı bağlanma bölgesi tarafından kontrol edilir. Mg^{2+} hiperpolarize durumda iyon geçişini engellerken, membran depolarize olduğunda bu blokaj ortadan kalkar ve iyon akışı gerçekleşir [209]. Kanalların Ca^{2+} geçirgenliği, Na^{+} veya K^{+} katyonlarına göre 10 kat daha yüksektir[211]. Bu nedenle NMDA reseptörlerinin hem aktivasyon hem inaktivasyonu hücre içi Ca^{2+} seviyelerindeki değişikliklerle bağlantılıdır. NMDA reseptörlerinin bir diğer önemli özelliği redoks durumuna duyarlı olmasıdır. Peroksinitrit ve süperoksit gibi reaktif türler, reseptördeki sülfidril gruplarını etkileyerek reseptörün aşırı uyarılmasına veya duyarsızlaşmasına neden olur [212]. MeHg maruziyeti gibi oksidatif stresin attığı durumlarda NMDA reseptörünün aktivasyonunun değişmesi, hücre içi Ca^{2+} girişinin artarak ROS üretiminin tetiklenmesine yol açabilir. MeHg'nin neden olduğu aşırı ROS oluşumu amino asit taşıyıcılarının inhibisyonuna neden olur [213]. NMDA reseptör antagonistleri ile in vitro muamele edilen hücre dizilerinde MeHg kaynaklı ROS üretiminin engellendiği gösterilmiştir [214]. Bu sonuçlara göre MeHg'nin neden olduğu hücresel hasara yönelik NMDA reseptörünün yüksek düzeyde Ca^{2+} geçirgenliğinin azaltılmasında, NMDA reseptör non-spesifik veya özgün antagonistlerinin kullanımını gündeme getirmiştir[215].

Nonspesifik bir NMDA reseptör antagonisti olan Memantin uygulamasının NMDA reseptör blokajı yaparak, MeHg kaynaklı oksidatif stresi azalttığı ve nöronal apoptozda önemli derece düşüş sağladığı gösterilmiştir [215]. Rat eritrositlerinde yapılan çalışmalar fonksiyonel NMDA reseptör varlığı ve etkinliğini ortaya koymuştur. Dolaşımdaki rat eritrositleri ve eritroid öncü hücrelerinde NMDA reseptörlerinin varlığı ve dağılımı immünoblotlama, immünohistokimya, akış sitometrisi ve radyoaktif ligand bağlanma analizleri ile doğrulanmıştır. Dolaşımdaki eritrosit popülasyonu içinde genç hücrelerde daha yüksek, olgun eritrositlerde ise daha düşük sayıda reseptör bulunduğu tespit edilmiştir [210]. Hücrelere NMDA uygulanması hızlı bir Ca^{2+} birikimini tetiklerken hücrelerin antagonistlere maruz kalması ise tam tersine hücre içi Ca^{2+} seviyelerini düşürmüştür. NMDA reseptör agonistleri Gardos kanallarının aktivasyonuna neden olarak doza bağımlı tek yönlü K^{+} akışına ve hücre büzülmesine yol açar. K^{+} akışındaki NMDA aracılı artışın, NMDA reseptörü üzerinden hücrelere Ca^{2+} girişi, Gardos kanalı açılmasını kolaylaştırdığı için ikincil bir olay olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Gardos kanalının açılması hücre küçülmesini tetikler, bunu endotel nitrik oksit sentazın aktivasyonu izler[210]. Makhro ve ark.ları[216] tarafından insan eritrositlerinde in vitro gerçekleştirilen çalışmada fonksiyonel

NMDA reseptör varlığı gösterilmiştir. Agonistler veya antagonistler tarafından NMDA reseptör aktivitesinin modülasyonu, tüm hücre iyon akımlarındaki değişikliklere sebep olur. Olgun insan eritrositlerinde NMDA reseptörünün aktivasyonu, geçici Ca^{2+} birikimi, hücre küçülmesi ve hücre içi pH'da değişiklik ve hemoglobinin oksijen afinitesinde azalma ile sonuçlanmıştır. NMDA reseptör fonksiyonlarının yalnızca sinir sistemiyle sınırlı olmadığı; aynı zamanda eritrositlerin iyon dengesi, hücre hacmi regülasyonu ve oksijen taşıma kapasitesi üzerinde kritik bir düzenleyici rol oynadığı anlaşılmıştır [210, 216].

Mevcut bulgular MeHg kaynaklı toksisiteye aracılık etmede NMDA reseptörlerinin önemini düşündürmektedir ancak literatür taramalarında eritrositlerde NMDA reseptörlerinin MeHg toksisitesindeki rolü ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Eritrosit pentoz fosfat yolağı ve antioksidan kapasite rejenerasyonu

Eritrositler, oksijen ve karbondioksit taşımadaki ana rollerinin yanı sıra organizmanın antioksidan savunmasında da önemli bir rol oynarlar. Antioksidan kapasiteyi aşan miktarlarda reaktif oksijen türlerine (ROS) doğrudan maruz kalma, eritrosit antioksidan kapasitenin tüketimine, eritrosit membran bütünlüğünün bozulmasına ve yarı ömürlerinin %50'ye kadar kısalmasına neden olur. PPP döngüsünde substrat olan glikozun varlığı, G6PD aktivitesi ve NADPH üretilmesi oksidatif stres seviyesini etkileyebilecek faktörlerdir [217]. PPP aktivitesi oksidatif stres sırasında artar. Glikoz, glutatyonun çoğalması için gerekli miktarlarda indirgeyici kapasitenin üretimini sağlar. İnsan eritrositleri çok yüksek düzeyde GLUT1 ekspresyonu yapar. Eritrosit zarındaki GLUT1 taşıyıcısı konsantrasyonu, eritrosit içine yeterli glikoz taşınmasında son derece önemlidir. Yüksek oksidatif stres seviyeleri, glikoz metabolizmasının NADPH üreten oksidatif pentoz fosfat yoluna doğru kayması ile sonuçlanır [218]. Okside glutatyondan redükte glutatyon rejenerasyonu, NADPH ve glutatyon redüktazı gerektirir. Eritrositlerde oksidatif strese transkripsiyonel yanıt oluşturacak organeller bulunmadığından, eritrositlerin oksidatif strese verdiği yanıt $NADP^{+}$'nin NADPH'ye indirgenmesi ile ortaya çıkar [218]. "Methyl mercury and oxidative stress and pentose phosphate pathway" anahtar kelimeleri ile yaptığımız literatür taramasında bu konuda herhangi bir kaynak bulunamamıştır. "Inorganic mercury and oxidative stress and pentose phosphate pathway" anahtar kelimeleri ile yaptığımız taramada bulunan tek kaynak: $HgCl_2$'ün hemoglobindeki ferröz demirin ferrik forma oksidasyonuna sebep olduğunu ve oksijen taşıyıcı olarak inaktif olan methemoglobin oluşumuna neden

olduğunu bildirmiştir. Protein oksidasyonu, serbest amino ve sülfidril grupları ile glutatyon içeriğinde eş zamanlı bir azalma meydana geldiğini ileri sürmüştür. HgCl2'a maruz kalan eritrositlerde doz bağımlı süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, peroksinitrit ve nitrik oksit oluşumu ile antioksidan kapasite azalmış ve oksidatif stres meydana gelmiştir. Eritrositlerdeki glikoz metabolizmasının ana yolu olan pentoz fosfat yolu da inhibe edilmiştir[4].

Oksidatif stres, serbest oksijen radikalleri üretimi ile enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemler arasındaki dengesizliğin bir sonucudur. Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz eritrositlerde oksidatif stresi önlemeye çalışan enzimler arasındadır. Bu enzimlerin aktiviteleri, doğrudan veya dolaylı olarak, esas olarak pentoz fosfat yoluyla sağlanan indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın (NADPH) varlığına bağlıdır[219]. Pentoz fosfat yolu, NADPH'nin tek kaynağıdır, dolayısıyla bu hücrelerde oksidatif hasara karşı savunma mekanizması büyük ölçüde bu yola bağımlıdır. G6PD, pentoz fosfat yolunun ilk ve düzenleyici enzimidir[220]. G6PD, özellikle eritrositleri oksidatif stres hasarına karşı koruyan kritik bir enzimdir Oksidatif strese maruziyet sonrası hemoliz, eritrosit sayısında azalma ve hiperbilirubinemi, G6PD eksikliğinin belirtileridir[220]. Normal hücreler GSH havuzunun korunması için yeterli NADPH rejenerasyonuna sahiptir. Buna karşılık, G6PD eksikliği olan hücreler stresli bir durumda yeterli NADPH rejenerasyonu yapamaz ve GSH tedariki için biyosentetik yola geçer. Hızlı GSH tükenmesi, enerji krizine ve gereksiz AMPK aktivasyonuna neden olur[220].

Eritrosit NMDA reseptör blokajı oksidatif stresi önler mi?

NMDA reseptör antagonisti tarafından inhibe edilen NMDA reseptör aracılı kalsiyum girişi, eritrositlerdeki NMDA reseptörlerinin fonksiyonel bütünlüğünü göstermektedir[6]. Dolaşımdaki eritrositlerde NMDA reseptör aktivitesi, eritrositlerde NMDA reseptör aktivasyonu sonrasında ekstraselüler kompartımandan eritrosit içine Ca^{2+} transportu ile tespit edilir. Bu süreç Ca^{2+}'ya duyarlı K^{+} (Gardos) kanallarının Ca^{2+}'nın aktif NMDA reseptörü aracılığıyla alınmasıyla gerçekleşir. Eritrosit membranında NMDA ekspresyonu ve aktivitesi, hücre içi Ca^{2+}'nin korunmasına katkıda bulunur[221]. NMDA reseptörünün GluN2B alt biriminin aşırı aktivasyonu, eksitotoksisite adı verilen bir süreç yoluyla oksidatif stresin gelişmesi ve hücre hasarına yol açar. NMDA reseptörü aktive edildiğinde eritrosit

içine aşırı Ca^{2+} akışı sağlayan oksidatif stres ve apoptoza neden olan kalsiyuma bağlı çeşitli yolakların aktivitesini artıran voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarıdır[222]. MeHg uygulaması enzimatik olmayan (protein olmayan sülfidril) ve enzimatik (SOD ve GPx) antioksidanları azaltır; lipit, protein ve DNA'nın oksidatif hasarına neden olur. Glutamat/aspartat taşıyıcısı (GLAST) ve glutamat taşıyıcısı-1'in (GLT-1) MeHg maruziyetiyle inhibe olduğu görülmektedir. 5 μmol/kg dozunda memantin ile ön tedavi, MeHg kaynaklı glutamat metabolizmasındaki değişikliklerini ve oksidatif stresi önemli ölçüde önlemektedir. Sonuçlar glutamat dishomeostazının ve MeHg maruziyetinden kaynaklanan oksidatif stresin hücre hasarına katkıda bulunduğunu göstermektedir. Memantin, NMDA reseptörüne bağlanma özelliği ve dolaylı antioksidan özelliği sayesinde MeHg kaynaklı toksisiteyi hafifletme yeteneğine sahiptir [215]. NMDA reseptör antagonistleri dizosilpin ve Memantin NMDA reseptörünü bloke ederek MeHg aracılı hücre ölümünü tamamen azaltır. Bu nedenle eritrositte MeHg toksisitesinin önlenmesinde, bu farmakolojik ajanların etkili olabileceği düşünülmektedir[223] Süperoksit üretimi, NADPH substratını yenileyen PPP yolağının ve NADPH oksidaz kompleksini aktive eden protein kinaz C zeta'nın inhibe edilmesiyle de engellenebilmektedir. Bu bulgular, NADPH oksidazın NMDA kaynaklı süperoksit üretiminin birincil kaynağı olduğunu göstermektedir[224]. Yapılan literatür taramasında cıva maruziyetine bağlı hemolizde NMDA reseptör aracılı oksidatif stresin önlenmesi konusunda herhangi bir çalışma bulunmamakla birlikte nöronlarda nonspesifik antagonistlerle yapılan çalışmalar, terapötik dozlarda NMDA reseptör antagonistleri kullanılmasının eritrositte oksidatif stresi ve hemolizin önlenmesi konusunda faydalı olabileceğini düşündürmektedir.

Klinik uygulamada bipolar depresyon için birinci basamak tedavi olarak önerilen Lityum özgün bir NMDA reseptör GluN2B alt ünite antagonistidir [225, 226]. Yaygın olarak kullanılan bu antipsikotik ilaç hücre içi Ca^{2+} dengesini düzenler [227]. Dolayısı ile NMDA reseptör/NO sinyallemesi, periferik dokularda lityum kaynaklı yanıtlarla modüle edilebilir[228].
Lityumun NMDA reseptör aracılı Ca^{2+} girişindeki azalma, NR2B tirozin fosforilasyonunun azalmasıyla düzenlenebileceğinden lityumun glutamaterjik eksitotoksisiteye karşı koruyucu bir etki gösterebileceği düşünülmektedir [229, 230].

Toplam Hg seviyelerinin yükselmesi, glutamat metabolizmasının bozulması, NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılması ve aşırı reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu için kritik

olabilecek hücre içi kalsiyumun aşırı yüklenmesine yol açmaktadır [215]. NMDA reseptörünün uyarılması NMDA reseptör/NO yolağı aracılığı ile NO düzeyini artırır. Buna karşılık, NO düzeyi lityum ve glutamatın birlikte verilmesi ile büyük ölçüde azalır. Bu bulgular, lityumun NMDA reseptör uyarısını öncelikli olarak bloke ettiğini göstermektedir [231]. Buna ek olarak lityum klorür Ca^{2+} aşırı yüklenmesine bağlı hasarı, endoplasmik retikulumdan inositol 3-fosfat duyarlı Ca^{2+} serbestleşmesini inhibe ederek önlemektedir [232]. "Methyl mercury and lithium and erythrocyte" anahtar kelimelerle yapılan son 20 yıllık literatür taramasında, bu konuda tezden kaynaklanan poster sunumu olan "N. Ateş, A.B. Engin, O. Alp, A. Engin. Effect of glutamate homeostasis and N-methyl-D-aspartate receptor modulation on methyl mercury toxicity. Toxicology Letters, Volume 411, Supplement, September 2025, Page S432" dışında herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Yukarıda belirtilen çalışmada: İnsan eritrositlerinde MeHg ile NMDA reseptörünün aşırı uyarılmasının, Ca^{2+} aşırı yüklenmesine ve oksidatif strese yol açarak hemolize sebep olduğu ve terapötik dozda lityumun NMDA reseptörünün GluN2B alt ünitesini bloke ederek eritrositleri MeHg kaynaklı oksidatif stresten kısmen koruduğu gösterilmiştir. Bu çalışma, NMDA reseptör inhibisyonunun cıva kaynaklı toksisiteden korunmada yeni bir yöntemi ortaya koyan özgün bir araştırmadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Biyolojik Örneklerin Temini

Çalışmaya dâhil olan 12 sağlıklı gönüllü, bilgilendirilmiş onam formunu kabul eden benzer yaşlarda kadın (n=9) ve erkek (n=3) bireylerden oluşmaktadır. Kanda indüktif eşleştirilmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS) ile ölçülen MeHg miktarı toksik düzeyde olan, mesleki olarak cıvaya maruz kaldığı bilinen, herhangi bir enfeksiyon, malignite ve bağışıklık sistemi bozukluğunu içeren hastalıklardan birinin tespit edildiği bireyler çalışmaya dâhil edilmedi. Tez çalışmasına ait etik kurul onayı Gazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 17.01.2025 tarihli 069 karar no ile alındı. Etik kurul onay yazısı Ek-1'de yer almaktadır. Gönüllülere ait cinsiyet, yaş, herhangi bir hastalığının olup olmadığı, ilaç ya da vitamin takviyesi kullanıp kullanmadığı, aile hikâyelerine ait kısa bilgiler ve sigara-alkol kullanımı olup olmadığına dair bilgileri içeren, Ek-3'te yer alan Gönüllü Anket Formları doldurulduu. Kişilere çalışmanın konusu, kan örneklerinin alınma gerekçesi ve ne amaçla kullanılacağının anlaşılır bir dille açıklandığı Gönüllü Onam Formu Ek-2'de sunulmuştur. Çalışmaya dâhil edilen gönüllülerden 10 ml venöz kan örneği steril sodyum heparin içeren tüplere alındı ve analizler en kısa sürede gerçekleştirildi.

3.2. Deney Tasarımı

Çalışmaya dâhil edilme ölçütlerine uyan sağlıklı gönüllülerden sodyum heparinli tüplere alınan tam kan örneklerine maddelerin maruziyeti *in vitro* olarak yapıldı. *In vitro* deneylerde 3 ve üzeri bireyde toplanan kanlarla yapılan triplike çalışmalar istatistiksel olarak yeterli örneklem büyüklüğü oluşturmaktadır [233-237]. Bu nedenle çalışmamız 12 sağlıklı gönüllüden alınan örneklerle gerçekleştirildi.

3.2.1.Ön deneyler

Ön çalışmada gönüllülerden (n=4) alınan kan örnekleriyle ön deneyler yapıldı ve elde edilen verilerden hareketle asıl çalışmaya ait inkübasyon süreleri ile MeHg dozları belirlendi.

İnkübasyon süresi ön deneyleri

İlk olarak inkübasyon süresinin belirlenmesi amacıyla iki gönüllüden alınan tam kan örnekleri herhangi bir madde maruziyeti gerçekleştirilmeden 5 tekrarla 6-24-48 saat, 37ºC'de inkübe edildi. 6-24 ve 48 saatlik her bir inkübasyon süresi sonunda örnekler 1000x g'de santrifüj edilerek, plazma ve eritrositleri ayrıldı. Oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla plazmada glutatyon [238], nitrik oksit [239] ve % hemoliz [240] oranları spektrofotometrik olarak tayin edildi. Bu deneylerden elde edilen sonuçlara göre MeHg dozlarının belirleneceği ön deneyler için 6 saat inkübasyon süresine karar verildi.

MeHg doz belirleme ön deneyleri

MeHg doz gruplarının belirlenmesi amacıyla sınırlı bir örneklemde (n=3) literatürde yapılan çalışmalarda insanlarda tam kanda bulunduğu gösterilmiş MeHg dozları (2,5-5-10-50-100 µg/L)[2, 241-243] ile bir ön çalışma gerçekleştirildi. Ön çalışmada gönüllülerden sodyum heparinli tüplere alınan tam kan kısımlara bölündü. Kan örneklerinin bir kısmında MeHg dozları tek başına, diğer kısmında NMDA pan reseptör blokörü Li_2CO_3 (1 mM) terapötik dozda [244, 245] ilave edildikten sonra aynı MeHg dozları ile kombinasyon halinde 6 saat 37ºC'de inkübe edildi. Hiçbir madde ilave edilmeyen tam kan kontrol grubunu oluşturdu. İnkübasyon süresi sonunda örnekler 1000x g'de santrifüj edilerek, plazma ve eritrositleri ayrıldı. Oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla plazmada glutatyon [238], nitrik oksit[239] ve eritrositlerdeki membran hasarını değerlendirmek için hemoliz oranları spektrofotometrik[240] olarak ölçüldü.

Çizelge 3.1. Ön deneylerin MeHg doz belirleme çalışma planı

Kontrol
2,5 µg/mL MeHg
5 µg/mL MeHg
10 µg/mL MeHg
50 µg/mL MeHg
100 µg/mL MeHg
1 mM Li_2CO_3
2,5 µg/mL MeHg + 1 mM Li_2CO_3
5 µg/mL MeHg + 1 mM Li_2CO_3
10 µg/mL MeHg + 1 mM Li_2CO_3
50 µg/mL MeHg + 1 mM Li_2CO_3
100 µg/mL MeHg + 1 mM Li_2CO_3

3.2.2. Asıl doz grupları deneyleri

Ön çalışmadan elde edilen ön bulgulara dayanarak, asıl çalışma dozları MeHg için 2,5 µg/mL - 5 µg/mL -10 µg/mL ve Li_2CO_3 için terapötik doz 1,2 mM [244, 245] belirlenerek 6 saat ve 24 saat inkübasyon süresinde çalışılmasına karar verildi. Ön deneylerde yapıldığı gibi gönüllülerden sodyum heparinli tüplere alınan tam kan kısımlara bölündü. Kan örneklerinin bir kısmında MeHg dozları tek başına, diğer kısmında Li_2CO_3 ilave edildikten sonra aynı MeHg dozları ile kombinasyon halinde 37ºC'de inkübe edildi. Ayrıca hiçbir madde ilave edilmeyen tam kan ve yalnızca 1,2 mM Li_2CO_3 ilave edilen tam kan aynı sürede maruz bırakılarak gruplar oluşturuldu. İnkübasyon süresi sonunda örnekler 1000x g'de santrifüj edilerek, plazma ve eritrositleri ayrıldı. GSH miktarı Beutler ve ark.'nın [238] yöntemi modifiye edilerek, plazma [NOx] miktarı Miranda ve ark.'nın [239] modifiye yöntemiyle spektrofotometrik olarak saptandı. %Hemoliz Tungjai ve ark.'nın [240] yöntemiyle, toplam kalsiyum (tCa) düzeyleri ise 5-nitro-5'metil-[1,2bis(o-aminofenoksi)etan-N,N,N',N'-tetraasetik asit] (NM-BAPTA) yöntemi[246] ile spektrofotometrik olarak ile belirlendi.

Kullanılan örnek ve çözelti miktarları:

- Kullanılan örnek: 1 mL tam kan (sodyum heparinli)
- Seyreltme: 50 µL stok çözelti (MeHgCl/ Li_2CO_3) + 50 µL PBS → 1/10 seyreltme
- Toplam hacim: 1,1 mL (kan + çözeltiler)
- Kontrol grupları: 1 mL kan + 100 µL PBS
  1 mL kan + 50 µL PBS + 50 µL Li_2CO_3 (1,2 mM)

Çizelge 3.2. Asıl deneylere ait 6 ve 24 saat inkübasyonda çalışma planı

Kontrol
2,5 µg/mL MeHg
5 µg/mL MeHg
10 µg/mL MeHg
1,2 mM Li_2CO_3
2,5 µg/mL MeHg + 1,2 mM Li_2CO_3
5 µg/mL MeHg + 1,2 mM Li_2CO_3
10 µg/mL MeHg + 1,2 mM Li_2CO_3

3.3. Analiz Yöntemleri

3.3.1. Cıva düzeyleri tayini

Deneyler gerçekleştirilmeden önce çalışmaya dâhil edilen sağlıklı gönüllülerden alınan venöz kan örneklerinde cıva düzeylerinin tespiti yapıldı. Böylece tespit edilen cıva düzeylerine göre gönüllülerin dışlanması veya deney planının buna göre düzenlenmesi amaçlandı. Sodyum heparinli vakumlu tüplere alınan kan örneklerinin herhangi bir maruziyet gerçekleşmeyen kısmı 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve plazmaları ayrıldı. Plazma örnekleri indüktif olarak eşleştirilmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS) ile analiz edilmek üzere –20 °C'de saklandı.

Kullanılan cihaz ve malzemeler

Mikrodalga Sindirim Sistemi	(Milestone Ethos Easy, İtalya)
ICP-MS	(Agilent Technologies 7800, ABD)
Otomatik örnekleyici	(Agilent Technologies SPS 4, ABD)
Derin Dondurucu (-20ºC)	(Arçelik, Türkiye)
Ultra saf su sistemi (Milli-Q)	(Millipore, ABD)
Vorteks	(Labnet, ABD)
Santrifüj	(Hettich, Almanya)
Ayarlanabilir otomatik pipetler	(Dlab, Çin)
TFM-PTFE 100 mL sindirim kapları	(Milestone Ethos Easy, İtalya)
1,5 ml steril ependorf tüpü	
Balon jojeler 50 mL	

Kullanılan kimyasallar

Ultra saf su	(Milli-Q)
Nitrik asit (%65 HNO_3)	(Merck, Almanya)
Hidrojen peroksit (%30 H_2O_2)	(Merck, Almanya)
ICP-MS Hg standart çözeltisi (%5 HNO_3 içinde 10 mg/l)	(Labmix, Almanya)
Platin(^{195}Pt) internal standart çözeltisi	(Agilent, ABD)

Örneklerin Asitle Sindirilmesi

Analiz öncesi plazma örneklerinin sindirim işlemi kapalı basınçlı mikrodalga sisteminde gerçekleştirildi. Bu sistem, uçucu element kaybını önlemek ve organik matrisi tamamen okside etmek amacıyla yüksek sıcaklık ve basınç altında çalışmaktadır[247].

Analiz öncesi plazma örneklerinde uçucu element kaybını önlemek için kapalı basınçlı mikrodalga sistemi prensibine göre sıcaklık ve basınç programı uygulanarak sindirme işlemi gerçekleştirildi. Bu yöntem, organik içerikli biyolojik matrislerin kapalı teflon (PTFE) kaplar kullanılarak yüksek sıcaklık ve basınç altında asit karışımları ile tam çözünürlüğünün sağlanmasını amaçlamaktadır [248]. Her bir plazma örneğinden 0,45 ml alınarak önceden temizlenmiş PTFE (politetrafloroetilen) kaplar içerisinde üzerine 8 ml derişik nitrik asit (HNO_3) ve 2 ml hidrojen peroksit (%30 H_2O_2) ilave edildi. Örneklerle beraber kimyasallardan ve ortamdan gelebilecek olası bulaşmayı belirlemek için ayrıca kör hazırlandı. Kör hazırlanırken aynı miktarda numune yerine deiyonize saf su, 8 ml derişik HNO_3 ve 2 ml %30 H_2O_2 ilave edilerek örneklerle beraber mikrodalga cihazında aynı anda işlendi. Programda sıcaklık kademeli olarak 180–200 °C'ye yükseltilerek otuz dakika sindirim işlemi sonrasında oda sıcaklığına soğutuldu. Mikrodalga cihazı çalışma parametreleri Çizelge 3.7'de belirtilmiştir. İşlem sonunda sindirilen örnekler ve kör, balon jojelerde deiyonize ultra saf su ile 50 ml'ye seyreltilerek ICP-MS analizine hazır hale getirildi.

Çizelge 3.3. Mikrodalga yaş yakma cihaz parametreleri

Güç	1500 W
Sıcaklık sensor tipi	easyTEMP temassız kızılötesi (IR)
Maximum sıcaklık	180°C
Kalış süresi	10 dk
Çıkış süresi	20 dk
Soğutma süresi	5 dk.
Basınç sensor tipi	easyTEMP
Maksimum basınç	25 bar (362,6 psi)
Tüp tipi	TFM (Modifiye edilmiş tetrafloroetilen) 100 mL

ICP-MS Analizi

Analizi yapılacak olan Hg elementini içeren bilinen derişimlerde 100, 250, 500, 1000, 2000 ppt aralığında cıva standart çözeltileri hazırlanarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Analiz için ^{201}Hg izotopu seçildi, ^{195}Pt internal standart olarak kullanıldı. Örneklerdeki total Hg tayini için 50 ml'lik balon jojelerdeki numunelerden plastik tüplere alındı, %2 HNO_3 ile asitlendirilerek cihazda okunmaya hazır hale getirildi.

3.3.2. Hemoliz oranlarının tayini

Hemoliz, eritrosit hücre zarının parçalanması veya zarar görmesi sonucunda hemoglobinin plazmaya ve çevreleyen ortama salındığının gözlemlenebilir bir göstergesidir[240]. Çalışmaya dâhil edilen sağlıklı gönüllülerden alınan venöz kan örneklerinde her bir çalışma grubuna ait kanın bir kısmı maruziyet süresi bittikten hemen sonra eritrosit hemoliz tayini için kullanıldı.

Kullanılan cihaz ve malzemeler

Etüv	(Memmert, Almanya)
Mikrosantrifüj	(Hettich, Almanya)
Ayarlanabilir otomatik pipetler	(Dlab, Çin)
Mikroplaka Okuyucu Spektrofotometre	(Molecular Devices, ABD)
Vorteks	(Labnet, ABD)
1,5 ml steril ependorf tüpü	
15 ml steril santrifüj tüpü	
96-kuyulu şeffaf düz tabanlı Mikroplaka	(Corning, ABD)
Turnusol kâğıdı	

Kullanılan kimyasallar

Sterilize edilmiş deiyonize su	
Fosfat tamponlu salin (PBS) tableti (pH 7,4)	(AFG Scientific, ABD)

Çözeltilerin hazırlanması

PBS çözeltisi

Ticari olarak satılan PBS tabletlerinden (AFG Scientific, ABD) 100 ml sterilize edilmiş distile su içerisinde bir adet çözünerek pH 7,4'te PBS çözeltisi elde edildi. Turnusol kâğıdı ile pH kontrol edildi.

Deneyin yapılışı

Çalışmamızda %hemoliz tayini için kullanılan spektrofotometrik yöntem [240], inkübasyon sonunda her numune için deney grubu ve kontrol olmak üzere iki ayrı tüpte duplike hazırlanarak aşağıdaki şekilde uygulandı.

- Deney grubu tüplerine 25 µL tam kan örneği üzerine 725 µL (pH: 7,4) PBS eklendi.
- Kontrol tüplerine 25 µL tam kan örneği üzerine 725 µL distile su eklendi.
- Tüm tüpler dikkatlice karıştırıldı.
- Numuneler 37°C'de inkübatörde 30 dakika bekletildi.
- İnkübasyon sonunda tüpler 7000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası üst sıvı (süpernatan) dikkatlice alındı ve mikroplakaya aktarılarak spektrofotometrede 415 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı.
- Hemoliz yüzdesi aşağıdaki formül ile hesaplandı:
- Hemoliz (%) = [Absorbans (PBS) / Absorbans (distile su)] × 100

3.3.3. Glutatyon Tayini

Örneklerimizde eritrositlerdeki indirgenmiş glutatyon (GSH) miktarı Beutler ve ark. tarafından tanımlanan spektrofotometrik yöntem modifiye edilerek belirlendi [238, 249]. Deney serbest sülfidril gruplarının 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB, Ellman reaktifi) ile oksidasyonuna dayanır. DTNB, sülfidril grupları ile reaksiyona girerek -SH grubunu oksitlenmiş form olan bir disülfit bağına dönüştürür. Bu reaksiyon sırasında sarı renkli bir ürün olan 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB) oluşur.

Oluşan bu molekül 412 nm'de maksimum absorbansa sahip olup bu dalga boyunda ölçülen absorbans, reaksiyon sonucu oluşan TNB miktarını ve dolayısıyla örnekteki glutatyon miktarını belirlemek için kullanılır [250].

DTNB sistein ile de glutatyon ile olduğu gibi aynı ekstinksiyon katsayısına sahip olduğundan yöntem glutatyona özgül değildir. Ancak eritrositlerde bulunan non-protein sülfidril bileşiklerinin büyük çoğunluğunu glutatyon oluşturmakta olup, diğer düşük molekül ağırlıklı tiyol bileşenleri çok küçük miktarlarda bulunmaktadır. Sonuç olarak bu durum, eritrositlerde GSH miktarının hesaplanmasında önemli bir sınırlılık oluşturmamakta ve ölçüm sonuçları güvenilir biçimde GSH düzeyini yansıtmaktadır [249].

Kullanılan cihaz ve malzemeler

Hassas terazi	(Ohaus, İsviçre)
pH metre cihazı	(Mettler Toledo, İsviçre)
Vorteks	(Labnet, ABD)
Santrifüj	(Hettich, Almanya)
Ayarlanabilir otomatik pipetler	(Dlab, Çin)
Mikro Plaka Okuyucu	(Molecular Devices, ABD)
1,5 ml eppendorf tüpü	
15 ml santrifüj tüpü	
96-kuyulu şeffaf düz tabanlı mikroplaka	(Corning, ABD)
Turnusol kâğıdı	

Kullanılan kimyasallar

Deiyonize su	(Miprolab, Türkiye)
Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)	(Serva, Almanya)
5,5’-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB)	(Serva, Almanya)
5-Sülfosasilik Asit	(Amresco, ABD)
Sodyum fosfat dibazik ($Na_2HPO_4.2H_2O$)	(Merck, Almanya)
Sodyum Fosfat monobazik ($NaH_2PO_4.2H_2O$	(Merck, Almanya)

Çözeltilerin hazırlanması

%5 Sülfosalisilik asit

100 mg sülfosalisilik asit tartıldı, 2 ml distile suda çözüldü.

1 mM EDTA içeren 0,1 M Sodyum fosfat tamponu (pH 8.0)

- 356 mg $Na_2HPO_4.2H_2O$ (sodyum fosfat dibazik) tartıldı ve 20 ml distile suda çözüldü.
- 312 mg $NaH_2PO_4.2H_2O$ (sodyum fosfat mono bazik) tartıldı ve 20 ml distile suda çözüldü.
- Çeker ocak altında sodyum fosfat dibazik 17 ml kadar behere alındı. Üzerine damla damla sodyum fosfat mono bazik karıştırılarak ilave edildi. pH metre ile eşzamanlı ölçümü yapıldı.
- 20 ml sodyum fosfat tamponunda 1 mM EDTA içerecek şekilde 5,84 mg EDTA tartıldı ve 20 ml 0,1 M sodyum fosfat tamponunda çözüldü.

10 mM DTNB

3,96 mg DTNB 1 ml 1 mM EDTA içeren 0.1 M sodyum fosfat tamponu içinde çözüldü.

Deneyin yapılışı

Glutatyonun proteinlerden ayrılması

- Protein çöktürme için 6-24-48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda numune tüpleri hafifçe altüst edilerek karıştırıldı ve homojen hale getirildi.
- Örneklerden 100 µl alındı, 900 µl distile su içeren ependorf tüpe aktarıldı. Pipetajla iyice karışması ve hemoliz olması sağlandı.
- Hemolizatlı tüpe 100 µl %5 sülfosalisilik asit ilave edildi.
- Proteinlerin çökmesi için karışım 14000 g, 15 dakika, 4ºC'de santrifüjlendi.
- Süpernatant dikkatlice toplanarak GSH tayini için kullanıldı.

Spektrofotometrik olarak GSH ölçümü

Reaksiyon ortamı için bir tüpte aşağıdaki çizelgede belirtilen miktarlarda çözeltiler karıştırılarak bu karışımdan 200 µl mikroplakaya otomatik pipetle eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübasyon sonrası spektrofotometrede 412 nm'de absorbansı okundu. Absorbans değerine karşılık Lambert-Beer yasası doğrultusunda miktarı hesaplandı.

Çizelge 3.4. GSH tayini için hazırlanan reaksiyon ortamı

0,1 M fosfat tamponu (pH 8.0)	638 µl
DTNB çözeltisi (10 mM, Ellman reaktifi)	12 µl
Süpernatan	100 µl

TNB, bu reaksiyonda üretilen renkli moleküldür ve görünür aralıkta yüksek bir molar absorptivite katsayısına sahiptir. TNB'nin molar absorptivite katsayısının başlangıçta 412 nm'de ve pH 8'de 13,600 $M^{-1}.cm^{-1}$ olduğu gösterilmiştir [251]. Sonraki çalışmalarda ise pH 7,6 ve 8,6 arasında 412 nm'de TNB'nin molar absorptivite (ekstinksiyon) katsayısının 14,150 $M^{-1}.cm^{-1}$ değeri en doğru şekilde yansıttığı görülmüştür[250].

GSH miktarı bu ekstinksiyon değeri esas alınarak Beer-Lambert yasası [252] doğrultusunda aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

A = E x l x c

A = absorbans, l = santimetre cinsinden yol uzunluğu, c = konsantrasyon (M), E = Molar absorptivite

$$\text{GSH Konsantrasyonu} = \frac{\text{Absorbans}}{14.150} \text{ x Dilüsyon faktörü}$$

Eritrosit hemolizatının işlem sırasında seyreltilme oranı dilüsyon faktörü olarak kullanıldı.Spektrofotometrik ölçüm sonucu bulunan absorbans değeri, spektrofotometredeki çözeltinin GSH konsantrasyonuyla doğru orantılıdır. Bilinmeyen numunenin konsantrasyonunu hesaplamak için, elde edilen sonuç dilüsyon faktörü ile çarpıldı.

3.3.4. Nitrit + Nitrat Tayini

Örneklerimizde plazmada total nitrit + nitrat tayini [NOx] spektrofotometrik olarak Miranda ve ark. tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek uygulandı [239]. Yöntemin prensibi NO_2^-'nin asidik koşullar altında Griess reaktifi ile reaksiyona girerek bir azo boyası oluşturmasına dayanır. Nitritin primer bir aromatik amin olan sülfanilamid ile reaksiyona girmesi ve daha sonra N-(1-naftil)etilendiamin (NED) ile diazotizasyonundan sonra ortaya çıkan bileşik, 540 nm dalga boyunda ışığı absorplayabilen bir pembe-mor renkli bir bileşiktir. Oluşan bileşiğin spektrofotometrede bu dalga boyuna karşılık okunan absorbans değeri nitrit konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak belirlenir [253]. Diazotizasyon yöntemi yalnızca nitrit iyonlarına duyarlı olduğundan nitratın VCl_3 aracılığıyla nitrite indirgenmesi sağlandı ve toplam nitrik oksit miktarı [NOx] hesaplandı.

Kullanılan cihaz ve malzemeler

Hassas terazi	(Ohaus, İsviçre)
pH metre cihazı	(Mettler Toledo, İsviçre)
Vorteks	(Labnet, ABD)
Santrifüj	(Hettich, Almanya)
Etüv	(Memmert, Almanya)
Ayarlanabilir otomatik pipetler	(Dlab, Çin)
Mikro Plaka Okuyucu	(Molecular Devices, ABD)
1,5 ml ependorf tüpü	
15 ml santrifüj tüpü	
96-kuyulu şeffaf düz tabanlı mikroplaka	(Corning, ABD)

Kullanılan kimyasallar

Deiyonize su	(Miprolab, Türkiye)
Sodyum Nitrat (NaNO3)	(Sigma-Aldrich, ABD)
%37 Hidroklorik Asit (HCI)	(Merck, Almanya)
%85 Fosforik Asit (H_3PO_4)	(Merck, Almanya)
N-(1-Naftil)etil diamin (NED)	(Sigma-Aldrich, ABD)

Sülfanilamid	(Sigma-Aldrich, ABD)
Vanadyum (III) Klorür	(Sigma-Aldrich, ABD)
Etil alkol (%96)	(Sigma-Aldrich, ABD)

Çözeltilerin hazırlanması

%5 H_3PO_4

%85'lik H_3PO_4'ten 14,12 ml alındı, 15 ml'ye distile su tamamlandı.

%1 Sülfanilamid

50 mg sülfanilamid tartıldı, 5 ml %5 H_3PO_4'te çözüldü.

%0,1 N-(1-naftil)etil diamin

5 mg NED tartıldı, 5 ml distile suda çözülmüştür.

1 N HCl

%37'lik HCl'den 0,83 ml alındı. 9,17 ml distile su üzerine HCl ilave edilerek 10 ml'ye tamamlandı.

0,05 M VCl_3

25 mg VCl_3 3,2 ml 1 N HCl'de çözüldü.

Standart $NaNO_3$ çözeltileri

10 mM stok $NaNO_3$ için 8,5 mg tartıldı ve 10 ml distile suda çözüldü.
Stok çözeltiden dilüsyonlar ile 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 µM $NaNO_3$ standart çözeltileri hazırlandı.

Deneyin yapılışı

Tüm örnekler 6-24-48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda yavaşça alt üst edildi. Örnekler daha sonra 1000x g'de 5 dakika santrifüj edildi ve plazmaları ayrıldı. Protein çöktürme için soğuk etil alkol ile serum örnekleri 1:1 oranında karıştırıldı ve 30 dakika boyunca 4ºC'de buzdolabında bekletildi. Bekleme süresi sonunda tekrar 1500x g'de örnekler santrifüj edildi ve süpernatant [NOx] tayini için kullanıldı. Uygulanan adımlar aşağıdaki gibidir:

- Nitrat standartları ve örnekler 96 kuyulu mikroplakaya 50 µl duplike olarak eklendi.
- Tüm kuyuların üzerine nitrat-nitrit indirgenmesi için önce 50 µl VCl_3 ilave edilerek 5 dakika bekletildi.
- Sonrasında Griess reaktifi oluşturmak için NED ve sülfanilamid eşit miktarda alınarak bir beherde karıştırıldı. Griess reaktifi nitrat standartları ve örneklere 50 µl eklendi.
- Mikroplaka 30 dakika 37 ºC'de karanlıkta inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda 540 nm'de her bir örnek ve standart için tekrarlanan kuyuların absorbans değerleri ölçüldü.
- Absorbans değerlerinin ortalaması alındı. Standartların absorbans ortalaması kullanılarak kalibrasyon doğrusu çizildi.
- Her bir örnekteki total nitrit miktarı kalibrasyon doğrusundan elde edilen denklem ile hesaplandı. Elde edilen değerler dilüsyon faktörü (x2) ile çarpılarak konsantrasyon mM olarak ifade edildi.

3.3.5. Total Ca^{2+} tayini

Plazma örneklerinde total kalsiyum (tCa^{2+}) düzeyleri Roche Cobas analizöründe NM-BAPTA (5-nitro-5′-metil-BAPTA) metoduna dayalı olarak spektrofotometrik olarak belirlendi. Yöntemin prensibi alkali koşullar altında 5-nitro-5'metil-[1,2bis (o-aminofenoksi)etan-N,N,N',N'-tetra asetik asit] ile kalsiyum iyonlarının reaksiyona girerek renkli bir bileşik oluşturmasına dayanır. Oluşan bu bileşik ikinci adımda EDTA (etilen diamin tetraasetik asit) reaksiyona girerek reaksiyon dengesinin Ca-EDTA kompleksi ve serbest NM-BAPTA bileşiği oluşturacak yönde kaymasına neden olur. 340 nm'de ölçülen absorbans değeriyle doğru orantılı olarak kalsiyum konsantrasyonu tespit edilir [246].

Kullanılan cihaz ve malzemeler

Derin Dondurucu (-20ºC)	(Arçelik, Türkiye)
Vorteks	(Labnet, ABD)
Santrifüj	(Hettich, Almanya)
Ayarlanabilir otomatik pipetler	(Dlab, Çin)
Calcium Gen.2 kit	(Roche, Almanya)
Modüler analizör Cobas 8000	(Hitachi, Japonya)
1,5 ml steril ependorf tüpü	

Kullanılan kimyasallar

Calcium Gen.2 kitinde kullanılan reaktifler şunlardır:
Reaktif 1 (R1): CAPSO tamponu (557 mmol/L), NM-BAPTA (2 mmol/L) pH 10.0
Reaktif 2 (R2) : EDTA (7,5 mmol/L) pH 7.3

Çözeltilerin hazırlanması

Kit içerisindeki tüm reaktifler, kullanıma hazır şekilde sunulmuştur. Reaktifler 2–8 °C'de saklandı, açıldıktan sonra hemen kullanıldı.

Deneyin yapılışı

Ölçümlerde Roche Calcium Gen.2 kiti kullanıldı. Tüm örnekler 6-24 saat inkübasyon sonrasında hafifçe karıştırılarak 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve plazma ayrıldı. Ayrılan plazma, analiz edilinceye kadar -20 °C'de saklandı ve çözündürüldükten sonra oda sıcaklığına getirilerek ölçümlere alındı. Analiz cihazına sırayla numuneler ve reaktifler (R1, R2) eklenerek elde edilen tCa sonuçları cihaz tarafından otomatik olarak mg/dl cinsinden hesaplandı.

3.4. İstatistiksel Analiz

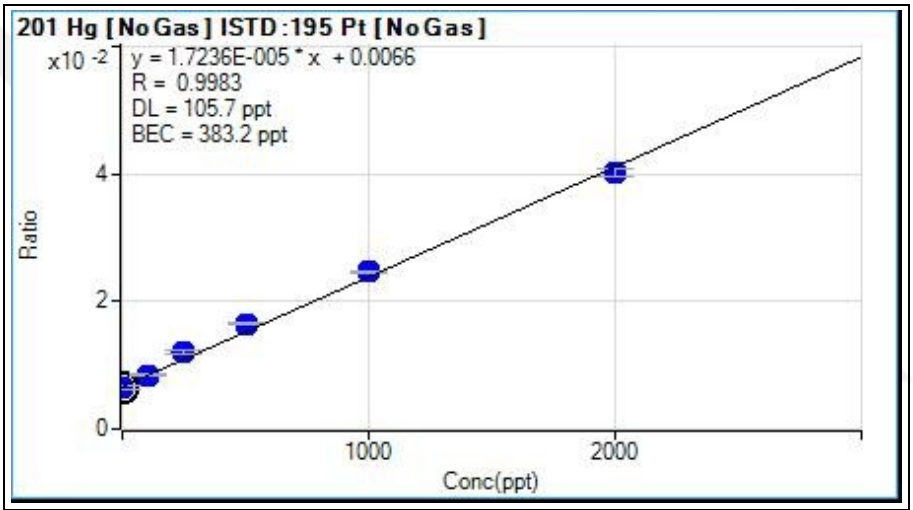
Çalışma boyunca elde edilen bütün değerler ortalama ± standart hata olarak hesaplandı. İstatistiksel analizlerde SPSS (Windows 13.0 USA) kullanıldı. Verilerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildikten sonra non-parametrik veriler için gruplar arası farkın önem kontrolü Mann-Whitney U testi ile yapıldı. İstatistiksel olarak $p<0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1. ICP-MS ile Cıva Tayini Bulguları

Çalışmamıza alınma kriterlerini taşıyan gönüllülerden alınan kan örneklerindeki cıva düzeyleri deneyler gerçekleştirilmeden önce tayin edildi. Analizi yapılacak olan Hg elementini içeren bilinen derişimlerde 100, 250, 500, 1000, 2000 ppt aralığında cıva standart çözeltileri hazırlanarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

ICP-MS kalibrasyon doğru denklemi $y = 1{,}7236 \times 10^{-5} \cdot x + 0.0066$, korelasyon katsayısı ($R^2$) 0,9983 bulundu.



Kör	<81,747(ppt)
Standart 1 (100 ppt)	84,828
Standart 2 (250 ppt)	269,497
Standart 3 (500 ppt)	480,719
Standart 4 (1000 ppt)	1116,997
Standart 5 (2000 ppt)	1944,643

Şekil 4.1 Cıva analizine ait kalibrasyon grafiği

Analiz sonucu ICP-MS Hg tespit limiti (LOD) 0,00817 ng/mL olarak saptandı. Gönüllülere ait plazma örneklerinde Hg düzeyleri Çizelge 4.1'de belirtildi.

Çizelge 4.1. Serum Örneklerinde Hg miktarları

Örnek	Konsantrasyon (ng/mL)
1	<LOD
2	< LOD
3	< LOD
4	< LOD
5	< LOD
6	< LOD
7	< LOD
8	< LOD
9	< LOD
10	< LOD
11	< LOD

ICP-MS analizinde plazma örneklerinde cıva düzeyi LOD altında bulunduğundan, herhangi bir cıva birikimi olmadığına karar verilerek çalışmaya alındı.

4.2. Ön Deney Bulguları

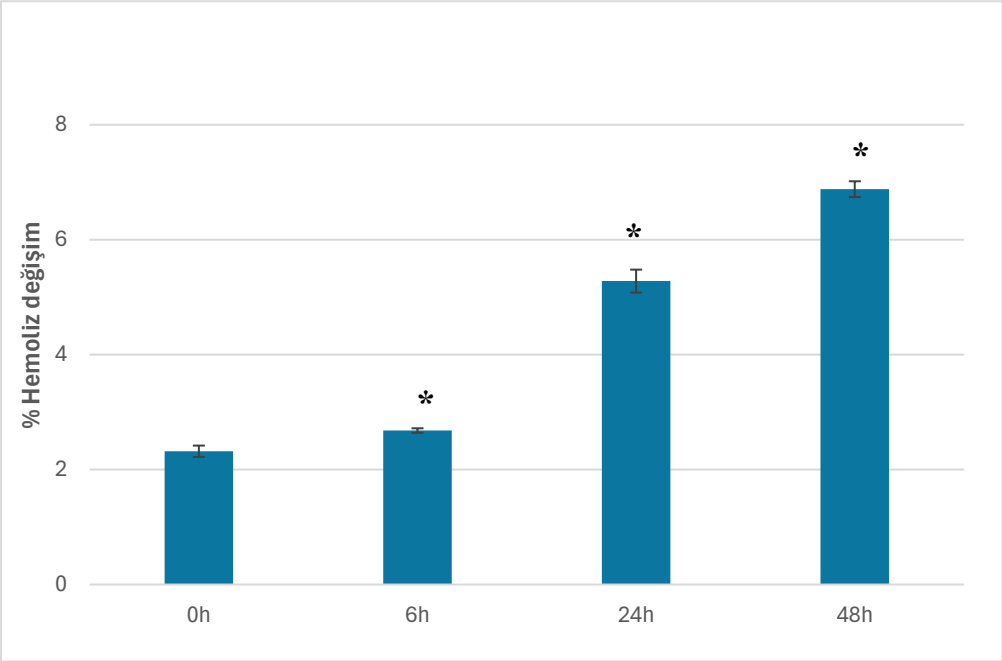
4.2.1.İnkübasyon süresi ön deney bulguları

İnkübasyon süresine karar vermek amacıyla 6-24-48 saatlik sürelerde kan örnekleri 37ºC'de inkübatörde bekletildi. Deneyler 5 kez tekrar edildi. 6-24-48 inkübasyon süreleri sonunda elde edilen hemoliz, GSH ve NOx değerleri karşılaştırıldı.

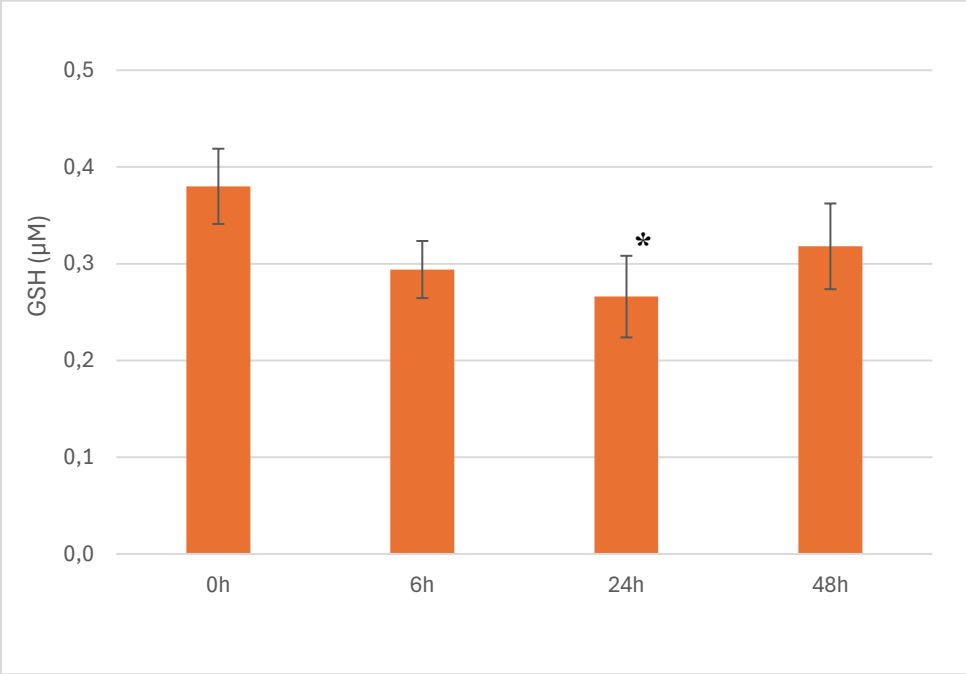
Çizelge 4.2. Zamana karşı %hemoliz, GSH, NOx ortalama ± standart hata değerleri

İnkübasyon	%Hemoliz	GSH(µM)	NOx (mM)
0 saat	2,32±0,098	0,38±0,0389	0,224±0,0216
6 saat	2,68±0,039*	0,294±0,0295	0,235±0,026
24 saat	5,28±0,200*	0,266±0,0422*	0,232±0,0248
48 saat	6,88±0,137*	0,318±0,0443	0,324±0,0445*

* 0. saat grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0,05)

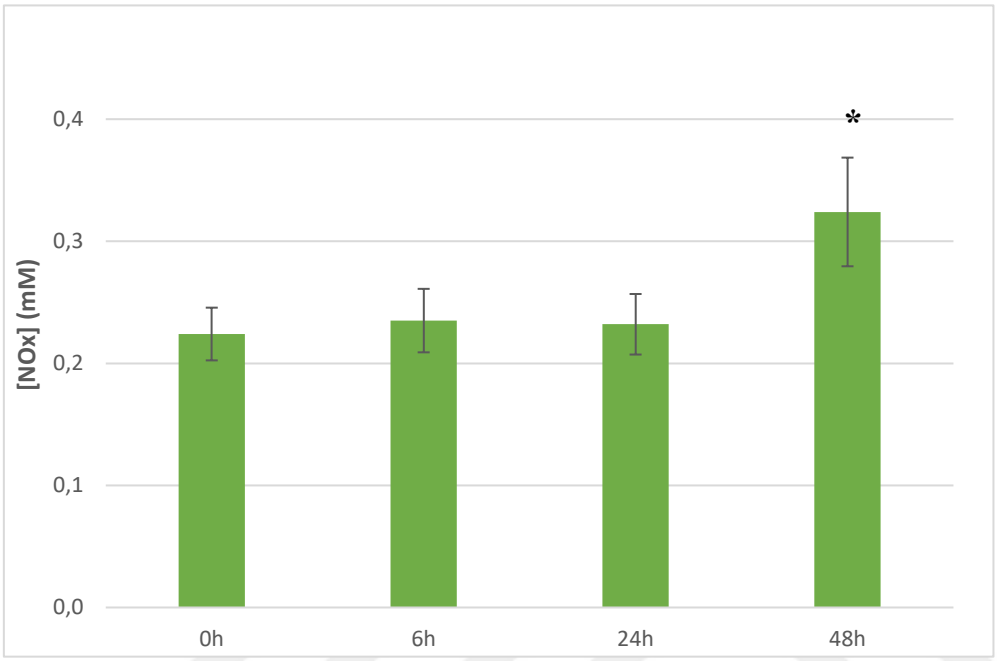


Şekil.4.2. İnkübasyon süreleri sonunda ortalama % hemoliz değerleri
* 0. saat grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0,05)



Şekil 4.3. İnkübasyon süreleri sonunda ortalama GSH (µM) değerleri
* 0. saat grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0,05)

Örneklerin kontrol grubuna göre (0. saat) 6-24-48 saatte %hemoliz değerleri incelendiğinde %hemolizde süreye bağlı olarak artış görüldü. 6. saatlik inkübasyon sonunda hemoliz %13 artarken 24 saatte %127,74, 48. saatte %183,13 artış oldu.



Şekil 4.4. İnkübasyon süreleri sonunda ortalama [NOx] (mM) değerleri
* 0. saat grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0,05)

GSH seviyeleri hemolizin artmasıyla kontrollere göre 6. saatte %13,77 azaldı, 24 saatin sonunda %31,74; 48 saat sonunda ise %12,87 düştü. [NOx] düzeyleri zamana bağlı olarak değişim gösterdi. 6. saatte %4,91; 24. saatte %3,57; 48 saatte %44,64 artış gösterdi.

Bu ön çalışmalar sonucunda *in vitro* koşullarda eritrosit GSH düzeylerinin ilk 6 saat ve 24 saat sonunda eritrositi hemolizden korumak için yeterli düzeyde olduğu tespit edildi. 48 saat sonunda eritrositin yeterli GSH miktarı kalmamasına bağlı olarak yüksek düzeyde hemoliz ve NO'in 6 ve 24 saatlerden farklı olarak %43,74 artış göstermesi nedeniyle MeHg maruziyet deneylerinde ilk 6 saat ve 24 saat sonunda GSH, hemoliz, NOx ve Ca^{2+} değerleri ölçülerek değerlendirme yapılmasına karar verildi.

4.2.2. MeHg doz belirleme ön deney bulguları

MeHg doz gruplarını belirlemek amacıyla yapılan ön çalışma tam kanda 2,5-100 µg/L geniş MeHg doz aralığı ve bunların 1 mM Li_2CO_3 ile kombinasyonları halinde uygulandı. 37ºC'de 6 saat inkübasyon sonrası elde edilen GSH, %hemoliz ve [NOx] değerleri analiz edildi.

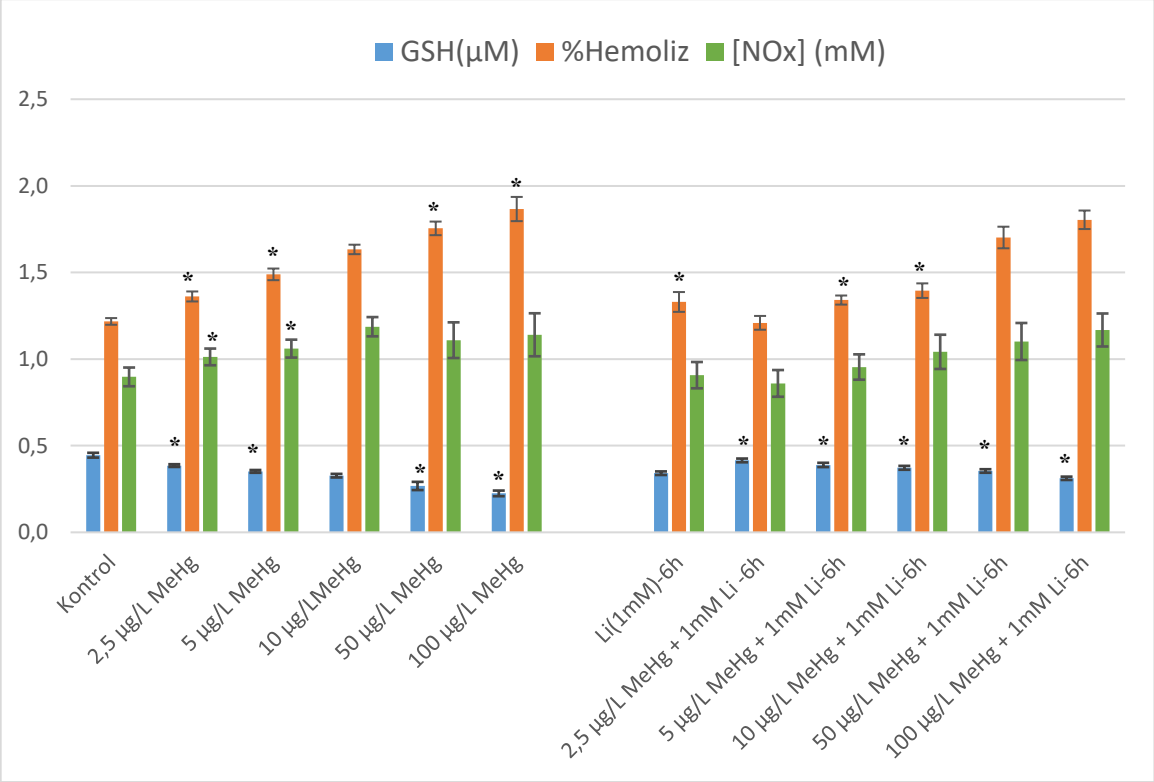
Çizelge 4.3. MeHg ve MeHg + Li_2CO_3 maruziyetinin 6. saat sonunda eritrosit GSH, NOx ve hemoliz düzeylerine etkisi (doz belirleme ön çalışması)

GRUPLAR	GSH (µM) (Ort ± SH)	%Hemoliz (Ort ± SH)	NOx (mM) (Ort ± SH)
Kontrol	0,4485±0,0155	1,2366±0,0235	0,8035±0,0621
2,5 µg/L MeHg	0,3910±0,0103 *	1,3889±0,0345 *	0,9362±0,0571 *
5 µg/L MeHg	0,3575±0,0087 *	1,5235±0,0367 *	0,9892±0,0573 *
10 µg/L MeHg	0,3234±0,0126 *	1,6721±0,0290 *	1,0861±0,0621 *
50 µg/L MeHg	0,2636±0,0245 *	1,7546±0,0408 *	1,1092±0,1064
100 µg/L MeHg	0,2259±0,0168 *	1,8662±0,0725 *	1,1405±0,1281
1 mM Li_2CO_3	0,3415±0,0102	1,3299±0,0602 *	0,9074±0,0793
2,5 µg/L MeHg + 1 mM Li_2CO_3	0,4157±0,0093*	1,2093±0,0420	0,8597±0,0806
5 µg/L MeHg + 1 mM Li_2CO_3	0,3898±0,0132*	1,3408±0,0276 *	0,9543±0,0764
10 µg/L MeHg + 1 mM Li_2CO_3	0,3697±0,0121*	1,3951±0,0443 *	1,0419±0,1032
50 µg/L MeHg + 1 mM Li_2CO_3	0,3544±0,0114*	1,7019±0,0657	1,0767±0,1092
100 µg/L MeHg + 1 mM Li_2CO_3	0,3151±0,0114*	1,8042±0,0563	1,1681±0,0994

* Kontrol grubu – 1 mM Li_2CO_3, 2,5 µg/L, 5 µg/L, 10 µg/L, 50 µg/L veya 100 µg/L MeHg ya da aynı konsantrasyondaki MeHg–MeHg+Li_2CO_3 grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0,05$)

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 6 saat 10 µg/L, 50 µg/L ve 100 µg/L'de MeHg maruziyeti sonunda NOx düzeyleri sırasıyla %35,17; %38,05 ve %41,94 oranında arttı.
MeHg dozu arttıkça eritrosit içi GSH düzeyleri doz bağımlı olarak azaldı. Özellikle 50 ve 100 µg/L MeHg gruplarında kontrol grubuna göre GSH düzeylerinde %41,22 ve %49,63 düştü. Li_2CO_3 ile inkübasyon, tek başına MeHg uygulanan doz gruplarına göre GSH düzeylerinde %34,45 ve %39,49 artış sağladı.

Eritrositlerde %hemoliz maruz bırakılan MeHg dozuna bağımlı şekilde yükseldi. Eritrositlerdeki hemoliz miktarı 50 ve 100 µg/L MeHg konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre %41,88 ve %50,91 arttı. Li_2CO_3 varlığı, 50 ve 100 µg/L MeHg dozlarının tek başına uygulandığı gruplara kıyasla hemoliz oranları sırasıyla %16,56 ve %3 azaldı.



Şekil 4.5. Eritrositlerde 6 saat inkübasyonda MeHg ve MeHg + Li_2CO_3 kombinasyonunda GSH, %Hemoliz ve NOx dağılımı
* Kontrol grubu – 2,5 µg/L, 5 µg/L, 10 µg/L, 50 µg/L veya 100 µg/L MeHg ya da aynı konsantrasyondaki MeHg – MeHg+Li_2CO_3 grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0,05)

MeHg maruziyet dozlarının belirlenmesi amacıyla yapılan ön çalışmada: tam kan 2,5 µg/L -5 µg/L - 10 µg/L - 50 µg/L ve 100 µg/L MeHg 6 saat 37ºC'de inkübe edilmiştir. Elde edilen sonuçlar 2,5 µg/L - 5 µg/L - 10 µg/L'de (ortalama 5,8 µg/L EPA tarafından belirlenen doz sınırı) eritrosit maruziyet-antioksidan kapasite-hemoliz-NO ilişkisinin düzenli olduğu tespit edilmiş ve ileri çalışmalar için bu doz ortalaması seçilmiştir.

50 µg/L ve 100 µg/L MeHg maruziyetinde MeHg'nın etki mekanizmasında meydana gelen değişiklikler nedeniyle MeHg toksisitesinde iyonotropik reseptör (NMDA reseptörü) cevabının incelenmesinin sağlıklı sonuç veremeyeceği anlaşılmıştır. Yapılan bu ön çalışmada bipolar psikiyatrik bozuklukların tedavisinde kullanılan Li_2CO_3'ın terapötik dozunun MeHg ile verilmesinin NMDA reseptör cevabının saptanması için uygun olduğuna karar verilmiştir.

4.3. Deney Bulguları

Ön deney bulgularından hareketle seçilen 2,5 µg/L-5 µg/L-10 µg/L MeHg dozları ve bunların NMDA reseptör blokörü Li_2CO_3 ile kombinasyonlarının uygulandığı tam kan örnekleri 6 ve 24 saatte inkübe edildi. MeHg'nin NMDA reseptör blokörü Li_2CO_3 varlığında eritrositlerdeki etkilerini görebilmek üzere %hemoliz, GSH, [NOx], tCa^{2+} miktarları tayin edildi. En yüksek koruyucu etkinin görülmesi için Li_2CO_3'ın insanlarda toksik etki göstermeyen terapötik aralıktaki maksimum değeri (1,2 mM) seçildi.

4.3.1. %Hemoliz tayini bulguları

İnsan eritrositlerinde MeHg ve MeHg + Li_2CO_3'a 6 ve 24 saat maruziyet sonunda % hemoliz incelendi. Tüm çalışma gruplarındaki %hemolize ait ortalama ve standart hata değerleri Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5 üzerinde gösterildi.

Eritrositlerin hemolizi 2,5 µg/L, 5 µg/L ve 10 µg/L dozlarında MeHg'ya hem 6 saat hem de 24 saat maruziyetleri sonunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış ($p<0,05$) gösterdi.

Çizelge 4.4. İnsan eritrositlerinde MeHg'ya maruziyetin 6. saati sonunda GSH, hemoliz, NOx ve Ca^{2+} düzeylerine etkisi

GRUPLAR	GSH (µM)	%Hemoliz	NOx (mM)	Ca^{2+}(mg/dL)
Kontrol	0,45±0,014	1,22±0,02	0,90±0,06	8,93±0,33
2,5 µg/L MeHg	0,38±0,008$^{\#}$	1,36±0,03$^{\#}$	1,01±0,05	7,68±0,46
5 µg/L MeHg	0,35±0,008$^{\#}$	1,49±0,03$^{\#}$	1,07±0,05$^{\#}$	7,20±0,33$^{\#}$
10 µg/L MeHg	0,32±0,010$^{\#}$	1,63±0,03$^{\#}$	1,19±0,06$^{\#}$	7,55±0,38$^{\#}$
MeHg (Ort±SH)	**0,35±0,008**	**1,49±0,03**	**1,09±0,05**	**7,47±0,39**
2,5 µg/L MeHg + 1,2 mM Li	0,50±0,01$^{\#,*}$	1,25±0,04*	1,13±0,02$^{\#}$	7,24±0,40$^{\#}$
5 µg/L MeHg + 1,2 mM Li	0,46±0,01*	1,35±0,03$^{\#,*}$	1,19±0,03$^{\#}$	7,30±0,09$^{\#}$
10 µg/L MeHg + 1,2 mM Li	0,42±0,009*	1,46±0,04$^{\#,*}$	1,24±0,03$^{\#}$	7,29±0,36$^{\#}$
MeHg (Ort±SH)	**0,46±0,01**	**1,35±0,036**	**1,18±0,026**	**7,27±0,28**

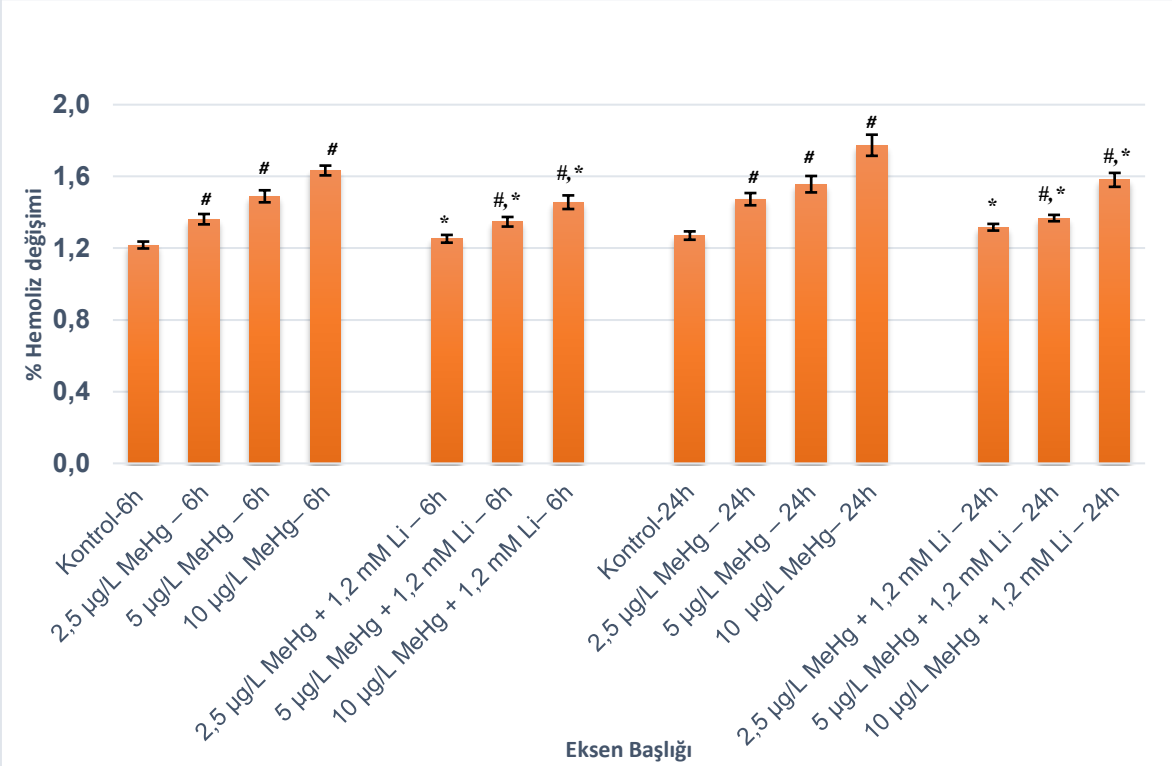
$^{\#}$ Kontrole karşı MeHg veya MeHg+Li_2CO_3 gupları arasında anlamlı fark ($p<0,05$)
* MeHg ve MeHg+Li_2CO_3 grupları arasında anlamlı fark ($p<0,05$)

Li_2CO_3'ın eklenmesi, MeHg'nin tüm konsantrasyonlarında neden olduğu hemolizi anlamlı şekilde azalttı. Her iki inkübasyon süresinde de %hemoliz, Li_2CO_3 ilavesinde MeHg'ya maruz bırakılan gruba göre anlamlı ($p<0,05$) azaldı.

Çizelge 4.5. İnsan eritrositlerinde MeHg'ya maruziyetin 24. saati sonunda GSH, hemoliz, NOx ve Ca düzeylerine etkisi

GRUPLAR	GSH (µM)	%Hemoliz	NOx (mM)	Ca^{2+}(mg/dL)
Kontrol	0,53±0,019	1,27±0,02	1,06±0,04	9,04±0,6
2,5 µg/L MeHg	0,49±0,014$^{\#}$	1,47±0,04$^{\#}$	1,32±0,02$^{\#}$	8,18±0,4
5 µg/L MeHg	0,46±0,015$^{\#}$	1,56±0,05$^{\#}$	1,42±0,02$^{\#}$	7,95±0,3
10 µg/L MeHg	0,42±0,011$^{\#}$	1,77±0,06$^{\#}$	1,58±0,02$^{\#}$	8,38±0,1
MeHg (Ort±SH)	**0,46±0,013**	**1,60±0,05**	**1,44±0,02**	**8,17±0,026**
2,5 µg/L MeHg + 1,2 mM Li	0,54±0,00*	1,32±0,02*	1,23±0,02$^{\#}$	7,83±0,4
5 µg/L MeHg + 1,2 mM Li	0,51±0,004$^{\#,*}$	1,37±0,02 $^{\#,*}$	1,36±0,03$^{\#,*}$	7,72±0,2
10 µg/L MeHg + 1,2 mM Li	0,47±0,003$^{\#,*}$	1,58±0,04 $^{\#,*}$	1,46±0,02$^{\#,*}$	8,24±0,2
MeHg (Ort±SH)	**0,51±0,003**	**1,42±0,03**	**1,35±0,02**	**7,93±0,03**

$^{\#}$ Kontrole karşı MeHg veya MeHg+Li_2CO_3 gupları arasında anlamlı fark ($p<0,05$)
* MeHg ve MeHg+Li_2CO_3 grupları arasında anlamlı fark ($p<0,05$)



Şekil 4.6 İnsan eritrositlerinde MeHg ve MeHg+ Li_2CO_3'ya maruziyetin 6. ve 24. saatlerinde %hemolize etkisi
$^{\#}$Kontrole karşı MeHg veya MeHg+Li_2CO_3 gupları arasında anlamlı fark ($p<0,05$)
* MeHg ve MeHg+Li_2CO_3 grupları arasında anlamlı fark ($p<0,05$)

4.3.2. Glutatyon tayini bulguları

İnsan eritrositlerinde MeHg ve MeHg + Li_2CO_3 uygulamalarının 6 ve 24 saatteki inkübasyonunda GSH (µM) miktarları değerlendirildi. Tüm deney gruplarındaki GSH miktarlarına ait ortalama ve standart hata değerleri Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5 üzerinde gösterildi.

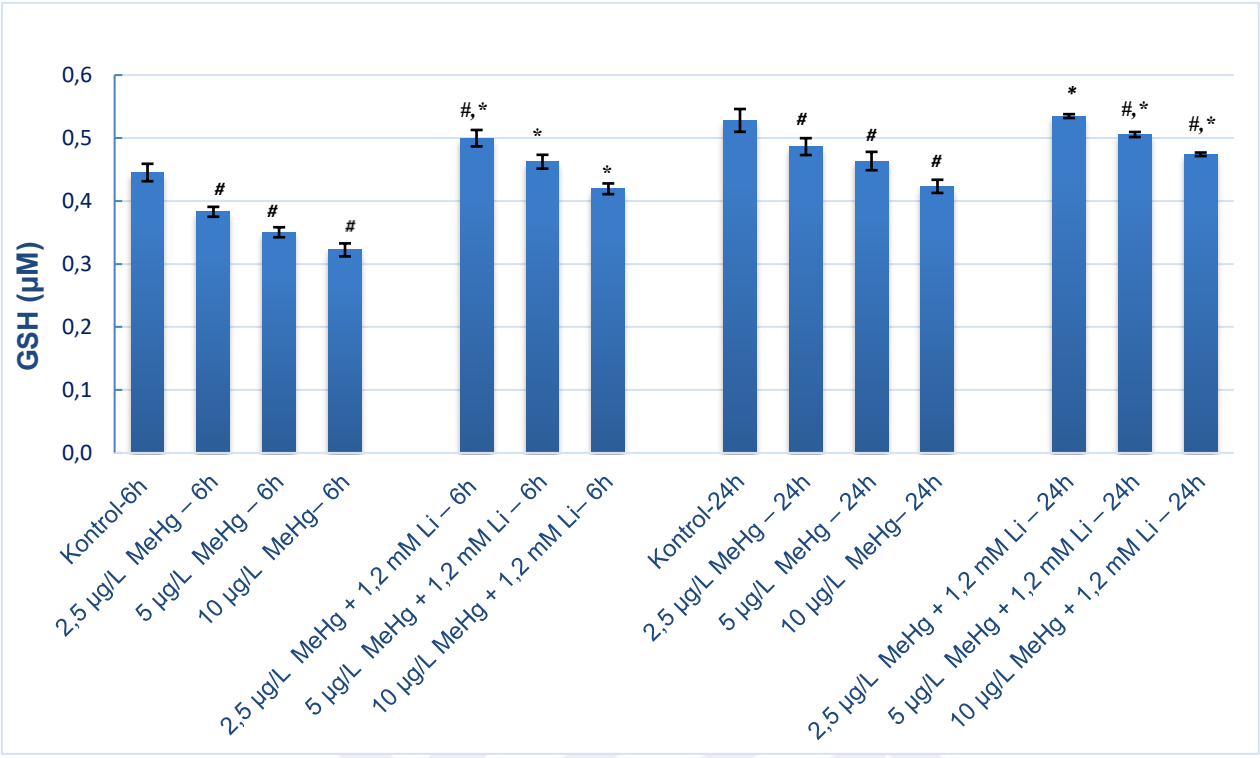
Elde edilen bulgulara göre eritrositlerdeki GSH miktarlarının MeHg ile hem 6 saat hem 24 saat inkübasyon süreleri sonunda doz bağımlı istatistiksel olarak anlamlı şekilde ($p<0,05$) düştüğünü gösterdi. İlk 6 saatte 2,5 µg/L MeHg maruziyetinde GSH miktarı kontrole göre %15,5 iken 5 µg/L MeHg ile %22,22 ve 10 µg/L MeHg maruziyetinde %28,89 azaldı.

6 saatlik 2,5 µg/L MeHg + 1,2 mM Li_2CO_3 maruziyeti sonunda GSH düzeyleri yalnız MeHg uygulamasına ve kontrole göre anlamlı şekilde ($p<0,05$) arttı. Bununla beraber 6 saat 5 µg/L ve 10 µg/L MeHg + Li_2CO_3 inkübasyonu sonunda GSH düzeyinde yalnız MeHg uygulanan gruba göre anlamlı olarak arttı ($p<0,05$). MeHg+Li_2CO_3 maruziyet gruplarında GSH miktarları doz bağımlı olarak azaldı. 24 saatlik maruziyette de benzer şekilde artan dozlarda MeHg ile GSH miktarı kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düştü ($p<0,05$). Bunun yanında GSH düzeyleri 1,2 mM Li_2CO_3'ın 2,5 µg/L, 5 µg/L ve 10 µg/L MeHg ile kombinasyonu, tek başına MeHg'ya maruz bırakılan gruba göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0,05$).

4.3.3. Nitrat + Nitrit tayini bulguları

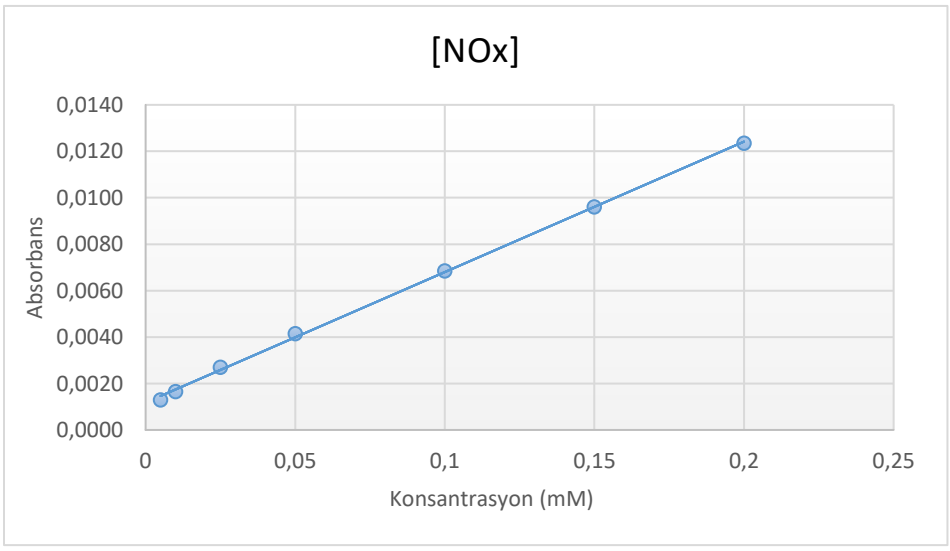
İnsan eritrositlerinde MeHg ve MeHg + Li_2CO_3 uygulamalarının 6 ve 24 saat inkübasyon sürelerinde total nitrit [NOx] miktarları değerlendirildi. Tüm deney gruplarındaki [NOx] bulgularına ait ortalama ve standart hata değerleri Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5 üzerinde gösterildi.

Hazırlanan standartlar üzerinden kalibrasyon eğrisi grafiği oluşturuldu. Bu grafik üzerinden regresyon denklemi $y = 0,0001x + 0,0012$ ve $R^2 = 0,9993$ olarak elde edildi. Regresyon denklemi üzerinden örneklere ait absorbanslar kullanılarak konsantrasyonlar hesaplandı (Bkz. Çizelge 4.4-5).



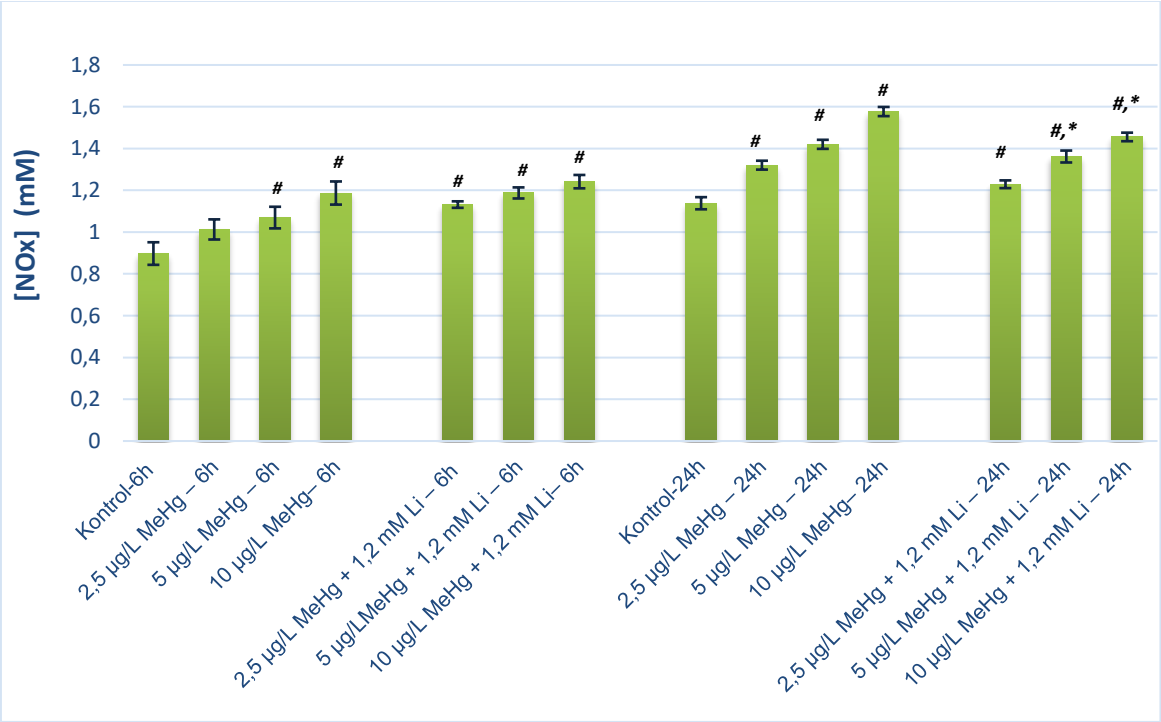
Şekil 4.7. İnsan eritrositlerinde MeHg ve MeHg+ Li_2CO_3'ya maruziyetin 6. ve 24. saatlerinde GSH miktarına etkisi
[#] Kontrole karşı MeHg veya MeHg+Li_2CO_3 gupları arasında anlamlı fark ($p<0,05$)
[*] MeHg ve MeHg+Li_2CO_3 grupları arasında anlamlı fark ($p<0,05$)

İnsan eritrositlerinde 6 saatlik MeHg inkübasyonu sonunda [NOx] düzeylerinde doza bağımlı bir artış görüldü. Bu artış 5 µg/L ve 10 µg/L MeHg gruplarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlılık ($p<0,05$) gösterdi.



Şekil 4.8. NOx kalibrasyon eğrisi grafiği

Bununla beraber insan eritrositlerinin 2,5 µg/L, 5 µg/L ve 10 µg/L dozlarda MeHg'ya 24 saat maruz bırakılması sonunda [NOx] düzeyleri kontrol grubuna göre sırasıyla %24,52; %33,96 ve %49,06 oranında artışla anlamlı (p<0,05) farklılık görüldü. Yalnız 5 µg/L ve 10 µg/L MeHg'ya maruz bırakılan gruplar ile aynı miktarda MeHg+Li_2CO_3 kombinasyonuna maruz bırakılan gruplar karşılaştırıldığında 24 saat sonunda [NOx] düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüş tespit edildi (p<0,05).



Şekil 4.9. İnsan eritrositlerinde MeHg ve MeHg+ Li_2CO_3'ya maruziyetinin 6. ve 24. saatlerinde [NOx] miktarına etkisi
[#]Kontrole karşı MeHg veya MeHg+Li_2CO_3 gupları arasında anlamlı fark (p<0,05)
[*] MeHg ve MeHg+Li_2CO_3 grupları arasında anlamlı fark (p<0,05)

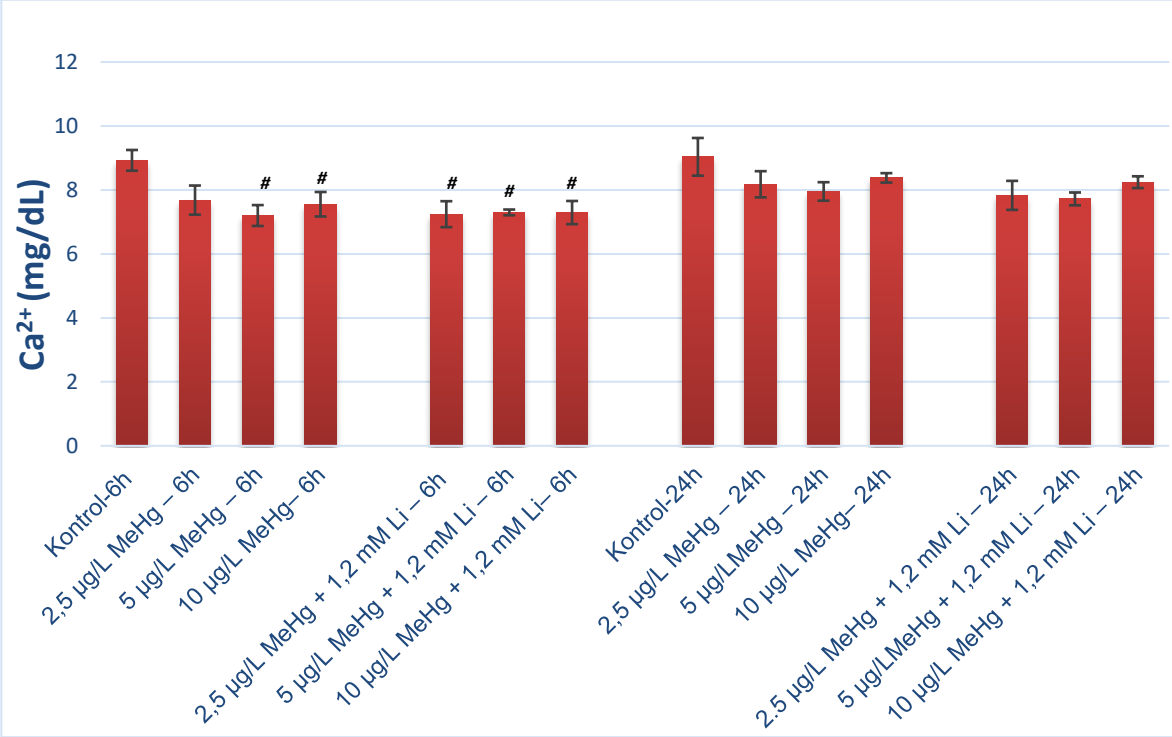
4.3.4. Total Ca^{2+} tayini bulguları

İnsan eritrositlerinde MeHg ve MeHg + Li_2CO_3 maruziyetinin 6. ve 24. saatleri sonunda serumdaki (ekstraselüler ortamda) total Ca^{2+} (mg/dL) miktarları değerlendirildi. Tüm deney gruplarındaki (mg/dL) bulgularına ait ortalama ve standart hata değerleri Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5 üzerinde gösterildi. Elde edilen bulgulara göre MeHg maruziyeti, kontrol grubuna kıyasla eritrosit içine Ca^{2+} girişine yol açtı. 6 saat inkübasyonda sonucunda 5 µg/L

ve 10 µg/L MeHg'ya maruz kalan eritrositlere kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı miktarda Ca^{2+} girdi ($p<0,05$).

Tek başına MeHg'ya maruz kalan eritrositlerde kontrol grubuna göre 24 saat sonunda hücre içine giren Ca^{2+} miktarı arttı ancak istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p>0,05$).

MeHg + Li_2CO_3 maruziyetinin 24. saati sonunda yalnızca MeHg'ya maruz kalan gruba göre serum tCa^{2+} seviyesi, MeHg içeren gruplarla göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde düştü ($p>0,05$).



Şekil 4.10. İnsan eritrositlerinde MeHg ve MeHg+ Li_2CO_3'ya maruziyetinin 6. ve 24. saatlerinde tCa^{2+} düzeylerindeki değişim
#Kontrole karşı MeHg veya MeHg+Li_2CO_3 gupları arasında anlamlı fark ($p<0,05$)
* MeHg ve MeHg+Li_2CO_3 grupları arasında anlamlı fark ($p<0,05$)

4.4. Eritrositlerde MeHg maruziyetinde Li_2CO_3'ın hemolizden koruma mekanizması

Çalışmanın bulguları MeHg'nin eritrositlerde neden olduğu toksisiteyi ve NMDA reseptörleri üzerinden Li_2CO_3'ın etkilerini anlamak amacıyla değerlendirildi. Elde edilen veriler MeHg ve Li_2CO_3'ın hemolize farklı mekanizmalarla yol açtığını ortaya koydu.

İnsan eritrositlerinin Li_2CO_3'a maruziyetinin 6. saat ve 24. saat sonunda GSH, hemoliz, NOx ve Ca düzeylerine etkisi Çizelge 4.6'da görülebilir.

Çizelge 4.6. İnsan eritrositlerinin Li_2CO_3'a maruziyetinin 6. saat ve 24. saat sonunda GSH, hemoliz, NOx ve Ca düzeylerine etkisi

GRUPLAR	GSH (µM) (Ort ± SH)	%Hemoliz (Ort ± SH)	NOx (mM) (Ort ± SH)	Ca^{2+}(mg/dL) (Ort ± SH)
Kontrol-6 saat	0,45±0,014	1,22±0,02	0,90±0,06	8,93±0,33
1,2 mM Li-6 saat	0,48±0,02	1,31±0,06*	1,15±0,03*	7,25±0,28*
Kontrol-24 saat	0,53±0,019	1,27±0,02	1,06±0,04	9,04±0,6
1,2 mM Li-24 saat	0,48±0,02*	1,51±0,02*	1,39±0,03*	8,02±0,2

* Kontrol grubu – 1,2 mM Li_2CO_3 grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark($p<0,05$)

Eritrositler tek başına Li_2CO_3'a maruz bırakıldığında GSH miktarının değişmeden hemolizin ilk 6 saatte %7,4; 24 saat sonunda ise %18,9 arttığı gözlenmiştir. Eritrosit içine Ca^{2+} girişi tek başına Li_2CO_3 verildiğinde 6 saat sonunda %18,8; 24 saat sonunda ise %11,28 arttı.

İnsan eritrositlerinde MeHg maruziyeti sonucu meydana gelen toksik etkinin Li_2CO_3 tarafından koruma oranları 6 saat için Çizelge 4.7 ve 24 saat için Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Lityumun eritrositi ilk 6 saatte MeHg toksisitesinden koruma oranı

GRUPLAR	GSH (µM) (Ort ± SH)	% GSH değişim oranı Kontrol-MeHg	GSH (µM) (Ort ± SH)	% GSH değişim oranı MeHg-Li+MeHg	Li+MeHg'nın MeHg'ya göre koruma oranı
Kontrol	0,45±0,014		**MeHg+1,2 mM Li**		
2,5 µg/L MeHg	0,38±0,008	-15,5	0,5±0,013	+31,6	%203,8
5 µg/L MeHg	0,35±0,008	-22,2	0,462±0,011	+31,4	%141,4
10 µg/L MeHg	0,32±0,010	-28,8	0,419±0,009	+31,3	%108,7

Çizelge 4.8 Lityumun eritrositi ilk 24 saatte MeHg toksisitesinden koruma oranı

GRUPLAR	GSH (µM) (Ort ± SH)	% GSH değişim oranı Kontrol-MeHg	GSH (µM) (Ort ± SH)	% GSH değişim oranı MeHg-Li+MeHg	Li+MeHg'nın MeHg'ya göre koruma oranı
Kontrol	0,53±0,019		**MeHg+1,2 mM Li**		
2,5 µg/L MeHg	0,49±0,014	-7,54	0,486±0,013	+10,2	%135,2
5 µg/L MeHg	0,46±0,015	-13,2	0,464±0,015	+10,86	%82,3
10 µg/L MeHg	0,42±0,011	-20,75	0,423±0,01	+11,9	%57,3

MeHg'nın farklı dozlarına maruz kalan eritrositlerde 1,2 mM Li_2CO_3'ın ilk 6 saatte NMDA reseptör blokajı ile meydana gelen GSH değişim oranları Li+MeHg verildiğinde elde edilen oranlarla karşılaştırıldı. Lityumun MeHg karşısında antioksidan kapasiteyi koruma oranları, 2,5 µg/L ve 5 µg/L MeHg maruziyetinde sırasıyla %203,8 ve %141,4 koruma sağladığı, 10 µg/L MeHg için koruma oranının azalarak %108,7 olduğu tespit edilmiştir (bkz. Çizelge

4.7). Farklı dozda MeHg'ye maruz kalan eritrositlerde 1,2 mM Li_2CO_3 dozu 24 saat sonunda 2,5 µg/L MeHg için %135,2 koruma sağlarken, 5 µg/L ve 10 µg/L MeHg için antioksidan kapasiteyi sırasıyla %82,3 ve %57,3 oranlarında artırabilmiştir (bkz. Çizelge 4.8).

4.5. Eritrositlerde Toksik dozlarda MeHg maruziyetinde Li_2CO_3'ın etkisi

Ön çalışmamızın kullandığımız EPA'nın belirlediği sınırlara göre toksik dozlardaki MeHg'nın 6 saat inkübasyon sonunda GSH, NOx ve hemolize etkisinin Li_2CO_3 ile ne şekilde değiştiği değerlendirildi.

Eritrositlerin 10 µg/L MeHg+Li_2CO_3 inkübasyonu sonucunda tek başına aynı dozda MeHg maruziyetine göre GSH değerleri %14,31 artmış, hemoliz %16,56 azalmıştır. MeHg dozu 5 kat artırıldığında Li_2CO_3 ile GSH %34,45 artmış, hemoliz ise %3 azalmıştır. MeHg dozu 10 kat artırıldığında ise, Li_2CO_3 ile GSH %39,49 artmış, hemoliz ise %3,32 azalmıştır. Bu sonuçlar, kullanılan dozda lityumun hemolizi azaltmada NMDA-GluN2B blokajında etkili olduğunu göstermiştir (bkz. Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Toksik düzeyde MeHg maruziyetinin 6. saat sonunda eritrosit GSH, NOx ve hemolize etkisi

GRUPLAR	**GSH (µM) (Ort ± SH)**	**%Hemoliz (Ort ± SH)**	**NOx (mM) (Ort ± SH)**
Kontrol	0,4485±0,0155	1,2366±0,0235	0,8035±0,0621
10 µg/L MeHg	0,3234±0,0126*	1,6721±0,0290*	1,0861±0,0621*
50 µg/L MeHg	0,2636±0,0245*	1,7546±0,0408*	1,1092±0,1064
100 µg/L MeHg	0,2259±0,0168*	1,8662±0,0725*	1,1405±0,1281
10 µg/L MeHg + 1 mM Li	0,3697±0,0121*	1,3951±0,0443*	1,0419±0,1032
50 µg/L MeHg + 1 mM Li	0,3544±0,0114*	1,7019±0,0657	1,0767±0,1092
100 µg/L MeHg + 1 mM Li	0,3151±0,0114*	1,8042±0,0563	1,1681±0,0994

*Kontrol grubu , 10 µg/L, 50 µg/L veya 100 µg/L MeHg ya da aynı konsantrasyondaki MeHg–MeHg+Li_2CO_3 grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0,05$).

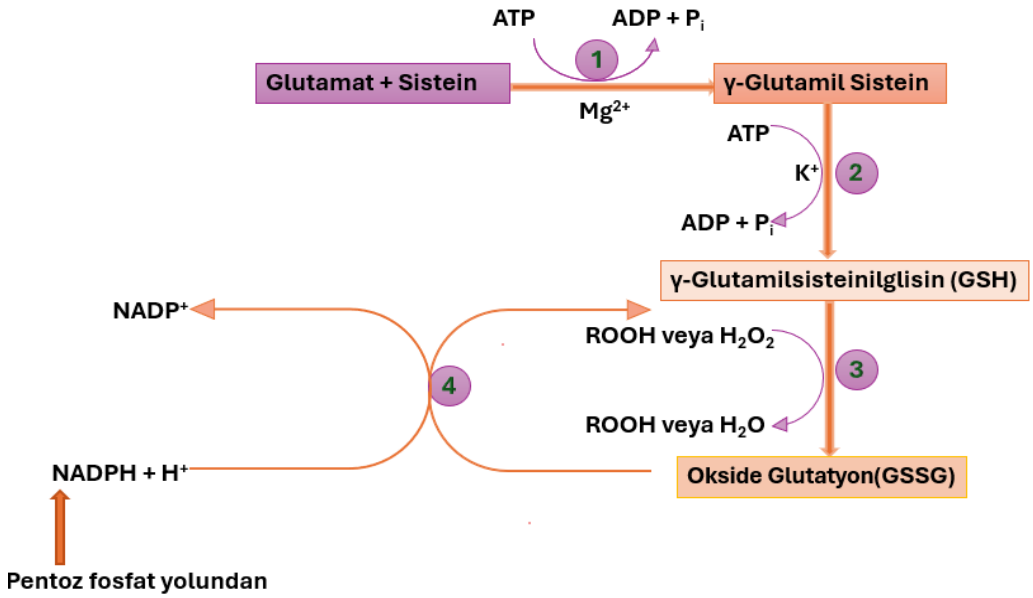
5. TARTIŞMA

Çalışmamız, metil cıvaya maruz kalan insan eritrositlerinde toksisite mekanizmasının, eritrositlerdeki NMDA reseptörleriyle ilişkisini araştıran ilk çalışmadır.

Genel olarak popülasyonun MeHg maruziyeti balık ve deniz ürünleri tüketimiyle gerçekleşmekte olup[115], kandaki MeHg dağılımı incelendiğinde %90'dan fazlasının eritrositlerde biriktiği ve maksimum kan konsantrasyonlarına 4-14 saat arasında ulaştığı gösterilmiştir [114]. Genel popülasyondaki kan toplam cıva (tHg) seviyesi %70-95 gibi büyük oranda MeHg'den kaynaklanmaktadır [254, 255]. EPA tarafından Hg'nin kandaki seviyesinin 5,8 µg/L altında olması gerektiği ön görülmektedir[256]. CDC'ye göre mesleki ya da diğer kaynaklardan MeHg maruziyeti olmayan kişilerde kan Hg düzeyleri balık tüketimiyle korelasyon göstermektedir. Mesleki ya da balık tüketimiyle birlikte diğer kaynaklardan MeHg maruziyeti durumunda kan Hg seviyelerinin 5,8 µg/L'nin üzerine çıktığı tespit edilmiştir[257, 258].

Yüksüz bir atom gazı olarak fiziksel özellikleri göz önüne alındığında, solunan Hg buharı pasif difüzyonla taşınır. MeHg hücre zarlarından küçük molekül ağırlıklı tiyol bileşikleriyle kompleksler halinde geçerek, hücreye kısmen büyük nötr amino asit taşıyıcıları üzerinde bir sistein kompleksi olarak girer ve kısmen de endojen taşıyıcılar üzerinde indirgenmiş glutatyon içeren bir kompleks olarak hücreden çıkar [61, 259]. Eritrositlerde yapılan çalışmalarda Hg iyonlarının özellikle CH_3Hg^+ katyonlarının GSH ile meydana getirdiği S-konjugatlarının (CH_3Hg-S-G) alımında birden fazla taşıyıcı sistemin rol oynadığı gösterilmiştir[187, 190]. MeHg, glutamin/glutamat döngüsünü değiştirerek glutamat metabolik dengesini bozar. MeHg ile NMDA reseptör ekspresyonunun artması ve MeHg ile bu reseptörün uyarılması, eritrosit içine aşırı kalsiyum akışına ve oksidatif strese neden olmaktadır[61, 259]. Hemoglobin, hücrenin toplam proteininin %90'ından fazlasını oluşturduğu için oksidatif hasarın kritik hedefidir [260]. NMDA reseptörlerinin MSS dışında eritrosit membranında bulunduğu ve fonksiyonel olarak çalıştığı gösterilmiştir[210, 216, 221]. İnsan eritrositlerindeki NMDA reseptörlerinin *in vitro* koşullarda MeHg ile aşırı uyarılması Ca^{2+} aşırı yüklenmesine ve oksidatif strese yol açar. Ca^{2+} sinyal iletimi, serbest Ca^{2+} konsantrasyonundaki artışlara dayanır. Serumdan gelen Ca^{2+}, NMDA reseptörü aracılı toksisitede önemli bir habercidir. Eritrosit içine NMDA reseptör aracılı Ca^{2+} akışı, NADPH oksidaz (NOX) aktivasyonu yoluyla reaktif oksijen ve azot türleri üretir[260].

Eritrositlerde NO sentez edilmektedir [195]. MeHg'nın NMDA reseptörünü uyarması ile meydana gelen süperoksit radikal üretimi, NADPH substratını yenileyen pentoz fosfat şantının ve NADPH oksidaz kompleksinin aktive edilmesi ile meydana gelir[224].



Şekil 5.11. Eritrositte Glutatyon Metabolizması Glutamat ve sistein amino asitlerinden, iki ATP bağımlı enzimatik adım 1: γ-glutamilsistein sentezi, 2: glutatyon (GSH) sentezi ile tripeptit glutatyon sentezlenir. Sentetik yol, Mg^{2+} ve K^{+} iyonları tarafından aktive edilir. Oluşan indirgenmiş glutatyon (GSH), antioksidan savunmada rol alarak reaktif oksijen türleri (ROOH veya H_2O_2) indirger ve kendisi okside glutatyon (GSSG) formuna dönüşür (3). GSSG, NADPH bağımlı glutatyon redüktaz enzimi (4) ile tekrar GSH'a indirgenir ve döngü tamamlanır. Gerekli NADPH, pentoz fosfat yolundan sağlanır.

MeHg ile NMDA reseptör-GluN2B-alt ünitesinin uyarılması, NADPH oksidazı aktive eder [261]. Aslında, fonksiyonel NMDA reseptörü, iki zorunlu GluN1 alt birimi ile iki GluN2 (A-D) alt biriminden veya GluN2 ve GluN3 (A veya B) alt birimlerinin bir kombinasyonundan oluşan hetero tetramerdir[262]. NMDA reseptörünün fizyolojik açıdan en önemli bileşenleri ise GluN1 ve GluN2A ve/veya GluN2B alt birimleridir [263, 264]. NMDA reseptörünün GluN2A veya GluN2B alt ünitelerinin ekspresyonu, yüksek Ca^{2+} geçirgenliği ve tek kanal iletkenliğinde artma ile sonuçlanır. NADPH oksidaz, NMDA reseptör aracılı ROS üretimiyle doğrudan ilişkili olup, Hg türleri NMDA reseptör alt birimleri olan NMDA/2A (NR2A), NMDA/NR2B ve NMDA/2D'nin (NR2D) ekspresyonunu artırır. Hg maruziyetinin toksisitesi, NMDA reseptör alt birimlerinin ekspresyonundaki bu değişikliklerle açıklanmaktadır [265]. Cıva bileşiklerinin en toksik türü olan MeHg maruziyeti, eritrosit sayısını ve hemoglobin konsantrasyonunu önemli ölçüde azaltarak anemiye sebep olur [266, 267]. Az sayıda yapılan deneysel çalışma ve

ekotoksikolojik değerlendirmelerde inorganik Hg, elementel Hg ve MeHg maruziyetinden sonra hemoglobin, hematokrit ve eritrosit sayısında azalma ile hemotoksisite meydana geldiği kanıtlanmıştır [268-270]. MeHg, nöronlar ve diğer hücrelerde hücre zarlarından küçük molekül ağırlıklı tiyol bileşikleriyle kompleks yaparak geçer, hücreye kısmen büyük nötr amino asit taşıyıcıları üzerinde bir sistein kompleksi olarak girer. Tiyol grubu içeren antioksidan enzimlere bağlanıp onları etkisiz hale getirerek, hücre içi reaktif oksijen türlerinde artışa ve DNA, hücre membran lipitleri ve hücre içi proteinlerde oksidatif hasara yol açar. Olgun eritrositler çekirdekleri ve organelleri olmadığı için protein üretemezler; bu nedenle, hasar gören eritrosit proteinleri yenilenemez ve hücre fonksiyonu ve antioksidan kapasite kaybına neden olur [61]. Nöronlarda MeHg toksisitesinin ana hedeflerinden biri olan GSH tükenmesi MeHg birikimini artırarak MeHg kaynaklı oksidatif stresi güçlendirir[271]. MeHg kaynaklı ROS üretimi, glutamin sentetaz aktivitesini inhibe ettiğinden glutamat metabolizmasını işlevsiz hale getirir. Eritrositlerde hemolizde rol oynayan iyonotropik membran reseptörlerinden NMDA reseptörünün MeHg ile uyarılmasına bağlı toksisitenin nonspesifik NMDA reseptör antagonistleri tarafından serebral kortekste olduğu gibi eritrositlerde de hafifletebileceği düşünülmektedir [272].

Aslında, glutamin içermeyen ortamda 5 µM MeHg'ya maruz bırakılan nöron hücre hattının 24 saatlik sürenin sonunda canlılığı 1,8 kat azalırken, oksidatif stres katsayısının 2 kat arttığı gösterilmiştir [273]. NMDA reseptörü, bir kalsiyum geçirgen iyon kanalı olup, aktivasyonu, nöronlarda nörotransmitter salınımını, sinaptik plastisite ve hücre içi sinyal iletiminde önemli bir rol oynayan kalsiyum akışını tetiklemektedir[274]. Ancak, eritrositlerde MeHg ile aktive olan NMDA reseptörünün davranışı tam olarak bilinmemektedir [274]. Bu çalışmada, Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansının (EPA) kan Hg seviyelerinin 5,8 µg/L'nin altında olması [33] önerisi dikkate alınarak: üç farklı dozda; 2,5 µg/L, 5 µg/L ve 10 µg/L MeHg (ortalama 5,8 µg/L) maruziyetinde ölçülen hemoliz yüzdesi, GSH, NO ve serum Ca^{2+} değerlerinin ortalaması alınarak NMDA reseptörünün MeHg toksisitesindeki davranışı incelenmiştir. Buna göre eritrositler MeHg'ya maruz bırakıldıktan sonra ilk 6 saat sonunda (bkz. Çizelge 4.4) hemoliz kontrollere göre %22,2 artarken eritrosit içine giren Ca^{2+} miktarı %16,3 artmış, eritrosit GSH miktarı %22 azalmış, NOx miktarı ise %21 artmıştır. Eritrositler MeHg'ya maruz bırakıldıktan sonra 24 saat sonunda (bkz. Çizelge 4.5) hemoliz kontrollere göre %25,98 artarken eritrosit içine giren Ca^{2+} miktarı %9,62 artmış, eritrosit GSH miktarı %13,2 azalmış, NOx miktarı ise %35,84 artmıştır. Bu bulgular, hemolize yol açan oksidatif stresin MeHg'nin NMDA reseptörünü uyarması sonucu

olduğunu düşündürmektedir. Ancak, eritrosit membranında eksprese edilen ve hemolizde rol oynayan iyonotropik membran reseptörünün NMDA reseptörü olduğunun kanıtlanabilmesi için NMDA reseptör antagonistleri tarafından eritrosit içine kalsiyum girişi, eritrositte NO ve majör antioksidan kapasite, GSH sentez miktarının inhibe edildiğinin gösterilmesi bu reseptörün fonksiyonel bütünlüğünün ortaya konulmasında son derece önemlidir[6]. Oksidatif stres aracılı eritrosit hasarının, NMDA reseptörü GluN2B alt biriminin aktivasyonu ile meydana geldiğini ortaya koyabilmek amacı ile insanlarda bipolar bozukluklarda tedavi amacı ile kullanılan özgün bir NMDA reseptör/GluN2B alt ünitesi antagonisti olan Lityum karbonat kullanılmıştır. Lityum, her ne kadar tedavi amacı ile kullanılsa da intoksikasyonu nörolojik, kardiyovasküler, gastrointestinal, nefrolojik ve endokrinolojik semptomlarla kendini göstermektedir. Terapötik indeks 0,4–1,2 mM arasındadır [275]. 2,3 mM'ın üzerinde mortal seyreden toksisite söz konusudur [276]. Bizim çalışmamızda NMDA reseptör antagonisti olarak kullanılan 1,2 mM Li_2CO_3 dozu terapötik indeks sınırları içinde ve non-toksik dozdur. Eritrositlerde Li+MeHg'ya maruz bırakıldıktan sonra ilk 6 saat sonunda (bkz. Çizelge 4.4) sadece MeHg'ya maruz kalan eritrositlere nazaran hemoliz %9,4 azalırken, eritrosit içine giren Ca^{2+} miktarı %2,68 oranında artmış (eritrosit dışı ortamda Ca^{2+} azalması eritrosit içine transportun arttığını göstermektedir), eritrosit GSH miktarı %31,43 oranında artmış, NOx sentezi ise %8,26 oranında yükselmiştir. Bu sonuçlar, eritrosit membranından eritrosit içine doğrudan giren MeHg'nın da antioksidan kapasite artışı ile hemolize yol açmasının engellendiğini göstermektedir.

Eritrositler Li+MeHg'ya maruz bırakıldıktan sonra, 24 saat sonunda (bkz. Çizelge 4.5) sadece MeHg'ya maruz kalan eritrositlere nazaran hemoliz %11,25 azalırken, eritrosit içine giren Ca^{2+} miktarı %2,94 oranında artmış, eritrosit GSH miktarı %10,87 artmış, NOx miktarı ise %6,25 azalmıştır. MeHg maruziyeti sonrasında eritrositin oksidatif strese dayanıklılığı, hemolizi veya eritrosit membranının korunmasında pentoz fosfat yolunda rejenere olan GSH'a bağlıdır[277]. Bizim çalışmamızda, ilk 6 saatte MeHg maruziyetinde kontrollere göre GSH azalma oranı hesaplanmıştır. Li+MeHg grubunda her farklı MeHg dozu 2,5 µg/L, 5 µg/L ve 10 µg/L, Li+MeHg grupları için kontrol olarak alınmıştır. İlk 6 saatte MeHg maruziyetinde hemolize uğrayan eritrosit yüzdesi başına düşen GSH oranı (% hemoliz/GSH oranı) 4,26 iken Li+MeHg maruziyetinde Li tarafından NMDA-GluN2B blokajına bağlı olarak bu oran 2,93'e düşmüş, 24 saat sonra ise MeHg maruziyeti sonrasında 3,48 olan oran Li+MeHg maruziyetinden sonra 2,78'e düşmüştür. Bu sonuçlar, kullanılan dozda lityumun

hemolizi azaltmada maruziyet süresinden bağımsız olarak NMDA-GluN2B blokajında sabit oranda etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Kullanılan dozda Li'un ilk 6 saatte NMDA reseptör blokaj kapasitesi MeHg maruziyet dozlarına göre meydana gelen GSH azalma oranları Li+MeHg verildiğinde elde edilen oranlarla karşılaştırılarak, Li'un MeHg karşısında antioksidan kapasiteyi koruma oranları, 2,5 µg/L ve 5µg/L MeHg maruziyetinde tam koruma sağladığı, 10 µg/L MeHg için koruma oranının azalarak, %108,7 olduğu tespit edilmiştir (bkz. Çizelge 4.7).

MeHg'ye maruz kalan eritrositlerde 1,2 mM Li_2CO_3 dozu 24 saat sonunda 2,5 µg/L MeHg için tam koruma sağlarken, 5 µg/L ve 10 µg/L MeHg için antioksidan kapasiteyi ancak sırasıyla %82,3 ve %57,3 oranlarında artırabilmektedir (bkz. Çizelge 4.8). Bu sonuçlar, majör antioksidan kapasitenin hemolizi azaltmada son derece önemli olduğunu, MeHg maruziyetinde NMDA reseptörünün etkili olduğunu ve Li'un bu reseptörü EPA'nın belirlediği dozlar üzerinde de bloke ederek, özellikle MeHg maruziyetinin erken döneminde tam etkili olduğunu ortaya koymuştur.

İlk 6 saatte kontrol grubunda ekstraselüler sektördeki Ca^{2+} miktarı 8,93 mg/dL iken, 2,5 µg/L -5 µg/L - 10 µg/L MeHg uygulamasından sonra ekstraselüler sektörde kalan ortalama Ca^{2+} miktarı 7,47 mg/dL'dir. Bu durumda 1,46 mg/dL Ca^{2+} eritrosit içine girmiştir. Li+MeHg uygulamasından sonra eritrosit içine Ca^{2+} girişi 7,3 kat azalarak 0,2 mg/dL'ye düşmüştür. Yani NMDA reseptörünün MeHg ile uyarılması azaltılarak GSH %31,43 artmış, Ca^{2+} girişi bloke edilmiştir (bkz. Çizelge 4.4).

24. saatte kontrol Ca^{2+} değeri 9,04 mg/dL iken 2,5 µg/L-5 µg/L-10 µg/L MeHg uygulamasından sonra ekstraselüler sektörde kalan Ca^{2+}'un 0,87 mg/dL'si eritrosit içine girmiştir. Li+MeHg uygulamasından sonra 0,24 mg/dL Ca^{2+} eritrosit içine girmiş. Böylece 24. saat sonunda eritrosit içine giren Ca^{2+} 3,6 kat azalmıştır (bkz. Çizelge 4.5).

Eritrositlerin sadece lityuma maruziyeti durumunda, hemolizin arttığı tespit edilmiştir. Li ve MeHg'nın hemoliz meydana getirme mekanizmaları farklıdır [278]. Eritrositler tek başına Li_2CO_3'a maruz bırakıldığında GSH miktarının değişmeden hemolizin ilk 6 saatte %7,4; 24 saat sonunda ise %18,9 arttığı gözlenmiştir. Ca^{2+}'nun "sodium-lithium countertransport activity" (SLC) ile ilk 6 saatte %18,8; 24 saat sonunda %11,3 oranında girmesi eritrosit içinde Na^+ ve su artmasına bağlı olarak eritrositin şişmesi ve hemolizine sebep olur, ancak

MeHg ile oksidatif stres uyarıldığında Lityum, NMDA reseptörünü bloke ettiğinden Ca^{2+} girişi SLC ile olmasına rağmen oksidatif stres meydana gelmediğinden hemoliz hem 6. saatte hem de 24. saatte anlamlı olarak azalıyor. 24. saatte Li ile GSH artışı ve hemolizin azalması NMDA reseptörünün bloke olduğunu ama Ca^{2+} iyon kanalının çalıştığını gösteriyor (bkz. Çizelge 4.5). Tek başına MeHg verildiğinde 6 saat sonunda eritrosite Ca^{2+} girişi %16,34 artarken, 24 saat sonunda %9,62 artmaktadır. Tek başına Li_2CO_3 verildiğinde 6 saat sonunda Ca^{2+} girişi %18,8 iken 24 saat sonunda %11,28 olmaktadır. Lityumun MeHg'ya nazaran 6. saatte eritrosit içine sağladığı Ca^{2+} girişi %2,46; 24 saatte ise %1,66 fazladır. Li_2CO_3 MeHg ile verildiğinde eritrosit içine giren Ca^{2+} miktarı 6. saatte %2,68; 24. saatte % 2,94'tür. Dolayısı ile lityumun tek başına verilmesi durumunda ortaya çıkan Ca^{2+} girişinin artmasına bağlı hemoliz MeHg+Li_2CO_3 verilmesi halinde eritrosit antioksidan kapasitenin artışına bağlı hemolizin azalması, Li_2CO_3'ın MeHg ile verildiğinde niçin tek başına verilmesi halinde meydana gelen hemolizi yapmadığını ortaya koymaktadır.

EPA'nın ön gördüğü maruziyet dozunun üzerinde 10 µg/L MeHg maruziyetinde GSH de kontrol grubuna göre %27,89 azalma meydana gelmiştir ve hemolizi kontrol grubuna göre %35,21 artırmıştır. Maruz kalınan MeHg dozunda 5 kat artma GSH miktarını %41,22 azaltırken, hemolizde %41,88 artma meydana gelmiştir. MeHg dozu 10 kat artırıldığında eritrosit GSH miktarı %49,63 azalırken, hemoliz %50,91 artmıştır.

Ortama insanlarda bipolar bozuklukta kullanılan terapötik dozda; 1 mM Li_2CO_3 ilavesi ile 10 µg/L MeHg ile GSH %14,31 artmış, hemoliz ise %16,56 azalmıştır. 50 µg/L MeHg ile GSH %34,45 artmış, hemoliz ise %3 azalırken, 100 µg/L MeHg ile GSH %39,49 artmış, hemoliz ise %3,32 azalmıştır. Bu sonuçlar, kullanılan dozda lityumun hemolizi azaltmada NMDA-GluN2B blokajında etkili olduğunu, Lityumun ilk 6 saatte 50 µg/L MeHg maruziyetinde %83,57 ve 100 µg/L MeHg maruziyetinde %79,56 oranında koruma sağladığını göstermektedir (bkz. Çizelge 4.9)

İlk 6 saatte 10 µg/L MeHg maruziyetinde hemolize uğrayan eritrosit yüzdesi başına düşen GSH oranı (% hemoliz/GSH oranı) 5,17 iken Li+MeHg maruziyetinde Li tarafından NMDA-GluN2B blokajına bağlı olarak bu oran 3,77'ye düşmüştür. Bu doz 5 kat artırıldığında; ilk 6 saatte 50 µg/L MeHg maruziyetinde hemolize uğrayan eritrosit yüzdesi başına düşen GSH oranı (% hemoliz/GSH oranı) 6,65 iken Li+MeHg maruziyetinde Li tarafından NMDA-GluN2B blokajına bağlı olarak bu oran 4,8'e düşmüştür. MeHg dozu 10 kat artırıldığında ise ilk 6 saatte 100 µg/L MeHg maruziyetinde hemolize uğrayan eritrosit yüzdesi başına düşen GSH oranı 8,26 iken Li+MeHg maruziyetinde Li tarafından NMDA-

GluN2B blokajına bağlı olarak bu oran 5,72'ye düşmüştür (bkz. Çizelge 4.9). MeHg dozunun 10 µg/L, 50 µg/L, 100 µg/L olması lityumla antioksidan kapasiteye göre hemolizi sırasıyla 1,14; 1,85; 2,54 azaltmıştır (bkz. Çizelge 4.9).

Farmakolojik olarak AMPA reseptör inhibisyonu, insan eritrositlerine Ca^{2+} girişini değiştirerek eritrosit ölümünü önlediği ileri sürülmektedir[5]. Ancak, bizim sonuçlarımız MeHg maruziyetinde eritrosit içine Ca^{2+} ile eritrosit içindeki GSH miktarı oranlandığında ilk 6 saat sonunda 4,7; 24 saat sonunda ise 1,89 olmaktadır. Ortama Li_2CO_3 ilave edildiğinde hem 6 saatte hem de 24 saatte bu oranların sırasıyla 0,43 ve 0,47 olması eritrosit içine farklı bir reseptör aracılığı ile Ca^{2+}'un girmediğini göstermektedir. Bu durumda MeHg toksisitesinde AMPA reseptörünün etkin bir katkısı olmadığını ortaya koymuştur.

Bu sonuçlar, yüksek MeHg dozları maruziyetinde GSH'da azalmanın doz bağımlı olarak hemolizi artırdığını ortaya koymuştur. Ancak, ortama Li_2CO_3 ilave edilmesinin hemoliz üzerine etkisinin eritrosit içindeki GSH rejenerasyonundan bağımsız bir mekanizma ile olduğuna işaret etmektedir. MeHg'ya maruz kalan eritrositlerde hemolizin düşük dozlarda doğrudan NMDA/GluN2B aracılı oksidatif strese bağlı olduğunu ve kullanılan lityum dozunun NMDA reseptör blokajı için yeterli olduğunu göstermiştir. Buna karşılık çok yüksek MeHg dozlarında ise, kullanılan lityum dozunun NMDA reseptör blokajı için yeterli gözükmesine rağmen, muhtemelen MeHg'nın doğrudan eritrosit içine girerek enzimatik protein olmayan sülfidril (NPSH), lipit ve proteinlerin oksidatif hasarına neden olmaktadır [215]. Böylece eritrosit içindeki MeHg'nın membran bütünlüğünü bozmasına bağlı olarak hemolizi, GSH rejenerasyonundan bağımsız bir toksik etki ile artırdığı düşünülmektedir. Eritrositin 50 µg/L ve 100 µg/L MeHg maruziyeti literatürde bildirilen maksimum maruziyet olan 48,38 µg/L'dan yüksektir [3].

6. SONUÇ

1. *İn vitro* koşullarda MeHg ile NMDA/GluN2B reseptörün uyarılması, eritrosit içine aşırı kalsiyum akışına ve oksidatif strese neden olmaktadır.

2. NMDA/GluN2B'nin özgün antagonisti Li_2CO_3, ortalama 5,8 µg/L MeHg toksisitesine karşı maruziyetten 6 saat sonra tam koruma sağlamakta, maruziyetten 24 saat sonra 5 µg/L üzerindeki konsantrasyonlarda koruma azalmaktadır. Bu bulgular, EPA'nın toksik etki görülmemesi için kan MeHg değerlerinin 5,8 µg/L'nin altında olması önerisini desteklemektedir.

3. Düşük MeHg dozlarında NMDA/GluN2B'nin özgün antagonisti Li_2CO_3'ın eritrositleri hemolizden koruması eritrosit GSH miktarı ile doğrudan bağlantılıdır.

4. Yüksek dozda MeHg maruziyetinde Li_2CO_3 uygulaması, antioksidan kapasiteyi yükseltmesine rağmen MeHg'nın doğrudan eritrosit içine girerek hemolize sebebiyet vermesini önleyememektedir.

5. MeHg toksisitesinde AMPA reseptörünün rolü olmadığı anlaşılmıştır.

6. *İn vitro* koşullarda ortama tek başına terapötik dozlarda Li ilavesi MeHg'den farklı bir mekanizma ile (muhtemelen SLC) hemolize sebep olmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Berglund, M., Lind, B., Björnberg, K. A., Palm, B., Einarsson, Ö. & Vahter, M. (2005). Inter-individual variations of human mercury exposure biomarkers: a cross-sectional assessment. *Environmental Health. 4(1),* 20.

2. World Health Organization (WHO), (1990) International Program on Chemical Safety, Environmental methylmercury: health criteria 101. Geneva: World Health Organization.

3. Silva-Filho, R., Santos, N., Santos, M.C., Nunes, Á., Pinto, R., Marinho, C., Lima, T., Fernandes, M.P., Santos, J.C.C. and Leite, A.C.R. 2021. Impact of environmental mercury exposure on the blood cells oxidative status of fishermen living around Mundaú lagoon in Maceió – Alagoas (AL), Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety 219,* 112337.

4. Ahmad, S. and Mahmood, R. 2019. Mercury chloride toxicity in human erythrocytes: enhanced generation of ROS and RNS, hemoglobin oxidation, impaired antioxidant power, and inhibition of plasma membrane redox system. *Environmental Science and Pollution Research 26(6),* 5645-5657.

5. Föller, M., Mahmud, H., Gu, S., Kucherenko, Y., Gehring, E.-M., Shumilina, E., Floride, E., Sprengel, R. and Lang, F. 2009. Modulation of suicidal erythrocyte cation channels by an AMPA antagonist. *Journal of Cellular and Molecular Medicine 13(9b),* 3680-3686.

6. Maekawa, R., Muto, H., Hatayama, M. and Aruga, J. 2021. Dysregulation of erythropoiesis and altered erythroblastic NMDA receptor-mediated calcium influx in Lrfn2-deficient mice. *PLOS ONE 16(1),* e0245624.

7. İnternet: World Health Agency (WHO). (2024). Mercury and Health. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health. adresinden 19.09.2025'te alınmıştır.

8. Özbolat, G., Tuli, A. 2016. Ağır metal toksisitesinin insan sağlığına etkileri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi 25(4),* 502-521.

9. World Health Organization (WHO), (2008). UNEP Guidance for Identifying Populations at Risk from Mercury Exposure. Geneva, Switzerland.

10. Fitzgerald, W.F. and Clarkson, T.W. 1991. Mercury and monomethylmercury: present and future concerns. *Environmental health perspectives 96,* 159-166.

11. United States Geological Survey (USGS), (2020). Mineral commodity summaries, 200.

12. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2022. Toxicological Profile for Mercury, US Department of Health and Human Services, Public Health Service Atlanta.

13. Clarkson, T.W., Magos, L. 2006. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Critical reviews in toxicology 36(8),* 609-662.

14. Cariccio, V.L., Samà, A., Bramanti, P. and Mazzon, E. 2019. Mercury Involvement in Neuronal Damage and in Neurodegenerative Diseases. *Biological Trace Element Research 187(2),* 341-356.

15. McKelvey, W., Jeffery, N., Clark, N., Kass, D. and Parsons, P.J. 2011. Population-Based Inorganic Mercury Biomonitoring and the Identification of Skin Care Products as a Source of Exposure in New York City. *Environmental Health Perspectives 119(2),* 203-209.

16. DeVito, S.C. and Brooks, W.E. (2013) *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, pp*. 1-26.

17. Clarkson, T.W. 1997. The toxicology of mercury. *Critical reviews in clinical laboratory sciences 34(4),* 369-403.

18. Ye, B.-J., Kim, B.-G., Jeon, M.-J., Kim, S.-Y., Kim, H.-C., Jang, T.-W., Chae, H.-J., Choi, W.-J., Ha, M.-N. and Hong, Y.-S. 2016a. Evaluation of mercury exposure level, clinical diagnosis and treatment for mercury intoxication. *Annals of occupational and environmental medicine 28(1),* 5.

19. Clarkson, T.W., Magos, L. and Myers, G.J. 2003. The toxicology of mercury—current exposures and clinical manifestations. *New England Journal of Medicine 349(18),* 1731-1737.

20. Yılmaz, H., Tutkun, E., Demiralp, K.Ö., Yılmaz, F.M., Aliyev, V., Söylemezoğlu, T. 2015. Exposure to mercury among dental health workers in Turkey: Correlation with amalgam work and own fillings. *Toxicology and Industrial Health 31(10), 951-954.*

21. Ritchie, K., Burke, F., Gilmour, W., Macdonald, E., Dale, I., Hamilton, R., McGowan, D., Binnie, V., Collington, D. and Hammersley, R. 2004. Mercury vapour levels in dental practices and body mercury levels of dentists and controls. *British Dental Journal 197(10),* 625-632.

22. Woods, J.S., Martin, M.D., Leroux, B.G., DeRouen, T.A., Leitão, J.G., Bernardo, M.F., Luis, H.S., Simmonds, P.L., Kushleika, J.V. and Huang, Y. 2007. The contribution of dental amalgam to urinary mercury excretion in children. *Environmental Health Perspectives 115(10),* 1527-1531.

23. Ballatori, N. and Clarkson, T.W. 1985. Biliary secretion of glutathione and of glutathione-metal complexes. *Toxicological Sciences 5(5),* 816-831.

24. Ballatori, N., Gatmaitan, Z. and Truong, A.T. 1995. Impaired biliary excretion and whole body elimination of methylmercury in rats with a congenital defect in biliary glutathione excretion. *Hepatology 22(5),* 1469-1473.

25. Syversen, T. and Kaur, P. 2012. The toxicology of mercury and its compounds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 26(4),* 215-226.

26. Warfvinge, K. 2000. Mercury distribution in the neonatal and adult cerebellum after mercury vapor exposure of pregnant squirrel monkeys. *Environmental Research 83(2),* 93-101.

27. Jeong, K.S., Park, H., Ha, E., Shin, J., Hong, Y.-C., Ha, M., Park, H., Kim, B.-N., Lee, B. and Lee, S.-J. 2017. High maternal blood mercury level is associated with low verbal IQ in children. *Journal of Korean Medical Science 32(7),* 1097.

28. Kim, B., Shah, S., Park, H.-S., Hong, Y.-C., Ha, M., Kim, Y., Kim, B.-N., Kim, Y. and Ha, E.-H. 2020. Adverse effects of prenatal mercury exposure on neurodevelopment during the first 3 years of life modified by early growth velocity and prenatal maternal folate level. *Environmental Research 191*, 109909.

29. Park, J.-D., Zheng, Wei 2012. Human exposure and health effects of inorganic and elemental mercury. *Journal of preventive medicine and public health 45(6),* 344.

30. Ufelle, A.C. and Barchowsky, A. 2019. Toxic effects of metals. *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons,* 33-20.

31. Berlin, M., Fazackerley, J., Nordberg, G. and Kand, M. 1969. The uptake of mercury in the brains of mammals exposed to mercury vapor and to mercuric salts. *Archives of Environmental Health: An International Journal 18(5),* 719-729.

32. von Burg, R. 1995. Inorganic mercury. *Journal of Applied Toxicology 15(6),* 483-493.

33. Llop, S., Murcia, M., Amorós, R., Julvez, J., Santa-Marina, L., Soler-Blasco, R., Rebagliato, M., Iñiguez, C., Aguinagalde, X. and Iriarte, G. 2020. Postnatal exposure to mercury and neuropsychological development among preschooler children. *European journal of epidemiology 35(3),* 259-271.

34. Cappelletti, S., Piacentino, D., Fineschi, V., Frati, P., D'Errico, S. and Aromatario, M. 2019. Mercuric chloride poisoning: symptoms, analysis, therapies, and autoptic findings. A review of the literature. *Critical reviews in toxicology 49(4),* 329-341.

35. Weldon, M.M., Smolinski, M.S., Maroufi, A., Hasty, B.W., Gilliss, D.L., Boulanger, L.L., Balluz, L.S. and Dutton, R.J. 2000. Mercury poisoning associated with a Mexican beauty cream. *Western Journal of Medicine 173(1),* 15.

36. Slowik, J. and Cwirko, H. 2025. The impact of mercury on human health. *Medical Science Pulse 19(1).*

37. Fernandes Azevedo, B., Barros Furieri, L., Peçanha, F.M., Wiggers, G.A., Frizera Vassallo, P., Ronacher Simões, M., Fiorim, J., Rossi de Batista, P., Fioresi, M., Rossoni, L., Stefanon, I., Alonso, M.J., Salaices, M. and Valentim Vassallo, D. 2012. Toxic Effects of Mercury on the Cardiovascular and Central Nervous Systems. *BioMed Research International 2012(1),* 949048.

38. Kungolos, A., Aoyama, I. and Muramoto, S. 1999. Toxicity of organic and inorganic mercury to Saccharomyces cerevisiae. *Ecotoxicology and environmental safety 43(2),* 149-155

39. Liu, G., Cai, Y., O'Driscoll, N., Feng, X. and Jiang, G. (2011) *Environmental Chemistry and Toxicology of Mercury,* pp. 1-12.

40. Selin, N.E. 2009. Global biogeochemical cycling of mercury: a review. *Annual review of environment and resources 34,* 43-63.

41. Beckers, F. and Rinklebe, J. 2017. Cycling of mercury in the environment: Sources, fate, and human health implications: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology 47(9),* 693-794.

42. Ufelle, A.C. and Barchowsky, A. (2021) Casarett & Doull's Essentials of Toxicology, 4e. Klaassen, C.D. and Watkins, J.B. (eds), McGraw Hill, New York, NY.

43. Baeyens, W., Leermakers, M., Papina, T., Saprykin, A., Brion, N., Noyen, J., De Gieter, M., Elskens, M. and Goeyens, L. 2003. Bioconcentration and biomagnification of mercury and methylmercury in North Sea and Scheldt estuary fish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology 45(4),* 498-508.

44. Lehnherr, I. 2014. Methylmercury biogeochemistry: a review with special reference to Arctic aquatic ecosystems. *Environmental Reviews 22(3),* 229-243.

45. Ambrose, J.L., Gratz, L.E., Jaffe, D.A., Campos, T., Flocke, F.M., Knapp, D.J., Stechman, D.M., Stell, M., Weinheimer, A.J. and Cantrell, C.A. 2015. Mercury emission ratios from coal-fired power plants in the Southeastern United States during NOMADSS. *Environmental science & technology 49(17),* 10389-10397.

46. Holzman, D.C. 2010. Mercury emissions not shrinking as forecast. *Environmental Health Perspecives 118(5),* A198.

47. Liang, S., Wang, Y., Cinnirella, S. and Pirrone, N. 2015. Atmospheric mercury footprints of nations. *Environmental science & technology 49(6),* 3566-3574.

48. Wiener, J.G., Bodaly, R., Brown, S.S., Lucotte, M., Newman, M.C., Porcella, D.B., Reash, R.J. and Swain, E.B. 2007. Monitoring and evaluating trends in methylmercury accumulation in aquatic biota. Ecosystem responses to mercury contamination: *Indicators of change,* 87-122.

49. European Food Safety Authority. 2004. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to mercury and methylmercury in food. *EFSA Journal 2(3),* 34.

50. Díez, S. 2008. Human health effects of methylmercury exposure. *Reviews of environmental contamination and toxicology,* 111-132.

51. Castoldi, A.F., Barni, S., Turin, I., Gandini, C. and Manzo, L. 2000. Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. *Journal of neuroscience research 59(6),* 775-787.

52. Esposito, M., De Roma, A., La Nucara, R., Picazio, G. and Gallo, P. 2018. Total mercury content in commercial swordfish (Xiphias gladius) from different FAO fishing areas. *Chemosphere 197,* 14-19.

53. Junqué, E., Garí, M., Llull, R.M. and Grimalt, J.O. 2018. Drivers of the accumulation of mercury and organochlorine pollutants in Mediterranean lean fish and dietary significance. *Science of the Total Environment 634*, 170-180.

54. Crespo-Lopez, M.E., Augusto-Oliveira, M., Lopes-Araújo, A., Santos-Sacramento, L., Takeda, P.Y., de Matos Macchi, B., do Nascimento, J.L.M., Maia, C.S., Lima, R.R. and Arrifano, G.P. 2021. Mercury: What can we learn from the Amazon? *Environment International 146,* 106223.

55. Bakir, F., Damluji, S.F., Amin-Zaki, L., Murtadha, M., Khalidi, A., Al-Rawi, N.Y., Tikriti, S., Dhahir, H.I., Clarkson, T.W., Smith, J.C. and Doherty, R.A. 1973. Methylmercury Poisoning in Iraq. *Science 181(4096),* 230-241.

56. Marsh, D.O., Clarkson, T.W., Cox, C., Myers, G.J., Amin-Zaki, L. and Al-Tikriti, S. 1987. Fetal methylmercury poisoning. Relationship between concentration in single strands of maternal hair and child effects. *Archieve Neurology Journal 44(10),* 1017-1022.

57. Environmental Protection Agency, (US EPA). 2001. Methylmercury (MeHg)(casrn 22967-92-6). Integrated Risk Information System, Washington, DC.

58. Tan, Y.-M., Sobus, J., Chang, D., Tornero-Velez, R., Goldsmith, M., Pleil, J. and Dary, C. 2012. Reconstructing human exposures using biomarkers and other "clues". *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B 15(1),* 22-38.

59. Benford, D.J., Hanley, A.B., Bottrill, K., Oehlschlager, S., Balls, M., Branca, F., Castegnaro, J.J., Descotes, J., Hemminiki, K. and Lindsay, D. 2000. Biomarkers as predictive tools in toxicity testing: the report and recommendations of ECVAM workshop 40. *Alternatives to laboratory animals 28(1),* 119-131.

60. Bates, M.N. 2006. Mercury amalgam dental fillings: An epidemiologic assessment. *International Journal of Hygiene and Environmental Health 209(4),* 309-316.

61. Clarkson, T.W., Vyas, J.B. and Ballatori, N. 2007. Mechanisms of mercury disposition in the body. *American journal of industrial medicine 50(10),* 757-764.

62. Magos, L. (1997) Metal ions in biological systems: Volume 34: Mercury and its effects on environment and biology. Sigel, A., Sigel, H. (ed), pp. 321-370.

63. Bose-O'Reilly, S., McCarty, K.M., Steckling, N. and Lettmeier, B. 2010. Mercury Exposure and Children's Health. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care 40(8),* 186-215.

64. National Research Council. (2000) Toxicological effects of methylmercury.

65. Carneiro, M.F.H., Grotto, D. and Barbosa Jr, F. 2014. Inorganic and Methylmercury Levels in Plasma are Differentially Associated with Age, Gender, and Oxidative Stress

Markers in a Population Exposed to Mercury Through Fish Consumption. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A 77(1-3)*, 69-79.

66. Cooke, G.M. 2014. Biomonitoring of Human Fetal Exposure to Environmental Chemicals in Early Pregnancy. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B 17(4),* 205-224

67. Brodkin, E., Copes, R., Mattman, A., Kennedy, J., Kling, R. and Yassi, A. 2007. Lead and mercury exposures: interpretation and action. *CMAJ : Canadian Medical Association journal 176(1),* 59-63.

68. Stern, A.H. 2005. A revised probabilistic estimate of the maternal methyl mercury intake dose corresponding to a measured cord blood mercury concentration. *Environmental health perspectives 113(2)*, 155-163.

69. Seccatore, J., Veiga, M., Origliasso, C., Marin, T. and De Tomi, G. 2014. An estimation of the artisanal small-scale production of gold in the world. *Science of the Total Environment 496*, 662-667.

70. Nakazawa, K., Nagafuchi, O., Kawakami, T., Inoue, T., Yokota, K., Serikawa, Y., Cyio, B. and Elvince, R. 2016. Human health risk assessment of mercury vapor around artisanal small-scale gold mining area, Palu city, Central Sulawesi, Indonesia. *Ecotoxicology and Environmental Safety 124,* 155-162

71. Ohlander, J., Huber, S.M., Schomaker, M., Heumann, C., Schierl, R., Michalke, B., Jenni, O.G., Caflisch, J., Muñoz, D.M. and von Ehrenstein, O.S. 2016. Mercury and neuromotor function among children in a rural town in Chile. *International journal of occupational and environmental health 22(1),* 27-35.

72. İnternet : Resmî Gazete, Kimyasal Maddelerle Çalışmalarda Sağlık ve Güvenlik Önlemleri Hakkında Yönetmelik 2013 https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=18709&MevzuatTur=7&MevzuatTertip=5 adresinden 08.10.2025'te alınmıştır.

73. İnternet : New Jersey Department of Health, Hazardous Substance Fact Sheet. 2009. https://www.nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/1183.pdf adresinden 08.10.2025'te alınmıştır.

74. International Labour Organization (ILO), WHO (2017). International Chemical Safety Card (ICSC) 0056: Mercury. Geneva: ILO/WHO.

75. İnternet : NIOSH 6009. https://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/6009.pdf. Adresinden 08.10.2025'te alınmıştır

76. İnternet : OSHA. Occupational Safety and Health Administration, Mercury (Vapor).https://www.osha.gov/chemicaldata/505 adresinden 08.10.2025'te alınmıştır.

77. Park, J.-S., Jung, S.-Y., Son, Y.-J., Choi, S.-J., Kim, M.-S., Kim, J.-G., Park, S.-H., Lee, S.-M., Chae, Y.-Z. and Kim, M.-Y. 2011. Total mercury, methylmercury and

ethylmercury in marine fish and marine fishery products sold in Seoul, Korea. *Food additives and contaminants: Part B 4(4),* 268-274.

78. Dórea, J.G., Farina, M. and Rocha, J.B. 2013. Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury. *Journal of Applied Toxicology 33(8),* 700-711.

79. Ajsuvakova, O.P., Tinkov, A.A., Aschner, M., Rocha, J.B., Michalke, B., Skalnaya, M.G., Skalny, A.V., Butnariu, M., Dadar, M. and Sarac, I. 2020. Sulfhydryl groups as targets of mercury toxicity. *Coordination chemistry reviews 417,* 213343.

80. Clarkson, T. 1993. Molecular and ionic mimicry of toxic metals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology 33(1)*, 545-571.

81. Ballatori, N. 2002. Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environmental Health Perspectives 110(suppl 5),* 689-694.

82. Bridges, C.C. and Zalups, R.K. 2017. Mechanisms involved in the transport of mercuric ions in target tissues. *Archieves of Toxicology 91(1),* 63-81.

83. You, C.-H., Kim, B.-G., Jo, E.-M., Kim, G.-Y., Yu, B.-C., Hong, M.-G., Kim, D.-S. and Hong, Y.-S. 2012. The relationship between the fish consumption and blood total/methyl-mercury concentration of costal area in Korea. *Neurotoxicology 33(4)*, 676-682

84. Bradley, M.A., Barst, B.D. and Basu, N. 2017. A Review of Mercury Bioavailability in Humans and Fish. *International Journal of Environmental Research and Public Health 14(2),* 169.

85. Clifton II, J.C. 2007. Mercury exposure and public health. *Pediatric clinics of north america 54(2), 237*. e231-237. e245.

86. Sakamoto, M., Murata, K., Kakita, A. and Sasaki, M. 2012. A review of mercury toxicity with special reference to methylmercury. *Environmental Chemistry and Toxicology of Mercury,* 501-516.

87. Inouye, M. and Kajiwara, Y. 1988. Developmental disturbances of the fetal brain in guinea-pigs caused by methylmercury. *Archives of toxicology 62(1*), 15-21.

88. Syversen, T.L. 1974. Distribution of mercury in enzymatically characterized subcellular fractions from the developing rat brain after injections of methyemercuric cheoride and diethylmercury. *Biochemical Pharmacology 23(21),* 2999-3007.
89. Dutczak, W. and Ballatori, N. 1992. gamma-Glutamyltransferase-dependent biliary-hepatic recycling of methyl mercury in the guinea pig. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 262(2),* 619-623.

90. Dutczak, W.J. and Ballatori, N. 1994. Transport of the glutathione-methylmercury complex across liver canalicular membranes on reduced glutathione carriers. *Journal of Biological Chemistry 269(13),* 9746-9751

91. Alexander, J. and Aaseth, J. 1982. Organ distribution and cellular uptake of methyl mercury in the rat as influenced by the intra-and extracellular glutathione concentration. *Biochemical Pharmacology 31(5),* 685-690.

92. Rowland, I., Robinson, R. and Doherty, R. 1984. Effects of diet on mercury metabolism and excretion in mice given methylmercury: role of gut flora. *Archives of Environmental Health: An International Journal 39(6),* 401-408.

93. Suda, I. and Hirayama, K. 1992. Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by hydroxyl radical produced from rat liver microsomes. *Archives of toxicology 66(6),* 398-402.

94. Barregard, L., Horvat, M. and Schutz, A. 1994. No indication of in vivo methylation of inorganic mercury in chloralkali workers. *Environmental Research 67(2),* 160-167.

95. Tchounwou, P.B., Ayensu, W.K., Ninashvili, N. and Sutton, D. 2003. Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. *Environmental Toxicology: An International Journal 18(3),* 149-175.

96. Eto, K. 1997. Pathology of Minamata disease. *Toxicologic Pathology 25(6),* 614-623.

97. Harada, M. 1995. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Critical reviews in toxicology 25(1),* 1-24.

98. Castoldi, A.F., Coccini, T., Ceccatelli, S. and Manzo, L. 2001. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain research bulletin 55(2),* 197-203.

99. Kunimoto, M. 1994. Methylmercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in primary culture. *Biochemical and biophysical research communications 204(1),* 310-317.

100. Soldin, O.P., O'Mara, D.M. and Aschner, M. 2008. Thyroid hormones and methylmercury toxicity. *Biological trace element research 126(1),* 1-12.

101. Grandjean, P., Weihe, P., White, R.F., Debes, F., Araki, S., Yokoyama, K., Murata, K., Sørensen, N., Dahl, R. and Jørgensen, P.J. 1997. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicology and teratology 19(6)*, 417-428.

102. Davidson, P.W., Myers, G.J., Cox, C., Axtell, C., Shamlaye, C., Sloane-Reeves, J., Cernichiari, E., Needham, L., Choi, A. and Wang, Y. 1998. Effects of prenatal and postnatal methylmercury exposure from fish consumption on neurodevelopment: outcomes at 66 months of age in the Seychelles Child Development Study. *Jama 280(8),* 701-707.

103. Crump, K.S., Kjellström, T., Shipp, A.M., Silvers, A. and Stewart, A. 1998. Influence of prenatal mercury exposure upon scholastic and psychological test performance: benchmark analysis of a New Zealand cohort. *Risk Analysis 18(6),* 701-713.

104. Myers, G.J., Thurston, S.W., Pearson, A.T., Davidson, P.W., Cox, C., Shamlaye, C.F., Cernichiari, E. and Clarkson, T.W. 2009. Postnatal exposure to methyl mercury from fish consumption: a review and new data from the Seychelles Child Development Study. *Neurotoxicology 30(3),* 338-349.

105. Ha, M., Kwon, H.-J., Lim, M.-H., Jee, Y.-K., Hong, Y.-C., Leem, J.-H., Sakong, J., Bae, J.-M., Hong, S.-J. and Roh, Y.-M. 2009. Low blood levels of lead and mercury and symptoms of attention deficit hyperactivity in children: a report of the children's health and environment research (CHEER*). Neurotoxicology 30(1),* 31-36.

106. Cheuk, D. and Wong, V. 2006. Attention-deficit hyperactivity disorder and blood mercury level: a case-control study in Chinese children. *Neuropediatrics 37(04),* 234-240

107. Torrente, M., Colomina, M.T. and Domingo, J.L. 2005. Metal concentrations in hair and cognitive assessment in an adolescent population. *Biological trace element research 104(3),* 215-221.

108. Balali-Mood, M., Naseri, K., Tahergorabi, Z., Khazdair, M.R. and Sadeghi, M. 2021. Toxic mechanisms of five heavy metals: mercury, lead, chromium, cadmium, and arsenic. *Frontiers in pharmacology 12,* 643972.

109. Abbott, L.C. and Nigussie, F. 2021. Mercury toxicity and neurogenesis in the mammalian brain. *International Journal of Molecular Sciences 22(14),* 7520.

110. Pedersen, E.B., Jørgensen, M.E., Pedersen, M.B., Siggaard, C., Sørensen, T.B., Mulvad, G., Hansen, J.C., Asmund, G. and Skjoldborg, H. 2005. Relationship Between Mercury in Blood and 24-h Ambulatory Blood Pressure in Greenlanders and Danes*. *American Journal of Hypertension 18(5),* 612-618.

111. Hong, Y.-S., Kim, Y.-M. and Lee, K.-E. 2012. Methylmercury exposure and health effects. *Journal of preventive medicine and public health 45(6),* 353.

112. Brown, H.A., Thomas, P.G. and Lindsley, C.W. 2017. Targeting phosholipase D in cancer, infection and neurodegenerative disorders. Nature reviews *Drug discovery 16(5)*, 351-367.

113. Carty, A. 1979. *The chemistry of mercury in biological systems.* The biogeochemistry of mercury in the environment.

114. Kershaw, T.G., Dhahir, P.H. and Clarkson, T.W. 1980. The relationship between blood levels and dose of methylmercury in man. *Archives of Environmental Health: An International Journal 35(1),* 28-36.

115. Birke, G., Johnels, A.G., Plantin, L.-O., Sjöstrand, B., Skerfving, S. and Westermark, T. 1972. Studies on humans exposed to methyl mercury through fish consumption. *Archives of Environmental Health: An International Journal 25(2*), 77-91.

116. Nierenberg, D.W., Nordgren, R.E., Chang, M.B., Siegler, R.W., Blayney, M.B., Hochberg, F., Toribara, T.Y., Cernichiari, E. and Clarkson, T. 1998. Delayed

Cerebellar Disease and Death after Accidental Exposure to Dimethylmercury. *New England Journal of Medicine 338(23)*, 1672-1676.

117. James, R.C., Roberts, S.M. and Williams, P.L. 2000. General principles of toxicology. Principles of toxicology: Environmental and industrial applications, 1-34.

118. Yoshida, H., Kawane, K., Koike, M., Mori, Y., Uchiyama, Y. and Nagata, S. 2005. Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature 437(7059),* 754-758.

119. Diez-Silva, M., Dao, M., Han, J., Lim, C.-T. and Suresh, S. 2010. Shape and biomechanical characteristics of human red blood cells in health and disease. *MRS bulletin 35(5)*, 382-388.

120. Mohandas, N. and Gallagher, P.G. 2008. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood 112(10)*, 3939-3948.

121. Li, H. and Lykotrafitis, G. 2014. Erythrocyte membrane model with explicit description of the lipid bilayer and the spectrin network. *Biophysical journal 107(3),* 642-653.

122. Gallagher, P.G., Joiner, C.H., Steinberg, M., Forget, B., Higgs, D. and Weatherall, D. 2009. The erythrocyte membrane. *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Managemen*t (ed. Steinberg M, FB, Higgs D, Weatherall D), 158-184.

123. Quintanar-Escorza, M., González-Martínez, M., del Pilar, I.-O.M. and Calderón-Salinas, J. 2010. Oxidative damage increases intracellular free calcium [Ca^{2+}] i concentration in human erythrocytes incubated with lead. *Toxicology in Vitro 24(5),* 1338-1346.

124. Telen, M. and Kaufman, R. 2004. Part II: normal hematologic system, the mature erythrocyte. *Clinical Hematology,* 217-248.

125. Hinderling, P.H. 1997. Red blood cells: a neglected compartment in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacological reviews 49(3),* 279-295.
126. Çimen, M.B. 2008. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica chimica acta 390(1-2)*, 1-11.

127. Rodwell, V.W. and Kennelly, P.J. 2003. *Proteins: Myoglobin & Hemoglobin* 6.a LANGE medical book, 40.

128. Łapiński, R., Siergiejuk, M., Worowska, A. and Gacko, M. 2014. Oxidants and antioxidants of erythrocytes. *Progress in Health Sciences 4(1),* 211-219.
129. Chatzinikolaou, P.N., Margaritelis, N.V., Paschalis, V., Theodorou, A.A., Vrabas, I.S., Kyparos, A., D'Alessandro, A. and Nikolaidis, M.G. 2024. Erythrocyte metabolism. *Acta Physiologica 240(3*), e14081.

130. Gordon-Smith, T. 2013. Structure and function of red and white blood cells. *Medicine 41(4),* 193-199.

131. Benesch, R. and Benesch, R.E. 1967. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochemical and Biophysical Research Communications 26(2),* 162-167.

132. Giardina, B. 2022. Hemoglobin: Multiple molecular interactions and multiple functions. An example of energy optimization and global molecular organization. Molecular Aspects of Medicine 84, 101040.

133. Dolopikou, C.F., Kourtzidis, I.A., Margaritelis, N.V., Vrabas, I.S., Koidou, I., Kyparos, A., Theodorou, A.A., Paschalis, V. and Nikolaidis, M.G. 2020. Acute nicotinamide riboside supplementation improves redox homeostasis and exercise performance in old individuals: a double-blind cross-over study. *European Journal of Nutrition 59(2)*, 505-515.

134. Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M.M.C., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N.-M., Krüger, A., Tauqeer Alam, M., Keller, M.A., Breitenbach, M., Brindle, K.M., Rabinowitz, J.D. and Ralser, M. 2015. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews 90(3),* 927-963.

135. Luzzatto, L., Ally, M. and Notaro, R. 2020. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood 136(11),* 1225-1240.

136. Yang, L., Zhang, Y., Wang, F., Luo, Z., Guo, S. and Strähle, U. 2020. Toxicity of mercury: Molecular evidence. *Chemosphere 245*, 125586.

137. Murphy, M.P., Bayir, H., Belousov, V., Chang, C.J., Davies, K.J.A., Davies, M.J., Dick, T.P., Finkel, T., Forman, H.J., Janssen-Heininger, Y., Gems, D., Kagan, V.E., Kalyanaraman, B., Larsson, N.-G., Milne, G.L., Nyström, T., Poulsen, H.E., Radi, R., Van Remmen, H., Schumacker, P.T., Thornalley, P.J., Toyokuni, S., Winterbourn, C.C., Yin, H. and Halliwell, B. 2022. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature Metabolism 4(6),* 651-662.

138. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine,* Oxford University Press.

139. Bright, A., Ofosu, P.M., Faiza, F. and Omar, K. 2022. Analysis Of Redox Status At The Erythrocyte Level. *bioRxiv, 2022.2005*..493368.

140. Sies, H., Berndt, C. and Jones, D.P. 2017. Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry 86(Volume 86),* 715-748.

141. Johnson, R.M., Goyette Jr, G., Ravindranath, Y. and Ho, Y.-S. 2005. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H2O2 levels in erythrocytes. *Free Radical Biology and Medicine 39(11),* 1407-1417.

142. Edwards, C. and Fuller, J. 1996. Oxidative stress in erythrocytes. *Comparative Haematology International 6(1),* 24-31.

143. Taylor, J.P. and Tse, H.M. 2021. The role of NADPH oxidases in infectious and inflammatory diseases. *Redox Biology 48,* 102159.

144. Denicola, A., Freeman, B.A., Trujillo, M. and Radi, R. 1996. Peroxynitrite Reaction with Carbon Dioxide/Bicarbonate: Kinetics and Influence on Peroxynitrite-Mediated Oxidations. *Archives of Biochemistry and Biophysics 333(1),* 49-58.

145. Signorelli, S., Möller, M.N., Coitiño, E.L. and Denicola, A. 2011. Nitrogen dioxide solubility and permeation in lipid membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics 512(2)*, 190-196.

146. Möller, M.N., Orrico, F., Villar, S.F., López, A.C., Silva, N., Donzé, M., Thomson, L. and Denicola, A. 2023. Oxidants and Antioxidants in the Redox Biochemistry of Human Red Blood Cells. *ACS Omega 8(1),* 147-168

147. Romero, N., Denicola, A., Souza, J.M. and Radi, R. 1999. Diffusion of Peroxynitrite in the Presence of Carbon Dioxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics 368(1),* 23-30.

148. Veskoukis, A.S., Paschalis, V., Kyparos, A. and Nikolaidis, M.G. 2018. Administration of exercise-conditioned plasma alters muscle catalase kinetics in rat: An argument for in vivo-like Km instead of in vitro-like Vmax. *Redox Biology 15,* 375-379.

149. Low, F.M., Hampton, M.B., Peskin, A.V. and Winterbourn, C.C. 2006. Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. *Blood 109(6)*, 2611-2617.

150. Putnam, C.D., Arvai, A.S., Bourne, Y. and Tainer, J.A. 2000. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism11Edited by R. Huber. Journal of Molecular Biology 296(1), 295-309.

151. Kirkman, H.N., Rolfo, M., Ferraris, A.M. and Gaetani, G.F. 1999. Mechanisms of Protection of Catalase by NADPH: KINETICS AND STOICHIOMETRY. *Journal of Biological Chemistry 274(20)*, 13908-13914.

152. Orrico, F., Möller, M.N., Cassina, A., Denicola, A. and Thomson, L. 2018. Kinetic and stoichiometric constraints determine the pathway of H2O2 consumption by red blood cells. *Free Radical Biology and Medicine 121*, 231-239.

153. Möller, M.N., Orrico, F., Villar, S.F., López, A.C., Silva, N., Donzé, M., Thomson, L. and Denicola, A. 2023. Oxidants and Antioxidants in the Redox Biochemistry of Human Red Blood Cells. *ACS Omega 8(1)*, 147-168

154. van ‘t Erve, T.J., Wagner, B.A., Ryckman, K.K., Raife, T.J. and Buettner, G.R. 2013. The concentration of glutathione in human erythrocytes is a heritable trait. *Free Radical Biology and Medicine 65,* 742-749.

155. Lu, S.C. 2013. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1830(5)*, 3143-3153.

156. Kim-Shapiro, D.B., Gladwin, M.T., Patel, R.P. and Hogg, N. 2005. The reaction between nitrite and hemoglobin: the role of nitrite in hemoglobin-mediated hypoxic vasodilation. *Journal of Inorganic Biochemistry 99(1)*, 237-246.

157. Jensen, F.B. 2009. The dual roles of red blood cells in tissue oxygen delivery: oxygen carriers and regulators of local blood flow. *Journal of Experimental Biology 212(21),* 3387-3393.

158. Ellinger, J.J., Lewis, I.A. and Markley, J.L. 2011. Role of aminotransferases in glutamate metabolism of human erythrocytes. *Journal of Biomolecular NMR 49(3),* 221-229.

159. Giustarini, D., Milzani, A., Dalle-Donne, I. and Rossi, R. 2008. Red blood cells as a physiological source of glutathione for extracellular fluids. *Blood Cells, Molecules, and Diseases 40(2),* 174-179.

160. Margaritelis, N.V., Chatzinikolaou, P.N., Bousiou, F.V., Malliou, V.J., Papadopoulou, S.K., Potsaki, P., Theodorou, A.A., Kyparos, A., Geladas, N.D., Nikolaidis, M.G. and Paschalis, V. 2020. Dietary Cysteine Intake is Associated with Blood Glutathione Levels and Isometric Strength. *International journal of sports medicine 42(05*), 441-447.

161. Franco, R., Navarro, G. and Martínez-Pinilla, E. 2019. Antioxidant defense mechanisms in erythrocytes and in the central nervous system. *Antioxidants 8(2),* 46.

162. Mohanty, J.G., Nagababu, E. and Rifkind, J.M. 2014. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Frontiers in physiology 5,* 84.

163. Rumsey, S.C., Kwon, O., Xu, G.W., Burant, C.F., Simpson, I. and Levine, M. 1997. Glucose Transporter Isoforms GLUT1 and GLUT3 Transport Dehydroascorbic Acid*. *Journal of Biological Chemistry 272(30),* 18982-18989.

164. Guizouarn, H. and Allegrini, B. 2020. Erythroid glucose transport in health and disease. Pflügers Archiv - *European Journal of Physiology 472(9),* 1371-1383.

165. Zhao, P., Geyer, R.R., Salameh, A.I., Wass, A.B., Taki, S., Huffman, D.E., Meyerson, H.J., Gros, G., Occhipinti, R. and Moss, F.J. 2020. Role of channels in the oxygen permeability of red blood cells. *Biorxiv, 2008*. 2028.265066

166. Jennings, M.L. 2021. Cell physiology and molecular mechanism of anion transport by erythrocyte band 3/AE1. *American Journal of Physiology-Cell Physiology 321(6),* C1028-C1059.

167. Nur, E., Verwijs, M., de Waart, D.R., Schnog, J.-J.B., Otten, H.-M., Brandjes, D.P., Biemond, B.J. and Elferink, R.P.J.O. 2011. Increased efflux of oxidized glutathione (GSSG) causes glutathione depletion and potentially diminishes antioxidant defense in sickle erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1812(11),* 1412-1417.

168. Radosinska, J. and Vrbjar, N. 2021. Erythrocyte Deformability and Na,K-ATPase Activity in Various Pathophysiological Situations and Their Protection by Selected

Nutritional Antioxidants in Humans. *International Journal of Molecular Sciences 22(21),* 11924.

169. Kuchel, P.W. and Shishmarev, D. 2017. Accelerating metabolism and transmembrane cation flux by distorting red blood cells. *Science Advances 3(10),* 1016.

170. Charan, J. and Kantharia, N. 2013. How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics 4(4),* 303-306.

171. Maher, A.D. and Kuchel, P.W. 2003. The Gárdos channel: a review of the Ca2+-activated K+ channel in human erythrocytes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 35(8*), 1182-1197.

172. Ataullakhanov, F.I., Martinov, M.V., Shi, Q. and Vitvitsky, V.M. 2022. Significance of two transmembrane ion gradients for human erythrocyte volume stabilization. *PLOS ONE 17(12),* e0272675.

173. Huisjes, R., Bogdanova, A., Van Solinge, W.W., Schiffelers, R.M., Kaestner, L. and Van Wijk, R. 2018. Squeezing for life–properties of red blood cell deformability. *Frontiers in physiology 9,* 656.

174. Orrico, F., Laurance, S., Lopez, A.C., Lefevre, S.D., Thomson, L., Möller, M.N. and Ostuni, M.A. 2023. Oxidative Stress in Healthy and Pathological Red Blood Cells. *Biomolecules 13(8),* 1262.

175. Thiagarajan, P., Parker, C.J. and Prchal, J.T. 2021. How do red blood cells die? *Frontiers in physiology 12,* 655393.

176. Lang, K., Lang, P., Bauer, C., Duranton, C., Wieder, T., Huber, S. and Lang, F. 2005. Mechanisms of Suicidal Erythrocyte Death. *Cellular Physiology and Biochemistry 15(5)*, 195-202.

177. Kaestner, L., Bogdanova, A. and Egee, S. 2019. Calcium channels and calcium-regulated channels in human red blood cells. *Calcium signaling,* 625-648.

178. Rifkind, J.M. and Nagababu, E. 2013. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. *Antioxidants & redox signaling 18(17),* 2274-2283.

179. Föller, M., Huber, S.M. and Lang, F. 2008. Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB life 60(10),* 661-668.

180. Lew, V.L. and Tiffert, T. 2017. On the Mechanism of Human Red Blood Cell Longevity: Roles of Calcium, the Sodium Pump, PIEZO1, and Gardos Channels. *Front Physiology 8,* 977.

181. Bissinger, R., Bhuyan, A.A.M., Qadri, S.M. and Lang, F. 2019. Oxidative stress, eryptosis and anemia: a pivotal mechanistic nexus in systemic diseases. *The FEBS Journal 286(5),* 826-854.

182. Mandal, D., Baudin-Creuza, V., Bhattacharyya, A., Pathak, S., Delaunay, J., Kundu, M. and Basu, J. 2003. Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic

domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3). *Journal of Biological Chemistry 278(52),* 52551-52558.

183. Mandal, D., Mazumder, A., Das, P., Kundu, M. and Basu, J. 2005. Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry 280(47)*, 39460-39467.

184. Lisovskaya, I.L., Shcherbachenko, I.M., Volkova, R.I. and Tikhonov, V.P. 2008. Modulation of RBC volume distributions by oxidants (phenazine methosulfate and tert-butyl hydroperoxide): Role of Gardos channel activation. *Bioelectrochemistry 73(1),* 49-54.

185. Eisele, K., Lang, P.A., Kempe, D.S., Klarl, B.A., Niemöller, O., Wieder, T., Huber, S.M., Duranton, C. and Lang, F. 2006. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. *Toxicology and applied pharmacology 210(1-2),* 116-122.

186. Farag, M.R. and Alagawany, M. 2018. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. *Chemico-biological interactions 279,* 73-83.
187. Wu, G. 1995a. Prediction of uptake of methyl mercury by rat erythrocytes using a two-compartment model. *Archives of toxicology 70(1),* 34-42.

188. Bridges, C.C. and Zalups, R.K. 2010. Transport of inorganic mercury and methylmercury in target tissues and organs. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B 13(5),* 385-410.

189. Wu, G. 1996a. Methylmercury–cysteine uptake by rat erythrocytes: evidence for several transport systems. *Journal of applied toxicology 16(1),* 77-83.

190. Wu, G. 1995b. Screening of potential transport systems for methyl mercury uptake in rat erythrocytes at 5 by use of inhibitors and substrates. *Pharmacology & toxicology 77(3),* 169-176.

191. Wu, G. 1996b. Uptake of Methylmercury Cysteine by Rat Erythrocytes at Lower Temperature. *Journal of Applied Toxicology 16(2),* 95-102.

192. Ancora, S., Rossi, R., Simplicio, P.D., Lusini, L. and Leonzio, C. 2002. In vitro study of methylmercury in blood of bottlenose dolphins (Tursiops truncatus). Archives of *Environmental Contamination and Toxicology 42(3*), 348-353.

193. Engström, K.S., Strömberg, U., Lundh, T., Johansson, I., Vessby, B., Hallmans, G., Skerfving, S. and Broberg, K. 2008. Genetic variation in glutathione-related genes and body burden of methylmercury. *Environmental health perspectives 116(6),* 734-739.

194. arina, M. and Aschner, M. 2019. Glutathione antioxidant system and methylmercury-induced neurotoxicity: An intriguing interplay. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 1863(12)*, 129285.

195. Harisa, G.I., Mariee, A.D., Abo-Salem, O.M. and Attiaa, S.M. 2014. Erythrocyte nitric oxide synthase as a surrogate marker for mercury-induced vascular damage: The modulatory effects of naringin. *Environmental Toxicology 29(11),* 1314-1322.

196. Barcelos, G.R.M., Grotto, D., Serpeloni, J.M., Angeli, J.P.F., Rocha, B.A., de Oliveira Souza, V.C., Vicentini, J.T., Emanuelli, T., Bastos, J.K. and Antunes, L.M.G. 2011. Protective properties of quercetin against DNA damage and oxidative stress induced by methylmercury in rats. *Archives of toxicology 85(9),* 1151-1157.

197. Durak, D., Kalender, S., Uzun, F.G. and Kalender, Y. 2010. Mercury chloride-induced oxidative stress in human erythrocytes and the effect of vitamins C and E in vitro. *African Journal of Biotechnology 9(4).*

198. de Souza Queiroz, M.L., Pena, S.C., Salles, T.S.I., de Capitani, E.M. and Saad, S.T.O. 1998. Abnormal antioxidant system in erythrocytes of mercury-exposed workers. *Human & experimental toxicology 17(4),* 225-230.

199. Zabiński, Z., Dabrowski, Z., Moszczyński, P. and Rutowski, J. 2000. The activity of erythrocyte enzymes and basic indices of peripheral blood erythrocytes from workers chronically exposed to mercury vapours. *Toxicology and Industrial Health 16(2),* 211-217.

200. Kurata, M., Suzuki, M. and Agar, N.S. 1993. Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry 106(3)*, 477-487.

201. Morcillo, P., Romero, D., Meseguer, J., Esteban, M.Á. and Cuesta, A. 2016. Cytotoxicity and alterations at transcriptional level caused by metals on fish erythrocytes in vitro. *Environmental Science and Pollution Research 23(12),* 12312-12322.

202. Newsholme, P., Lima, M., Procópio, J., Pithon-Curi, T., Bazotte, R. and Curi, R. 2003. Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Brazilian journal of medical and biological research 36*, 153-163.

203. Morris, C.R., Suh, J.H., Hagar, W., Larkin, S., Bland, D.A., Steinberg, M.H., Vichinsky, E.P., Shigenaga, M., Ames, B. and Kuypers, F.A. 2008. Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology 111(1),* 402-410.

204. Skals, M., Jensen, U.B., Ousingsawat, J., Kunzelmann, K., Leipziger, J. and Praetorius, H.A. 2010. Escherichia coli α-Hemolysin Triggers Shrinkage of Erythrocytes via KCa3.1 and TMEM16A Channels with Subsequent Phosphatidylserine Exposure *Journal of Biological Chemistry 285(20),* 15557-15565.

205. Kaestner, L. and Bernhardt, I. 2002. Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance. *Bioelectrochemistry 55(1),* 71-74.

206. Bratosin, D., Estaquier, J., Petit, F., Arnoult, D., Quatannens, B., Tissier, J.P., Slomianny, C., Sartiaux, C., Alonso, C., Huart, J.J., Montreuil, J. and Ameisen, J.C.

2001. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death & Differentiation 8(12),* 1143-1156.

207. Daugas, E., Candé, C. and Kroemer, G. 2001. Erythrocytes: Death of a mummy. Cell *Death & Differentiation 8(12),* 1131-1133.

208. Mori, H. and Mishina, M. 1995. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology 34(10),* 1219-1237.

209. Kampa, B.M., Clements, J., Jonas, P. and Stuart, G.J. 2004. Kinetics of Mg2+ unblock of NMDA receptors: implications for spike-timing dependent synaptic plasticity. *The Journal of physiology 556(2),* 337-345.

210. Makhro, A., Wang, J., Vogel, J., Boldyrev, A.A., Gassmann, M., Kaestner, L. and Bogdanova, A. 2010. Functional NMDA receptors in rat erythrocytes. American *Journal of Physiology-Cell Physiology 298(6),* C1315-C1325.

211. Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. and Traynelis, S.F. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological reviews 51(1),* 7-61.

212. Choi, Y.B. and Lipton, S.A. 2000. Redox modulation of the NMDA receptor. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS 57(11),* 1535-1541.

213. Aschner, M., Yao, C.P., Allen, J.W. and Tan, K.H. 2000. Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. *Neurochemistry international 37(2-3),* 199-206.

214. Park, S.T., Lim, K.T., Chung, Y.T. and Kim, S.U. 1996. Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicology 17(1),* 37-45.

215. Liu, W., Xu, Z., Deng, Y., Xu, B., Wei, Y. and Yang, T. 2013. Protective effects of memantine against methylmercury-induced glutamate dyshomeostasis and oxidative stress in rat cerebral cortex. *Neurotoxicity research 24(3),* 320-337.

216. Makhro, A., Hänggi, P., Goede, J.S., Wang, J., Brüggemann, A., Gassmann, M., Schmugge, M., Kaestner, L., Speer, O. and Bogdanova, A. 2013. N-methyl-d-aspartate receptors in human erythroid precursor cells and in circulating red blood cells contribute to the intracellular calcium regulation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology 305(11),* C1123-C1138.

217. Olszewska, M., Wiatrow, J., Bober, J., Stachowska, E., Gołembiewska, E., Jakubowska, K., Stańczyk-Dunaj, M. and Pietrzak-Nowacka, M. 2012. Oxidative stress modulates the organization of erythrocyte membrane cytoskeleton. *Advances in Hygiene & Experimental Medicine, 66*.

218. Zhang, Z.Z., Lee, E.E., Sudderth, J., Yue, Y., Zia, A., Glass, D., Deberardinis, R.J. and Wang, R.C. 2016. Glutathione Depletion, Pentose Phosphate Pathway Activation, and Hemolysis in Erythrocytes Protecting Cancer Cells from Vitamin C-induced Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry 291(44*), 22861-22867.

219. Wang, Y.P., Zhou, L.S., Zhao, Y.Z., Wang, S.W., Chen, L.L., Liu, L.X., Ling, Z.Q., Hu, F.J., Sun, Y.P., Zhang, J.Y., Yang, C., Yang, Y., Xiong, Y., Guan, K.L. and Ye, D. 2014. Regulation of G6PD acetylation by SIRT2 and KAT9 modulates NADPH homeostasis and cell survival during oxidative stress&#x2020. The EMBO *Journal 33(12),* 1304-1320.

220. Gómez-Manzo, S., Marcial-Quino, J., Vanoye-Carlo, A., Serrano-Posada, H., Ortega-Cuellar, D., González-Valdez, A., Castillo-Rodríguez, R.A., Hernández-Ochoa, B., Sierra-Palacios, E., Rodríguez-Bustamante, E. and Arreguin-Espinosa, R. 2016. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Update and Analysis of New Mutations around the World. *International Journal of Molecular Sciences 17(12*), 2069.

221. Makhro, A., Kaestner, L. and Bogdanova, A. (2017) NMDA Receptors: *Methods and Protocols*, pp. 265-282, Springer.

222. Mazumder, M.K. and Borah, A. 2014. Piroxicam inhibits NMDA receptor-mediated excitotoxicity through allosteric inhibition of the GluN2B subunit: An in silico study elucidating a novel mechanism of action of the drug. *Medical Hypotheses 83(6),* 740-746.

223. Ndountse, L.T. and Chan, H.M. 2008. Methylmercury increases N-methyl-d-aspartate receptors on human SH-SY 5Y neuroblastoma cells leading to neurotoxicity. *Toxicology 249(2),* 251-255.

224. Brennan, A.M., Won Suh, S., Joon Won, S., Narasimhan, P., Kauppinen, T.M., Lee, H., Edling, Y., Chan, P.H. and Swanson, R.A. 2009. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nature Neuroscience 12(7),* 857-863.

225. Haeberle, A., Greil, W., Russmann, S. and Grohmann, R. 2012. Mono- and combination drug therapies in hospitalized patients with bipolar depression. Data from the European drug surveillance program AMSP. *BMC Psychiatry 12(1),* 153.

226. Yatham, L.N., Kennedy, S.H., Parikh, S.V., Schaffer, A., Beaulieu, S., Alda, M., O'Donovan, C., MacQueen, G., McIntyre, R.S., Sharma, V., Ravindran, A., Young, L.T., Milev, R., Bond, D.J., Frey, B.N., Goldstein, B.I., Lafer, B., Birmaher, B., Ha, K., Nolen, W.A. and Berk, M. 2013. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) collaborative update of CANMAT guidelines for the management of patients with bipolar disorder: update 2013. *Bipolar Disorders 15(1),* 1-44.

227. Wasserman, M.J., Corson, T.W., Sibony, D., Cooke, R.G., Parikh, S.V., Pennefather, P.S., Li, P.P. and Warsh, J.J. 2004. Chronic Lithium Treatment Attenuates Intracellular Calcium Mobilization. *Neuropsychopharmacology 29(4),* 759-769.

228. Ghasemi, M. and Dehpour, A.R. 2011. The NMDA receptor/nitric oxide pathway: a target for the therapeutic and toxic effects of lithium. *Trends in Pharmacological Sciences 32(7),* 420-434.

229. Hashimoto, R., Hough, C., Nakazawa, T., Yamamoto, T. and Chuang, D.M. 2002. Lithium protection against glutamate excitotoxicity in rat cerebral cortical neurons: involvement of NMDA receptor inhibition possibly by decreasing NR2B tyrosine phosphorylation. *Journal of neurochemistry 80(4*), 589-597.

230. Nonaka, S., Hough, C.J. and Chuang, D.-M. 1998. Chronic lithium treatment robustly protects neurons in the central nervous system against excitotoxicity by inhibiting N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences 95(5),* 2642-2647.

231. Mohammad Jafari, R., Ghahremani, M.H., Rahimi, N., Shadboorestan, A., Rashidian, A., Esmaeili, J., Ejtemaei Mehr, S. and Dehpour, A.R. 2018. The anticonvulsant activity and cerebral protection of chronic lithium chloride via NMDA receptor/nitric oxide and phospho-ERK. *Brain Research Bulletin 137*, 1-9.

232. Bosche, B., Schäfer, M., Graf, R., Härtel, F.V., Schäfer, U. and Noll, T. 2013. Lithium prevents early cytosolic calcium increase and secondary injurious calcium overload in glycolytically inhibited endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications 434(2),* 268-272.

233. Charan, J. and Kantharia, N. 2013. How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics 4(4),* 303-306.

234. Gostner, J.M., Raggl, E., Becker, K., Überall, F., Schennach, H., Pease, J.E. and Fuchs, D. 2015. Bisphenol A suppresses Th1-type immune response in human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Immunology letters 168(2),* 285-292.

235. Hofer, S., Geisler, S., Lisandrelli, R., Nguyen Ngoc, H., Ganzera, M., Schennach, H., Fuchs, D., Fuchs, J.E., M. Gostner, J. and Kurz, K. 2020. Pharmacological targets of kaempferol within inflammatory pathways—A hint towards the central role of tryptophan metabolism. *Antioxidants 9(2),* 180.

236. Jenny, M., Klieber, M., Zaknun, D., Schroecksnadel, S., Kurz, K., Ledochowski, M., Schennach, H. and Fuchs, D. 2011. In vitro testing for anti-inflammatory properties of compounds employing peripheral blood mononuclear cells freshly isolated from healthy donors. *Inflammation Research 60(2),* 127-135.

237. Waris, S., Patel, A., Ali, A. and Mahmood, R. 2020. Acetaldehyde-induced oxidative modifications and morphological changes in isolated human erythrocytes: an in vitro study. *Environmental Science and Pollution Research 27(14),* 16268-16281.

238. Beutler, E., Duron, O. and Kelly, B.M. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *The Journal of laboratory and clinical medicine 61,* 882-888.

239. Miranda, K.M., Espey, M.G. and Wink, D.A. 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide 5(1)*, 62-71.

240. Tungjai, M., Phathakanon, N., Ketnuam, P., Tinlapat, J. and Kothan, S. 2018. Determination of hemolysis, osmotic fragility and fluorescence anisotropy on irradiated

red blood cells as a function of kV of medical diagnostic X-rays. *International Journal of Radiation Research 16(1)*, 123-127.

241. Clarkson, T.W. 1998. Human toxicology of Mercury. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine 11(2-3)*, 303-317.

242. Sharma, B.M., Sáňka, O., Kalina, J. and Scheringer, M. 2019. An overview of worldwide and regional time trends in total mercury levels in human blood and breast milk from 1966 to 2015 and their associations with health effects. *Environment International 125,* 300-319.

243. Ye, B.-J., Kim, B.-G., Jeon, M.-J., Kim, S.-Y., Kim, H.-C., Jang, T.-W., Chae, H.-J., Choi, W.-J., Ha, M.-N. and Hong, Y.-S. 2016a. Evaluation of mercury exposure level, clinical diagnosis and treatment for mercury intoxication. *Annals of occupational and environmental medicine 28(1)*, 5.

244. Peng, J. 2014. Case report on lithium intoxication with normal lithium levels. *Shanghai archives of psychiatry 26(2),* 103-104.

245. Shaldubina, A., Agam, G. and Belmaker, R.H. 2001. The mechanism of lithium action: state of the art, ten years later. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 25(4)*, 855-866.

246. Bourguignon, C., Dupuy, A.M., Coste, T., Michel, F. and Cristol, J.P. 2014. Evaluation of NM-BAPTA method for plasma total calcium measurement on Cobas 8000®. *Clinical biochemistry 47(7-8*), 636-639.

247. Vassileva, E., Mandjukov, P., Wrobel, K., Escobosa, A.R.C., Ojeda, A.G., Ruszczynska, A., Kurek, E., Dmitruk, W., Brozek-Mucha, Z. and Wycislik, A. (2017) *Inorganic trace analytics: Trace element analysis and speciation*, Walter de Gruyter GmbH & Co KG.

248. EPA 1996 Method 3052: Microwave Assisted Acid Digestion of Siliceous and Organically Based Matrices. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency.

249. Engin, A., Altan, N. and Isik, E. 2005. Erythrocyte glutathione levels in lithium-induced hypothyroidism. *Drugs in R & D 6(1),* 35-40.

250. Riddles, P.W., Blakeley, R.L. and Zerner, B. 1979. Ellman's reagent: 5, 5′-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)—a reexamination. *Analytical biochemistry 94(1),* 75-81.

251. Ellman, G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics 82(1),* 70-77.

252. Oshina, I. and Spigulis, J. 2021. Beer–Lambert law for optical tissue diagnostics: current state of the art and the main limitations. *Journal of biomedical optics 26(10),* 100901-100901.

253. Tsikas, D. 2007. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B 851(1-2),* 51-70.

254. Oskarsson, A., Schütz, A., Skerfving, S., Hallén, I.P., Ohlin, B. and Lagerkvist, B.J. 1996. Total and inorganic mercury in breast milk and blood in relation to fish consumption and amalgam fillings in lactating women. *Archives of Environmental Health: An International Journal 51(3),* 234-241.

255. Mortensen, M.E., Caudill, S.P., Caldwell, K.L., Ward, C.D. and Jones, R.L. 2014. Total and methyl mercury in whole blood measured for the first time in the U.S. population: NHANES 2011–2012. *Environmental Research 134,* 257-264.

256. Hightower, J.M. and Moore, D. 2003. Mercury levels in high-end consumers of fish. *Environmental Health Perspectives 111(4),* 604-608.

257. McKelvey, W., Jeffery, N., Clark, N., Kass, D. and Parsons, P.J. 2011. Population-Based Inorganic Mercury Biomonitoring and the Identification of Skin Care Products as a Source of Exposure in New York City. *Environmental Health Perspectives 119(2),* 203-209.

258. Silbernagel, S.M., Carpenter, D.O., Gilbert, S.G., Gochfeld, M., Groth III, E., Hightower, J.M. and Schiavone, F.M. 2011. Recognizing and Preventing Overexposure to Methylmercury from Fish and Seafood Consumption: Information for Physicians. *Journal of Toxicology 2011(1),* 983072.

259. Jacob, H., Brain, M., Dacie, J., Carrell, R. and Lehmann, H. 1968. Abnormal haem binding and globin SH group blockade in unstable haemoglobins. *Nature 218(5148),* 1214-1217.

260. Borghi, S., Nencini, F., Giurranna, E., Fiorillo, C. and Becatti, M. 2025 *The Erythrocyte–ROS Axis in Thrombosis and Hemostasis*, Thieme Medical Publishers, Inc.

261. Noguera Hurtado, H., Hense, J., Klöpper, N., Osthues, J., Wünsch, B. and Düfer, M. 2025. Targeting GluN2B-containing NMDA receptors to interact with stress pathways and Ca2+-regulated K+ channels in murine islets of Langerhans. *European Journal of Pharmacology 1007*, 178223.

262. Ulbrich, M.H. and Isacoff, E.Y. 2008. Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences 105(37),* 14163-14168.

263. Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J. and Dingledine, R. 2010. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews 62(3),* 405-496.

264. Paoletti, P., Bellone, C. and Zhou, Q. 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience 14(6),* 383-400.

265. Cobbina, S.J., Mao, G., Zhao, T., Xu, H., Zhang, Z., Liu, H., Zou, Y., Wu, X. and Yang, L. 2017. Modulation of N-Methyl-D-Aspartate Receptors (NMDAR), Bcl-2 and C-Fos Gene Expressions on Exposure to Individual and Mixtures of Low Concentration Metals in Zebrafish (Danio rerio). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology 72(3),* 418-427.

266. Alam, R.T.M., Abu Zeid, E.H., Khalifa, B.A., Arisha, A.H. and Reda, R.M. 2021. Dietary exposure to methyl mercury chloride induces alterations in hematology, biochemical parameters, and mRNA expression of antioxidant enzymes and metallothionein in Nile tilapia. *Environmental Science and Pollution Research 28(24),* 31391-31402.

267. Weinhouse, C., Ortiz, E.J., Berky, A.J., Bullins, P., Hare-Grogg, J., Rogers, L., Morales, A.M., Hsu-Kim, H. and Pan, W.K. 2017. Hair Mercury Level is Associated with Anemia and Micronutrient Status in Children Living Near Artisanal and Small-Scale Gold Mining in the Peruvian Amazon. *The American journal of tropical medicine and hygiene, 97(6),* 1886-1897.

268. Seriani, R., Franca, J.G., Lombardi, J.V., Brito, J.M. and Ranzani-Paiva, M.J.T. 2015. Hematological changes and cytogenotoxicity in the tilapia Oreochromis niloticus caused by sub-chronic exposures to mercury and selenium. *Fish Physiology and Biochemistry 41(1),* 311-322.

269. Ryrie, D.R., Toghill, P.J., Tanna, M.K. and Galan, G.N. 1970. Marrow suppression from mercury poisoning? *British medical journal, 1(5694),* 499.

270. Priya, N., Nagaprabhu, V.N., Kurian, G., Seethalakshmi, N., Rao, G.G. and Unni, V.N. 2012. Aplastic anemia and membranous nephropathy induced by intravenous mercury. *Indian Journal of Nephrology 22(6),* 451-454.

271. Kaur, P., Aschner, M. and Syversen, T. 2006. Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes. *NeuroToxicology 27(4),* 492-500.

272. Xu, B., Xu, Z.-F., Deng, Y., Liu, W., Yang, H.-B. and Wei, Y.-G. 2012. Protective effects of MK-801 on methylmercury-induced neuronal injury in rat cerebral cortex: involvement of oxidative stress and glutamate metabolism dysfunction. *Toxicology 300(3)*, 112-120.

273. Engin A.B. and Engin, E.D. 2016. Impact of glutamine on the effect of neopterin in methyl mercury-exposed neurons. *Pteridines 29(1),* 104-113.

274. Zhang, X., Cai, W., Wang, C. and Tian, J. 2025. N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs): a glutamate-activated cation channel with biased signaling and therapeutic potential in brain disorders. *Pharmacology & Therapeutics 273*, 108888.

275. Bystrzyński, A., Kwaśniak-Butowska, M. and Sławek, J. 2025. Movement disorders accompanying lithium intoxication – An evolving clinical presentation and SILENT syndrome. *Clinical Parkinsonism & Related Disorders 12,* 100347.

276. Darke, S., Duflou, J., Peacock, A., Lim, J., Havard, A., Farrell, M. and Lappin, J. 2025. Characteristics of deaths related to lithium toxicity in Australia, 2000–2024. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry 59(7),* 622-628.

277. Johnson, R., Ravindranath, Y., el-Alfy, M. and Goyette, G.J. 1994. Oxidant damage to erythrocyte membrane in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: correlation with in vivo reduced glutathione concentration and membrane protein oxidation. *Blood 83(4),* 1117-1123.

278. Fujita, J., Tsuda, K., Obayashi, H., Fukui, I., Ishida, H. and Seino, Y. 1997. Nisoldipine blocks the increase of intracellular free calcium-ion concentration associated with elevated sodium–lithium countertransport activity in erythrocytes in patients with NIDDM. *Diabetic medicine 14(6),* 499-502.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onay Belgesi

GAZİ ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL İLETİŞİM BİLGİLERİ	**ETİK KURULUNUN ADI**	GÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı (GÜTF) 06500 Beşevler/Ankara
	TELEFON	
	FAKS	
	E-POSTA	

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**İnsan Eritrositlerinde Glutamat Homeostazı ve N-metil D-aspartat Reseptör Modulasyonunun Metil Civa Toksisitesinde Etkisi**			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	**Prof. Dr. Ayşe Başak ENGİN**			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI/UZMANLIK ALANI/ BULUNDUĞU MERKEZ	Eczacılık Fakültesi / GÜEF			
	DESTEKLEYİCİ (Varsa)				
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Kan, idrar, doku, radyolojik görüntü gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji koleksiyon materyalleriyle veya rutin muayene, tetkik tahlil ve tedavi işlemleri sırasında (önceden) elde edilmiş materyallerle yapılacak araştırmalar- Yüksek lisan tezi			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

	Belge Adı	**Tarihi**	**Ver. No**	**Dili**
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	08.01.2025	1	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	08.01.2025	1	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

	Belge Adı		**Açıklama**
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒	
	DİĞER	☐	

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:** 069 **Toplantı tarihi: 17.01.2025**
	Etik Kurul Kararı Geçerlilik Tarihi : 17.01.2028
	İnsan Eritrositlerinde Glutamat Homeostazı ve N-metil D-aspartat Reseptör Modulasyonunun Metil Civa Toksisitesinde Etkisi başlıklı başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşım ve yöntemleri ile incelenerek uygun bulunduğuna GÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	GÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	**Prof. Dr. Neslihan BUKAN**

Unvanı/Adı/Soyadı	**Uzmanlık Alanı**	**Kurumu**	**Cinsiyet**		**Araştırma ile ilişki**		**Katılım ***		**İmza**
Prof. Dr. Neslihan BUKAN BAŞKAN	Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Betül ÖĞÜT BAŞKAN YARD.	Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM ÜYE	Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Gökçe Sevim ÖZTÜRK FİNCAN ÜYE	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

EK-1. (devam) Etik Kurul Onay Belgesi

Doç. Dr. Halit Nahit ŞENDUR ÜYE	Radyoloji AD.	GÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Gökçen EMMEZ ÜYE	Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD.	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☒	H ☐	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Seher UYSAL ÜYE	Göz Hastalıkları Anabilim Dalı	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. M. Funda CEVHER AKDULUM ÜYE	Kadın Hastalıkları ve Doğum AD.	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Fatih GÜRLER ÜYE	İç Hastalıkları AD. Tıbbi Onkoloji BD.	GÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Aslı İNCİ ÜYE	Çocuk Sağlığı ve Hast. AD. Met. BD.	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Dr. Öğr. Üyesi Çağrı BÜYÜKKASAP ÜYE	Genel Cerrahi Anabilim Dalı	GÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Dr. Öğr. Üyesi Burcu BEKSAÇ ÜYE	Dermatoloji Anabilim Dalı	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Dr. Öğr. Üyesi Elif Ayça ŞAHİN ÜYE	Tıbbi Mikrobiyoloji AD.	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Dr. Öğr. Üyesi Dicle BÜYÜKTAŞKIN TUNÇTÜRK ÜYE	Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı AD.	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Uzm. Dr. Mehmet Alperen ÖZÇELİK ÜYE	Sağlık Bak. Halk Sağ. Genel Müd.	Sağlık Bak.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐

EK-2 Bilgilerndirilmiş Gönüllü Onam Formu

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
"GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR"
İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırma Projesinin Adı: İnsan eritrositlerinde glutamat homeostazı ve N-metil D-aspartat reseptör modulasyonunun metil cıva toksisitesinde etkisi
Sorumlu Araştırıcının Adı: Prof. Dr. Ayşe Başak ENGİN
Diğer Araştırıcıların Adı: Ecz. Nursema ATEŞ, Prof. Dr. Orkun ALP, Prof. Dr. Atilla ENGİN
Destekleyici (varsa): -

"İnsan eritrositlerinde glutamat homeostazı ve N-metil D-aspartat reseptör modülasyonunun metil cıva toksisitesinde etkisi" isimli bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmaya davet edilmenizin nedeni sağlıklı olmanızdır. Bu çalışma, araştırma amaçlı olarak yapılmaktadır ve katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir. Bu araştırma, F. Toksikoloji Anabilim Dalında, Prof. Dr. Ayşe Başak ENGİN'in sorumluluğu altındadır.

Çalışmanın amacı nedir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?
Amacımız, metil cıvanın çevresel maruziyeti takiben %90 oranında taşınmasından sorumlu olan eritrositlerdeki etki mekanizmasının reseptör düzeyinde aydınlatılmasını ve elde edilecek verilere göre MeHg maruziyetinde meydana gelecek toksisitenin azaltılmasında kullanılabilecek olası moleküler mekanizmaları değerlendirmektir. Çalışmaya sağlıklı 10 gönüllü katılacaktır ve çalışma tek merkezde yürütülecektir.

Bu çalışmaya katılmalı mıyım? (Bu bölüm aynen korunacaktır)
Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Şu anda bu formu imzalasanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz.

Bu çalışmaya katılırsam beni ne bekliyor?
Eğer bu araştırmaya katılmayı isterseniz bir defaya mahsus hemşire tarafından kolunuzdan bir tüpe yaklaşık 10 ml kan alınacaktır. Ancak bu çalışma nedeniyle sizden herhangi bir tetkik istenmeyecektir. Kanınız alındıktan sonra üzerine cıva ilave edilerek cıvanın kandaki hücrelere hasar verip vermediği araştırılacaktır.

Çalışmanın riskleri ve rahatsızlıkları var mıdır?
Kanınızın alınması sırasında iğne batmasını hissedebilirsiniz. Ancak bu işlem sırasında meydana gelebilecek herhangi bir risk bulunmamaktadır. Kan alınması sırasında meydana gelebilecek herhangi bir zararda gerekli her türlü tıbbi girişim tarafımızdan yapılacaktır; bu konudaki tüm harcamalar da tarafımızdan karşılanacaktır

Çalışmada yer almanın yararları nelerdir?
Eğer bu çalışmaya katılırsanız metil cıvanın kanda meydana getirdiği etkilerin aydınlatılmasına ve metil cıva maruziyetinin meydana getirdiği hasarın mekanizmalarının açıklanmasına katkı sağlamış olacaksınız.

EK-2 (Devamı) Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Bu çalışmaya katılmanın maliyeti nedir? (Bu bölüm aynen korunacaktır)
Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak? (Bu bölüm aynen korunacaktır)
Çalışma doktorunuz kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde, sizinle ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Çalışmanın sonunda, kendi sonuçlarınızla ilgili bilgi istemeye hakkınız vardır. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

Daha fazla bilgi için kime başvurabilirim?
Çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : Prof. Dr. Ayşe Başak ENGİN
GÖREVİ : Öğretim Üyesi
TELEFON : 202 3084

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, F. Toksikoloji Anabilim dalında, Prof. Dr. Ayşe Başak ENGİN tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımıma ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (*Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim).* Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırmadan elde edilen benimle ilgili kişisel bilgilerin gizliliğinin korunacağını biliyorum.

Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Prof. Dr. Mehmet Ali ERGÜN, Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, 202 4637'den arayabileceğimi biliyorum. (Doktor ismi, telefon ve adres bilgileri mutlaka belirtilmelidir)

EK-2 (Devamı) Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı
Adı, soyadı:
Adres:
Tel:
İmza:
Tarih:

Görüşme tanığı
Adı, soyadı:
Adres:
Tel:
İmza:
Tarih:

Katılımcı ile görüşen hekim
Adı soyadı, unvanı:
Adres:
Tel:
İmza:
Tarih:

AYDINLATMA ve KATILIMCININ BEYANI KESİNLİKLE BİRBİRLERİNİN DEVAMI ŞEKLİNDE OLACAKTIR. AYRI AYRI SAYFALARDA YER *ALMAYACAKTIR.*

EK-3 Gönüllü Anket Formu

TARİH...../...../.....

GÖNÜLLÜ ANKET FORMU

Kayıt No:

Ad Soyad: **Tel:**

Yaş:

Boy:

Kilo:

Sigara kullanımı (gün/adet):

Alkol kullanımı (gün/kadeh):

Mevcut hastalıkları (varsa; kronik/genetik/diğerleri):

Kullanılan ilaçlar, süreleri, en son alınma zamanı (vitamin, destek ürünleri dahil):

Aile bireylerinde genetik bir hastalık var mı, nedir?

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ATEŞ, Nursema

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri :

Medeni hali :

e-mail :

Telefon :

Eğitim

Yüksek lisans : Gazi Üniversitesi / Farmasötik Toksikoloji Devam ediyor

Lisans : Ankara Üniversitesi / Eczacılık Fakültesi 2020

Lise Bolu Anadolu Öğretmen Lisesi 2013

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2024-Devam ediyor	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2023-2024	HD Ecza Deposu ve İlaç Medikal A.Ş	Mesul Müdür
2020-2023	Özel Güven Hastanesi	Eczacı
2020	Göksu Eczanesi	Yardımcı Eczacı

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

-

Hobiler

Bisiklet sürmek, Analog fotoğrafçılık, seyahat etmek.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...



Gazili olmak ayrıcalıktır