

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**PERFLOROOKTAN SÜLFONAT (PFOS)'IN EMBRİYONEL
ORJİNLİ HÜCRE SERİLERİNDEKİ ETKİSİNİN İN-VİTRO
ARAŞTIRILMASI**

Sevim KARAKAŞ ÇELİK

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ

MERSİN – 2010

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**PERFLOROOKTAN SÜLFONAT (PFOS)'IN EMBRİYONEL
ORJİNLİ HÜCRE SERİLERİNDEKİ ETKİSİNİN İN-VİTRO
ARAŞTIRILMASI**

Sevim KARAKAŞ ÇELİK

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP SBE TBG (SK) 2006 DR kodlu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:

MERSİN – 2010

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Perflorooktan Sülfonat (PFOS)’un Embriyonel Orjinli Hücre Serilerindeki Etkisinin İn-Vitro Araştırılması” başlıklı çalışma, aşağıdaki jürimiz tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 29/06/ 2010

Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR

Jüri Başkanı

Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ

Jüri Üyesi

Doç. Dr. İ.Ömer BARLAS

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Ayla ÇELİK

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Hilmi İSİ

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun.....tarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve Doktora eğitimim boyunca, akademik açıdan yetişmemde büyük katkısı olan danışman hocam Sn. Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ'e, tezimin hazırlanması boyunca gösterdiği titizlik, özveri ve bilimsel katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Anabilim dalımızın değerli hocaları; Sn. Prof. Dr. M. Emin ERDAL'a, Sn. Doç. Dr. Etem AKBAŐ'a, Sn. Doç. Dr. İ.Ömer Barlas'a, Sn. Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY ve Sn. Yrd. Doç. Dr. Ertan AY'a doktora eğitimim boyunca yaptıkları bilimsel ve akademik katkılardan dolayı teşekkür ederim.

Tezimin istatistikleri ve bulguların değerlendirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Doç. Dr. Bahar TAŐDELEN ve Sn. Arő. Gör. Seval KUL'a, yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca, her türlü desteğini esirgemeyen laboratuvarında birlikte çalıştığım arkadaşlarımdan hepsine teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, maddi ve manevi destekleriyle, eğitimimin akademik yönde devam etmesini sağlayan aileme ve her zaman yanımda olup bana destek olan sevgili eşime sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Perflorooktan Sülfonat.....	4
2.1.1 Fizikokimyasal Özellikleri.....	4
2.1.2 Kullanım Alanları.....	5
2.1.2.1 Metal (Krom) Kaplama.....	6
2.1.2.2 Fotoğrafçılık.....	6
2.1.2.3 Havacılık.....	6
2.1.2.4 Yangın Söndürücüler.....	6
2.1.2.5 Dokumalarda (halı, tekstil, deri) Koruyucu.....	7
2.1.2.6 Kağıtların Muamele Edilmesi.....	7
2.1.2.7 Endüstriyel, Ev Temizleme ve Kişisel Bakım Ürünleri.....	7
2.1.2.8 Pestisitler.....	8
2.1.3 Degradasyonu.....	8
2.1.3.1 Abiyotik Degradasyonu.....	8
i. Hidroliz.....	8
ii. Fotoliz.....	8
2.1.3.2 Biyodegradasyonu.....	8
i. Aerobik.....	8
ii. Anaerobik.....	9
2.1.4 Çevresel Konsantrasyonu.....	9

2.1.5	Biyoakümülyasyonu	10
2.1.6	Vücuttan Atılımı	13
2.1.7	Toksisitesi	14
2.2.	Apoptoz	17
2.2.1	Tanımı ve Tarihçesi	17
2.2.2	Apoptotik Hücre Ölümünün Aşamaları	20
2.2.2.1	Apoptozun Başlatılması	20
2.2.2.1.1	Sinyal Üretici Yollar	20
2.2.2.1.2	Antiapoptotik ve Proapoptotik Faktörler	21
2.2.2.1.3	Apoptoz Mekanizmaları	23
1.	Dış Sinyallerle Apoptozun Tetiklenmesi	23
i.	Tümör Nekroz Faktör aracılı apoptoz:	23
ii.	Fas-Fas ligand aracılı apoptoz:	24
2.	Mitokondri/sitokrom-c aracılı apoptoz	24
3.	Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptoz Oluşturulması:	30
1.2.2.2	Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu	31
2.2.2.3	Apoptotik Hücrede Görülen Morfolojik ve Biyokimyasal Değişiklikler	34
1.	Morfolojik Değişiklikler	34
2.	Biyokimyasal Değişiklikler	34
2.2.2.4	Fagositoz	35
2.2.3	Apoptozun Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	36
2.	GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1	Kullanılan Kimyasallar	40
3.2	Kullanılan Çözeltiler	41
3.3	Kullanılan Yöntemler	43
3.3.1	Hücre Kültürü	43
3.3.2	Tripan Mavisi Boyama Yöntemi	47
3.3.3.	Gen Ekspresyonu Deneyleri	48
3.3.3.1	RNA İzolasyonu:	48

3.3.3.2 cDNA Eldesi	49
3.3.3.3 Realtime Revers Transkriptaz RT-PCR ile Gen Ekspresyonu Analizi..	50
3.4. İstatistiksel Analiz	52
4. BULGULAR.....	54
4.1. Fl Hücre Hattında 24. Saatte Apaf-1 ve Kaspaz-3 Ekspresyonu	56
4.2. Hel299 Hücre Hattında 24. Saatte Apaf-1 ve Kaspaz-3 Ekspresyonu.....	57
4.3. Fl Hücre Hattında 48. Saatte Apaf-1 ve Kaspaz-3 Ekspresyonu	58
4.4. Hel299 Hücre Hattında 48. Saatte Apaf-1 ve Kaspaz-3 Ekspresyonu.....	60
4.5. Fl Hücre Hattında 72. Saatte Apaf-1 ve Kaspaz-3 Ekspresyonu	61
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	70
7. KAYNAKLAR	71
7. ÖZGEÇMİŞ	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Perflorooktan Sülfonatın şematik yapısı.....	4
Şekil 2.2. Fas ve TNFR-1 reseptörleri ile tetiklenen apoptoz mekanizması.....	24
Şekil 2.3. Mitokondriden sitokrom-c salınımı	25
Şekil 2.4. Sitokrom-c salınımı ile kaspaz kaskadının aktivasyonu.....	27
Şekil 2.5. Apaf-1'in şematik yapısı	28
Şekil 2.6. Apoptozomun yapısı ve kaspaz-9 aktivasyonu	28
Şekil 2.7. Endoplazmik retikulum aracılı apoptoz.....	31
Şekil 2.8. Kaspazların aktivasyonu.....	33
Şekil 3. 1. Neuber–Hemositometrede hücre sayımı.	47
Şekil 3. 2. TaqMan sisteminde kullanılan prob.	51
Şekil 3. 3. Proben tek sarmal hale getirilen kalıp DNA'ya bağlanması.	51
Şekil 3. 4. Raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması	51
Şekil 4. 1. Fl hücre hattında Apaf-1 geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi.....	54
Şekil 4. 2. Fl hücre hattında kaspaz 3 geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi.	55
Şekil 4. 3. Fl hücre hattında beta-aktin geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi.....	55
Şekil 4. 4. Fl hücre hattında Apaf-1 geni için 24. saatte ekspresyon oranı (E) değeri ortalamaları	56
Şekil 4. 5. Fl hücre hattında kaspaz-3 geni için 24. saatte ekspresyon oranı (E) değeri ortalamaları	57
Şekil 4. 6. Hel299 hücre hattında Apaf-1 geni için 24. saatte ekspresyon oranı (E) değeri ortalamaları	58
Şekil 4. 7. Hel299 hücre hattında kaspaz-3 geni için 24. saatte ekspresyon oranı (E) değeri ortalamaları	58
Şekil 4. 8. Fl hücre hattında Apaf-1 geni için 48. saatte ekspresyon oranı (E) değeri ortalamaları	59
Şekil 4. 9. Fl hücre hattında Kaspaz 3 geni için 48. saatte ekspresyon oranı (E) değeri ortalamaları.	59
Şekil 4.10. Hel299 hücre hattında Apaf-1 geni için 48. saatte ekspresyon oranı (E) değeri ortalamaları	60
Şekil 4.11. Hel299 hücre hattında Kaspaz-3 geni için 48. saatte ekspresyon oranı (E) değeri ortalamaları	61

Şekil 4.12. Fl hücre hattında Apaf-1 geni için 72. saatte ekspresyon oranı (E) değeri ortalamaları	62
Şekil 4.13. Fl hücre hattında Kaspaz-3 geni için 72. saatte ekspresyon oranı (E) değeri ortalamaları.....	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Perflorooktan Sülfonatın fiziksel ve kimyasal özellikleri	5
Çizelge 2.2. Nekroz ve apoptozun karşılaştırılması.	18
Çizelge 2.3. Apoptozu tetikleyen hücre içi ve dışı ajanlar	21
Çizelge 2.4. İnsan kaspaz ailesi	32
Çizelge 3.1. Hücre kültürü besiyerinin bileşenleri (memeli hücresi için)	45
Çizelge 4.1. Fl hücre hattında Apaf-1 ve kaspaz 3 geni için 24. saatte ekspresyon oranı (E) değeri ortalamaları	56
Çizelge 4.2. Hel299 hücre hattında Apaf-1 ve kaspaz 3 geni için 24. saatte ekspresyon oranı (E) değeri ortalamaları	57
Çizelge 4.3. Fl hücre hattında Apaf-1 ve kaspaz 3 geni için 48. saatte ekspresyon oranı (E) değeri ortalamaları	59
Çizelge 4.4. Hel299 hücre hattında Apaf-1 ve kaspaz-3 geni için 48. saatte ekspresyon oranı (E) değeri ortalamaları	60
Çizelge 4.5. Fl hücre hattında Apaf-1 ve kaspaz-3 geni için 72. saatte ekspresyon oranı (E) değeri ortalamaları	61

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACOX	Acyl-CoA oxidase (açıl-coa oksidaz)
AIF	Apoptosis-inducing factor (apoptoz–indükleyici faktör)
ANT	Adenine nucleotide translocator (adenin nükleotid translokator)
Apaf-1	Apoptotic Protease-Activating Factor-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör-1)
BIEN	Bifunctional enzyme (bifonksiyonel enzim)
CAD	Caspase-activated deoxyribonuclease (kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz)
CARD	Caspase recruitment domain (kaspaz toplanma bölgesi)
DEPC	Diethyl pyrocarbonate (dietilpirokarbonat)
DISC	Death inducing signal complex (ölüm başlatan sinyal kompleksi)
Endo G	Endonükleaz G
ER	Endoplazmik retikulum
Fl	İnsan amniyon hücre hattı
GSCN	Guanidinium thiocyanate (guanidinyum tiyosiyanat)
GSH-Px	Glutathione peroxidase (glutatyon peroksidaz)
HB	Hematoksilen boyama
Hel299	İnsan fetal akciğer hücre hattı
HepG2	Hepatoselüler liver carcinoma cell line (İnsan karaciğer hücre hattı)
HSP	Heat shock proteins (ısı şok proteinleri)
IAP	Inhibitor of Apoptosis (Apoptoz inhibitörü)
ICAD	İnhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease (kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü)
ICE	İnterleukin-1 β converting enzyme (İnterlökin-1 β dönüştürücü enzimin)
IMM	Inner membrane of mitochondria (mitokondrinin iç membranı)
ME	Malik enzim
MMVRT	Reverse transkriptaz
MN	Mikronükleus
N-EtFOSE	N-etilperfluorooctanesulfonamidoethanol
NFkB	Nükleer faktör-kb
NGF	Neuron growth factor (sinir büyüme faktörü)
OMM	Outer membrane of mitochondria (Mitokondrinin dış membranı)
PAHs	Polyaromatic Hydrocarbon (poliaromatik hidrokarbon)
PARP	Poly ADP-ribose polimerase (poli ADP-riboz polimeraz)

PC	Phosphotidylcholine (Fosfatidilkolin)
PE	Phosphotidylethanolamin (Fosfotidiletanolamin)
PFOA	Perfluorooctanoic acid (perflorooktanoik asit)
PFOS	Perfluorooctane sulphonate (perflorooktan sülfonat)
PKT	Peroxisomal 3ketoacyICoA thiolase (peroksizomal 3-ketoaçil tiyolaz)
POSF	Perfluorooctane sulfonyl florid (perflorooktan sulfonil florit)
PS	Phosphotidylserine (Fosfatidilserin)
PTP	Permeability transition pore (permeabilite transisyon poru)
SCGE	Single cell gel electrophoresis (tek hücre jel elektroforezi)
SMAC/DIABLO	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with Low PI (Mitokondriden türetilen ikinci aktivator/düşük PI ile doğrudan IAP bağlayan protein)
SREBP	Sterol Regulatory Element Binding Proteins (sterol düzenleyici eleman bağlayıcı proteinler)
TBE	Tris-Borat-Edta
TNF	Tumor necrosis factor (Tümör nekroz faktör)
TNFR	Tumor necrosis factor receptor (tümör nekroz faktör reseptör)
TRADD	TNFR-1 associated death domain (TNFR adaptör protein)
VDAK	Voltage dependent anion channel (voltaj bağımlı anyon kanalı)

ÖZET

Perflorooktan Sülfonat (PFOS)'ın Embriyonel Orjinli Hücre Serilerindeki Etkisinin İn-Vitro Araştırılması

Perflorooktan sülfonat gibi florin organik bileşenler stabil kimyasallar olup, endüstriyel alanda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

Perflorooktan sülfonatın potansiyel toksisitesi henüz çok iyi karakterize edilememiş ve toksik etkisinin altında yatan moleküler mekanizma ile ilgili de çok az şey bilinmektedir. Perflorooktan sülfonatın mitokondrial membran permeabilitesini değiştirmesi potansiyel toksisite mekanizması olarak kabul edilmektedir. Mitokondrial membran permeabilitesinin değiştirmesi sonucu hücrenin apoptoz süreci başlamaktadır. Ancak perflorooktan sülfonatın toksisitesinin altında yatan apoptotik moleküler mekanizma ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, amniyon hücre serilerinde perflorooktan sülfonatın hücreyi apoptoza götüren Apaf-1 ve kaspaz-3 genlerinin ekspresyonuna etkisi araştırılmıştır. Amniyon ve fetal akciğer hücrelerindeki apoptotik gen ekspresyonunu belirlemek için Ankara Şap Enstitüsü Hücre Kültür Koleksiyonundan (Hükük) sağlanan amniyon ve fetal akciğer hücreleri kültüre edilmiştir. Değişik konsantrasyonlarda perflorooktan sülfonat uygulanan amniyon hücrelerinden RNA izolasyonu yapılmış ve Apaf-1 ve kaspaz-3'ün ekspresyonları RT-PCR kullanılarak belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada yüksek dozda perflorooktan sülfonat uygulanan hücrelerde kaspaz-3 ve Apaf-1 ekspresyonunda anlamlı derecede artış gözlenmiştir. Ayrıca uzun süre PFOS uygulanan hücrelerde de Apaf-1 ve kaspaz-3 ekspresyonunun anlamlı derecede arttığı görülmüştür. Ancak düşük doz ve kısa süreli uygulamalarda anlamlı bir artış görülmemiştir.

Sonuç olarak; perflorooktan sülfonat uygulanan hücrelerde apoptotik gen ekspresyonunun doza ve zamana bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışmanın perflorooktan sülfonatın apoptotik etkisini inceleyen ilk çalışma olması

nedeni ile bu konuyla ilgili yapılacak diğer çalışmalara yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Apoptoz, Perflorooktan Sülfonat, Apaf-1, Kaspaz 3.

ABSTRACT

An In Vitro Investigation of the Effect of Perfluorooctane sulphonate On Cell Lines of Embryonic Origin

Fluorinated organic compounds, such as perfluorooctane sulfonate, are stable chemicals with a wide range of industrial applications.

The potential toxicity of perfluorooctane sulfonate is not well characterized, and even less known are the mechanisms underlying its toxic effects. Perfluorooctane sulfonate change of inner mitochondrial membrane permeability has been implicated as a potential mechanism of toxicity. But there has been no study about apoptotic molecular mechanisms underlying toxicity of perfluorooctane sulfonate.

In this study, we research that perfluorooctane sulfonate effects the expression of Apaf-1 and caspase-3 genes in the amnion and fetal lung cell line that initiate the cells to undergo apoptosis. To determine the apoptotic gene expression in amnion cell line, amnion and fetal lung cells that obtained from Ankara Foot-and-Mouth Disease Institute collection of cell culture (Hükük) was cultured. Total RNAs of amnion and fetal lung cells exposed to different concentration perfluorooctane sulfonate was purified and the expression of caspase 3 and Apaf-1 determined by using RT-PCR.

In the study there is significant increase in expression of caspase-3 and Apaf-1 in amnion and fetal lung cell line exposed to high dose. Also there is significant increase in expression of Apaf-1 and caspase-3 in cell lines exposed for along time perfluorooctane sulfonate. But no significant increase was seen in the low doses and exposed for a short time.

In conclusion, apoptotic gene expression is increase in cells exposed perfluorooctane sulfonate by dose dependent manner was determined. So this work is the first study examine the apoptotic effects of perfluorooctane sulfonate it will lead the way to the other topical studies.

Keywords: Apoptosis, Perfluorooctane Sulphonate, Caspase 3, Apaf-1.

1. GİRİŞ

Florokimyasal bileşimler, perflorooktan sulfonil florit (POSF)'den türemiş bileşikler olup bu bileşimler döşeme, deri, kumaş ve tahta yüzey kaplamalarında kullanılarak bunların leke, yağ ve suya karşı dirençli olmasını sağlar. Bu bileşimlerin içinde en çok dikkat çeken perflorooktan sulfonattır (PFOS). PFOS 50 yıldan daha fazla bir süredir endüstriyel alanda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. PFOS kâğıt koruyucu olarak yiyecekler ile doğrudan temas eden kâğıtların (kâğıt tabaklar, yemek konteynırı ve ambalaj kâğıtları) yağ ve suya karşı dirençli olması için kullanılmaktadır (1, 2, 3).

PFOS, karbon ve flor arasında kimyasal olarak stabilize ve güçlü bağlar oluşturmaktadır. Geçmişte bu bileşimin toksik olmadığı kabul edilmekteyken yapılan son araştırmalarla PFOS'un oldukça toksik olduğu gösterilmiştir (1, 2). Toksikokinetik çalışmalar, PFOS'un çok iyi absorbe edildiğini (>95%) ancak hidroliz, fotoliz ve mikrobiyal ayrışmaya karşı dirençli olduğundan çok az elimine edilebildiğini göstermiştir (3).

PFOS'a maruz kalmanın temel yolu tam olarak anlaşılacak şekilde birlikte çok iyi absorbe edildiği, karaciğer ve serumda biriktiği bilinmektedir. Kannan ve ark. (4) tarafından Belçika, Brezilya, Kolombiya, Hindistan, İtalya, Polonya ve Amerika olmak üzere 5 farklı bölgede yaşayan 473 kişinin serum veya plazma PFOS konsantrasyonları değerlendirilmiştir. Bu bölgelerde yaşayan insanların kanında değişen konsantrasyonlarda PFOS'a rastlanmıştır. En yüksek PFOS konsantrasyonu Amerikada görülürken en düşük PFOS konsantrasyonu ise Hindistan'da görülmüştür.

PFOS çok iyi bir şekilde absorbe edilirken, eliminasyonun da çok uzun yıllar alması nedeniyle son 25 yılda Japonya'daki insanların kanında bulunan PFOS konsantrasyonunun 14 kat arttığı belirlenmiştir. Ayrıca son yıllarda PFOS kullanımının yaygınlaşması da konsantrasyonunun artmasında diğer bir önemli etkidir (5).

Yapılan çalışmalar PFOS'un, tatlı su ve deniz memelileri, balıklar, kuşlar ve kabuklu deniz hayvanları gibi çok çeşitli türlerde bulunduğunu ortaya koymuştur (6, 7).

Memelilerde (maymun, tavşan, fare ve sıçan) yapılan gelişim toksikolojisi çalışmalarında da PFOS'un fetal ağırlığı azalttığı, yarık damak oluşumunu indüklediği, kardiyak anomalilerine sebep olduğu ve iskelet ossifikasyonunu geciktirdiği tespit edilmiştir. Ayrıca 2 mg/kg gibi düşük dozda PFOS verilen gebe sıçanlarda bile neonatal

mortalitenin arttığı gösterilmiştir. PFOS'a maruz kalmanın öncelikle karaciğeri etkilediği görülmüştür. PFOS hepatik hücrelerde hipertrofiye yol açmaktadır. Aynı zamanda vücut ağırlığını, serum kolesterol ve trigliserit seviyesini azaltmakta ve karaciğer ağırlığını arttırmaktadır. Ayrıca PFOS plasenta bariyerini geçerek fetal dolaşıma da katılmakta ve böylece gebe sıçanlarda fetüs üzerinde çok sayıda toksik etkiye neden olmaktadır (8, 9, 10)

PFOS'un toksisitesinin altında yatan nedenin mitokondrial fonksiyon kaybı olduğu düşünülmektedir. Bu kimyasallar üç farklı mekanizma ile mitokondri fonksiyonunu bozmaktadır. Bunlar; membran geçirgenliğini bozulması, kalsiyum indüksiyonuna bağlı olarak mitokondrilerin şişmesi ve son olarak da solunum reaksiyonlarının engellenmesidir. Bunlar arasından solunum reaksiyonlarının engellenmesi ve mitokondrilerin şişmesi daha nadir görülmekte olup mitokondrinin fonksiyon kaybında en önemli etken mitokondrinin membran geçirgenliğinin bozulmasıdır (11, 12).

Mitokondrinin dış zar geçirgenliğinin artması mitokondri membranları arasındaki boşlukta bulunan bazı proteinlerin sitoplazmaya kaçışına neden olur. Bunların başlıcaları sitokrom-c, mitokondriden türetilen ikinci kaspaz aktivatörü/düşük pI ile doğrudan IAP bağlayan protein (SMAC/DIABLO, second mitochondrial-derived activator of caspase/Direct IAP binding protein with low pI), apoptoz indükleyici faktör (AIF, Apoptosis Inducing Factor), Endonükleaz G (EndoG)'dir. Bu proteinler arasında en önemlilerinden biri sitokrom-c'dir. Mitokondri iç membranında bulunan ve elektron transport zincirinin bir proteini olan sitokrom-c'nin sitoplazmaya geçişi ile bir seri apoptotik reaksiyon başlamaktadır (13).

Sitokrom-c sitoplazmik bir protein olan apoptotik proteaz aktive edici faktör-1'e (Apaf-1, apoptotic protease activating factor-1) bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nin de katılımıyla "apoptozom" adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive eder. Aktif kaspaz-3, kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD, inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease) inaktifleştirir, böylece ICAD'ünün bağladığı kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD, Caspase-activated deoxyribonuclease) serbestleşir ve bu da apoptozun karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur (14).

PFOS endüstriyel alanda oldukça yaygın olarak kullanılan bir bileşiktir. Son yıllarda sıçanlar ile yapılan çalışmalar, PFOS'un neonatal mortalite ile ilişkili olduğunu göstermiştir ancak bu etkinin moleküler mekanizması ile ilgili yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada PFOS'un embriyonel orjinli hücre serilerinden amniyon (F1) ve fetal akciğer (Hel299) hücrelerinde, sitokrom-c aracılı apoptoz ile ilişkili genlerin (Apaf-1, kaspaz-3) ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Perflorooktan Sülfonat

Perflorooktan sülfonat (PFOS), perflorooktan sülfonil floritten üretilmiş bileşiklerin son metabolik ürünü olup 50 yılı aşkın bir süredir endüstriyel alanda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (1).

Perflorooktan sülfonat ve tuzları flor içeren organik bileşiklerdir. Flor, halojenler arasında en yüksek elektronegatifliğe sahiptir. Bu da karbon-flor bağlarına güçlü bir polarite sağlar. Karbon-flor bağı (110 kcal/mol) doğadaki en güçlü bağ olup oldukça yüksek enerji taşımakta ve PFOS'a stabilite sağlamaktadır (2). PFOS'un şematik yapısı Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. PFOS'un şematik yapısı (15)

Perflorooktan sülfonat Amerika, Avrupa ve Japonya'da üretilmektedir. İşlendiği firmalar da Japonya ve Minnesota da bulunmaktadır. Son yıllarda yıllık 4500 ton PFOS içeren kimyasal üretilmiştir (16).

2.1.1 Fizikokimyasal Özellikleri

Çizelge 2.1'de görüldüğü gibi yapılan çalışmalarda, 20-21°C'de saf sudaki çözünürlüğünün 519 mg/L olduğu tespit edilmiştir. Tuz konsantrasyonu arttıkça, çözünürlüğünün ciddi derecede düştüğü görülmüştür (22-23 °C'de doğal deniz suyundaki çözünürlüğü 12.4 mg/L ve 22-24 °C' de % 3.5'luk NaCl çözeltisindeki çözünürlüğü 20.0 mg/L). Saf oktanoldaki ortalama çözünürlüğünün 56 mg/L olduğu gösterilmiştir. Bu bulgu PFOS'un bir su kaynağına ulaştıktan sonra özel bir madde tarafından emilene veya bir organizma tarafından asimile edilene kadar ortamda kaldığını göstermektedir. Eğer PFOS özel bir maddeye bağlanırsa materyal sonunda bir çökeltide bulunacaktır (3).

PFOS'un sıcaklığı maksimum 400 °C'ye çıkarılabilmiş ancak erimediği gözlenmiştir. Bu nedenle erime noktası >400 °C olarak gösterilmektedir. Erime noktasının bu kadar yüksek olması nedeniyle kaynama noktasının tespit edilmesi ile ilişkili bir çalışma yapılmamıştır (3).

Çizelge 2.1. PFOS'un Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Özellik	Değeri
Fiziksel Durumu	Katı
Molekül Ağırlığı	538 g
Buhar Basıncı	3.31×10^{-4} mm-hg
Suda Çözünürlüğü	519 mg/L (20±0.5 °C) 680 mg/L (24-25 °C)
Erime Noktası	>400 °C,
Uçuculuk oranı	$<2 \times 10^{-6}$ Pa.m ³ /mol

Uçuculuk oranı hesaplandığında ölçülebilen hiçbir aralıkta uçuculuğu tespit edilememiştir. Buhar basıncının (3.31×10^{-4} mmhg) da oldukça düşük olması PFOS'un anlamlı derecede uçucu olmadığını göstermektedir. Uçuculuk oranı $<2 \times 10^{-6}$ Pa.m³/mol olup çok düşük olması nedeni ile sıfır olarak kabul edilmektedir. Ancak bazı PFOS içeren maddelerin yüksek buhar basıncı nedeni ile uçuculukları söz konusudur. Bu da PFOS'un kendisinin doğrudan hava aracılığı ile transportunun olmamasına rağmen PFOS prekürsörleri aracılığı ile transportunun olduğunu göstermektedir.

PFOS'un düşük buhar basıncı ve düşük uçuculuğu nedeni ile önemli ölçüde havada bulunamayacağından çökmesi de önemli bir faktör olarak kabul edilmemektedir. Bu konuda da yeterli çalışma yapılmamıştır (3, 17).

2.1.2 Kullanım Alanları

Florokimyasallar endüstriyel alan için oldukça faydalı özelliklere sahip olduklarından birçok önemli komponentin üretiminde kullanılmaktadırlar. Oldukça stabil olup genellikle reaktif değildirler. Kullanıldıkları komponentin su ve yüzey gerilimini diğer maddelerden daha fazla düşürürler. Oligomerizasyon ve polimerizasyon için katalizör rolü oynarlar. Diğer komponentlerin parçalandığı şartlarda bile fonksiyonlarını yerine getirebilirler (18).

2.1.2.1 Metal (Krom) Kaplama

PFOS'un temel kullanım alanlarından biri metal ve krom yüzeylerinin kaplanmasıdır. PFOS metal kaplama solüsyonlarının yüzey gerilimini azaltmak için kullanılırlar. Böylece solüsyondan zararlı komponentler içeren buğu oluşumu önlenmektedirler. Ayrıca krom kaplamalarda da kullanılarak asit aşınmasını önlerler. Bu amaçla Avrupada her yıl 8.6-10 ton PFOS kullanılmaktadır (19, 20).

2.1.2.2 Fotoğrafçılık

PFOS fotoğraf filmleri, kağıtları ve matbaa levhalarının kaplamasında da kullanılmaktadır. Bu maddelerin buradaki temel fonksiyonu anti-statik ajan olmasıdır. Bu da statik akımı önleyerek çalışanların materyale dokunabilmesini sağlamakta ve fotoğrafik materyallerin akıma maruz kalmasını önlemektedir. Bu maddeler ayrıca sürtünmeyi de azaltmaktadır. Fotoğrafik materyallerde birçok ince tabakanın aşağı yukarı kayması önemli olduğundan kamera, yazıcı ve projektörlerdeki sürtünmeyi önlemek amacıyla kullanılmaktadır. PFOS'un kullanıldığı temel alan, medikal alan (x-ışın) olup Avrupa'da fotoğrafçılık sektöründe kullanılan PFOS'un % 85'inin bu alan tarafından kullanıldığı bildirilmektedir. Film üretimi için yılda 850 kg PFOS kullanılmaktadır (19, 20).

2.1.2.3 Havacılık

PFOS uçakların ateşe dayanıklı hidrolik sıvılarının komponenti olarak da kullanılmaktadır. Hidrolik sıvılara eklenerek hidrolik sistemdeki hasar ve erozyon önlenmektedir. Dünyada bu amaçla kullanılan PFOS miktarının yılda 2.2 ton olduğu tahmin edilmekte ve bununun 0.73 tonu Avrupa tarafından tüketilmektedir (19, 20).

2.1.2.4 Yangın Söndürücüler

Su, yangınların çoğunda önemli ve etkilidir. Ancak çabuk yanabilen likitler içeren yangınları (sınıf B) söndürmek için yetersiz kalmaktadır. PFOS temelli yangın söndürücüler ise bu tip yangınların söndürülmesi için son yıllarda kullanılmaya başlanmıştır. PFOS içeren yangın söndürücü köpük, solüsyon ile hava arasında ince bir film tabakası oluşturarak suyun yüzey gerilimini azaltır ve yangının yayılmasını engeller (19, 20).

İngiltere'de itfaiye yetkilileri, yıllık 76 ton PFOS içeren yangın söndürücü köpük konsantresi kullandıklarını bildirmiştir. Yangın söndürücü köpük konsantrelerinin % 1

PFOS içerdiği göz önünde bulundurulursa İngiltere’de yılda 760 kg PFOS’un yangın söndürücülerde kullanıldığı tespit edilmiştir (19, 20).

2.1.2.5 Dokumalarda (halı, tekstil, deri) Koruyucu

PFOS dokumaların toprak, su ve yağa karşı dirençli olmasını sağlamak amacı ile yoğun olarak kullanılmaktadır. Materyal yüzeyine uygulandığında, materyalin yüzey enerjisini düşürerek koruyucu bir bariyer oluşturur.

İngiltere’de her yıl 48 ton PFOS bu amaçla kullanılmakta bunun 23 tonu halı, 15 tonu giyim ve deri, 10 tonu da döşeme sanayinde kullanılmaktadır. Bu amaçla tüm dünyada kullanılan PFOS miktarının ise 240 ton olduğu düşünülmektedir (19, 20).

2.1.2.6 Kağıtların Muamele Edilmesi

PFOS bir çok kağıt tipinde ve ürünüde kağıtların yağ ve suya karşı dirençli olmasını sağlamak amacı ile kullanılmaktadır. Bu tip kağıtlar yiyeceklerle doğrudan temas halindedir. Örneğin; kek, margarin, şeker, unlu mamüller ve evcil hayvan yemlerinin konulduğu paketlerde, hamburger paketleri, sandviç paketleri, patates cipsi kutuları ve kağıt tabaklarda kullanılmaktadır.

Bu amaçla, 2000 yılında Avrupa’da 32 ton PFOS kullanılmış olup tüm dünyada kullanılan miktarın ise 160 ton olduğu düşünülmektedir. Kağıtlar için geri dönüşüm de olabilmektedir. Ancak PFOS içeren bu kağıtların (yiyecek paketleri gibi) geri dönüşüme girmek yerine evsel veya kentsel atıklar ile imha edildiği düşünülmektedir (19, 20).

2.1.2.7 Endüstriyel, Ev Temizleme ve Kişisel Bakım Ürünleri

PFOS’un diğer bir yaygın kullanım alanı ise kişisel bakım ve endüstriyel temizlik ürünleridir. Sislenmeyi önleyici olarak nemli havaya maruz kalan cam yüzeylerinde (banyo aynaları, otomobil ön camları, gözlük mercekleri) kullanılır. Çimentoya eklenerek çimentonun ağırlığındaki azalmayı azaltır. Boyalara eklenerek kirlenmeyi önleyici ya da geciktirici olarak kullanılır. Ayrıca alkali temizleyiciler (otomotiv cilaları, uçakların dış yüzey temizliği, zemin parlaticılar, takma diş temizleyicileri), saç şekillendiriciler, şampuanlar diğer kullanım alanlarıdır. Bu alanda kullanılan PFOS miktarı ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır (19, 20).

2.1.2.8 Pestisitler

PFOS karınca ve kara böceklerle karşı üretilen yemlerde kullanılmaktadır. Avrupa'da bu amaçla PFOS kullanılan bir firma tespit edilmiş olup yılda 0.5 ton PFOS kullanmaktadır (19, 20).

2.1.3 Degradasyonu

Karbon-flor bağı oldukça dirençli bir bağ olduğundan asit, asit-baz reaksiyonları, oksidasyon, redüksiyon ve degradasyona karşı oldukça dirençlidir (2). Uçuculuğu düşük olduğu için atmosferdeki degradasyonu önemli değildir. Bu nedenle de konu ile ilgili deneysel bir veri bulunmamaktadır. Degradasyonu ile ilgili olarak yapılan çalışmalar sıvı ortamda gerçekleştirilmiştir (21).

2.1.3.1 Abiyotik Degradasyonu

i. Hidroliz

PFOS'un hidrolizi için çok değişken pH aralıklarında (1.5-11) çalışılmıştır. Reaksiyonun hızlanması için testler 50 °C'de gerçekleştirilmiştir. Ancak hiçbir çalışmada PFOS miktarında azalma olmamıştır. Yarılanma ömrünün 25 °C'de 41 yıldan fazla olduğu tahmin edilmektedir.

ii. Fotoliz

Fotolizini tespit edebilmek için doğrudan veya dolaylı olarak fotolize izin veren birçok test tekniği kullanılmış ancak test edilen hiçbir koşulda doğrudan veya dolaylı olarak fotolizi tespit edilememiştir. Fotolizi için yarılanma ömrünün 3.7 yıldan fazla olduğu tespit edilmiştir (21).

2.1.3.2 Biyodegradasyonu

i. Aerobik

Kurume Laboratuvarı tarafından yapılan 28 günlük ve 35 günlük biyodegradasyon testleri anlamlı bir degradasyonunun olmadığını göstermiştir (22). RİKZ (23) n-etilperflorooktansulfonamidoetanölün (N-EtFOSE) atık sularda PFOS ve perflorooktan asite (PFOA) kadar degrade edildiğini göstermiştir. N-EtFOSE aerobik biyodegradasyonun başlangıç molekülü olarak tanımlanmıştır. Mekanizmayı tanımlamak için 5 ara metabolit ayrı ayrı test

edilmiş ve bu 5 ara metabolitin de 18 günde PFOS ve PFOA'a degrade edildiği görülmüştür. PFOS ve PFOA'nın ise degrade edilemediği ve zincirin sonunda yer aldığı tespit edilmiştir. Bu durum N-EtFOSE'nin aerobik biyodegradasyon ürünlerinde son noktanın PFOS ve PFOA'nın olduğunu göstermektedir.

Öte yandan Cahill ve Mackay (24) ayrıca N-EtFOSE'nin mikrobiyal degradasyonu sonucunda % 92 PFOS ve % 8 PFOA oluştuğunu ortaya koymuştur.

ii. Anaerobik

PFOS'un anaerobik koşullarda yapılan 56 günlük bir çalışmada da degradasyonuna rastlanmamıştır. Yapılan mikrobiyal kültürler sonucunda hiçbir türün PFOS'u degrade edemediği görülmüştür (21). Schroder (25) yaptığı çalışmada ise anaerobik koşullarda 2. gün sonunda PFOS konsantrasyonunun ilk belirlenen değer altına düştüğünü tespit etmiştir. Ancak 25 günlük çalışma sonunda, flor iyon konsantrasyonu ölçüldüğünde flor konsantrasyonunda bir artma olmadığı tespit edilmiştir. Bu da tam anlamıyla mineralizasyonun olmadığını göstermektedir.

2.1.4 Çevresel Konsantrasyonu

PFOS ve prekürsörleri ile ilgili ilk çevresel çalışma Japonyada yapılmış ve Tokyo körfezinde yüzey sularındaki en yüksek konsantrasyon 59 ng/L (ortalama: 26 ng/L) olarak ölçülmüştür. Yüzey sularındaki PFOS konsantrasyonunun poliaromatik hidrokarbonlara (PAHs) yakın olduğu, poliklorlu bifenil, dioksin ve furan'dan yüksek olduğu tespit edilmiştir (26). Daha sonraki yıllarda Saito ve ark. (27) tarafından Japonya'daki 142 farklı yerdeki yüzey su örneklerinde PFOS'un en yüksek konsantrasyonunun 157 ng/L'ye kadar ulaştığı tespit edilmiştir.

Loos ve ark. (28) tarafından Avrupa'da yapılan başka bir çalışmada ise 100 nehirden 94 tanesinde PFOS'a rastlanmıştır. PFOS konsantrasyonu ortalaması ise 39 ng/L olarak tespit edilmiştir.

Su sıkıntısı çeken ülkelerde, fabrika ve evsel atık sularının işlenmesi ile susuzluğun önleneceği düşünülmektedir. Ancak arıtılan sularda 90-470 ng/l florokimyasal tespit edilmiş olup bunun 20-190 ng/l'sinin PFOS olduğu belirtilmiştir (29). Geçmişte başka alternatif olmadığından işlenmiş atık sular yüzey sularına verilmiştir. Atık su işleyen fabrikaların işlenen suları yüzey sularına boşaltmaları nedeni

ile de nehirlerde PFOS konsantrasyonu belirgin şekilde arttığı bildirilmiştir (30). Almanya'da 5 farklı nehirde su örnekleri alınarak yapılan bir çalışmada atık su işleyen fabrikalara yakın olan bölgelerde PFOS konsantrasyonunun 3 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (31).

İspanya'da Ericson ve ark. (30) tarafından yapılan bir çalışmada ise musluk suyundaki PFOS konsantrasyonunu oranı 0.39-0.87 ng/L olarak tespit edilirken sadece şişe sularında PFOS'a rastlanmamıştır. Ancak musluk suyu tüketen insanların günde ortalama iki litre su içtiği göz önünde bulundurulduğunda 0.78-1.74 ng PFOS'a maruz kalacakları bildirilmiştir.

Ayrıca, İspanya'da market raflarındaki ürünlerde PFOS konsantrasyonunun araştırıldığı bir çalışmada, 20 ürünün 4'ünde ciddi oranda PFOS'a rastlanmıştır. Bunlar patates (10 ng/g), yumurta (2 ng/g), konserve sebze (1 ng/g) ve şeker (1 ng/g) olup bakliyat, tahıl, süt ve yağlarda ise PFOS konsantrasyonu oldukça düşüktür. Bu çalışmada kuzu, dana eti ve piliçte de değişik konsantrasyonlarda PFOS'a rastlanmıştır (32). Amerika'da da süt ve sığır etinin de ölçülebilir konsantrasyonda PFOS içerdiği tespit edilmiştir. Sıçan karaciğeri, sıçan yiyeceğinde ve balık etinde de farklı konsantrasyonlarda PFOS'a rastlanmıştır (20).

2.1.5 Biyoakümüülasyonu

PFOS oral yolla çok iyi absorbe edilmektedir. Sıçanlarla yapılan çalışmada içinde 4.2 mg/kg işaretlenmiş PFOS içeren solusyonunun tek oral dozunun % 95'nin 24 saat sonununda absorbe edildiği gösterilmiştir (33).

Ayrıca yapılan çalışmalar PFOS'un hidrofilik olması nedeni ile diğer dirençli organik kirleticiler gibi yağ dokuda birikmediğini göstermiştir. Bunun yerine PFOS kan ve karaciğerdeki proteinlere bağlanmaktadır (21).

Vestergen ve ark. (34) tarafından endüstriyel ülkelerde genel populasyonun maruz kaldığı kronik doz 3.9-520 ng/kg/gün olarak hesaplanmıştır. Bunun yanı sıra Trudel ve ark. (35) ise Kuzey Amerika ve Avrupa'daki tüketicinin PFOS ile kontamine yiyecekler ve içeceklerin tüketilmesi ile kronik olarak 3-220 ng/kg/gün PFOS'a maruz kaldığını tespit etmiştir. Ayrıca vücut tarafından emilen tozlar, evlerde PFOS ile muamele edilmiş halılar, yiyecek ile temas eden kağıtlar (kaplayıcılar) da tüketici maruziyetinde rol oynayan diğer etkenlerdir. Çocuklar tozlarla daha fazla temas ettiğinden yetişkinlere ve gençlere oranla daha fazla PFOS'a maruz kalmaktadır (35,

36) Ancak yapılan çalışmalarda yaş grupları ile PFOS konsantrasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (37).

PFOS'un bitkiler tarafından alındığı ile ilgili sınırlı miktarda veri bulunmaktadır. PFOS verilen 7 bitki türünde toksisite çalışmaları yapılmış ve bitki dokularındaki PFOS konsantrasyonları ölçülmüştür. Bitkilerin vejetatif dokularındaki PFOS konsantrasyonunun topraktakine oranla 1-2 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Topraktaki PFOS konsantrasyonu düşük olduğunda bu değerin ikiye daha yakın olduğu görülmüştür. Meyvedeki konsantrasyon ise topraktaki seviyenin % 10'undan daha düşük olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bitkilerin PFOS'dan daha az etkilendiği görülmüştür.

Çeşitli hayvan türlerinde de farklı konsantrasyonlarında PFOS'a rastlanmıştır. Bu hayvanlar arasında balıklar, kutup ayıları, kaplanlar, aslanlar, kuşlar, fok balıkları, kaplumbağalar yer almaktadır (6, 7, 38).

Kannan ve ark. (39) tarafından Florida, Kaliforniya, Alaska, Akdeniz, Kuzey Baltık Denizi, Kuzey Kutbu, Kanada'daki Samur adalarında yapılan çalışmalarda memeli hayvanların karaciğerlerinde ve kanlarında saptanabilir derecede PFOS olduğu gösterilmiştir. En yüksek karaciğer PFOS konsantrasyonu 1520 ng/g olup Florida'daki yunusta, en yüksek kan konsantrasyonu ise 475 ng/mL olup Baltık denizindeki ayı balığında görülmüştür.

Adams ve ark. (40) Amerika Charleston'da Şişeburun yunus balığında (*Tursiops truncatus*) PFOS konsantrasyon oranını 317-6260 ng/g olarak bulmuşlar ve PFOS'un yoğun kullanıldığı bölgelerde yaşayan yunusların plazma PFOS konsantrasyonlarının anlamlı derecede yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Almanya'da da, 4 Liman fokunda (*Phoca vitulina*) yapılan çalışmada PFOS konsantrasyonunun en yüksek olduğu organın karaciğer (1017 ± 536 ng/g) sonra sırasıyla akciğer (433 ± 227 ng/g), kan (349 ± 370 ng/g), timus (312 ± 136 ng/g), böbrek (288 ± 117 ng/g), kalp (143 ± 40 ng/g), beyin (99 ± 49 ng/g), tiroid (62 ± 58 ng/g), kas (59 ± 52 ng/g) ve en düşük olduğu organın da yağ dokusu (8.91 ± 9.93 ng/g) olduğu tespit edilmiştir (41).

Cheasepeake körfezi ve Meksika körfezlerinden toplanan istiridyelerde ve Amerika nehirlerinden toplanan deniztaraklarında da PFOS tespit edilmiştir (42). Tokyo körfezinin yüzey sularından elde edilen 78 balığın kan ve karaciğerinde PFOS olduğu tespit edilmiştir (43).

PFOS konsantrasyonunun balıkla beslenen kuşlarda da oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kahverengi pelikan, beyaz pelikan, büyük mavi balıkçıl, karabatak, kel kartal ve deniz kartalının kan ve karaciğerlerinde değişik konsantrasyonlarda (oranı: 6-2055 ng/l) PFOS'a rastlanmıştır (44).

Japonya'daki çiftlik ve ev hayvanlarında PFOS belirgin oranda tespit edilmiştir. PFOS konsantrasyonunun en yüksek olduğu çiftlik hayvanı tavuk (5.8 ng/ml) olup onu sırasıyla sığır (3.0 ng/ml), keçi (2.4 ng/ml), at (0.71 ng/ml) ve domuz (0.37 ng/ml) takip etmektedir (45).

PFOS, genel insan popülasyonunun kanında ise ilk defa 1968'de belirlenmiştir. Japonlar tarafından yapılan bir çalışmada serum PFOS konsantrasyonunun 25 yılda 14 kat arttığı gösterilmiştir (5). Çin'de ise 1999-2002 yılları arasında serum PFOS konsantrasyonunun 13 kat arttığı tespit edilmiştir (46). Son yıllarda genel popülasyondaki insanların serumunda da PFOS olduğu tespit edilmiştir. Ancak mesleki olarak PFOS'a maruz kalan işçilere göre oldukça düşük oranlarda bulunmaktadır (5).

Amerika'da yapılan bir çalışmada genel popülasyondaki insanların serumlarında PFOS konsantrasyon oranı 13.8-56.5 µl/l olarak tespit edilmiştir (37). Kore savaşından kalan kan örneklerinde PFOS'a rastlanmaması 1950'lerde (PFOS üretimi başlamadan önce) PFOS'a maruziyetin olmadığını göstermektedir.

Amerika'da 3 farklı yaş popülasyonu kullanılarak kan PFOS seviyeleri ölçüldüğünde ise 3 popülasyonda da geometrik ortalamalarının (35, 31 ve 38 ng/ml) birbirine oldukça yakın olduğu gözlenmiştir. Ancak çocuklar (515 ng/ml) ve yetişkinlerde (1656 ng/l) gözlenen en yüksek PFOS konsantrasyonu yaşlılarda (175 ng/l) gözlenen en yüksek PFOS konsantrasyonundan daha yüksektir (47).

Kannan ve ark. (4)'nin yaptıkları çalışmada ise en yüksek kan PFOS konsantrasyonunun Amerika'da (>30 ng/l), en düşük kan PFOS konsantrasyonunun ise Hindistan'da (3 ng/l) olduğu görülmektedir. Kore, Belçika, Malezya, Brezilya, İtalya, Kolombiya ise PFOS konsantrasyonunun (3-29 ng/l) orta dereceli olduğu ülkelerdir.

PFOS'un plasenta bariyerini geçerek fetal sirkülasyona girebildiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Baltimor'da Apelberg ve ark. (48) tarafından yapılan bir çalışmada umbilikal kord örneklerinin % 99'unda PFOS'a rastlanmıştır. PFOS konsantrasyonunun geometrik ortalaması 4.9 ng/mL dir. Ayrıca Inoue ve ark. (49) Japonya'da 15 gebenin maternal ve kordon kanındaki PFOS seviyelerini ölçmüşlerdir. Maternal örneklerdeki en düşük PFOS konsantrasyonu 4.9 ng/ml iken en yükseği 17.6

ng/ml'dir. Fetal örneklerde ise en düşük PFOS konsantrasyonu 1.6 ng/ml ve en yüksek ise 5.3 ng/ml'dir. Sonuçlar arasında oldukça yüksek oranda bir korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir (r^2 : 0.88). Midasch ve ark. (50) da 11 gebenin maternal ve kordon kanında PFOS konsantrasyonu değerlendirildiğinde benzer şekilde maternal PFOS konsantrasyonunun kordon kanı konsantrasyonuna (13.0 µg/l vs. 7.3 µg/l) oranla daha yüksek olduğunu tespit etmiştir.

Bunun yanı sıra yapılan çalışmalar PFOS'un anne sütünde de olduğunu göstermiştir. Massachusetts'de yapılan bir çalışmada 45 anne sütü örneğindeki PFOS konsantrasyonu 131 pg/ml olarak tespit edilmiştir (51). Almanya'da ise 70 anne sütü örneğindeki PFOS konsantrasyonu değerlendirilmiş olup PFOS konsantrasyonu ortalaması 330 ng/l ve oranı 96–639 ng/l olarak bulunmuştur. Bu çalışmaya göre yenidoğan 5 kg'lık bir bebek günde 0.10 mg (median kullanılarak) veya 0.27 g (maksimum değer kullanılarak) PFOS'a maruz kalmaktadır (52).

Kadavralarda da karaciğer ve serum PFOS konsantrasyonları değerlendirildiğinde karaciğer:serum PFOS oranı 1.3:1 şeklinde bulunmuştur (47).

Yapılan çalışmalarda bazı kişilerin serum PFOS konsantrasyonlarının diğerlerine oranla oldukça yüksek olduğu tespit edilmiş olup buna neden olan faktörler henüz aydınlatılamamıştır. Serum PFOS konsantrasyonu ile coğrafik bölge, sigara kullanma ya da yaş arasında önemli derecede bir ilişki bulunamamıştır. Bazı çalışmalarda erkeklerde PFOS konsantrasyonunun geometrik ortalamasının kadınlardan daha yüksek olduğu tespit edilmekle birlikte bazı çalışmalarda cinsiyet ile PFOS konsantrasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Serum PFOS konsantrasyonunu etkileyen nedenler arasında üretim veya kullanıma yakın bölgede oturma ve ürünlerle maruziyetin (yiyecekler ve çevresel kaynaklar) yer aldığı düşünülmektedir (5).

2.1.6 Vücuttan Atılımı

Hayvanlarda yapılan çalışmalar PFOS'un çok iyi absorbe edildiğini ve en çok serum ve karaciğerde biriktiğini göstermiştir. Vücuttan eliminasyonu oldukça yavaş bir şekilde gerçekleşmekte olup idrar ve feçesle atılmaktadır. PFOS'un vücuttan eliminasyon yarılanma süresi, türler arasında farklılık göstermektedir. Serumdaki yarılanma süresi yetişkin sıçanlarda 7.5 günken (33) *Cynomolgus* maymunlarında bu süre 200 gündür (8). Bu sürenin insanlarda ise çok daha uzun olduğu görülmektedir. En büyük PFOS üretici firma olan 3M'den emekli olan 9 işçide yarılanma ömrü analizleri

yapılmıştır. Bu çalışmada 18 günde eşit aralıklar ile 4 kez serum PFOS konsantrasyonları değerlendirilmiş ve ortalama yarılanma ömrünün 8.67 yıl (oranı 2.29-21.3, SD:6.12) olduğu tespit edilmiştir (53).

2.1.7 Toksisitesi

Mesleği nedeniyle PFOS'a maruz kalan çalışanların bu maddenin sağlıklarına olan etkilerini araştıran pek çok çalışma yapılmıştır. 3M şirketi florokimyasal üretiminde çalışan işçilerini 20 yıl boyunca medikal gözlem altında tutmuştur. Lipit ve hematolojik parametreler, enzimler ve 11 farklı hormon içeren bir klinik test seti uygulanan işçilerde PFOS serum konsantrasyonu ile hematolojik, hormonal ve diğer biyokimya parametreleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (1, 54).

Yapılan bir mortalite çalışmasında mesane kanseri ile işçilerdeki PFOS seviyesi arasında anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Mesane kanserinden ölen işçilerin 20 yıldır 3M fabrikasının Decatur, Alabama fabrikalarında çalıştığı ve en az 5 yılda yüksek miktarda PFOS'a maruz kalan işlerde çalıştıkları tespit edilmiştir. İstatistiksel analizler yüksek miktarda PFOS'a maruz kalan işçilerin mesane kanserinden ölme riskinin Alabama'daki genel popülasyona oranla daha yüksek olduğunu göstermiştir. Ancak mesane kanserinden ölümün temel nedeninin florokimyasal maruziyeti mi yoksa fabrikadaki olası başka bir karsinojen mi olduğu ile ilgili yeterli miktarda veri olmaması nedeni ile bu durum tam anlamıyla anlaşılamamıştır. Ayrıca mesane kanserinin yanı sıra başta erkek üreme sistemi kanserleri ve gastrointestinal sistem kanserleri olmak üzere tüm kanser çeşitlerinde artış gözlenmiştir. Ancak bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Risk oranının yüksek dozda ve uzun süre florokimyasala maruz kalmayla arttığı tespit edilmiştir (55).

Fei ve ark. (56) maternal PFOS seviyesi arttığında hamile kalma oranında azalma olduğunu tespit etmiştir. Genel popülasyonda da PFOS'a maruziyetin doğurganlığı düşürdüğü gösterilmiştir.

PFOS'un toksik olduğu sıçanların akut, subkronik, kronik olarak ve maymunların subkronik olarak PFOS'a maruz bırakılması sonucu kanıtlanmıştır. Tekrarlayan dozda PFOS verilerek maymunlarda yapılan oral toksisite çalışmalarında iki maymun türünde de benzer karakteristik etkiler gözlenmiştir (8, 57).

Rhesus maymunları ile yapılan 90 günlük çalışmada PFOS gavaj yolu ile 0, 0.5, 1.5 ve 4.5 mg/kg/gün olarak verilmiş ve iştahsızlık, kusma, ishal, hipoaktivite, bitkinlik,

çarpınma, tükürük bezleri ve pankreasta atrofi, serum kolesterol seviyesinde anlamlı derecede düşüş, adrenal bezlerde lipit seviyesinde azalma gözlenmiştir. Yüksek dozda PFOS verilen tüm maymunlar ölmüştür (4.5 mg/kg/gün PFOS verilen maymunlar 7. haftada ölmüştür), 0.5 ve 1.5 mg/kg/gün PFOS verilen maymunlarda ölüm gözlenmemekle birlikte gastrointestinal sistemde toksik etkiler görülmeye başlanmıştır (57).

6 ay boyunca kapsül ile düşük dozda PFOS verilen *Cynomolgus* maymunlarında ise besin tüketiminde azalma, hipoaktivite, karaciğerde vakuolizasyon, hepatoselüler hipertrofi, serum kolesterol seviyesinde anlamlı derecede azalma ve ölüm görülmüştür (çalışmanın son ayında 0.75 mg/kg/gün PFOS verilen 6 erkekten 2'si ölmüştür) (8).

Sıçan çalışmalarında meydana gelen etkiler arasında ise karaciğer enzimlerinde artış, hepatoselüler hipertrofi, gastrointestinal etkiler, hematolojik anormallikler, kilo kaybı, çarpınma ve ölüm yer almaktadır. Gavajla, 28 gün, 5 mg/kg/gün ve 20 mg/kg/gün PFOS verilen Sprague–Dawley sıçanlarında en yüksek PFOS konsantrasyonunun karaciğerde olduğu daha sonra sırasıyla kalp, böbrek, tam kan, akciğer, dalak, beyin ve en düşük PFOS konsantrasyonunun ise testislerde olduğu tespit edilmiştir. Yüksek doz grubunda anormal davranışlar, hızlı kilo kaybı, hepatomegali, böbrek hipertrofisi, testis tümörü görülmüştür. Histopatolojik bulgular karaciğer ve akciğerde büyük hasarlar olduğunu göstermiştir. Karaciğerde hepatosit hipertrofisi ile sitoplazma vakuolizasyonu, akciğerde ise epitelyal duvarlarında kalınlaşma tespit edilmiştir (58).

Austin ve ark. (59) tarafından yapılan çalışmada yetişkin dişi farelere (n=4-5) 2 hafta boyunca 0.1 veya 10 mg/kg PFOS uygulanmıştır. Doza bağlı olarak yiyecek tüketimi ve vücut ağırlığının azaldığı tespit edilmiştir. PFOS'un östros siklusunu etkilediği, serum kortikosteron seviyesini arttırdığı ve serum leptin seviyesini azalttığı tespit edilmiştir. PFOS'un ayrıca hipotalamusun paraventriküler nükleus bölgesinde norepinefrin konsantrasyonunu da arttırdığı gözlenmiştir.

Johansson ve ark. (60) tarafından yapılan çalışmada 10 günlük farelere tek oral doz 1.4 veya 21 mmol/kg PFOS (0.75 or 11.3 mg) vermişler ve nörotoksik etkilerini değerlendirmişlerdir. PFOS uygulanan 2 ve 4 aylık farelerin davranışlarında dengesizlik, belirgin bir şekilde oturmada azalma ve hiperaktivite gözlenmiştir. Bu etkilerin yaş ilerledikçe de kötüye gittiğini belirlemişlerdir. PFOS'a maruziyet kolinerjik sistemi etkilemektedir. Bu nörotoksik etkiler poliklorlu bifenil ve

polibromodifenil eter ile benzerdir ve PFOS gelişimsel nörotoksik bir madde olarak kabul edilmiştir.

Diğer etkilerin yanı sıra flow sitometri analizlerinde 7 gün 0, 5, 20 ve 40 mg PFOS/kg verilen sıçanlarda özellikle 20 ve 40 mg PFOS/kg dozlarında lenfosit sayısında ciddi bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada PFOS'a maruziyetin immün fonksiyonu da baskıladığı tespit edilmiştir (61).

Sıçanlarda PFOS'un prenatal gelişime olan toksik etkisini belirlemek için reproduktif toksisite çalışmaları için sıçanlara gavajla 0.1, 0.4, 1.6 ve 3.2 mg/kg/gün PFOS verilmiştir. 1.6 ve 3.2 mg/kg/gün dozlarında F1 jenerasyonunda canlılıkta anlamlı derecede bir azalma görülmüştür. 1.6 mg/kg/gün dozunda F1 yavrularının % 34'ü doğumdan sonraki ilk 4 gün içinde ölmüştür. 3.2 mg/kg/gün grubundaki F1 yavrularının % 45'i (71/156) doğumdan sonraki gün ölmüştür. Bu gruptaki yavrulardan hiç biri 4 günden fazla yaşamamıştır. Yüksek dozlarda ilk jenerasyondaki tüm yavrular ölmüş, düşük dozlarda ise ikinci jenerasyondaki tüm sıçanlar ölmüştür. İkinci jenerasyonda etkilerinin görülmesi oldukça ilginçtir. Neonatal mortalitenin altında yatan nedenin ise akciğerlerin gelişmemesi olduğu düşünülmektedir (9).

Gebelik sırasında PFOS uygulanan sıçanların fetüslerinde gelişimsel toksik etkiler arasında fetal vücut ağırlığında azalma, yarık damak, anazarka, ventriküler septal defekt, sağ atriumda genişleme, karaciğer ağırlığında artma, iç organlarda anomaliler, kemik oluşumunda gecikme ve iskelet anomalileri, doğumdan sonra hayatta kalan yavru sayısında azalma, doğumsal kusurlarda artma, yavrunun vücut ağırlığının artışında azalma, serum tiroid hormon seviyesinde azalma yer almaktadır. Ayrıca gebeliğin ilerleyen aşamalarında (17. gün ve sonrası) PFOS uygulandığında neonatal mortalite oranının da arttığı tespit edilmiştir. Gebelik sırasında PFOS uygulanan sıçanlarda ise serum tiroksin ve triiodotironin seviyesinde anlamlı derecede azalma görülmüş ve tirotropin (TSH) seviyesinde telafi edici bir artış gözlenmemiştir. Aksine TSH seviyesinde de bir azalma söz konusudur (10). Diğer maternal toksik etkiler ise vücut ağırlığında ve besin tüketiminde azalmadır. Fetal ağırlıkta azalma ve iskelet oluşumunda gecikme gebelik sırasında PFOS uygulanan tavşanlarda da görülmektedir (62, 63, 64). Tavşanlardaki maternal etkiler ise düşük olması, besin tüketimi ve vücut ağırlığında azalmadır (65). Daha az boyutta olmak üzere benzer etkiler farelerde ve yavrularında da gözlenmiştir. Farklı olarak ana hayvanda karaciğerde ciddi bir büyüme de gözlenmiştir (66).

Gelişimsel ve reproduktif toksisite çalışmalarında görülen neonatal mortalitenin altında yatan etki mekanizması ile ilgili birçok teori öne sürülmüştür. Steroid sentezi ve lipit metabolizmasındaki değişimler, akciğer yüzeyindeki fonksiyon bozuklukları, hipotiroksinemi, fetal akciğerin, pulmoner fonksiyonların ve merkezi sinir sisteminin tam olarak gelişmemiş olması neonatal mortalitenin muhtemel nedenleri arasında kabul edilmektedir. Lipit metabolizması ve kolesterol sentezindeki değişimler ve hipotiroksinemi neonatal mortalitenin doğrudan sebebi olarak görülmemektedir. Neonatal mortalitenin gerçek nedeni bu güne kadar hala belirlenememiştir (62).

PFOS'un muhtemel etki mekanizmasını araştıran pek çok sayıda çalışma yapılmıştır. Peroksizom proliferasyonunu indüklemesi ve peroksizom enzimleriyle ilişkili olması (67), lipit mekanizmasını engellemesi ve serum kolesterol seviyesini düşürmesi (68) ve hücresel iletişimde önemli bir rolü olan gap junctionların inhibisyonundan sorumlu olması muhtemel nedenler arasında sayılmaktadır (69).

Kemirgenlerde en önemli toksik etkiler lipit metabolizmasında değişim, hepatomegali, vücut ağırlığında azalma olup bu toksik etkinin altında yatan mekanizmanın mitokondrinin fonksiyon kaybı olduğu düşünülmektedir (12).

Florokimyasal bileşikler, in vitro ortamda 3 farklı mekanizma ile mitokondri fonksiyonunda bozukluklara yol açarlar. Bunlar mitokondriyal solunumun bozulması, membran permeabilitesinin artması, kalsiyum indüksiyonuna bağlı olarak mitokondrilerin şişmesidir (11, 70). Mitokondriyal membran permeabilitesindeki artış mitokondrilerin fonksiyon kaybındaki en önemli neden olarak görülmektedir (11, 12). Membran permeabilitesinin bozulması mitokondri iç membranının 1.5 kD'dan daha büyük maddelere karşı da geçirgen olmasına neden olacaktır. Bu geçirgenlik nedeniyle, iç ve dış ortamın eşitlenmesi için maddelerin mitokondri içine giriş-çıkışının olması ve bunun sonucunda mitokondrilerin şişmesi ve sitokrom-c gibi apoptotik faktörlerin mitokondri dışına salınımı söz konusu olacaktır (71).

2.2. Apoptoz

2.2.1 Tanımı ve Tarihçesi

Ölüm, canlılarda bütün yaşam süreçlerinin geriye dönüşü olmayacak biçimde durmasıdır. Tüm canlıların en küçük işlevsel birimi olan hücrede ölüm, patolojik ya da fizyolojik süreçler sonunda gerçekleşir. Başlıca iki hücre ölüm şekline biri olan nekroz, hücre şişmesi ve hücre parçalanması ile karakterize, ani ağır iskemi, mekanik

travma gibi büyük çevresel değişikliklerin neden olduğu patolojik ve pasif bir süreçtir. Bu tür hücre ölümünde hücre içi denetim mekanizmalarının etkisi yoktur. Hücre kendi isteği ile ölmez (çizelge 2.2). Diğer bir hücre ölüm şekli olan fizyolojik ölüm yolu ise “apoptoz” olarak adlandırılır. Apoptoz; gelişmiş organizmalarda gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin kontrollü bir mekanizma ile çevreye zarar vermeden programlı ölümüdür (13).

Çizelge 2.2. Nekroz ve apoptozun karşılaştırılması (13)

ÖZELLİK	NEKROZ	APOPTOZ
Yol açan nedenler	İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stres	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması HIV Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya Tümör Nekroz Faktör reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stress
Morfolojik özellikler	Hücre membran bütünlüğünün kaybı Hücre şişmesi Organellerin parçalanması Endoplazmik retikulumun genişlemesi Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi	Hücre membranı bozulmamış olması fakat membranda cepciklerinin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Hücresinin mitokondri, ribozom, nükleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal özellikler	Bozulmuş iyon homeostazisi ATP gerekmez (pasif süreç) +4 °C'de gerçekleşebilir DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde “smear” görüntüsü) Postlitik DNA fragmentasyonu (ölümün geç safhasında)	İyi kontrollü, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4 °C'de gerçekleşmez DNA internükleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonükleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven patterni) Preolitik DNA fragmentasyonu (erken evrede gerçekleşir)
Diğer özellikler	Hücreler gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir Lizozomal enzimler salınır İnflamasyona neden olur	Hücreler tek tek veya birkaçı bir arada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler İnflamasyon görülmez

Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskopunun ve yeni boya yöntemlerinin keşfiyle başlamış olup ilk olarak nekroz tanımlanmıştır. 1972 yılında, iskemiye maruz kalan dokunun etrafında nekroza daha farklı hücre ölümü gösterilmiş ve buna, ağaç yapraklarının gövdeden ayrılması anlamına gelen “apoptoz” adı

verilmiştir. Apoptoz Yunanca'da apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinden oluşan ve ilk olarak Kerr, Wyllie ve Currie adlı patologlar tarafından 1972 yılında kullanılan bir terimdir (72). 1983 yılında Duke ve ark. (14) tarafından jel elektroforezi ile apoptozda endonükleazların DNA kırıklarına neden olduğunu göstermesi ile hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı elde edilmiş ve apoptoz ile ilgili çalışmalar hızlanmıştır.

DeneySEL apoptoz da yine ilk kez Wylie tarafından oluşturulmuştur. Glukokortikoidlere maruz bırakılan olgunlaşmamış timus hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü gerçekleştiren bu araştırmacılar, apoptotik hücre DNA'sının elektroforetik jel ayrımını yaparak apoptotik hücrelerde DNA bütünlüğünün kalmadığını bunun sonucunda da apoptotik hücre için karakteristik olan merdiven tarzında DNA bantlarının jelde görüldüğünü bildirmiştir (73). Cohen'in deneyleri ise apoptozun aktif ve genlerle düzenlenen bir olay olduğunu göstermiştir (74).

Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadır ve bu oluşum ömür boyu devam etmektedir. Böylece ölüm (apoptoz) ve yeniden yapım (mitozis) bu dokularda doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halinde süregelir. Normal apoptotik hücre ölümü ve yerine yeni hücre yapımının ("tissue remodelling") günde yaklaşık 1×10^{11} hücreyi bulduğu hesaplanmaktadır. Bu hızda bir hücre ölümü ve yeniden yapımı yetişkin bir insanın vücut ağırlığının her 18-24 ayda bir yeniden yapım ve yıkımı anlamına gelmektedir. Bu doku ve hücrelere örnek olarak verilebilecekler aşağıdadır:

- a. İnce barsaklar: İnce barsaklardaki kriptaların tabanlarında yeni oluşan hücreler, kriptaların uçlarına doğru göç ederler ve 3-4 gün süren bu göçün sonunda ölürek, barsak boşluğuna dökülürler.
- b. Deri: Derinin keratinositleri derinin bazal tabakasında oluştuktan (stem hücre bölünmesi) sonra derinin en üst tabakasına doğru (stratum korneum) göç ederler. Bu göç esnasında derinin her tabakasında çeşitli farklılaşma özellikleri gösterip en sonunda derinin organizmayı dış etkenlerden (enfeksiyon ajanları, travmatik zedelenmeler vs.) koruyucu ölü tabakasını oluşturmak üzere ölürlür. Deri keratinositlerinde bu şekilde gerçekleşen apoptozun özelleşmiş bir apoptoz formu olduğu düşünülmektedir.
- c. Timus: İmmün sistemin çok önemli hücreleri olan T lenfositler timusda olgunlaşırlar. Bu hücrelerin etkisiz olanları veya organizmanın kendi dokularına karşı reaksiyon

verme potansiyeli taşıyanları kan dolaşımına girmeden önce apoptozla ölürlere ve böylece ortamdaki uzaklaştırılırlar.

d. Uterus: Menstruasyon esnasında uterusun iç duvarındaki hücreler ölürlere ve menstruasyon kanıyla uzaklaştırılırlar. Böylece, uterusun iç tabakası (endometrium) apoptozla dökülür

f. Gözdeki lensde içleri saydam bir protein olan kristalin ile dolu apoptotik hücreler bulunur.

g. Diğer: Virüslerle enfekte olmuş veya kalıcı DNA hasarı oluşmuş hücreler sıklıkla apoptozla kendilerini öldürürler (intihar ederler). Bu yolla apoptoza gidemeyen ve genetik olarak değişmiş hücreler ileride kanser gelişimine neden olabilirler.

Apoptoz, doku gelişimi esnasında istenmeyen hücrelerin yok edilmesinde de rol alır. Örneğin böcek ve amfibilerin metamorfozu esnasında larva dokusunun yok edilmesine neden olur. Diğer bir örnek de memelilerde sinir sisteminin gelişimi esnasındaki programlanmış hücre ölümüdür. Fazla sayıda üretilen nöronların % 50'den fazlası programlanmış hücre ölümü yoluyla ortadan kaldırılır. İnsan embriyosunda intrauterin gelişim sırasında el ve ayak parmaklarının arasındaki hücrelerin apoptoz ile yıkılmasıyla başlangıçta kapalı olan parmaklar birbirlerinden ayrılmaktadır (75).

2.2.2 Apoptotik Hücre Ölümünün Aşamaları

Apoptoz hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden bir olaylar zinciri olarak seyreder. Sonuçta hücrenin fagositozu ile sona erer. Bu aşamalar;

I) Apoptozun başlatılması,

II) Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu,

III) Hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması,

IV) Fagositoz, olarak özetlenebilir.

2.2.2.1 Apoptozun Başlatılması

2.2.2.1.1 Sinyal Üretici Yollar

Hücrenin apoptoza gidebilmesi için ilk önce, ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyal ile karşılaşması gerekir. Bu sinyal hücre içinden veya dışından gelebilir (Çizelge 2.3).

1. **Hücre Dışından Kaynaklanan Sinyaller (Çevresel yaşam sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin yetersizliği):** Hücreler, çevre hücrelerden ve ekstrasellüler matriksden gelen yaşam sinyallerine, büyüme faktörlerine ihtiyaç duyar. Bu sinyaller düzenli bir şekilde ve yeterli miktarda olmazsa hücreler apoptoza gider. Örn: nöronlar nöron büyüme faktörü (NGF) yetersizliğinde apoptoz gösterebilirler.
2. **Hücrelerin Maruz Kaldığı Dış Etkenler:** Hipoksi, ısı, antikanser ilaçlar, radyasyon, gamma ve ultraviyole ışınlar gibi etkenler apoptoza neden olabilirler. Bu etkenler DNA hasarı oluşturarak apoptoz meydana getirirler.
3. **Hücre İçinden Kaynaklanan Sinyaller:** DNA hasarı, hücre içi Ca^{++} seviyesinde artış, hücre içi pH'da düşme, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları hücreyi apoptoza götüren merkezi hücre ölüm sinyallerini başlatabilmektedir (76).

Çizelge 2.3. Apoptozu tetikleyen hücre içi ve dışı ajanlar (76)

Fizyolojik Aktivatörler	Hasara Bağlı İndükleme	Tedavi Ajanları	Toksinler
TNF ailesi (FasL, TNF)	Isı şoku	Kemoterapötikler Sisplatin, Bleomisin	Etanol
Transforming growth factor beta (TGF)	Viral Enfeksiyonlar	Gama radyasyon	Beta-amiloid peptit
Nörotransmitterler; Glutamat, dopamin	Bakteriyel toksinler	UV radyasyon	
Büyüme faktörlerinin seviyesinde düşüş	Onkogenler		
Kalsiyum	Tümör supresör genler		
Glukokortikostreoidler	Sitotoksik T hücreler		
	Oksidanlar		
	Serbest radikaller		
	Besin eksikliği ve Antimetabolitler		

2.2.2.1.2 Antiapoptotik ve Proapoptotik Faktörler

Apoptoz sırasında çeşitli genlerin kodladığı bazı protein ve faktörlerin hücre içinde aktif veya inaktif hale gelmesiyle apoptozun kontrol edildiği bilinmektedir. Bugüne kadar saptanmış en az 30 protein ve bir o kadar da apoptozda olası rolü düşünülen protein vardır. Bu proteinlerden en bilinenleri c-myc, p53 ve Bcl-2, Bax ve BH3'tür (77).

1. c-myc

Bir transkripsiyon faktörü olan c-myc proteini ortamda bazı faktörlerin bulunmasına bağlı olarak hücrenin proliferasyonuna ya da apoptoza girmesine neden olur. c-myc protoonkogeni bir hücrenin büyümesini programlar. Eğer hücrede hem c-myc hem de uygun büyüme faktörleri yoksa büyüme durur, her ikisinde yeterli ise çoğalma olur ama c-myc var, büyüme faktörleri yoksa apoptoz görülür. Yani c-myc büyüme faktörleri tarafından baskılanan apoptozu uyarmaktadır. Ayrıca c-myc yapımı hücreyi tümör nekroz faktörün (TNF, tumor necrosis factor) uyardığı apoptoza daha duyarlı kılar (78, 79).

2. p53

Başlangıçta bir onkoprotein olarak belirlendiyse de yabancı p53 proteininin özellikle DNA hasarına yanıt olarak hücre ölümünü başlatıcı işlev gördüğü açıklık kazanmıştır. DNA hasarı tarafından indüklenen apoptoz sinyalinin iletimi p53 ile başlayan ve kaspazlara kadar devam eden bir süreçtir. Bir tümör süpresör gen olarak çalışan p53 mutasyona uğradığı ya da bulunmadığı zaman hücre yaşamı uzar. Genotoksik olaylarla oluşan hücre hasarı, bir transkripsiyon regülatör geni olan p53'ü aktive eder (80). Aktive olan p53 geni, DNA hasarı oluştuğunda aktifleşerek p21 genini harekete geçirir. p21 geni hücrenin geç G1 fazında kalarak, S fazına geçmesini engeller. Böylece hücre siklusu durdurularak oluşmuş olan DNA hasarlı hücrenin çoğalması engellenir. p53 geni DNA tamiri yapan proteinlerin transkripsiyonunu sağlar. Bu proteinler DNA hasarını tamir edebilirse, hücre siklusundaki blok kalkar. Hücre hasarının tamiri başarılı olmazsa p53 geni bax proteinini (bcl-2 grubu proteinlerden, proapoptotik) aktive ederek mitokondri aracılığı ile hücrenin apoptoza giderek ölmesini sağlar (81). Böylece DNA hasarlı hücre ortadan kaldırılmış olur. Bazı hücre tiplerinde p53'ün indüklenmesi ile bax yapımının indüklediği görülmektedir (82). Diğer olası hedefleri hücre yüzeyi ölüm reseptörleri DR5 ve Fas'tır (83, 84).

3. Bcl-2/Bax ve BH3

Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri proapoptotik etkiye sahiptir ve apoptozu indükler. Diğeri ise anti-apoptotik etkiye sahip olup apoptozu baskılar. Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır; bunlardan anti-apoptotik etkiye sahip olanlar; Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Boo, Mcl-1, proapoptotik etki gösterenler ise

Bax (Bax, Bak ve Bok) ve BH3 (Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bad, Bid gibi)'dir. Bcl-2/Bax gen ailesinin ürünleri, mitokondri ve nükleus zarlarının yanı sıra endoplazmik retikulum zarının üzerinde de yer alır ve homodimer ya da heterodimerler şeklinde kompleks oluşturarak çalışırlar. Örneğin; Bcl-2'nin Bax ile olan etkileşiminde Bcl-2'nin oranının daha yüksek olması hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlarken, Bax'ın daha fazla olması durumunda ise hücre ölüme gitmektedir. Bcl-2'nin hücreleri apoptozdan koruma mekanizması, mitokondri zarını stabilize etmek, serbest radikallerin oluşmasını/etkilerini engellemek, nukleusa apoptoz yazılımını düzenleyici moleküllerin seçici olarak girmesini önlemektir (85, 86).

2.2.2.1.3 Apoptoz Mekanizmaları

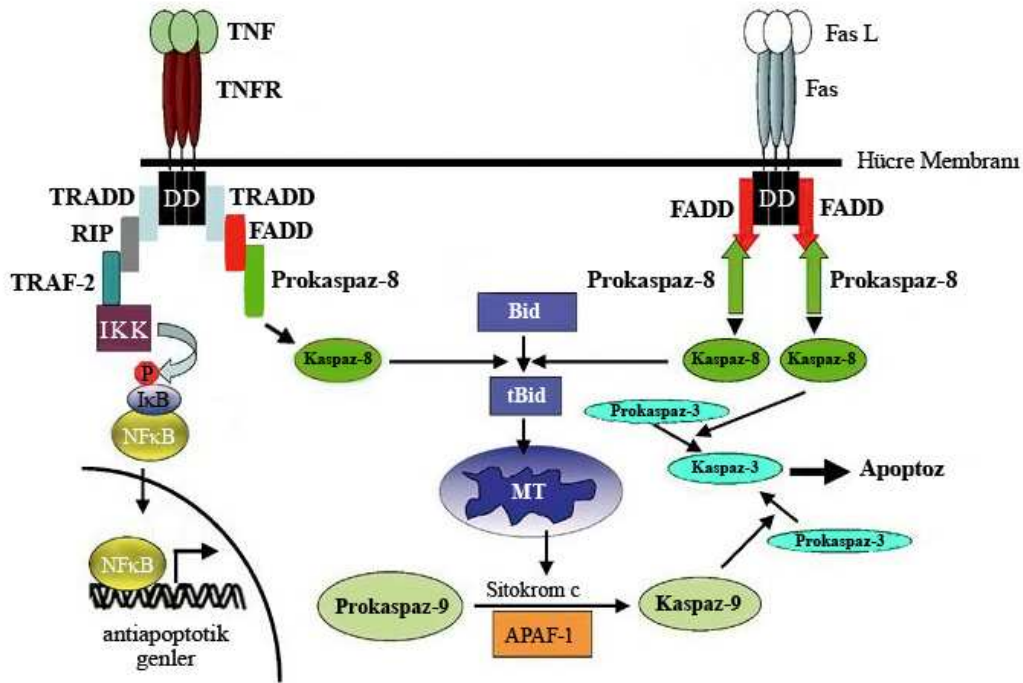
1. Dış sinyallerle apoptozun tetiklenmesi

Bazı sitokinler hücre membranında bulunan reseptörlere bağlanarak ölüm programını harekete geçiren sinyaller üretebilirler ve apoptozu tetikleyen sinyal moleküllerinin hücre zarında bulunan ilgili reseptörlere bağlanması apoptozu başlatır. Apoptozda rol alan membran reseptörleri içinde en önemli grup tümör nekroz faktör reseptör (TNFR, tumor necrosis factor receptor) ailesidir. Bu reseptör grubunun en az 29 üyesi vardır. Bunlardan bazıları; TNFR-1, TNFR-2, Fas, lenfotoksin-beta, NGF-reseptör, CD40, CD27 ve CD30'dur. Bu reseptörlerin biyolojik etkileri çeşitlidir ve apoptoz ile sınırlı değildir. Bir kısmı apoptoz oluştururken, bir kısmı proliferasyona neden olur. Bir kısmı ise her ikisini de oluşturur. TNFR içinde apoptoz oluşturan reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNFR1'dir. Bu reseptörler uyarıldıklarında, hücrenin sitoplazmasında bulunan parçaları, "adaptör proteinlere" bağlanır. Adaptör proteinlerin ölüm efektör parçaları vardır. Bunlar da apoptoz için başlatıcı olan kaspazlara (örn: prokaspaz-8) bağlanırlar (87).

i. Tümör Nekroz Faktör Aracılı Apoptoz: TNF ligandı, reseptörleri olan TNFR-1 veya TNFR-2 ile bağlandığında apoptozu aktive eder. TNFR-1, pek çok dokuda ölüm sinyalinin aktivasyonundan ve iletiminden sorumlu iken TNFR-2 sadece timositlerde TNF bağımlı sinyalin iletiminden sorumludur. Bir sitokin olan TNF'nin TNF reseptörleri ile birleşmesi (örn: TNFR1) sonucunda reseptörün hücre içinde bulunan parçası, TNFR adaptör protein (TRADD, TNFR adapter protein) ile etkileşir. TRADD

daha sonra FADD ile birleşerek prokaspaz-8'i aktifleştirerek apoptoza neden olur (Şekil 2.2).

Fas reseptörünün aksine, TNFR1'in TRADD'la etkileşmesi her zaman apoptoz ile sonuçlanmaz. TRADD, FADD yerine başka adaptör proteinlere bağlanabilir. Bunun sonucunda önemli bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör- κ B (NF κ B) harekete geçebilir. Bu durumda hücre canlı kalır. Hücrede hangi yolun, nasıl seçildiği açık değildir. Ancak, hücrede aktif NF κ B (bazı tümörlerde bulunur) bulunduğu zaman, hücrenin canlı kaldığı düşünülmektedir (88, 89).



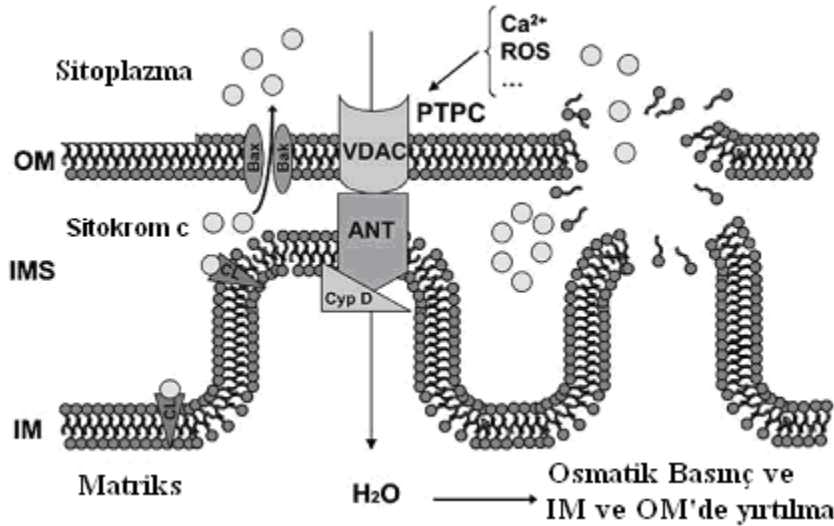
Şekil 2.2. Fas ve TNFR-1 reseptörleri ile tetiklenen apoptoz mekanizması (89)

ii. Fas-Fas ligand aracılı apoptoz: Bu tip apoptoz hücre yüzey reseptörü Fas (CD95, APO-1) aracılığı ile oluşur. Fas ligandın Fas reseptörüne bağlanması ile Fas reseptörünün hücre içinde bulunan parçası, FADD ile birleşerek ölüm başlatan sinyal kompleksini (DISC, Death Inducing Signal Complex) oluşturur. Bu da prokaspaz-8'in aktifleşmesini sağlar. Aktif hale gelen kaspaz-8 ya kaspaz-3'ü aktifleştirerek apoptozu indükler ya da bir pro-apoptotik protein olan Bid'i proteolitik olarak aktive edip tBid'e dönüştürür ve tBid de diğer pro-apoptotik proteinlerle beraber mitokondrinin dış zarının delinmesi olayına katılır (87, 89).

2. Mitokondri/sitokrom-c aracılı apoptoz

Mitokondri aracılı apoptoz, hücreden kaynaklanan çok çeşitli sinyaller tarafından (onkogen aktivasyonu, DNA hasarı, sitotoksik ilaçlar veya hücrel stres gibi) tetiklenen bir yoldur. Çeşitli apoptotik uyarılar ATP varlığında mitokondrinin intermembran boşluğunda bulunan bazı proteinlerin sitoplazmaya kaçışına neden olur. Bunların başlıcaları SMAC/DIABLO, AIF, EndoG ve OMI/HTRA2 olup en önemlisi de sitokrom-c salınımıdır.

Sitokrom-c salınım mekanizması henüz tam olarak anlaşılacakla beraber bu mekanizmayı açıklayabilmek için çok sayıda görüş ortaya atılmıştır. İlk görüşe göre sitokrom-c salınımı iç (IMM) ve dış (OMM) mitokondri membranları arasındaki kontak noktalarında yer alan ve henüz tam olarak karakterize edilememiş olan permeabilite transisyon poru (PTP) yolu ile gerçekleşmektedir (Şekil 2.3). Bu kompleksin merkezinde IMM'de adenin nükleotid translokator (ANT, Adenine Nucleotide Translocator) ve siklofilin D, OMM'de Voltaj bağımlı anyon kanalı (VDAC, Voltage dependent anion channel) bulunmaktadır. Oksidatif stres, yüksek kalsiyum, seramid ve düşük ATP seviyesi PTP'nin açılmasına yol açar. Bu durum düşük moleküler ağırlıklı maddelerin IMM'ye rağmen difüze olmasına yol açar ve mitokondrinin şişmesi ve OMM'nin yırtılması ile sonuçlanır. Böylece sitokrom-c ve diğer membranlar arasında yer alan proteinler sitozole salınmış olur (90).



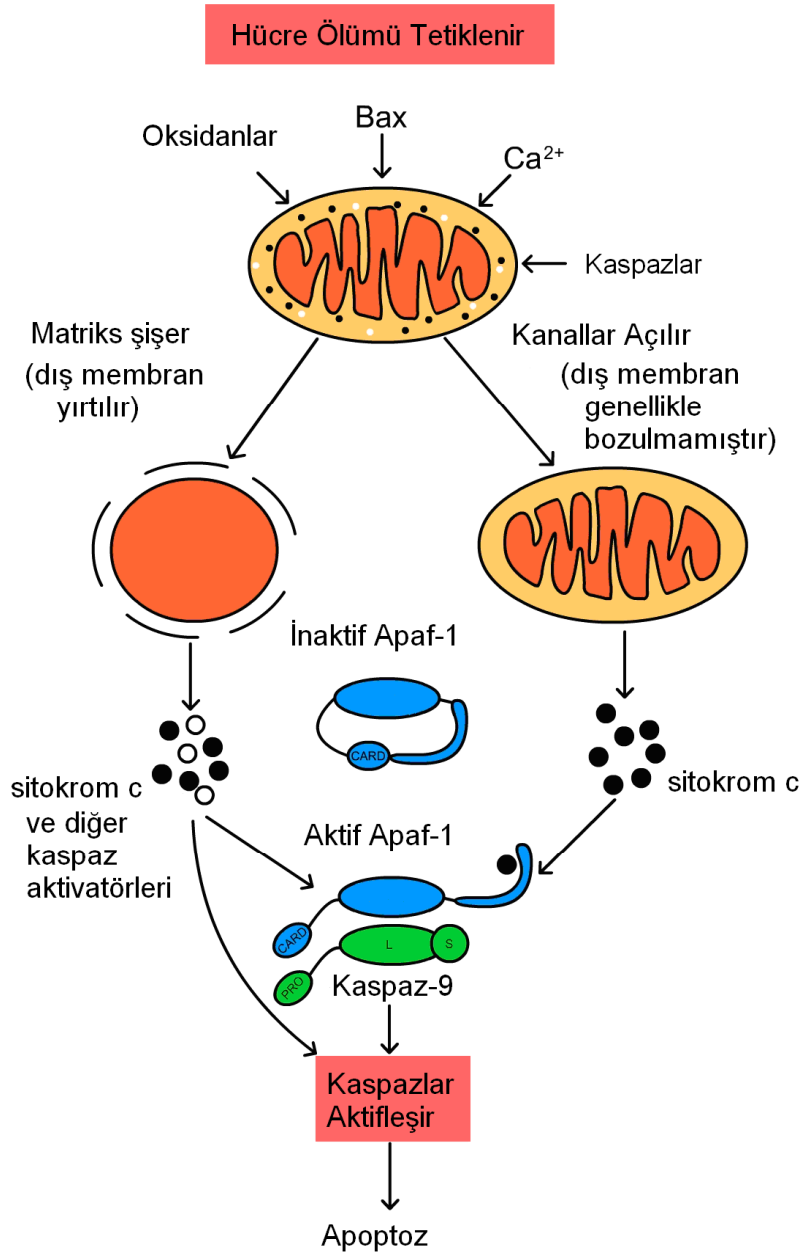
Şekil 2.3. Mitokondriden sitokrom-c salınımı (91)

PTP'nin pro ve anti-apoptotik proteinlerden oluşan Bcl-2 ailesi tarafından regüle edildiği düşünülmektedir. Proapoptotik olan Bcl-2 ve Bcl-xL, PTP'yi kontrol ederek onun kapalı kalmasını sağlamaktadır. Ancak Bax ve Bak proteinleri, VDAC ve ANT ile etkileşerek PTP'nin açılmasını sağlarlar. PTP'nin açılması mitokondrial membranın depolarizasyonuna yol açmaktadır. Ancak birçok çalışmada sitokrom-c salınımı için PTP'nin açılmasının şart olmadığı gösterilmiştir.

Diğer bir model Bcl-2 ailesi üyelerinin OMM üzerinde membranlar arasındaki çözünebilir proteinlerin salınımını sağlayacak porlar ve büyük kanallar oluşturduğu yönündedir. Bcl-2 ailesinin Bcl-xL, Bcl-2, Bax ve kırılmış Bid (tBid) gibi birçok üyesinin lipit veziküllerde ve lipit membranlarda fonksiyonel iyon kanalları oluşturabildiği gösterilmiştir (92). Ancak 20 kDa'luk bir protein olan Bax'ın sitokrom-c'nin salınımını sağlayabilecek büyüklükte bir poru nasıl oluşturduğu henüz aydınlatılamamıştır. Ancak Bax ve Bak oligomerize olarak daha büyük bir yapı oluşturarak sitokrom-c ve diğer proteinlerinde salınımı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu kanalların oluşması için Bax'da konformasyonel değişiklikler meydana gelmesi ve sitoplazmadan OMM'ye gelmesi gerekmektedir. OMM'ye gelen Bax membranın içine girer ve burada oligomerize olarak poru oluşturur. Böylece Bax sitokrom-c salınımında hem sinyal hem de efektör molekül olarak görev alır. Bax sitoplazmada BH3 içeren tBid (kaspaz tarafından kırılarak aktive edilen Bid) tarafından aktive edilir ve OMM'ye girerek poru şekillendirir (93). Por modellerinde antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL proteinleri Bax'ın konformasyonel değişimini ve/veya membrana girmesini ve/veya membrana girip oligomerizasyonu engeller (92).

Sitokrom-c sitoplazmada monomerik Apaf-1 ile birleşerek bu proteinin konformasyonunda değişikliğe neden olur ve bu yapı da inaktif durumdaki kaspaz-9 enzimine bağlanarak "apoptozom" adı verilen bütünü oluşturur. Apoptozomda kaspaz-9 proteolitik olarak aktif hale gelir ve kaspaz enzimleri hiyerarşisinde bulunan diğer kaspazları yine proteolitik olarak aktive eder (Şekil 2.4).

Apoptozun ilerlemesindeki bir diğer kritik aşama da normalde sitoplazmada bulunan apoptoz inhibitörlerinin inaktifleştirilmesidir. Bu inaktifleştirme süreci mitokondrinin intermembran boşluğundan salınan SMAC/DIABLO ve OMI/HTRA2 gibi proteinler tarafından gerçekleştirilir (94).

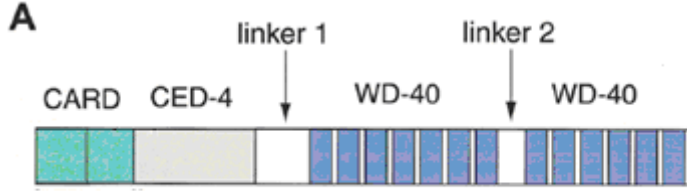


Şekil 2.4. Sitokrom-c salınımı ile kaspaz kaskadının aktivasyonu

Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1 (Apaf-1)

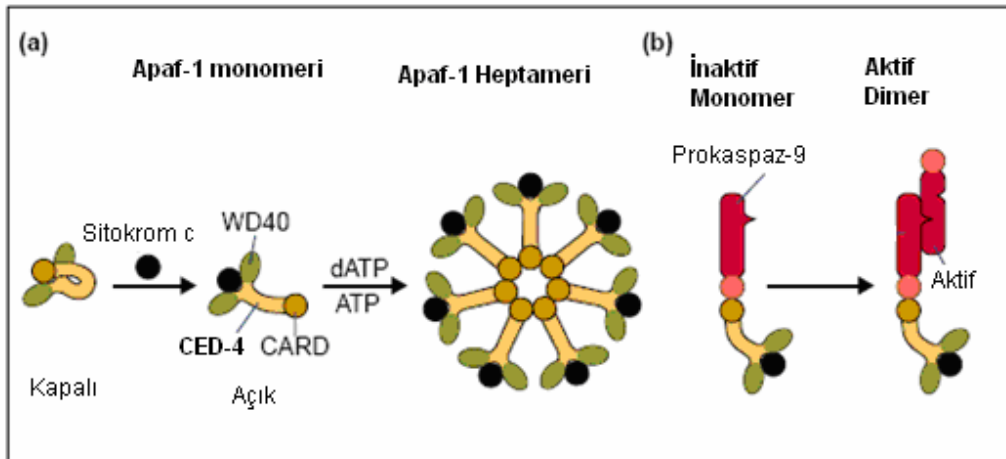
1997'de Zou ve ark. (95) tarafından *Caenorhabditis elegans* Ced-4 geninin insanlardaki homologunun cDNA'sı klonlanmış olup Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1 (Apaf-1) olarak adlandırılmıştır. Apaf-1 mRNA'sı fetal ve yetişkin tüm hücrelerde eksprese edilmektedir. Apaf-1 1194 amino asitten oluşan 130 kD'luk bir protein olup sitokrom-c'ye bağlanarak kaspaz-9 aktivasyonunu sağlamaktadır. Apaf-1

proteini, Ced-4'e homolog olan dATP/ATP bağlayan bölgesi, kaspaza bağlanan CARD bölgesi, ve Apaf-1'in negatif regülasyonundan sorumlu WD-40 tekrar bölgelerini içermektedir (Şekil 2.5) (96).



Şekil 2.5. Apaf-1'in şematik yapısı

Yapılan çalışmalarda kaspaz-9'un sitokrom-c ve dATP'ye bağlı bir mekanizma ile Apaf-1'e bağlandığı ve böylece aktive olduğu tespit edilmiştir. Apaf-1'in kaspaz-9'a bağlanması her iki proteinde de bulunan kaspaz toplanma bölgeleri (CARD, caspase recruitment domain) aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. Kaspaz-9 Apaf-1'e bağlandıktan sonra aktive olup kaspaz-3'ü kırar ve aktive eder. Apoptotik kaskadın başlangıcında mitokondriden sitokrom-c salınmasıyla bir çok Apaf-1 alt ünitesi içeren (apoptozom olarak adlandırılır) büyük bir multimerik kompleks şekillenir (97).



Şekil 2.6. Apoptozomun yapısı ve kaspaz-9 aktivasyonu (98)

Apoptozomunun 7 jant teli ve bir göbek bölgesine sahip tekerlek benzeri bir multiprotein kompleksi olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.6a). Acehan ve ark. (98)

tarafından önerilen modele göre 7 tane Apaf-1 molekülü, CARD bölgeleri aracılığı ile göbek kısmına bağlanır. Kaspaz-9 ile de bu bölge etkileşime girecektir. Apaf-1 molekülünün kalan parçaları kol kısmını ve iki lob ile biten y-şekilindeki bölgeyi oluşturur. Her bir lob 6 ya da 7 WD-40 tekrarının (Apaf-1 izoformlarına bağlı olarak) bir pervane şeklinde katlanması ile oluşur ve sitokrom-c molekülü bu iki pervane arasına bağlanır (Şekil 2.6a).

Bu modele göre ortamda sitokrom-c bulunmaması durumunda CARD bölgesi bu pervanelere bağlandığından oto-inhibitör bir konformasyona sahiptir. Sitokrom-c'nin Apaf-1'in CARD bölgesini açığa çıkardığı görülmektedir. Apoptozom oluşumu sırasında sitokrom-c'nin pervanelere bağlanarak CARD bölgesinin yerini alması ced-4 homologu olan bölgeye ATP bağlanmasına olanak sağlar ve bu da Apaf-1 molekülünde konformasyonel bir değişime yol açar. Farklı Apaf-1 moleküllerinin CARD ve ced-4 homolog bölgeleri etkileşim kurarak apoptozomun göbek bölgesini oluştururlar. Bu aşamada 7 prokaspaz-9 molekülü CARD-CARD etkileşimi ile apoptozoma bağlanırlar (Şekil 2.6b). Kaspaz-9 dimerlerinin oluşumu ise pro-kaspaz-9'un aktivasyonunda son aşamadır (96, 97).

Apaf-1'in Transkripsiyonel Kontrolü

Apaf-1'in transkripsiyonel kontrolü hem transkripsiyonel seviyede hem de birçok transkripsiyon sonrası mekanizma ile düzenlenir. Apaf-1'in promotör bölgesi apoptozun aktivasyonundan ve hücre siklusunun kontrolünden sorumlu transkripsiyon faktörleri içerir.

Yapılan çalışmalar Apaf-1'in p53 tarafından indüklenen tek pro-apoptotik gen olduğu göstermişlerdir. Daha sonraki yıllarda Robles ve ark. Apaf-1'in promotör bölgesinde 13 bp (604-570 arası transkripsiyonel başlama bölgesi ile ilişkili) bir parça tespit etmişlerdir ve bu parçanın p53 cevap elementi ile ortak (5_-PuPuPuCA/TT/AGPyPyPy-3_) bir palindromik dizi olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmayla Apaf-1'in p53 geninin doğrudan transkripsiyonel hedefi olduğu gösterilmiştir.

Ayrıca Apaf-1'in, çeşitli büyümeyle ilişkili genlerin ekspresyonunu regüle ederek ökaryotik hücre G1/S transisyonunun kontrolünden sorumlu E2F ailesi transkripsiyon faktörlerinden E2F-1'in doğrudan transkripsiyonel hedefi olduğunu gösterilmiştir.

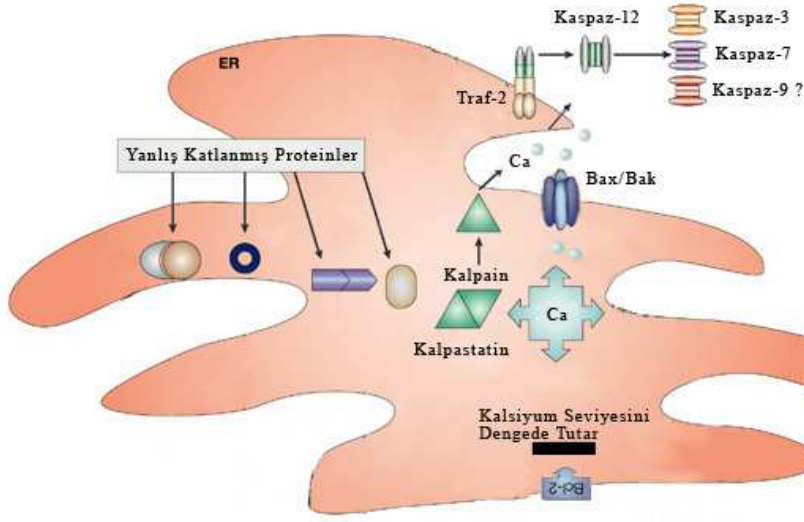
Ayrıca E2F-1'in sitokrom-c salınımı olmadan Apaf-1 ekspresyonunun artmasından sorumlu olduğunu belirlemişlerdir (99).

Apaf-1 yolunun negatif regülatörleri

Apaf-1 yolunda ayrıca çok sayıda negatif regülatör vardır. Apoptoz inhibitör (IAP; Inhibitor of Apoptosis) proteinleri apoptozoma bağlanarak kaspaz-3 aktivasyonunu inhibe ettikleri gibi aktif kaspaz moleküllerinin de kompleksten ayrılmasına yol açarlar. Apaf-1 yolundaki IAP proteinlerinin negatif etkisi mitokondriden salınan ve kaspaz-9'a bağlanan IAP'yi uzaklaştırabilen SMAC/DIABLO gibi proteinler veya IAP'yi parçalayabilen OMI/HtrA2 gibi proteazlar tarafından yok edilebilir. Apaf-1 yolu ayrıca ısı şok (heat shock; HSP) proteinleri tarafından da kontrol edilmektedir. Apaf-1 yolunda hücre ölümünün negatif kontrolünden sorumlu en az 3 Hsp (HSp27, Hsp70 ve Hsp90) tanımlanmıştır. Hsp27 sitokrom-c'ye bağlanarak onun Apaf-1'e bağlanmasını önlerken Hsp70 ve Hsp90, Apaf-1 molekülüne bağlanarak kaspaz-9 aktivasyonunu engellemektedir. Son yıllarda cAMP yolunun da Apaf-1 yolunun negatif regülasyonuna katıldığı gösterilmiştir. Ekstrasellüler sinyaller sonucu cAMP seviyesinin artması protein kinaz A'nın aktivasyonuna yol açmaktadır. Aktive olan protein kinaz-A da Apaf-1'in prokaspaz-9'a bağlanmasını inhibe etmektedir (97).

3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptoz Oluşturulması:

Son yıllarda yapılan çalışmalarda mitokondriyal yola ek olarak endoplazmik retikulumun (ER) da intrinsik yolda rol oynadığı gösterilmiştir. Endoplazmik retikulumda yanlış katlanmış proteinler az miktarda olduğunda salgı yollarındaki regülatör proteinlerin sentezini uyarırken eğer çok fazla miktarda ise ER'daki stresin artmasına bağlı olarak kalsiyum depolarının açılmasına yol açar ve ER aracılı ölümü başlatır (Şekil 2.7). Bu gibi durumlarda proapoptotik Bax ve Bak gibi Bcl-2 ailesi üyeleri ER'a hareket eder. ER, apoptozu başlatırken ER'un sitosolik yüzünde lokalize olan ve diğer downstream kaspazların aktivasyonunu yapan kaspaz-12 aktivasyonuna ihtiyaç duyar. Son çalışmalar Ca^{++} seviyelerinin ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile prokaspaz-12'nin aktifleştiğini göstermiştir. Aktiflenmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile karşılıklı olarak etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder (100).



Şekil 2.7. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptoz

1.2.2.2 Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu

Apoptotik hücre ölümündeki biyokimyasal ve morfolojik değişimler, aspartik asit spesifik proteazların sistein gruplarının aktivasyonu sonucu meydana gelmektedir. Bu proteazlara **kaspaz** (“**caspase**”= Cysteine-Containing **A**spartate Specific **P**roteases) adı verilmektedir. Kaspaz aktivasyonu apoptozun en belirgin özelliği olup bu mekanizmanın anahtar elemanları *Caenorhabditis elegans*'tan *Drosophila melanogaster*'e sonuçta memelilere kadar evrim süresince korunmuştur. Apoptotik hücre ölümünde *Caenorhabditis elegans*'da dört gene (ced-3, ced-4, ced-9 ve egl-1) ihtiyaç duyulmaktadır. Ced-3 bir sistein proteaz olup interlökin-1 β dönüştürücü enzimin (ICE, IL-1 β converting enzyme) homologudur ve şu anda kaspaz-1 olarak bilinmektedir. Sonraki diğer 13 kaspaz ise memelilerde tanımlanmış olup bunlardan bazıları inflamasyonda rol alırken bir kısmı da programlı hücre ölümünde yer almaktadır (Çizelge 2.4) (101).

Yapı ve işlevlerine göre kaspazlar 3 grupta toplanmıştır:

1. Başlıca lenfokin yapımında bulunan kaspazlar şunlardır: Kaspaz-1 (ICE), kaspaz-4, kaspaz-5, kaspaz-11, kaspaz-12, kaspaz-13 ve kaspaz-14. Sitokin sekresyonu ve inflamasyondan sorumludurlar. Kaspaz-1 ve kaspaz-4 ayrıca apoptozda da rol oynar. Kaspaz -1, -4, -5 tetrapeptid olup kendi kendilerine aktive olabilmektedirler.

2. Çeşitli hücre proteinleri parçalayan ve küçük bağlanma bölgeleri olan apoptozu yürüten kaspazlar, kaspaz-3 (CPP32/Yama), kaspaz- 6 ve kaspaz-7'dir.

Bunlara Sınıf II ya da sonlandırıcı (effektör) kaspazlar da denir. Yapısal ve biyokimyasal çalışmalar aktif kaspazların her biri bir aktif bölgeye sahip benzer katalitik birimlerin bağlanması ile oluşan dimerler olduğunu göstermiştir. Kaspazların aktif formdaki üç boyutlu yapısı, her katalitik ünitenin bir büyük ve bir küçük alt birimden oluştuğunu göstermiştir. Bu alt birimler, tek bir prekürsör molekülün alt birimleri birbirinden ayıran linker bölgeden kırılması ile oluşmaktadır. Tüm sonlandırıcı kaspazlar linker bölgedeki proteolitik kırılma ile aktive edilmektedir (Şekil 2.8).

3. Sinyal iletiminde yer alan ve efektör kaspazları aktive eden aktivasyon kaspazları, kaspaz-2, kaspaz-8 (FLICE/MACH), kaspaz-9 ve kaspaz-10'dur. Sınıf I ya da başlatıcı (initiatör) kaspazlardır. Pro-enzim veya zimojen olarak sentezlenmekte olup bir proteolitik kaskad ile aktive edilirler. Başlatıcı/aktive edici kaspaz kendinden sonraki kaspazı kırar ve aktive eder, aktive olan kaspaz da bir sonraki kaspazı aktive eder ve kaskad bu şekilde devam eder. Kaspazların sadece ihtiyaç duyulduğunda aktive olmasını sağlamak için kaspaz kaskadındaki başlangıç aktivasyonu bağımsız, kontrollü ve hataya karşı güvenli bir mekanizmaya ihtiyaç duymaktadır (102).

Çizelge 2.4. İnsan Kaspaz Ailesi (102)

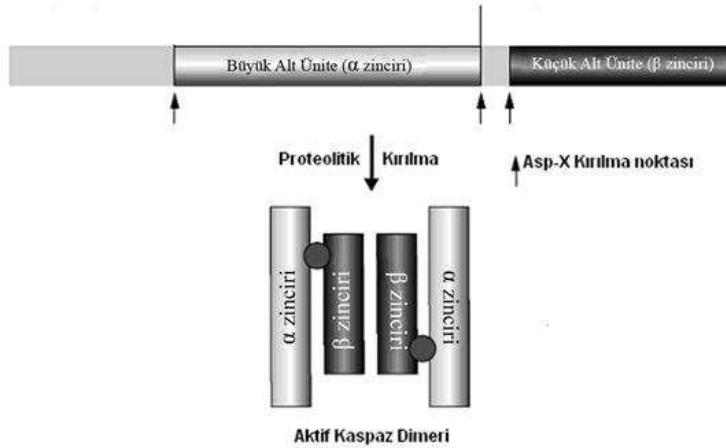
Kaspazlar	Alternatif İsimleri
Kaspaz-1	ICE
Kaspaz-2	ICH-1
Kaspaz-3	CPP32, Yama, Apopain
Kaspaz-4	ICErel-II, TX, ICH-2
Kaspaz-5	ICErel-III, TY
Kaspaz-6	Mch2
Kaspaz-7	Mch3, ICE-Lap3, CMH-1
Kaspaz-8	FLICE, MACH, Mch5
Kaspaz-9	ICE-LAP6, Mch6
Kaspaz-10	Mch4, FLICE 2
Kaspaz-11	ICH-3
Kaspaz-12	
Kaspaz-13	ERICE
Kaspaz-14	MICE

Başlatıcı kaspaz zimojenleri hücre içinde inaktif monomerler olarak bulunurlar ve bu monomerik zimojenlerin aktif konformasyona geçebilmeleri için dimerizasyona

ihtiyaçları vardır. Bu dimerizasyon olayı aktive edici bir multiprotein kompleksi tarafından gerçekleştirilir. Efektör kaspazların aksine başlatıcı kaspazların aktivasyonu ve regülasyonu oldukça kompleksdir. Başlatıcı kaspazların aktive olması için spesifik adaptör proteinlere ihtiyaç duyulmaktadır. Kaspaz-2'nin aktivasyonu için PIDDosome, kaspaz-8'in aktivasyonu için DISC'e ve kaspaz-9 aktivasyonu için ise apoptozoma ihtiyaç duyulmaktadır (103).

Apoptozda Kaspaz-3'ün Yeri ve Önemi

Yapılan çalışmalar kaspaz-3 geninin 4 numaralı kromozomun uzun kolunda (4q33-q35.1) lokalize olduğunu göstermiştir. Kaspaz-3, 2.6 kb'lık bir mRNA tarafından kodlanmakta olup hemen hemen tüm doku ve hücre tiplerinde bulunmaktadır. 277 amino asitten oluşan (32 kD) proenzimin proteolitik kırılması sonucu p20 ve p11 olarak adlandırılan iki alt üniteden oluşmaktadır. Bu iki alt ünite dimerize olarak aktif enzimi oluşturmaktadır (105).



Şekil 2.8. Kaspazların aktivasyonu (104)

32 kDa'luk kaspaz-3 prekürsörü (prokaspaz-3 veya pro-CPP32) CED3 proteini ile % 35 benzerlik göstermektedir (105, 106). Kaspaz-3 aktivasyonu ICE (kaspaz-1), kaspaz-9, granzyme B ve Mch4 (kaspaz-10) aracılığı ile gerçekleşmektedir. Granzim B ve kaspaz-10 tarafından Asp175'den prokaspaz-3'ün kırılması sonucu p20 ve p12 alt üniteleri oluşur. P20 ve p12 alt üniteleride birleşerek aktif kaspaz-3 dimerini meydana getirir (107).

Yapılan çalışmalar, Kaspaz-3'ün katalitik Cys residüsündeki mutasyonun, kaspaz-3 aktivitesini durdurduğunu göstermiştir (105). Ayrıca kaspaz-3 aktivasyonunun

apoptoz sırasındaki birçok uyarın tarafından başlatılabileceği de gösterilmiştir. Bunlar arasında Fas-ligasyonu, radyasyon, büyüme faktörü eksikliği sayılabilir. Sitotoksik T-hücreleri tarafından salınan granzim B'nin de kaspaz-3'ü aktive ettiği gösterilmiştir (108).

Kaspaz-3'ün hedefi olan çok sayıda protein bulunmaktadır. Bunlar arasında poli ADP-riboz polimeraz (PARP; DNA tamiri), Ul-70K, hnRNP C1 ve C2 (mRNA işlenmesi), sterol düzenleyici eleman bağlayıcı proteinler (SREBP, Sterol Regulatory Element Binding Proteins, sterol biyosentezi) ve DCGDI (hücre iskeletinin organizasyonu) sayılabilir. Ek olarak kaspaz-3 kaspaz kaskadındaki birçok proteazın aktivasyonuna da katılır. Bunlar kaspaz-2, kaspaz-6 ve kaspaz-7'dir. Aktive olan bu proteazlar ise diğer hücreyel proteinlerin degradasyonunu katalizler (107).

2.2.2.3 Apoptotik Hücrede Görülen Morfolojik ve Biyokimyasal Değişiklikler

1. Morfolojik Değişiklikler

Apoptoz, tek bir hücrede büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Apoptotik uyarım alan hücre, hücreler ile bağlantısını koparır. Hücre yüzeyindeki mikrovillus ve bağlantı noktaları gibi özelleşmiş yapılar ortadan kalkar, hücrenin yüzeyi yuvarlaklaşır. Endoplazmik retikulumda geçici genişlemeler görülür. Bu genişlemelerin, sitoplazmadaki suyun endoplazmik retikuluma geçmesi ile oluştuğu düşünölmektedir. Genişleyen sisternalar, hücre zarı ile birleşerek hücre yüzeyine doğru tomurcuklanmalar oluştururlar. Önemli yapısal değişiklikler nükleustan başlayarak izlenir. Nükleus apoptotik olayların odak noktasıdır. Nükleus büzüşür, nükleer porlar seçilemez, nükleus şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük nükleer parçalara bölünür. Nükleolus genişler ve granülleri kaba kümeler halinde dağılır. Hücrenin parçalanmasıyla nükleer materyal içeren zarla çevrili "apoptotik cisimcikler" oluşur. Apoptotik cisimciklerin bazıları sitoplazma parçacıkları içerir, sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşurlar ve membranla sarılıdırlar. Hücre iskeleti apoptozda önemli bir role sahiptir ve stabilizasyonu apoptozu engellemektedir (109).

2. Biyokimyasal Değişiklikler

Sonlandırıcı kaspazlar aktive olduktan sonra sitoplazmada ve nükleus içinde hedef proteinleri yıkarlar.

1-DNA kırıklarının oluşması: Hedef proteinlerden bir tanesi DNA endonükleaz ile bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkararak endonükleazı serbestleştirirler.

Nukleus içine giren Ca^{2+} - Mg^{2+} bağımlı endonükleaz, DNA kırıkları oluşturur. 180 baz çifti ve katları şeklinde kırılma oluşur.

2-Hücre iskeletinin yıkılması: Kaspazların aktifleştirdiği bir başka protein ise hücre iskeletinin ana bileşenlerinden olan aktini yıkan bir proteindir. Aktin filamentlerinin yıkılması ile hücre normal şeklini kaybeder.

3-Hücre membran değişiklikleri: İki katlı lipit tabakada fosfolipit asimetrisi, hücre zarının bir özelliğidir. Fosfolipitler, yani iç tabakada bulunan fosfatidilserin (PS) ve fosfatidiletanolamin (PE) ve dış tabakada bulunan fosfatidilkolin (PC) asimetrik olarak dağılmışlardır. Normal hücrelerde bu asimetri ATP'ye bağlı translokaz ile aktif olarak korunmaktadır. Apoptoz sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu negatif yüklü PS'nin dış yüzey tabakaya yerleşmesi ile sonuçlanır. Fosfolipid dağılımındaki bu değişiklik sonucu, kolektin gibi çeşitli çözünür proteinlerin apoptotik hücre membranına bağlandığı ayrıca mitokondri yerleşimli kardiyolipinin de yine membranda bulunduğu saptanmıştır. Apoptotik cisimlerin makrofajlarca tanınmasında rol oynayan diğer reseptörler; trombospondin reseptörleri olan α B ve CD-36 reseptörüdür. Bütün bu membran değişiklikleri apoptotik hücrelerin çevre fagositler tarafından fark edilmelerini ve fagositozlarını sağlamaktadır.

Apoptoza yönelen hücrede şekilsel değişiklikler gelişmeden ve DNA parçalanması görülmeden önce b-tubulin miktarı artar. Transglutaminaz aktivasyonu ile membran proteinlerde oluşan çapraz bağlanmalar, membranların parçalanmasını ve apoptotik cisimlerin oluşmasını sağlar. Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosit edilirlir. Apoptoz 30-60 dakika gibi bir sürede tamamlanır (76, 109, 110).

2.2.2.4 Fagositoz

Apoptotik cisimler çevredeki parenkim hücreleri ve fagositler tarafından fagosit edilerek dokudan temizlenirlir. Dokuda 4-9 saat tanınabilir halde kalan apoptotik hücreler daha sonra fagozomlar içinde birkaç saat kadar görülebilir, sonra da sindirilemeyen materyal olarak kalırlar. Apoptoz sırasındaki hücre zarı değişimleri, komşu hücrelerin ölü hücreyi fagosit etmesi için gerekli tüm uyarıları verecek şekilde düzenlenir. Apoptotik cisimlerin makrofajlar tarafından tanınmasında, fibronektin benzeri bir serum proteini olan ve doku hücrelerinin birbirine bağlanmasını kolaylaştırdığı bilinen vitronektin reseptörünün de rol oynadığı belirlenmiştir (111).

2.2.3 Apoptozun Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptozu saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptoz terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanısıra apoptoza özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örn. aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir.

Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler aşağıda sıralanmıştır:

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri
2. Histokimyasal yöntemler
3. Biyokimyasal yöntemler
4. İmmunolojik yöntemler
5. Moleküler biyoloji yöntemleri

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri:

1.1. Işık mikroskopu kullanımı:

a. Hematoksilen boyama: Morfolojik görüntüleme yöntemleri içinde en ucuz ve kolay olanı hematoksilen ile boyamadır. Hematoksilen ile boyanan preparatlar ışık mikroskopu ile incelenir. Hematoksilen boyama (HB) hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku boyamalarında kolaylıkla kullanılabilir. Hematoksilen boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilir.

b. Giemsa boyama: Giemsa ile boyamada hematoksilenle boyamada da olduğu gibi nükleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Sitoplazma sınırları hematoksilen boyamaya göre daha iyi seçilebilmekle birlikte hematoksilen boyamaya belirgin bir üstünlüğü yoktur.

1.2. Floresan mikroskopu / Lazerli konfokal mikroskop kullanımı:

Floresan maddelerin (örn. Hoechst boyası, DAPI, propidium iyodür) kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilir. Floresan sistemler ışık mikroskopuna göre çok daha pahalıdır. Fakat hücre kültürü çalışmasında kullanılırlarsa, canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanır.

1.3. Elektron mikroskopu:

Elektron mikroskopu ile değerlendirme apoptozda en değerli yöntem (“gold standard”) olarak düşünülmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözlemlendiği bir yöntemdir. Üstelik subsellüler detaylar (örn. mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi) da incelenebilir.

1.4. Faz kontrast mikroskopu:

Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında, “flask” veya “plate”lerde büyütüldüğü çalışmalarda, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Ölen hücreler yapıştıkları yüzeyden ayrılacakları için besiyer içinde yüzmeye başlarlar. Bu hücreler faz kontrast mikroskopu ile gözlenebilirler. Ancak faz kontrast mikroskopunda mitozda giren hücreler apoptotik hücrelerin erken evredeki görüntülerine benzer ve ayrımları hemen hemen imkansızdır.

2. Histokimyasal yöntemler:

2.1. Anneksin V Yöntemi:

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde PS bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Dış yüze transloke olan PS’ler, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilirler. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur.

2.2. TUNEL Yöntemi:

DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya “plate”lere ekilmiş ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozun varlığı bu metodla saptanabilir.

2.3. M30 Yöntemi:

M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeratin 18’in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir. Sadece sitokeratin 18’i eksprese eden dokularda kullanılması mümkündür. Bu dokular epitelyal kaynaklı dokulardır.

2.4. Kaspaz-3 Yöntemi:

Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan

dokuda apoptoza yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bu bilinirse apoptotik hücreler bu metotla tespit edilebilirler.

3. Biyokimyasal Yöntemler

I. Agaroz Jel Elektroforezi:

DNA fragmentasyonu DNA kırıklarının gösterilebildiği bir başka yöntemdir. Apoptozda DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan (internukleozomal bölgelerden) kırıldığı için merdiven görüntüsü "ladder pattern" oluşur. Bu bulgu apoptozun karakteristik özelliğidir ve nekroziste görülmez. O yüzden apoptozu nekrozisten ayırmada faydalı yöntemlerden biridir.

II. "Western" Blotting:

Bu metod yardımıyla apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması mümkündür. Sitokrom-c'nin mitokondriden çıkıp çıkmadığı da bu metotla belirlenebilir. Yalnız, sitokrom-c tespitinde önce alt fraksiyonlama yapılarak hücrelerin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonları ayrılır. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom-c'nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptoza gittikleri anlaşılır.

III. "Flow" Sitometri:

"Flow" sitometri yardımıyla floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozun saptanmasında kullanışlı bir yöntemdir. İki farklı şekilde uygulanmaktadır:

- a. Floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak,
- b. Anneksin V kullanılarak.

Birincisinde, kompleks bilgisayar işlemleri kullanılarak hücre boyutu ile içerdiği DNA miktarı kıyaslanarak, azalan DNA miktarının apoptoz lehine olduğu gerçeğinden hareketle, apoptotik hücre popülasyonu tayin edilir. İkincisinde, floresan mikroskopuyla uzun zaman alan sayma işlemi saniyeler içinde yapılarak sonuç alınır.

4. İmmünolojik Yöntemler

1. ELISA:

ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre populasyonlarında gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkündür.

II. Florimetrik Yöntem:

Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilgili kaspazın antikoru bulunmuş flasklara hücre lizatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulur ve sonra ortama kaspazların parçaladığı ve kendisine floresan bir maddenin tutunduğu bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti florimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanır.

5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri

DNA "microarray" teknolojisi henüz çok yeni ve çok pahalı bir yöntemdir. Fakat yakın bir gelecekte tıp pratiğini radikal bir biçimde değiştirme iddiası taşıyan bu teknoloji ile aynı anda ve kısa bir süre içinde (önceden aylarca sürerken) yüzlerce hatta binlerce genin ekspresyon derecelerinin (mRNA'larının) tespiti mümkün olabilecektir. Böylece, apoptoza özgü hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ekspresyon durumları hakkında geniş bilgi edinme olanağı doğacaktır (75).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Ankara Şap Enstitüsü Hücre Kültürü Koleksiyonu'ndan (HÜKÜK) sağlanan insan amniyon (Fl) ve fetal akciğer (hel299) hücre hattı kullanıldı.

Bu hücrelerde sitotoksiteyi göstermek için belirli doz ve sürelerde perflorooktan sülfonat uygulandı ve tripan blue canlılık testi (Tyripan Blue Exclusion) yöntemi ile canlılık deneyi yapıldı. Ayrıca hiçbir kimyasal uygulanmayan hücreler de negatif kontrol olarak kabul edildi. Perflorooktan sülfonat uygulanan hücrelerden ve kontrolden RNA izolasyonu yapılarak Apaf-1, kaspaz-3 ve beta aktin (housekeeping gen) gen ekspresyonları, Realtime online Revers Transkriptaz RT-PCR ile saptandı ve beta aktine oranlanarak ekspresyonların relatif oranları belirlendi.

3.1 Kullanılan Kimyasallar

DMEM hücre besi yeri ortamı (Biological Industries 01-053-1A)

Tripsin EDTA (Sigma T4049)

Fetal dana serumu (Biochrom AG S0115)

L-Glutamin (Biochrom AG K0282)

Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin (Biological Industries 03-033-1C)

Perflorooktan Sülfonat (Fluka 77282)

Kimyasal Formülü: $C_8F_{17}KO_3S$

Moleküler Ağırlık: 538.22

Tripan Mavi Boyası (Sigma T8154)

PBS Tablet (Amresco E404)

Sodyum sitrat (Sigma S-4641)

Sodyum laurilsarkozin (Amresco 0719)

Guanidyum tiyosiyanat (Amresco 0380)

β -merkaptoetanol (Sigma M3148)

Dietilpirokarbonat (DEPC) (Serva 18835)

Fenol/kloroform/izoamil alkol (25:24:1) (Amresco K169)

Kloroform/izoamil alkol (24:1) (Amresco 0757)

Etanol (Riedel-de Haen 32221)

Agarose (LE Prona Basica 051342PR)

Borik Asit (Carlo Erba 302177)

Na₂EDTA (Sigma E-5134)

Orange G (Sigma O-3756)

Trizma Base (Sigma T-6066)

Gliserol (Merck 4091)

Ethidium Bromide (Sigma E-1510)

25 mM dNTP Mix (MBI Fermentas, #R0241)

25 M MgCl₂ (MBI Fermentas)

Revers transkriptaz (M-MLV) (Fermentas EP0441)

RNAse inhibitör (Fermentas E00381)

Light Cycler TaqMan Master (Roche 04535286001)

Primerler:

Apaf-1 Forward 5'–AGTGGTTGCTTTGTCCCAGT–3'

Reverse 5'– ACCCAACTTAAATGTCCTCTGC–3'

Kaspaz-3 Forward 5'–CTGGTTTTTCGGTGGGTGT–3'

Reverse 5'–CAGTGTTCTCCATGGATACCTTTATT–3'

Problar:

Apaf-1 UPL Prob 83 (Roche Universal ProbeLibrary 04689062001)

Kaspaz-3 UPL Prob 34 (Roche Universal ProbeLibrary 04687671001)

3.2 Kullanılan Çözeltiler

Dietilpirokarbonat (DEPC) H₂O

1000 ml deiyonize su içine 2 damla DEPC konup iyice çalkalanır.

Bir gece oda ısısında bırakılır.

60 °C'de 2 saat kapağı hafifçe gevşetilerek tutulur ve ardından otoklavlanır.

+4 °C'de saklanır. Bu ısıda 1 yıl stabildir.

0.75 M Sodyum Sitrat

Sodyum sitrat (15.78 g)

DEPC H₂O ile 100 ml' ye tamamlandı (pH 7.0)

Otoklavlanarak sterilize edildi.

Oda ısısında 6 ay stabildir.

% 10 Sarkozil

Sarkozil (1 g)

DEPC H₂O (10 ml)

Oda ısısında en az 3 ay stabildir.

4M Guanidinyum Tiyosiyanat (GSCN)

Guanidinyum tiyosiyanat (25 g)

0,75 M sodyum sitrat (5 ml)

% 10 Sarkozil (2.5 ml)

DEPC H₂O 50 ml'ye tamamlanır.

Bu karışım oda ısısında 3 ay stabildir.

Denatürasyon Çözeltisi (Solusyon D)

GSCN 4M çözeltisi (9.9 ml)

2-merkaptotanol (0.1 ml)

Bu karışım oda ısısında 1 ay stabildir.

10XTBE (Tris-Borat-EDTA) Tamponu

Trizma Base (108 g)

Borik asit (54,8 g)

EDTA (5,44 g)

Distile su ile 1lt'ye tamamlanarak çözüldü.

Orange G çözeltisi

Na₂EDTA (2,232 g)

Orange G (200 mg)

60 ml Gliserol ve 40 ml distile sudan oluşan solüsyon içerisinde çözüldü.

% 1.5'luk Agaroz Jel Solüsyonu

1X TBE Buffer (140 ml)

Agarose Basica LE Prona (2.1 g)

Ethidium Bromide (0.5 µg/ml)

3.3 Kullanılan Yöntemler

3.3.1 Hücre Kültürü

Hücre kültürü, bir organ veya dokudan alınan küçük bir parçanın, uygun fizikokimyasal ve biyolojik işlemler sonucu *in vitro* koşullarda üretilmesi işlemidir. Hücre (doku) kültürü çalışmalarının geçmişi yüz yılı aşkın bir süreyi kapsamaktadır ve orjini 1885'e dayanmaktadır. 1885'de Wilhelm Roux embriyonik tavuk hücrelerinin hayvan vücudunun dışında, tuz çözeltisinde canlılığını sürdürebildiğini göstermesi ile hücre kültürü çalışmaları başlamış, daha sonraki yıllarda uygun besi ortamlarının üretimi ile ve kontaminasyon sorununda çözülmesi ile hücre kültürü çalışmaları büyük bir hız kazanmıştır.

Hücre kültürleri kaynaklarına ve büyüme biçimlerine göre sınıflandırılırlar.

1. Kaynaklarına göre;

Primer kültürler: Hücre ya da doku izole edildikten sonra yapılan ilk kültüre primer kültür denir. Primer kültürde hücre soyu sonludur yani pasajlamalar sonunda hücreler yaşlanarak ölürlür. Bu nedenle primer hücrelerle belirli bir sayıda pasajlama yapılabildiğinden deneyler bu dönemde yapılmalıdır.

Hücre hatları (Cell line'lar): Primer kültürden spontan mutasyonlar sonucunda kendiliğinden ya da kimyasal ajanlar ya da virüsler eklenerek insan eliyle oluşturulurlar. Tümör dokusundan alınan hücrelerden de elde edilirler. Hücre hatları primer kültürden şu özellikleri ile farklılık gösterirler;

- Kültürde yüksek yoğunluğa ulaşabilmeleri,
- Büyüme faktörleri ve seruma daha az gereksinim duymaları,
- Çoğalmak için bir zemine tutunma gereksinimlerinin daha az olması,
- Sonsuz çoğalma yetenekleri (bu özellikleri ile tümör hücrelerine benzerler).

2. Büyüme biçimlerine göre;

Süspansiyon kültürler: Kan, dalak, kemik iliği ve olgunlaşmamış hücreler bu şekilde kültüre edilirler. Bu kültürler kültür kabına yapışma göstermezler.

Monolayer (tutunarak büyüyen) kültürler: Ekdoderm ve endodermden oluşan hücreler (fibroblast ve epitel hücreleri) ekstrasellüler matrix olarak adlandırılan ve kollagen, fibronektin, laminin, proteoglikanlar gibi makromoleküllerin bir karışımı olan kompleks bir yapı üzerinde, bu yapıdaki moleküllerle membran reseptörleri aracılığı ile etkileşerek büyürler. Bu etkileşimi sağlayan membran proteinlerinin en önemlileri integrin adlı heterodimerik proteinlerdir.

Hücre Kültürü Yönteminin Temel Aşamaları

Hücre kültürü çalışmaları için gerekli donanımdaki araç-gereçler, laminar akımlı kabin, karbon dioksit (CO₂) etüvü, faz kontrast mikroskop, hücreleri saklama ve koruma için sıvı azot tankı ile hücrelerin üremesi için tutunma ve hareketlerine olanak sağlayacak toksik olmayan, biyolojik olarak inert ve optik olarak saydam, tek kullanımlık steril plastik kaplardır.

Laminar akımlı kabinler partikül filtresine sahiptirler. Bu kabinler dikey ya da yatay olabilirler, dikey olanlarında süzülen hava kabinin üstünden çıkarken, yatay olanlarında kullanıcı bölgesinden yatay olarak dışarı üfürülmektedir. Kabinlerin kullanım öncesi UV (ultraviyole, morötesi) ışıkla sterilizasyonu sağlanmalıdır. Hücreler yaklaşık olarak % 5 CO₂ içeren ortamda üretildikleri için CO₂ etüvlerinden yararlanılmaktadır. Hücreleri gözlemek için de faz kontrast mikroskoplar kullanılır.

Kültürler günlük olarak kontrol edilmelidir. Besiyerinin rengi ve morfolojisi ile hücrelerin yoğunluğu gözlemlenmelidir. Kültürde hücreler; hücre tipine, ekilme yoğunluğuna, ortamın yoğunluğuna ve daha önceki işlemlere bağlı olarak önce sessiz (inaktif) ya da “lag fazı” denilen bir döneme girerler. Bunu, en yüksek metabolik aktivitenin gözlemlendiği “log fazı” yani logaritmik artış (üreme) dönemi izler. Bundan sonra da hücreler hücre sayısının sabit kaldığı “plato fazı” olarak adlandırılan durağan bir evreye girer (tüm üreme yüzeyleri kaplanmıştır). Hücre yoğunluğu üremeyi baskıladığı zaman besiyerinden alınır. İdeal olanı hücrelerin durağan evreye girmeden önce kültürden alınmalarıdır. Hücrelerin kültür kabından alınmaları için değişik yöntemler kullanılabilir:

Mekanik: Bir spatül kullanarak hücreler yüzeyden fiziksel olarak ayrılabilir. Ancak hızlı bir yöntem olmasıyla birlikte bu yöntemde hücreler zarar görebilirler. Bu nedenle ancak hücre canlılığının önemli olmadığı koşullarda bu yöntem tercih edilebilir.

Proteolitik enzimler: Tripsin, kollajenaz ya da pronaz genellikle EDTA ile kombine edildiğinde hücrelerin üreme yüzeyinden ayrılmasına neden olur. Bu enzimler proteolitik aktiviteye sahiptir ve hücreler arası protein-protein bağlarını koparır. Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonları hücre dışı matriksin stabilitesini artırır. Hücreler arası tutunmada rol oynayan hücre yüzey glikoproteinleri Ca^{2+} varlığında etkindir. EDTA, Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarını etkiler. Bu nedenle tripsin ile birlikte, hücre dışı Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarının uzaklaştırılması için de EDTA kullanılır. Bu yöntem de hızlı ve güvenilir olmasına karşın hücre yüzeyine zarar verebilir. Proteolitik reaksiyon serum içeren tam kültür ortamının katılmasıyla hızlı bir biçimde sona erdirilebilir.

Kültür ortamı (besiyeri) için gereken bileşenler ve üreme gereksinimleri Çizelge 3.1’de özetlendiği gibi sağlanmalıdır. Kültür kapları CO_2 etüvüne ($37^{\circ}C$; % 5 CO_2) konduğu zaman gaz giriş çıkışı için kapların ağzı hafif açık olmalıdır. Ayrıca ortamın nemli olması ve görünür ışıktan sakınılması da gereklidir. Hücre kültürü çalışmalarında da tüm laboratuvar çalışmalarında olduğu gibi güvenlik önlemlerine dikkat edilmelidir (112, 113).

Çizelge 3.1. Hücre kültürü besiyerinin bileşenleri (memeli hücresi için)(112, 113)

Amino asitler	Vitaminler	Tuzlar	Diğerleri	Proteinler (serum yerine)
Arjinin Sistin Glutamin Histidin İzolösin Lösin Lizin Metyonin Fenilalanin Treonin Triptofan Tirozin Valin	Biotin Kolin Folat Nikotinamid Pantotenat Pridoksal Tiamin Riboflavin	NaCl KCl NaH_2PO_4 $NaHCO_3$ $CaCl_2$ $MgCl_2$	Glukoz Penisilin Streptomisin Fenol kırmızısı Tam serum	İnsülin Transferrin Büyüme faktörleri

Bu araştırmada kullanılan embriyonel orijinli hücre serileri Fl ve Hel299 hücreleri Şap Enstitüsü Hücre Kültür Koleksiyonu (Hükük)’den alındı ve aşağıda verilen besiyeri ortamında kültüre edilerek çoğaltılması sağlandı.

Hücrelerin Besiyeri Ortamı

DMEM hücre besi yeri ortamı	100 ml
Fetal dana serumu	% 20
Penisilin	10.000 U/ml
Streptomisin	10 mg/ml
Amfoterisin-B	0.025 mg/ml
L-Glutamin	0.3 g/L

Hücrelerin Fiziksel Ortam Şartları

Sıcaklık	37 °C
pH	7.0-7.4
CO ₂	% 5

Hücrelerin Bölünme ve Pasaj Zamanları

Fl: 1:3 pasaj 3-6 günde bir,
Hel299: 1:3 pasaj 3-4 günde bir Tripsin-EDTA ile

Üreme Ortamı

T3 (25ml) ve T4 (75ml) ortam kapları,
6 kuyucuklu ortam kapları

Hücrelerin konfluent olup olmadığı invert mikroskopta kontrol edildi ve % 80 ve üzerinde konfluent olduğuna karar verilen flasklardaki hücreler, üreyen hücre sayısını daha da arttırmak amacıyla tripsinizasyon işlemi uygulandı. Daha sonra elde edilen hücreler uygun sayıda flaska pasajlanarak yeniden ekildi.

Tripsinizasyon işlemi için seçilen flaskların kültür ortamları uzaklaştırılarak flasklar serum fizyolojik ile yıkandı. Bu yıkama işlemi sonrasında hücreler Tripsin+etilendiamintetraasetikasit (EDTA) solüsyonu ile muamele edilerek tutundukları yüzeyden ve birbirlerinden ayrılmasını sağlamış oldu.

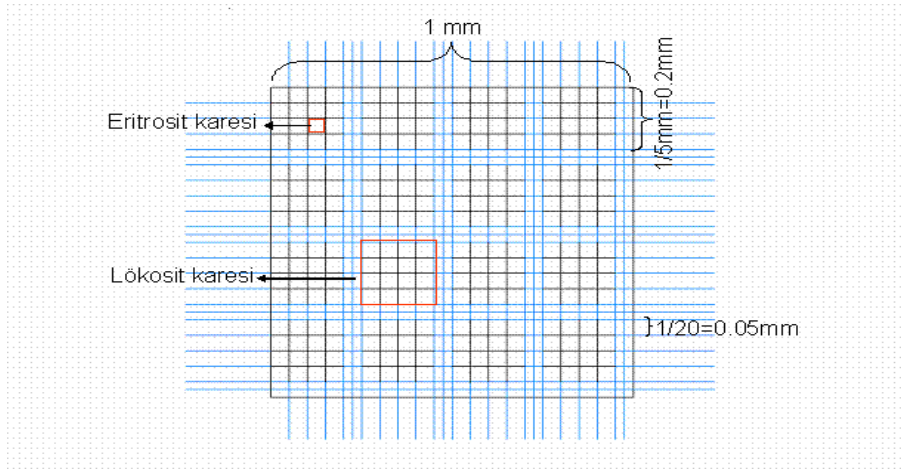
Yüzeyden kaldırılan hücreler flask sayısı ile orantılı olarak kültür ortamı ile resüspande edildi. Elde edilen suspansiyon daha önce içlerine kültür ortamı konmuş flasklara eşit miktarlarda ekilerek pasajlama işlemi tamamlandı.

3.3.2 Tripan mavisi boyama yöntemi

Hücrelerin Sayımı:

Tripsinizasyon işleminden sonra tripsin+hücre olan flasklar medium ile iyice yıkanarak elde edilen süspansiyon tripsin+EDTA'lı mediumun uzaklaştırılması amacıyla 1200 rpm'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi.

Hücreler 1:1 oranında taze besi yeri ortamı/PBS ile seyreltikten sonra Neuber–hemositometreye alındı. Hemositometrenin dört karesindeki hücreler sayılıp ortalaması alındıktan sonra çıkan sayı Dilüsyon Etkeni, 10^4 ile çarpılıp 1 ml'deki hücre sayısı (hücre/ml) bulundu (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1. Neuber–Hemositometrede hücre sayımı (77).

İn vitro Sitotoksosite Deneyi

Bu deney için 24 kuyucuklu kapların her bir kuyucuğuna 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde hücre konuldu. Daha sonra bu kuyucuklara değişik dilüsyonlarda (10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M) PFOS eklenerek 12, 24, 36, 48 ve 72 saatlik sürelerdeki sitotoksosite tripan mavisi boyası ile belirlendi. İnkübasyon sonrası hücreler 1:1 oranında (hücre süspansiyonu:tripan mavi boyası) seyreltildiler ve *Neuber Lami*'nda ışık mikroskopunda sayıldılar. Tripan mavisini alan hücreler ölü olduğundan, maviye boyanmış ve boyanmamış hücrelerin sayımı ile sitotoksosite belirlendi. Çıkan sayı, dilüsyon faktörü ve 10^4 ile çarpılıp ölü ve canlı hücrelerin yüzde değerleri bulundu. % 70 ve üzerinde canlılık saptanan gruplar deney grubuna dahil edildi.

Ölü hücrelerin yüzdesi: Tripan mavisini alan hücreler/Tüm hücreler x 100

3.3.3. Gen Ekspresyonu Deneyleri

3.3.3.1 RNA izolasyonu:

Canlılık testi sonucunda belirlenen dilüsyonlarda (10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M) PFOS eklenen flasklardan 24, 48 ve 72. saat sonunda Chomczynski ve ark. (114) tarafından 1987’de tanımlanan Asit Guanidinyum-Fenol-Kloroform (AGPC) yöntemi modifiye edilerek RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Yöntem doku ya da hücrelerin lizis solüsyonu ile parçalanıp fenol yardımıyla RNA’nın ekstrakte edilmesine dayanmaktadır. Bu yöntemde güçlü bir protein denatüre edici ve RNaz’ları inaktivite edici olan guanidin tiosiyanat içeren bir lizis solüsyonu kullanıldı. RNA izolasyonunda fenol ekstraksiyonu genellikle DNA ve RNA içeren solüsyonlardan protein ve restriksiyon enzimlerinin uzaklaştırılması için kullanılır. Fenol proteinlerin sekonder yapısını parçalayarak onların denatüre olmasını ve solüsyonda presipitasyonunu sağlar. Fenol ekstraksiyonu esnasında bu presipite olan proteinler bir araya toplanarak sıvı ve organik fazlar arasında interfazda toplanırlar. Fenolün stabilitesi oldukça düşük olup kısa sürede nükleik asitlerdeki fosfodiester bağlarını kıran bir serbest radikale (kuinon) okside olmaktadır. Karışıma kloroform eklenmesi fenol oksidasyonu azaltmakta ve stabilitesini arttırmaktadır. Ayrıca kloroform protein denatürasyonunun etkinliğini arttırmakla birlikte lipidlerin uzaklaştırılmasında da rol oynamaktadır. Fenol:kloroform karışımına izoamil alkol de eklenerek köpürme engellenmektedir. Kullanılan cam ve plastik malzeme ile solüsyonlardan RNase kontaminasyonunun elemine edilmesi için ise DEPC kullanıldı (115).

Bu yöntem için sırasıyla şu işlemler yapıldı;

- Flask içindeki hücre kültür mediumu pipetle bir tüp içine alındı.
- Hücreler 2 kere PBS ile yıkandı. 1-2 ml tripsin-EDTA eklendi. Flask 5-10 dakika inkübatöre konarak hücrelerin yüzeyden kalkması sağlandı.
- Yüzeyden kalkan hücreler aynı tüp içerisine alınarak 1600 rpm’de 10 dak. santrifüj edildi.
- Oluşan pellet bir 1.5 ml’lik ependorf tüpe aktarıldı.
- Üzerine 500µl denatürasyon solüsyonu eklenip birkaç saniye vortekslenerek buz içinde 15 dk bekletildi.
- Karışımların üzerine 700 µl fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) ekleyip buz içinde 15 dk daha bekletildi.
- Tüpler 4 dk 10 000 rpm (10 dk, 13000 rpm)’de santrifüj edildi.

- h. Üst faz alınıp yeni bir 1.5 ml lik steril ependörf tüplere aktarıldı.
- i. Yeni tüplere 700 µl kloroform-izoamil (24:1) ekleyip 2 dk 10000 rpm'de santrifüj edildi.
- j. Üst sıvı fazı yeni bir 1.5 ml lik steril ependörf tüpe aktarıldıktan sonra alınan bu üst faza 1 ml %100 etanol ekleyip -20 C⁰'de bir gece bırakıldı.
- k. Tüpler -20 C⁰ den alınıp 15 dk 12500 rpm de santrifüj edildi.
- l. Tüplerdeki etanol dökülüp 500µl %70'lik etanol eklenerek birkaç saniye vortekslendikten sonra 5 dk 12500 rpm de santrifüj edildi.
- m. Süpernatantı dökülüp birkaç saniye mikrosantrifüjde santrifüj edildikten sonra tüplerin dibinde kalan etanol pipetle uzaklaştırıldı.
- n. Tüplerin ağzı açık olarak (en az 10 dk) bekletilip çökelek üzerine 20-50 µl DEPC-distile su eklendi.
- o. RNA'nın çözülmesi için 70⁰C'de 1 saat bekletildi.
- p. İzole edilen RNA'nın 5 µl'si alınıp 10 µl orange G eklendi.
- q. Etidyum bromid içeren % 1.5 luk agaroz jel hazırlandı. Her bir tüpten 15 µl alınarak jel kuyucuklarına yüklendi.
- r. 120 V elektrik akım uygulanarak elektroforez işlemi yapıldı ve RNA gözlendi.
- s. Kalan RNA daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80'de saklandı.

3.3.3.2 cDNA eldesi

Ekstraksiyon sonunda elde edilen RNA, komplementer DNA (cDNA) sentezi için kalıp olarak kullanıldı. cDNA sentezi için tek sarmal RNA'yı kalıp olarak kullanabilen bir DNA polimeraz enzimi olan reverse transkriptaz (MMVRT) kullanıldı. Bu enzim, Wisconsin-Madison Üniversitesi'nden Howard Martin Temin ve Massachusetts Teknoloji Enstitüsünden David Baltimore'nin sürdürdükleri bağımsız çalışmalar sonucu keşfedilmiştir. cDNA sentezinde MMVRT'nin yanı sıra dNTP, RNAaz inhibitörü, DNA primeri kullanıldı. DNA primeri dT oligonükleotidi içermekte olup (sadece hexamer yapıda thymidine nükleotidi) messenger RNA'nın poli A kuyruğuna komplementerdir. Tüm RNA çeşitlerinde bulunmakla birlikte dezavantajı 25°C de hibridize olması ve ortamda RNaz inhibitörü bulunmazsa çabuk bozulmasıdır (116, 117) .

PCR ortamı:

5XRT Buffer	4µl
dNTP	10µl
polydT primer	1µl
MMVRT	1µl (20U/ µl)
RNAaz inhibitörü	0.5 µl
Su	12 µl
RNA	1 µl

Final hacmi 30 µl olacak şekilde hazırlandı.

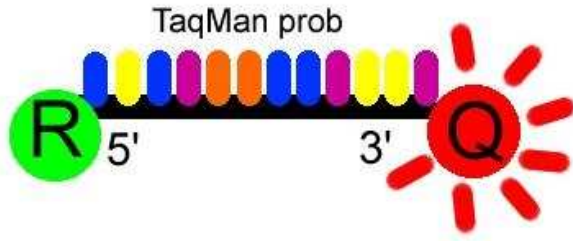
Hazırlanan PCR ortamı, 37 °C 60 dk inkübe edildi. Enzim inaktivasyonu için 95 °C'de 5 dakika bekletilen örnekler, analizi yapılana kadar -20 °C'de saklandı.

3.3.3.3 Realtime Revers Transkriptaz RT-PCR ile Gen Ekspresyonu Analizi

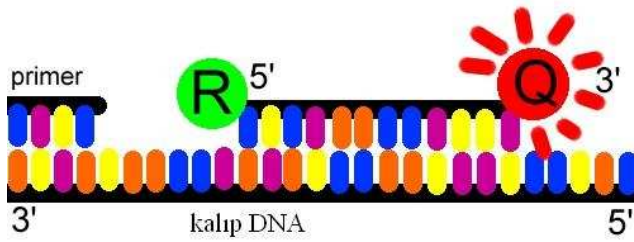
Elde edilen cDNA örneklerinden Apaf-1, kaspaz-3 ve beta aktin (housekeeping gen) gen ekspresyonları Real-Time online Revers Transkriptaz RT-PCR ile Light Cycler Real-Time PCR (Roche, Almanya) cihazı ile belirlendi. Her bir gruptan elde edilen konsantrasyon oranı, beta aktine oranlanarak ekspresyonların oranı (E değeri; efficiency) saptandı.

Real-Time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problardan yararlanılmaktadır. Böylece sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devam etmektedir.

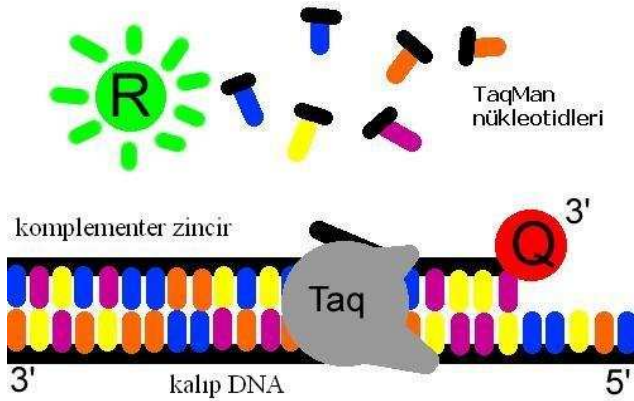
TaqMan Gen Ekspresyon Master hassas bir şekilde formüle edilmiş, yüksek duyarlılıkta, rutin ve araştırma amaçlı kantitatif uygulamalarda kullanılabilen bir Real-Time PCR sistemidir. TaqMan sisteminde, 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Probu 5' ucunda raportör florokrom (Reporter, R; 6-karboksifloresein=6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom (Quencher, Q; 6-karboksi-tetrametil-rodamin=TAMRA) bulunmaktadır (Şekil 3.2). Prob tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanmaktadır (Şekil 3.3).



Şekil 3. 2. TaqMan sisteminde kullanılan prob (84).



Şekil 3. 3. Probu tek sarmal hale getirilen kalıp DNA'ya bağlanması (84).



Şekil 3. 4. Raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması (84).

Prob–hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik aside bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' ekzonükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur (Şekil 3.4). Her siklusta üretilen amplikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artar. Bu sinyal şiddeti de Light Cyler cihazı tarafından ölçülür.

Ayrı bir PCR'da yapılan aynı cDNA preparasyonu kullanılarak beta-aktin kodlayan mRNA housekeeping gen olarak kullanıldı. Bunun ürünü, RNA kontrolü ve rölatif kantitasyon için kullanıldı. Her bir örneğin kantitasyonu, floresan rezonans enerjisi Light Cycler Kantitasyon Software'ı (LCQuant, Roche Diagnostics) kullanılarak ölçülür. Bakılacak örnekte, ilgili gen mRNA miktarının ölçülmesi için rölatif kantitasyon kullanıldı. Amplifiye edilen DNA'nın kantitasyon analizi, kantitasyon software (Relative Quantification software Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) ile hesaplandı. PCR sırasında elde edilen amplikonlar, doğrudan Light Cycler cihazında, logaritmik artışa geçtikleri döngü sayısına göre değerlendirildi. Çalışılan örnekteki geçiş noktasına (CP; Crossing Point) göre DNA'nın rölatif miktarı kantitasyon yazılımı tarafından belirlendi (118, 119).

Realtime PCR reaksiyonu Apaf-1, kaspaz-3 ve beta aktin için şu şekilde yapıldı;

1 örnek için

Su	9 µl
UPL Prob (10 µM)	1 µl
Primer (forward)	1 µl
Primer (reverse)	1 µl
TaqMan master	4 µl
cDNA	5 µl

PCR koşulları Light Cycler cihazı ile şu şekilde sağlandı;

95 °C	10 dakika	1 siklus	
95 °C	10 saniye		45 siklus
45 °C	20 saniye		
72 °C	1 saniye		
40 °C	30 saniye	1 siklus	

3.4. İstatistiksel Analiz

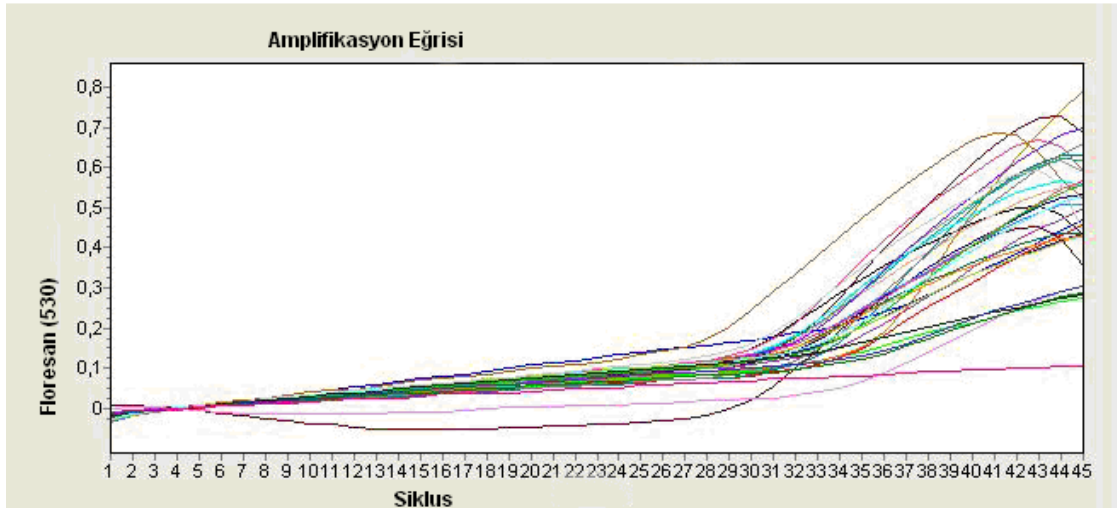
Gen ekspresyonu deneyleri dörder kez tekrarlandı. Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. En az iki grup arasında, saat değerleri bakımından herhangi bir farklılık olup olmadığını tespit etmek için *Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA)* testi

kullanıldı. Gruplar arası yapılan karşılaştırmalarda negatif kontrol grupları baz alınarak, diğer gruplar ile karşılaştırıldı. Yapılan analizde kontrol grupları ve diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığını tespit etmek için *Dunnet _t* testi kullanıldı. Yapılan istatistiksel çalışmada 1. tip hata miktarı olarak $\alpha = 0.05$ belirlenmiş ve her çalışmadan elde edilen anlamlılık değerleri ile (p) karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

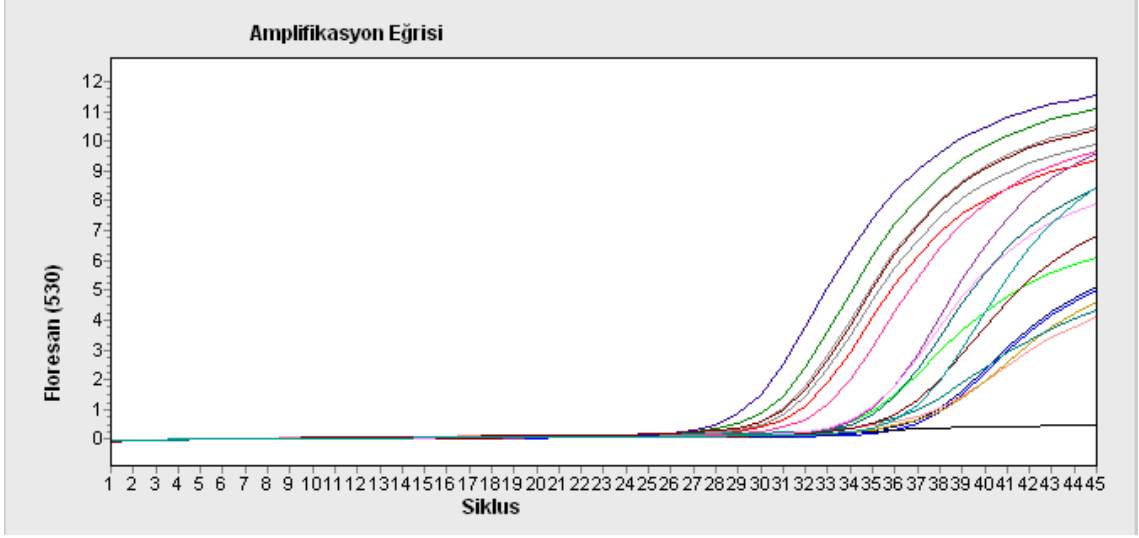
Bu çalışmada PFOS'un etkilerini, embriyonel orjinli hücre serilerinden amniyon (Fl) ve fetal akciğer (Hel299) hücrelerinde, sitokrom-c aracılı apoptoz ile ilişkili Apaf-1 ve kaspaz-3 genlerinin ekspresyon düzeyine bakarak araştırdık. Canlılık testi sonucunda dozlar 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M olarak belirlendi. Fl hücre hattına bu dozlarda PFOS uygulanarak 24, 48 ve 72. saatler sonunda Apaf-1 ve kaspaz-3 genlerinin amplifikasyon düzeylerine bakıldı. Ancak 72. saat sonunda Hel299 hücrelerinde ölüm görülmesi nedeni ile bu hücre hattında sadece 24. ve 48. saat sonunda Apaf-1 ve kaspaz-3 genlerinin amplifikasyon düzeylerine bakıldı.

PFOS uygulanan grupların light cycler da Apaf-1 geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



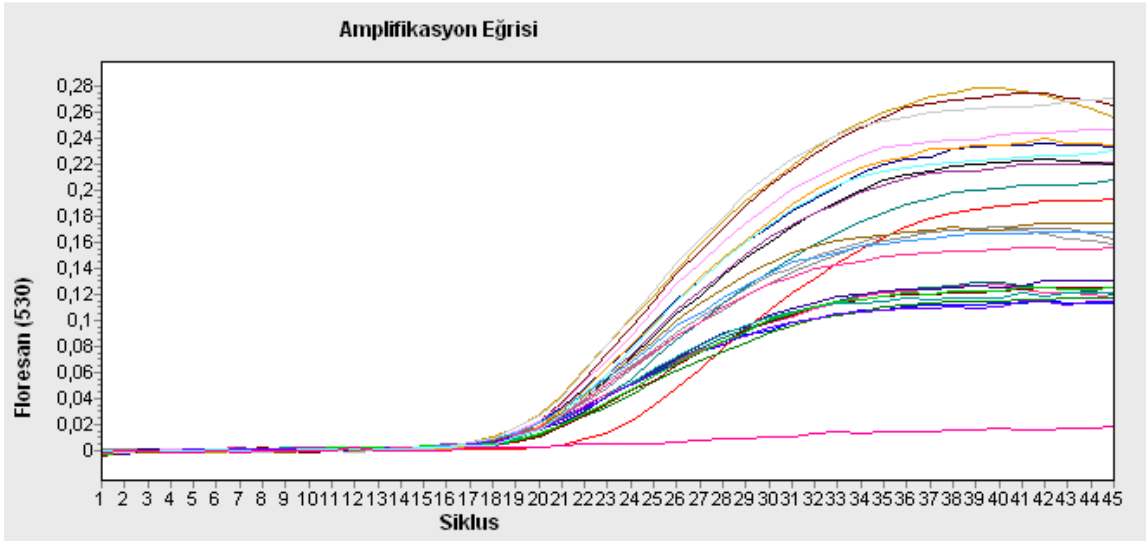
Şekil 4. 1. Fl hücre hattında Apaf-1 geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi

PFOS uygulanan grupların light cycler da kaspaz-3 geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 2. Fl hücre hattında kaspaz-3 geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi.

PFOS uygulanan grupların light cycler da housekeeping gen olan beta-aktin geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi ise Şekil 4.3’de gösterilmiştir.



Şekil 4. 3. Fl hücre hattında beta-aktin geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi.

Çalışılan tüm gruplarda, ekspresyon oranları negatif kontrol baz alınarak hesaplanmıştır. Negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösteren gruplara ait p değerleri (*) ile gösterilmiştir.

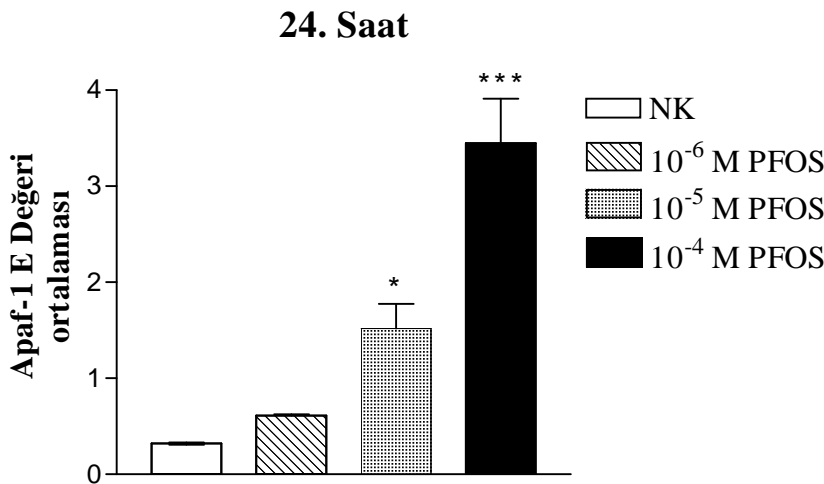
4.1. Fl Hücre Hattında 24. Saatte Apaf-1 ve Kaspaz-3 Ekspresyonu

Fl hücrelerine 24. saatte 10^{-4} M PFOS uygulanan hücrelerde Apaf-1 ve kaspaz-3 geni için anlamlı bir ekspresyon artışı saptanırken 10^{-5} M PFOS uygulanan hücrelerde sadece Apaf-1 ekspresyonunda anlamlı bir artış saptanmıştır ($p < 0.05$; Çizelge 4.1; Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). 10^{-6} M PFOS uygulanan Fl hücrelerinde her iki genin ekspresyonundaki artış da anlamlı değildir ($p > 0.05$; Çizelge 4.1; Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). Ayrıca 10^{-5} M PFOS uygulanan Fl hücrelerinde de kaspaz-3 ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlenmemiştir ($p > 0.05$; Çizelge 4.1; Şekil 4.5).

Çizelge 4. 1. Fl hücre hattında Apaf-1 ve kaspaz-3 geni için 24. saatte ekspresyon oranı (E değeri) ortalamaları, NK: negatif kontrol,

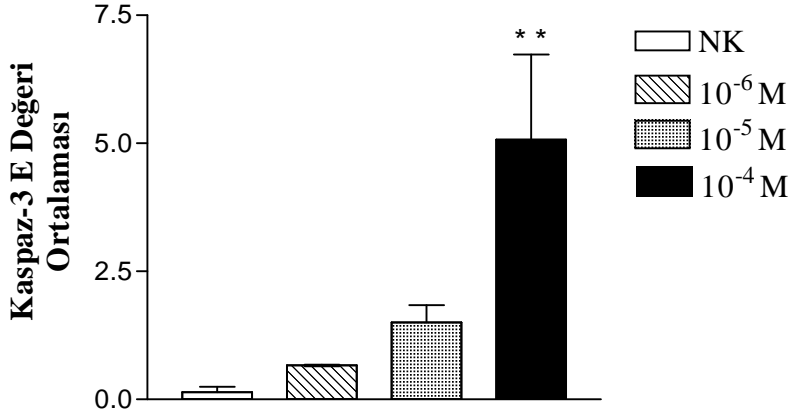
	PFOS	N	E Değeri Ortalaması	Ortalama Fark	P değeri
Apaf-1	NK	4	0.3181		
	10^{-6} M	4	0.6106	0.2925	0.777
	10^{-5} M	4	1.5177	1.1997	0.019*
	10^{-4} M	4	3.4505	3.1324	0.000***
Kaspaz-3	NK	4	0.1380		
	10^{-6} M	4	0.6626	0.5246	0.946
	10^{-5} M	4	1.5020	1.3640	0.551
	10^{-4} M	4	5.0705	4.9325	0.004**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$



Şekil 4. 4. Fl hücre hattında Apaf-1 geni için 24. saatte ekspresyon oranı (E değeri) ortalamaları, NK: negatif kontrol,

24. Saat



Şekil 4. 5. FI hücre hattında kaspaz-3 geni için 24. saatte ekspresyon oranı (E değeri) ortalamaları, NK: negatif kontrol

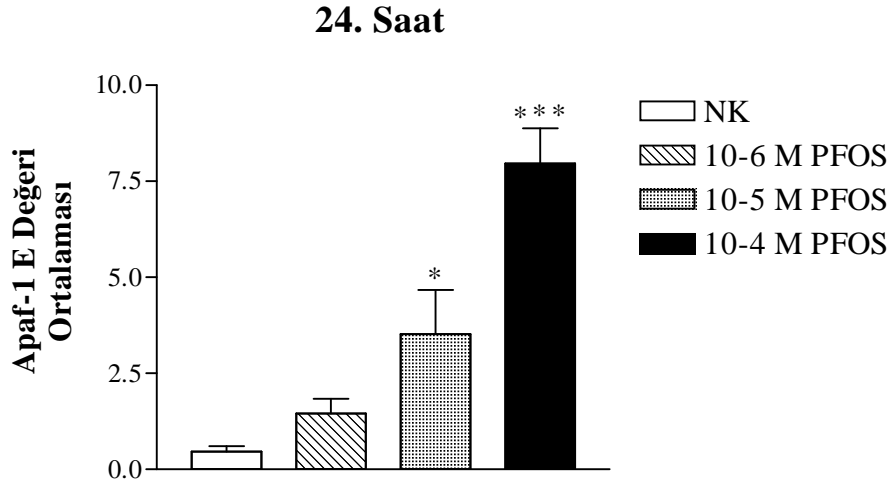
4.2. Hel299 Hücre Hattında 24. Saatte Apaf-1 ve Kaspaz-3 Ekspresyonu

Hel299 hücrelerine 24. saatte 10⁻⁴ M ve 10⁻⁵ M PFOS uygulanan Apaf-1 geni ekspresyonunda anlamlı bir artış saptanmıştır (p<0.05, Çizelge 4.2 ve Şekil 4.6). Ancak kaspaz-3 gen ekspresyonu her üç dozda da (10⁻⁴ M, 10⁻⁵ M ve 10⁻⁶ M) artmakla birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (p>0.05; Çizelge 4.2 ve Şekil 4.7). Ayrıca 10⁻⁶ M PFOS uygulanan Hel299 hücrelerinde Apaf-1 gen ekspresyonundaki artış da anlamlı değildir (p>0.05; Çizelge 4.2 ve Şekil 4.6).

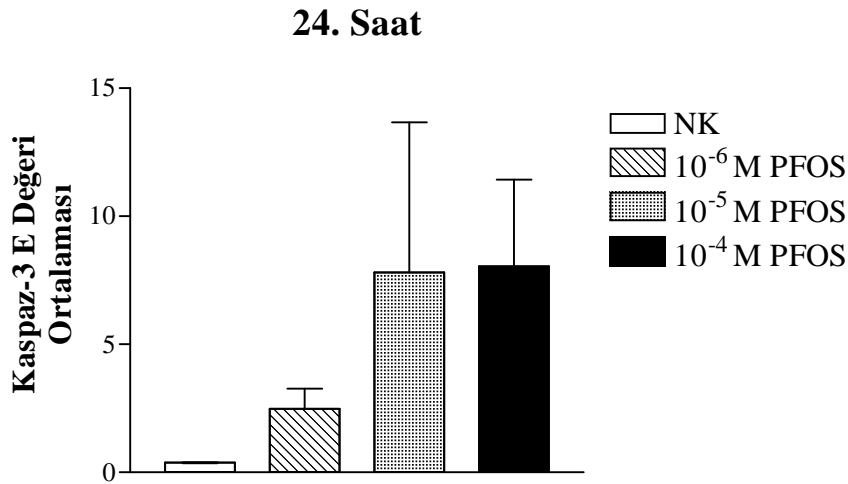
Çizelge 4. 2. Hel299 hücre hattında Apaf-1 ve kaspaz-3 geni için 24. saatte ekspresyon oranı (E değeri) ortalamaları, NK: negatif kontrol

	PFOS	N	E Değeri Ortalaması	Ortalama Fark	P değeri
Apaf-1	NK	4	.4642		
	10 ⁻⁶ M	4	1.4511	0.9869	0.695
	10 ⁻⁵ M	4	3.5176	3.0534	0.039 *
	10 ⁻⁴ M	4	7.9616	7.4974	0.000 ***
Kaspaz-3	NK	4	.3782		
	10 ⁻⁶ M	4	2.4796	2.1014	0.947
	10 ⁻⁵ M	4	7.8010	7.4227	0.328
	10 ⁻⁴ M	4	8.0387	7.6605	0.305

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001



Şekil 4. 6. Hel299 hücre hattında Apaf-1 geni için 24. saatte ekspresyon oranı (E değeri) ortalamaları, NK: negatif kontrol



Şekil 4. 7. Hel299 hücre hattında kaspaz-3 geni için 24. saatte ekspresyon oranı (E değeri) ortalamaları, NK: negatif kontrol

4.3. F1 Hücre Hattında 48. Saatte Apaf-1 ve Kaspaz-3 Ekspresyonu

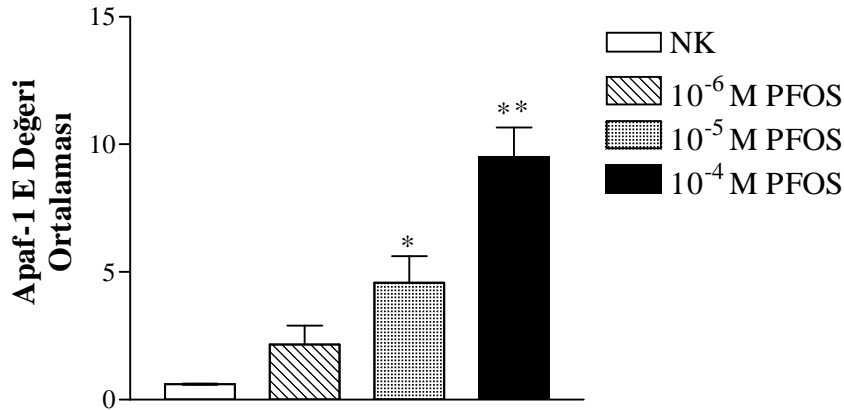
48. saatte 10^{-4} M ve 10^{-5} M PFOS uygulanan F1 hücrelerinde Apaf-1 ve kaspaz-3 geni ekspresyonunda anlamlı bir artış saptanmıştır ($p < 0.05$; Çizelge 4.3; Şekil 4.8 ve Şekil 4.9). Ancak 10^{-6} M PFOS uygulanan F1 hücrelerinde Apaf-1 ve kaspaz-3 ekspresyonundaki artış anlamlı değildir ($p > 0.05$; Çizelge 4.3; Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).

Çizelge 4. 3. F1 hücre hattında Apaf-1 ve kaspaz-3 geni için 48. saatte ekspresyon oranı (E değeri) ortalamaları, NK: negatif kontrol.

	PFOS	N	E Değeri Ortalaması	Standart Sapma	Ortalama Fark	P Değeri
Apaf-1	NK	4	0.6065	0.01202		
	10 ⁻⁶ M	4	2.1593	1.49273	1.5528	0.461
	10 ⁻⁵ M	4	4.5833	2.07238	3.9768	0.017*
	10 ⁻⁴ M	4	9.5121	2.27743	8.9056	0.001**
Kaspaz-3	NK	4	0.3395	0.04056		
	10 ⁻⁶ M	4	3.7488	1.93829	3.4093	0.202
	10 ⁻⁵ M	4	6.3391	2.89975	5.9997	0.017*
	10 ⁻⁴ M	4	8.7306	3.84097	8.3911	0.002**

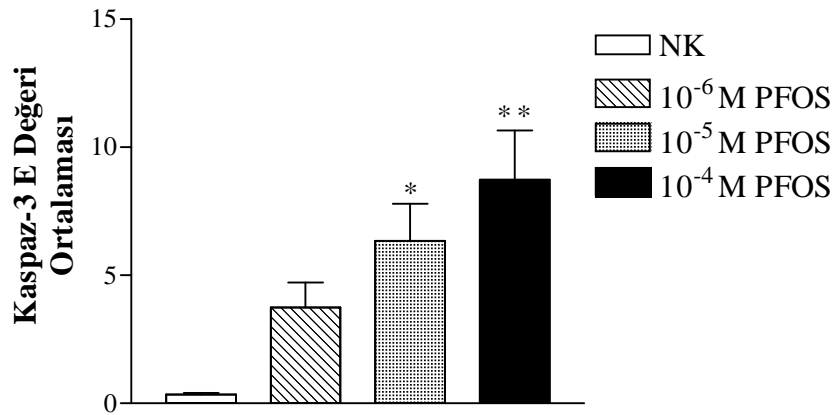
*P<0.05, **P<0.01

48. Saat



Şekil 4. 8. F1 hücre hattında Apaf-1 geni için 48. saatte ekspresyon oranı (E değeri) ortalamaları, NK: negatif kontrol

48. Saat



Şekil 4. 9. F1 hücre hattında kaspaz-3 geni için 48. saatte ekspresyon oranı (E değeri) ortalamaları, NK: negatif kontrol.

4.4. Hel299 Hücre Hattında 48. Saatte Apaf-1 ve Kaspaz-3 Ekspresyonu

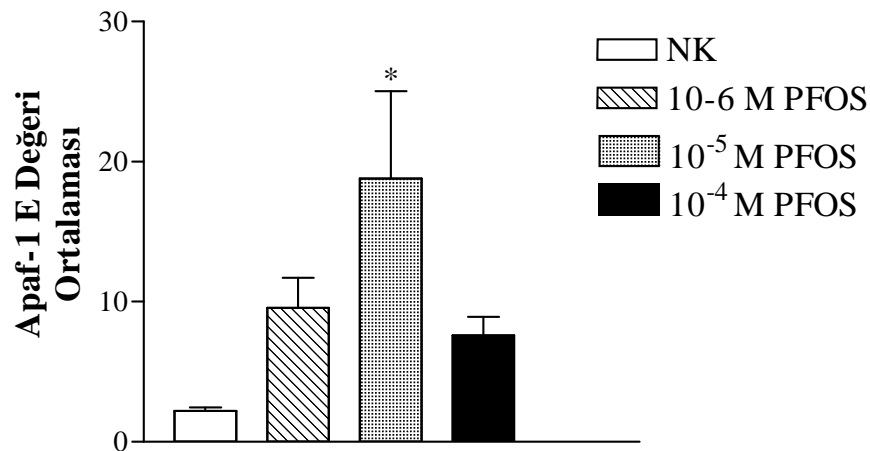
10^{-5} M PFOS uygulanan Hel299 hücrelerinde 48. saatte Apaf-1 geni ekspresyonunda anlamlı bir artış saptanırken ($p < 0.05$), kaspaz-3 geni için ise 10^{-5} M PFOS uygulanan hücrelerdeki ekspresyon artışı istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$; Çizelge 4.4; Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). Ayrıca 10^{-6} M PFOS uygulanan Hel299 hücrelerinde de kaspaz-3 gen ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlenirken ($p < 0.05$), Apaf-1 ekspresyonundaki artış istatistiksel açıdan anlamlı değildir ($p > 0.05$; Çizelge 4.4; Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). 10^{-4} M PFOS uygulanan Hel299 hücrelerinde ise her iki gen ekspresyonunda da anlamlı bir artış görülmemiştir ($p > 0.05$; Çizelge 4.4; Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). Ayrıca doza bağlı kaspaz-3 ekspresyonunda bir azalma görülmekle birlikte bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$).

Çizelge 4.4. Hel299 hücre hattında Apaf-1 ve kaspaz-3 geni için 48. saatte ekspresyon oranı (E değeri) ortalamaları, NK: negatif kontrol.

		N	E Değeri Ortalaması	Standart Sapma	Ortalama Fark	P Değeri
Apaf-1	NK	4	2.2080	.49273		
	10^{-6} M	4	9.5507	4.30746	7.3427	0.327
	10^{-5} M	4	18.7794	12.50350	16.5714	0.012*
	10^{-4} M	4	7.5913	2.64394	5.3833	0.555
Kaspaz-3	NK	4	2.6495	2.76614		
	10^{-6} M	4	9.5121	2.27743	6.8625	0.027*
	10^{-5} M	4	6.9297	4.53834	4.2802	0.191
	10^{-4} M	4	5.5078	2.72195	2.8583	0.472

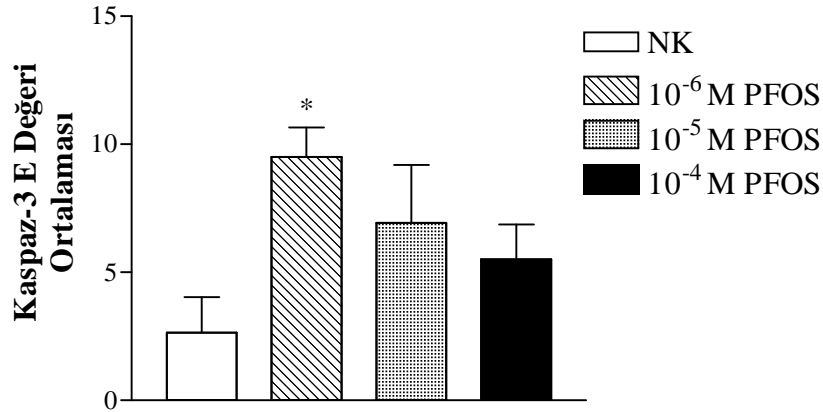
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

48. Saat



Şekil 4.10. Hel299 hücre hattında Apaf-1 geni için 48. saatte ekspresyon oranı (E değeri) ortalamaları, NK: negatif kontrol

48. Saat



Şekil 4. 11. Hel299 hücre hattında kaspaz-3 geni için 48. saatte ekspresyon oranı (E değeri) ortalamaları, NK: negatif kontrol.

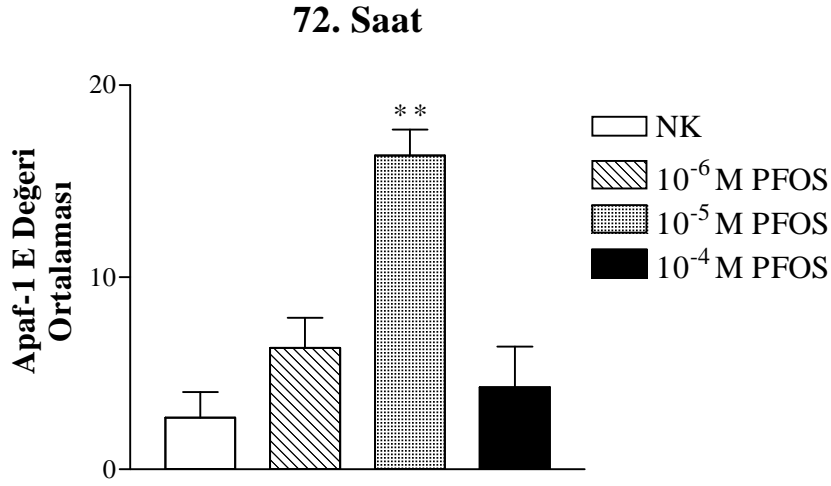
4.5. F1 Hücre Hattında 72. Saatte Apaf-1 ve Kaspaz-3 Ekspresyonu

PFOS uygulanan F1 hücrelerinde 72. saatte 10^{-5} M konsantrasyonda Apaf-1 gen ekspresyonunda anlamlı bir artış saptanırken ($p < 0.01$), 10^{-6} M PFOS uygulanan hücrelerdeki artış ise anlamlı değildir ($p > 0.05$; Çizelge 4.5; Şekil 4.12). 10^{-4} M PFOS uygulanan hücrelerde ise Apaf-1 ekspresyonunda bir azalma söz konusudur. Ancak bu azalma da istatistiksel açıdan anlamlı değildir ($p > 0.05$; Çizelge 4.5; Şekil 4.12). Kaspaz-3 gen ekspresyonu ise PFOS uygulanan tüm gruplarda artmakla birlikte sadece 10^{-4} M PFOS uygulanan hücrelerdeki kaspaz-3 ekspresyonunda artış istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p < 0.05$; Çizelge 4.5; Şekil 4.13). 10^{-5} ve 10^{-6} M PFOS uygulanan hücrelerde kaspaz-3 ekspresyonunda çok hafif bir artış görülmekle birlikte bu artış istatistiksel açıdan anlamlı değildir ($p > 0.05$; Çizelge 4.5; Şekil 4.13).

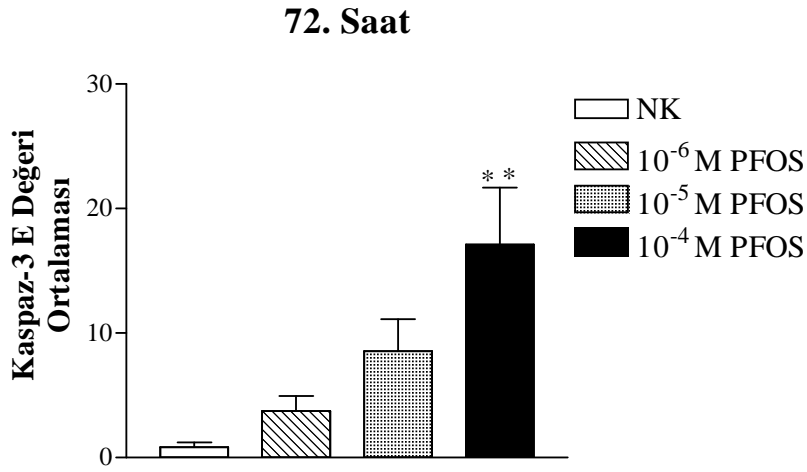
Çizelge 4. 5. F1 hücre hattında Apaf-1 ve kaspaz-3 geni için 72. saatte ekspresyon oranı (E değeri) ortalamaları, NK: negatif kontrol.

		N	E Değeri Ortalaması	Standart Sapma	Ortalama Fark	P Değeri
Apaf-1	NK	4	2.6836	2.68176		
	10^{-6} M	4	6.3205	3.14051	3.6369	0.308
	10^{-5} M	4	16.3414	2.70954	13.6578	0.001**
	10^{-4} M	4	4.2702	4.24188	1.5866	0.832
Kaspaz-3	NK	4	0.8114	0.79051		
	10^{-6} M	4	3.7457	2.40386	2.9343	0.785
	10^{-5} M	4	8.5259	5.17941	7.7145	0.155
	10^{-4} M	4	17.0988	9.12214	16.2874	0.003**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$



Şekil 4. 12. Fl hücre hattında Apaf-1 geni için 72. saatte ekspresyon oranı (E değeri) ortalamaları, NK: negatif kontrol



Şekil 4. 13. Fl hücre hattında kaspaz-3 geni için 72. saatte ekspresyon oranı (E değeri) ortalamaları, NK: negatif kontrol.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada perflorooktan sülfonatın insan amniyon (Fl) ve insan fetal akciğer (Hel299) hücre hatlarında apoptotik etkileri araştırılmıştır. Oluşturulan deney gruplarında, apoptotik genler olan Apaf-1 ve kaspaz-3 için gen ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler incelenmiştir.

Yaptığımız çalışmada her iki hücre hattında da Apaf-1 ve kaspaz-3 genlerinin PFOS uygulanan gruplarda ekspresyon düzeylerinin negatif kontrole oranla arttığı tespit edilmiştir.

24. saat sonunda özellikle yüksek dozda (10^{-4} M) PFOS uygulanan Fl hücre hattında ekspresyon oranlarının arttığı gözlenirken düşük dozlarda PFOS'un kaspaz-3 ve Apaf-1 ekspresyonuna bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Hel299 hücre hattında ise yine yüksek dozda (10^{-4} M) PFOS'un Apaf-1 ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Ancak kaspaz-3 ekspresyonunun da oldukça yüksek olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Bunun nedeninin standart sapmadaki artış olduğu düşünülmekte olup örnek sayısı artırıldığında anlamlılık kazanacağı düşünülmektedir.

PFOS uygulanan Fl hücre hattında Apaf-1 ve kaspaz-3 ekspresyonları 24. saatte ve 48. saatte en yüksek doz olan 10^{-4} M konsantrasyonda artmıştır. Ayrıca 48. saatte daha düşük olan 10^{-5} M'da artış gözlenmiştir. Hel299 hücre hattında da Fl hücre hattına benzer şekilde 10^{-5} M'da her iki genin ekspresyonu artmıştır. Ancak Hel299 hücre hattından 24. saatte yüksek dozda (10^{-4} M) PFOS uygulanan grupta görülen ekspresyon artışı 48. saatte anlamlılığını kaybetmiştir. Bunun nedeninin gen ekspresyonlarının erken apoptotik bir gösterge olması göz önünde bulundurularak hücrelerin apoptozun daha ileri aşamalarında olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Hel299 hücre hattında 72. saatte de PFOS uygulanmayan hücrelerde dahil tüm hücrelerin ölmesi de fetal akciğer hücrelerinin büyüme faktörü eksikliklerine ve kimyasallara karşı amniyon hücrelerine oranla daha dayanıksız olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

PFOS uygulanan Fl hücre hattında Apaf-1 ve kaspaz-3 ekspresyonları 24. saatte ve 48. saatte en yüksek doz olan 10^{-4} M'da artmıştır. Ayrıca hem Fl hücre hattında hemde Hel299 hücre hattında 48. saatte 10^{-5} M'da artış gözlenmiştir. Ancak Fl hücre hattından farklı olarak Hel299 hücre hattında 10^{-4} M'daki artış 48. saatte anlamlılığını

kaybetmiştir. Bunun nedeninde benzer şekilde hücrelerin apoptozun daha ileri aşamalarında olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Hel299 hücre hattında 72. saatte de PFOS uygulanmayan hücreler de dahil tüm hücrelerin ölmesi de fetal akciğer hücrelerinin büyüme faktörü eksikliklerine ve kimyasallara karşı amniyon hücrelerine oranla daha dayanıksız olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

F1 hücre hattında 72. saatte yüksek doz PFOS uygulanan hücrelerde, kaspaz-3 ekspresyonu anlamlı derecede artarken Apaf-1 ekspresyonunda bir azalma görülmüştür. Bu durum Apaf-1 gen ekspresyonunun daha erken bir apoptotik gösterge olmasına dayandırılmaktadır. Apoptozun erken evrelerinde, apoptotik gen ekspresyonu uyarılır, hücrelerin zar yapısı bozulmaya başlar. Hücre zarı iç kısmında bulunan fosfolipidlerin zar dışına çıkar. Daha geç aşamalarında ise DNA fragmentasyonu başlar ve hücre zarı geçirgenliği artar. Son olarak hücre apoptotik cisimcikler şeklinde paketlenir. Hücrelerin yüksek dozda PFOS'a maruz kaldıkları süre arttıkça artık bu hücreler geç apoptotik döneme doğru ilerlemektedirler. Bu nedenle gen ekspresyonlarındaki artışın da anlamlılığını kaybettiği görülmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada PFOS'un doza ve zamana bağlı olarak apoptozu indüklediği gözlenmiştir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde Hu ve ark. (120) insan karaciğer hücre hattı (HepG2) ile yaptıkları çalışmada 50-200 µmol/l PFOS'a maruz kalan hücrelerde PFOS'un apoptozu indüklediğini göstermiştir. Ayrıca bu çalışma sonunda PFOS'un ROS üretimini indüklediği, mitokondri membran potansiyelini bozduğu, hücre içi glutatyon miktarını azalttığı, p53 ve kaspaz-9 gen ekspresyonunu arttırdığı görülürken Bcl-2 ekspresyonunu da azalttığını tespit etmişlerdir.

Liu ve ark. (121) bir tatlı su balığı olan tilapia'dan izole ettikleri hepatositlerden elde ettikleri primer kültüre 0, 1, 5, 15 and 30 mg/L PFOS uygulamışlardır. Tripan mavisi ile canlılık testi yaptıkları çalışmada bizim çalışmamızla benzer şekilde doza bağlı olarak canlılık oranının azaldığını tespit etmişlerdir. Bizim sonuçlarımızla benzer şekilde PFOS uygulanan grupta kaspaz 3, 8, 9 aktivitesi artmış ve DNA fragmentasyon analizi de apoptozun doza bağlı olarak arttığını göstermiştir. Ayrıca yapılan bu çalışmada ROS üretiminde de anlamlı derecede bir artış olduğu tespit edilmiştir.

Watanabe ve ark. (122) yaptıkları çalışmada 30 ve 60 µM PFOS'a maruz kalan tavuk embriyosu hepatosit kültürlerinde 24. saat sonunda canlılık oranının anlamlı derecede düştüğü tespit edilmiştir. Bu bulguda bizim bulgularımızla oldukça uyumludur.

Bizim çalışmamızdan farklı olarak Krovel ve ark. (123) ise som balığında yapmış oldukları çalışmada 24 ve 48 saat 2.1-6.2-15.1-25.0 mg/L PFOS'a maruz kalan hücrelerde doza bağlı olarak canlılık oranında bir değişiklik olmadığını tespit etmişlerdir. Ayrıca PFOS'a maruz kalan hücrelerde kontrole oranla apoptozun azaldığını tespit etmişlerdir. Sonuçlardaki bu farklılık balık hücrelerinin diğer hayvan hücrelerine oranla kimyasalların akut toksik konsantrasyonuna karşı daha az duyarlı olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Krovel ve ark. (123) Atlantik som balığından (*Salmo salar*) izole ettikleri karaciğer hücrelerine PFOS uygulayarak yaptıkları bu çalışmada 24 ve 48. saat sonunda apoptoz yanı sıra hücrel stres, lipid metabolizması ve faz II enzimleri ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerini de araştırmışlardır. Hoechst 33342 ile nükleusu boyayarak hücre canlılığı ve kaspaz-3 ekspresyonunu değerlendirmişler ve hücre canlılığında doza bağlı bir azalma olmadığını tespit etmişlerdir. Bizim bulgularımızdan farklı olarak kaspaz-3 ekspresyonunun 24. saatte değişmediği ayrıca 48. saatte 25 mg/L dozda PFOS uygulanan grupta kaspaz-3 ekspresyon oranında bir azalma olduğu tespit edilmiştir.

PFOS'a maruz kalan hepatositlerdeki hücrel stresi belirlemek için glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve ısı şok proteini (Hsp70) ekspresyon düzeyine baktıkları çalışmada 25 mg/L'ye maruz kalan hücrelerde oksidatif stres göstergesi olan GSH-Px mRNA seviyesinde anlamlı derecede bir artış olduğunu tespit etmişlerdir. Daha düşük dozlarda ise GSH-Px seviyesinin etkilenmediği gözlenmiştir (123).

Hemen hemen tüm canlılarda çevresel, kimyasal veya fizyolojik strese cevap olarak sentezlenen ısı şok proteinlerinin de 25.0 mg/L PFOS'a maruz kalan hücrelerde ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Ancak stresin altında yatan mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır (123).

Ksenobiyotiklere maruz kalan hücrelerde faz I ve faz II enzim seviyesi artmaktadır. Sitrokrom p450 enzimleri faz I enzimlerinden en önemlileri olup Krovel ve ark. (123) tarafından yapılan bu çalışmada PFOS'a maruz kalan hepatositlerde CYP1A ve CYP3A ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca düşük PFOS konsantrasyonunun (2.1 mg/L) faz II enzimlerinden UDP-Glukoronil transferaz (UGT) seviyesini azalttığı görülürken daha yüksek PFOS konsantrasyonunun (> 15.1 mg/L) UGT ekspresyonunu arttırdığını tespit etmişlerdir.

Lipit metabolizmasında görev alan peroksizomal açil-CoA oksidaz ve üç PPAR varyantının (PPAR- α , PPAR- β ve PPAR- γ) ekspresyonuna bakıldığında ise peroksizomal açil-CoA oksidaz ve PPAR- α 'nın doza bağlı olarak ekspresyon seviyesinin arttığı tespit edilmiştir. PPAR- γ ekspresyonu 15.1 mg/L PFOS'a maruz kalan hücrelerde artarken PPAR- β ekspresyonunda hiçbir dozda artış gözlenmemiştir (123). Cwin ve ark. (124)'nın tavuk embriyolarından izole ettikleri hepatosit kültüründe yaptıkları çalışmada da PPAR- α ve PPAR- α hedef genlerin enzimleri olan peroksizomal açil-CoA oksidaz (ACOX), yağ asiti bağlayıcı protein (L-FABP), enol-koenzim A, hidrataz/3-hidroksiaçil koenzim A dehidrojenaz, bifonksiyonel enzim (BIEN), peroksizomal 3-ketoaçil tiyolaz (PKT) ve malik enzim (ME) ekspresyon düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir.

PFOS'un toksik etkileri kemirgenlerde çalışılmış olup yapılan çalışmalarda hamilelik döneminde PFOS'a maruz kalmanın, su ve yiyecek alımında azalmaya ve dolayısıyla maternal vücut ağırlığının da azalmasına yol açtığı ve ayrıca fetüs üzerinde de gelişimsel etkilere yol açtığı görülmüştür. Bunlar arasında fetal ağırlıkta azalma, yarık damak, anazarka (ödem), iskelet ossifikasyonunda gecikme ve kardiyak anomaliler yer almakta olup gebe sıçanlara PFOS düşük dozlarda (2mg/kg) verilse dahi neonatal mortalitenin arttığı gösterilmiştir (62, 63, 64).

Ayrıca yapılan çalışmaların birçoğu PFOS'un gelişimsel nörotoksik bir madde olduğunu göstermekle birlikte bazı çalışmalarda PFOS'un herhangi bir nörotoksik etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Pinkas ve ark. (125) PFOS'un kuşlardaki gelişimsel nörotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmada; PFOS'un kuluçka sonrası bilişsel davranışları etkilediğini ortaya koymuşlardır. Ancak bunun altında yatan sinaptik mekanizma aydınlatılamamıştır. Johansson ve ark. (60) tarafından yapılan çalışmada ise 10 günlük farelere oral yolla tek doz 1.4 veya 21 mmol/kg PFOS (0.75 or 11.3 mg) vermişler ve nörotoksik etkilerini değerlendirmişlerdir. Doğan yavruların 2. ve 4. aylarında davranışlarında dengesizlik, belirgin bir şekilde oturmada azalma ve hiperaktivite gözlenmiştir. Ancak Butenhoff ve ark. (126)'nın 0, 0.1, 0.3, veya 1.0 mg/kg PFOS'u gebelik başladığı andan itibaren doğuma kadar uyguladıkları sıçanlarla yaptıkları çalışmada PFOS uygulanan sıçanlardan doğan yavrularda kontrole oranla doğum kilosu, büyüme, seksüel olgunlaşma dönemindeki vücut ağırlığında, öğrenme, hafıza, bilişsel davranışlarda ve beyin ağırlığında herhangi bir farklılık olmadığı tespit

edilmiştir. 1.0 mg/kg PFOS uygulanan sıçanlarda maternal vücut ağırlığının oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir.

Danimarka'da 12 ve 30. gebelik haftalarında takip edilen ve maternal serum konsantrasyonu ortalaması 35 ng/mL olan kadınların doğum sonrası APGAR skorları hesaplanmıştır. Ayrıca doğumdan sonraki 6 ve 18. aylarda da bu kadınlarla tekrar görüşülmüş ve çocuğun gelişimi ile ilgili sorular sorulmuştur. Motor gelişimi, dil gelişimi, bilişsel fonksiyonlarında bir anomali olup olmadığı değerlendirilmiştir. Yapılan bu çalışma sonunda maternal PFOS konsantrasyonu yüksek olan kadınlar ile düşük olan kadınlar arasında çocuğun motor ve mental gelişimsel parametreleri ve APGAR skoru açısından bir farklılık bulunamamıştır (56).

Shi ve ark. (127)'nin yaptıkları bir çalışmada PFOS'un zebra balığı embriyoları üzerindeki gelişimsel toksik etkilerini araştırılmış, fertilizasyondan sonraki dördüncü saatte zebra balığı embriyolarına 0.1, 0.5, 1, 3 ve 5 mg/L PFOS uygulandığında yumurtaların kırılmasının geciktiği ve 1, 3 ve 5 mg/L PFOS'a maruz kalan yumurtalarda kırılma oranında ciddi derecede azalma olduğu gibi larvaların hayatta kalma süresinin de anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca balık yavruları ciddi derecede gelişimsel bozukluklar göstermektedir. Bunlar arasında epiboli deformiteleri, pigmentasyonda azalma, kuyruk ve kalp anomalileri, yolk kesesinde ödem yer almaktadır. 1 mg/L'den daha yüksek PFOS'a maruz kalan yumurtalardan çıkan yavru balıklarda da belkemiğinde eğrilik görülmüştür. 3 ve 5 mg/L PFOS'a maruz kalan grupta ise vücut uzunluğunda anlamlı derecede azalma tespit edilmiştir. Gelişimsel etkilerin altında yatan nedenin apoptoz olup olmadığı ise flow-sitometri, Tunel yöntemi ile araştırmışlardır. Yaptıkları çalışma sonunda bizim bulgularımızla benzer şekilde PFOS konsantrasyonuna bağlı olarak apoptotik oranın arttığını tespit etmişlerdir. PFOS ile muamele edilen embriyolarda da kontrol embriyolarına oranla apoptotik hücre oranının arttığı tespit edilmiştir.

Ayrıca Shi ve ark. (128) tarafından yapılan başka bir çalışmada da fertilizasyondan sonraki ilk 192. saatte 0.5 mg/l PFOS'a maruz kalan zebra balığı embriyolarındaki protein ekspresyonunu araştırmışlardır. Yaptıkları çalışma sonunda 69 proteinin seviyesinde kontrol grubuna oranla artma veya azalma olduğu tespit edilmiş olup bunlardan 18 tanesi tanımlanmıştır. Bu proteinler detoksifikasyon, enerji metabolizması, lipid transportu/steroid metabolizması, hücre yapısı, sinyal iletimi ve apoptozda rol oynamaktadır.

Peden-Adams ve ark. (129) tarafından ise PFOS'un embriyo üzerindeki etkileri beyaz leghorn tavuklarında araştırılmıştır. Yaptıkları çalışmada tavuk yumurtalarına ilk embriyonik günden itibaren 1, 2.5, veya 5 mg/kg PFOS enjekte etmişlerdir. PFOS uygulamasının yumurta kırılma oranına herhangi bir etkisinin olmadığını tespit etmişler, ancak kontrol grubuna oranla PFOS'a maruz kalan yumurtalardan çıkan civcivlerin sağ kanatlarının daha kısa olduğu gözlenmiştir. İmmünoglobulin titresinde de anlamlı derece düşüş olduğu tespit edilmiştir. PFOS uygulanan tüm gruplarda beyin asimetrisi gözlenmiştir. Bu çalışma sonucunda PFOS'a in ovo olarak maruz kalmanın immünolojik, morfolojik ve nörolojik etkileri olduğunu göstermiştir.

Starkov ve Wallace'ın (12) Sprague-Dawley sıçanlarının karaciğer hücrelerinden izole ettikleri ve yüksek dozda PFOS uygulanan mitokondrilerde membran geçirgenliğinin bozulduğunu ve PFOS'un mitokondride şişmeye neden olduğunu göstermişlerdir. PFOS 3 farklı mekanizma ile mitokondri fonksiyonunda in vitro bozukluklara yol açarlar. Bunlar, mitokondriyal solunumu bozarlar, membran permeabilitesini artırırlar, kalsiyum indüksiyonuna bağlı olarak mitokondrilerin şişmesine neden olurlar (11, 70). Mitokondriyal membran geçirgenliğindeki artış mitokondrilerin fonksiyon kaybındaki en önemli neden olarak görülmektedir (11, 12). Membran permeabilitesinin bozulması mitokondri iç membranının 1.5 kD'dan daha büyük maddelere karşı da geçirgen olmasına neden olmaktadır. Mitokondrinin iç ve dış ortamın eşitlenmesi için maddelerin mitokondri içine giriş-çıkışı söz konusu olacak ve mitokondrilerde şişme ve sitokrom-c gibi apoptotik faktörlerin mitokondri dışına salınımı olacaktır ve dolayısıyla apoptoz ile sonuçlanacaktır (71).

PFOS ile ilgili yukarıda bahsedilen çalışmaların yanı sıra perflorin bileşiklerinin diğer bir üyesi olan PFOA ile yapılan çalışmalardan Panaretakis ve ark. (11)'ları HepG2 hücrelerine 200 ve 400 µM PFOA uygulayarak 24 saat içerisinde oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) ile mitokondri transmembran potansiyelini değerlendirmişlerdir. Ayrıca 5 ve 17. saatlerde kaspaz-9 aktivasyonunu western blot yöntemi ile ölçerek apoptotik etkisini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda PFOA'nın doza ve zamana bağlı olarak apoptozu indüklediğini göstermişlerdir.

Benzer şekilde Shabalina ve ark. (130) HepG2 hücre hattına 200 µM, 250 µM, 300 µM, 350 µM, 400 µM, 450 µM ve 500 µM PFOA uygulayarak DNA fragmantasyon analizi, hücre siklus analizi, TUNEL yöntemleri ile elektron mikroskopisi yaparak hücrelerin morfolojik görünümünü değerlendirmişler ve

PFOA'nın apoptozu indüklediğini göstermişlerdir. Shabalina ve ark. (130) PFOA'nın doz ve zamana bağlı olarak apoptozu indüklediğini belirlemişler ve 450 µM PFOA'ya maruz kalan hücrelerde, 200 µM'a oranla apoptotik etkinin arttığını göstermişlerdir. Bu çalışmada da bizim çalışmamızda olduğu gibi doza bağlı olarak PFOA'ya maruz kalan hücrelerde apoptotik etkinin arttığı görülmektedir.

Gruge ve ark. (131) 21 gün boyunca günde 5 farklı konsantrasyonda (1, 3, 5, 10, veya 15 mg/kg) PFOA'yı gavajla erkek sıçanlara vermişler ve 21. gün sonunda sıçanların karaciğerlerinden total RNA izolasyonu yapmışlardır. Affymetrix sıçan gen çipi kullanarak yaptıkları mikroarray çalışması sonucunda 31.042 genden 108 genin kontrole oranla ekspresyonunun arttığını tespit etmişlerdir. Ekspresyonu indüklenen genler arasında başta apoptoz ile ilgili genler olmak üzere yağ asitleri, lipid metabolizması ve transportunda görev alan proteinleri kodlayan genler, hücre iletişimi, adezyon, büyüme, hormon düzenleyici, proteolizis, sinyal iletimi gibi yollarda görev alan proteinleri kodlayan genler bulunmaktadır.

Yao ve ark. (132) tarafından yapılan çalışmada ise HepG2 hücrelerinde PFOA'nın genotoksik potansiyeli tek hücre jel elektroforezi (single cell gel electrophoresis (SCGE)) ve mikronükleus (MN) testleri kullanılarak tespit edilmiştir. 50–400 µM PFOA'ya maruz kalan hücrelerde DNA kırıklarının arttığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak; PFOS uygulanan hücrelerde apoptotik gen ekspresyonunun doza ve zamana bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışma, perflorooktan sülfonatın insan embriyonel hücrelerindeki apoptotik etkisini inceleyen ilk çalışma olması nedeniyle bu konu ile ilgili yapılacak diğer araştırmalara yol gösterici olacaktır.

Hücrelerin davranış biçimlerinin hücre kültürü ortamında farklı, organizmalarda ise ait oldukları dokuda daha farklıdır. Bu gerçekten hareketle, araştırmalarda kullanılan deneysel modellerin, hücre kültürü modellerinden hayvan modellerine doğru kayması, PFOS'un apoptozu olan etkilerinin aydınlatılmasında daha net yanıtlar bulunmasını sağlayacaktır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

PFOS'un potansiyel toksisitesi henüz çok iyi karakterize edilememiş ve hatta toksik etkilerinin altında yatan moleküler mekanizma ile ilgilide çok az şey bilinmektedir. PFOS'un mitokondrial membran permeabilitesini değiştirmesi potansiyel toksisite mekanizması olarak kabul edilmektedir. Yaptığımız bu çalışma, PFOS'un toksisitesinin altında yatan apoptotik moleküler mekanizmaya ışık tutmaktadır. Ayrıca çalışmamızda in-vitro ortamda fetüse ait hücreler kullanılarak gebelik döneminde PFOS'a maruz kalma durumunda plasenta bariyerini aşarak fetal dolaşıma girdiği bilinen PFOS'un fetüs üzerindeki olası etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen bulgular, PFOS'un embriyonel orjinli hücre serilerinde apoptozu indükleyebileceğini göstermektedir.

Bu çalışmanın in-vitro ortamda insan fetüsüne ait hücreler kullanılarak PFOS'un fetüs üzerindeki olası etkilerinin araştırılması ile ilgili yapılan ilk çalışma olması nedeni ile de yapılacak bundan sonraki çalışmalara da yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Olsen G, Burris JM, Mandel JH, Zobel LR.** Serum perfluorooctane sulfonate and hepatic and lipid clinical chemistry tests in fluorochemical production employees. *J Occup Environ Med*, **1999**; 41(9):799-806.
2. **Meesters RJ, Schröder HF.** Perfluorooctane sulfonate--a quite mobile anionic anthropogenic surfactant, ubiquitously found in the environment. *Water Sci Technol*, **2004**; 50(5):235-42.
3. 3M Reports "The Science of Organic Fluorochemistry" and "Perfluorooctane Sulfonate: Current Summary of Human Sera, Health and Toxicology Data", dated February 5 **1999**.
4. **Kannan K, Corsolini S, Falandysz J, Fillmann G, Kumar KS, Loganathan BG, Mohd MA, Olivero J, Van Wouwe N, Yang JH, Aldoust KM.** Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries. *Environ Sci Technol*, **2004**; 38(17):4489-95.
5. **Harada K, Saito N, Inoue K, Yoshinaga T, Watanabe T, Sasaki S, Kamiyama S, Koizumi A.** The influence of time, sex and geographic factors on levels of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in human serum over the last 25 years. *J Occup Health*, **2004**;46(2):141-7.
6. **Shaw S, Berger ML, Brenner D, Tao L, Wu Q, Kannan K.** Specific accumulation of perfluorochemicals in harbor seals (*Phoca vitulina concolor*) from the northwest Atlantic. *Chemosphere*, **2009**; 74(8):1037-43.
7. **Li X, Yeung LW, Taniyasu S, Li M, Zhang H, Liu D, Lam PK, Yamashita N, Dai J.** Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in the Amur tiger (*Panthera tigris altaica*) from China. *Environ Sci Technol*, **2008**; 42(19):7078-83.
8. **Seacat AM, Thomford PJ, Hansen KJ, Olsen GW, Case MT, Butenhoff JL.** Subchronic toxicity studies on perfluorooctanesulfonate potassium salt in cynomolgus monkeys. *Toxicol. Sci*, **2002**; 68(1): 249-264.
9. **Luebker DJ, Case MT, York RG, Moore JA, Hansen KJ, Butenhoff JL.** Two-generation reproduction and cross-foster studies of perfluorooctanesulfonate (PFOS) in rats. *Toxicology*, **2005**; 215(1-2):126-48.
10. **Chang SC, Thibodeaux JR, Eastvold ML, Ehresman DJ, Bjork JA, Froehlich JW, Lau CS, Singh RJ, Wallace KB, Butenhoff JL.** Negative bias from analog methods used in the analysis of free thyroxine in rat serum containing perfluorooctanesulfonate (PFOS). *Toxicology*, **2007**; 234(1-2):21-33.
11. **Panaretakis T, Shabalina IG, Grandér D, Shoshan MC, DePierre JW.** Reactive oxygen species and mitochondria mediate the induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells by the rodent peroxisome proliferator and hepatocarcinogen, perfluorooctanoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol*, **2001**; 173(1):56-64.
12. **Starkov AA, Wallace KB.** Structural determinants of fluorochemical-induced mitochondrial dysfunction. *Toxicol Sci*, **2002**; 66(2):244-52.
13. **Searle J, Kerr JF, Bishop CJ.** Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu*, **1982**; 2:229-59.
14. **Duke RC, Chervenak R, Cohen JJ.** Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: an early event in cellmediated cytolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1983**; 80 (20): 6361-6365.

15. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PFOS-2D-skeletal.png> (Erişim Tarihi: 10.12.2005).
16. Organisation for Economic Co-operation and Development. Hazard Assessment of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and its Salts. ENV/JM/RD(2002)17/FINAL.
17. **Kelly BC, Ikonomou MG, Blair JD, Surridge B, Hoover D, Grace R, Gobas FA.** Perfluoroalkyl contaminants in an Arctic marine food web: trophic magnification and wildlife exposure. *Environ Sci Technol*, **2009**; 43(11):4037-43.
18. 3M (2000). Sulfonated perfluorochemicals in the environment: sources, dispersion, fate and effects (AR226-0545). 3M Company, St Paul, MN. (In OECD 2002).
19. <http://www.fluoridealert.org/pesticides/pfos.uk.report.2004.pdf> erişim tarihi: 20.02.2009)
20. http://www.pops.int/documents/meetings/poprc/meeting_docs/en/POPRC1-INF9-c.pdf, erişim tarihi:20.02.2009)
21. 3M. Environmental and Health Assessment of Perfluorooctane Sulfonic Acid and its Salts. Prepared by 3M Company, with J Moore (Hollyhouse Inc.), J Rodericks and D Turnbull (Environ Corp.) and W Warren-Hicks and Colleagues (The Cadmus Group, Inc.). August 2003.
22. Kurume Laboratory. Final report, biodegradation test of salt (Na, K, Li) of perfluoroalkyl (C=4-12) sulphonic acid, test substance number K-1520 (test number 21520). Kurume Laboratory, Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan. (In OECD 2002)
23. RIKZ. Perfluoroalkylated Substances - Aquatic Environmental Assessment. RIKZ and University of Amsterdam. RIKZ/2002.043.
24. **Cahill TM, Mackay D.** Development of a multiple chemical species environmental fate model and its application to pentachlorophenol and perfluorooctane sulfonate. *J Am Chem Soc*, **2002**; 42 (2), 5-81.
25. **Schröder HF.** Determination of fluorinated surfactants and their metabolites in sewage sludge samples by liquid chromatography with mass spectrometry and tandem mass spectrometry after pressurised liquid extraction and separation on fluorine-modified reversed-phase sorbents. *J Chromatogr A*, **2003**; 1020(1):131-51.
26. **Taniyasu S, Kannan K, Horri Y, Yamashita N.** The first environmental survey of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related compounds in Japan. *Organohalogen compounds*, **2002**; (59) 311-314.
27. **Saito N, Sasaki K, Nakatome K, Harada K, Yoshinaga T, Koizumi A.** Perfluorooctane sulfonate concentrations in surface water in Japan. *Arch Environ Contam Toxicol*, **2003**; 45(2):149-58.
28. **Loos R, Gawlik BM, Locoro G, Rimaviciute E, Contini S, Bidoglio G.** EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ Pollut*, **2009**; 157(2):561-8.
29. **Plumlee MH, Larabee J, Reinhard M.** Perfluorochemicals in water reuse. *Chemosphere*, **2008**; 72(10):1541-7.
30. **Bossi R, Strand J, Sortkjaer O, Larsen MM.** Perfluoroalkyl compounds in Danish wastewater treatment plants and aquatic environments. *Environ Int*, **2008**; 34(4):443-50.
31. **Becker AM, Gerstmann S, Frank H.** Perfluorooctane surfactants in waste waters, the major source of river pollution. *Chemosphere*, **2008**; 72(1):115-21.

32. **Ericson I, Martí-Cid R, Nadal M, Van Bavel B, Lindström G, Domingo JL.** Human exposure to perfluorinated chemicals through the diet: intake of perfluorinated compounds in foods from the Catalan (Spain) market. *J Agric Food Chem*, **2008**; 56(5):1787-94.
33. **Johnson JD, Gibson SJ, Ober RE.** Cholestyramine-enhanced fecal elimination of carbon-14 in rats after administration of ammonium [14C]perfluorooctanoate or potassium [14C]perfluorooctanesulfonate. *Fundam Appl Toxicol*, **1984**; 4(6):972-6.
34. **Vestergren R, Cousins IT, Trudel D, Wormuth M, Scheringer M.** Estimating the contribution of precursor compounds in consumer exposure to PFOS and PFOA. *Chemosphere*, **2008**; 73(10):1617-24.
35. **Trudel D, Horowitz L, Wormuth M, Scheringer M, Cousins IT, Hungerbühler K.** Estimating consumer exposure to PFOS and PFOA. *Risk Anal*, **2008**; 28(2):251-69.
36. **Fromme H, Tittlemier SA, Völkel W, Wilhelm M, Twardella D.** Perfluorinated compounds - Exposure assessment for the general population in western countries. *Int J Hyg Environ Health*, **2009**; 212(3):239-70.
37. **Calafat AM, Needham LL, Kuklenyik Z, Reidy JA, Tully JS, Aguilar-Villalobos M, Naeher LP.** Perfluorinated chemicals in selected residents of the American continent. *Chemosphere*, **2006**; 63(3):490-6.
38. **Morikawa A, Kamei N, Harada K, Inoue K, Yoshinaga T, Saito N, Koizumi A.** The bioconcentration factor of perfluorooctane sulfonate is significantly larger than that of perfluorooctanoate in wild turtles (*Trachemys scripta elegans* and *Chinemys reevesii*): an Ai river ecological study in Japan. *Ecotoxicol Environ Saf*, **2006**; 65(1):14-21.
39. **Kannan K, Koistinen J, Beckmen K, Evans T, Gorzelany JF, Hansen KJ, Jones PD, Helle E, Nyman M, Giesy JP.** Accumulation of perfluorooctane sulfonate in marine mammals. *Environ Sci Technol*, **2001**; 35(8):1593-8.
40. **Adams J, Houde M, Muir D, Speakman T, Bossart G, Fair P.** Land use and the spatial distribution of perfluoroalkyl compounds as measured in the plasma of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Mar Environ Res*, **2008**; 66(4):430-7.
41. **Ahrens L, Siebert U, Ebinghaus R.** Total body burden and tissue distribution of polyfluorinated compounds in harbor seals (*Phoca vitulina*) from the German Bight. *Mar Pollut Bull*, **2008**; 58(4):520-5.
42. **Kannan K, Hansen KJ, Wade TL, Giesy JP.** Perfluorooctane sulfonate in oysters, *Crassostrea virginica*, from the Gulf of Mexico and the Chesapeake Bay, USA. *Arch Environ Contam Toxicol*, **2002**; 42(3):313-8.
43. **Taniyasu S, Kannan K, Horii Y, Hanari N, Yamashita N.** A survey of perfluorooctane sulfonate and related perfluorinated organic compounds in water, fish, birds, and humans from Japan. *Environ Sci Technol*, **2003**; 37(12):2634-9.
44. **Kannan K, Franson JC, Bowerman WW, Hansen KJ, Jones PD, Giesy JP.** Perfluorooctane sulfonate in fish-eating water birds including bald eagles and albatrosses. *Environ Sci Technol*, **2001**; 35(15):3065-70.
45. **Guruge KS, Manage PM, Yamanaka N, Miyazaki S, Taniyasu S, Yamashita N.** Species-specific concentrations of perfluoroalkyl contaminants in farm and pet animals in Japan. *Chemosphere*, **2008**; 73(1):210-5.
46. **Jin Y, Saito N, Harada KH, Inoue K, Koizumi A.** Historical trends in human serum levels of perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate in Shenyang, China. *Tohoku J Exp Med*, **2007**; 212(1):63-70.

47. **Olsen GW, Logan PW, Hansen KJ, Simpson CA, Burris JM, Burlew MM, Vorarath PP, Venkateswarlu P, Schumpert JC, Mandel JH.** An occupational exposure assessment of a perfluorooctanesulfonyl fluoride production site: biomonitoring. *AIHA J*, **2003**; 64(5):651-9.
48. **Apelberg BJ, Witter FR, Herbstman JB, Calafat AM, Halden RU, Needham LL, Goldman LR.** Cord serum concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in relation to weight and size at birth. *Environ Health Perspect*, **2007**; 115(11):1670-6.
49. **Inoue K, Okada F, Ito R, Kato S, Sasaki S, Nakajima S, Uno A, Saijo Y, Sata F, Yoshimura Y, Kishi R, Nakazawa H.** Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy. *Environ Health Perspect*, **2004**; 112(11):1204-7.
50. **Midasch O, Drexler H, Hart N, Beckmann MW, Angerer J.** Transplacental exposure of neonates to perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate: a pilot study. *Int Arch Occup Environ Health*, **2007**; 80(7):643-8.
51. **Tao L, Kannan K, Wong CM, Arcaro KF, Butenhoff JL.** Perfluorinated compounds in human milk from Massachusetts, U.S.A. *Environ Sci Technol*, **2008**; 42(8):3096-101.
52. **Völkel W, Genzel-Boroviczeny O, Demmelmair H, Gebauer C, Koletzko B, Twardella D, Raab U, Fromme H.** Perfluorooctane sulphonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in human breast milk: results of a pilot study. *Int J Hyg Environ Health*, **2008**; 211(3-4):440-6.
53. **Burris JM, Lundberg JK, Olsen GW, Simpson C, Mandel JH.** Determination of Serum Half-lives of Several Fluorochemicals. US EPA Docket AR-226-1086. **2002**; 3M Company, St. Paul, MN, USA/US EPA, Washington, DC.
54. **Olsen GW, Church TR, Miller JP, Burris JM, Hansen KJ, Lundberg JK, Armitage JB, Herron RM, Medhdizadehkashi Z, Nobiletti JB, O'Neill EM, Mandel JH, Zobel LR.** Perfluorooctanesulfonate and other fluorochemicals in the serum of American Red Cross adult blood donors. *Environ Health Perspect*, **2003**; 111(16):1892-901.
55. **Alexander BH, Olsen GW, Burris JM, Mandel JH, Mandel JS.** Mortality of employees of a perfluorooctanesulphonyl fluoride manufacturing facility. *Occup Environ Med*, **2003**; 60(10):722-9.
56. **Fei C, McLaughlin JK, Lipworth L, Olsen J.** Maternal levels of perfluorinated chemicals and subfecundity. *Hum Reprod*, **2009**; 1(1):1-6.
57. **Goldenthal EI, Jessup DC, Geil RG, Mehring JS** Ninety-day Subacute Rhesus Monkey Toxicity Study. *Int Res Dev Corp*, **1979**; 137: 1378-1500.
58. **Cui L, Zhou QF, Liao CY, Fu JJ, Jiang GB.** Studies on the toxicological effects of PFOA and PFOS on rats using histological observation and chemical analysis. *Arch Environ Contam Toxicol*, **2009**; 56(2):338-49.
59. **Austin ME, Kasturi BS, Barber M, Kannan K, MohanKumar PS, MohanKumar SM.** Neuroendocrine effects of perfluorooctane sulfonate in rats. *Environ Health Perspect*, **2003**; 111(12):1485-9.
60. **Johansson N, Fredriksson A, Eriksson P.** Neonatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) causes neurobehavioural defects in adult mice. *Neurotoxicology*, **2008**; 29(1):160-9.
61. **Zheng L, Dong GH, Jin YH, He QC.** Immunotoxic changes associated with a 7-day oral exposure to perfluorooctanesulfonate (PFOS) in adult male C57BL/6 mice. *Arch Toxicol*, **2009**; 83(7):679-89.

62. **Grasty RC, Wolf DC, Grey BE, Lau CS, Rogers JM.** Prenatal window of susceptibility to perfluorooctane sulfonate-induced neonatal mortality in the Sprague-Dawley rat. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, **2003**; 68(6):465-71.
63. **Lau C, Thibodeaux JR, Hanson RG, Rogers JM, Grey BE, Stanton ME, Butenhoff JL, Stevenson LA.** Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. II: postnatal evaluation. *Toxicol Sci*, **2003** Aug;74(2):382-92.
64. **Thibodeaux JR, Hanson RG, Rogers JM, Grey BE, Barbee BD, Richards JH, Butenhoff JL, Stevenson LA, Lau C.** Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. I: maternal and prenatal evaluations. *Toxicol Sci*, **2003**; 74(2):369-81.
65. **Case MT, York RG, Christian MS.** Rat and rabbit oral developmental toxicology studies with two perfluorinated compounds. *Int J Toxicol*, **2001**; 20(2):101-9.
66. **Fuentes S, Colomina MT, Vicens P, Franco-Pons N, Domingo JL.** Concurrent exposure to perfluorooctane sulfonate and restraint stress during pregnancy in mice: effects on postnatal development and behavior of the offspring. *Toxicol Sci*, **2007**; 98(2):589-98.
67. **Berthiaume J, Wallace KB.** Perfluorooctanoate, perfluorooctanesulfonate, and N-ethyl perfluorooctanesulfonamido ethanol; peroxisome proliferation and mitochondrial biogenesis. *Toxicol Lett*, **2002**; 129(1-2):23-32.
68. **Haugom B, Spydevold O.** The mechanism underlying the hypolipemic effect of perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluorooctane sulphonic acid (PFOSA) and clofibrilic acid. *Biochim Biophys Acta*, **1992**; 1128(1):65-72.
69. **Hu W, Jones PD, DeCoen W, King L, Fraker P, Newsted J, Giesy JP.** Alterations in cell membrane properties caused by perfluorinated compounds. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **2003**; 135(1):77-88.
70. **Keller BJ, Marsman DS, Popp JA, Thurman RG.** Several nongenotoxic carcinogens uncouple mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, **1992**; 1102(2):237-44.
71. **Kroemer G, Reed JC.** Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*, **2000**; 6(5):513-9.
72. **Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **1972**; 26: 239-57.
73. **Wyllie AH.** Glucocorticoid induces in thymocytes a nuclease-like activity associated with the chromatin condensation of apoptosis. *Nature*, **1980**; 284: 555-556.
74. **Cohen JJ., Duke RC.** Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol*, **1984**; 132: 38-42.
75. http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu (Erişim Tarihi: 18.06.2009).
76. **Öztürk F.** Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **2002**; 9(2):143-148.
77. **Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA.** Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med*, **1999**; 107 (5): 489-506.
78. **Askew DS, Ashmun RA, Simmons BC, Cleveland JL.** Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene*, **1991**; 6(10): 1915-22.

79. **Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters C, Penn LS, Hancock DC.** Induction of apoptosis in fibroblasts by *c-myc* protein. *Cell*, **1992**; 69 (1): 119–125.
80. **Liu G, Baskaran R., Lea-Chou ET, Wood LD, Chen Y, Karin M, Wang JY.** Three distinct signalling responses by murine fibroblasts to genotoxic stress. *Nature*, **1996**; 384 (6606): 273–276.
81. **El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, Wilman KG, Mercer WE, Kastan MB, Kohn KW, Elledge SJ, K.W. Kinzler KW, Vogelstein B.** WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res*, **1994**; 54 (5): 1169-1174.
82. **Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR.** Direct Activation of Bax by p53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis. *Science*, **2004**; 303(5660):1010-1014.
83. **Itoh K, Hase H, Kojima H, Saotome K, Nishioka K, Kobata T.** Central role of mitochondria and p53 in Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology*, **2004**; 43(3):277-285.
84. **Finnberg N, Gruber JJ, Fei P, Rudolph D, Bric A, Kim SH, Burns TF, Ajuha H, Page R, Wu GS, Chen Y, McKenna WG, Bernhard E, Lowe S, Mak T, El-Deiry WS.** DR5 Knockout Mice Are Compromised in Radiation-Induced Apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **2005**; 25:2000-2013.
85. **Chao DT, Korsmeyer SJ.** BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*, **1998**; 16:395-419.
86. **Park DS, Stefanis L, Greene LA.** Ordering the Multiple Pathways of Apoptosis. *Trends Cardiovasc Med*, **1997**; 7: 294-301.
87. **Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G.** The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*, **2003**; 14(3-4):193-209.
88. **Wallach D, Boldin M, Varfolomeev E, Beyaert R, Vandenabeele P, Fiers W.** Cell death induction by receptors of the TNF family: Towards a Molecular understanding. *FEBS Lett*, **1997**; 410 (1): 96-106.
89. **Nagata S, Golstein P.** The Fas death factor. *Science*, **1995**; 267: 1449-56.
90. **Zamzami N., Kroemer, G.** The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2001**; 2 (1):67–71.
91. **Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G.** Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, **2006**; 13(9):1423-33.
92. **Martinou JC, Green DR.** Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**; 2 (1):63–67.
93. **Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC.** Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem*, **2001**; 276 (15):11615–11623.
94. **Cain K.** Chemical-induced apoptosis: formation of the Apaf-1 apoptosome. *Drug Metab Rev*, **2003**; 35(4):337-63.
95. **Zou H, Wieser R, Massagué J, Niswander L.** Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev*, **1997**; 11(17):2191-203.

96. **Adams JM, Cory S.** Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, **2002**; 14(6):715-20.
97. **Anichini A, Mortarini R, Sensi M, Zanon M.** APAF-1 signaling in human melanoma. *Cancer Lett.* **2006**; 238(2):168-79.
98. **Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW.** Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding and activation. *Mol Cell*, **2002**; 9: 423–432.
99. **Campioni M, Santini D, Tonini G, Murace R, Dragonetti E, Spugnini EP, Baldi A.** Role of Apaf-1, a key regulator of apoptosis, in melanoma progression and chemoresistance. *Exp Dermatol*, **2005**; 14(11):811-8.
100. **Rao RV, Hermel E, Obregon SC, Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE.** Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program mechanism of caspase activation. *J Biol Chem*, **2001**; 276(36):33869–33874.
101. **Kumar S.** Caspases and their many biological functions. *Cell Death Differ*, **2007**; 14 (1):1–2.
102. **Boatright KM, Salvesen GS.** Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, **2003**; 15(6):725-31.
103. **Bao Q, Shi Y.** Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ*, **2007**; 14(1):56-65.
104. **Grütter MG.** Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol*, **2000**; 10(6):649-55.
105. **Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES.** CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem*, **1994**; 269(49):30761-4.
106. **Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM.** Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell*, **1995**; 81(5):801-9.
107. **Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES.** In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1996**; 93(15):7464-9.
108. **Kumar S, Lavin MF.** The ICE family of cysteine proteases as effectors of cell death. *Cell Death Differ*, **1996**; 3(3):255-67.
109. **Tomatır AG.** Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *T Klin Tıp Bilim*, **2003**; 23:499-508.
110. **Turgut B, Demir T, Çeliker U.** Oftalmolojide Apoptoz. *Fırat Tıp Dergisi* **2006**; 11(1): 6-11.
111. **Kelten B.** Bir Safra Asidi Olan Tauroursodeoxycholic Acid'in Nöroprotektif Etkilerinin Deneysel Spinal Kord Travması Modelinde İncelenmesi. Uzmanlık tezi, Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği, İstanbul, **2005**.
112. **Tiftik RN.** Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre kültüründe Rho/Rho-kinaz yolağı ve nitrik oksid ilişkisi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı, Mersin, **2005**.
113. http://www.steteskop.net/Tibbi_Makale-file-print-sid-444.html erişim tarihi: 07.09.09.

114. **Chomczynski P, Sacchi N.** Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*, **1987**; 162(1):156-159.
115. **Farrell RE.** RNA Methodologies. 3. Edition. Penn State University. U.S.A. Academic Press. **2005**; 47-64.
116. **Baltimore, D.** Viral RNA-dependent DNA polymerase. *Nature*, **1999**; 226 : 1209-11.
117. **Temin, H. M. and S. Mizutani.** RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous carcinoma virus. *Nature*, **1970**; 226 (5252):1211-1213.
118. **Gunel T.** Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, **2007**; 27:763-767.
119. <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Pierce/realtimepcr.htm>
Erişim Tarihi: 07.09.2009.
120. **Hu XZ, Hu DC.** Effects of perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate exposure on hepatoma Hep G2 cells. *Arch Toxicol*. **2009**; 83(9):851-61.
121. **Liu C, Yu K, Shi X, Wang J, Lam PK, Wu RS, Zhou B.** Induction of oxidative stress and apoptosis by PFOS and PFOA in primary cultured hepatocytes of freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquat Toxicol*, **2007**; 82(2):135-43.
122. **Watanabe MX, Jones SP, Iwata H, Kim EY, Kennedy SW.** Effects of co-exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and perfluorooctane sulfonate or perfluorooctanoic acid on expression of cytochrome P450 isoforms in chicken (*Gallus gallus*) embryo hepatocyte cultures. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **2009**; 149(4):605-12.
123. **Krovel AV, Softeland L, Torstensen B, Olsvik PA.** Transcriptional effects of PFOS in isolated hepatocytes from Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. **2008**; 148(1):14-22.
124. **Cwinn MA, Jones SP, Kennedy SW.** Exposure to perfluorooctane sulfonate or fenofibrate causes PPAR-alpha dependent transcriptional responses in chicken embryo hepatocytes. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. **2008**; 148(2):165-71.
125. **Pinkas A, Slotkin TA, Brick-Turin Y, Van der Zee EA, Yanai J.** Neurobehavioral teratogenicity of perfluorinated alkyls in an avian model. *Neurotoxicol Teratol*. **2010**; 32(2):182-6.
126. **Butenhoff JL, Ehresman DJ, Chang SC, Parker GA, Stump DG.** Gestational and lactational exposure to potassium perfluorooctanesulfonate (K+PFOS) in rats: developmental neurotoxicity. *Reprod Toxicol*. **2009**; 27(3-4):319-30.
127. **Shi X, Du Y, Lam PK, Wu RS, Zhou B.** Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryos exposed to PFOS. *Toxicol Appl Pharmacol*. **2008**; 230(1):23-32.
128. **Shi X, Yeung LW, Lam PK, Wu RS, Zhou B.** Protein profiles in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to perfluorooctane sulfonate. *Toxicol Sci*. **2009**; 110(2):334-40.
129. **Peden-Adams MM, Stuckey JE, Gaworecki KM, Berger-Ritchie J, Bryant K, Jodice PG, Scott TR, Ferrario JB, Guan B, Vigo C, Boone JS, McGuinn WD, DeWitt JC, Keil DE.** Developmental toxicity in white leghorn chickens following in ovo exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS). *Reprod Toxicol*, **2009**; 27(3-4):307-18.

130. **Shabalina IG, Panaretakis T, Bergstrand A, DePierre JW.** Effects of the rodent peroxisome proliferator and hepatocarcinogen, perfluorooctanoic acid, on apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Carcinogenesis*, **1999**; 20(12):2237-46.
131. **Guruge KS, Yeung LW, Yamanaka N, Miyazaki S, Lam PK, Giesy JP, Jones PD, Yamashita N.** Gene expression profiles in rat liver treated with perfluorooctanoic acid (PFOA). *Toxicol Sci*, **2006**; 89(1):93-107.
132. **Yao X, Zhong L.** Genotoxic risk and oxidative DNA damage in HepG2 cells exposed to perfluorooctanoic acid. *Mutat Res*, **2005**; 587(1-2):38-44.

ÖZGEÇMİŞ

01.02.1979 yılında Gaziantep'te doğdu. İlkokulu Ahmet Çelebi ilkokulunda, Ortaokulu Atatürk Lisesi'nde ve Liseyi Gaziantep Lisesi'nde tamamladı. Lisans eğitimini 1997-2001 yılları arasında Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde tamamladı. 2001 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda lisansüstü eğitimine başladı. 2002 yılında araştırma görevlisi kadrosuna atandı. 2004 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimini tamamlayıp doktora başladı. 2009 yılında Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Öğretim görevlisi kadrosuna geçti. Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine devam etmektedir.

Evli ve bir çocuk annesidir.