

**PERFLOROOKTAN SÜLFONAT VE KURKUMİN
BİLEŞİKLERİNİN SIÇAN KARACİĞER VE KAN
DOKULARINDA GENOTOKSİK VE APOPTOTİK
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

DİLEK EKE

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

**MERSİN
TEMMUZ – 2013**

**PERFLOROOKTAN SÜLFONAT VE KURKUMİN
BİLEŞİKLERİNİN SIÇAN KARACİĞER VE KAN
DOKULARINDA GENOTOKSİK VE APOPTOTİK
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

DİLEK EKE

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

**Danışman
Prof. Dr. AYL A ÇELİK**

**MERSİN
TEMMUZ – 2013**

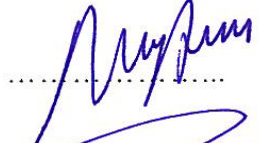
Dilek EKE tarafından Prof. Dr. Ayla ÇELİK danışmanlığında ve Prof. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ eş danışmanlığında hazırlanan “Perflorooktan Sülfonat ve Kurkumin Bileşiklerinin Sıçan Karaciğer ve Kan Dokularında Genotoksik ve Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Ayla ÇELİK



Prof. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ



Prof. Dr. Serap YALIN



Prof. Dr. Davut ALPTEKİN



Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20...108 Adı tarih ve 2013...15.../444... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Doç. Dr. Mehmet KÜÇÜKASLAN
Enstitü Müdürü



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

PERFLOROOKTAN SÜLFONAT VE KURKUMİN BİLEŞİKLERİNİN SIÇAN KARACİĞER VE KAN DOKULARINDA GENOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Dilek EKE

ÖZ

Canlılar yaşam boyu çevredeki kimyasallarla etkileşim halindedir. Bu kimyasallardan bazıları kalıcıdır ve kronik maruziyet oluşturan bu kimyasallar, canlılarda bazı sağlık etkilerine sebep olurlar. Hem doğal olarak bulunan hem de insan yapımı olan bu kimyasalların izlerine; havadan, sudan yiyeceklerden ve tüketim mallarından gelen maruziyet sonucu; dokularda ve vücut sıvılarında rastlanır. Bu çalışmada, bu kimyasallardan ikisi olan perflorooktan sülfonat (PFOS) ve kurkumin değerlendirilmiştir. FOS, perflorooktanil sülfonat bileşikleri ailesinin bir üyesidir. Kıyafet, döşeme, halı yiyecek ve paketlemeninde içinde bulunduğu ticari, endüstriyel ve diğer tüketim mallarında geniş çapta kullanılmaktadır. Zerdeçal(hintsafranı) bitkisinden elde edilen kurkumin, yüzyıllardır hindistanda baharat olarak kullanılmaktadır. geleneksel olarak bölge halkı kurkumini yemeklerine lezzet katsın diye eklemektedir ancak birçok kültür onun tıbbi faydalarının farkındadır. Kurkuminin sürekli artan popülaritesiyle birlikte faydalarında tastiklenmiş oluyor. Bu çalışma için ellidört tane sıçan dokuz guruba ayrıldı. Kimyasal maruziyetinin sonunda; kan ve karaciğer hücrelerindeki toksik hasar; mikronukleus, komet ve kantitatif gen ekspresyonu (kaspaz 3 ve kaspaz 8) testleri ile değerlendirilmiştir. Kan ve karaciğer hücrelerinde; komet testi ile değerlendirilen DNA kırıkları, mikronukleus sıklığı ve kaspaz 3 kaspaz 8 genlerindeki ekspresyon, kontrol gurubuna kıyasla artmıştır. Kurkuminin varlığı, PFOS ın toksisitesine karşı koruyucu etki göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: PFOS, Kurkumin, Mikronukleus, Komet, Gen ekspresyonu
Danışman: Prof. Dr. Ayla ÇELİK, Biyoloji Bölümü, Mersin Üniversitesi
Yardımcı danışman: Prof. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ, Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı, Mersin Üniversitesi

INVESTIGATION OF GENOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF PERFLUOROOCTAN SULFONATE AND CURCUMIN COMPOUNDS IN RAT LIVER AND BLOOD TISSUES

DİLEK EKE

ABSTRACT

Alive beings are affected by chemicals in the environment. Some chemicals are persistent in the environment and the chronic exposure to these chemicals leads to some health consequences in alive. Traces of a large variety of both natural and man-made compounds can be found in the tissues and body fluids as a result of exposure to these compounds in air, soil, water, food, and consumer products. In this study two of these chemicals, Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and curcumin, were evaluated. PFOS is a member of a large family of perfluorooctanyl sulfonate chemicals. These chemicals have been used in a variety of industrial, commercial and consumer products; clothing fabrics, carpets, and food packaging. Curcumin comes from the Turmeric plant and has been in India as a spice for centuries. Traditionally, people used curcumin to add flavour to their dishes, with many cultures recognizing the spice for its many medicinal properties. As the use of curcumin continues to grow in popularity, so does the acknowledgement of its many benefits. For investigation fiftyfour rats were divided into nine groups. At the end of the experimental period, toxic damage in blood and liver cell was assessed by micronucleus, comet and quantitative gene expression (caspas 3 and caspas 8) assays. DNA breaks (evaluated by comet assay), frequency of micronuclei and Caspas 3 and Caspas 8 gene expressions were significantly increased in peripheral blood and liver cell of rats when compared with control. Curcumin exerts protective effect against PFOS toxicity.

Key Words: PFOS, Curcumin, Micronucleus, Comet, Gene expression
Advisor: Prof. Dr. Ayla ÇELİK Department of Biology, Mersin University
Co-advisor: Prof. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ Department of Medical biology and genethics, Mersin University

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin başından doktora tezimin sonuna kadar değerli bilgileriyle beni yönlendiren, her zaman başarı için motive eden ve gerek akademik gerek sosyal yaşamım boyunca bıraktığı etkiyi her zaman hissedeceğim danışman hocam sayın Prof. Dr. Ayla ÇELİK'e teşekkürler.

Çalışmamın Tez İzleme Kurulunda yer alan ve değerli katkılarıyla tezimi yönlendiren sayın Prof. Dr. Serap YALIN ve sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN'e teşekkürler.

Biyoloji bölüm başkanı sayın Prof. Dr. Gökhan CORAL'a teşekkürler.

Ko-danışman hocam sayın Prof. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ'e teşekkürler.

Çukurova üniversitesi değerli hocalarından Prof. Dr. Davut ALPTEKİN ve Yrd. Doç. Dr. M.Bertan YILMAZ'a teşekkürler

Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı Hocalarından Prof. Dr. Arzu KANIK ve Prof. Dr. Bahar TAŞDELEN'e teşekkürler.

Labaratuar çalışmalarında desteklerini esirgemeyen bölüm arkadaşlarım Seda YILDIRIM, Seda EKINCI ve Arş. Görv. Serpil KÖNEN ADIGÜZEL'e teşekkürler.

Hayatımın her aşamasında, varlıklarıyla bana güç veren ve bu günlere gelmemde en büyük emeğe sahip olan anneannem ve rahmetli dedem başta olmak üzere çok sevdiğim aileme sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	2
2.1. PERFLOROOKTAN SÜLFONAT (PFOS)	2
2.1.1. Yapısı.....	2
2.1.2. Kullanım Alanları.....	4
2.1.2.1. Metal kaplama.....	4
2.1.2.2. Fotoğrafçılık	4
2.1.2.3. Uçak sanayisi	5
2.1.2.4. Yangın söndürücüler.....	5
2.1.2.5. Dokuma sanayi.....	5
2.1.2.6. Kağıt sanayi	6
2.1.2.7. Endüstriyel ürünler, kişisel bakım ve temizlik ürünleri	6
2.1.2.8. Pestisitler.....	6
2.1.3. Biyoakümülyasyonu.....	6
2.1.4. Çevresel konsantrasyonu	10
2.1.5. Vücuttan atılımı	11
2.1.6. PFOS toksisitesi	11

2.2. KURKUMİN	18
2.2.1. Kimyasal Özellikleri.....	19
2.2.2. Biyosentezi.....	20
2.2.3. Kurkuminin Doğal Kaynakları.....	20
2.2.4. Medikal Kullanımı.....	20
2.2.5. Antikarsinojenik Etkisi.....	26
2.2.6. Potansiyel Riskleri	29
2.2.7. Kurkuminin Genotoksik Ve Apoptotik Etkileri	30
2.3.SIÇANLAR	31
2.3.1. Davranış.....	32
2.3.2. Çevre Ve Vücut Isısı	34
2.3.3. Işık.....	34
2.3.4. Dolaşım.....	34
2.3.5. Hematoloji.....	34
2.3.6. Karaciğer	38
2.3.7. Solunum.....	41
2.3.8. Sindirim Sistemi.....	41
2.4. APOPTOZ	43
2.4.1. Apoptozda Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 in Yeri ve Önemi.....	48
2.4.2. Apoptoz Mekanizmaları.....	50
2.4.2.1. Mitokondri/sitokrom-c aracılı apoptoz oluşturulması	51
2.4.2.2. Dış sinyallerle apoptozun tetiklenmesi	53
2.4.3. Apoptozun Genetik Kontrolü.....	56
2.4.3.1. Antiapoptotik proteinler.....	56
2.4.3.2. Proapoptotik proteinler	58

2.4.4. Apoptozda Hücre İçi Sinyal İletimi Ve Metabolik Değişiklikler	60
2.6.5. Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler	61
2.4.6. Apoptoz Ve Nekroz Arasındaki Farklar	62
2.4.7. Fagositoz	64
2.4.8. Apoptozisin Görüldüğü Olaylar	65
2.4.8.1. Fizyolojik olaylar	65
2.4.8.2. Patolojik Olaylar	66
2.4.9. Apoptozun İnhibisyonu İle İlişkili Hastalıklar	68
2.4.10 Apoptozun Aktivasyonu İle İlişkili Hastalıklar	68
2.4.11. Apoptozun Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	68

3. MATERYAL VE YÖNTEM..... 68

3.1. YÖNTEMLER HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....68

3.1.1. Mikronukleus (MN)	68
3.1.2. Komet (Tek Hücre Jel Elektroforezi).....	74
3.1.3. Apoptozun Belirlenmesi (Kantitatif Gen Ekspresyonu (Kaspaz-3 Ve 8) Yöntemi).....	84
3.1.3.1. RNA İzolasyonu (Trizol Metodu)	84
3.1.3.2. Real Time PCR.....	87

3.2.YÖNTEMLER

3.2.1. Mikronukleus(MN) Test.....	93
3.2.1.1. Kullanılan Kimyasal Ve Çözeltiler.....	93
3.2.1.2. Karaciğer için MN testi.....	94
3.2.1.3. Kan dokusunda MN.....	95
3.2.2. Komet Testi	95

3.2.2.1. Kullanılan kimyasal ve çözeltiler	95
3.2.2.2. Komet in uygulanması.....	98
3.2.3. Kantitatif Gen Ekspresyonu (Kaspaz 3 Ve 8)	98
3.2.3.1. Gerekli Kimyasal Malzemeler	98
3.2.3.2. Trizol ile karaciğer dokusunan RNA izolasyonu.....	99
3.2.3.3. RNA'dan cDNA elde edilmesi	99
3.2.3.4. Real time (RT) PCR işlemleri	101
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	102
4.1. BULGULAR.....	102
4.1.1. Kanda Yapılan MN Testi Sonucu.....	102
4.1.2. Karaciğer İçin MN Testi Sonucu	105
4.1.3. Kan Hücrelerinde Yapılan Komet Analizinde Hasarlı Hücre Yüzdesi (HHY) Sonucu.....	108
4.1.4. Kanda Yapılan Komet Analizinde Genetik Hasar İndeksi (GHI) Sonuçları..	110
4.1.5. Karaciğerde Yapılan Komet Analizine Göre Hasarlı Hücre Yüzdesi (HHY) Sonuçları	112
4.1.6. Karaciğerde Yapılan Komet Analizine Göre Genetik Hasar İndeksi (GHI) Sonuçları	114
4.1.7. Kantitatif Gen Ekspresyonu Sonuçları	116
4.2. TARTIŞMA.....	120
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	134
KAYNAKLAR.....	136
ÖZGEÇMİŞ.....	166

ÇİZELGELER DİZİNİ

sayfa no

Çizelge 2.1. PFOS'un fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	2
Çizelge 2.2. Çeşitli hayvan gruplarındaki PFOS miktarları.....	10
Çizelge 2.3. Kurkuminin kimyasal özellikleri.....	20
Çizelge 2.4. Kurkuminin hücrede etkilediği moleküller	27
Çizelge 2.5. Sıçanlara ait bazı fizyolojik değerler.....	42
Çizelge 2.6. Apoptozu tetikleyen hücre içi ve dışı ajanlar.	45
Çizelge 2.7 İnsan kaspaz ailesi	47
Çizelge 3.1. cDNA elde etmek için kullanılan master mix içeri.....	100
Çizelge 3.2. cDNA elde etmek için uygulanan sıcaklık-zaman koşulları.	101
Çizelge 3.3. RT PCR için master mix içeriği.....	101
Çizelge 4.1. PFOS ve kurkumin uygulanmış sıçanların kan dokusu polikromatik hücrelerinde mikronukleus frekans.....	103
Çizelge. 4.2. Sıçan karaciğer hücrelerinde MN sonuçları	106
Çizelge 4.3. Kanda yapılan Komet testinde HHY nin ortalaması ve standart sapması.....	109
Çizelge 4.4. Kanda yapılan komet testine göre genetik hasar indeksi (GHI) nin gruplara.....	110
Çizelge 4.5. Karaciğerde yapılan Komet Analizine Göre HHY nin ortalaması ve standart sapması.....	112
Çizelge 4.6. Karaciğerde yapılan komet analizine göre genetik hasar indeksi(GHI) nin gruplara göre dağılımı	114
Çizelge 4.7. Karaciğer hücrelerinden elde edilen kaspaz 3 geninin ekspresyon miktarının dozlara göre değişimi.....	117
Çizelge 4.8. Karaciğer hücrelerinden elde edilen kaspaz 8 geninin ekspresyon miktarının dozlara göre değişimi.....	118

ŞEKİLLER DİZİNİ

sayfa no

Şekil 2.1. PFOS ve türevlerinin yapısal formülleri	3
Şekil 2.2. Hastanelerde ve üniversitelerde gönüllü kan bağışçılarının kanlarında yapılan ölçümlerde elde edilen PFOS verileri	9
Şekil 2.3. Kurkuminin enol ve keto formları.....	18
Şekil 2.4 Asidik ve alkali koşullarda tümerik ve kurkumin görüntüleri	19
Şekil 2.5. Kurkumin kaynakları.....	21
Şekil 2.6. Kurkuminin hindistanda halk tarafından geleneksel kullanım alanlar.....	22
Şekil 2.7. Kurkuminin modern tıptaki kullanım alanları.....	23
Şekil 2.8. Sıçanlarda tanımlanmış kurkumin ve metabolitleri	25
Şekil 2.9. Sıçanların anatomik yapısı.....	33
Şekil 2.10. Kan hücrelerinin oluşumu.....	35
Şekil 2.11. Polikromatik eritrositlerin oluşumu.....	36
Şekil 2. 12. Sıçan karaciğerindeki loblar.	40
Şekil 2.13. Fotoğraf Michigan State üniversitesindeki 'Sıçan karaciğerinden hepatositlerin izolasyonu.....	40
Şekil 2.14. Kaspazların aktivasyonu	48
Şekil 2.15. Kaspaz 3 ve 8 in apoptozdaki yeri ve önemi.....	50
Şekil 2.16.. Apoptozom oluşumu (Apaf-1 + kaspaz 9).....	52
Şekil 2.17. Apaf molekülünün genetik yapısı.....	52
Şekil 2.18. Mitokondri/sitokrom-c aracılı apoptozun tetiklenmesi.....	54
Şekil 2.19. Dış sinyallerle apoptozun tetiklenmesi.....	55
Şekil 2.20. Dış sinyallerle apoptozun tetiklenmesi.....	55
Şekil 2.21 Endoplazmik retikulum aracılı apoptoz oluşumu.....	56
Şekil 2.22. Apoptozun genetik kontrolü.	58
Şekil 2.23. Apoptoz ve nekrozun morfolojisi.....	62
Şekil 3.1. Hücrede mikronukleus oluşumu.	68
Şekil 3.2.. Mikronukleus oluşumuna sebep olan kromozomal hasarlar.....	69
Şekil 3.3. Komet testinin aşamaları.	79

Şekil 3.4.. Komet tipleri.....	82
Şekil 3.5. Taq man probu.....	90
Şekil 3.6. Taq Man probun kalıp DNA ya bağlanması.....	91
Şekil 3.7. Taq Man probun çalışması.....	91
Şekil 4.1. MN içeren kan hücrelerinin dozlara göre oranı	104
Şekil 4.2. AO ile boyanan kan hücrelerinin floresan mikroskop altındaki görüntüsü.	104
Şekil 4.3. 1000 hücre içerisinde MN içeren karaciğer hücrelerinin dozlara göre oranı	106
Şekil 4.4. Karaciğer hücrelerinin floresan mikroskop altındaki görüntüsü.....	107
Şekil 4.5. Karaciğer hücrelerinin floresan mikroskoptaki görüntüsü.....	108
Şekil 4.6. Kanda yapılan komet testine göre HHY'nin dozlara göre oranı.....	109
Şekil 4.7. Kanda yapılan komet testi ne göre GHI nin dozlara oranı.....	110
Şekil 4.8. Komet oluşturmuş bir kan hücresinin floresan mikroskop altındaki görüntüsü.	111
Şekil 4.9. Karaciğerde yapılan komet testine göre HHY nin dozlara göre oranı..	113
Şekil 4.10. Komet oluşturan karaciğer hücrelerinin floresan mikroskop altındaki görüntüleri.....	113
Şekil 4.11. Karaciğerde yapılan komet testi ne göre GHI nin dozlara oranı.....	115
Şekil 4.12 Kaspaz 3 geninin ekspresyon miktarının dozlara göre değişimi.....	118
Şekil 4.13. Kaspaz 8 geninin ekspresyon miktarının dozlara göre değişimi.....	119

KISALTMALAR DİZİNİ

- AP-1, activating protein-1
- AR, androgen receptor
- Arh-R, aryl hydrocarbon receptor
- DR-5, death receptor-5
- EGF, epidermal growth factor
- EGF-R, EGF-receptor
- EGFRK, EGF receptor-kinase
- Egr-1, early growth response gene-1
- EPC-R, endothelial protein C-receptor
- EpRE, electrophile response element
- ERK, extracellular receptor kinase
- ER- α , estrogen receptor-alpha
- FAK, focal adhesion kinase
- Fas-R, Fas receptor
- FGF, fibroblast growth factor
- FPTase, farnesyl protein transferase
- Gcl, glutamate-cysteine ligase
- GST, glutathione S-transferase
- H2-R, histamine (2)- receptor
- HGF, hepatocyte growth factor
- HO, hemeoxygenase

HSP-70, heat-shock protein 70

IAP, inhibitory apoptosis protein

IL 8-R, interleukin 8-receptor

IL, interleukin;

InsP3-R, inositol 1,4,5-triphosphate receptor

IR, integrin receptor

iNOS, inducible nitric oxide oxidase

K, Kurkumin

LOX, lipoxygenase

MAPK, mitogen-activated protein kinase

MCP, monocyte chemoattractant protein

MDR, multi-drug resistance

MMP, matrix metalloproteinase

MN, mikronukleus

NAT, Arylamine N-acetyltransferases

NF- κ B, nuclear factor-kappa B

NGF, nerve growth factor

Nrf-2, nuclear factor 2-related factor

PDGF, platelet derived growth factor

PFOS, perflororoktan sülfonat

PPAR γ , peroxisome preoliferator-activated receptor-gamma

STAT, signal transducers and activators of transcription

TGF- β 1, transforming growth factor- β 1

TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase-3

TNF α , tumor necrosis factor alpha

VEGF, vascular endothelial growth factor

1. GİRİŞ

Bu projede perflorooktan sülfonat (PFOS)'ın oluşturabileceği genotoksik hasara karşı Kurkumin maddesinin koruyucu etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu etkinin ortaya konması toplum sağlığı açısından önem arz etmektedir. Çünkü genotoksisite oluşturan maddelerin etkilerinin diyetle alınan destekleyici katkılarla azaltılması önemlidir. Bu çalışma ile elde edilen veriler sayesinde, insan sağlığını etkilemesi olası madde olan PFOS maddesinin canlı organizmalardaki etkileri belirlenmeye çalışılmış ve bu etkiler arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Kurkumin maddesinin koruyucu etkisinin, toplum sağlığı ile ilgili olarak ileride yapılacak çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Tez çalışmasında uygulanan testlerle genotoksisite ve apoptotik gen ekspresyonu arasındaki ilişki belirlenmiş ayrıca PFOS'ın in vivo ortamda test edilmesiyle bu madde hakkındaki hem yetersiz hem de tartışmalı sonuçların elde edildiği genotoksisite raporlarına katkı sağlanması amaçlanmıştır. PFOS maddesinin genotoksik etkisine karşı Kurkumin maddesinin koruyuculuğu hakkında hiç veri bulunmaması nedeniyle bu konuda bilgi sağlanarak, literatürdeki boşluk giderilmeye çalışılmıştır

Çalışmada sıçanlara 48 saat aralıklarla, toplam 30 gün süre ile hem PFOS maddesi üç farklı dozda (0,6, 1,25 ve 2,5 mg/kg) tek başına ve Kurkumin maddesi (80 mg/kg) ile beraber ve kurkumin maddesi de tek doz olarak gavaj yolu ile verilmiş ve uygulamaların 30. gününden sonraki günde ratlardan kan ve karaciğer dokuları alınarak genotoksisite ve apoptotik gen ekspresyonu çalışmaları yapılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. PERFLOROOKTAN SÜLFONAT (PFOS)

2.1.1. Yapısı

Kimyasal adı: PFOS

Moleküler formülü: $C_8F_{17}SO_3$

Yapısal formülü: $CF_3-CF_2-CF_2-CF_2-CF_2-CF_2-CF_2-CF_2-S(=O)(=O)O$

Çizelge 2.1. PFOS'un fiziksel ve kimyasal özellikleri [Karakaş, 2010]

ÖZELLİK	DEĞERİ
Fiziksel Durumu	Katı
Molekül Ağırlığı	538
Buhar Basıncı	3.31×10^{-4}
Suda Çözünürlüğü	519 mg/L (20±0.5 °C) 680 mg/L (24-25 °C)
Erime Noktası	>400 °C
Kaynama Noktası	Hesaplanmamıştır
Uçuculuk oranı	$<2 \times 10^{-6}$

Sinonimleri:

1-oktano sülfonik asit, 1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-heptadekaflo

1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-heptadekaflo-1-oktano sülfonik asit;

1-oktano sülfonik asit hepta dekafloro;

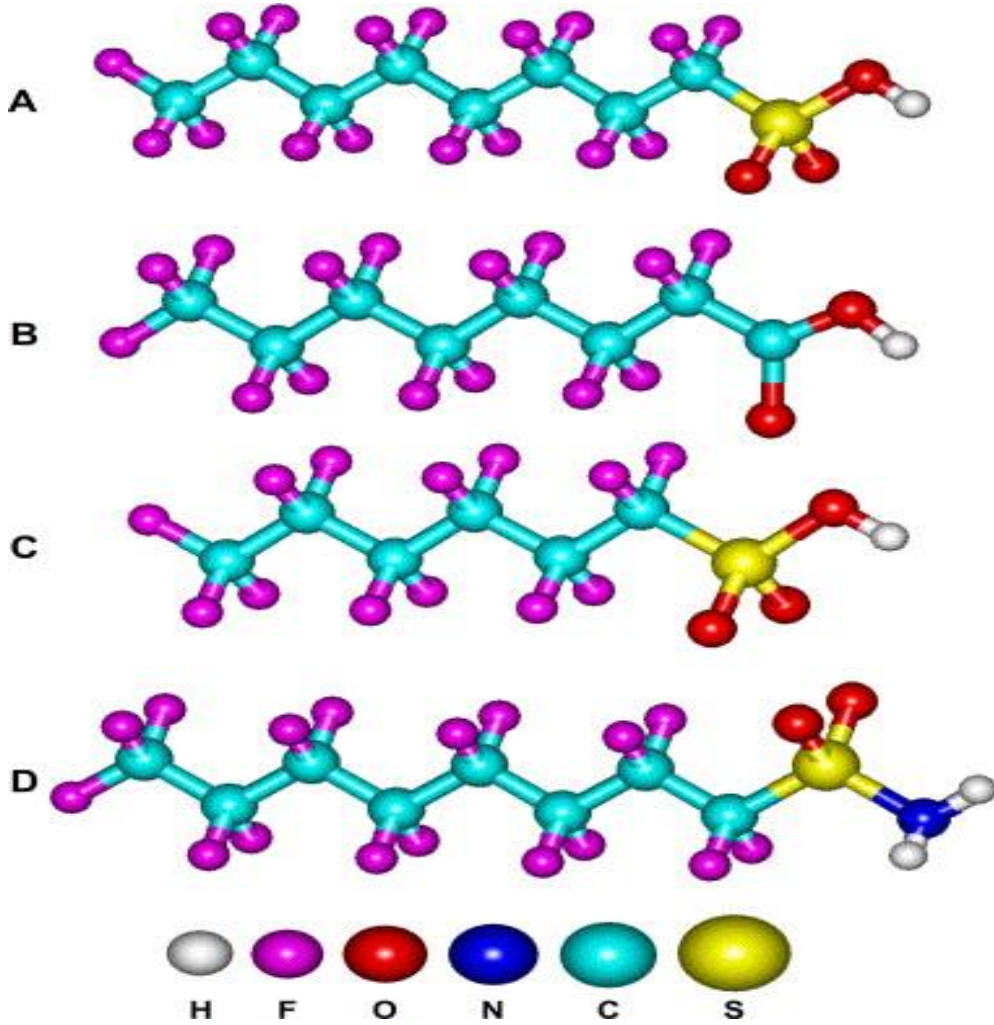
1-perflorooktan sülfonik asit;

heptadekafloro-1-oktano sülfonik asit;

perfloro-n-oktasülfonik asit;

perflorooktan sülfonik asit;

perflorooktil sülfonik asit [Olsen vd., 1999] [Meesters ve Schröder, 2004] [3M Reports, 1999] [Kelly vd., 2009] [Karakas, 2010]



Şekil 2.1. PFOS ve türevlerinin yapısal formülleri (A) Perfluorooctanesulfonate – serbest asit formu (PFOS); (B) perfluorooctanoic acid (PFOA); (C) perfluorohexanesulfonate – serbest asit formu (PFHxS) and (D) perfluorooctanesulfonamide (PFOSA) [Olivero-Verbel vd., 2006]

2.1.2. Kullanım Alanları

Perflorooktan sülfonat (PFOS) ve onunda içerisinde bulunduğu florokimyasallar ailesi özellikle endüstriyel açıdan oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptirler. Bu kadar geniş kullanım alanına sahip olmaları, onların diğer kimyasallara oranla bazı avantajlara sahip olmalarından ileri gelmektedir. Örneğin; kullanıldıkları komponentin su ve yüzey gerilimini azaltırlar. Oligomerizasyon ve polimerizasyon için katalizör rolü oynarlar. Diğer komponentlerin parçalandığı şartlarda bile fonksiyonlarını yerine getirebilirler [Karakaş, 2010]. Oldukça kararlı olup genellikle reaktif değildir.

2.1.2.1. Metal kaplama

En yaygın kullanım alanıdır. PFOS metal kaplama solüsyonlarının yüzey gerilimini azaltmak için kullanılmaktadır. Böylece buğu oluşumu önlenmektedir. Ayrıca krom kaplamalarda da kullanılarak korozyonu önlemektedir. Bu amaçla Avrupada her yıl 8.6-10 ton PFOS kullanılmaktadır [PFOS, 2009] [POPRC1, 2009] [Karakaş, 2010].

2.1.2.2. Fotoğrafçılık

PFOS fotoğraf filmleri, kağıtları ve matbaa levhalarının kaplamasında da kullanılmaktadır. Film üretimi için yılda 850 kg PFOS 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 [PFOS, 2009] [POPRC1, 2009] [Karakaş, 2010].

2.1.2.3. Uçak sanayisi

PFOS uçakların ateşe dayanıklı hidrolik sıvılarının bir bileşeni 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 bunun 0.73 tonu Avrupa tarafından tüketilmektedir [PFOS, 2009] [POPRC1, 2009] [Karakaş, 2010].

2.1.2.4. Yangın söndürücüler

PFOS içeren yangın söndürücü köpük, alttaki söndürücü solüsyon ile üstteki hava arasında ince bir film tabakası oluşturarak suyun yüzey gerilimini azaltarak yangının yayılmasını engellemektedir. İngiltere’de itfaiye yetkilileri, PFOS içeren yangın söndürücü köpük konsantresini yıllık 76 ton kullandıklarını bildirmiştir. Bunun % 1’i PFOS içerdiği göz önünde bulundurulursa İngiltere’de yılda 76 kg PFOS’un yangın söndürücülerde kullanıldığı tespit edilmiştir [PFOS, 2009] [POPRC1, 2009] [Karakaş, 2010].

2.1.2.5. Dokuma sanayi

Bu alanda halı, tekstil ve deri sanayi yer almaktadır. PFOS dokumaların yüzey enerjilerini düşürerek, toprak, su ve yağa karşı dirençli olmasını sağlamak amacı ile yoğun olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla tüm dünyada kullanılan PFOS miktarının ise 240 ton olduğu düşünülmektedir [PFOS, 2009] [POPRC1, 2009] [Karakaş, 2010].

2.1.2.6. Kağıt sanayi

PFOS, yiyeceklerle direkt temas halinde bulunan bir çok kağıt tipinde ve ürününde kağıtların yağ ve suya karşı dirençli olmasını sağlamak amacı ile kullanılmaktadır. 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, dünyada yıllık 160 ton PFOS kullanılmaktadır [PFOS, 2009] [POPRC1, 2009] [Karakaş, 2010].

2.1.2.7. Endüstriyel ürünler, kişisel bakım ve temizlik ürünleri

Sislenmeyi önleyici olarak nemli havaya maruz kalan cam yüzeylerinde (banyo aynaları, otomobil ön camları, gözlük mercekleri) kullanılmaktadır. 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 [PFOS, 2009] [POPRC1, 2009] [Karakaş, 2010].

2.1.2.8. Pestisitler

PFOS karınca ve kara böceklere karşı üretilen yemlerde kullanılmaktadır. Avrupa'da bu amaçla yılda 0.5 ton PFOS kullanılmaktadır [PFOS, 2009] [POPRC1, 2009] [Karakaş, 2010].

2.1.3. Biyoakümülyasyonu

Trudel ve ark. 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 [Trudel 2008].

PFOS molekülü yapısı itibarı ile hem hidrofilik hemde lipofobik özellik göstermektedir. Bu yüzden diğer kirleticilerin aksine yağ dokusunda değilde karaciğer ve kan dokusunda birikme eğilimi göstermektedir [PFOS, 2009] [POPRC1, 2009] [Karakaş, 2010].

PFOS'un bitkiler tarafından alındığı ile ilgili sınırlı sayıda 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. Meyvedeki konsantrasyon ise topraktaki seviyenin % 10'nundan daha düşük olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bitkilerin PFOS'dan daha az etkilendiği görülmüştür [Stahl Heyn 2008].

Kannan ve ark 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 [Kannan, 2001].

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 [Guruge, 2008].

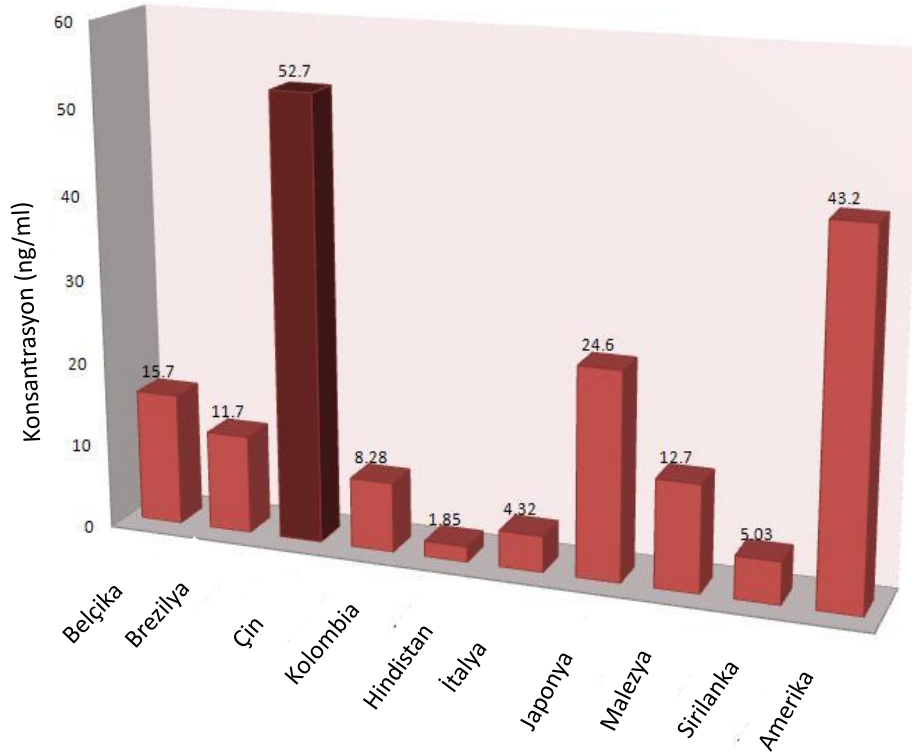
PFOS, genel insan popülasyonunun kanında ise ilk defa 1968'de belirlenmiştir. Japonlar tarafından yapılan çalışmada serum PFOS konsantrasyonunun 25 yılda 14 kat arttığı gösterilmiştir [Harada, 2004]. Çin'de ise 1999-2002 yılları arasında serum PFOS konsantrasyonunun 13 kat arttığı tespit edilmiştir [Jin, 2007]. Son yıllarda genel popülasyondaki insanların serumunda da PFOS olduğu tespit edilmiştir. Ancak mesleki olarak PFOS'a maruz kalan işçilere göre oldukça düşük oranlarda bulunmaktadır [Harada 2004].

Amerika'da yapılan bir çalışmada genel popülasyondaki insanların serumlarında PFOS konsantrasyon aralığı 13.8-56.5 µl/l olarak tespit edilmiştir [Calafat, 2006]. Kore savaşıdan kalan kan örneklerinde PFOS'a rastlanmaması 1950'lerde (PFOS üretimi başlamadan önce) PFOS'a maruziyetin olmadığını göstermektedir [Olsen, 2003].

PFOS'un plasenta bariyerini geçerek fetal sirkülasyona girebildiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bunun yanı sıra yapılan çalışmalar PFOS'un anne sütünde de olduğunu göstermiştir [Apelberg BJ, 2007] [Tao 2008].

İnsanlardaki en yüksek PFOS maruziyeti 12.830 ppb mesleki maruziyet olarak kaydedilmiştir. Tüketici maruziyetleri ise 656-1.656 ppb arasında kaydedilmiştir [Fromme vd., 2009].

Leo ve ark. Çinde gönüllü kan bağışçıların kanlarında yapılan ölçümlerde elde edilen PFOS verileri derlemiştir. Çalışma sonucuna göre kandaki en yüksek veriler Çin'de bulunurken en düşük veriler Hindistan'dan elde edilmiştir (Şekil 2.2.) [Leo vd., 2006].



Şekil 2.2. Hastanelerde ve üniversitelerde gönüllü kan bağışçıların kanlarında yapılan ölçümlerde elde edilen PFOS verileri [Leo vd., 2006].

OECD nin çevre araştırmalarına göre; PFOS, memeliler için biyolojik birikim yapma eğilimi olan, toksik ve kararlı bir birbileşiktir [Wikipedia, 2012].

Erkek farelerin kan serumlarındaki ölçümlerde; 90 ppb lik konsantrasyonun immün sistemi etkilediği görülürken, insanlarda bu oranın bağışıklık sistemini daha fazla baskıladığı görülmüştür. 2006 da yayınlanan bir derlemeye göre yapılan bazı ölçüm sonuçları Çizelge 2.2. de verilmiştir [Houde vd., 2006].

Çizelge 2.2. Çeşitli hayvan gruplarındaki PFOS miktarları[Houde vd., 2006].

Tür	Coğrafi alan	Yıl	Örnek	PFOS (ppb)
Kartal	Midwestern USA	1990–93	Plazma	2,200
Brandt's karabatak	California, USA	1997	Karaciğer	970
Guillemot	Baltic Sea	1997	Yumurta	614
Leş kargası	Tokyo Bay, Japan	2000	Karaciğer	464
Red-throated Loon	North Carolina, USA	1998	Karaciğer	861
Kutup ayısı	Sanikiluaq, Nunavut	2002	Karaciğer	3,100
Harbor ayıbalığı	Dutch Wadden Sea, Denmark	2002	Kas	2,725
Bottlenose yunus	Charleston, USA	2003	Plazma	1,315
Yunus	Mediterranean Sea, Italy	1998	Karaciğer	940
Vizon	Michigan, USA	2000–01	Karaciğer	59,500

2.1.4. Çevresel konsantrasyonu

Avrupa'da yapılan bir çalışmada 100 nehirden 6 tanesinde PFOS'a rastlanmamıştır. PFOS konsantrasyonu ortalaması 39 ng/L (aralığı 6-1371ng/L) olarak tespit edilmiştir [Loos vd., 2009].

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'si PFOS'dur [Plumle vd., 2008]. 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 artmaktadır [Bossi vd., 2008].

Japonya'da iki farklı bölgede 12 aylık süreçte aylık toz örneklerinde ölçüm yapmıştır. Yapılan bu çalışmada PFOS konsantrasyonu sırasıyla 19.2 ve 97.4 ng/g olarak tespit edilmiştir. Murakami ve ark.'da trafiğin yoğun olduğu bölgelerdeki toz örneklerinde PFOS konsantrasyonunun diğer caddelere oranla daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir [Murakami vd., 2009].

2.1.5. Vücuttan atılımı

Çok iyi absorbe edilen PFOS serum ve karaciğerde birikmekte ve idrar yoluyla atılmaktadır. Serumdaki yarılanma süresi; sıçanda 7.5 gün, maymunda 200 gün, insanda 8,5 yıl olarak tesbit edilmiştir [Karakaş, 2010] [Johnson vd., 1984] [Seacat vd., 2002] [Burriss vd., 2002].

2.1.6. PFOS toksisitesi

Mayıs 2009 da yapılan, Kalıcı Organik Kirleticiler adlı Stokholm kongresinde, PFOS, annex B sınıfına dahil edilmiştir. Kanada çevre koruma ajansı tarafından yasaklanması önerilmiştir. PFOS ile ilgili OECD ve sağlık ve çevre riskleri Avrupa Bilimsel Komitesi'nin 2006 çalışmalarına göre; gıdalarla teması olan ürünlerde yasaklanmış sonradan tüm ağırlığın 0.005% ini geçmeyecek şekilde sınırlandırılmıştır. Bu yasaklamada, fotolitografi, yangın söndürücüler, ağır sanayide kullanılan krom kaplama ve uçak sanayisindeki kullanımı hariç tutulmuştur. 2010 da

PFOS in kalıcı organik kirleticiler den biri olarak kullanımı 0.001% (10mg/kg) geçmeyecek şekilde sınırlandırılmıştır.

Florokimyasal bileşiklerin , in vitro ortamda 3 farklı mekanizma ile mitokondri fonksiyonunda bozukluklara yol açtığı bildirilmiştir. Bunlar mitokondriyal solunumun bozulması, membran permeabilitesinin artması, kalsiyum indüksiyonuna bağlı olarak mitokondrilerin şişmesidir [Keller vd., 1992] [Panaretakis vd., 2001]. Mitokondriyal membran geçirgenliğindeki artış mitokondrilerin fonksiyon kaybındaki en önemli neden olarak görülmektedir [Panaretakis vd., 2001] [Starkov ve Wallace, 2002]. 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 [Kroemer ve Reed, 2000].

PFOS'un muhtemel etki mekanizmasını araştıran pek çok sayıda çalışma yapılmıştır. Peroksizom proliferasyonunu indüklemesi ve peroksizom enzimleriyle ilişkili olması [Berthiaume ve Wallace, 2003], lipit mekanizmasını engellemesi ve serum kolesterol seviyesini düşürmesi [Haughom ve Sydevold, 1992] hücreler arası iletişimde önemli bir rolü olan gap junctionların inhibisyonundan sorumlu olması muhtemel nedenler arasında sayılmaktadır [Hu vd., 2003].

PFOS'un ratlarda akut, subkronik, kronik olarak toksik etkilerinin olduğunu belirten çalışmalar vardır.

Rat 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 ratlarında 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 duvarlarda kalınlaşma tespit edilmiştir [Cui ve Zhou, 2009].

Austin ve ark. 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 [Austin ve ark. 2003].

Johannson ve ark. tarafından yapılan çalışmada 10 günlük farelere tek oral doz 1.4 veya 21 mmol/kg PFOS (0.75 or 11.3 mg) uygulanmış ve nörotoksik etkileri değerlendirilmiştir. PFOS uygulanan 2 ve 4 aylık farelerin davranışlarında dengesizlik, belirgin bir şekilde oturmada azalma ve hiperaktivite gözlenmiştir. Bu etkilerin yaş ilerledikçe de arttığını 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 [Johannson vd., 2008].

Diğer etkilerin yanı sıra Flow sitometri analizlerinde 7 gün 0, 5, 20 ve 40 mg PFOS/kg verilen ratlarda 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 [Zheng vd., 2008].

Ratlarda PFOS'un prenatal gelişime olan toksik etkisini belirlemek için reproduktif toksisite çalışmaları için ratlara 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 ölmüş, 3.2 mg/kg/gün grubundaki F1 yavrularının % 45'i (71/156) doğumdan sonraki gün öldüğü kaydedilmiştir. Bu gruptaki yavruardan hiç biri 4 günden fazla yaşamamıştır. Yüksek dozlarda ilk jenerasyondaki tüm yavrular ölmüş, düşük dozlarda ise ikinci jenerasyondaki tüm fareler ölmüştür [Luebker vd., 2005].

Gebelik sırasında PFOS uygulanan ratların fetüslerinde gelişimsel toksik etkiler arasında fetal vücut ağırlığında azalma, yarı damak, 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 ratlarda 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 [Chang vd., 2007]. Diğer maternal toksik etkiler ise vücut ağırlığında ve besin tüketiminde azalmadır. Fetal ağırlıkta azalma ve iskelet oluşumunda gecikme gebelik sırasında PFOS uygulanan tavşanlarda da görülmüştür [Grasty vd, 2003] [Lau vd., 2003] [Thibodeaux vd., 2003]. Tavşanlardaki maternal etkiler ise düşük olması, besin tüketimi ve vücut ağırlığında azalmadır [Case vd., 2001]. Daha az boyutta olmak üzere benzer etkiler farelerde ve

yavrularında da gözlenmiştir. Farklı olarak ana hayvanda karaciğerde ciddi bir büyüme de gözlenmiştir [Fuentes vd., 2007].

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, hipotroksinemi, 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 hipotroksinemi neonatal mortalitenin sebebi olarak görülmektedir [Grasty vd., 2003], neonatal mortalitenin gerçek nedeni bu güne kadar hala belirlenmemiştir.

PFOS hakkında yapılan kronik toksisite çalışmalarına bakıldığında; PFOS ve potasyum tuzları sıçanlarda çalışılmıştır. 40 erkek ve 70 dişi sıçana 0.5, 2,5 ve 20 mg/kg dozlarda PFOS yemlerine katılarak tek doz olarak ayrıca 0.04, 0.14, 0.36 ve 1.42 mg/kg erkeklere ve 0.035, 0.14, 0.37 ve 1.49 mg/kg dişilere günlük olarak 52 hafta boyunca verilmiştir. Erkeklerde 5 mg/kg ve 20 mg/kg lık dozlarda hayati değişimler gözlemlenirken dişilerde negatif kontrole kıyasla anlamlı değişimler gözlenmemiştir. Sentrilobüler hipertrofi, sentrilobüler hepatoksik pigmentler, ve sentrilobüler hepatoksik vakülasyon gibi hepatoksik veriler dişi ve erkeklerde 5 ve 20 mg/kg lık dozlarda not edilmiştir [Thomford vd., 2002] [Jan Alexander vd., 2008].

PFOS ile yapılan genotoksisite çalışmalarına değinilecek olursa;

PFOS ve onun tuzlarının genotoksisitesi; 2002 yılında OECD, 2004 yılında KANADA Sağlık, 2006 yılında U.S. EPA, yine 2006 yılında U.K. KOMİTE sinde

(çevredeki, tüketim mallarındaki ve gıdalardaki kimyasalların toksisitesi) değerlendirilmiştir.

Salmonella typhimurium geri gen mutasyon testinde 0.01–500 µg/plate(-S9) ve 0.1<500 µg/plate(+S9) konsantrasyonlarda negatif çıkmış ve mutajenik olmadığı rapor edilmiştir. Çalışmada TA100, TA1535, TA1537, TA1538 VE TA09 soyları kullanılmıştır. Ayrıca *Saccharomyces cerevisiae* (D4) mitotik rekombinasyon testinde etkisiz olduğu belirtilmiştir [Litton Bionetics vd., 1978] [Jan Alexander vd., 2008].

Salmonella ve Escherichia coli geri mutasyon testinde 5000 µg/plate(-S9 ve +S9) konsantrasyonuna kadar negatif çıkmıştır. Çalışmada *S. typhimurium* TA1535, TA100, TA98, TA1537 and *E. coli* WP2UVRA soyları kullanılmıştır [Mecchi vd., 1999] [Jan Alexander vd., 2008].

İnsan lenfosit hücrelerinde 599 µg/mL(-S9) ve 449 µg/mL(+S9) konsantrasyonlara kadar kromozomal aberasyonu tetiklemediği bildirilmiştir [Cifone vd., 1999] [Jan Alexander vd., 2008].

Sıçan karaciğer primer kültürlerinde 4000 µg/mL konsantrasyona kadar programlanmamış DNA sentezini arttırmadığı bildirilmiştir [Cifone vd., 1999] [Jan Alexander vd., 2008].

Fare kemik iliği mikronukleus (MN) testinde, 237.5, 450 ve 950 mg/kg tek oral dozda ayrıca 24, 48 ve 72 saatlik çoklu uygulamalarda genotoksik olmadığı bildirilmiştir [Corning Hazleton vd., 1993] [Jan Alexander vd., 2008]

Perfluorooktan sülfonat (PFOS) ve perfluorooktanoik asit (PFOA) in genotoksik etkileri Paramecium caudatum için geliştirilen komet testi ile araştırılmıştır. PFOS uygulamasında herhangi bir DNA hasarı gözlenmezken,

PFOA (100 µM) in 12 ve 24 saatlik uygulamalarında DNA hasarının (komet göçü) anlamlı derecede yükseldiği tesbit edilmiştir [Kawamoto vd., 2010].

Florentin ve ark. tarafından PFOS ve PFOA'nın sitotoksik ve genotoksik etkileri HepG2 hücrelerinde çalışılmıştır. 200 µM ve 300 µM lük dozlar halinde 1-24 saat arası uygulamalar yapılmış ve uygulama sonunda MN testi yapılmıştır ve anlamlı artışlar görülmemiştir [Florentin vd., 2011].

PFOS ve siklofosfamid (cyclophosphamid CPP) in etkileri, hamster akciğer hücrelerinde MN testi kullanılarak araştırılmıştır. PFOS, CPP'nin toksisitesini artırırken, tek başına uygulanan dozda da anlamlı derecede genotoksik bulunmuştur [Jernbro1 vd., 2007].

PFOS ve PFOA in oksidatif stres ve apoptoz yoluyla hücrel toksikolojisi tatlısu Tilapia (*Oreochromis niloticus*) hepatosit primer kültürlerinde çalışılmıştır. Kültüre alınan hücreler 24 saat boyunca 0, 1, 5, 15 and 30 mgL(-1) dozlarda PFOS ve PFOA e maruz bırakılmış ve hücre canlılığı triphan blue ile ölçülmüştür. Süperoksit dismutaz (superoxide dismutase:SOD), katalaz(catalase:CAT) ve glutatyon redüktaz(glutathione reductase:GR) miktarlarının arttığı görülürken, glutatyon peroksidaz(glutathione peroxidase:GPx) ve glutatyon-S-transferaz(glutathione-S-transferase:GST) in aktivitesi azalmıştır. Hem PFOS hemde PFOA gruplarının hepsinde kaspaz-3, -8, -9 aktivitelerinde anlamlı derecede artış olmuştur. Agaroz jelde apoptoza özgü olan DNA merdiven basamakları görülmüştür [Liu vd., 2007].

PFOS in apoptozise olan etkileri, mikroglia, murin N9 hücre dizileri kullanılarak araştırılmıştır. Çalışma sonucunda mitokondrial membran potansiyelinin bozulması, p53, Bax, kaspaz9, kaspaz3 genlerine ait mRNA ların bozulması yoluyla hücrel apoptozin indüklendiği sonucuna varılmıştır. Buna karşın Bcl-2 mRNA'nın ekspresyonu azalmıştır. Çalışma sonucunda; apoptosizi başlatıp bitiren apoptoz

düzenleyici genleri ve mitokondriyi etkilemek yoluyla PFOS ın, N9 hücre homeostazisini bozduğu belirtilmiştir [Zhang vd., 2011]

PFOS; Oral [LD50] PFOS: 233 to 271 mg/kg (sıçan)

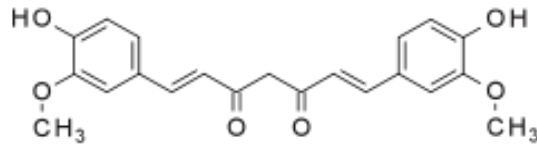
Dermal [LD50] PFOS: > 5,000 mg/kg (rabbit)

İnhalasyon [LD50] PFOS: 5.2 mg/L (1 hr, sıçan) olarak belirtilmiştir [Jan Alexander vd., 2008].

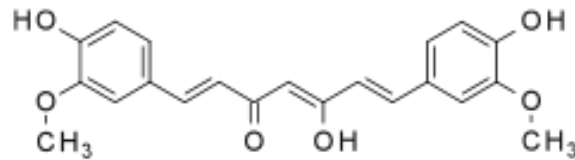
2.2. KURKUMİN

Kurkumin, zerdeçal olarak da bilinen hint safranı baharatında (*Curcuma longa*) bulunan bir pigmenttir. Köri tozu üretiminde kullanılmakta ve Hint safranına sarı rengini vermektedir.

Desmetoksi kurkumin ve bis-desmetoksi kurkumin ile beraber kurkuminoidler ailesinin en bilinen üyesidir. Kurkuminoidler doğal fenollerdir. Kimyasal yapısı incelendiğinde keto ve enol formu olmak üzere iki tautomerik formu bulunmaktadır. Enol formu katı fazda ve solüsyon içindeyken enerjisi bakımından daha karardır [Kolev vd., 2005].

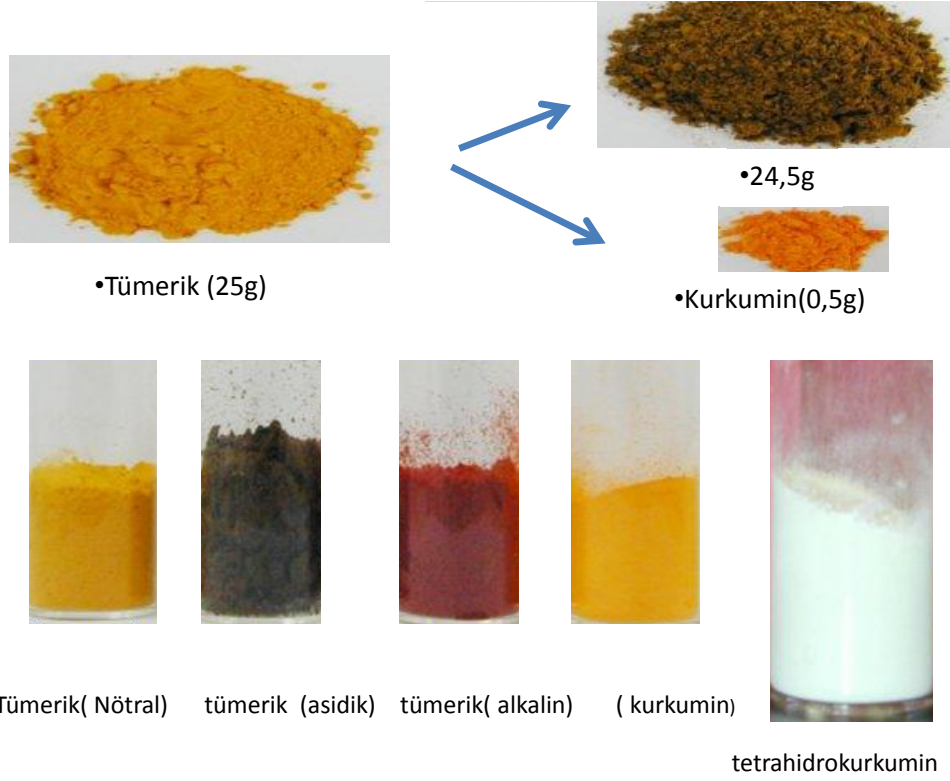


keto formu



enol formu

Şekil 2.3. Kurkuminin enol ve keto formları.



Şekil 2.4. Asidik ve alkali koşullarda tümerik ve kurkumin görüntüleri [Shishodia vd., 2005] .

Kurkuminin en bilinen kullanım alanı, bor madeninin kalitesinin saptanmasıdır. Borik asitle tepkimeye girerek kırmızı bir renk oluşturmakta buda mineralin kalitesi hakkında bilgi vermektedir. Kurkumin metodu olarak bilinen bu metod geniş çapta kullanılmaktadır.

2.2.1. Kimyasal Özellikleri

Kurkumin pek çok fonksiyonel grup içermektedir. Polifenol olan aromatik halkalar, doymamış karbonil gruplar yolu ile bağlanmaktadır. Yapısı ilk kez 1910 yılında J. Miłobędzka, Stanisław Kostanecki ve Wiktor Lampe tarafından tanımlanmıştır (Şekil ve Çizelge 2.3) [Miłobędzka vd., 1910].

Çizelge 2.3. Kurkuminin kimyasal özellikleri.

Formülü	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
Molekül ağırlığı	368.38 g/mol
Görünümü	Parlak yeşil-portakal rengi
Erime Noktası	183 °C (361 °F) (456.15 K)

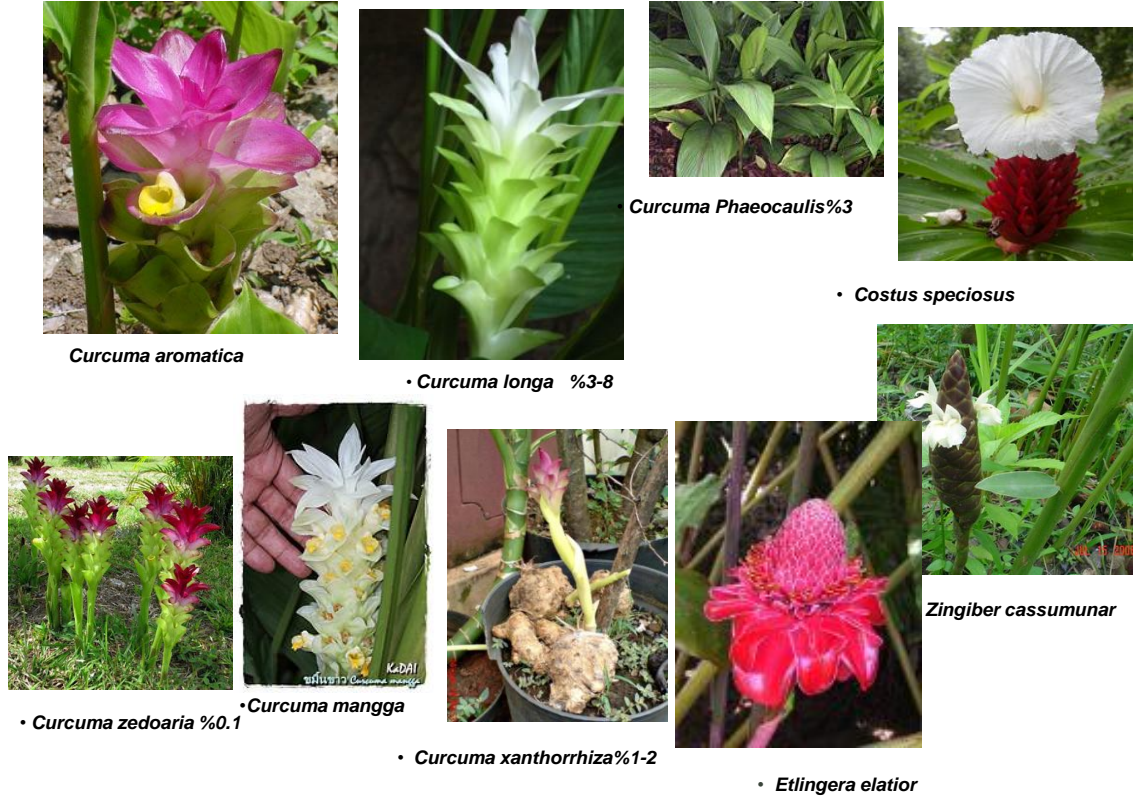
2.2.2. Biyosentezi

Uzun süren çalışmalardan sonra 1973 yılında Roughly ve Whiting tarafından kurkuminin biyosentezi konusunda iki mekanizma ortaya atılmıştır.

İlk mekanizma, sinamik asit ve 5-malonil-CoA'nın yer aldığı uzun bir zincir reaksiyonudur ve sonuçta bir kurkuminoid açığa çıkmaktadır. İkinci mekanizmada ise; iki tane sinnamit bir tane malonil-Co-A tarafından birleştirilmektedir. Her iki mekanizmada da başlangıç molekülü sinamik asittir. Sinamik asit fenilalanin aminoasitinden türevlenen bir moleküldür. Sinamik asitin başlangıç molekülü olarak kullanılması çok nadir görülen bir olaydır. Kurkuminin sıradışılığı burada başlamaktadır. Genellikle kimyasal biyosentezinde p-kumarik asit başlangıç için kullanılmaktadır [Schmitt vd., 2000].

2.2.3. Kurkuminin Doğal Kaynakları

Kurkumin içeren bitki türleri Şekil 2.5 te gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Kurkumin kaynakları. Mevcut kurkuminin ne kadarının bitki türünden karşılandığı, yüzde olarak verilmiştir. Miktar yazmayanlar hakkında net veri bulunmamaktadır. [Chattopadhyay vd., 2004] [Abas vd., 2005] [Syu vd., 1998] [Mohamad vd., 2005] [Dechatowongse vd., 1976].

2.2.4. Medikal Kullanımı

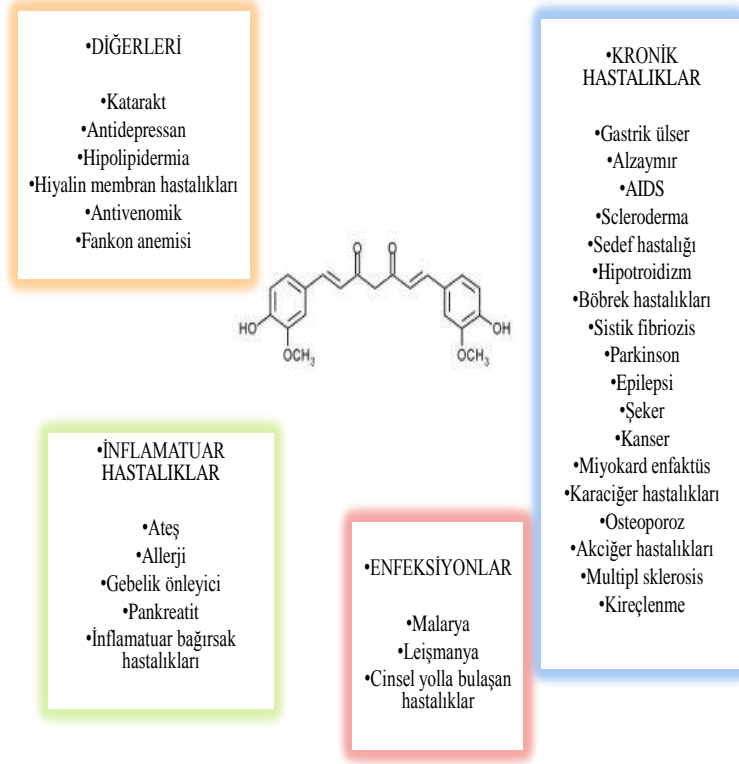
Zerdeçal, yüzyıllardır Hindistan'da birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. 20 y.y. in ikinci yarısından itibaren zerdeçalın biyolojik etkilerinin kurkuminden kaynaklandığı bulunmuştur. Uzun zamandır yapılan in vitro ve hayvan çalışmalarında; birçok hastalıkta, kurkuminin tedavi edici ve koruyucu rol üstlendiği bulunmuştur (Şekil 2.6 ve 2.7). Bugün insanlarda bu etkiler doğrudan ispatlanmamasına rağmen multipl miyelom, pankreas kanseri, miyelodisplastik sendrom, kolon kanseri ve özellikle alzheimer üzerinde tedavi edici ve koruyucu etkilerinin olduğu düşünülmektedir [Aggarwal vd., 2007] [Hatcher vd., 2008]



Şekil 2.6. Kurkuminin hindistanda halk tarafından geleneksel kullanım alanları [Aggarwal vd., 2007] [Shishodia vd., 2005].

Yapılan in vitro ve hayvan çalışmalarında kurkuminin antitümör, antioksidan, antiartritik, antimiyeloid, antiistemik ve antiinflamatuvar etkilerinin olduğu bulunmuştur. Antiinflamatuvar etkisinin eikosanoid biyosentezini inhibe etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Malarya'nın tedavisinde ve serviks kanserinin önlenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca HIV virüsünün replikasyonunu baskıladığı bildirilmiştir. HIV üzerindeki bu etkisini P300/CREB-bağlayıcı proteinle etkileşime girerek gerçekleştirmektedir. Kurkumin aynı zamanda karaciğeri koruyucu etkiye sahiptir. 2008 yılında Michigan State Üniversitesi'nde de yapılan bir çalışmada kurkuminin Herpes simplex virus-1 (HSV-1) in replikasyonunu engellediği gösterilmiştir. Bunu yapmak için; viral DNA ya gerekli olan RNA

Polimeraz II ile etkileşime girerek transkripsiyonu baskıladığı düşünülmektedir [Aggarwal vd., 2006] [Hyunsung 2006] [Shukla vd., 2008].



Şekil 2.7. Kurkuminin modern tıptaki kullanım alanları [Aggarwal vd., 2007] [Shishodia vd., 2005].

Kurkumin aynı zamanda; lipid peroksidasyonunu ve oksidatif DNA hasarını baskılamak suretiyle serbest radikal süpürücüsü ve antioksidan olarak ta görev yapmaktadır. Genel anlamda kurkuminoidler ise zaten glutatyon-s-transferazı indüklemektedirler ve güçlü bir sitokrom p-450 inhibitörü olarak bilinmektedirler [Bourne vd., 1999].

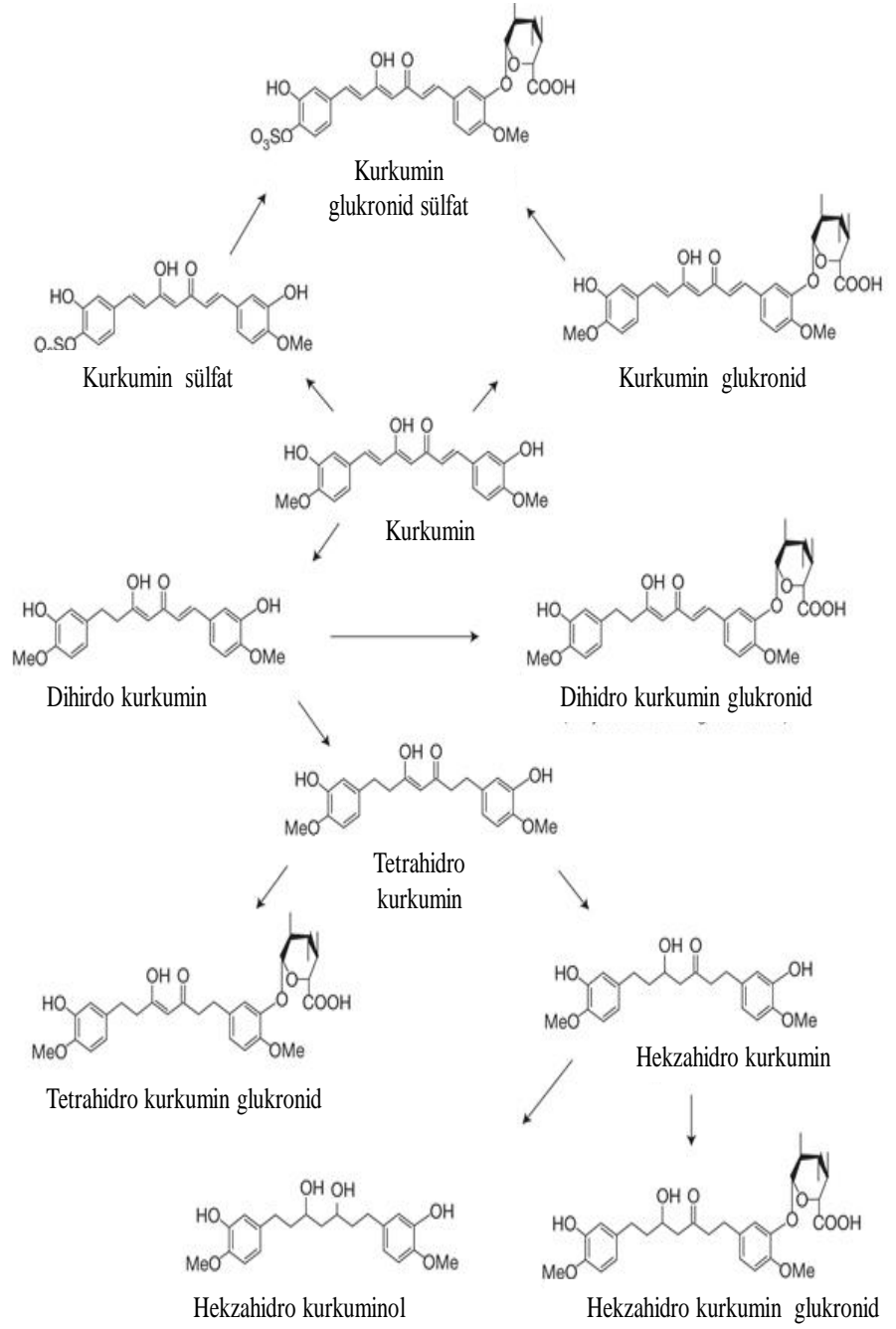
Kurkuminin hippokampus içindeki nörojenezis ve BDNF (brain-derived neurotrophic factor) konsantrasyonu üzerine olumlu etkilerinin olduğunu ve ayrıca

stres, depresyon, anksiyeti gibi olumsuz durumları baskıladığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır [Ng vd., 2006] [Xu vd., 2007] [Wu vd., 2006]. Kurkumin aynı zamanda monoamin oksidaz inhibitörüdür (MAOI) (MAO-A tipi). Alzaymır hastalığı üzerine kurkuminin etkisinin araştırıldığı bir sıçan çalışmasında flöresan göstergeler kurkuminin kan beyin bariyerini aştığını göstermiştir. Pek çok çalışma glukronidlenmiş kurkuminin, serbest kurkuminin aksine lipofilik olduğu için hemen kan beyin bariyerini geçtiğini göstermiştir [Garcia-Alloza vd., 2007] [Begum vd., 2008] [Yang vd., 2005].

2009 da İranlı bir grup kurkumini 28 farklı antibiyotikle ayrı ayrı kombinleyerek *Staphylococcus aureus* a karşı test etmiştir. Çalışmada kurkuminin varlığı antibiyotiklerin etkinliğini cefixime de 52.6%, cephotaxime de 24.9% vancomycin de 26.5% ve tetracycline de 24.4% oranında arttırırken nalidixic acid antibiyotiğinin etkisini azaltmıştır [Shahverdi vd., 2009].

2008 de Salk Institute (Drs. Dave Schubert ve Pam Maher) bir kurkumin pirazol türevini tanımlamışlar ve bu molekülün hafıza üzerine olumlu etkilerinin olduğu ve nöroprotektif olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu türev BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) yi, yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda stimule etmiştir. Bu çalışma kurkuminin felce karşı koruyucu rolünü ortaya koyan UCSD (University of California, San Diego) grubu ile beraber yürütülen bir çalışmadır ve sonuçlar tutarlıdır [Mancuso vd., 2009] [Pam vd., 2010] [Liu vd., 2008] [Wu vd., 2011].

2011 yılında Mariola ve ark. tarafından sıçanlarda kurkumin ve metabolitleri tanımlanmıştır(Şekil2.8).



Şekil 2.8. Sıçanlarda tanımlanmış kurkumin ve metabolitleri [Mariola vd., 2011]

2.2.5. Antikarsinojenik Etkisi

Kurkumin sağlıklı hücrelerde sitotoksik etki göstermemesine rağmen kanser hücrelerinde apoptozisi tetiklemektedir. Bu yeteneğini kanser gibi pek çok inflamatuvar hastalıkla bağlantısı olduğu bilinen transkripsiyon faktör NF-KB(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) ile etkileşime girerek yaptığı düşünülmektedir [Aggarwal vd., 2004].

2009 daki bir çalışmanın sonucuna göre; kurkumin kanser üzerindeki etkisini hücrenin sinyal yolaklarını etkileyerek gerçekleştirmektedir. Bu yolaklar arasında hücre proliferasyon yolağı (cyclin D1, c-myc), hücre yaşam yolağı (Bcl-2, Bcl-xL, cFLIP, XIAP, c-IAP1), kaspaz aktivasyon yolağı (caspase-8, 3, 9), tümör süpressör yolağı (p53, p21) ölüm reseptör yolağı (DR4, DR5), mitokondrial yolak ve protein kinaz yolağı yer alır [Ravindran vd., 2009].

2010 da yapılan bir çalışmada malignant beyin tümöründe kurkumin tümör hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve invasionunu inhibe etmiştir. Etkisini STAT-3 sinyal yolağı aracılığıyla yaptığı düşünülmektedir [Senft vd., 2010].

Kurkumin meme kanserine karşı etkili olan fito-östrojenik etkiye sahip olduğu belirtilmiştir [Bachmeier vd., 2010].

Göğüs kanserinin metastaz aşamasında kurkumin akciğere metastazı inhibe etmiştir [Bachmeier vd., 2007]. Bunun NF-kappa yoluyla gerçekleştirmiş olduğu tahmin edilmektedir [Bachmeier vd., 2008]

Çizelge 2.4. Kurkuminin hücrede etkilediği moleküller [Aggarwal vd., 2007] [Shishodia vd., 2005] .

KİNAZLAR	ENZİMLER	TRANSKRİPSİYONEL FAKTÖRLER	BÜYÜME FAKTÖRLERİ
PhK cPK ERK FAK cAK CDPK JAK JNK MAPK PKA PKB PKC pp60c-src IRAK TK	ATPase ATFase Desaturase DNA pol FTPase GST HO PLD ODCase Telomerase EGF XO	STAT1 STAT3 STAT5 Egr-1 Nrf-2 PPAR- γ EpRE β -catenin STAT4 NF- κ B CBP AP1 HIF1	EGF EGFRK FGF HGF NGF PDGF TGF- β VEGF
GEN EKSPRESYONU	DİĞERLERİ	İNFLAMATUAR SİTOKİNLER	RESEPTÖRLER
DMMP TIMP-3 iNOS CyclinD1 COX-2 LOX TF Gcl NAT-1 LDL-R IAP Hsp70 MDR-1 CTGF	VCAM-1 ICAM-1 Bcl-2 Bcl-xL p53 E-selectin ELAM-1 UPA DFF40 Notch-1 SHP-2 WT1	MIF TNF IL-1 IL-18 C-C MCP IL-12 IL-8 IL-5 IL-2 IL-6	AR Arh-R DR-5 EPC-R ER Fas-R InsP3-R IL8-R EGF-R H2-R LDL-R IR

Çizelgedeki kısaltmalar: NF- κ B, nuclear factor-kappa B; AP-1, activating protein-1; STAT, signal transducers and activators of transcription; Nrf-2, nuclear factor 2-related factor; Egr-1, early growth response gene-1; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor-gamma; CBP, CREB-binding protein; EpRE, electrophile response element; CTGF, connective tissue growth factor; EGF, epidermal growth factor; EGFRK, EGF receptor-kinase; FGF, fibroblast growth factor; HGF, hepatocyte growth factor; NGF, nerve growth factor; PDGF, platelet derived growth factor; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1; VEGF, vascular endothelial growth factor; AR, androgen receptor; Arh-R, aryl hydrocarbon receptor; DR-5, death receptor-5; EGF-R, EGF-receptor; EPC-R, endothelial protein C-receptor; ER- α , estrogen receptor-alpha; Fas-R, Fas receptor; H2-R, histamine (2)-receptor; InsP3-R, inositol 1,4,5-triphosphate receptor; IR, integrin receptor; IL 8-R, interleukin 8-receptor; LDL-R, low density lipoprotein-receptor; MMP, matrix metalloproteinase; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase-3; iNOS, inducible nitric oxide oxidase; COX2, cyclooxygenase-2; LOX, lipoxygenase; Gcl, glutamate-cysteine ligase; NAT, Arylamine N-acetyltransferases; IAP, inhibitory apoptosis protein; HSP-70, heat-shock protein 70; MDR, multi-drug resistance; TNF α , tumor necrosis factor alpha; IL, interleukin; MCP, monocyte chemoattractant protein; MIF, migration inhibition protein; MIP, macrophage inflammatory protein; cAK, autophosphorylation-activated protein kinase; CDPK, Ca²⁺-dependent protein kinase; cPK, protamine kinase; ERK, extracellular receptor kinase; FAK, focal adhesion kinase; IARK, IL-1 receptor-associated kinase; JAK, janus kinase; JNK, c-jun N-terminal kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PhK, phosphorylase kinase; PKA, protein kinase A; PKB, protein kinase B; PKC, protein kinase C; pp60c-src, pp60c-src tyrosine kinase; TK, protein tyrosine kinase; FPTase, farnesyl protein transferase; GST, glutathione S-transferase; HO, hemeoxygenase; ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; ELAM-1, endothelial leukocyte adhesion molecule-1; Bcl-2, B-cell lymphoma protein 2; SHP-2, Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2, uPA, urokinase-type plasminogen activator, DFF40; DNA fragmentation factor, 40-kd subunit.

2.2.6. Potansiyel Riskleri

%85 Kurkumin içeren tümerik oleoresin ile pekçok çalışma yapılmıştır [Dadhaniya vd., 2011].

Kawanishi ve ark. 2005 te iyibir antioksidan olduğu bilinen kurkumini 'double edge sword' 'çift başlı bıçak' a benzetmişlerdir. Antikanser ve antioksidan etkisine ek olarak prooksidan etki gösterebileceğini ileri sürmüşlerdir [Kawanishi vd., 2005].

Karsinojenik etkisinin p53 tümör süpressör yolağının baskılanmasından kaynaklandığını ileri sürülmüştür. Bu durum, insandaki kolon kanseri için önemli bir detaydır [Moos vd., 2004].

İnsanda yapılan klinik çalışmalarında 2-12 gramlık kurkumin miktarı nadirde olsa mide bulantısı ve baş dönmesi gibi yan etkilere sebep olmuştur [Hsu ve Cheng 2007].

Daha yakın zamanda yapılan çalışmalarda; duyarlı hastalarda hepsidin proteinini baskılayarak ve demiri tutarak, demir metabolizmasını etkileyerek demir eksikliğine sebep olduğu görülmüştür [Jiao vd., 2009] bu konu ile ilgili çalışmalar yetersizdir [Burgos-Moron vd., 2010].

Kurkuminin hamile kadınlarda olumlu yada olumsuz etkilerinin olduğunu gösteren çalışma yoktur. Bununla birlikte yine de kurkumin içeren ürünlerin uterusu uyarabileceği için düşük tehlikesi taşıyabilmektedir (bu konuda hiçbir kanıt olmamasına rağmen). Hamile domuz ve guena domuzlarında kurkuminin embriyo yada hamilelik üzerinde olumlu yada olumsuz hiçbir etkisine rastlanmamıştır [Vijayalaxmi 1980] [Jheng-Yu vd., 2007].

2.2.7. Kurkuminin Genotoksik Ve Apoptotik Etkileri

Kurkumin (CR), klorojenik asit (CGA) ve β -karoten (BC) in γ -radyasyona karşı koruyucu etkisi, fare kemik iliğinde in vivo olarak çalışılmış ve polikromatik eritrositlerde mikronukleus miktarına bakılmıştır. γ -radyasyon (1.15) Gy; 0.05 Gy/s)a maruz bırakılan hücrelerde MN seviyesi artmıştır. Hem radyasyon hemde CGA (50, 100 ve 200 mg/kg b.w.), CR (5, 10 ve 20 mg/kg b.w.) ve BC (0.5 and 2.5 mg/kg b.w.) ye maruz bırakılanlarda ise polikromatik eritrositlerdeki mikronukleus miktarı doza bağlı olarak azalmıştır. Böylece kurkumin klorojenik asit ve β -karotenin, γ -radyasyona karşı koruyucu etkisi kanıtlanmıştır [Abraham vd., 1993].

Cao ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada; İn vitro ortamda HepG2 kullanan ekip kurkumini tek başına ve siklofosfamid (CP) ile kombinleyerek MN yöntemi ile test etmiştir. 8 ve 16 μ g/ml lük konsantrasyonlardaki kurkumin MN oranını arttırırken, 2 μ g/ml lük konsantrasyondaki kurkumin CP nin toksik etkisini azaltmıştır [Cao vd., 2007].

Bandyopadhyaya ve arkadaşları kurkuminin etkilerini nikotine karşı test etmişlerdir. Nikotin her ne kadar sigara yoluyla akciğerlere solunsada karaciğerde metabolize edilmektedir. Bu yüzden doku olarak sıçan karaciğeri seçilmiştir. Karaciğerdeki toplam DNA konsantrasyonu ölçümü ve komet testi kullanılmıştır. Nikotine maruz bırakılan dişi sıçanların karaciğerlerindeki toplam DNA miktarı kontrol gurubuna göre anlamlı seviyede azalmıştır. Komet testi ile DNA hasarı ölçüldüğünde ise DNA hasarı kontrol gurubuna kıyasla anlamlı seviyede artmıştır (p < 0.001). Bu diyete ek olarak kurkumin eklendiğinde ise sadece nikotinin kullanıldığı deney gurubuna kıyasla karaciğerdeki toplam DNA miktarı artarken, komet testi ölçümlerindeki DNA hasarı azalmıştır (p < 0.01). Sadece kurkuminin kullanıldığı grupta ise toplam DNA miktarı en yüksek seviyede çıkarken, komet

testindeki DNA hasarı oranı en düşük seviyede çıkmıştır ($p < 0.001$) [Bandyopadhyaya vd., 2008].

Tiwari ve ark. tarafından kurkuminin, sulardaki kirleticilerden olan arsenik (As) ve florid (F) e karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. İnsan periferik kan lenfositleri kullanılmış ve dokuz deney gurubu oluşturulmuştur (negatif kontrol, pozitif kontrol (EMS; 1.93 mM), sadece kurkumin(1.7 μ M), sadece kimyasallar As (1.4 μ M), F (34 μ M) ve kurkumin+ kimyasallar). 24 saatlik uygulamanın sonunda, hücre kültürleri; kromozomal aberasyonlar (hem sayısal hem yapısal) ve komet testi ile test edilmiştir. Çalışma sonucunda kurkuminin varlığı; hem arsenik hem de floridin toksik etkilerini azaltmıştır [Tiwari vd., 2010].

Srinivasan ve ark. tarafından, Kurkuminin radyoaktiviteye karşı koruyucu etkisi primer siçan hepatosit kültürlerinde test edilmiştir. Süperoksit dismutaz, katalaz gibi antioksidanların ölçümü yapılmış ve komet testi kullanılmıştır. Kurkumin kullanılmayan guruplarda radyasyondaki doz artışına bağlı olarak (1, 2 ve 4 Gy) DNA hasarı artmıştır. Kurkumin eklendiğinde (1, 5 ve 10 μ g/ml) DNA hasarı doza bağlı olarak azalmış ve antioksidan enzim seviyeleri artmıştır [Srinivasan vd., 2007].

2.3. SIÇANLAR

Alem: Animalia

Şube: Chordata

Sınıf: Mammalia

Takım: Rodentia

Familya: Muridae

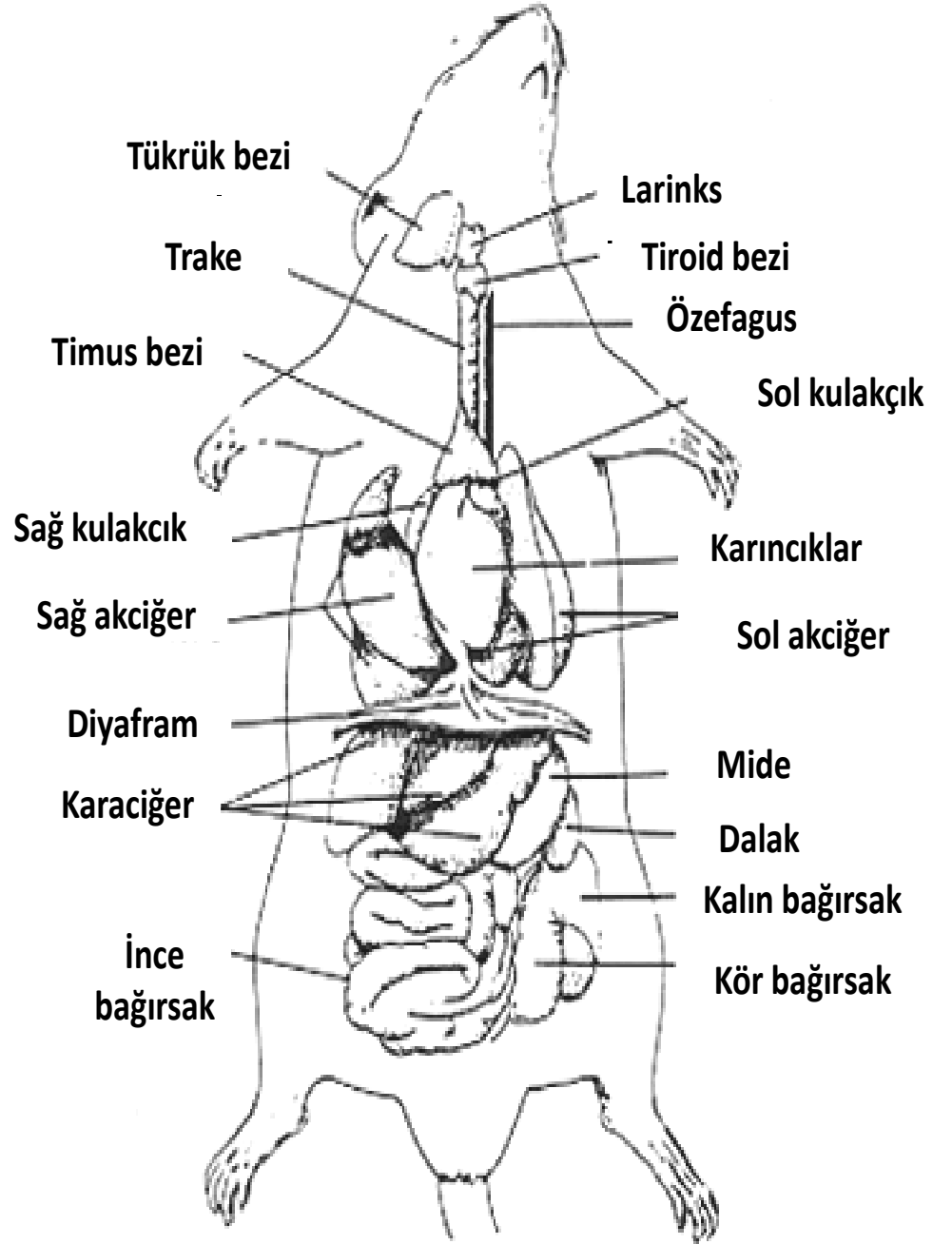
Cins: Rattus Tür: *Rattus rattus* ve *Rattus norvegicus*

Sıçanlar birçok fizyolojik ve farmakolojik çalışmada deney hayvanı olarak kullanılmaktadır. Tercih edilmesinin nedeni çabuk üreyebilmesi, deney uygulamalarında kullanımının ve bakımının kolay olması ve kısa sürede genetik açıdan benzer nitelikte gruplar oluşturulabilmesidir. Gibbs ve ark. tarafından sıçanın genetik haritasının çıkarılmasının ardından genetik çalışmalarda da çok fazla tercih edilen bir laboratuvar hayvanı haline gelmiştir [Gibbs vd., 2004].

Sıçanlar tüysüz, gözleri ve kulak kanalları kapalı olarak doğarlar. Yavru sayısı ve doğum ağırlığı birbiriyle ters orantılıdır. Kulak kanalı 2,5-3,5 günlükken, gözler 14-17 günlükken açılır. Hayvanlar 7-10 günlük yaşa ulaştıklarında tüyleri tümüyle çıkmış olur. Sütten kesilme 21. günde şekillenir. Bu yaştaki sıçan yavruları su içmeye ve yem tüketmeye başlamışlardır. Dişilerde fertilitite 7-9 aylık yaşa ulaştıklarında azalmaya başlar. Erkeklerin üreme yetenekleri dişilere göre daha uzun sürer fakat iki yaşına yaklaşmış erkek sıçanda üreme yeteneği azalmaya başlamıştır. Bizim çalışmamızda kullandığımız sıçanlar 5 haftalık erkek sıçanlardır. Şekil 2.9.de kullanılan sıçanların anatomik yapısı gösterilmektedir [Soylu, 2012].

2.3.1. Davranış

Sıçanlar nokturnal hayvanlar olduklarından, daha çok gece ve sabaha doğru aktivite gösterirler. Gün ışığı almayan odalarda barındırılan sıçanların ışık-karanlık döngüleri değiştirilerek hayvanların gündüz aktif olmaları ve böylelikle araştırmacılarla aynı zamanda uyanık kalmaları sağlanabilir. Bu değişimin gerçekleşebilmesi için iki haftalık bir uyum süresi gereklidir [Soylu, 2012]. Bu çalışmada kullandığımız sıçanlar zaten çalışmanın yürütüldüğü Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Araştırma Merkezinde üretilmiş ve burada büyümüş hayvanlardır.



Şekil 2.9. Sıçanların anatomik yapısı.

3.2. Çevre Ve Vücut Isısı

Sıçanlar 10 °C ile 30 °C arasındaki çevre sıcaklıklarına uyum sağlayabilirler. Ancak sıçanlar için optimal çevre sıcaklığı 20 °C ile 26 °C arasındadır. Erkek sıçanların yüksek çevre sıcaklıklarına (31,6 °C - 32,5 °C) maruz kalması geri dönüşümsüz testis harabiyetine, dişilerde ise laktasyonun normal seyrinin bozulmasına neden olabilmektedir [Faith vd., 2006] [whishaw vd., 2006][Soylu, 2012].

2.3.3. Işık

Uygulanan ışık süresinin östrus siklusunun uzunluğu üzerine önemli bir etkisi vardır. Aydınlık/karanlık süresi 12 saat/12 saat olan sıçanlarda östrus süresi 4 gün iken, 16 saat/8 saat olan hayvanlarda östrus 5 gündür. Hayvanlar gün içerisinde 22 saat süreyle ışığa maruz bırakıldıklarında ise östrus siklusunun düzensizleştiği ve hayvanların üreyemedikleri görülmüştür [Faith vd., 2006] [Soylu, 2012].

2.3.4. Dolaşım

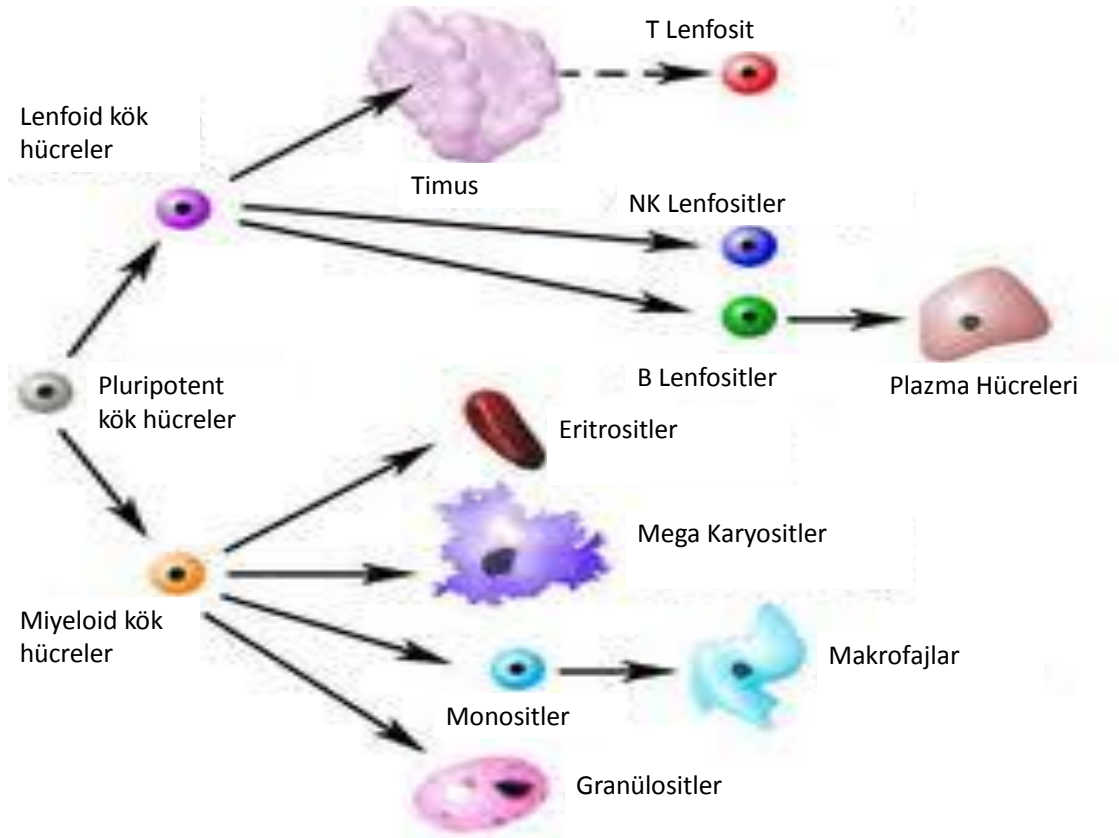
Diğer memelilerden farklı olarak ve balıklardakine benzer şekilde kalbin ekstrakoronar damarlarla da bağlantısı söz konusudur. Kalp kası aksiyon potansiyeli kalp atım sayısı fazla olan hayvanlarda daha kısa süreli şekillenmektedir. İnsanda kalp kası aksiyon potansiyeli 200-500 msn iken yetişkin sıçanın kalp kası aksiyon potansiyeli yaklaşık 100 msn'dir [Langer vd., 1978][Soylu, 2012].

2.3.5. Hematoloji

Hematopoezis kemik iliği ve dalakta gerçekleşir (Şekil 2.10). Genç bir sıçanın kemik iliğinde hücre profili % 45 oranında lenfositlerden oluşurken

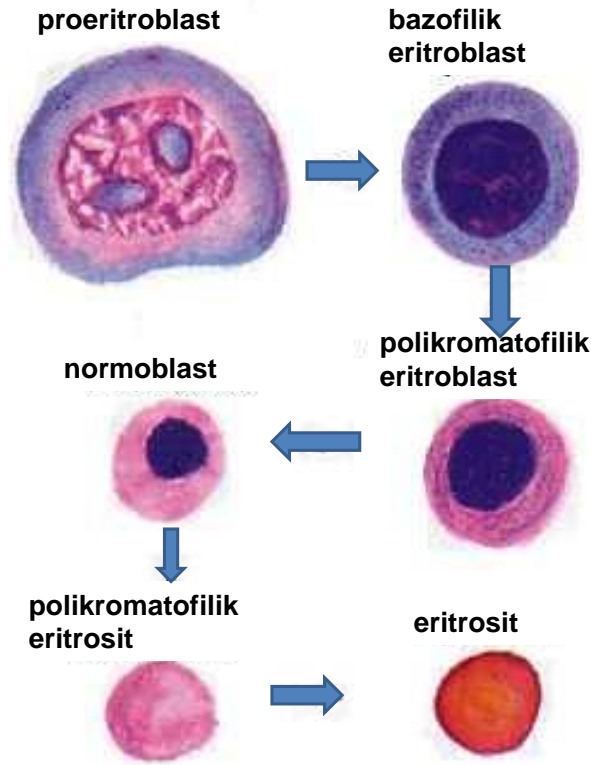
yetişkinde bu oran % 5'tir. Kemik iliğinde olgunlaşan granülositlerde sıçanlara özgü olarak yüzük formunda ortası delik hücelere rastlanır. Yüzük görümlü granülositler myelosit ve metamyelosit arasında bir geçiş formudur.

Kalpten alınan kan örnekleriyle karşılaştırıldığında kuyruk venasından alınan kan örneklerinde akyuvar sayısı belirgin olarak yüksektir. Ayrıca kuyruk venasından ve periorbital sinüsten alınan kan örneklerinde hemoglobin ve hematokrit değerleri kalpten alınan kana göre daha düşüktür. Uygulanan kan alma tekniğinden bağımsız olarak arteriyel kan venöz kana göre daha az sayıda akyuvar ve serum protein düzeylerine sahiptir. Kan parametrelerine dair en tutarlı değerlerin sağ kalpten alınan kanda yapılan ölçümlerde elde edildiği bildirilmektedir. [Halpern vd., 1957] [Jain vd., 1993] [Schwabebauer vd., 1991] [Smith vd., 1986].



Şekil 2.10. Kan hücrelerinin oluşumu

Mikronukleus miktarının saptanması için mikroskop altında çekirdekli hücrelerden polikromatik eritrositler sayılır. Komet testi için ise hangi çekirdekli hücre olduğuna bakılmaksızın tüm kan hücrelerindeki DNA göçü dikkate alınır. Şekil 2.11 da polikromatik eritrositlerin oluşumu gösterilmiştir.



Şekil 2.11. Polikromatik eritrositlerin oluşumu.

Eritropoezis aşamasında son mitozdan sonra kemik iliğindeki eritroblastlar polikromatik eritrositlere (PCE) dönüşürken çekirdeklerini kaybetmekte ve bu sırada meydana gelen kromozomal hasar sitoplazmada MN oluşumuna neden olmaktadır. MN içeren tam olarak olgunlaşmamış (polikromatik) eritrosit sayısındaki artış

kromozomal hasarın veya anafaz gecikmesi sonucu meydana gelen sitogenetik hasarın bir göstergesidir.

Mikroskopta her preparat üzerinde rastgele 1000 adet PCE sayılır ve bunların içerisindeki MN taşıyanların sayıları tespit edilerek yüzdeleri çıkarılır. PCE'ler gelişimlerinin ara aşamasında olan, olgun olmayan eritrositlerdir. Yapılarında hâlâ ribozom bulundurlar ve ribozomların boyanma özelliklerinden dolayı, gelişimlerini tamamlamış olgun normokromatik eritrositlerden (NCE) ayırt edilebilirler. NCE'ler ışık mikroskopunda mavi-yeşil arası bir renkte görülürken, daha büyük olan PCE'ler sarımsı turuncu renkte görülmektedirler. PCE'lerin içerisinde oluşan MN'ler ise, ana çekirdeğin üçte bir ya da daha az çapında, boyanma özelliği ana çekirdeğin boyanma özelliği ile aynı, yuvarlak şekilli, koyu mavi renkli olması nedeni ile kolaylıkla ayırt edilebilmektedirler [Şekeroğlu vd., 2011].

Kandaki bir diğer çekirdekli hücre grubu ise lenfositlerdir. Lenfositlerin en önemli özelliği, eritrosit, granülosit, trombosit gibi birer uç (son) hücre olmamalarıdır. Lenfositler bölünebilen ve yeni lenfositler verebilen hücrelerdir. İmmunojenik(antijenik) bir uyarı ile karşılaştıklarında, morfolojik dönüşüm gösterir, farklılaşır ve çoğalırlar. Sıradan bir insan vücudu ortalama 10^{12} lenfoid hücre içerir ve lenfoid doku toplam vücut ağırlığının %2 sini oluşturur. Lökositlerin %20-40 kadarı lenfositlerdir. Lenfositler için normal değer bir litre kanda $(1-5) \times 10^9$ dur. Lenfositozis (kandaki lenfosit sayısı $>5 \times 10^9/L$) viral enfeksiyonlara (EBW, CMV, HIV, TBC, toksoplazmolizis gibi kronik enfeksiyonlar) tepki olarak oluşur. Aynı zamanda KLL(kronik lenfosit kösemi) ve bazı lenfoma hastalıklarında da ortaya çıkar.

Morfolojik açıdan lenfositler üçe ayrılır;

1) Dar sitoplazmalı küçük lenfositler; kandaki lökositlerin en küçüğüdür ($10\mu m$). Mavinin değişik tonlarında boyanabilirler ayrıca sitoplazma çok dar ve granülsüzdür . Çekirdek çapı yaklaşık $9\mu m$ 'dur.

2) Geniş sitoplazmalı büyük lenfositler; lenfositlerin yaklaşık % 10'unu oluşturur. Açık gök mavisi renge boyanan, nispeten geniş bir sitoplazması vardır.

3) Sitoplazmaları granüllü büyük lenfositler.

İşlevsel açıdan lenfositler;

Doğal Öldürücü Hücreler (Natural Killer); doğal bağışıklığın bir parçası sayılırlar ve konağın Tümörlere ve virüslerle enfekte olmuş hücelere karşı savunmasında en büyük rolü oynarlar. Doğal öldürücü hüceler, tümörleri ve enfekte olmuş hüceleri, normal ve enfekte olmamış hücelerden ayırabilmek için sınıf 1 Major Histokompatibilite Kompleksi deneni yüzey proteinlerinin hücelerdeki düzeyini algırlar. Doğal öldürücü hüceler, interferonlar deneni sitokinlere yanıt olarak işlevsel konuma gelirler. İşlevsel doğal öldürücü hüceler sitotoksik granüller salgılayarak hedef hüceleri öldürürler.

T-Lenfositleri (Thymus Dependent); kanda dolaşan bütün lenfositlerin % 80'ini oluştururlar. Hücresel bağışıklıktan sorumludurlar. Ayrıca B lenfositlerin aktivasyonunda görevleri vardır. T lenfositler efektör hücre haline geldikleri zaman farklılaşarak Yardımcı ve Sitotoksik T lenfosit olarak görev yaparlar.

B-Lenfositleri (Burssa Fabricus Dependent); ise humoral bağışıklıktan sorumludurlar. Antikor üretirler.

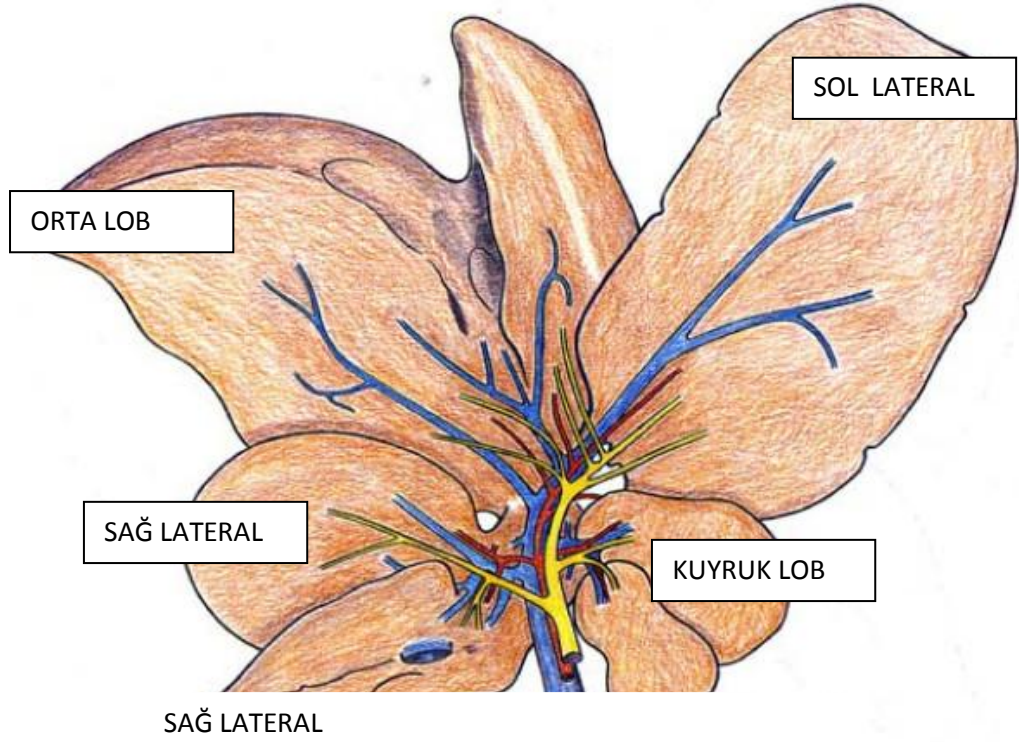
2.3.6. Karaciğer

Bu tez çalışmasında kullanılan diğer bir materyal ise sıçan karaciğeridir. Karaciğer; proteinlerin üretilmesi ve depolanması, protein metabolizmalarının birçok yan üretimlerinin tanzim ve kontrol edilmesinden sorumlu organdır. Bunların yanı sıra;

- Şekerin depolanması ve kanda bulunması gereken şeker miktarının ayarlanması.
- Vücuttaki toksik maddelerin nötralize edilmesi.
- Depo edilmiş yağların kullanılması.
- Kanın pıhtılaşması için gerekli maddelerin üretilmesi.
- Safra ve safra tuzlarının üretilmesi.
- Kırmızı kan hücreleri ve başka kan elemanlarının üretimi için gerekli ve önemli olan maddelerin üretimi ve depolanması.
- Safra salgılanması.
- Vücut ısısının ayarlanması,
- Vücudun ihtiyacı olan su ve vitaminlerin dengesinin sağlanması,
- Kan miktarını ayarlanması,
- Hormonların görevleri üzerinde belli etkiler gibi pek çok görevi bulunmaktadır.

Bütün bunlar insan karaciğerinin, sıçan karaciğeri ile görev bakımından ortak olan özellikleridir. Görev bakımından sıçan ve insan karaciğeri benzer özelliklere sahip olsada morfolojik açıdan bazı farklılıkları bulunmaktadır. İnsan karaciğeri tek lobdan meydana gelirken sıçan karaciğeri dört lobdan meydana gelmektedir. Ancak bu loblar arasında görev dağılımı bakımından bir farklılık bulunmamaktadır.

- **Orta veya sistik lob:** Merkezde yarıktır.
- **Sol lateral lob:** Büyüktür ve kısmen stoma(açıklık)lar vardır.
- **Sağ lateral lob:** Anterior ve posterior olmak üzere kısmi bir ayrışımı vardır. Orta lob tarafından gizlenmiştir.
- **Uç yada kuyruk lob:** Küçüktür, mide ve özefagus tarafına çok belirgin bir kıvrım yapar (Şekil 2.12 ve 13).



Şekil 2. 12. Sıçan karaciğerindeki loblar.



Şekil 2.13. Fotoğraf Michigan State üniversitesindeki 'Sıçan karaciğerinden hepatositlerin izolasyonu' adlı bir çalışma esnasında çekilmiştir. Karaciğer perfüzyon metodu ile kanın uzaklaştırıldığı bir sıçan karaciğeri görülmektedir (Kodak DX4900 camera 2004-04-27)

2.3.7. Solunum

Akciğerin ağırlığı vücut büyüklüğü ile orantılıdır. Fakat akciğerin yüzey alanı tüketilen oksijen miktarıyla orantılıdır. Bu nedenle alveol çapı, birim canlı ağırlık başına tüketilen O₂'nin ifadesi olan metabolik hız ile ilişkilidir. İnsan ve sıçanın alveol genişlikleri karşılaştırıldığında, sıçandan 17 kat daha ağır olan bir insanda alveol çapının sadece üç kat daha geniş olduğu görülmektedir (yetişkin sıçanda alveol çapı 70 µm, insanda 200-250 µm'dir). Aynı şekilde toplam akciğer yüzey alanı karşılaştırıldığında ise insanın sıçandan sadece 10 kat daha geniş bir yüzey alanına sahip olduğu görülmektedir (toplam akciğer yüzey alanı 400 g ağırlığında bir sıçanda 7,5 m² iken, 70 kg ağırlığındaki bir insanda 75m²'dir) [Hofstetter vd., 2006][Soylu, 2012].

2.3.8. Sindirim Sistemi

Yarığı olan bir üst dudağa ve tam bir alt dudağa sahiptir. Her iki çenede de iyi gelişmiş kesici dişler bulunur. Köpek dişleri yoktur fakat bunların yerinde diastema adı verilen bir boşluk bulunur ve yanak buraya doğru girinti yapar. Bu girinti kemirme mekanizması ile gerideki yanak boşluğu arasında bir sınır oluşturur. Özefagusun mideye girdiği noktada, ön mide ve bezsel mideyi ayıran anatomik sınırın yarattığı katlanma nedeniyle sıçanlar kusamazlar. Sıçanların bu özelliği bizim bu tez çalışmamızda, kimyasalı gavaj yöntemiyle uyguladığımız için çok büyük avantaj sağladı. Sıçanlar omnivor hayvanlardır. Bu nedenle laboratuvar yemi yapımında hem bitkisel hem de hayvansal kökenli yem maddeleri kullanılmaktadır. Hem etkili bir enzimsel sindirim, hem de gelişmiş bir sekuma sahip olduklarından etkili bir fermentatif sindirim yapabilme özellikleri vardır. Genellikle 2-3 yıl yaşarlar ancak daha düşük kalorili besinlerle beslenen sıçanların daha uzun süre yaşadıkları bildirilmektedir [Soylu, 2012] [Hofstetter vd., 2006] [Wu vd., 1994][Poyraz, 2000].

Çizelge 2.5. Sıçanlara ait bazı fizyolojik değerler [Kaya vd., 2010] [Soylu, 2012].

Erişkin vücut ağırlığı (dişi) 200-300 g
Erişkin vücut ağırlığı (erkek) 300-500 g
Doğum ağırlığı 5-6 g
Vücut yüzey alanı 230 cm ² /50 g ;
250 cm ² /130 g ;
325 cm ² /200 g
Vücut sıcaklığı 35.9-37.5 °C
Yaşam süresi 2.5-3.5 yıl
Gıda tüketimi 5-6 g/100 g CA/gün
Su tüketimi 10-12 ml/100 g CA/gün
Gastrointestinal kanal geçiş zamanı 12-24 saat
Seksüel olgunluk (dişi) 65-110 gün (13 hafta)
Seksüel olgunluk (erkek) 65-110 gün (13 hafta)
Siklus uzunluğu 4-5 gün
Östrus süresi 14 gün
Gebelik süresi 21-23 gün
Yavru sayısı 6-12
Doğurganlık süresi 350-440 gün
Işık periyodu (aydınlık / karanlık) 12 / 12
Oksijen tüketimi (250 g CA için) 0.84 (0.68-1.10) ml/g/saat
Kalp atım sayısı 250-500/dak
Kan volümü 54-70 ml/kg
Kan basıncı 84-134/ 60-68 mmHg
Kan volümü 57.5-69.9 ml/kg
Eritrosit sayısı (RBC) 5-10 x 10 ⁶ /mm ³
Hematokrit (PCV) % 36-57
Hemoglobin (Hb) 11-18 g/dl
Ortalama alyuvar hacmi (MCV) 46.0-65.0 fl
Ortalama alyuvar Hemoglobini (MCH) 11.9-19.0 pg
Ortalama alyuvar hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) 25.9-35.1 g/dl
Lökosit sayısı (WBC) 3-17 x 10 ³ /mm ³
Nötrofil % 9-34
Lenfosit % 65-85
Eozinofil % 0-6
Monosit % 0-5
Bazofil % 0-1.5
Trombosit sayısı (PLT) 500-1300 x 10 ³ /mm ³
İdrar pH 7.3-8.5

2.4. APOPTOZ

Organizma sürekli bir denge halindedir. Yeni hücreler sentez edilirken, varolan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta ve böylece denge korunmaktadır. Hücre ölümünün iki tipi vardır, bunlar apoptoz ve nekrozdur. Her ikisinde de düzenli olarak birbirini izleyen biyokimyasal ve morfolojik olaylar sonucu hücre ölümü meydana gelmektedir [Ameisen vd., 1996] [Thompson vd., 1995] [Kiess vd., 1998] [Yılmaz, 2005].

Hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm ilk olarak 1842 yılında Vogt tarafından tanımlanmıştır. Programlanmış hücre ölümü terim olarak ilk kez 1965 yılında kullanılmıştır. Apoptoz terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır [Kerr vd., 1972]. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır.

Köken olarak "apo-TOE-sis" 'den gelmektedir ve eski Yunanca'da "sonbaharda yaprak dökümü" anlamına gelmektedir [Touchette vd., 1991]. Hücre proliferasyonu nasıl ki mitoz ile belirlenmekte ise belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptoz ile belirlenir [Bellamy vd., 1995] [Cummings vd., 1997]. Apoptoz ve mitoz dokuda sürekli bir denge halindedir. Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptoz ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir [Majno vd., 1995] [Schwartzman vd., 1993][Yılmaz, 2005] [Karakaş, 2010].

Wyllie, 1980 yılında deneysel apoptozu, glukokortikoidlere maruz bırakılan olgunlaşmamış timus hücrelerinde gerçekleştirmiş ve apoptotik hücre DNA'sının elektroforetik jel ayrımını yaparak, hücrede DNA bütünlüğünün kalmadığını, apoptotik hücre için karakteristik olan merdiven tarzında DNA kırılım bantlarının oluştuğunu göstermiştir [Wyllie vd., 1980].

1993 yılında Cohen yüksek dozda kullanılan steroidlerin timus hücreleri üzerine etkilerini incelemiş ve timus hücrelerinin doğrudan apoptozu seçmediğini, hücre ölümüne neden olacak genleri oluşturarak hücreleri apoptozu yönlendirdiğini bildirmiştir [Cohen vd., 1993]. Böylece apoptozun genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkmıştır. Apoptoz genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla yeniden düzenlenir [Cohen vd., 1993]. Nekrozda hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plasma membranı yırtılır. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek inflamasyona neden olur. Apoptoz sırasında ise plazma membranı yırtılmaz. Apoptozun gerçekleşebilmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptoz veya nekroz ile öleceğine yön verir. Bu da mitokondrinin önemini apoptozun erken fazında göstermektedir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjii sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir. Apoptoz hücre içi yada hücre dışı sinyallerle tetiklenebilir (Çizelge 2.6). Apoptoz, hücre intihar şeklidir ve hücre kendi kendisini aktif olarak yok eder. Bu olay nükleer büzülme ve DNA fragmentasyonu ile karakterizedir [Gavrieli vd., 1992] [Karakaş, 2010] [Yılmaz, 2005].

Apoptotik hücre ölümündeki biyokimyasal ve morfolojik değişimler, aspartik asit spesifik proteazların sistein gruplarının aktivasyonu sonucu meydana gelmektedir. Bu proteazlara kaspaz ("caspase"= cysteine –containing aspartate specific proteases) adı verilmektedir. Kaspaz aktivasyonu apoptozun en belirgin özelliği olup bu mekanizmanın anahtar elemanları *C. Elegans*'tan *Drosophila melanogaster*'e sonuçta memelilere kadar evrim süresince korunmuştur. Apoptotik hücre ölümünde *C. elegans*'da dört gene (ced-3, ced-4, ced-9 ve egl-1) ihtiyaç duyulmaktadır. Ced-3 bir sistein proteaz olup interleukin-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. İnsanda tanımlanmış olan kaspazlar ve alternatif isimleri Çizelge 2.7 de gösterilmiştir [Karakaş, 2010]

Çizelge 2.6. Apoptozu tetikleyen hücre içi ve dışı ajanlar [Karakaş, 2010].

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 gen		
Glukokortikosteroitler	Sitotoksik T hücreler		
	Oksidanlar		
	Serbest radikaller		
	Besin eksikliği ve Antimetabolitler		

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 salınımı ve uyarılmasından sorumludurlar fakat Kaspaz-1 ve Kaspaz-4 apoptozda da rol oynar. Ayrıca kaspaz -1, -4, -5 tetrapeptid olup kendi kendilerine aktive olabilmektedirler [Karakaş, 2010].

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

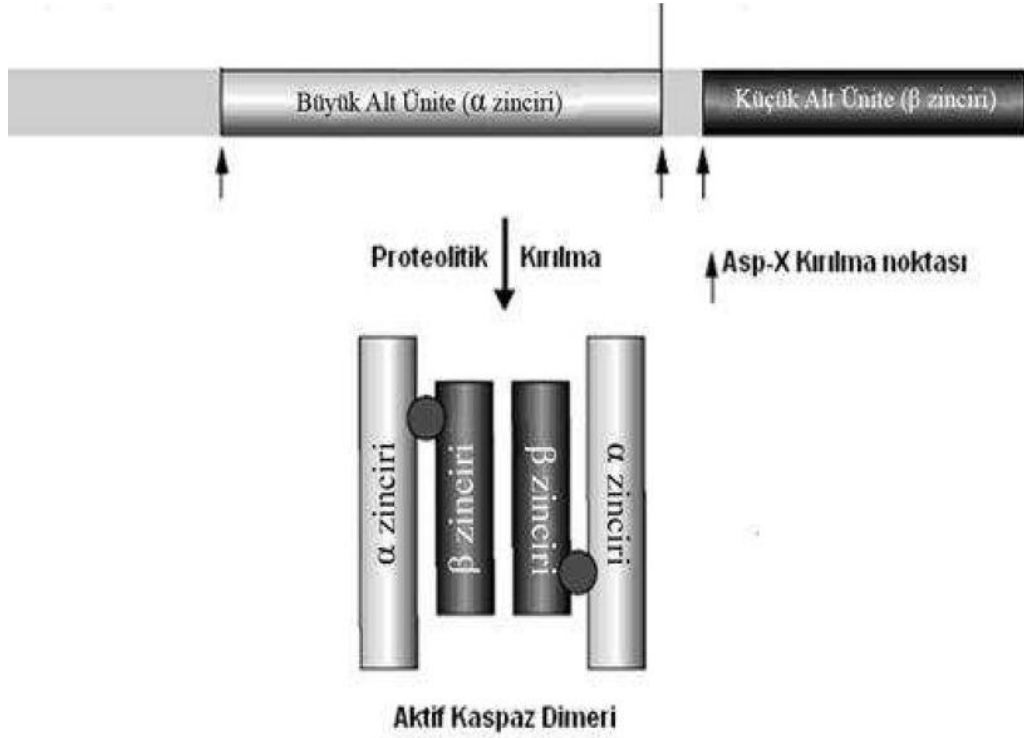
Bunlara Sınıf II ya da sonlandırıcı (effektör) kaspazlar da denilir. Yapısal ve biyokimyasal kanıtlar, aktif kaspazların her biri bir aktif bölgeye sahip benzer katalitik birimlerin bağlanması ile oluşan dimerler olduğunu göstermiştir. Kaspazların aktif formdaki üç boyutlu yapısı, her katalitik ünitenin 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 [Karakaş, 2010].

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.

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 (Şekil 2.14). 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 [Karakaş, 2010].

Çizelge 2.7 İnsan kaspaz ailesi [Karakaş, 2010].

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



Şekil 2.14 Kaspazların aktivasyonu [Grütter, 2000].

2.4.1. Apoptozda Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 in 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 ünite oluşmaktadır. Bu iki alt ünite dimerize olarak aktif enzimi oluşturmaktadır [Fernandes-Alnemri T, 1994][Karakaş, 2010] [Yılmaz, 2005].

32 kDa'luk kaspaz-3 prekürsörü (prokaspaz-3 veya pro-CPP32) CED3 proteini ile % 35 benzerlik göstermektedir [Fernandes-Alnemri, 1994]. Kaspaz-3 aktivasyonu

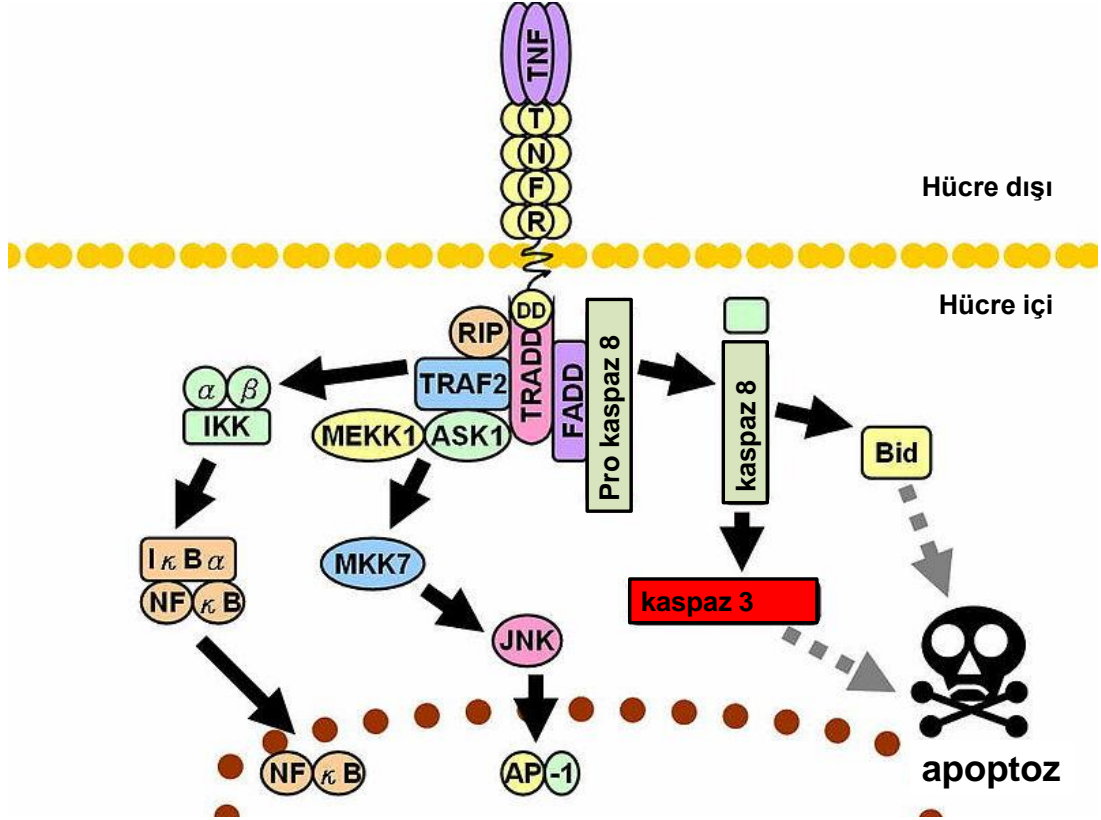
ICE (kaspaz-1), kaspaz-9, granzim B ve Mch4 (kaspaz-10) aracılığı ile gerçekleşmektedir. Granzim B ve kaspaz-10 tarafından Asp175'den prokaspaz-3'ün kırılması sonucu p20 ve p12 alt üniteleri oluşur. P20 ve p12 alt üniteleri de birleşerek aktif kaspaz-3 dimerini meydana getirir [Fernandes-Alnemri T 1996] [Karakaş, 2010].

Yapılan çalışmalar, Kaspaz-3'ün katalitik sistemin residüsündeki mutasyonun, kaspaz-3 aktivitesini durdurduğunu göstermiştir [Fernandes vd., 1994]. Ayrıca kaspaz-3 aktivasyonunun apoptoz sırasındaki birçok uyaran 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.

Kaspaz-3'ün hedefi olan çok sayıda protein bulunmaktadır. Bunlar arasında poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP; DNA tamiri), U1-70K, 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 [Fernandes-Alnemri vd., 1996]. Aktive olan bu proteazlar ise diğer hücre proteinlerinin parçalanmalarını katalizler (Şekil 2.15).

Bu çalışmada kullanılan diğer bir protein kaspaz 8 dir. Kaspaz 8 geni tarafından kodlanır ve hücrenin apoptozunda düzenleyici olarak merkezi rol oynar. Proenzim olarak sentezlenir. Bir prodomain, bir büyük proteaz alt ünite ve bir küçük proteaz alt ünitesinden oluşur. Enzimin aktifleşmesi, büyük ve küçük heterodimerik alt ünitelerin, proteolitik yarımlarıyla olur. Bu enzim FAS ve diğer apoptotik dış uyaranlar yoluyla apoptoz yolağında görev yapar. Dışardan gelen bir ölüm sinyaliyle

uyarılan N-terminal FADD, kaspaz 8 proenzimini aktifleştirir ve apoptoz sürecini başlatır. Bu protein huntington hastalarının etkilenmiş beyin alanlarında tanımlanırken, herhangi bir nörodejeneratif problemi olmayan sağlıklı kontrol gruplarında görülmemiştir.



Şekil 2.15. Kaspaz 3 ve 8'in apoptozdaki yeri ve önemi.

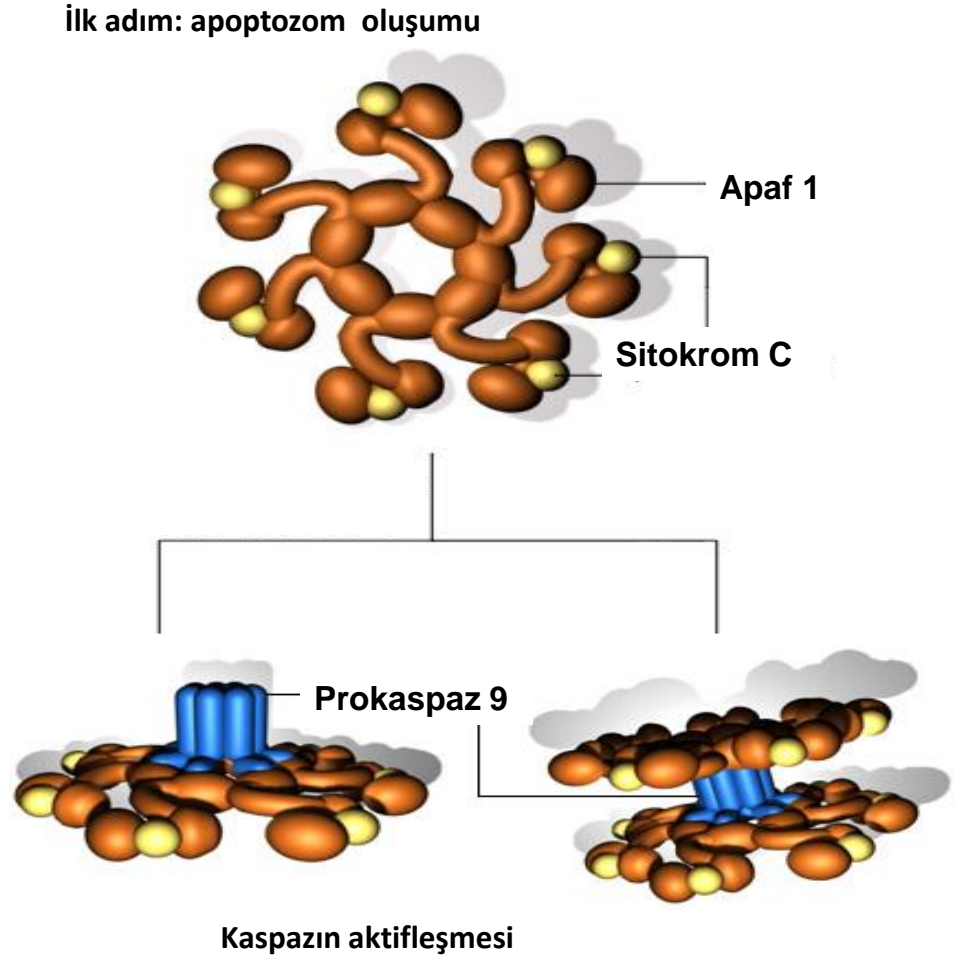
2.4.2. Apoptoz Mekanizmaları

Apoptozun indüklenmesinde 3 tip sinyal yolunun rol aldığı bilinmektedir.

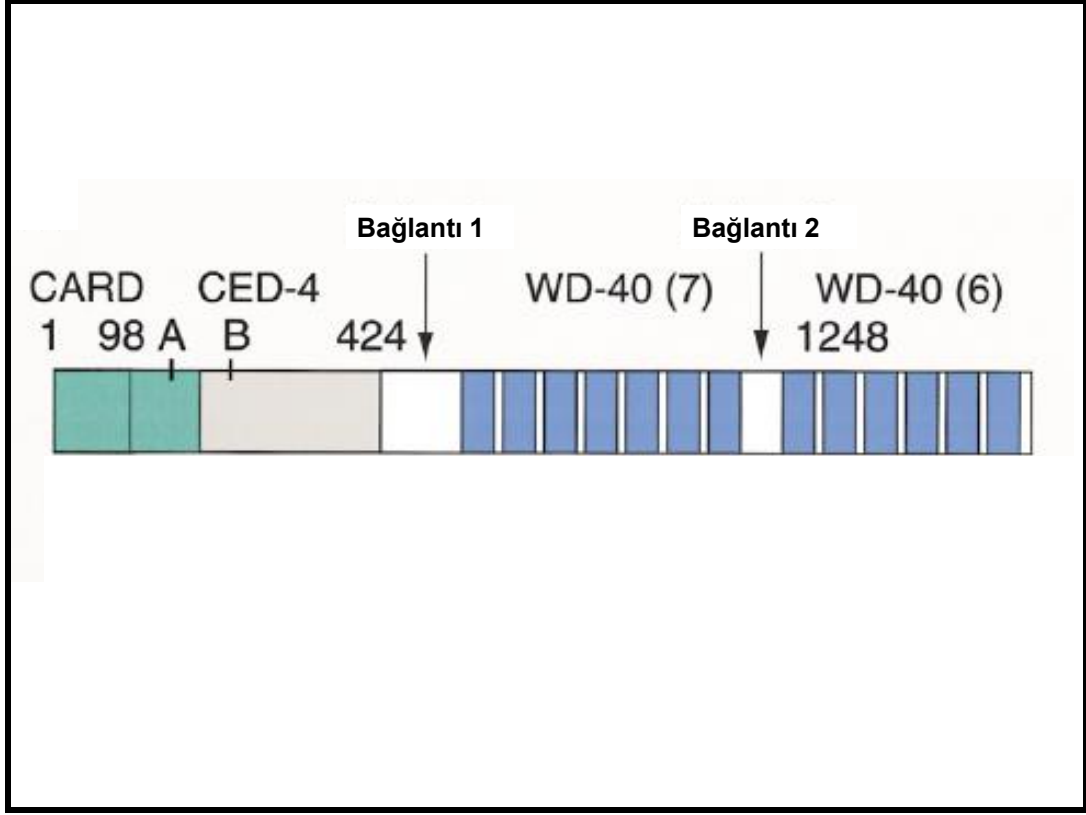
1. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptoz oluşturulması.
2. Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile tetiklenme.
3. Endoplazmik Retikulum aracılı apoptoz oluşturulması.

.4.2.1. Mitokondri/sitokrom-c aracılı apoptoz oluşturulması[Yılmaz, 2005].

Mitokondri normal şartlar altında ATP oluşturmak üzere sitokrom-c ihtiva eder. Mitokondrial stres durumlarında serbestlenen sitokrom-c apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3 aktivasyonu için önemli rol teşkil eder). Bu yolda mitokondri tarafından kontrol edilen apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ve kaspaz-9 bulunmaktadır [Takagi vd., 2003] [Hu vd., 1999]. Ko-faktör nukleotid trifosfat (d-ATP ve ATP) ile aktive edilen sitokrom-c ve apaf-1 birleşerek prokaspaz-9'u aktive eder. Aktifleşmiş kaspaz-9 da kaspaz-3'ü aktive ederek diğer kaspaz kaskadının tetiklenmesini sağlar (Şekil 2.16).



Şekil 2.16 .Apoptozom oluşumu (Apaf-1 + kaspaz 9

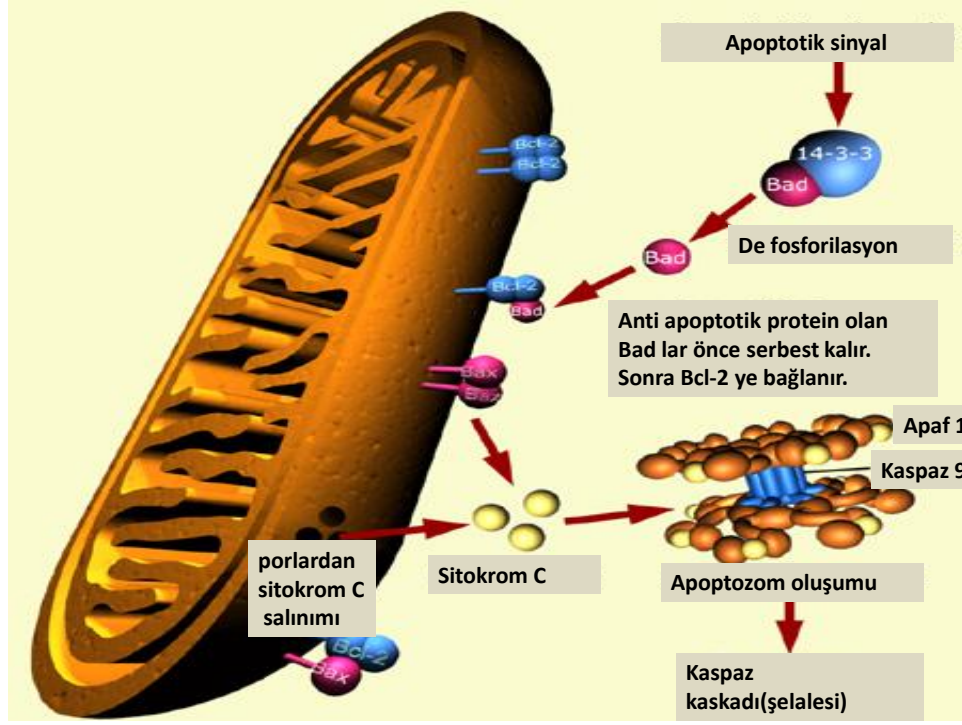


Şekil 2.17. Apaf molekülünün genetik yapısı.

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 (caspase recruitment domain) bölgesi, ve apaf-1'in negatif regülasyonundan sorumlu WD-40 tekrar bölgelerini içermektedir (Şekil 2.17). 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.

Sağlıklı bir hücre mitokondrisinin dış membranında Bcl-2 proteini yer alır [Choi vd., 2001]. Bcl-2, Apaf-1 proteinini bağlar (Şekil 2.18). Bcl-2 neden olduğu

internal hasarla mitokondride çatlaklar oluşturarak Apaf-1 ve Sitokrom-C salınımına yol açar. Bu iki protein kaspaz-9 moleküllerine bağlanır [Takahaski vd., 1999]



Şekil 2.18. Mitokondri/sitokrom-c aracılı apoptozun tetiklenmesi.

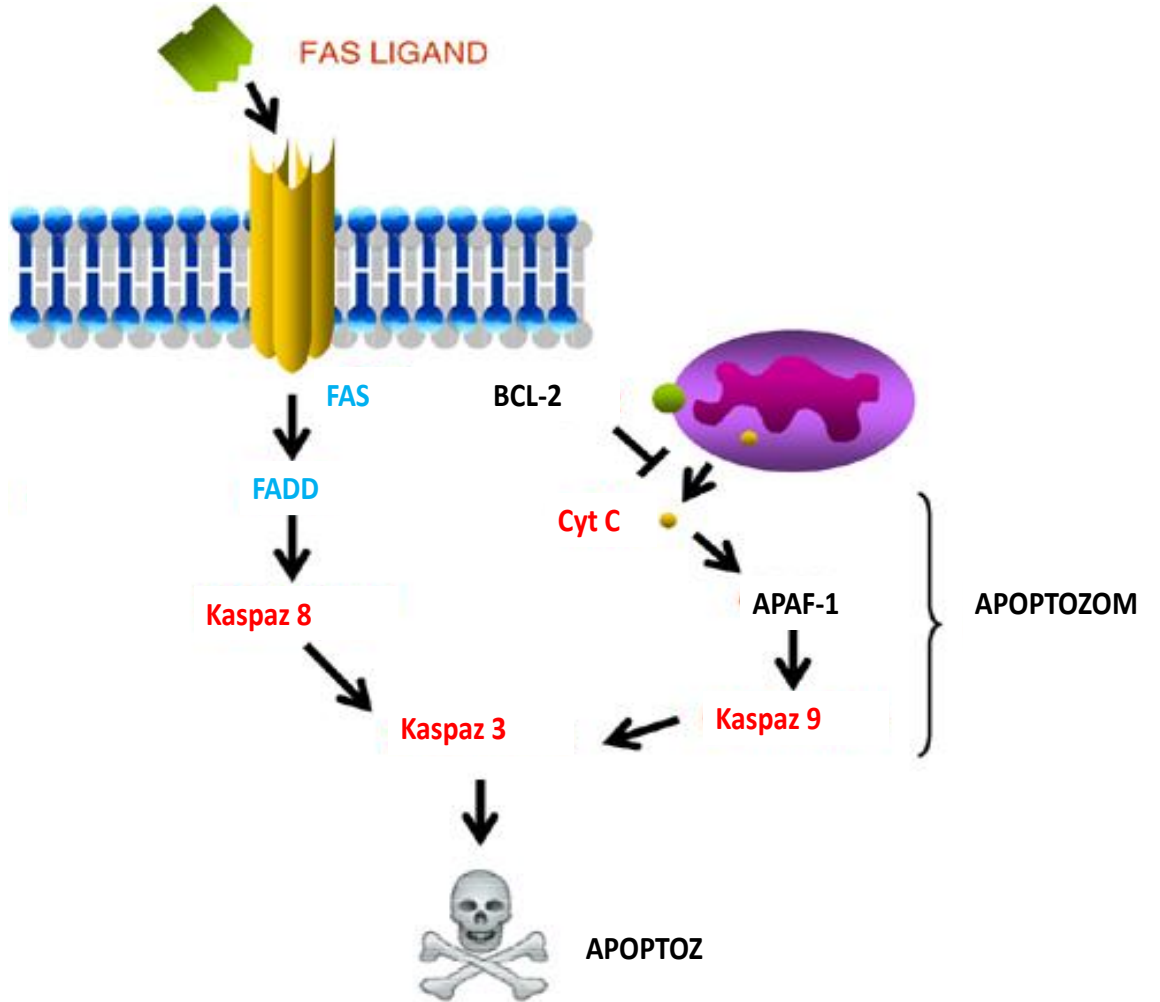
Bu proteolitik aktivitenin kaskadı kan pıhtılaşması ve kompleman aktivasyonuna benzer. Terminal uç kaspaz-3'tür. Bu proteolitik aktivite ile sitoplazmada yapısal proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA'nın degradasyonu ve hücrenin fagositozu sağlanır.

2.4.2.2. Dış sinyallerle apoptozun tetiklenmesi

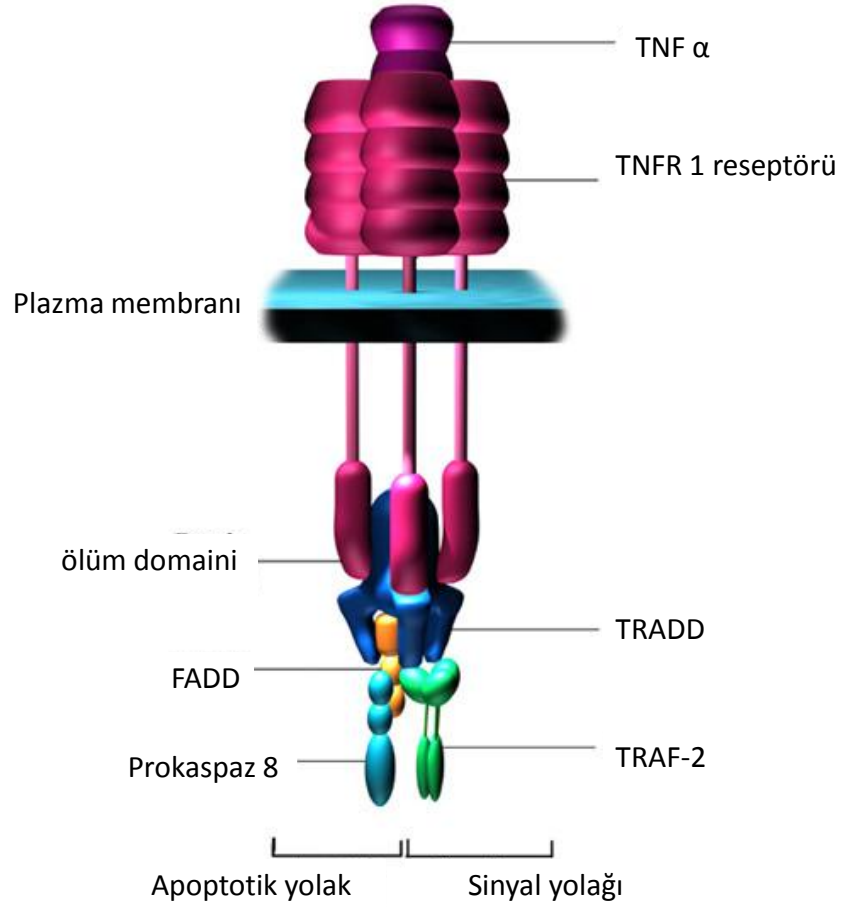
Birbirini tamamlayan ölüm aktivatörlerinin (Fas-L ve TNF) hücre yüzeyindeki Fas ve TNF reseptörlerine bağlanmasıyla sitoplazmaya kaspaz-8'i aktive eden sinyaller yayılır. Kaspaz-8 (kaspaz-9 gibi) diğer kaspazları uyarır ve hücrenin fagositozuna yol açar (örn: Sitotoksik-C hücrelerinin hedef hücre yüzeyine

bağlanarak Fas-L üretmesi sonrası oligodendrositlerde görülen apoptotik dejenerasyon, ölüm). SCI reseptörleri Fas ve p-75 ile bağlantılıdır. Bu reseptörler tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) gen ailesinin üyeleridir. Bunların apoptotik hücre ölümünü başlatan kaspaz kaskadını aktive ettiği bilinmektedir.

Diğer sistemlerde de oligodendrositlerde olduğu gibi apoptoz oluşumunda Fas ve p-75'in sorumlu olduğu gösterilmiştir. Fas reseptörünün, Fas ligand (Fas-L) ile karşılıklı etkileşimi FADD (Fas bağımlı ölüm domain proteini) aracılığı ile olur ve bunun sonucunda da kaspaz-8 aktive edilerek apoptotik döngü başlar (Şekil 2. 19 ve 20) [Banasiak vd., 1998].



Şekil 2.19. Dış sinyallerle apoptozun tetiklenmesi.

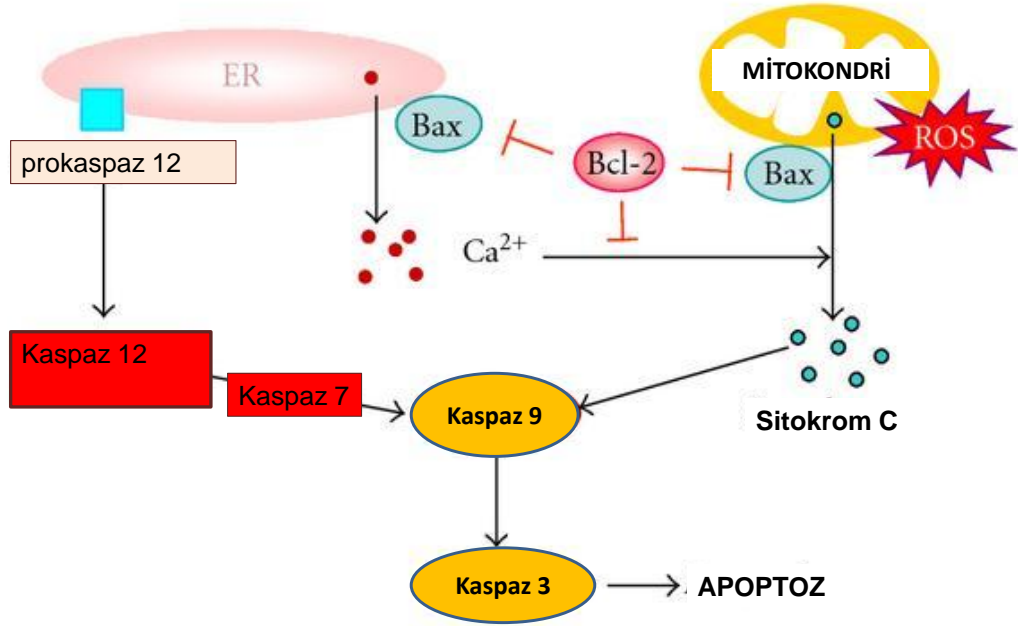


Şekil 2.20. Dış sinyallerle apoptozun tetiklenmesi.

2.23. Endoplazmik retikulum aracılı apoptoz oluşturulması

Son zamanlarda amiloid β nörotoksisitesine katkıda bulunan kaspaz- 12'ye bağımlı endoplazmik retikulum (ER) aracılı apoptotik yol tarif edilmiştir. Bu yol mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptör aracılı apoptozdan farklı bir yoldur. ER, hücre içi kalsiyum dengesi, sentezi ve membran proteinlerinin katlanmasını içeren birçok süreçte kritik öneme sahiptir. Kaspaz-12, ER membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptoz için esas teşkil eden bir kaspazdır. Son çalışmalar göstermiştir ki Ca^{++} seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile prokaspaz-12 aktifleşir. Ayrıca kaspaz-7 salınımı ile de prokaspaz-12 salınımı

arasında bir bağlantı bulunur. Aktifleşmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile karşılıklı olarak etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder. Son çalışmalar, in vivo ve in vitro olarak kaspaz-12'nin kaspaz-9'u aktive ettiğini göstermiştir (Şekil 2.21) [Rao vd., 2001] [Bao vd., 2003].



Şekil 2.21. Endoplazmik retikulum aracılı apoptoz oluşumu.

2.4.3. Apoptozun Genetik Kontrolü

2.4.3.1. Antiapoptotik proteinler

Protoonkogenler normal hücre büyüme ve gelişmesini düzenleyen genlerdir. Bu genler aktive olup mutasyona uğradıklarında onkogen adını alır. Onkogenler, hücrenin aşırı büyüme ve bölünmesi doğrultusunda uyarımı gerçekleştirir. Hücrenin büyüme ve bölünmesini aktive edici genleri baskılayan ve dengeleyen genler ise adından da anlaşılacağı üzere tümör baskılayıcı genlerdir [Akins vd., 1996] [Millerk

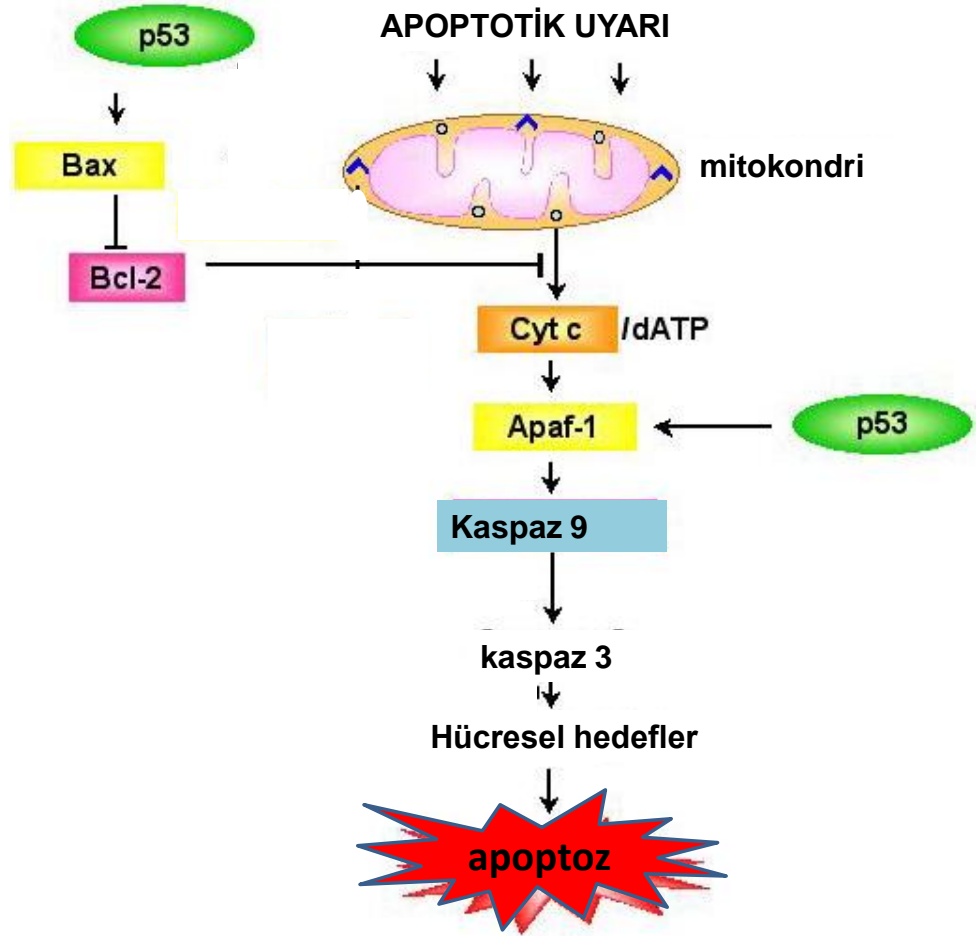
vd., 1990] [Nowell vd., 1990]. Son yapılan çalışmalar, bazı onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin programlı hücre ölümünü kontrol ettiğini göstermektedir [Caotes vd., 1996]. Omurgalılarda apoptozu düzenleyen genler c-myc, p-53 ve bcl-2 ailesi (bcl-2, bax ve bcl-x) olarak bilinmektedir ve üretimini sağladıkları proteinler de aynı adlarla anılmaktadır [Nakano vd., 1997] [Wyllie vd., 1995].

p-53: Apoptozu düzenleyen bir diğer gen, tümör baskılayıcı p-53 genidir. Hipoksi ve serbest radikal oluşumu p-53 aracılı DNA onarımı ve apoptozu başlatır (Şekil 2.22). DNA hasarı olduğu zaman S fazına geçişi bloke eder. DNA tamiri için zaman kazanılır, eğer tamir mümkün değilse hasarlanmış hücreler apoptozla yok edilir [Miyashita vd., 1994] [Spencer vd., 1996].

c-myc: Bir transkripsiyon düzenleyici faktör olan c-myc proteini, ortamda bazı faktörlerin bulunmasına bağlı olarak hücrenin proliferasyonuna ve apoptozu uğramasına neden olur. C-myc protoonkogeni bir hücrenin büyümesini programlar. Eğer hücrede hem c-myc hem de uygun büyüme faktörleri yoksa büyüme durur, her ikisi de yeterli ise çoğalma olur, c-myc olduğu halde büyüme faktörleri yoksa apoptoz görülür [Evan vd., 1992] [Wagner vd., 1993].

Bcl-2 ve Bcl-xl: Bcl-2 (antiapoptotik protein) ailesi apoptotik kaskadın kontrolünde en önemli gruptur ve bir düzineden fazla üyesi vardır. Bunlardan bazıları apoptotik aktivitenin öncüleri iken (bax ve bad), diğerleri antiapoptotik (hücre koruyucu) proteinlerdir. Bu proteinlerin seviyeleri hücrenin öleceğine veya yaşayacağına karar verir. Bcl-2, ailesi proteinlerinin etki yeri mitokondridir ve bcl-2 güçlü bir ölüm inhibitörüdür. Antioksidan yolda mitokondriden sitokrom-c salınımını engellemede rol oynar. Bcl-2 mitokondri membran dışında, endoplazmik retikulum ve nukleer membranlarda bulunur. Bcl-2 ayrıca Raf 1 ve kalsinorine bağlanır [Korsmeyer vd., 1992]. Bcl-xl mitokondri membran dışında lokalizedir. Bcl-xl ve Bcl-2 beraberce mitokondri membran geçirgenliğini korurlar. Proapoptotik proteinleri (Bax ve Bad) baskılayarak apoptozu engeller [Yılmaz 2005]. Bcl-xl kaspaz aktivasyonunu, Apaf-1 üzerinden önler. Bax ve bad proteinleri etkilerini diğer

bir protein ailesi kaspazlar üzerinden gerçekleştirir. Bunların sayısı da bir düzineden fazladır. Kaspazlar sistein proteazlardır, aktiviteleri hücre ölüm yolunda ortaya çıkar. Kaspaz-9, bcl-2 ailesi tarafından stimule veya inhibe edilir. Kaspaz-2 ve kaspaz-8, TNF- α gibi sitokinler tarafından aktive edilir [Keane vd., 2001] [Choi vd., 2001] [Newton vd., 1998] [Yılmaz, 2005].



Şekil 2.22. Apoptozun genetik kontrolü.

XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP: Antiapoptotik protein ailesinden apoptoz protein inhibitörleri omurgalı ve omurgasızlarda bulunmuş olup, bunlar programlanmış hücre ölümünün negatif düzenleyicileridir. Bazı memeli homologları; XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, Bruce, Survivin, pIAP olarak tanımlanmıştır. Bunların çoğu hücre ölümünü kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9'a doğrudan bağlanıp onları inhibe ederek

gerçekleştirirler [Yılmaz 2005]. Apoptoz protein inhibitörleri kaspazları ölüm reseptörleri ve mitokondrial yol ile inhibe ederler [Keane vd., 2001].

2.4.3.2. Proapoptotik proteinler

Bax, Bad ve Bid: Sağlıklı hücrede bax sitozolde bulunur. Apoptotik uyarı ile sitozolik bax mitokondriye yönelir ve çeşitli değişimler sonucunda bax'ın hidrofobik C terminal ucu açığa çıkar ve sitokrom-c salınımına neden olur. Kalpain tarafından bax salınımı uyarılarak sitokrom-c açığa çıkar. Bad, sağlıklı hücrelerde mitokondri membranının dış zarında bulunur. Apoptoz sırasında bax değişime uğrar ve N terminal uç açığa çıkarken bcl-xl bad'dan ayrılır [Wingrave vd., 2003]. Bid, bcl-2'yi inaktive etmek veya bax'ı aktiflemek üzere mitokondriye yönelir. Endojen bid'in yarısı sitozolde erir. Diğer yarısı ise hücre içi membranlarda özellikle de endoplazmik retikulumda bulunur [Newton vd., 1998].

2.4.4. Apoptozda Hücre İçi Sinyal İletimi Ve Metabolik Değişiklikler

Apoptotik sinyal iletimi ile ilgili bu güne kadar elde edilen bilgiler, hücre diğer sinyallerin iletiminden sorumlu olan bazı molekül ve enzimlerin , apoptozdaki sinyal iletiminde de rolleri olduğunu göstermektedir [Eastman vd., 1995]. Hücre içi sinyal iletiminde yaygın olarak kullanılan Ca^{++} apoptozda de rol oynar. Hücre içindeki Ca^{++} iyonlarının miktarındaki artış hücreyi apoptoza götürmektedir. Sitoplazmadaki Ca^{++} iyonu miktarındaki hafif artış, c-myc, c-fos, ısı şok proteinlerini harekete geçirir ve hücrenin apoptoza gitmesine neden olur. Ca^{++} adenilat siklazları aktive ve inhibe etme yeteneğine sahiptir [Brinley vd., 1978]. C-AMP ve protein kinazlar üzerinden sinyal iletimini etkiler. Hücre içi c-AMP konsantrasyonundaki artışın çeşitli hücre tiplerinde apoptozu uyardığı bildirilmiştir. Ca^{++} 'dan bağımsız olarak da apoptoz olabileceği gösterilmiştir. Sitoplazmada artan

Ca⁺⁺, inaktif durumdaki Ca⁺⁺ bağımlı proteazları ve nukleazları aktifleştirerek sitoplazmik proteinlerin parçalanmasına ve apoptoza özgü internukleozomal DNA kırıklarına neden olur.

Ca⁺⁺ iyonu, inaktif durumdaki endonukleaz, proteaz, transglutamaz, fosfolipaz gibi latent enzimleri aktive ederek apoptoza neden olur [Earnshaw vd., 1978].

Kalsiyuma bağlı endonükleazlar: Endonükleazlar sitoplazmada artan Ca⁺⁺ tarafından aktif hale getirilir. DNA zincirini, H1 histon proteini bölgesinden 180-200 baz çifti ve katları uzunluğunda parçalara ayırır [Balakumran vd., 1996] [Collins vd., 1997].

Transglutamazlar: Apoptozda hücreler büzüşür ve küçük parçalara ayrılır. Bu parçalar; transglutamazların yaptığı protein çapraz bağlanmaları ile kimyasal maddelere karşı dayanıklı hale getirilir [Eastman vd., 1995].

Proteazlar: Proteazlar histonları ve kromatin yapısını stabilize eden proteinleri parçalar [Collins vd., 1997]. Kalsiyum bağımlı notral bir proteaz olan 'kalpin' hücrenin iskelet yapısını bozar [Earnshaw vd., 1978]. Lizozomal bir proteaz olan katepsin- D apoptozun geç evresinde ortaya çıkan bir endopeptidazdır ve lizozomların proteolitik aktivitesinin oluşumunda önemlidir.

Lipid Modifiye Edici Enzimler: Normal hücrelerin plazma membranlarında fosfolipid asimetrisi vardır (Membran fosfolipidlerinin hücre dışında ve içinde kalan kısımları farklıdır). Bu asimetri ATP'ye bağımlı fosfolipid translokaz enzimi tarafından sağlanır. Apoptotik indüksiyon olduğunda bu enzim etkilenir ve zar asimetrisi bozulur. Makrofajlar hücreyi yabancı bir hücre olarak algırlar ve fagosite eder [Bortner vd., 1995].

Protein Kinazlar: Protein fosforilasyonunda rol oynayan zar ve sitoplazma enzimlerinin apoptotik sinyallerin iletiminde önemli oldukları kanıtlanmıştır. Bu enzimlerden protein kinaz-A, apoptozu sağlarken, protein kinaz-C apoptozu durdurur [Eastman vd., 1995].

2.4.5. Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler

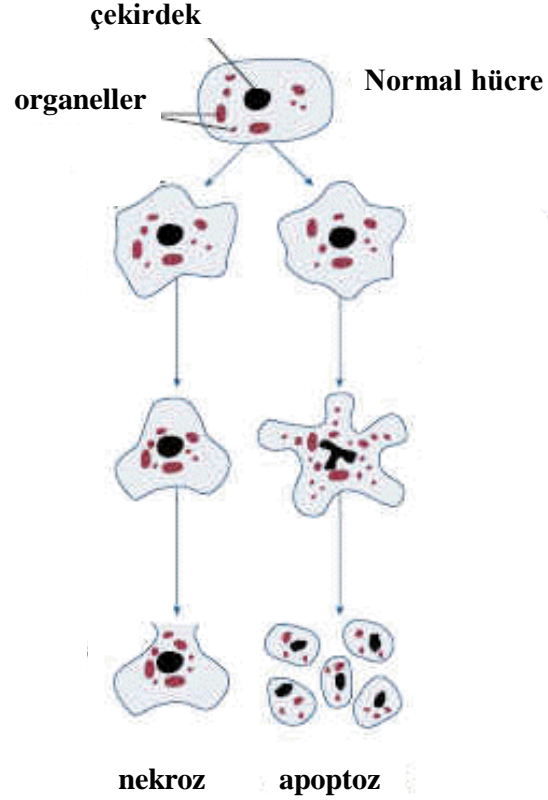
1. Yüzey Organellerinin Kaybı: Apoptozu uğrayan hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovilluslar ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır [Balakumran vd., 1996] [Yılmaz, 2005].

2. Hücre Büzülmesi: Apoptotik hücre komşu hücreye göre daha küçük ve sitoplazması daha yoğundur. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur. Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez [Balakumran vd., 1996] [Yılmaz, 2005].

3. Kromatin Yoğunlaşması: Önemli yapısal değişiklik çekirdekten başlayarak izlenir. Çekirdek apoptozda odak noktasıdır. Hücreden hücreye değişmekle birlikte genellikle çekirdek büzülür .Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek porları seçilemez. Çekirdek şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Çekirdekcik genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır [Balakumran vd., 1996].

4. Sitoplazmik Baloncuklar ve Apoptotik Cisimlerin Oluşması: Hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimlere dönüşür [Balakumran vd., 1996]. Apoptoz için morfolojik değişimler hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması olurken

fosfolipidlerin açığa çıkar. Sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan fosfolipidlerin apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür.



Şekil 2.23. Apoptoz ve nekrozun morfolojisi.

2.4.6. Apoptoz Ve Nekroz Arasındaki Farklar

Apoptoz, hücrede yarattığı bu değişikliklerle nekrozun bir parçasıymış gibi algılanabilir. Ancak nekrozdan farkları şunlardır.

Fiziksel Farklılıklar:

1- Nekroz bileşik hücre gruplarını etkiler, oysa apoptozda tek tek hücreler etkilenir [Spencer vd., 1996].

2- Nekroz fizyolojik olmayan uyarılarla başlar, apoptoz fizyolojik uyarılarla da başlayabilir (örnek: hormonal dengenin bozulması) [Wyllie vd., 1980].

3- Nekroza uğrayan hücre, çevreye yaydığı kemotaktik maddeler aracılığı ile çağrılan makrofajlar tarafından fagosite edilir.

Apoptoza uğrayan hücre ise çevreye kemotaktik madde yaymaz; yanında bulunan epitel hücreleri veya makrofajlar aracılığı ile fagositoza uğrar. Nekrozda inflamatuvar cevap vardır, apoptozda ise yoktur [Majno vd., 1995] [Yılmaz, 2005].

Morfolojik Farklılıklar:

1- Nekrozda zar bütünlüğü bozulur, apoptozda zarda kabarcıklar görülür fakat asla zar bütünlüğü bozulmaz [Spencer vd., 1996].

2- Nekroz sitoplazma ve mitokondride şişme ile başlar, apoptozda ise sitoplazmada büzülme ve çekirdek yoğunlaşması görülür.

3- Nekroz total hücre parçalanması ile sonlanır, oysa apoptoz hücrenin daha ufak fragmanlara dönüşmesi ile sonlanır (apoptotik cisimler) (şekil 2.23).

4- Nekrozda hücre zarında vezikul formasyonu yoktur, total parçalanma olur; oysa apoptozda zara bağlı veziküller oluşur [Cohen vd., 1993].

5- Nekrozda organellerin devamlılığının bozulması mevcut iken, apoptozda; apoptozu başlatan bcl-2 gen ailesinin ürettiği por oluşturan proteinlerin etkisi ile organeller bütünlüğünü korur, ancak delikli bir yapıya kavuşur [Cohen vd., 1993] [Yılmaz, 2005].

Biyokimyasal Farklılıklar:

1- Nekrozda iyon dengesi kaybolur, apoptozda ise sıkı bir şekilde kontrol edilen enzimatik olaylar mevcuttur [Wyllie vd., 1980].

2- Nekroz enerjiye ihtiyaç duymaz, pasif bir olgudur ve +4°C’de bile gerçekleşebilir. Apoptoz ise enerji gerektiren aktif bir olgudur ve +4° C’de gerçekleşemez [Cohen vd., 1993].

3- Agaroz jel elektroforezi yapıldığında, nekroz sırasında DNA'nın rastgele sindirimi mevcuttur. Oysa apoptozda rastgele olmayan, monooligonukleozomal parçalanma mevcuttur. Bu da agaroz jel elektroforezde apoptoz için karakteristik “*ladder pattern*” denen merdiven basamağı şeklinde kırılmalar meydana getirir [Eastman vd., 1995].

4- Nekroz sırasında hücre ölümünün geç bulgusu; postlitik DNA parçalanması vardır (DNA, hücre bütünlüğü bozulmadan önce parçalanır). Ayrıca apoptozda mitokondri tarafından sitoplazmaya birçok faktör salınımı mevcuttur (sitokrom-c v.b.) [Eastman vd., 1995].

5- Nekroz sırasında nonspesifik zar parçalanması olurken, apoptozda zar asimetrisinde değişiklikler olur (örn: fosfolipidlerin zarın sitoplazmik yüzünden ekstraselüler yüzüne doğru yer değiştirir). Bu değişiklik apoptotik hücrenin inflamatuvar reaksiyon oluşturmadan lokal hücrelerce tanınıp, fagosite edilmesini sağlar [Cohen vd., 1993].

2.4.7. Fagositoz

Ölüm mekanizması nasıl olursa olsun, ölü hücrelerin ortadan kaldırılması gerekmektedir. Gerek nekroz gerekse apoptozda ölü hücre fagositozla ortadan kaldırılır. Apoptoz sırasındaki hücre zarı değişimleri komşu hücrelerin ölü hücreyi fagosite etmesi için gerekli tüm uyarıları verecek şekilde düzenlenir. Oluşan apoptotik hücreler, hücreler arası alana dağılırlar veya lümene dökülürler. Dokuda 4-9 saat tanınabilir halde kalan apoptotik hücreler daha sonra içinde birkaç saat kadar

görülebilir, sonra da sindirilemeyen materyal olarak kalır [Schwartzman vd., 1993] [Majno vd., 1995].

2.4.8. Apoptozun Görüldüğü Olaylar

Bazı organların biyolojik gelişimleri esnasında apoptoza rastlamak mümkündür. Örnek olarak, Müller ve Wolf kanallarının involusyonu, kalp gibi bazı iç organların lümenlerinin oluşması gösterilebilir. Apoptoz ayrıca her türlü neoplastik oluşumda; hem büyüme hem gerileme döneminde görülebilir. Hafif şiddette fiziksel ve toksik uyarılara maruz kalan dokularda da apoptoz görülür. Örnek olarak hipertermi, düşük doz sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif travma, hafif hipoksi gösterilebilir. Bu anlamda apoptoz spesifik bir uyarana maruz kalan hücrenin, bu uyarıya aktif olarak verdiği düzenleyici bir cevaptır. Apoptozlu hücreler sağlıklı doku içinde dağılmış şekilde bulunur. Apoptozun görüldüğü başlıca olaylar şunlardır: [Bellamy vd., 1995] [Cummings vd., 1997] [Majno vd., 1995] [Yılmaz, 2005].

2.4.8.1. Fizyolojik olaylar

- a- Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde programlı hücre yıkımı (fetus implantasyonu, organogenezis ve gelişim sürecinde yaşanan involusyon).
- b- Erişkinde hormona bağımlı involusyon (menstruel siklusta endometriyum hücrelerinin yıkımı, menopozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin rejenerasyonu).
- c- Sürekli çoğalan hücre gruplarında hücre sayısının dengelenmesi amacı ile hücre azaltılması (barsak kripta epitelleri) [Majno vd., 1995].
- d- İmmün hücrelerin seçimi (hem B hem de T hücrelerinin sitokin deplesyonundan sonra ve timusun gelişimi sırasında otreaktif T hücrelerinin ortadan kaldırılması).

2.4.8.2. Patolojik Olaylar

- a- Tümörlerde hücre ölümü (hem büyüme hem de regresyon aşamasında) [Cohen vd., 1993].
- b- Hormonlara bağlı dokularda patolojik atrofi (kastrasyon sonrası prostat atrofisi, glukokortikoid kullanımı sonrası timusta lenfosit kaybı) [Bellamy vd., 1995] [Cummings vd., 1997].
- c- Parankimden zengin dokularda duktus tıkanmasından sonra patolojik atrofi (pankreas ve böbrek tübüllerinde olduğu gibi) [Schwartzman vd., 1993].
- d- Sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümü (otoimmün hastalıklar) [Cohen vd., 1993].
- e- Çeşitli etkenlerle oluşan hücre ölümü (radyasyon, antikanser ilaçları, hipertermi, hipoksi, travma) [Schwartzman vd., 1993].

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda apoptoz yoluyla hücre ölümünün artması ya da azalmasının kanser, otoimmün bozukluklar, viral infeksiyonlar, norodejeneratif hastalıklar gibi bir çok hastalığın patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir [Hettis vd., 1998].

2.4.9. Apoptozun İnhibisyonu İle İlişkili Hastalıklar

- 1-Kanser: Foliküler lenfoma P53 mutasyonları ile oluşan karsinomlar, Hormon bağımlı tümörler, Akciğer kanseri, Prostat kanseri, Over kanseri
- 2-Otoimmün bozukluklar: Sistemik lupus eritematozus, İmmün ilişkili glomerulonefritler, Otoimmün diabet, Greft rejeksiyonu
- 3- Viral infeksiyonlar: Herpes virüs, Poliovirus, Adenovirus [Yılmaz 2005].

2.4.10 Apoptozun Aktivasyonu İle İlişkili Hastalıklar

- 1- AİDS
- 2-Nörödegeneratif hastalıklar: Alzheimer hastalığı Parkinson hastalığı, Amyotrofik

lateral skleroz, Retinitis pigmentosa, Serebellar dejenerasyon

3- Miyelodisplastik sendromlar: Aplastik anemi

4- İskemik hasarlar: Myokard infarktüsü, İnme, Reperfüzyon hasarı

5- Toksik nedenli karaciğer hasarı [Yılmaz 2005].

2.4.11. 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. İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptoz, 80'li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlamıştır. 90'ların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulunmuştur. Böylece, kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metodlarla saptanabilen apoptoz, 90'ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlanmıştır. Apoptozun belirlenmesine yönelik geliştirilen tüm metodları, 2000'li yılların başlarında, sadece apoptotik epitelyal hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18'in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikörlerin kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etmiştir. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler şöyledir:

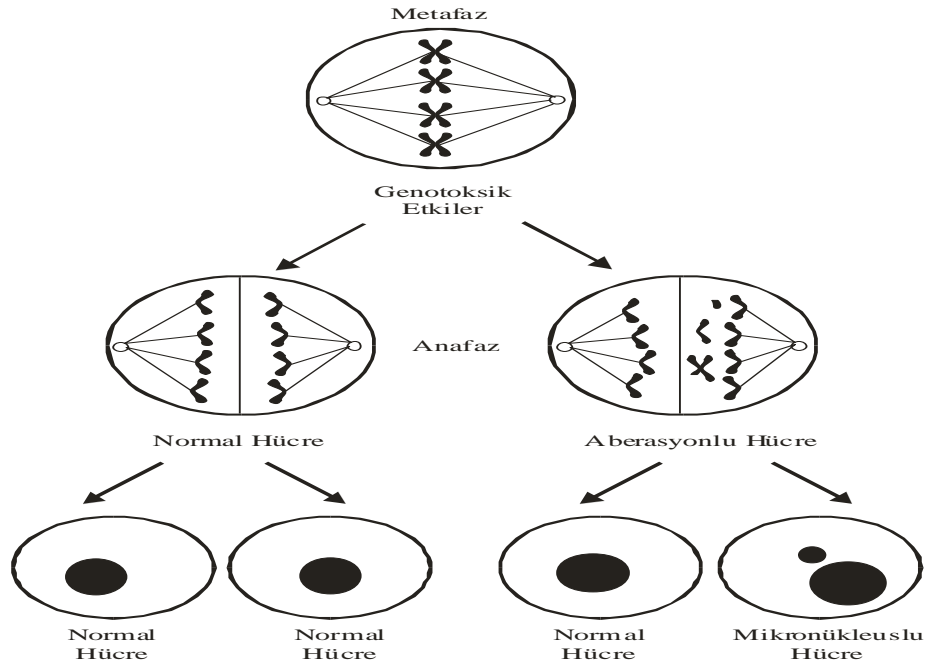
1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri
2. İmmunohistokimyasal yöntemler
3. Biyokimyasal yöntemler
4. İmmünolojik yöntemler
5. Moleküler biyoloji yöntemleri[Yılmaz, 2005].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. YÖNTEMLER HAKKINDA GENEL BİLGİLER

3.1.1. Mikronukleus (MN)

Mikronukleus (MN) ana kromozomdan kopmuş olan parçacıklardan ya da anafaz esnasındaki hatalara bağlı olarak ana nukleusa dahil olamayan tam kromozomlardan oluşan ve sitoplazma içerisinde ana nukleusa ilaveten görülebilen küçük nükleustur. Mikronukleus oluşumunu indükleyen her ajan klastojen olmayabilir. Mikronukleus oluşumuna iğ ipliklerinin inhibisyonu ve apoptozis gibi diğer etkenler de yol açabilmektedir. Eğer oluşuma kromozomlardan kopan bir parça neden olmuşsa (asentrik bir kromozom parçası), bu klastojenik bir olayın sonucu iken eğer oluşuma neden olan olgu anafazda geri kalma ya da iğ ipliklerinin hasarından dolayı oluşmuşsa, bu duruma anojenik bir ajanın neden olduğu belirtilmektedir (Şekil 3.1.ve 2.).



Şekil 3.1. Hücrede mikronukleus oluşumu [Cavaş 2004].

MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iç iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Günümüzde, hızlı endüstrileşmeye bağlı olarak çevresel kirliliğin giderek artmasıyla, canlılar daha fazla fiziksel ve kimyasal ajana maruz kalmakta dolayısıyla güçlü toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik faktörlerin olumsuz etkilerini tespit etme ve önlemler alma ihtiyacı kaçınılmaz olmaktadır. Bu nedenle, MN testi sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi avantajı sağlamasıyla yaygın kullanım alanı bulan bir teknik olmuştur.



Şekil 3.2.. Mikronukleus oluşumuna sebep olan kromozomal hasarlar [Cavaş 2004].

Yukarıdaki şekilde de görüldüğü üzere genotoksik etkiler sonucunda metafazda gözlenen kromozomal fragmentler ya da tam kromozomlar, hücre bölünmesi bitiminde oluşan kardeş hücrelerden birinde tekrar kromatin halde kondanse olarak ana nukleus yanında küçük bir nukleus olarak kendilerini göstermektedir. Mikronukleus oluşumuna yol açabilen kromozom anomalilerinin çeşitleri Şekil 3.2. te gösterilmiştir.

Görüldüğü üzere metafaz kromozomlarındaki kırılmalar sonucunda oluşan fragmentler ve deforme kromozomlar mitoz bölünme sonunda oluşan hücrelerde mikronukleus oluşumlarına yol açmaktadırlar [Cavaş 2004] [Fenech vd., 2003] .

MN testi 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde [Widel vd., 2001] [Jagetia vd., 2001] ve daha sonra Haddle ve arkadaşları tarafından kültüre edilmiş [Schmid vd., 1975] insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Bazı araştırmacılar [Von Ledebur ve Schmid, 1973] [Heddle ve Countryman, 1976] [Högstedt ve Karlsson, 1985] geliştirdikleri modifiye metotlarla anöploidiye yol açan ajanlar ile klastojenleri birbirinden ayırmada MN büyüklük farkından yararlanmışlar; klastojenlerce uyarılan MN'lerin asentrik kromozomal fragmentler içeren küçük, anojenler tarafından uyarılan MN'lerin tam kromozomlar içeren daha büyük ebatlı olduğunu göstermişlerdir.

Eastmond ve Tucker aynı amaçla antikinetokor antikorumları kullanarak kinetokor pozitif MN'lerin tam bir kromozom, kinetokor negatif MN'lerin ise asentrik kromozom fragmentini içerdiğini ve bu yöntemin anöploidiyi uyaran ajanları

klastrojenlerden ayırmada daha kesin bir yol olduğunu vurgulamışlardır [Eastmond ve Tucker 1989].

Daha sonraları Fenech ve Morley tarafından geliştirilen Sitokinez-Blok (Cytokinesis-Blocked) Metodu, bazı kinetik problemlerin ortadan kalkmasını ve tekniğin uygulanmasındaki güvenilirliğin artmasını sağlamıştır [Fenech ve Morley 1985,1986]

Bu metot, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan Cytochalasin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır. Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B ilavesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir. Lenfosit kültürlerindeki çalışmalara paralel olarak MN tekniği, eksfoliyatif hücrelere 1982 yılında ilk defa Stich ve arkadaşları [Stich vd., 1982] tarafından uygulanmıştır.

Bu teknik sayesinde ağız, burun, bronş ve ürotelyal eksfoliyatif hücrelerde kimyasalların ve enfeksiyonların etkilerini değerlendirmek mümkün olmuştur. Hızla çoğalan bu epitelyal dokular çevreleriyle sürekli temas halindedir ve epitelin yüzeyel tabakasını oluşturan eksfoliyatif hücreler kolaylıkla elde edilebilmekte, dolayısıyla uğradıkları genotoksik hasar da kolaylıkla gösterilebilmektedir. Böylece bu hücreler ait oldukları dokularda meydana gelen morfoloji bozukluğunu, kromozom kırıklarını, premalign değişiklikleri ve kanseri gösterebildiklerinden bir biyobelirteç olarak değerlendirilebilmekte ve karsinojenlere maruz kalmış bireylerde artmış kanser riskini göstermek amacıyla kullanılabilir [Stich ve Rosin 1984].

Eksfoliyatif hücrelerde uygulanan MN tekniğinde Fielgen-Fast Green boyama yöntemi kullanılmakta, hücrenin çekirdeği parlak pembe, sitoplazması ise açık yeşil boyanmaktadır. MN testi sigara, pestisid ve parazitik enfeksiyonlar gibi çevresel ve mesleki etkileri değerlendirebilmek için kolaylıkla kullanılmaktadır. Benzer şekilde yapılan bir araştırmada [Rosin ve Anvar 1992] [Zamani ve Durakbaşı 2002] periferik kan, bukkal mukoza ve üriner sistem eksfoliyatif hücrelerinde sigaranın genotoksik etkisi gösterilmiştir.

MN araştırmalarında in situ hibridizasyon (ISH) tekniği, ilk defa kromozomların sentromerini tanımlamak için Norppa ve arkadaşları [Norppa vd., 1993] tarafından uygulanmıştır; bu çalışmada kullanılan proplar, 1989 yılında Meyne ve arkadaşları tarafından hazırlanmış insan kromozomlarının her biriyle hibridize olabilen sentromere spesifik oligonükleotidlerdir. Daha sonra, floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniği ile MN oluşturan kromozomların her birinin kimliğini belirleyebilecek teknolojik gelişmeler sağlanmıştır [Norppa vd., 1993] [Meyne vd., 1989].

1980'den sonra özellikle deney hayvanlarıyla gerçekleştirilen kontrollü çalışmalarda, kimyasal ve fiziksel ajanların sebep olduğu sitogenetik harabiyetin güvenilir bir göstergesi olarak kullanılan MN çalışmalarının sayısı çok hızlı bir şekilde artmıştır. Mavournin ve arkadaşları 1990 yılına kadar kimyasalların canlılar üzerindeki etkilerini belirleyebilmek için yapılan MN test sonuçlarını toplayarak, ABD Çevre Koruma Grubunun Gen-toks Programı dahilinde değerlendirmeye almışlardır [Mavournin vd., 1990]. Memelilerin kan ve kemik iliğinde in vivo çalışılmış olan 414 bileşiğin sadece 220'sinin kriterlere uygun test edilebildiği ortaya çıkmıştır. Uygun test edilen kimyasallar arasında karsinogenlerin oranı % 91 olarak saptandı; ancak negatif testlerin azlığı ciddi bir eksiklik olarak bildirildi. Ayrıca bu çalışmalarda esas alınan ve yıllar önce Schmid tarafından tanımlanan MN test

protokolunun modifikasyonuna ihtiyaç duyulduğu ve daha fazla çalışmanın gerekli olduğu vurgulandı [Schmid vd., 1976].

Fiziksel ajanların etkileri deneysel MN çalışmaları yanında, 13 Eylül 1987'de Goiânia'da (Brezilya) meydana gelen radyolojik kazanın genetik materyalde oluşturduğu hasarı belirlemek için kullanılmıştır. MN sıklığında iyonizan radyasyonun dozuna bağlı çok anlamlı bir artış gözlemlendi ve MN testinin biyolojik dozimetre olarak kullanılması önerilmiştir. Ayrıca Goiânia kazasına maruz kalan insanlardaki sitogenetik değişiklikler iyonizan radyasyon ile yaş ve hayat tarzı (alkol tüketimi, sigara kullanımı) gibi faktörlerin etkisi birlikte ele alınarak değerlendirilmiştir [Cruz vd., 1994].

Daha sonra bu konuda yapılan çeşitli araştırmalar iyonize radyasyonun ve mikro dalga ışınların klastojenik etkisini açıkça ortaya koymuş ve ayrıca mikro dalga ışınların, anöploidi uyaran bazı kimyasalların, karakteristik mutajen özelliklerine de sahip olduğu göstermiştir [Yoshida vd., 2001].

S.K. Roy ve ark. tarafından etkin bir hepatokarsinojen olan 1-4 Dioxin in etkileri rat karaciğer ve kemik iliği dokularında araştırılmıştır. MN frekansındaki artış değerlendirilmiş ve anlamlı seviyede artış saptanmıştır [Roy vd., 2005].

Hiroshi ve ark. tarafından sıçan karaciğer ve kan dokularında hepatokarsinojen—4,4-metilendianilin (MDA), kuinolin, o-toludin, 4-kloro-o-

fenilendiamin(CPDA), dimetilnitrozamin (DMN), p-dimetilaminobenzen (DAB) ve 2-etileksplat (DEHP) kimyasallarının mikronukleus oluşturma frekansları araştırılmış kuinolin, DMN, ve DAB karaciğer testinde, o-toluidine, kojic acid, DAB ve MMS peripheral kan da pozitif etki göstermiştir. Sonuçlar arasındaki korelasyon bu tekniğin geçerliliğini kanıtlamıştır [Hiroshi vd., 2005].

3.1.2. Komet Yöntemi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)

Kimyasalların genetik materyal üzerinde yarattığı etkiler iki şekilde ortaya çıkmaktadır. Bunlardan ilki, gen frekansını etkileyerek populasyonların genetik yapısı üzerinde secici bir baskı oluşturmak ikincisi ise mutasyon gibi DNA üzerinde etkisi oldukça büyük-köklü değişiklikler yaratmak. DNA da olumsuz hasarının saptanmasında yararlanılan metotlar hedef büyüklüğüne göre 2 kategoriye ayrılmaktadır:

- a) Kromozom seviyesinde görülen etkileri ölçenler (makro ölçekli) ve
- b) Gen seviyesinde etkili değişiklikleri ölçenler (moleküler veya DNA seviyesinde).

Gen düzeyinde DNA kırıklarının tayini prensibine dayanan Komet yöntemi, pek çok DNA hasarının ve onarımının tayininde, biyoizleme çalışmalarında ve genetik toksikolojide yaygın kullanım alanı bulmuştur [Bandyopadhyaya vd., 2008] [Çavaş ve Könen 2007,2008].

Genetik toksikoloji çalışmalarında ana amaç genetik hasarların belirlenmesi olduğundan, bu amaca hizmet edecek test yöntemlerinin geliştirilmesine dair çalışmalar süreklilik kazanmıştır. Bu amaçla geliştirilen çok çeşitli test yöntemleri mevcut olmakla birlikte son yıllarda üzerinde en çok çalışılan ve yaygın olarak kullanılanlardan birisinin komet tekniği olduğu görülmektedir.

Tek hücre jel elektroforezi (Single Cell Gel Elektrophoresis, Comet Assay) olarak isimlendirilen Komet Testi, DNA hasarını ölçmek ve analiz etmek amacıyla kullanılan, hızlı, basit, duyarlı ve yaygın kullanım alanına sahip bir yöntemdir [Bandyopadhyaya vd., 2008] [Çavaş ve Könen 2007,2008].

Bu tekniğin temeli ilk olarak 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından yürütülen ve insan hücrelerinde DNA sarmal kırıklarının ölçülmesini amaçlayan çalışmalara dayanmaktadır. 6 yıl sonra 1984 yılında Ostling ve Johanson Tek Hücre Jel Elektroforezi (Single Cell Gel Elektrophoresis) ya da Komet (Comet) Testi olarak bilinen mikrojel elektroforez tekniğini kullanarak DNA hasarlarını incelemişlerdir. Ostling ve Johanson' ın 1984 te kullandıkları teknikte uygulanan şartlar nötral pH'da olduğu için DNA zincirleri birbirinden ayrılmamış ve bu yüzden sadece çift sarmal DNA kırıklarının saptanması mümkün olmuştur [Bandyopadhyaya vd., 2008] [Çavaş ve Könen 2007,2008].

Daha sonraları bu teknik Singh ve arkadaşları tarafından alkali koşullarda uygulanarak DNA çift sarmalının açılması sağlanmış ve böylece de hem tek hemde çift iplik DNA kırıklarının belirlenmesine olanak sağlamışlardır. Singh ve arkadaşlarının geliştirdikleri bu yöntem, şu anda bazı basamaklarda yapılan değişikliklerle beraber en çok kullanılan yöntemdir [Bandyopadhyaya vd., 2008] [Çavaş ve Könen 2007,2008].

Bu yöntemde yapılan temel değişiklikler en yaygın olarak lizis ve elektroforez koşullarında gerçekleştirilmektedir. Böylece araştırmacılar, çalışma amaçlarına ve kullandıkları organizma/hücre tipine en uygun yöntemi belirleyebilmişlerdir.

Hasara uğramamış olan DNA'nın nükleus sınırları içerisinde kompakt bir yapı halinde bulunmatadır. DNA'da bir hasar meydana geldiğinde bu yapıda bozulma meydana gelmektedir. Bu durumda bireysel DNA zincirleri yoğunlaşmış yapılarını kaybeder ve ana nükleus bölgesinden dışarı doğru uzanmaktadırlar. Bu yapıya bir elektrik akımı uygulandığında yapısı itibariyle negatif yüklü olan DNA katoda (+ uca) doğru hareket etmektedir. Ana nükleusu oluşturan ve hasarlı olmayan DNA zinciri çok büyük olduğu için elektrik akımı ile hareket edip nükleus bölgesini terk edemeyip yerinde kalmaktadır. Diğer taraftan küçük fragmentler akım uygulama sürecine bağlı olarak ana DNA'dan ayrılarak hareket/göç edebilmektedir. Böylece ana nükleus bölgesini terk eden DNA'nın miktarı bize hücrede meydana gelen DNA hasarının miktarının göstergesi olarak kabul edilir [Bandyopadhyaya vd., 2008] [Çavaş ve Könen 2007,2008].

Lam üzerinde agara gömülü haldeki hücrelerde DNA'nın negatif yüklü olan kırık uçları elektroforez işlemi esnasında pozitif elektrot tarafına doğru hareket ederler. Bunun sonucunda da floresan boyama ile gözlenebilen kuyruklu yıldız (KOMET/COMET) benzeri görüntüler meydana gelir. DNA göç miktarı ile DNA'daki kırık sayısı arasında pozitif ilişki vardır. Kuyruk uzunluğu, DNA hasarı ve elektroforez şartlarına bağlı olarak artar. Düşük hasar seviyelerinde DNA'da kuyruk gözlenmez iken kırık sayısının artmasıyla kuyruk uzunluğunda artış gözlenir. Nötral şartlarda kuyruk kısmında sadece iplikçikler bulunurken alkali ortamda DNA parçacıkları da bulunur. Böylece alkali ortamda bağların çözülmesi ve DNA moleküllerinin denatürasyonu sağlandığı için DNA tek iplik hasarlarının detaylı belirlenmesine olanak sağlamaktadır [Bandyopadhyaya vd., 2008] [Çavaş ve Könen 2007,2008].

Komet testinin özelliklerine bakıldığında;

Çok yönlüdür

- ✓ Prokaryotlardan ve ökaryotik organizmalardan bir çok hücre tipine uygulanabilir.
- ✓ Kültüre alınmış hücreler ve direkt olarak canlıdan alınan hücrelere uygulanabilir.
- ✓ Hem bölünen hem de bölünmeyen hücrelere uygulanabilir.

Pratiktir

- ✓ Göreceli olarak ucuz ve uygulaması kolaydır.
- ✓ Güvenilir, hızlı ve duyarlıdır.
- ✓ Analiz için az sayıda hücre yeterlidir.

Güçlüdür

- ✓ Tek bir hücre düzeyinde elde edilen veriler oluşturur.
- ✓ Sadece DNA hasarlarının varlığını belirlemekle kalmaz tipini de belirler.
- ✓ DNA onarım ve onarım kinetiğinin çalışılmasında da kullanılabilir.
- ✓ Testin, yönetmeliklerde yer alabilirliği kabul edilmiştir.

Komet Testinin Kullanım Alanlarına bakıldığında;

- ✓ Genotoksisite yönetmeliklerine uygunluk (endüstriyel, farmasötik, zirai ve kozmetik kimyasalların test edilmesi),

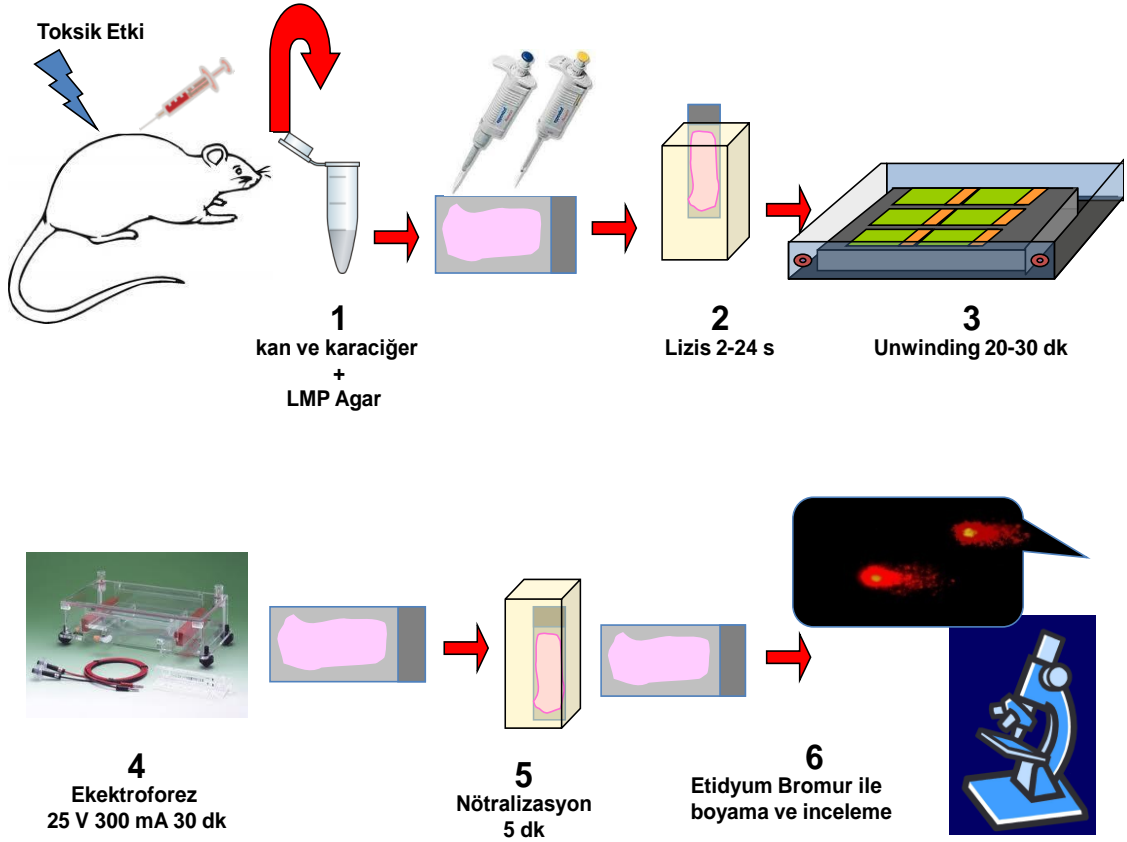
- ✓ İnsanlarda biyolojik izleme (zararlı kimyasallara, kirleticilere ve radyasyona mesleki maruziyetin analizi),
- ✓ Ekogenotoksikoloji (çevrenin genotoksik ajanlar ile kontaminasyonunun analizi),
- ✓ DNA hasar ve onarımında mekanizma çalışmaları
- ✓ Beslenme (gıda ve gıda katkı maddelerinin zararlı ve yararlı etkilerinin araştırılması),
- ✓ Klinik hastalık tanısı ve ilaç uygulamasının etkilerinin izlenmesi.

Kommet testinin aşamaları [Bandyopadhyaya vd., 2008] [Çavaş ve Könen 2007,2008] Şekil 3.3. te görülmektedir.

Preparasyon aşaması; Bu aşama, hücrelerin agar ile karıştırılarak lam üzerine yayılmasını içeren safhalardan oluşmaktadır.

Lizis; Bu aşama agara gömülü halde lam üzerine yayılmış olan hücrelerin hücre zarı ve proteinlerin yıkımını içermektedir. Böylece çıplak DNA elde edilir.

Bu işlem için önceden hazırlanan ve +4°C'de soğutulmuş olarak saklanan lizis solüsyonu kullanılmaktadır. Lizis çözeltisindeki tuz; proteinler ve hücre ile olan bağlarını ve RNA yapısını bozmaktadır. Deterjanlar ise hücre membran yapısını bozar. Böylece lizis uygulaması sonucunda hücre yapısındaki membran, proteinler, RNA ile sitoplazmik ve nükleer bileşenler parçalanmaktadır. Bunun sonucunda da nükleoid olarak adlandırılan ve kommet oluşumunun gözleneceği DNA yumağının kalması sağlanmaktadır.



Şekil 3.3. Komet testinin aşamaları.

DNA sarmalının açılması (Unwinding); Bu aşamada lizis işleminden geçirilen preparatlar elektroforez tankına yerleştirilir ve tank soğuk elektroforez solusyonu (pH: 13) ile doldurulur. Bu esnadan DNA zincirleri ayrılarak tek iplik haline gelmektedirler. Böylece Alkali şartlar altında yürütülen bu test alkali komet testi olarak adlandırılmaktadır.

Elektroforez aşaması; Bu aşamada unwinding işlemi tamamlanan preparatlara aynı tank ve solüsyon içerisinde elektrik akımı uygulanarak elektroforez işlemi gerçekleştirilmektedir. Bu esnada; tek iplik DNA üzerindeki kırık fragmentler ve

kırılma ile oluşan DNA ilmekleri eksi (-) yüklü olmaları nedeniyle boyutlarına bağlı olarak değişen hızlarda artı (+) uca doğru hareket etmektedir.

Nötralizasyon; Elektroforez işlemini takiben pH13 değerindeki solüsyon içeren tanktan çıkarılan preparatlar pH ayarlamasını sağlamak amacıyla nötralizasyon işlemine alınmaktadır. Bunun için preparatlar soğuk nötralizasyon tamponu içeren şalelere alınmak ya da tamponu direkt olarak üzerlerine damlatmak suretiyle nötralize edilmektedir. Nötralizasyon işleminden sonra preparatlar soğuk distile sudan geçirilir ve boyamaya alınmaktadır.

Nötralizasyon işlemini takiben preparatlar boyama işlemine alınmaktadır. Bu işlem için en yaygın kullanılan floresan boya Etidyum bromür'dür. Oldukça net görüntü sağlaması yanında yüksek oranda kanserojen olduğu için dikkatli bir biçimde kullanılmalıdır. Çok iyi sonuç vermesine rağmen yüksek oranda genotoksik etkiye sahip olan bu boya yerine kullanılabilen alternatif boya tipleri de bulunmaktadır. Bu alternatifler arasından en çok kullanılanlardan biri gümüş boyamadır. Floresan mikroskop göreceli olarak pahalı sayılabilecek bir ekipman olduğundan dolayı, gümüş boyama; kometleri ışık mikroskobu altında da görünür hale getirebilen bir yöntem olarak geliştirilmiştir [Bandyopadhyaya vd., 2008] [Çavaş ve Könen 2007,2008].

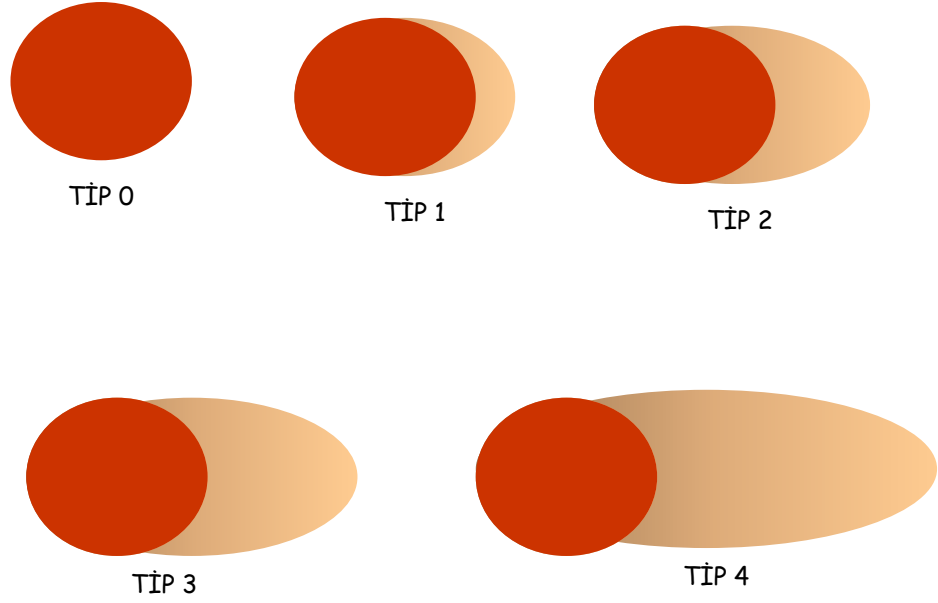
Kometyönteminin analizi ise şu şekilde yapılır; Tipik bir komet baş ve kuyruk olmak üzere iki temel kısımdan oluşmaktadır. Komet ölçümlerinde kullanılan birçok parametre geliştirilmiş olmakla birlikte kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesi en yaygın kullanılan parametreler olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Komet tekniği ile DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde gözle değerlendirmeye dayanan ölçümler ve Bilgisayarlı komet görüntü analiz programlarının kullanımı olmak üzere iki esas analiz yöntemi bulunmaktadır.

Komet yapısı içerisinde belirli bir bölgedeki DNA miktarı o bölgedeki floresan yoğunluğu ile arasında doğru orantı bulunmaktadır. Bu özellikten yararlanarak dijital görüntü sistemlerinde ve bilgisayar yazılım programlarındaki kullanımına dayanan çeşitli tayin yöntemleri geliştirilmiştir.

- **Kuyruk Uzunluğu:** Çekirdek baş bölge dış sınırından itibaren göç eden DNA uzunluğunun ölçümüdür.
- **Merkezden Kuyruk Uzunluğu:** Kuyruk uzunluğu + Baş çapı/2
- **% Kuyruk DNA:** Hücrede bulunan toplam DNA'nın kuyrukta bulunan yüzdesi.
- **Kuyruk Momenti:** Bu birim kuyruk uzunluğu ve kuyrukta bulunan toplam DNA miktarının ölçümü sonucu ortaya çıkmıştır. Kuyrukta bulunan toplam DNA yüzdesi ile baş bölgesinin merkezinden itibaren kuyruğun merkez kısmına olan mesafenin ortak olarak hesaplanmasına dayanmaktadır.
- **Olive Tail Moment:** (Tail mean – Head mean) X Kuyruktaki %DNA/100

[Bandyopadhyaya vd., 2008] [Çavaş ve Könen 2007,2008].

Kometin gözle (manuel) analiziinde ise; Gözle değerlendirmede hücreler hasarsız ve farklı düzeylerde hasarlı olarak gözle kategorize edilmektedir. Anderson ve Kobayashi tarafından geliştirilen ve uygulanan bu yöntemin hassasiyeti sonraki yürütülen çalışmalarla da desteklenmiştir. Ayrıca mikroskopta okülere yerleştirilen mikron seviyesinde ölçüm yapabilen bir cetvelden de yararlanarak ölçüm yapmak suretiyle gerekli parametreler hesaplanabilmektedir. Gözle değerlendirme, hızlı ve bilgisayar programı gerektirmediğinden ucuz ve kolay ve benzer hassasiyete sahip bir yöntemdir [Bandyopadhyaya vd., 2008] [Çavaş ve Könen 2007,2008].



Şekil 3.4. Komet tipleri.

Gözle sayım, **Tip 0** (kuyruk yok)'dan **Tip 4** (hemen tüm DNA kuyruk bölgesindedir)'e kadar beş farklı kategoride incelenmektedir. Her örnek için 100 komet sayılır ve sayılırken her bir komet 0-4 arasında değer alır. Sonuçta toplam skor 0-400 arasında bir değer olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 3.4).

Gözle yapılan analize göre 5 sınıfa ayrılan kometlerin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan parametrelerden iki tanesi hasarlı hücre yüzdesi ve genetik hasar indeksi dir.

- **Hasarlı Hücre Yüzdesi**= Tip 2 + Tip3 + Tip4
- **Genetik Hasar İndeksi (GHI)**= [Tip 1+ (2xTip2)+(3xTip3)+(4xTip4)]

Bu tez çalışmasında komet hesaplaması yaparken bu iki parametre kullanılmıştır.

Komet testinin esasları pek çok araştırmacı tarafından ayrıntılarıyla ortaya konmuş ve DNA'daki oksidatif hasarın belirlenmesinde geçerli bir belirteç olduğu birçok çalışmada kanıtlanmıştır [Bandyopadhyaya vd., 2008] [Çavaş ve Könen 2007,2008].

Muthukumaran Shanmugavelu ve ark. tarafından wistar sıçanlarına nikotin uygulanmış ve quercetin(Q) nikotine karşı koruyucu etkisi komet testi kullanılarak araştırılmıştır. Böbrek, karaciğer, akciğer ve kan dokuları kullanılmış ve Q in nikotine karşı anlamlı seviyede bir koruyucu etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Q in koruyucu etkisi etkin bir antioksidan olan N-asetilsisteine bağlanmıştır [Shanmugavelu vd., 2008].

Sudheer tarafından ratlarda nikotinin sebep olduğu lipid peroksidasyonu ve DNA hasarına karşı ferulik asitin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Nikotinin sebep olduğu tek zincir kırıkları komet testi (alkalin tek zincir mikrojel elektroforezi) ile araştırılmış ayrıca mikronukleus testi yapılmıştır. Nikotinin genotoksik etkisine karşı ferulik asitin anlamlı seviyede koruyucu etkiye sahip olduğu bulunmuştur [Sudheer vd., 2008].

Gargi Bandyopadhyaya ve ark. tarafından rat karaciğer dokusunda nikotinin genotoksik etkisine karşı kurkuminin koruyucu etkisi komet testi uygulanarak araştırılmış ve anlamlı seviyede koruyucu etkiye sahip olduğu bulunmuştur [Bandyopadhyaya, G].

3.1.3. Apoptozun Belirlenmesi (Kantitatif Gen Ekspresyonu (Kaspaz-3 Ve 8) Yöntemi)

Kantitatif gen ekspresyonu, yapılan üçüncü ve son testtir. Uygulanan kimyasallar karşısında, karaciğer hücrelerinde kaspaz 3, 8 ve kontrol olarak ta beta aktin genlerinin ekspresyon miktarlarına bakılmıştır.

Bu test üç ana aşamadan oluşmaktadır.

1- Dokudan RNA izolasyonu.

2- Elde edilen RNA dan cDNA elde edilmesi.

3-Elde edilen cDNA ların real time PCR cihazına yüklenerek söz konusu genlerin ekspresyon oranlarının tayin edilmesi.

3.1.3.1. RNA izolasyonu (trizol yöntemi)

Trizol, doku ve hücreden RNA yı ede etmek için kullanılan bir ayırıcıdır. Guanidin izotiosiyanat ve fenolün monoplastik eriyiği olan bu ayıraç, tek adımda RNA izolasyonu metodu için kullanılır ve şu aşamalardan oluşur.

Homojenizasyon,

Seperasyon (ayırıştırma) fazı,

RNA nın presipitasyonu (çökmesi),

RNA nın yıkanması,

RNA nın çözdürülmesi.

Bu teknik insan , hayvan, bitki ve bakteri kökenli çok az miktardaki dokudan (50-100mg) ve hücreden (5x10⁶ hücre) ya da çok miktardaki dokudan ≥ 1 mg veya

hücre $>10^7$ iyi performans sağlar. Bu metod aynı zamanda örneğin büyük miktarının işleme alınmasını sağlar. Tüm prosedür bir saatte tamamlanabilir. DNA ve protein kontaminasyonu olmadan tüm RNA izole edilir. Bu yöntemle elde edilen RNA; northen blot, dot blot, polyA selection, in vitro translasyon, RNase protection assay, ve moleküler klonlamada kullanılabilir. Eğer PCR için kullanılacaksa elde edilen RNA ya DNAs 1(cat no:18068) uygulanması önerilir.

Trizol küçük yada büyük boyuttaki RNA türlerinin izolasyonuna yardımcı olur. Örneğin; sıçan karaciğerinden elde edilen RNA elektroforezde yürütülüp etidyum bromid ile boyandığında, yüksek moleküler ağırlıktaki bantlar (7kb-14kb mRNA hnRNA) predominant ribozomal RNA bantları 5kb (28S) ve (18S) ve düşük moleküler ağırlıktaki (0.1-0.3kb tRNA 5S) RNA lar gözlemlenir. İzole edilen RNA seyreltilip absorbanası ölçüldüğünde, A260/A280 oranı ≥ 1.8 çıkar.

Homojenizasyon; 1ml trizol için 50-100mg doku kullanarak homojenize edilir. Homojenizasyon için; cam-teflon homojenizatör yada power homojenizatör (politron veya tekmar tissumizer) kullanılır. Homojenizasyon için kullanılan doku, trizolün %10 unu geçmemelidir.

Opsiyon; çok miktarda protein, yağ, polisakkarit yada extrasellüler materyalin bulunduğu, kas, yağ yada bitki yumrusu gibi dokularda ekstra bir izolasyon basamağı gerekebilir. Homojenizasyonun ardından; homojenat santrifüj edilir. Pellet kısmı; ekstrasellüler membranları, polisakkaritleri ve yüksek molekül ağırlıklı DNA yı içerirken süpernatant kısmında RNA bulunmaktadır. Yağ dokudan elde edilen örneklerde üst kısımda çok fazla biriken yağ uzlaştırılmalıdır. Her durumda da, elde edilen homojenat temiz bir tüpe transfer edilerek aşağıda belirtildiği gibi seperasyon fazı uygulanır.

Seperasyon(Ayrıştırma) Fazı; Elde edilen homojenat, inkübasyona bırakılarak nükleoprotein kompleksinin çözünmesine izin verilir. Her 1ml lik trizol için 0.2ml kloroform eklenir. Tüplerin ağzı sıkıca kapatılır ve santrifüj edilir. Santrifüjle karışım; lower red faz, fenolkloroform faz, interfaz, renksiz üst sıvı faz olmak üzere katmanlara ayrılır. RNA, üst sıvı fazda bulunur. Bu fazın hacmi, homojenizasyon için kullanılan trizol hacmin %60 ıdır.

RNA nın presipitasyonu (çökmesi); Üst faz yeni bir tüpe transfer edilir. Eğer DNA ve protein izole edilecekse, bunları içeren organik faz kullanılmak üzere alınabilir. Üst sıvı faza izopropil alkol eklendiğinde RNA çökler ve santrifüj edilir. Çoğu zaman RNA, santrifüjden önce tüpün kenarında ya da dibinde jel gibi görülebilir.

RNA nın yıkanması; RNA pelleti %75 lik etanolle yıkanır. Bunun için ilk eklenen trizolün her 1ml si için en az 1ml %75 etanol eklenmelidir.

RNA nın çözdürülmesi; Prosedürün sonunda RNA pelleti kısaca kurutulur. Bunun için hava kurutması yada vakum kurutması kullanılabilir. Vakum santrifüj yoluyla kurutulmamalıdır. Tamamen kurumaması önemlidir çünkü o zaman çözünürlüğü azalır. Çözülmüş olan RNA örnekleri A260/280 oranı <1.6 dır. RNA, RNAaz sız su içerisinde yada %0.5 lik SDS ile çözdürülür. Eğer RNA, enzimatik reaksiyonlar için kullanılacaksa SDS önerilmez. RNA aynı zamanda %100 lük deiyonize formamid içerisinde de çözdürülebilir ve -70 °C de saklanır.

RNAaz Kontaminasyonunu Önleme Yöntemleri;

- Prosedür uygulanırken yapılacak bir yanlışlık ile anında RNAaz kontaminasyonu oluşur. Çünkü RNAaz ın aktivitesini inhibe etmek çok zordur. RNA ile çalışırken prosedüre uygun hareket etmek çok önemlidir.
- Her zaman tek kullanımlık eldiven kullanılmalı. Çünkü deri, RNA preparasyonunu olumsuz etkileyecek bakteri mantar yada RNAaz içerebilir.
- Steril, tek kullanımlık plastik kaplar ve cross kontaminasyonu önlemesi açısından otomatik pipetler kullanılmalı. RNA problemlerini kullanan laboratuvarlardaki tek kullanımlık olmayan pipetler ve filtreler zengin bir RNAaz A ve T1 kaynağıdır.
- Trizolün varlığında RNA , RNAaz kontaminasyonundan korunur. İleriki aşamalar, tek kullanımlık ve RNAaz sız plastik ya da cam gereçler gerektirir. Cam malzeme 150 °C de 4 saat bekletilmeli, plastik kaplar 0.5M NaOH içerisinde 10 dk bekletilmeli ardından iyice durulanarak otoklavlanmalıdır.
- Eğer çalışılacak trizol, 2ml den daha azsa kullanılan malzemenin polipropilen den yapılmış olması önerilir.
- Fazla miktardaki örnekler için cam malzeme kullanılacaksa, malzeme kloroform ve 12.000xg lik santrifüje dayanıklı olması gerekmektedir. Sızdıran ya da çatlak tüpler kullanılmamalıdır.
- Santrifüj cihazına malzemeler dengeli yerleştirilmelidir.
- Santrifüj sırasında tüplerin kapakları kapatılmalı ve cam tüplerin ağzına parafilm ya da metal kapak takılmalıdır.

3.1.3.2. Real Time PCR

Klasik PCR ABD'de Cetus şirketinde çalışan Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilmiştir. Bu buluşundan dolayı K.Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülüne layık görülmüştür. İlk kez 1985'de bilim dünyasına sunulan PCR da metod basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda

çoğaltılmasıdır. PCR reaksiyonunda üç temel basamak vardır ve çoğaltılmış ürün miktarı, bu üç adımın tekrarına bağlıdır.

- 1) Denatürasyon (90-95 °C)
- 2) Primer bağlanması (50-70 °C)
- 3) DNA sentezi (70-75 °C)

Bu üç adım bir PCR siklusunu oluşturur. Bu döngülerin ardından PCR sonlandırılır ve ürünlerin analizi yapılır.

PCR da kullanılan malzemeler;

- 1) Kalıp DNA
- 2) Reaction buffer
- 3) Forward primer
- 4) Reverse primer
- 5) dNTP
- 6) MgCl₂
- 7) Taq Polimeraz

PCR bu şekilde uygulanırken son zamanlarda PCR cihazları hassas ölçüm yapan cihazlarla birleştirilmiş ve real time PCR yöntemi ortaya çıkmıştır. Real-time PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Real-time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziyeye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziyeye özgün problemlerden yararlanılmaktadır. Real-time PCR Reaksiyon

esnasında her bir PCR siklüsünde yeterli miktarda ürünün verdiği floresans ışığa göre çalışıp, reaksiyonda aşama aşama sonuna kadar oluşan ürünü kontrol eden bir sistemdir. Işıma özelliğine sahip moleküller kullanarak, PCR'ı oluşurken izleme ve miktar belirleme yöntemidir.

Klasik PCR da, PCR sonundaki ürünler (amplikonlar) saptanır, analiz edilir. Real Time PCR (gerçek zamanlı PCR) da ise PCR devam ederken ortaya çıkan ürünler saptanmaya başladığı anda değerlendirmeye alınır. Bir flöresan röporterin kantitasyonu ve tanısı üzerine kuruludur.

Threshold cycle veya C_T değeri reaksiyonda önemli artışın olduğu ilk siklusu ifade eder. PCR ürünlerinin miktarındaki ilk önemli artış (C_T) hedef template'in başlangıç miktarı ile orantılıdır. Tüp içinde oluşan flöresan ile saptanır. Amplifikasyon sırasında saptama yapılır.

RT PCR da üç faz vardır;

Exponential Faz,

Linear Faz (Yüksek Farklılık),

Plateu Faz (End-point).

Exponential Faz; PCR ürün miktarı her siklusta tam olarak iki kat artar. Reaksiyon spesifik ve tamdır. Reaksiyonun Etkinliği %100 dür. Reaksiyonun tüm bileşenleri tazedir.

Linear Faz (yüksek farklılık); Reaksiyonun komponentleri tükenmeye başlar. Reaksiyon yavaşlar. Oluşan PCR ürünleri değrade olmaya başlar.

Plateu Faz (End-point); Geleneksel PCR larda jel bazlı tanıya geçilen safhadır. Reaksiyon sonlanmakta, yeni PCR ürünü oluşmamakta ve PCR ürünlerinin degrade olması artmaktadır.

Floresan Prob Sistemleri;

Hidrolizasyon problemleri: TaqMan, Beacons, Scorpions.

Hibridizasyon problemleri: (Light Cyclers (Roche).

DNA'ya bağlanan (binding) boyalar: SYBR Green.

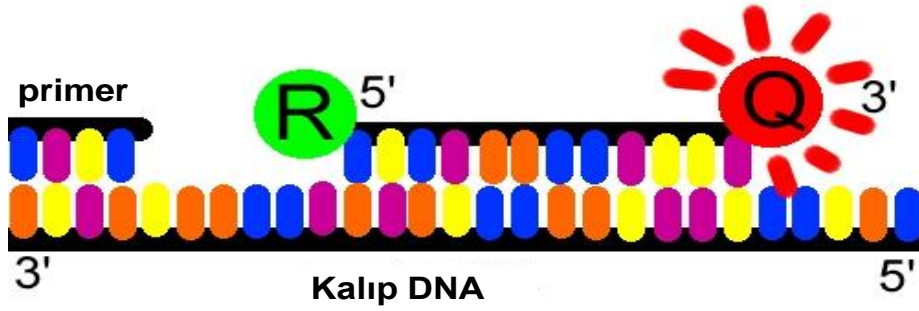
Yeni prob sistemleri: Peptide nucleic acids (PNAs), nükleik asit analogları (Tm 15), Minor Groove Binding (MGB), Locked Nucleic acid (LNA), Oligonükleotid riboz analogları.

Yaptığımız bu tez çalışmasında kullanılan Taq Man probun çalışma prensibi şu şekildedir;

- TaqMan sisteminde; 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır.
- Prob'un 5' ucunda raportör florokrom (6-carboxyfluorescein =6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine =TAMRA) bulunmaktadır (Şekil 3.5.).
- Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır.
- Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir (Şekil 3.6).



Şekil 3.5. Taq man probu

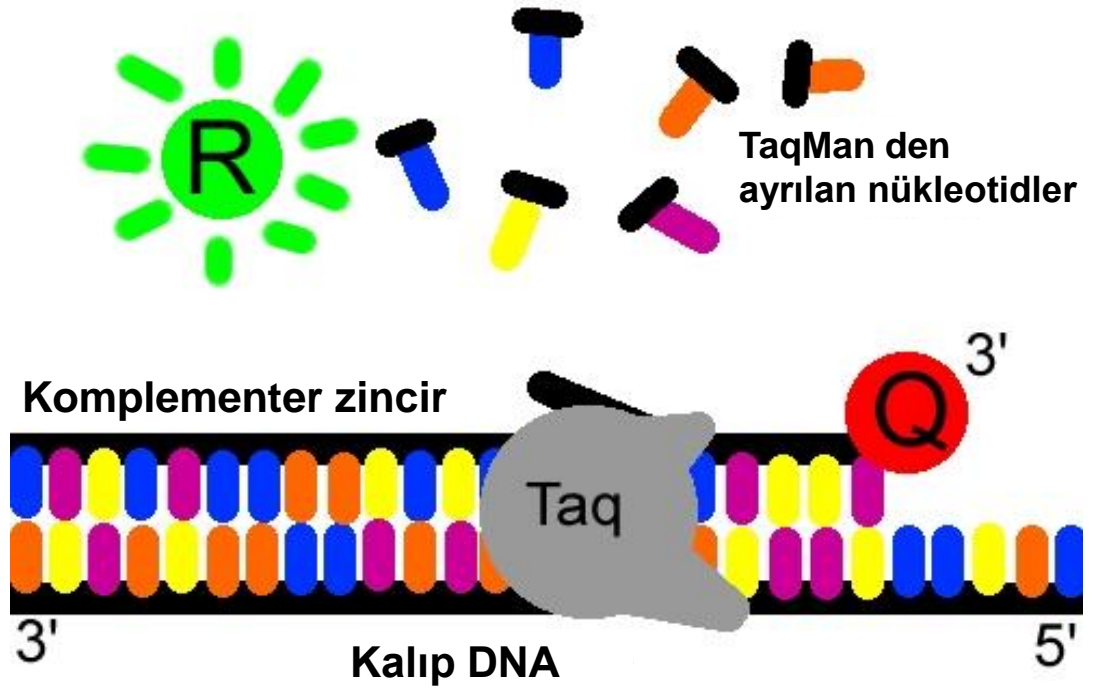


Şekil 3.6. Taq Man probun kalıp DNA ya bağlanması.

- Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması prob'un bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam

edebilmesi için *Taq* DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar.

- Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen amplikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Taq Man probun çalışması.

3.2.YÖNTEMLER

Bu çalışmada PFOS in oluşturabileceği geotoksik hasara karşı Kurkumin in koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak mersin üniversitesi deney hayvanları laboratuvarında 2-6 haftalık ve ortalama 200gr ağırlığındaki erkek sıçanlara 30 gün süresince 48 saatlik aralıklarla, gavaj yoluyla kimyasallar uygulanmıştır. Uygulamadan sonra kan ve karaciğer dokuları izole edilerek testler uygulanmıştır. MN ve komet yöntemleri hem karaciğer hemde kan dokusuna uygulanırken gen ekspresyonunun tayini için sadece karaciğer kullanılmıştır.

3.2.1. Mikronukleus(MN) Testi

3.2.1.1.Kullanılan kimyasal ve çözeltiler

Etilalkol

PBS

Homojenizasyon tamponu pH:7.5 (100ml için)

0.024M EDTA = 0,89mg

0.075M NaCl = 0,438mg

%10 DMSO distile su içerisinde çözdürülerek buzdolabında saklanır.

Akridin Oranj(AO) Çözeltisi: 0,01gr akridin oranj, 100ml distile su içerisinde çözdürülür. Ağzı kapalı ve ışık almayacak şekilde, oda ısısında 3 ay muhafaza edilebilir.

Karaciğer Homojenatının Hazırlanması; Karaciğer dokusu sıçandan izole edilip buz üzerinde küçük parçalara ayrılır. Bu işlemi takiben, 1gr örnek tüpe alınıp üzerine 1ml homojenizasyon tamponu eklenir. +4 C⁰ de, 10 dk, 600rpm de homojenize edilir. Ardından yine +4 de, 2000rpm de, 10dk boyunca santrifüj edilir. Süpernatand kısmı atılır. Pellet kısmı 1:1 oranında PBS ile karıştırılarak analiz edilinceye kadar buzdolabında saklanır. Bu stok hem MN testi hem de komet testi için kullanılabilir.

3.2.1.2 Karaciğer için MN testi

Önceden hazırlanıp buzdolabında saklanan karaciğer homojenatı 1:10 oranında PBS ile seyreltilir. Daha sonra seyreltik solüsyondan 100µl alınarak lam üzerine damlatılır. Bir lamel yardımıyla lama eşit şekilde dağıtılır ve kurumaya bırakılır. Kuruduktan sonra etilalkolde 10dk bekletilerek fikse edilir. Etilalkolden çıkarılarak kurutulur ve inceleme yapılacağı güne kadar kuru bir yerde muhafaza edilir.

İncelemenin yapılacağı zaman preparatların üzerine 75µl AO çözeltisi damlatılıp üzerine bir lamel kapatıldıktan sonra floresan mikroskobun 40 lık objektifinde sayımlar yapılır.

Sayımlar yapılırken sınırları belirgin çekirdekleri net görünümlü 1000 hepatosit hücresi sayılır ve bunlar içerisinde mikronukleus taşıyanlar belirlenir. Mikronukleuslar belirlenirken de mikronukleusun büyüklüğü çekirdeğin yarısını geçmemeli ve mikrovidayla oynandığında çekirdekle aynı ışıltıyı vermelidir.

3.2.1.3. Kan dokusunda MN

Sıçan kalbinden enjektörle alınan kandan bir damla lama damlatılır. Ardından bir lamel alınır ve 45 derecelik açıyla kan lama yayılır. Bir saat kuruması beklenir. Kuruduktan sonra 10dk etil alkolde bekletilerek fikse edilir. Ardından kurutulur ve mikroskopta sayımın yapılacağı güne kadar kuru bir yerde muhafaza edilir. Mikroskopta sayım yapılacağı zaman preparatın üzerine 75µl AO damlatılıp üzerine bir lamel kapatılır ve floresan mikroskobun 40 lık objektifinde sayım yapılır.

Sayım yapılırken dikkat edilmesi gereken bazı noktalar bulunmaktadır. Kan dokusu birçok hücre grubundan meydana gelmektedir. Bunlar arasından çekirdekli polikromatik eritrositler baz alınmalıdır. Sınırları net ve çekirdekleri belirgin polikromatik eritrositler arasından 1000 hücre sayılır ve bunlar arasından mikronukleus taşıyanlar not edilir. Mikronukleuslar belirlenirken karaciğer dokusunda olduğu gibi burada da mikronukleusun büyüklüğü ana çekirdeğin yarısını geçmemelidir. Ayrıca mikrovidayla oynandığında çekirdekle aynı renk ışıltı vermelidir.

3.2.2. Komet Testi

3.2.2.1. Kullanılan kimyasal ve çözeltiler

Etilalkol

PBS

%0.65'lik NMA (Normal Melting Agaroz)

LMA (Low Melting Agaroz)

2 mg/ml'lik Etidyum Bromür boya çözeltisi

Lizis Çözeltisi (pH:10)

2.5M NaCl

100mM Tris Tris

100nM EDTA

Deneyden 30 dakika önce

%1 Triton X100(v/v)

%10 DMSO (v/v) eklenir ve pH 10'a ayarlanır.

Elektroforez Çözeltisi (+4 °C) (pH: 13)

0.3 M NaOH

1 nM EDTA

Nötralizasyon Çözeltisi pH 7.5

400 nM Tris

3.2.2.2. Komet in uygulanması

- ✓ Kullanılacak lamalar rodajlı değilse önceden rodajlanarak pürüzlü yüzey oluşturulur.
- ✓ Rodajlı lamalar bir gün önceden %0.65'lik NMA (normal melting agaroz) ile kaplanır.
- ✓ Preparatların daldırılacağı tüm çözeltiler soğuk olmalı. Bunun için distile su hazırlanır soğuması için buzdolabında muhafaza edilir.

- ✓ Çalışmaya başlarken öncelikle su banyosu kurulur ve sıcaklığı 37 °C ye ayarlanır.
- ✓ Su banyosu ısınırken biryandan LMA hazırlanır ve hemen donmaması için ısınmış olan su banyosuna bırakılır.
- ✓ Su banyosunun kuyucuklarına örnek sayısı kadar numaralı ependof tüp dizilir. Ependoflara 250 µl LMA konulur. Üzerlerine 30 µl çalışılacak olan örnek eklenir (Eğer kan çalışılıyorsa; doğrudan tam kan PBS ile 1/10 oranında seyreltilerek eklenir. Karaciğer çalışılıyorsa homojenize edilmiş ve buzdolabında bekletilen stok örnekten alınıp PBS ile 1/10 oranında seyreltilerek eklenir. Homojenize karaciğer dokusu hem MN deneyi için hemde komet deneyi için aynı şekilde hazırlanmaktadır.
- ✓ Daha sonra ependorf tüplerindeki karışım mikropipetle karıştırılarak 100 µl alınır ve lamlara üç noktaya damlatılır ardından üzerlerine lameller kapatılır (bu işlem buz plakalarının üzerinde yapılır).
- ✓ Lamalar hemen dolaba kaldırılır ve 15dk buzdolabında bekletilir.
- ✓ Dolaba kaldırılan lamalar çıkarılır. Lamaların üzerindeki lameller yavaşça yana doğru çekilerek alınır.
- ✓ Lamalar şalelere dizilir ve üzerlerine soğuk liziz çözeltisi eklenir. Işık almasını diye alüminyum folyoya sarılır ve dolaba kaldırılır. Bu şekilde 1-24 saat lizizde bekleyebilir.
- ✓ Lizize bırakılan örneklerin olduğu şaleler dolaptan çıkarılır, folyoları sökülür. Lamaları şaleden çıkarmadan, şaleler eğilerek liziz tamponu yavaşça süzülür.
- ✓ Şalenin üzerine soğuk su konulur ve hemen geri süzülür (soğuk suyla şoklanır).
- ✓ Lamalar elektroforez tankının tablasına yanyana yavaşça dizilir (sıcaklık hep +4 de olmalıdır. Aksi takdirde LMA eriyerek lamaların üzerinden akar).
- ✓ Tanka, elektroforez tamponu konulur (lamaların üzerini örtecek kadar) .
- ✓ Tankın kapağı kapatılır ve ışık almayacak şekilde tank sarılır.
- ✓ 20 dk elektroforezin güç kaynağı kapalı şekilde lamalar bekler.
- ✓ Bu süre dolunca elektroforez işlemi başlatılır. 25 V ve 300 mA de 20 dakika boyunca elektrik akımına maruz bırakılır.

- ✓ 20 dk sonra lamalar çıkarılarak boş şalelere konur ve üzerine yavaşça soğuk nötralizasyon tamponu eklenir. 5dk nötralizasyonda kalır.
- ✓ Şaleler yavaşça süzülür. Üzerine soğuk su konur tekrar süzülür.
- ✓ Soğuk etil alkol konulur ve 10dk beklenir.
- ✓ Alkolden çıkarılıp kurutulur. Daha sonra incelenmek üzere temiz bir yerde saklanır.
- ✓ İnceleneceği zaman 2 mg/ml'lik Etidyum Bromür çözeltisinden her preparat üzerine 100 µl damlatılır ve üzerine bir lamel kapatıldıktan sonra floresan mikroskop altında inceleme yapılır.

Mikroskopik değerlendirme yapılırken her preparat için 100 tane hücre sayıldı. Her bir hücre kuyruk uzunluğuna göre komet tip 0, 1, 2, 3, 4 olarak numaralandırıldı. Ardından aşağıdaki formüllere göre HHY (Hasarlı Hücre Yüzdesi) ve GHI (Genetik Hasar İndeksi) olmak üzere iki parametre oluşturuldu ve istatistiksel işlemler bu parametreler üzerinden yapıldı.

- **Hasarlı Hücre Yüzdesi**= Tip 2 + Tip3 + Tip4
- **Genetik Hasar İndeksi (GHI)**= [Tip 1+ (2xTip2)+(3xTip3)+(4xTip4)]

3.2.3. Kantitatif Gen Ekspresyonu (Kaspaz 3 Ve 8)

3.2.3.1. Gerekli kimyasal malzemeler

Trizol (15596-026)

Kloroform (34697)

İzopropanol (AC423830000)

EtOH (Etil alkol)

DEPC

Taq man gen exp. Kiti (KASPAZ 3 VE KASPAZ 8) (998327) (Applied Biosystem)

High Capacity cDNA Revers Transcription Kiti (4368814) (Applied Biosystem)

Rat ACTB (4352931E) (Applied Biosystem)

Taq man gene exp. Master mix (4369016) (Applied Biosystem)

Kantitatif gen ekspresyonu, yapılan üçüncü ve son testtir. Uygulanan kimyasallar karşısında, karaciğer hücrelerinde kaspaz 3, 8 ve kontrol olarak ta beta aktin genlerinin ekspresyon miktarlarına bakılmıştır.

Bu test üç ana aşamadan oluşmaktadır.

1- Karaciğerden RNA izolasyonu.

2- Elde edilen RNA dan cDNA elde edilmesi.

3-Elde edilen cDNA ların Real Time PCR cihazına yüklenerek söz konusu genlerin ekspresyon oranlarının tayin edilmesi.

3.2.3.2. Trizol ile karaciğer dokusunan RNA izolasyonu

- ✓ 100mg doku buz üzerinde küçük parçalara ayrılır ve üzerine 1000 µl +4 trizol eklenip kabaca pipetaj yapılır.
- ✓ 15dk buz üzerinde bekletilir. Bekleme sırasında 5dk arayla vortekslenir.
- ✓ 10dk, 14 000rpm de +4 C⁰ de santrifüj edilir.
- ✓ Süpernatantı 1.5ml lik tüpe transfer edilir.
- ✓ 200 µl kloroform eklenir.

- ✓ 15 saniye vortekslenir.
- ✓ 10dk buz üzerinde bekletilir.
- ✓ 15dk, 14 000rpm de +4 C⁰ de santrifüj edilir.
- ✓ Süpernatantın %70 lik saydam kısmı başka tüpe transfer edilir.
- ✓ Transfer edilen kısma eşit hacimde izopropanol eklenir (500-250 µl)
- ✓ Kısa süre vortekslenir.
- ✓ 10dk buz üzerinde bekletilir.
- ✓ 10dk, 14 000rpm de +4 C⁰ de santrifüj edilir.
- ✓ Dipteki pelletin görülmesi önemli.
- ✓ Süpernatant kısmı atılır.
- ✓ 1ml %75 lik EtOH(DEPC) (-20 C⁰) eklenir.
- ✓ Kısaca vortekslenir.
- ✓ 5dk 14 000rpm de + 4 C⁰ de santrifüj edilir.
- ✓ Tamamı alınır ve buz üzerinde ağzı açık 6dk bekletilir.
- ✓ 20 µl DEPC li su eklenir.
- ✓ Buz üzerinde 15dk pipetaj yapılır(ağzı açık)
- ✓ Daha sonra kullanılmak üzere -20 C⁰ ye kaldırılır.

3.2.3.3. RNA'dan cDNA elde edilmesi

Önce bir tüp içerisine master mix hazırlanır. Hazırlanırken kimyasallar Çizelge 3.1. e göre eklenir. Hazırlandıktan sonra başka bir tüpe Master mixten 10µl ve RNA dan 10 µl eklenir (toplam 20µl).

Çizelge 3.1. cDNA elde etmek için kullanılan master mix içeriği.

	MASTER MİX HAZIRLANIRKEN EKLENECEKLER	BİR ÖRNEK İÇİN EKLENECEK MİKTAR(µl) 1 örnek için toplam 10µl
1	Nuclease-free H ₂ O	3.2
2	10X RT Buffer	2
3	25x dNTP MİX (100mM)	0.8
4	10X RT Random Primer	2
5	RNAas inhibitörü	1
6	Multi Scrbe Revers Transcriptase	1

Master mix ve RNA tüpe eklendikten sonra kısa süreli santrifüj edilir. Örnekler cihaza yerleştirilir ve tablodaki koşullara göre cihaz ayarlanarak cDNA elde edilir.

Çizelge 3.2. cDNA elde etmek için uygulanan sıcaklık-zaman koşulları.

	Adım1	Adım2	Adım3	Adım4
Sıcaklık C⁰	25	37	85	4
Zaman (dakika)	10	120	5

3.2.3.4. Real time (RT) PCR işlemleri

Önce Çizelge 3.3. teki miktarlara göre bir tüpte master mix hazırlanır. Master mix hazırlandıktan sonra PCR plate in her kuyucuğuna 23 µl master mix ve 2 µl cDNA eklenerek yürütme yapılır.

Çizelge 3.3. RT PCR için master mix içeriği.

Master mix için eklenecek maddeler	Bir örnek için eklenmesi gereken miktar
Su	9,25 µl
Taq man	12,5 µl
Primer probe	1,25 µl
Toplam hacim	23 µl

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

Çalışmada karaciğer ve kan dokularıyla yapılan mikronukleus (MN) ve komet testleri ile karaciğer dokusuyla yapılan kantitatif gen ekspresyonu (kaspaz 3 ve 8) testlerinin sonuçları aşağıda tablo ve fotoğraflarla belirtilmiştir.

4.1.1. Kanda Yapılan MN Testi Sonucu

Sonuçların normal dağılıma uygun olup olmadıklarının anlaşılması için Shapiro Wilk testi uygulanmıştır. Test sonucuna göre kandaki MN değerleri normal dağılıma uygun bir dağılım göstermemektedir ($p=0,007$). Bu yüzden grupların istatistiksel analizi için Krukal-Wallis testi uygulanmıştır. Buna göre; genel olarak PFOS'un doz artışına bağlı olarak MN miktarı artmış, kurkumin varlığı bu artışı azaltmıştır. MN değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$). NK ile 2.5 mg/kg PFOS lık grup arasında kandaki MN değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,05$). Testin sonuçları ve mikroskopik görüntüsü Çizelge 4.1, Şekil 4.1. ve 2 de gösterilmiştir.

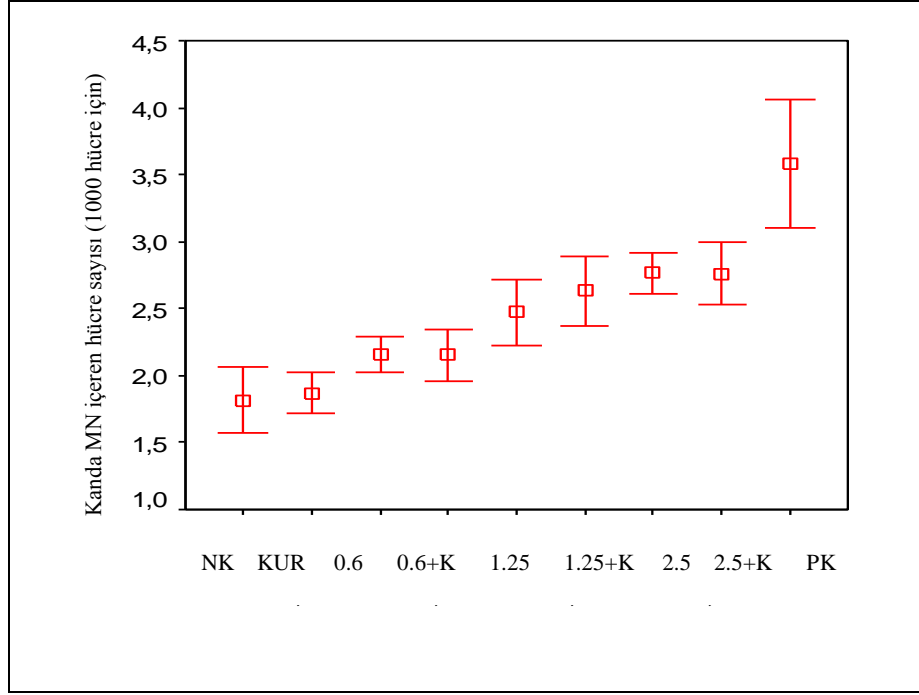
Çizelge 4.1. PFOS ve kurkumin uygulanmış sıçanların kan dokusu polikromatik hücrelerinde mikronukleus frekansları .

GRUPLAR	1000 polikromatik eritrositten MN içerenlerin ortalaması +/- standart sapma
Negatif kontrol(NK)	1,81 +/- 0,23
Kurkumin(K)	1,86 +/- 0,14 ^a
0,6 mg/kg PFOS	2,15 +/- 0,12 ^a
0,6 mg/kg PFOS+K	2,15 +/- 0,18 ^a
1,25 mg/kg PFOS	2,47 +/- 0,23 ^a
1,25 mg/kg PFOS+K	2,63 +/- 0,24 ^a
2,5 mg/kg PFOS	2,76 +/- 0,14 ^a
2,5 mg/kg PFOS+K	2,76 +/- 0,22 ^c
PK (0,2 mg/kg MMC)	3,58 +/- 0,45 ^a

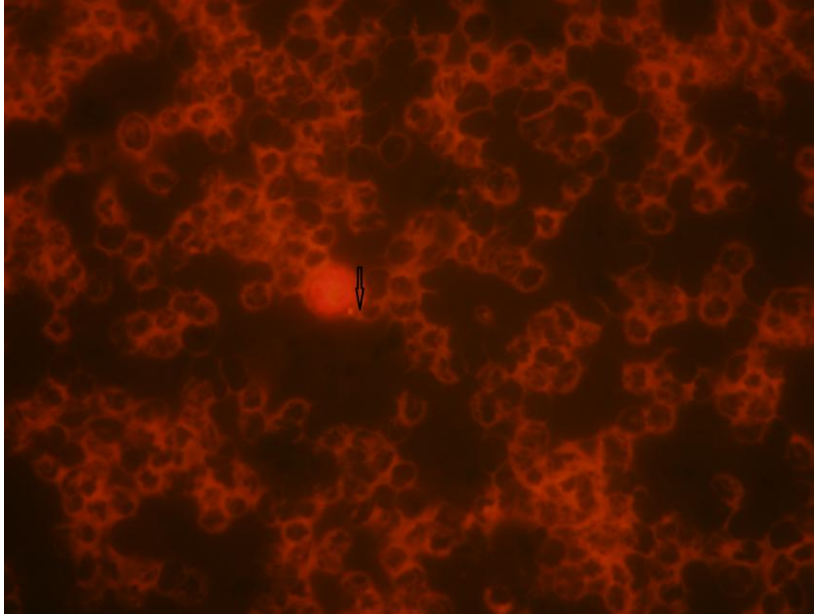
^a ; grup diğer gruplardan istatistiksel olarak ($p < 0,001$) farklıdır,

^b ; grup negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak ($p < 0,001$) farklıdır,

^c ; grup negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak ($p < 0,05$) farklıdır.



Şekil 4.1. MN içeren kan hücrelerinin dozlara göre oranı (birimler mg/kg cinsinden verilmiştir). PK: pozitif kontrol, NK: negatif kontrol, K: kurkumin)



Şekil 4.2. AO ile boyanan kan hücrelerinin floresan mikroskop altındaki görüntüsü. MN içeren polikromatik eritrosit işaretlenmiştir.

4.1.2. Karaciğer İçin MN Testi Sonucu

Sonuçların normal dağılıma uygun olup olmadıklarının anlaşılması için Shapiro Wilk testi uygulanmıştır. Değerler normal dağılıma uygun bir dağılım göstermektedir ($p=0,348$). Bu yüzden analizi ANOVA ile yapılmıştır. ANOVA testine göre genel olarak PFOS in doz artışına bağlı olarak karaciğerde MN miktarı artmış, kurkumin varlığı bu artışı azaltmıştır. Karaciğer MN değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$). NK grubu ile 0,6 mg/kg PFOS grubu arasında karaciğerdeki MN değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,05$). NK grubu ile 1,25 mg/kg PFOS grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$). Test sonucu ve mikroskopik görüntüsü Çizelge 4.2. , Şekil 4.3. , Şekil 4.4. ve Şekil 4.5. te gösterilmektedir.

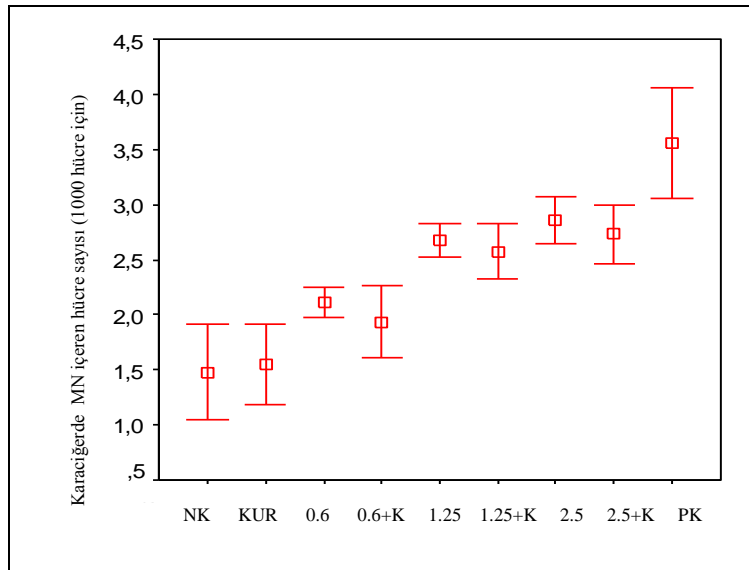
Çizelge. 4.2. Sıçan karaciğer hücrelerinde MN sonuçları.

GRUPLAR	ORTALAMA(1000 hücre içinde MN içerenlerin ortalaması +/- standart sapma)
Negatif kontrol(NK)	1,47 +/- 0,41
Kurkumin(K)	1,54 +/- 0,34 ^a
0,6 mg/kg PFOS	2,11 +/- 0,12 ^c
0,6 mg/kg PFOS+K	1,93 +/- 0,31 ^a
1,25 mg/kg PFOS	2,67 +/- 0,14 ^b
1,25 mg/kg PFOS+K	2,57 +/- 0,23 ^a
2,5 mg/kg PFOS	2,85 +/- 0,20 ^a
2,5 mg/kg PFOS+K	2,72 +/- 0,25 ^a
PK (0,2 mg/kg MMC)	3,55 +/- 0,47 ^a

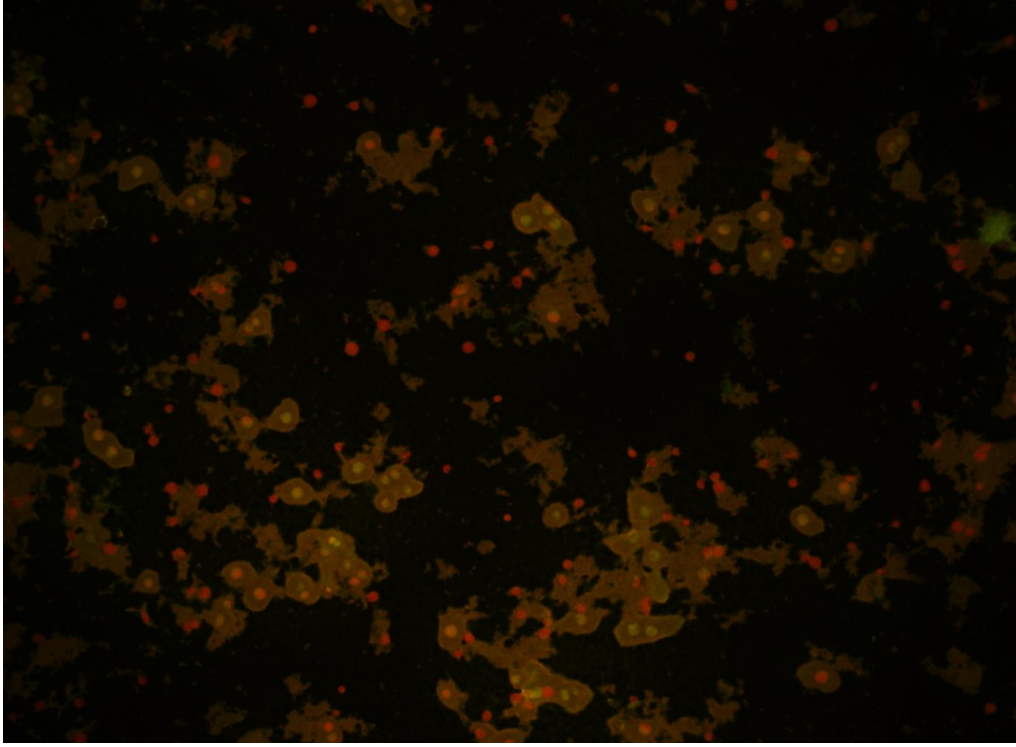
^a ; grup diğer gruplardan istatistiksel olarak ($p<0,001$) farklıdır,

^b ; grup negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak ($p<0,001$) farklıdır,

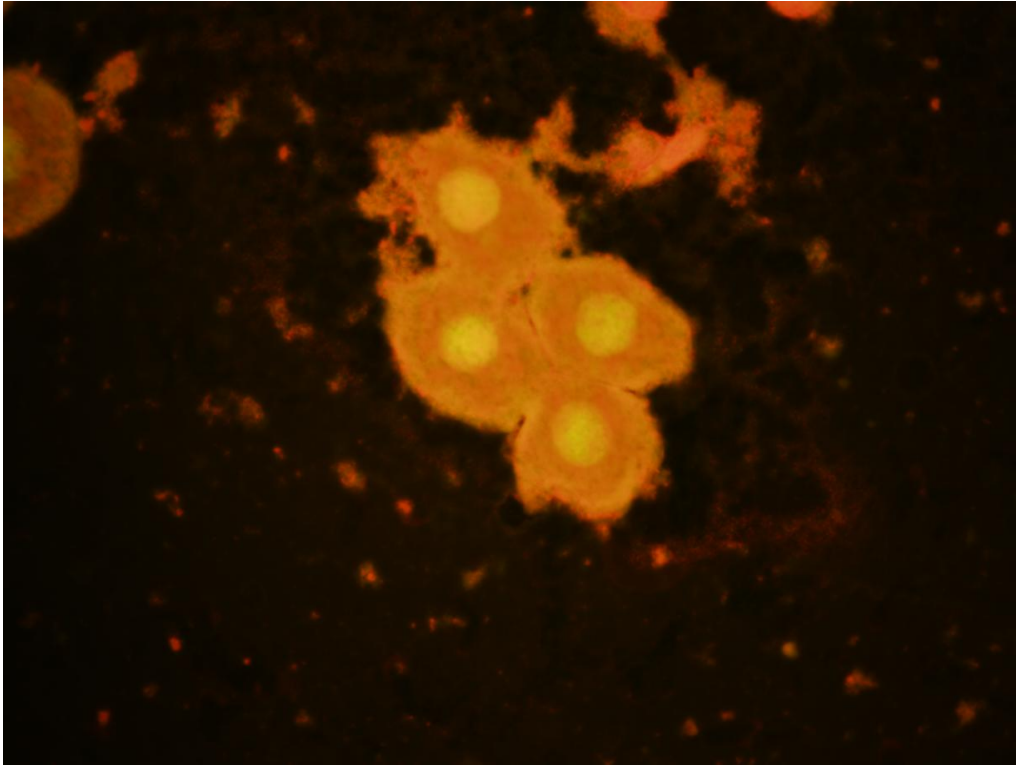
^c ; grup negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak ($p<0,05$) farklıdır.

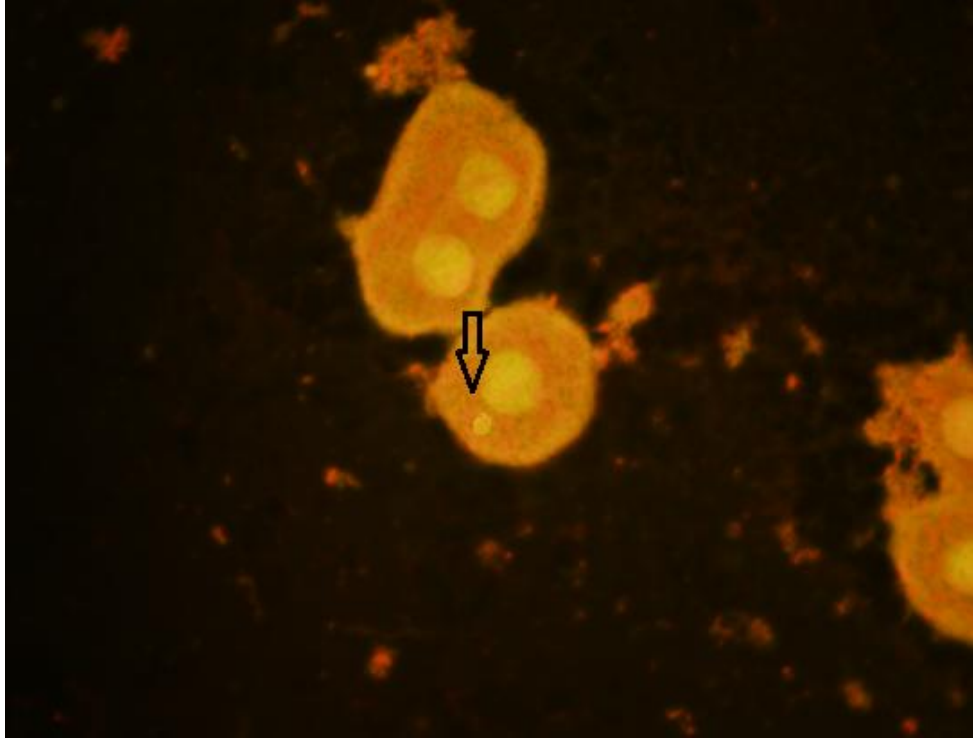


Şekil 4.3. 1000 hücre içerisinde MN içeren karaciğer hücrelerinin dozlara göre oranı.



Şekil 4.4. Karaciğer hücrelerinin floresan mikroskop altındaki görüntüsü.





Şekil 4.5. Karaciğer hücrelerinin floresan mikroskoptaki görüntüsü. MN içeren hücre işaretlenmiştir.

4.1.3. Kan Hücrelerinde Yapılan Komet Analizinde Hasarlı Hücre Yüzdesi (HHY) Sonucu

Sonuçların normal dağılıma uygun olup olmadıklarının anlaşılması için Shapiro Wilk testi uygulanmıştır. Kanda yapılan komet testi HHY değerleri normal dağılıma uygun bir dağılım göstermemektedir ($p=0,004$). Bu yüzden analizde Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Genel olarak PFOS'ın doz artışına bağlı olarak HHY miktarı artmış, kurkumin varlığı bu artışı azaltmıştır. Değerler bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$). NK grubu ile 1,25 mg/kg PFOS grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,05$). Testle ilgili veriler Çizelge 4.3. ve Şekil 4.6. da belirtilmiştir.

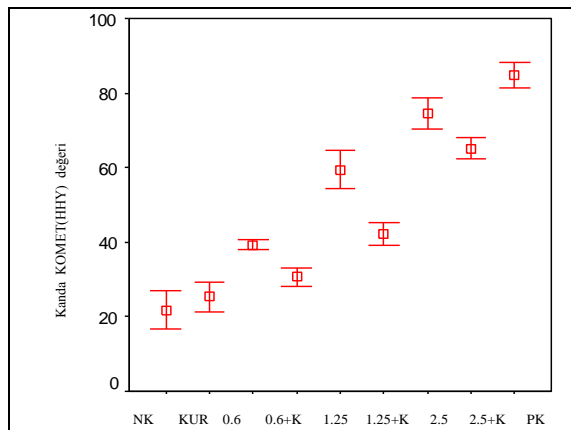
Çizelge 4.3. Kanda yapılan Komet testinde HHY nin ortalaması ve standart sapması. HHY, 100 hücre içerisinde komet tip 2, komet tip 3 ve komet tip 4 içerenlerin toplam sayısıdır. Komet tip 0 ve komet tip1 ler bu toplama dahil edilmemiştir.

GRUPLAR	ORTALAMA
Negatif kontrol(NK)	21,83 +/- 4,95
Kurkumin(K)	25,33 +/- 3,93 ^a
0,6 mg/kg PFOS	39,33 +/- 1,21 ^a
0,6 mg/kg PFOS+K	30,66 +/- 2,25 ^a
1,25 mg/kg PFOS	59,50 +/- 4,72 ^c
1,25 mg/kg PFOS+K	42,16 +/- 2,78 ^a
2,5 mg/kg PFOS	74,50 +/- 3,93 ^a
2,5 mg/kg PFOS+K	65,16 +/- 2,63 ^a
PK (0,2 mg/kg MMC)	84,83 +/- 3,18 ^a

^a ; grup diğer gruplardan istatistiksel olarak (p<0,001)farklıdır,

^b ; grup negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak (p<0,001)farklıdır,

^c ; grup negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak (p<0,05) farklıdır.



Şekil 4.6. Kanda yapılan komet testine göre HHY'nin dozlara göre oranı. HHY, 100 hücre içerisinde komet tip 2, komet tip 3 ve komet tip 4 içerenlerin toplam sayısıdır. Komet tip 0 ve komet tip1 ler bu toplama dahil edilmez.

4.1.4. Kanda Yapılan Komet Analizinde Genetik Hasar İndeksi (GHI) Sonuçları

Sonuçların normal dağılıma uygun olup olmadıklarının anlaşılması için Shapiro Wilk testi uygulanmıştır. Değerler normal dağılıma uygun dağılış göstermemektedir ($p<0,001$). Analizde Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Genel olarak PFOS'un doz artışına bağlı olarak GHI artmış, kurkumin varlığı bu artışı azaltmıştır. Değerler bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$). NK grubu ile 1,25 mg/kg PFOS grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,05$). Testle ilgili veriler ve mikroskopik görüntüler çizelge 4.4. şekil 4.7. ve şekil 4.8. de belirtilmiştir.

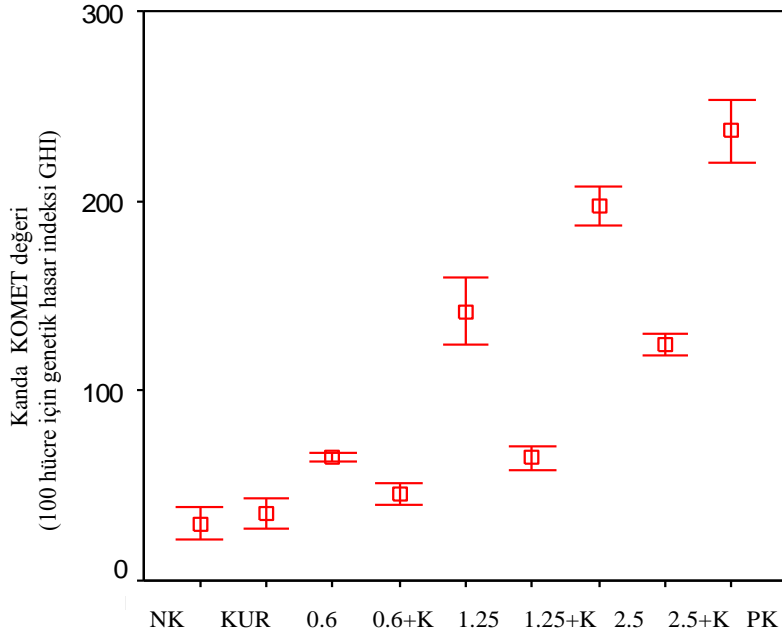
Çizelge 4.4. Kanda yapılan komet testine göre genetik hasar indeksi (GHI) nin gruplara göre dağılımı. GHI: [Tip 1+ (2xTip2)+(3xTip3)+(4xTip4)]. Komet tip 0 lar formüle dahil edilmemiştir.

GRUPLAR	ORTALAMA
Negatif kontrol(NK)	29,83 +/-8,01
Kurkumin(K)	35,33 +/-7,31 ^a
0,6 mg/kg PFOS	64,83 +/-2,31 ^a
0,6 mg/kg PFOS+K	45,33 +/-5,57 ^a
1,25 mg/kg PFOS	141,83 +/-17,05 ^c
1,25 mg/kg PFOS+K	64,66 +/-5,71 ^a
2,5 mg/kg PFOS	197,33 +/-9,37 ^a
2,5 mg/kg PFOS+K	124,33 +/-4,92 ^a
PK (0,2 mg/kg MMC)	237,00 +/-15,64 ^a

^a ; grup diğer gruplardan istatistiksel olarak ($p<0,001$)farklıdır,

^b ; grup negatif kontrol rubundan istatistiksel olarak ($p<0,001$)farklıdır,

^c ; grup negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak ($p<0,05$) farklıdır.



Şekil 4.7. Kanda yapılan komet testi ne göre GHI nin dozlara oranı. GHI: [Tip 1+(2xTip2)+(3xTip3)+(4xTip4)]. Komet tip 0 lar formüle dahil edilmez.



Şekil 4.8. Komet oluşturmuş bir kan hücresinin floresan mikroskop altındaki görüntüsü

4.1.5. Karaciğerde Yapılan Komet Analizine Göre Hasarlı Hücre Yüzdesi (HHY) Sonuçları

Sonuçların normal dağılıma uygun olup olmadıklarının anlaşılması için Shapiro Wilk testi uygulanmıştır. Karaciğerdeki komet 1 değerleri normal dağılıma uygun bir dağılım göstermemektedir ($p=0,001$). Analizde Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Genel olarak PFOS in doz artışına bağlı olarak HHY artmış, kurkumin varlığı bu artışı azaltmıştır. Değerler bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$). NK grubu ile 2,5 mg/kg PFOS grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p=0,001$). Testle ilgili veri ve görüntüler Çizelge 4.5., Şekil 4.9. ve Şekil 4.10 da görülmektedir.

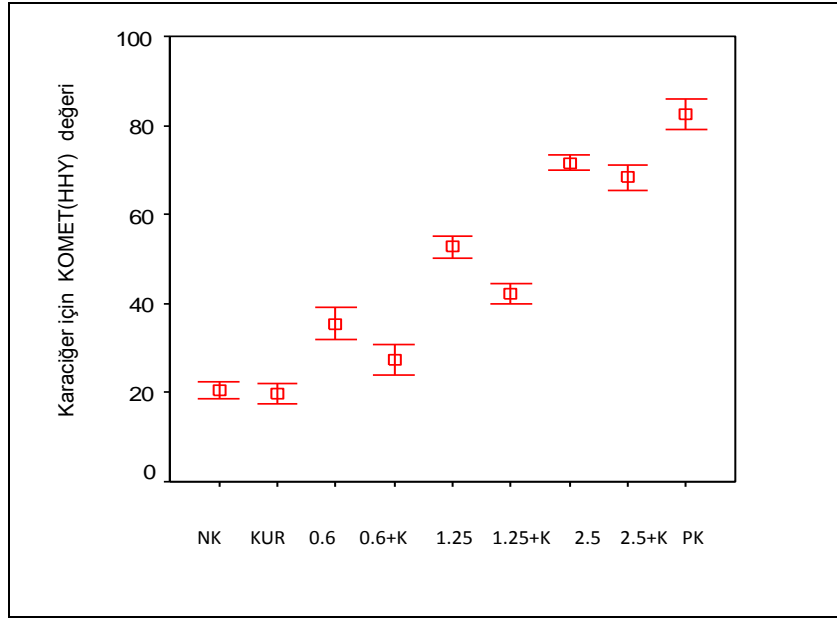
Çizelge 4.5. Karaciğerde yapılan Komet Analizine Göre HHY nin ortalaması ve standart sapması. HHY: 100 hücre içerisinde komet tip 2, komet tip 3 ve komet tip 4 içerenlerin toplam sayısıdır. Komet tip 0 ve komet tip1 ler bu toplama dahil edilmemiştir. Yıldız olan grup diğer gruplardan istatistiksel olarak ($p<0,001$) farklıdır.

GRUPLAR	ORTALAMA
Negatif kontrol(NK)	20,66 +/-1,86
Kurkumin(K)	19,66 +/-2,16 ^a
0,6 mg/kg PFOS	35,50 +/-3,44 ^a
0,6 mg/kg PFOS+K	27,33 +/-3,38 ^a
1,25 mg/kg PFOS	52,66 +/-2,50 ^a
1,25 mg/kg PFOS+K	42,33 +/-2,16 ^a
2,5 mg/kg PFOS	71,50 +/-1,64 ^a
2,5 mg/kg PFOS+K	68,33 +/-2,80 ^a
PK (0,2 mg/kg MMC)	82,50 +/-3,14 ^a

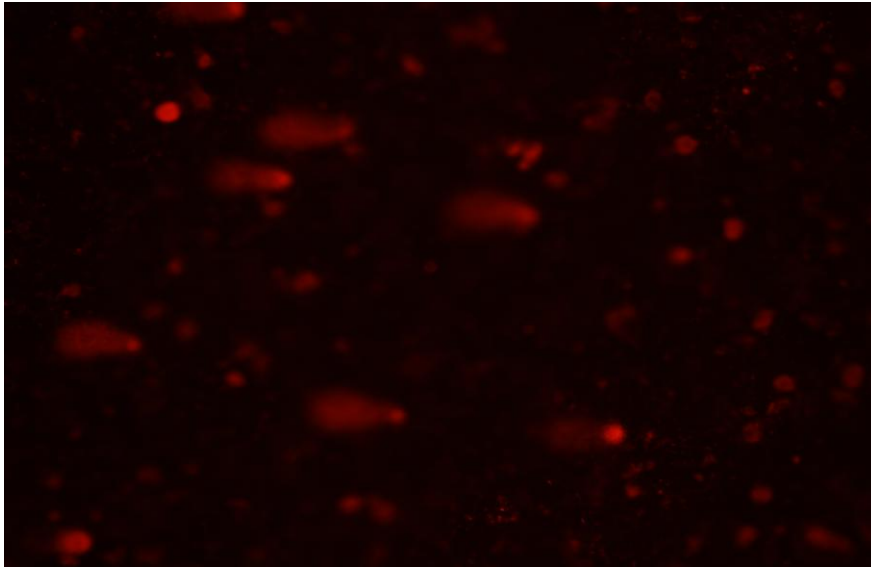
^a ; grup diğer gruplardan istatistiksel olarak ($p<0,001$) farklıdır,

^b ; grup negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak ($p<0,001$) farklıdır,

^c ; grup negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak ($p<0,05$) farklıdır.



Şekil 4.9. Karaciğerde yapılan komet testine göre HHY nin dozlara göre oranı. HHY hasarlı hücre yüzdesi olup 100 hücre içerisinde komet tip 2, komet tip 3 ve komet tip 4 içerenlerin toplam sayısıdır. Komet tip 0 ve komet tip1 ler bu toplama dahil edilmemiştir.



Şekil 4.10. Komet oluşturan karaciğer hücrelerinin floresan mikroskop altındaki görüntüleri.

4.1.6. Karaciğerde Yapılan Komet Analizine Göre Genetik Hasar İndeksi (GHI) Sonuçları

Sonuçların normal dağılıma uygun olup olmadıklarının anlaşılması için Shapiro Wilk testi uygulanmıştır. Karaciğerdeki komet analizi GHI değerleri normal dağılıma uygun bir dağılım göstermemektedir ($p<0,001$). Analizde Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Genel olarak PFOS in doz artışına bağlı olarak GHI artmış, kurkumin varlığı bu artışı azaltmıştır. Değerler bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,001$). NK grubu ile 2,5 mg/kg PFOS grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p=0,001$). Testle ilgili veriler Çizelge 4.6. ve Şekil 4.11 de gösterilmiştir.

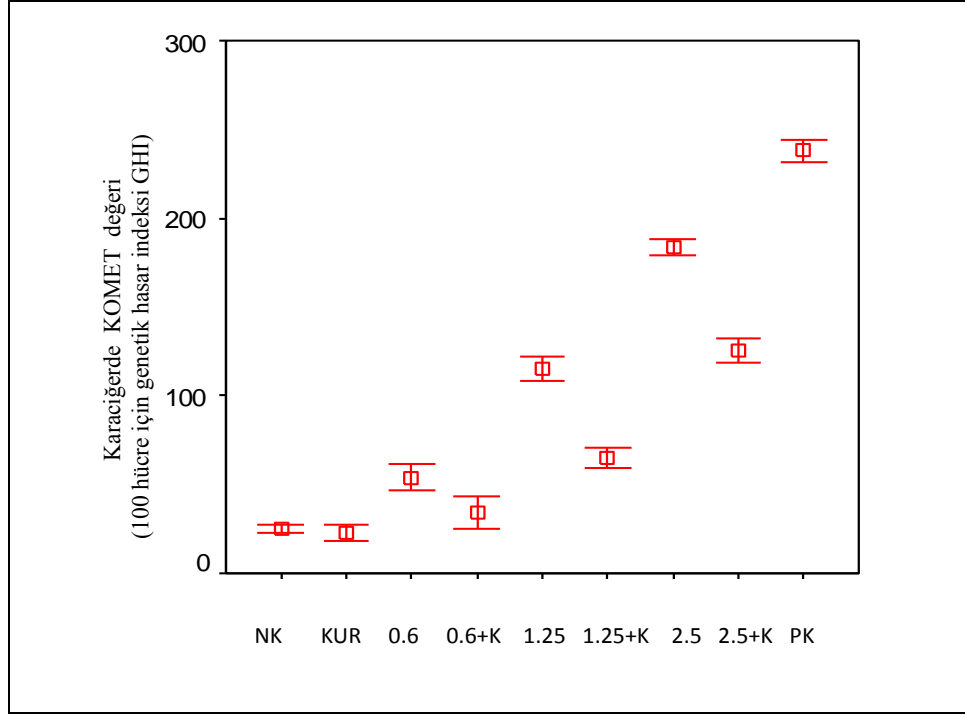
Çizelge 4.6. Karaciğerde yapılan komet analizine göre genetik hasar indeksi (GHI) nin gruplara göre dağılımı.

GRUPLAR	ORTALAMA
Negatif kontrol(NK)	25,00 +/- 2,60
Kurkumin(K)	22,66 +/-4,36 ^a
0,6 mg/kg PFOS	53,83 +/-6,91 ^a
0,6 mg/kg PFOS+K	34,33 +/-8,43 ^a
1,25 mg/kg PFOS	114,83 +/-6,33 ^a
1,25 mg/kg PFOS+K	65,00 +/-4,93 ^a
2,5 mg/kg PFOS	183,83 +/-4,62 ^a
2,5 mg/kg PFOS+K	125,66 +/-6,83 ^a
PK (0,2 mg/kg MMC)	238,00 +/-6,35 ^a

^a ; grup diğer gruplardan istatistiksel olarak ($p<0,001$)farklıdır,

^b ; grup negatif kontrol rubundan istatistiksel olarak ($p<0,001$)farklıdır,

^c ; grup negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak ($p<0,05$) farklıdır.



Şekil 4.11. Karaciğerde yapılan komet testi ne göre GHI nin dozlara oranı. GHI: [Tip 1+ (2xTip2)+(3xTip3)+(4xTip4)]. Komet tip 0 lar formüle dahil edilmemiştir.

Kandaki MN ve komet (HHY) değerleri arasında pozitif yönde güçlü bir ilişki vardır ($r=0,878$, $p<0,001$).

Kandaki MN ve komet (GHI) değerleri arasında pozitif yönde güçlü bir ilişki vardır ($r=0,842$, $p<0,001$).

Kandaki komet (HHY) ve komet (GHI) değerleri arasında pozitif yönde doğrusala yakın bir ilişki vardır ($r=0,986$, $p<0,001$).

Karaciğerdeki MN ve komet (HHY) değerleri arasında pozitif yönde güçlü bir ilişki vardır ($r=0,922$, $p<0,001$).

Karaciğerdeki MN ve komet (GHI) değerleri arasında pozitif yönde güçlü bir ilişki vardır ($r=0,923$, $p<0,001$).

Karaciğerdeki komet (HHY) ve komet (GHI) değerleri arasında pozitif yönde doğrusala yakın bir ilişki vardır ($r=0,995$, $p<0,001$).

Normal dağılıma uygun dağılım gösteren parametreler için grup karşılaştırmalarında ANOVA testinden yararlanılmış olup, farklılık çıkan gruplar için farkın hangi gruplardan kaynaklandığını tespit etmek amacıyla Post Hoc testlerinden Bonferroni testi uygulanmıştır. Dağılım varsayımı sağlamayan parametreler için ise Kruskal Wallis testinden yararlanılmış olup, Post Hoc testlerinden Dunn testi uygulanmıştır. Sürekli değişkenler arasında ilişki katsayısı olarak Spearman korelasyon katsayısı hesaplanmıştır.

4.1.7. Kantitatif Gen Ekspresyonu Sonuçları

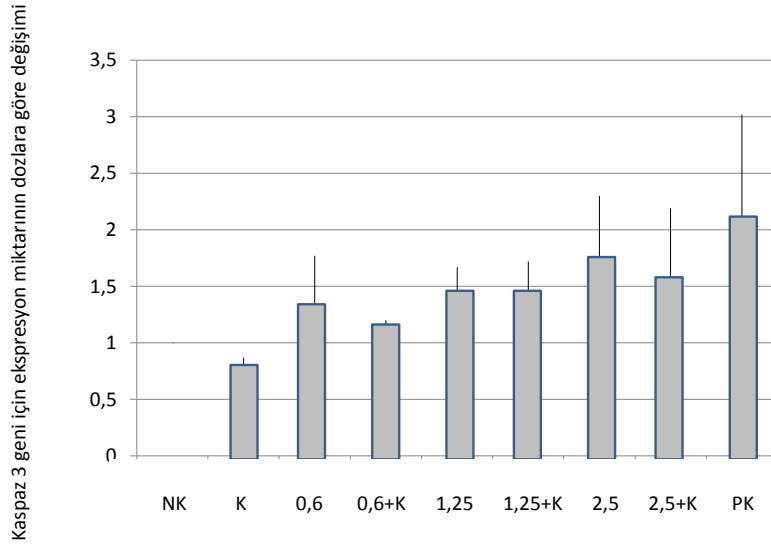
C_T değeri RT PCR işleminde anlamlı ekspresyon artışının olduğu ilk siklusu ifade etmektedir. Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 genlerinin C_T değerleri beta aktin geninin C_T değerinden çıkarılarak ΔC_T değeri elde edilmiştir. Ardından bu değer, NK (negatif kontrol) ile kıyaslanarak $\Delta\Delta C_T$ ve $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri hesaplanmış ve istatistiksel işlem yapılmıştır. $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değeri, genin negatif kontrole kıyasla, ekspresyon miktarının göstergesidir. Kaspaz 3 geninin ekspresyon verileri çizelge 4.7. ve Şekil

4. 12 de ayrıca kaspaz 8 geninin ekspresyon verileri ise Çizelge 4.8. ve Şekil 4.13 te verilmiştir.

Gruplar arasında fark olup olmadığının tespiti ANOVA ile değerlendirilmiş ve ortalama ile standart sapma verilmiştir. Kaspaz3 ve Kaspaz8 için tüm gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık vardır ($p < 0,001$).Çıkan farklılığın hangi gruplar arasında olduğunun tespiti için Bonferroni post-hoc testi yapılmıştır.

Çizelge 4.7. Karaciğer hücrelerinden elde edilen kaspaz 3 geninin ekspresyon miktarının dozlara göre değişimi.

GRUPLAR (kaspaz 3 için)	ΔC_T ortalaması	$\Delta\Delta C_T$ ortalaması	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ ortalaması	Standart sapma	p
Negatif kontrol(NK)	4,243	-	-	-	<0,001
Kurkumin(K)	4,603	0,36	0,7822	+/- 0,07	
0,6 mg/kg PFOS	3,83	-0,413	1,345	+/- 0,22	
0,6 mg/kg PFOS+K	3,921	-0,321	1,167	+/- 0,03	
1,25 mg/kg PFOS	3,718	-0,525	1,447	+/- 0,17	
1,25 mg/kg PFOS+K	3,731	-0,511	1,435	+/- 0,19	
2,5 mg/kg PFOS	3,441	-0,801	1,762	+/- 0,30	
2,5 mg/kg PFOS+K	3,61	-0,633	1,582	+/- 0,36	
PK(0,2mg/kg MMC)	3,213	-1,03	2,092	+/- 0,53	

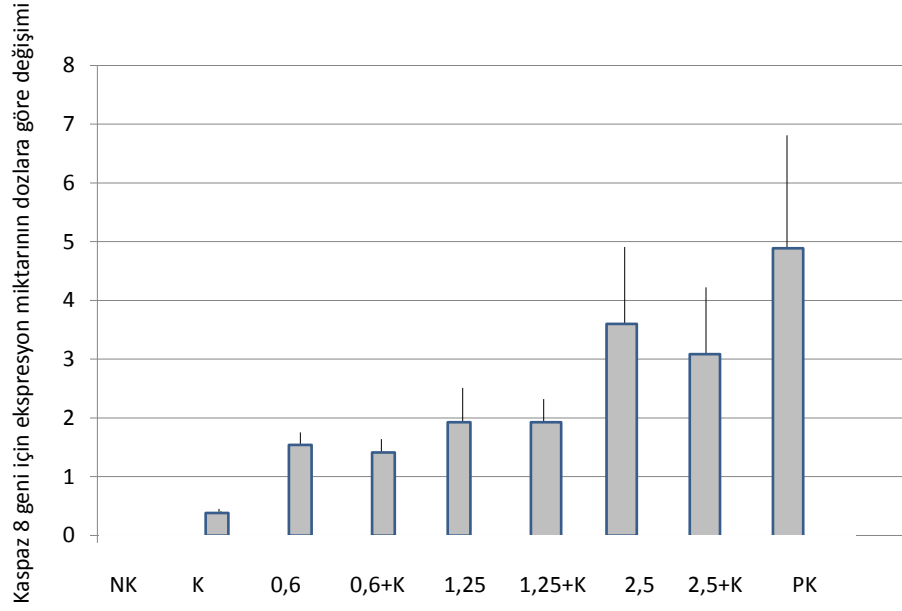


Şekil 4.12 Kaspaz 3 geninin ekspresyon miktarı real time PCR dan elde edilen

$2^{-\Delta\Delta C_T}$ formülü ile hesaplanmıştır. Doz değerleri $\mu\text{g/ml}$ cinsindedir. NK; negatif kontrol, K; kurkumin, PK; pozitif kontrol.

Şekil 4.8. Karaciğer cücrelerinden elde edilen kaspaz 8 geninin ekspresyon miktarının dozlara göre değişimi

GRUPLAR (kaspaz 8 için)	ΔC_T ortalaması	$\Delta\Delta C_T$ ortalaması	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ ortalaması	Standart sapma	p
Negatif kontrol(NK)	5,226	-	-	-	<0,001
Kurkumin(K)	6,551	1,325	0,401	+/- 0,04	
0,6 mg/kg PFOS	4,808	-0,418	1,361	+/- 0,28	
0,6 mg/kg PFOS+K	4,955	-0,271	1,220	+/- 0,21	
1,25 mg/kg PFOS	4,353	-0,873	1,871	+/- 0,44	
1,25 mg/kg PFOS+K	4,596	-0,63	1,588	+/- 0,41	
2,5 mg/kg PFOS	3,523	-1,703	3,427	+/- 1,16	
2,5 mg/kg PFOS+K	3,848	-1,378	2,722	+/- 0,90	
PK (0,2 mg/kg MMC)	3,101	-2,125	4,601	+/- 1,62	



Şekil 4.13. 12 Kaspaz 8 geninin ekspresyon miktarı real time PCR dan elde edilen $2^{-\Delta\Delta C_T}$ formülü ile hesaplanmıştır. Doz değerleri $\mu\text{g/ml}$ cinsindedir. NK; negatif kontrol, K; kurkumin, PK; pozitif kontrol.

4.2. TARTIŞMA

Bu çalışmada PFOS ve kurkumin bileşiklerinin toksisitesi değerlendirilmiştir. Çalışma, bu iki kimyasalın beraber kullanıldığı ilk çalışmadır. Çalışma in vivo olarak yapılmıştır. İn vivo yöntemler bütün dünyada in vitro yöntemlere göre daha kabul görür durumdadırlar. Deney hayvanı olarak sıçanların kullanılması da; tıpkı insanlar gibi omurgalı ve memeli olmaları sebebiyle önemlidir.

Kullanılan dokular; kan(lenfosit) ve karaciğer hücreleridir. PFOS molekülü yapısı itibarı ile hem hidrofilik hemde lipofobik özellik göstermektedir. Bu yüzden diğer kirleticilerin aksine yağ dokusunda değilde karaciğer ve kan dokusunda birikme eğilimi göstermektedir. PFOS'ın bu özelliği bizim çalışmamızda karaciğer ve kan dokusunu seçmemizin sebebidir.

Bu çalışmada PFOS molekülü hem kan dokusunda hem de karaciğerde doz artışına bağlı olarak toksik etki göstermiştir. 1000 hücre içeçerisinden MN içerenlerin oranı kaydedilerek hesaplanan MN testi sonuçlarına göre, doz arttıkça MN oranıda artmıştır ve bu artış tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlıdır. Testin toksisite göstergesi olduğu bilindiğine göre; doz arttıkça toksisite oranıda artmıştır denilebilir. Aynı doz kurkumin eklenek tekrar edildiğinde ise MN oranı düşüş göstermiştir. 0.6; 1,25 ve 2,5mg/kg PFOS grubunun üçü de 80mg/kg kurkumin ilave edilerek tekrarlandığında MN oranı kurkumin içermeyen gruba göre azalmıştır.

Yaptığımız tez çalışmasının sonuçları yakın zamanda yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırılınca büyük ölçüde örtüşür niteliktedir. Bunlara detaylı olarak değinirsek;

Bu tez çalışmasında PFOS kimyasalındaki doz artışına paralel olarak toksik etkisi de artmıştır. Benzer sonuçların elde edildiği bir çalışmada; Gavajla, 28 gün, 5 mg/kg/gün ve 20 mg/kg/gün PFOS verilen Sprague–Dawley sıçanlarında en yüksek PFOS konsantrasyonunun karaciğerde (hepatosit hipertrofisi ile sitoplazma vakuolizasyonu) olduğu daha sonra sırasıyla kalp, böbrek, tam kan, akciğer, dalak, beyin ve en düşük PFOS konsantrasyonunun ise testislerde olduğu tespit edilmiştir [Cui ve Zhou, 2009]. Bizim yaptığımız çalışmada da aynı şekilde karaciğer ve kan dokularında PFOS ın toksik etkileri görülmüştür. Bu çalışma bizim yürüttüğümüz tez çalışması ile örtüşür niteliktedir. PFOS ın toksisitesini işaret eden bir diğer çalışma da Austin ve ark. tarafından yapılmıştır. 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 [Austin ve ark., 2003]. Bir başka çalışmada ise nörotoksik etki tek dozluk kullanımda saptanmıştır. Johansson ve ark. tarafından yapılan çalışma PFOS ın nörotoksik etkisini göstermiştir. 10 günlük farelere tek oral doz 1.4 den 21 mmol/kg a kadar PFOS (0.75-11.3 mg) verilmiş ve nörotoksik etkilerini değerlendirilmiştir. PFOS, gelişimsel nörotoksik bir madde olarak kabul edilmiştir [Johansson ve ark., 2008].

Bu tez çalışmasında gibi sıçan lenfositleri üzerindeki etkisini araştıran bir grup ise; 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 olduğunu tespit etmişlerdir. Bizim yürüttüğümüz tez çalışmasında da PFOS ın kan hücreleri üzerinde toksik etkisinin görülmesi sebebiyle her iki çalışma paralel sonuçlara sahiptir [Zheng ve ark., 2008].

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. Yüksek dozlarda ilk jenerasyondaki tüm yavrular ölmüş, düşük

dozlarda ise ikinci jenerasyondaki tüm fareler ölmüştür. İkinci jenerasyonda etkilerinin görülmesi oldukça ilginçtir [Luebker ve ark., 2005].

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. Ana hayvanda ise karaciğerde ciddi bir büyüme gözlenmiştir [Fuentes ve ark., 2007].

PFOS'nin karaciğer üzerine etkilerini araştıran diğer bir çalışma ise Thamford ve arkadaşları tarafından sıçanlarda çalışılmıştır. Onlar maruziyet süresini ve dozu bize göre biraz fazla tutmuş sitotoksik etkilere bakmışlar. 52 hafta boyunca gavajla PFOS verilen sıçan karaciğerlerinde; Sentrilobüler hipertrofi, sentrilobüler hepatoksik pigmentler, ve sentrilobüler hepatoksik vakülasyon gibi hepatoksik veriler dişi ve erkeklerde 5 ve 20 mg/kg lık dozlarda not edilmiştir [Thomford ve ark., 2002]. Biz çalışmamızda 2,5 mg/kg ve üstünü MN ve komet testlerinde zaten toksik olarak rapor ettik.

PFOS nin karaciğer ve kan üzerinde toksik etkisinin görülmediği çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde; İnsan lenfosit hücrelerinde 599 µg/mL (-S9) ve 449 µg/mL (+S9) konsantrasyonlara kadar kromozomal aberasyonu tetiklememiştir [Cifone ve ark., 1999]. Sıçan karaciğer primer kültürlerinde 4000 µg/ml konsantrasyona kadar programlanmamış DNA sentezi (Unscheduled DNA Synthesis (UDS)) i arttırmamıştır [Cifone ve ark., 1999].

Fare kemik iliği MN testinde, tek oral dozda 237.5, 450 ve 950 mg/kg ve 24, 48 and 72 saatlik uygulamalarda MN oranında istatistiksel olarak bir değişikliğe sebep olmamıştır [Corning Hazleton, ve ark., 1993]. Bu sonuç bizim MN sonuçlarımızla ters gibi gözüksede, Hazleton ve ekibinin uygulamayı tek doz olarak yaptığı yani biyolojik bir birikime fırsat verilmediği gözden kaçmamalıdır. PFOS ile yapılan bir başka MN testinde; Jernbro ve ark. Tarafından 2007 yılında PFOS ve siklofosfamid(cyclophosphamid CPP) in etkileri, hamster akciğer hücrelerinde MN testi kullanılarak araştırılmıştır. PFOS, tüm dozlarda CPP nin tosisitesini arttırırken, 12.5 µg/ml lik dozda tek başına anlamlı derecede genotoksik bulunmuştur [Jernbro ve ark.,]. PFOS in toksisiteyi arttırması yine bizim çalışmamızın sonucuyla örtüşür niteliktedir.

PFOS ile yapılan komet testine bakacak olursak;

Komet testi DNA zincirindeki kırılmaları ölçen bir testtir. Yani; ‘komet parametresini arttıran bir kimyasal genotoksik etkiye sahiptir’, sonucuna varılır. PFOS in tek başına uygulandığı tüm gruplarda doz artışına bağlı olarak komet miktarıda artmıştır. Bu artış PFOS in kullanıldığı tüm gruplarda (0,6; 1,25; 2,5mg/kg PFOS) istatistiksel olarak anlamlıdır. Ancak biz bu grupları 80mg/kg kurkumin ilave ederek tekrar ettiğimizde; aynı grubun kurmin ilaveli olunda komet miktarı, kurkumin olmayanına göre düşüş göstermiştir. Yani kurkumin, PFOS in tokssitesini azaltmıştır.

Liu ve ark., tarafından yapılan çalışmada PFOS ve PFOA in oksidatif stres ve apoptozis yoluyla hücrel toksikolojisi freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*) hepatosit primer kültürlerinde çalışılmıştır. Kültüre alınan hücreler 24 saat boyunca 0, 1, 5, 15 and 30 mg/L(-1) dozlarda PFOS ve PFOA e maruz bırakılmış ve Hem PFOS hem de PFOA gruplarının hepsinde kaspaz-3, -8, -9 aktivitelerinde anlamlı derecede artış olmuştur. Bu sonuç bizim yürüttüğümüz tez çalışmasının komet, MN

ve kantitatif gen ekspresyonu test sonuçları ile örtüşür niteliktedir. Yürüttüğümüz tez çalışmasında da kaspaz 3 ve kaspaz 8 yolakları aktive olmuştur[Liu ve ark., 2007]. PFOS in apoptoz üzerinde olumsuz etkisini bulan bir diğer çalışmada ise murin N9 hücre dizileri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda mitokondrial membran potansiyelinin bozulması, p53, Bax, kaspaz9, kaspaz3 genlerine ait mRNA ların düzenlerinin bozulması yoluyla hücrel apoptozisin indüklendiği sonucuna varılmıştır [Zhang ve ark., 2011].

PFOS'ın apoptotik genlerin ekspresyonu üzerindeki etkisine değinecek olursak;

Bu çalışmada apoptotik yolağı aktive eden iki önemli gen (kaspaz3 ve kaspaz8) çalışıldı. Bu genler sadece hücrenin bölünmesi aşamasında veya apoptoz yolağında görev almazlar. Aynı zamanda bir çok kritik noktada hayati roller üstlenirler. Örneğin 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 [Fernandes-Alnemri vd., 1996].

Çalışmada PFOS kimyasalı doz artışına bağlı olarak, karaciğer hücrelerinde kaspaz 3 ve kaspaz 8 genlerinin ekspresyonunu anlamlı derece arttırmıştır. Apoptotik yolağın, aktive edici molekülleri olan bu genlerin artması, komet testindeki Komet Tip 4 oranlarının artışıyla tutarlılık göstermektedir. Komet tip 4 lerde; DNA da aşırı kırılmalar nedeniyle DNA kendini eşleyememekte ve intihar dediğimiz apoptoz yolağını seçmektedir.

PFOS olan gruplar(0,6; 1,25; ve 2,5mg/kg)da her iki genin ekspresyon miktarı doz artışına bağlı olarak anlamlı derecede artmıştır. Ancak bu gruplar

kurkumin (80mg/kg) eklenerek tekrarlandığında ekspresyon miktarı, kurkumin ilavesiz gruplara göre daha azdır.

Üniversitemizin tıp fakültesi bünyesinde yürütülen doktora çalışmasında ise (F1) ve insan fetal akciğer (hel299) hücre hatlarında perflorooktan sülfonatın apoptoza etkileri araştırılmıştır. Oluşturulan deney gruplarında, apoptotik genler olan apaf-1 ve kaspaz-3 için gen ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler incelenmiştir. Yapılmış olan çalışmada her iki hücre hattında da apaf-1 ve kaspaz-3 genlerinin PFOS uygulanan gruplarda ekspresyon düzeylerinin negatif kontrole oranla arttığı tespit edilmiştir[Karakaş, 2010]. Bizim çalışmamızın verileri ile karşılaştırıldığında iki çalışma birbirini bu yönüyle destekler nitelikte sonuçlara sahiptir sonucuna varılabilir. PFOS hem in vivo hem de in vitro düzeyde apoptotik etkilere sahip bir çevresel kirleticidir.

Yine bizim gibi kaspaz 3 ve kaspaz 8 geninin ekspresyonunu çalışan Liu ve ark. tilapia'dan izole ettikleri hepatositlerden elde ettikleri primer kültüre 0, 1, 5, 15 and 30 mg/L PFOS uygulamışlardır. kaspaz-3, -8, aktivitesi artmış ve DNA fragmentasyon analizi de apoptozun doza bağlı olarak arttığını göstermişlerdir. [Liu ve ark 2008,2007][Karakaş, 2010].

Hu ve ark. 50-200 µmol/l PFOS'a maruz kalan insan karaciğer hücre hattı (HepG2) ile yaptıkları çalışmada hücrelerde PFOS'un apoptozu indüklediğini göstermiş ve p53, Bcl-2 ve kaspaz-9 gibi genlerin ekspresyonlarını arttırdığını tespit etmişlerdir. [Karakaş, 2010].

Krovel ve ark. som balığında yapmış oldukları çalışmada 2.1-6.2-15.1-25.0 mg/L PFOS'a maruz kalan hücrelerde doza bağlı olarak kaspaz-3 ekspresyon seviyesinin de anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir[Gulden et al., 2005].

Yine aynı ekip Atlantik Som balığından (*Salmo salar*) izole ettikleri karaciğer hücrelerine değişik konsantrasyonda PFOS [5, 30, 80, 25 mg/L] uygulayarak 24 ve 48. saat sonunda apoptoz yanı sıra hücrel stres, lipid metabolizması ve faz II enzimleri ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerini araştırmışlardır. 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. Hemen hemen tüm canlılarda çevresel, kimyasal veya fizyolojik strese cevap olarak senetezlenen ısı şok proteinlerinin de 25.0 mg/L PFOS'a maruz kalan hücrelerde ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Ancak stresin altında yatan mekanizma tam olarak anlaşılammıştır. Ksenobiyotiklere maruz kalan hücrelerde faz I ve faz II enzim seviyesi artmaktadır. Sitrokrom p450 enzimleri faz I enzimlerinden en önemlileri olup Krovel ve ark. 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 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 (Krovel). Ayrıca Cwin ve ark.'nın tavuk embriyolarından izole ettikleri hepatosit kültüründe yaptığı çalışmada da PPAR- α ve PPAR- α hedef genleri olan peroxisomal açil-CoA oksidaz (ACOX), yağ asiti bağlayıcı protein (L-FABP), enol-Coenzim A, hidrataz/3-hidroxiacil koenzim A dehidrogenaz, bifunctional enzim (BIEN),

peroxisomal 3-ketoaçil thiolaz (PKT) ve malik enzim (ME) ekspresyon düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir.

Pinkas ve ark. PFOS'un kuşlardaki gelişimsel nörotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmada; PFOS'un kuluçka sonrası bilişsel davranışları etkilediğini ortaya koymuşlardır. Ancak bunun altında yatan sinaptik mekanizma aydınlatılamamıştır [Pinkas A, baskıda]. Johansson ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise 10 günlük farelere tek oral 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[Johansson 2008]. Ancak Butenhoff ve arkadaşlarının 0.0, 0.1, 0.3, veya 1.0 mg/kg PFOS'u gebelik başladığı andan itibaren doğuma kadar uyguladıkları ratlarla yaptıkları çalışmada PFOS uygulanan ratlardan doğan yavruarda kontrole oranla doğum kilosu, büyüme, seksüel olgunlaşma dönemindeki vücut ağırlığında, öğrenme, hafıza, bilişsel davranışlarda ve beyin ağırlığında herhangi bir farklılık olmadığını tespit etmişlerdir. 1.0 mg/kg PFOS uygulanan gebelerde maternal vücut ağırlığının oldukça düşük olduğu tespit etmişlerdir [Butenhoff, 2009].

Shi ve ark. yaptıkları çalışmada PFOS'un zebra balığı embriyoları üzerindeki gelişimsel toksik etkilerini araştırmıştır. 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 sonucunda 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. tarafından yapılan başka bir çalışmada 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 [Peroxiredoxin 2, sulfotransferaz (SULT), nukleosit difosfat kinaz (NDPK)-Z2, stidilat kinaz, adenilat kinaz (AK)2, Ckmb protein [bir çeşit kreatin kinaz (CKs) , fosfogliserat mutaz 1, annexin A4 (Anx4), oxisterol-bağlayıcı protein-benzeri 1A (OSBP1A), Kristallin, gamma MX, omurgalı mikrotübül-aktin çapraz bağlayıcı faktör 1 (MACF1), Glisin C-asetiltransferaz, ökaryotik translasyon uzama faktör 1 gamma, Tirozin rekombinaz, RNA-bağlayıcı protein 4 (Rbp4), anormal visual (ELAV)-like 4, F-box protein 44 tanımlanmıştır. Bu proteinler detoksifikasyon, enerji metabolizması, lipit transportu/steroid metabolizması, hücre yapısı, sinyal iletimi ve apoptozda rol oynamaktadır.

Tez çalışmasında kullandığımız diğer önemli kimyasalımız ise kurkumin di. Kurkumin, tek başına(80mg/kg)ve PFOS dozlarına(0,6; 1,25; 2,5mg/kg)kombine olarak uygulanmıştır. Kurkumin hem kan dokusunda hemde karaciğer hücrelerinde, PFOS ın tüm dozlarında toksisiteyi azaltmıştır. MN testinde PFOS in doz artışına bağlı olarak MN sayısı artarken aynı gruplara kurkumin eklenerek yapılması, MN miktarındaki artış oranını azaltmıştır. Yine aynı şekilde komet testinde PFOS doz artışına bağlı olarak DNA kırıklarının arttırırken, kurkumin eklenmiş gruplarda DNA kırığı daha az çıkmıştır. Kurkuminle ilgili yapılmış MN çalışmalarına bakıldığında, bunlardan bizimkine en yakın olanı Abraham ve ark. tarafından yapılmıştır. Onlar

kurkuminin koruyucu etkisini γ -radyasyona karşı test etmiş ve onlarda polikromatik eritrositlerki MN miktarına bakmışlardır. çalışma sonucuna göre; γ -radyasyon (1.15) Gy; 0.05 Gy/s)a maruz bırakılan hücrelerde MN seviyesi artmıştır. Hem radyasyon hemde kurkumine (5, 10 ve 20 mg/kg b.w.) maruz bırakılanlarda ise polikromatik eritrositlerdeki mikronukleus miktarı doza bağlı olarak azalmıştır. Kurkuminin, γ -radyasyon etkisini azaltması bizim sonuçlarımızla paraleldir [Abraham vd., 1993].

Bunun yanında kurkuminin hem genotoksik hemde antigeotoksik olduğunu gösteren çalışmalarda bulunmaktadır. Bu çalışmalardan biri Cao ve ark. tarafından yapılmıştır. İn vitro ortamda HepG2 kullanan ekip kurkumini tek başına ve siklofosamid (CP) ile kombinleyerek MN yöntemi ile test etmiştir. 8 ve 16 $\mu\text{g/ml}$ lük konsantrasyonlardaki kurkumin MN oranını arttırırken, 2 $\mu\text{g/ml}$ lük konsantrasyondaki kurkumin CP nin toksik etkisini azaltmıştır. Buda bize kurkuminin düşük dozda antitoksik ama yüksek dozda toksik olduğunu göstermektedir[Cao vd., 2007].

Kurkumini komet metodu ile test eden çalışmalara bakıldığında: bu ekiplerde genellikle bizim yaptığımız gibi kurkumini başka bir kimyasala karşı test etmişler [Çelik vd, 2013] ve çoğunlukla kurkumin, toksik olan kimyasalların toksitesini azaltır yönde etki göstermiştir. Bandyopadhyaya ve arkadaşları kurkuminin etkilerini nikotine karşı test etmiştir ve yine bizim gibi karaciğer kullanmışlardır. Nikotine maruz bırakılan dişi sıçanların karaciğerlerindeki toplam DNA miktarı kontrol gurubuna göre anlamlı seviyede azalmıştır . Komet testi ile DNA hasarı ölçüldüğünde ise DNA hasarı kontrol gurubuna kıyasla anlamlı seviyede artmıştır (P<0.001). Bu diyete ek olarak kurkumin eklendiğinde ise sadece nikotinin kullanıldığı deney gurubuna kıyasla karaciğerdeki toplam DNA miktarı artarken, komet testi ölçümlerindeki DNA hasarı azalmıştır (P < 0.01). Sadece kurkuminin kullanıldığı gurupta ise toplam DNA miktarı en yüksek seviyede çıkarken, komet testindeki DNA hasarı oranı en düşük seviyede çıkmıştır (P < 0.001). Bu sonuçlar bizim bulduğumuz sonuçlarla yine paraleldir [Bandyopadhyaya vd., 2008].

Kurkuminin komet metodu ile araştırıldığı bir diğer çalışmada ise; Tiwari ve ark. tarafından kurkuminin, sulardaki kirleticilerden olan arsenik(As) ve florid(F) e karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. İnsan periferel kan lenfositleri kullanılmış ve dokuz deney gurubu oluşturulmuştur (negatif kontrol, pozitif kontrol(EMS; 1.93 mM), sadece kurkumin(1.7 µM), sadece kimyasallar As (1.4 µM), F (34 µM) ve kutkumin+ kimyasallar). 24 saatlik uygulamanın sonunda, hücre kültürleri; kromozomal aberasyonlar (hem sayısal hem yapısal) ve komet testi ile test edilmiştir. Çalışma sonucunda kurkuminin varlığı; hem arsenik hem de floridin toksik etkilerini azaltmıştır. [Tiwari vd., 2010]

Yaptığımız çalışmaya benzer olarak yapılan ve paralel sonuçların elde edildiği bir diğer çalışmada ise; Srinivasan ve ark. tarafından, Kurkuminin radyoaktiviteye karşı koruyucu etkisi primer sıçan hepetosit kültürlerinde test edilmiştir. Kurkumin kullanılmayan guruplarda radyasyondaki doz artışına bağlı olarak (1, 2 ve 4 Gy) DNA hasarı artmıştır. Kurkumin eklendiğinde (1, 5 ve 10 µg/ml) DNA hasarı doza bağlı olarak azalmış ve antioksidan enzim seviyeleri artmıştır[Srinivasan vd., 2007].

Kurkuminle ilgili kanser çalışmalarına bakıldığında; genel olarak, kurkumin sağlıklı hücrelerde sitotoksik etki göstermemesine ramen kanser hücrelerinde apoptozisi tetiklemektedir. Aggarwal ve arkadaşlarına göre bu yeteneğini NF-KB ile etkileşime girerek yapmaktayken, Ravindran ve arkadaşlarına göre ise kurkumin kanser üzerindeki etkisini hücrenin sinyal yollarını etkileyerek gerçekleştirmektedir. Bu yollar arasında cell hücre proliferasyon yolağı (cyclin D1, c-myc), hücre yaşam yolağı (Bcl-2, Bcl-xL, cFLIP, XIAP, c-IAP1), kaspaz aktivasyon yolağı (caspase-8, 3, 9), tümör süpressör yolağı (p53, p21) ölüm reseptör yolağı (DR4, DR5), mitokondrial yolak, ve protein kinaz yolağı yer alır. [Ravindran vd., 2009]. [Aggarwal vd., 2004]. Bu konuda çalışma yürüten ve paralel sonuçlar elde eden Senft ve arkadaşlarına göre ise kurkumin antikanserojen etkisini STAT-3 yolağı üzerinden gerçekleştirmiştir [Senft vd., 2010]. Bachmeier ve arkadaşlarına göre ise Bunun NF-kappa yoluyla olduğu tahmin edilmektedir [Bachmeier vd., 2008].

Bizim yürüttüğümüz tez çalışmasında bu yollardan kaspaz-3 ve kaspaz-8 in bulunduğu kaspaz atıvasyon yolağı baz alındı. Kurkuminin tek başına verildiği grupta her iki genin ekspresyon seviyesi negatif kontrole kıyasla azalmıştır. PFOS ile kombinlendiği gruplarda ise PFOS ın gen ekspresyonunu arttırıcı etkisini azaltır şekilde bir etki göstermiştir.

Banjerdpongchai ye göre ise kurkumin; Kurkumin, c-Jun NH2-terminal kinaz (JNK) atıvasyonunu, atıvatör proteini -1 (AP-1), nuclear factor-kappa B (NF-κB) ve p53 ün fonksiyonlarını inhibe etmektedir. Kanserleşme sürecinde , kurkumin, initeyşin promoşın adımlarında tümör oluşumunu baskılamaktadır. Bununla birlikte, apoptoz yolağında, kurkumin aynı zamanda, bir proto-onkoprotein olan Bax ı düzenlemekte, sitokrom C nin salınımını ve kaspazların atıvasyonunu düzenlemektedir. HL-60 hücrelerinde, kurkumin gibi proteozomlar aracılığıyla proteolizinin baskılanması apoptoza yol açmaktadır. HL-60 gibi hücrelerde serbest radikal oluşumu yada oksidatif stres, kurkuminle tedavi edilmiştir [Banjerdpongchai ve ark., 2006].

Ancak bunların yanında kurkuminin kaspaz 8 aracılı apoptoz üzerine bir etkisinin bulunmadığını bildiren çalışmalarda bulunmaktadır. HL-60 hücrelerinin hem bilinen yaygın fenotipinde hemde kaspaz-3 aracılı apoptozun olduğu MDR fenotipinin her ikisinde de kaspaz 8 üzerine bir etkisi görülmemiştir. [Bielak-Mijewska vd., 2004].

İlaç kullanımının sebep olduğu apoptozda, reaktif oksijen türleri(ROS)nin apoptoz sürecinde tetikleyici olmaları sebebiyle, kurkuminin, antioksidan, serbest radikal süpürücüsü olduğu kabul edilir. Çünkü bu süpürücüler, kemoterapotik ilaçlar aracılı apoptozu inhibe etmektedir. ROS ların üretiminin kurkumin muamelesinin sonucu olarak tümör hücresi apoptozunu etkilediği gösterilmiştir [Bhaumik vd., 1999]. Dahası, kurkumin, konsantrasyona ve zamana bağlı olarak ROS oluşumu yoluyla (bu durum malondialdehit miktarıyla saptanmıştır) malondialdehide, MDA) HL-60 hücrelerinde canlılığı ve proliferasyonu azaltmıştır. Yani kurkuminin düşük

konsantrasyonu ROS üretimini azaltırken, yüksek konsantrasyonu ROS üretimini uyarılmaktadır. Bu konsantrasyonlara ek olarak 50 µM H₂O₂ kombine edildiğinde MDA, hücre proliferasyonunu ve ölümünü uyarır. Bu sonuca göre kurkumin düşük konsantrasyonda HL-60 hücrelerinde antikanser aktivite gösterirken, yüksek konsantrasyonlarda ROS üretimini arttırmıştır. Benzer başka bir çalışmaya göre suda eriyen antioksidanlar (askorbik asit, N-asetil sistein ve glutatyon), düşük doz kurkuminin sebep olduğu antikanser ve antioksidan etkinin herikiside güçlendirmiştir. ROS un birikimi normal hücrelerde zararlıdır. Verilerde belirtilen yüksek doz kurkuminin aksine düşük doz kurkuminin suda eriyen antioksidanla kombinasyonu, kurkuminin antikanser aktivitesini arttırmada daha etkin olarak bulunmuştur [Chen vd., 2005]. Bu strateji son zamanlarda pek çok araştırmaya konu olmuştur. Çünkü tümör hücreleri ilaç ya da radyasyonla muamele sonucunda apoptoz yoluyla hücre ölümüne çok açıktırlar. Pek çok çalışmada cisplatin, camptothecin, etoposide, andteniposide gibi kemoterapik ilaçlar yoluyla indüklenen hücre ölümlerinin apoptoz şeklinde olduğu gösterilmiştir [Evans vd., 1993] [Barry vd., 1993] [Walton vd., 1993]. Hayvan modellerindeki kurkuminin kemo koruyucu etkisi; onun tümör hücreleri, büyümeleri ve apoptoz üzerindeki etkileri konusunda bilgi vermektedir. Meme kanseri ve benzer hücre dizilerinde kurkuminin koruyucu rol üslendiği bulunmuştur [Hanif vd., 1997] [Ramachandran vd., 1999]. Son birkaç yılda apoptozun radyolojik hassasiyetin muhtemel etki ve sınırlarının belirlenmesi konusundaki kullanımı araştırmacıların büyük ilgisini çekmektedir. Çünkü hem biyolojik bir dozimetre olarak apoptozun kullanım sınırları genişleyecek hemde radyoterapi öncesinde kanser hücrelerinin radyolojik duyarlılıkları tahmin edilecektir [Rupnow vd., 1998] [Guovd., 1999] [Kern vd., 1999].

Radyasyon çalışmalarında; apoptotik proteinlerin ekspresyonunun seviyesi, radyasyon maruziyetinin ve hassasiyetinin bir göstergesi olmaktadır. Kurkumin bu bakımdan çeşitli hücrelerde farklı etkiler göstermiştir. Bu etkiler arasında kromozomal aberasyonlarla birlikte hücre sayıları azalmıştır. Ancak normal hücreler, irradyasyon maruziyetinde kromatid kırıklarından korunmuşlardır [Thresiamma vd., 1998]. Kurkumin 200 µM konsantrasyona kadar, serviks kanseri, hela hücreleri, kronik myeloid lösemi (K-562), kemik iliği miyelomu (IM-9) hücre dizilerinde, X-

irradiation varlığında (doz aralığı 0-8 Gy) ve yokluğunda çalışılmıştır. Hücreler morfolojik olarak incelenmiş ve 100µM lük dozun üzerinde apoptoz uyarılmıştır. Kurkuminle muamele edilen hücreler sub-G1 peakform sergilemişlerdir. Bu pikin büyüklüğü kurkumin konsantrasyonuyla orantılı çıkmıştır. Kurkumin üç hücre dizisinde apoptozu farklı oranlarda tetiklemiştir (IM-9<K-562<HeLa). Bu oranların farklı olması radyasyona karşı hassasiyetin farklı olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte apoptoz ve kurkumin birlikte uygulandığında üç hücre dizisinde de radyasyon hassasiyeti sadece 200 µM de görülmüştür. Bu sonuçlar kurkumin uygulanmış tümör hücrelerinin gerçek tosite adresleri konusunda yeni bir bakış açısı geliştirmiştir. Kurkumin aynı zamanda vascular smooth muscle hücre dizisinin normal hücrelerindeki apoptozu sürüklemiş ve burada da yine etkisini hücre döngüsü üzerinden gerçekleştirdiği düşünülmüştür [Baatout vd., 2004].

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan MN testi sonucunda doz artışına bağlı olarak hücrelerdeki mikronukleus oranı artmıştır. Mikronukleus oluşumu genotoksik etkinin göstergesi olduğu göz önüne alınırsa; Yaptığımız çalışma sonucunda; PFOS, hücrelerde doz artışına paralel olarak toksik etki göstermiştir.

Yapısı itibarı ile karaciğer ve kan dokusunda birikme eğilimi gösteren PFOS maddesi yaptığımız çalışma sonucunda kullandığımız dokuların herikisinde de toksik etki göstermiş her ikisinde de toksisite doz artışına bağlı olarak artmıştır.

Komet testi DNA daki tek ve çift zincir kırılmalarını ölçen yani genotoksik hasarı ölçen bir metoddur. HHY ve GHI parametrelerinin yüksek çıkması genotoksik hasarın göstergesidir. Bizim yaptığımız bu test sonucunda; PFOS'ın doz artışına bağlı olarak hem karaciğer hem de kan dokusu hücrelerinde, doz artışına bağlı olarak HHY ve GHI parametreleri artmıştır. Yani doz artışına paralel şekilde , PFOS kimyasalı karaciğer ve kan dokusunda genotoksik etki göstermiştir.

Yapılan MN ve komet testlerinde PFOS'a ek olarak kurkumin de kullanılmıştır. Bu çalışma literatürde iki kimyasalın beraber kullanıldığı ilk çalışma olması sebebiyle önemlidir. Yapılan MN ve komet testlerinde kurkumin, PFOS'ın toksik ve genotoksik etkisini azaltmıştır.

Kantitatif gen ekspresyonu testinde; karaciğer hücrelerinde kaspaz 3 ve kaspaz 8 genlerinin ekspresyonuna bakılmıştır. Test sonucuna göre PFOS ve heriki genin de ekspresyon miktarını arttırırken kurkumin heriki geninde ekspresyon

miktarını azaltmıştır. İki kimyasalın kombinlenerek uygulandığı gruplarda ise; kurkumin kimyasalı, PFOS'ın etkisini azaltır nitelikte etki göstermiştir. Bu genler apoptoz yolağının önemli genleri olmaları sebebiyle dolaylı olarak bu kimyasalların apoptozu bizim çalışmamıza göre etkilediği sonucuna varılmıştır. Yani PFOS, apoptozu artırırken kurkumin ise azaltmıştır. Bir sonraki çalışmada her iki kimyasal için apoptoz yolağındaki diğer genlerin çalışılması da uygun olacaktır.

Gerek bizim yaptığımız çalışma ve gerekse bizim çalışmamızla sonuçları örtüşen diğer çalışmaların sonuçları göz önüne alındığında; PFOS'ın toksik etkilerine daha fazla dikkat çekilmeli ve bu konuda daha fazla çalışma yapılmalıdır. Çünkü PFOS kimyasalı, gıda paketlenme, temizlik, kaplama gibi günlük yaşamın vazgeçilmezi olan alanlarda kullanılan bir çok kimyasalın katkı maddesidir.

Türkiye diyetinde fazla bilinmeyen zerdeçalın etken maddesi olan kurkumin konusunda daha fazla araştırma yapılmalıdır. Hem bizim çalışmamız hemde dünyada bu konuda yapılmış diğer çalışmaların sonuçları göz önüne alındığında; Uzmanlar tarafından kurkuminin faydalarına dikkat çekilmelidir. Özellikle ucuz olan ve neredeyse her baharatçıda bulunan zerdeçal tüketimi teşvik edilmelidir.

KAYNAKLAR

- 3M Reports “The Science of Organic Fluorochemistry” and “Perfluorooctane Sulfonate: Current Summary of Human Sera, Health and Toxicology Data”,(1999).
- Abas, F., Lajis, N. H., Shaari, K., Israf, D. A., Stanslas, J., Yusuf U. K., and Raof S. M. ' A labdane diterpene glucoside from the rhizomes of *Curcuma mangga*' J Nat Prod, 68:1090-3, (2005).
- Abraham, S. K., Sarma, L. ve Kesavan, P.C. ' Protective effects of chlorogenic acid, curcumin and β -carotene against γ -radiation-induced in vivo chromosomal damage', Mutation Research Letters, 303(3): 109–112, (1993).
- Aggarwal, B.B., Sundaram, C., Malani, N. and Ichikawa, H. ' Curcumin: the Indian solid gold', Advances in Experimental Medicine & Biology, 595:1-75, (2007).
- Aggarwal, B.B. and Shishodia, S. "Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer", Biochemical Pharmacology (Elsevier), 71 (10): 1397–421, (2006).
- Aggarwal, B.B. and Shishodia, S. "Suppression of the nuclear factor-kappaB activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning", Annals of the New York Academy of Sciences, 1030: 434–41, (2004).
- Aggarwal, B.B., Sundaram, C., Malani, N. and Ichikawa, H. "Curcumin: the Indian solid gold", Adv. Exp. Med. Biol., 595: 1–75, (2007).
- Akins, P.T., Liu, P.K. and Hsu, C. Y. 'Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia: Friend or Foe ?', Stroke, 27: 1682- 1687, (1996).

Alexander, J., Guojion, A. A., Diane, B., Andrew, C., Jean-Pierre, C., Eugenia, D., Alessandro, D.D., Maria L. and Fernandez C. J. ' Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain1 (Question No EFSA-Q-2004-163)', The EFSA 653, 1-131, (2008).

Ameisen, J.S. 'The origin of programmed cell death', Science, 272: 1278, (1996).

Anand, P., Thomas, S.G., Kunnumakkara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Sung, B., Tharakan, S.T., Misra, K., Priyadarsini, I.K., Rajasekharan, K.N., Aggarwal, B.B. ' Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature', Biochem Pharmacol, 76(11): 611-1590, (2008).

Apelberg, B.J., Witter, F.R., Herbstman, J.B., Calafat, A.M., Halden, R.U. and Needham, L.L. 'Cord serum concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in relation to weight and size at birth.', Environ Health Perspect, 115(11):1670-6, (2007).

Austin, M.E., Kasturi, B.S., Barber, M., Kannan, K., MohanKumar, P.S. and MohanKumar, S.M. 'Neuroendocrine effects of perfluorooctane sulfonate in rats', Environ Health Perspect, 111(12):1485-9, (2003).

Baatout, S., Derradji, H., Jacquet, P., Ooms, D., Michaux, A. and Mergeay, M. 'Effect of curcumin on radiation-induced apoptosis in human cancer cells', Int J Oncol, 24:321-9, (2004).

Bachmeier, B., Nerlich, A.G., Iancu, C.M., Cilli, M., Schleicher, E., Vene, R., Dell'Eva, R., Jochum, M., Albini, A. and Pfeffer, U. "The chemopreventive polyphenol Curcumin prevents hematogenous breast cancer metastases in immunodeficient mice", Cell Physiol Biochem, 19 (1-4): 137–52, (2007).

- Bachmeier, B.E., Mirisola, V., Romeo, F., Generoso, L., Esposito, A., Dell'eva, R., Blengio, F., Killian, P.H., Albini, A. and Pfeffer, U. "Reference profile correlation reveals estrogen-like transcriptional activity of Curcumin", *Cell Physiol Biochem*, 26 (3): 471–82, (2010).
- Bachmeier, B.E., Mohrenz, I.V., Mirisola, V., Schleicher, E., Romeo, F., Hohneke, C., Jochum, M., Nerlich, A.G. and Pfeffer, U. "Curcumin downregulates the inflammatory cytokines CXCL1 and -2 in breast cancer cells via NFkappaB", *Carcinogenesis*, 29 (4): 779–89, (2008).
- Balakumran, A., Champbell, G. A. and Maslen, M. T. 'Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats', *Toxicol Appl Pharmacol*, 139: 122-127, (1996).
- Banasiak, K. J. and Haddad, G. G. 'Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death', *Brain Res*, 797: 295-304, (1998).
- Bandyopadhyaya, G., Sinha, S., Chattopadhyay, B.D. and Chakraborty, A. 'Protective role of curcumin against nicotine-induced genotoxicity on rat liver under restricted dietary protein', *European Journal of Pharmacology*, 588:151-157, (2008).
- Bandyopadhyaya, G., Sinha, S., Chattopadhyay, B. D. and Chakraborty, A. 'Protective role of curcumin against nicotine-induced genotoxicity on rat liver under restricted dietary protein.', *European Journal of Pharmacology*, 588(2–3): 151–157, (2008).
- Banjerdpongchai, R., 'Curcumin And Apoptosis: Related To Oxidative Stress, Carcinogenesis And Proteasome Inhibition', *Chiang Mai Med Bull*, 45(1):31-43, (2006).

- Banjerdpongchai, R., Kongtawelert, P. and Suttajit, M. 'Cytotoxic effect of doxorubicin on HL60 cell apoptosis', *Chiang Mai Med Bull*, 38: 5-63, (1999).
- Banjerdpongchai, R., Suttajit, M., Kongtawelert, P. 'Effect of curcumin on HL60 cell apoptosis induced by doxorubicin', *Chiang Mai Med Bull*, 41:59-66, (2002).
- Bao, F. and Liu, D. 'Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces apoptosis cell death and activates caspase-3', *Neuroscience*, 116: 59-70, (2003).
- Barry, M.A., Reynolds, J.E. and Eastman, A. 'Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 Cells is associated with intracellular acidification', *Cancer Res*, 53:2349-57, (1993).
- Begum, A.N., Jones, M.R., Lim, G.P., Morihara, T., Kim, P., Heath, D.D., Rock, C.L., Pruitt, M.A, Yang, F., Hudspeth, B., Hu, S., Faull, K.F., Teter, B., Cole, G.M. and Frautschy, S.A. "Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease", *J Pharmacol Exp Ther*, 326 (1): 196, (2008).
- Bellamy, C. O., Malcomson, R.D., Harrison, D.J. and Wyllie ,A.H. 'Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis', *Cancer Biology*, 6: 3-16, (1995).
- Berthiaume, J. and Wallace, K.B. 'Perfluorooctanoate, perfluorooctanesulfonate, and N-ethyl perfluorooctanesulfonamido ethanol; peroxisome proliferation and mitochondrial biogenesis', *Toxicol Lett*, 129(1-2):23-32, (2002).
- Bhaumik, S., Anjum, R., Rangaraj, N., Pardhasaradhi, B.V. and Khar, A. 'Curcumin mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves the production of reactive oxygen intermediates', *FEBS Lett*, 456: 4-311, (1999).

- Bielak-Mijewska, A., Piwocka, K., Magalska, A. and Sikora, E. 'P-glycoprotein expression does not change the apoptotic pathway by curcumin in HL-60 cells', *Cancer Chemother Pharmacol*, 53:179-85, (2004).
- Bortner, C. D., Odernburg, N. B. E. and Crdowski, J. A. 'The role of fragmentation in apoptosis', *Trends in Cell Biology*, 5: 21-28, (1995).
- Bossi, R., Strand, J., Sortkjaer, O. and Larsen, M.M. 'Perfluoroalkyl compounds in Danish wastewater treatment plants and aquatic environments', *Environ Int*, 34(4):443-50, (2008).
- Bourne, K.Z., Bourne, N., Reising, S.F. and Stanberry, L.R. "Plant products as topical microbicide candidates: assessment of in vitro and in vivo activity against herpes simplex virus type 2", *Antiviral research*, 42 (3): 219–26, (1999).
- Brinley, F. J. J., Tiffert, T. and Scarp, A. 'Mitochondria and other calcium buffers of squid axon studied in situ', *J Gen Physiol*, 72: 101-127, (1978).
- Burgos-Moron, E., Calderon-Montano, J.M., Salvador, J., Robles, A. and Lopez-Lazaro, M. "The dark side of curcumin", *Int J Cance*, 126 (7): 1771–5, (2010).
- Burris, J.M., Lundberg, J.K., Olsen, G.W., Simpson, C. and Mandel, J.H. 'Determination of Serum Halfives of Several Fluorochemicals', US EPA Docket AR-226-1086, 3M Company, (2002).

- Cao , J., Jiang, L., Liu, Y., Yang, G., Yao, X. and Zhong, L. 'Curcumin-induced genotoxicity and antigenotoxicity in HepG2 cells.', *Toxicon*, 49(8):1219–1222, (2007).
- Caotes, P. J., Hales, S.A. and Hall, P.A. 'The association between cell proliferation and apoptosis; studies using cell cycle-associated proteins Ki67 and DNA polymerase alpha', *J Pathol*, 178: 71-7, (1996).
- Case, M.T., York, R.G. and Christian, M.S. 'Rat and rabbit oral developmental toxicology studies with two perfluorinated compounds', *Int J Toxicol*, 20(2):101-9, (2001).
- Chang, S.C., Thibodeaux, J.R., Eastvold, M.L., Ehresman, D.J., Bjork, J.A., Froehlich, J.W., Lau, C.S., Singh, R.J., Wallace, K.B. and Butenhoff, J.L. 'Negative bias from analog methods used in the analysis of free thyroxine in rat serum containing perfluorooctanesulfonate (PFOS)', *Toxicology*, 234(1-2):21-33, (2007).
- Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U., and Banerjee, R. K. 'Turmeric and curcumin: biological actions and medicinal applications', *Curr Sci*, 87: 44-50, (2004).
- Chen, J., Wanming., D, Zhang, D., Liu, Q. and Kang, J. 'Water-soluble antioxidants improve the antioxidant and anticancer activity of low concentrations of curcumin in human leukemia cells', *Pharmazie*, 57:60, (2005).
- Chen, Y., Wu, Y., He, J. and Chen W. 'The experimental and clinical study on the effect of curcumin on cell cycle proteins and regulating proteins of apoptosis in acute myelogenous leukemia', *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 22: 8-295, (2002).

- Choi, W. S., Lee, E. H. and Chung, C. W. 'Cleavage of bax is mediated by caspase dependent or independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl 2', *J Neurochem*, 77:1531-1541, (2001).
- Choi, W. S., Lee, E. H. and Chung, C. W. 'Cleavage of bax is mediated by caspase dependent or independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl 2', *J Neurochem*, 77:1531-1541, (2001).
- Cifone, M.A., 'Unscheduled DNA synthesis in rat liver primary cell cultures with PFOS', Covance Laboratories Inc. 20780-0-447, (1999).
- Cohen, J. J. 'Apoptosis', *Immunol Today*, 14: 126-130, (1993).
- Cohen, J. J. 'Apoptosis: The physiological pathway of cell death', *Hosp Pract*, 15: 35-43, (1993).
- Collins, J. A., Cynthia, C. A., Young, K. K. and Vesely, J. M. 'Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis', *J Histochem Cytochem*, 45: 923-934, (1997).
- Cruz, A.D., McArthur, A.G., Silva, C.C., Curado, M.P. and Glickman, B.W. 'Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiania (Brazil) radiological accident', *Mutat Res.*, 313:57-68, (1994).
- Cui, L., Zhou, Q.F., Liao, C.Y., Fu, J.J. and Jiang, G.B. 'Studies on the toxicological effects of PFOA and PFOS on rats using histological observation and chemical analysis', *Arch Environ Contam Toxicol*, 56(2):338-49, (2009).
- Cummings, M. C., Winterford, C.M. and Walker, N.I. 'Apoptosis', *Am J Surg Pathol*, 21: 88-101, (1997).

- Çavaş T. and Könen S. 'In vivo genotoxicity testing of the amnesic shell.sh poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay', *Aquatic Toxicology*, 90:154-159, (2008).
- Çavaş, T. and Könen S. 'Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay', *Mutagenesis*, 22 (4): 263–268, (2007).
- Çavaş,T., 'Endüstriyel Atıkların Genotoksik Etkilerinin Mikronukleus Testi Ve Agnor Analiz Teknikleri Kullanılarak İn-Situ Ve Laboratuar Koşulları Altında Araştırılması' , Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı, (2004).
- Celik,A., Eke, D., Ekinci, S., Yıldırım, ., 'The Protective Role of Curcumin on Perfluorooctan sulfonate-induced Genotoxicity Single cell gel electrophoresis and Micronucleus test' *Food and Chemical Toxicology* 53 249–255, (2013)
- Dadhaniya, P., Patel, C., Muchhara, J., Bhadja, N., Mathuria, N., Vachhani, K. and Soni, M.G. "Safety assessment of a solid lipid curcumin particle preparation: Acute and subchronic toxicity studies", *Food Chem Toxicol*, 49 (8):1834–42, (2011).
- Dechatowongse, T. 'Isolation of constituents from the rhizome of plai (*Zingiber cassumunar Rpxb.*)', *Bull Dept Med Sci*, 18:75, (1976).
- Earnshaw, W. C. 'Nuclear changes in apoptosis', *Curr Opin Cell Biol*, 7: 337-43, (1995).

- Eastman, A. 'Survival factors, intranuclear signal transduction and the activation of endonucleases in apoptosis', *Cancer Biology*, 6: 45-52, (1995).
- Eastmond, D.A. and Tucker, J.D.' Identification aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody', *Environ Mol Mutagen*, 13:34- 43, (1989).
- Evan, G.L., Wyllie, A. H., Gilbert, G. S., Littlewood, T. D., Lond, H. and Breaks, M. 'Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein' *Cell*, 69: 119-128, (1992).
- Evans, D.L. and Dive, C. 'Effects of cisplatin on the induction of apoptosis in proliferating hepatoma cells and nonproliferating immature thymocytes', *Cancer Res.*, 53: 9-2133, (1993).
- Faith, R.E., Hessler, J.R. 'Housing and environment.', In: *The laboratory rat*. Academic Press, 314-15, (2006).
- Fenech, M. and Morley. A.A. 'Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay', *Cytobios*, 43:233-46, (1985).
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E., 'Human Micronucleus project HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures', *Mutat Res.*, 534(1-2):65-75, (2003).

- Fenech, M., Morley, A.A. 'Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of in vivo ageing and dose X-irradiation', *Mutat Res*, 161:193-8, (1986).
- Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R.C., Krebs, J., Srinivasula, S.M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L.C., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G. and Alnemri, E.S. 'In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains.', *Proc. Natl. Acad. Scii U S A*, 93(15):7464-9, (1996).
- Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, E.S. 'CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 betaconverting enzyme.', *J Biol Chem*, 269(49):30761-4, (1994).
- Florentin, A., Deblonde, T., Diguio, N., Hautemaniere, A. and Hartemann, P. 'Impacts of two perfluorinated compounds (PFOS and PFOA) on human hepatoma cells: cytotoxicity but no genotoxicity?', 214(6):493-9, (2011).
- Fromme, H., Tittlemier, S.A., Völkel, W., Wilhelm, M. and Twardella, D. "Perfluorinated compounds—exposure assessment for the general population in Western countries", *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 212(3): 239–70, (2009).
- Fuentes, S., Colomina, M.T., Vicens, P., Franco-Pons, N. and Domingo, J.L. 'Concurrent exposure to perfluorooctane sulfonate and restraint stress during pregnancy in mice: effects on postnatal development and behavior of the offspring', *Toxicol Sci*, 98(2):589-98, (2007).
- Garcia-Alloza, M., Borrelli, L.A., Rozkalne, A., Hyman, B.T. and Bacskai, B.J. 'Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and

- partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model', *J. Neurochem*, 102:1095–1104, (2007).
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A. 'Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation', *J Cell Biol*, 119: 493-501, (1992).
- Gibbs, G., '(Rat Genome Sequencing Consortium) Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution.', *Nature* 428(6982):493-521, (2004).
- Grasty, R.C., Wolf, D.C., Grey, B.E., Lau, C.S. and Rogers, J.M. 'Prenatal window of susceptibility to perfluorooctane sulfonate-induced neonatal mortality in the Sprague-Dawley rat', *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 68(6):465-71, (2003).
- Grütter, M.G., 'Caspases: key players in programmed cell death.', *Curr Opin Struct Biol*, 10(6):649-55, (2000).
- Guo, G.Z., Sasai, K., Oya, N., Shibata, T., Shibuya, K. and Kiraoka, M. 'A significant correlation between clonogenic radiosensitivity and the simultaneous assessment of micronucleus and apoptotic cell frequencies', *Int J Radiat Biol*, 75:857-64, (1999).
- Guruge, K.S., Manage, P.M., Yamanaka, N., Miyazaki, S., Taniyasu, S. and Yamashita N. 'Species-specific concentrations of perfluoroalkyl contaminants in farm and pet animals in Japan.', *Chemosphere*, 73(1):210-5, (2008).
- Halpern, M.H. 'The dual blood supply of the rat heart.', *Am J Anat*, 101(1):1- 16, (1957).

- Hanif, R., Qiao, L., Shiff, S.J. and Rigas, B. 'Curcumin, a natural plant phenolic food additive, inhibits cell proliferation and induces cell cycle changes in colon adenocarcinoma cell lines by a prostaglandin-independent pathway', *J Lab Clin Med*, 130:576-84, (1997).
- Harada, K., Saito, N., Inoue, K., Yoshinaga, T., Watanabe T, Sasaki S, Kamiyama S. and 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*, 46(2):141-7, (2004).
- Harada, K., Saito, N., Inoue, K., Yoshinaga, T., Watanabe, T., Sasaki, S., Kamiyama S. and 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*, 46(2):141-7, (2004).
- Hatcher, H., Planalp, R., Cho, J., Torti, F.M. and Torti, S.V. "Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials", *Cell. Mol. Life Sci.*, 65 (11): 1631–52, (2008).
- Haughom, B. and Spydevold, O. 'The mechanism underlying the hypolipemic effect of perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluorooctane sulphonic acid (PFOSA) and clofibric acid', *Biochim Biophys Acta*, 1128(1):65-72, (1992).
- Hazleton, C. 'Mutagenicity test on T-5710 in an in vivo rat micronucleus assay', No 15516-0-454, (1993).
- Heddle, J.A. and Countryman, R.I. 'The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes', *Mutat Res.*, 41:321-32, (1976).

- Hetts, S. W. 'To die or not to die: An overview of apoptosis and its role in disease', *JAMA*, 278: 300-307, (1998).
- Hiroshi, S., Naohiro, I. and Kazuo, K., 'Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS)—Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS)', *Mutation Research*, 583:133–145, (2005).
- Hofstetter, J., Suckow, M.A. and Hickman, D.L. 'Morphophysiology The laboratory Rat.', In: editors, Academic Press, 101- 107, (2006).
- Houde, M., Martin, J.W., Letcher, R.J., Solomon, K.R. and Muir, D.C. "Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances: A review", *Environ. Sci. Technol.*, 40 (11): 3463–73, (2006).
- Högstedt, B. and Karlsson, A. ' The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used', *Mutat Res.*, 156:229-32, (1985).
- Hsu, C.H. and Cheng, A.L. "Clinical studies with curcumin", *Adv. Exp. Med. Biol.*, 595: 471–80, (2007).
- Hu, W., Jones, P.D., De Coen, W., King, L., Fraker, P., Newsted, J. and Giesy, J.P. 'Alterations in cell membrane properties caused by perfluorinated compounds', *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 135(1):77-88, (2003).

Hu, Y. M., Benedict, M. A. and Ding, L. Y. 'Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-I-mediated caspase-9 activation and apoptosis', *EMBO J.*, 18: 3586- 3595, (1999).

Hyunsung, C., "Curcumin Inhibits Hypoxia-Inducible Factor-1 by Degrading Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator: A Mechanism of Tumor Growth Inhibition", *Molecular Pharmacology (American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics)*, 70 (5): 1664–71, (2006).

Jagetia, G.C., Jayakrishnan, A., Fernandes, D. and Vidyasagar, M.S. 'Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment', *Mutat Res*, 491:9-16, (2001).

Jain, N.C. 'Essentials of Veterinary Hematology.', *Lea & Febiger, Philadelphia*(69), (1993).

Jernbro, S., Rocha, P. S., Keiter, S., Skutlarek, D., Farber, H., Jones, P. D. Giesy, J. P. Hollert H., and Engwall, M. 'Perfluorooctane Sulfonate Increases the Genotoxicity of Cyclophosphamide in the Micronucleus Assay with V79 Cells Further Proof of Alterations in Cell Membrane Properties Caused by PFOS', *University of Heidelberg, D-69120 Heidelberg*, 230, (2007).

Jheng-Yu, W., Chin-Yi, L., Tien-Wei, L., Chuian-Fu, K. and Yu-Der, W., 'Curcumin Affects Development of Zebrafish Embryo', *Biol. Pharm. Bull.*, 30: 1336-1339, (2007).

- Jiao, Y., Wilkinson, J. and Di, X. "Curcumin, a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent, is a biologically active iron chelator", *Blood*, 113 (2): 462–9, (2009).
- Jin, Y., Saito, N., Harada, K.H., Inoue, K., Koizumi, A. 'Historical trends in human serum levels of perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate in Shenyang, China.', *Tohoku J Exp Med*, 212(1):63-70 (2007).
- Johansson, N., Fredriksson, A. and Eriksson, P. 'Neonatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) causes neurobehavioural defects in adult mice', *Neurotoxicology*, 29(1):160-9, (2008).
- Johnson, J.D., Gibson, S.J. and Ober, R.E. 'Cholestyramine-enhanced fecal elimination of carbon-14 in rats after administration of ammonium [14C]perfluorooctanoate or potassium [14C]perfluorooctanesulfonate', *Fundam Appl Toxicol*, 4(6):972-6, (1984).
- Kannan, K., Koistinen, J., Beckmen, K., Evans, T., Gorzelany, J.F., Hansen, K.J., Jones, P.D., Helle, E., Nyman, M. and Giesy, J.P. 'Accumulation of perfluorooctane sulfonate in marine mammals.', *Environ Sci Technol*, 35(8):1593-8, (2001).
- Karakaş, S. 'perflorooktan sülfonat (PFOS)'ın embriyonel orjinli hücre serilerindeki etkisinin in-vitro araştırılması', *Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı*, 70s, (2010).
- Kawamoto, K., Oashi, T., Oami, K., Liu, W., Jin, Y., Saito, N., Sato, I. and Tsuda, S. 'Perfluorooctanoic acid (PFOA) but not perfluorooctane sulfonate (PFOS) showed DNA damage in comet assay on *Paramecium caudatum*', 35(6):835-41, (2010).

- Kawanishi, S., Oikawa, S. and Murata, M. "Evaluation for safety of antioxidant chemopreventive agents", *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(11-12):1728–39, (2005).
- Kaya, M., Çenesiz, M., Aksoy, A., Kolbakır, F., Hökelek, M., 'Deney hayvanlarının fizyolojisi. In: editors.', *Laboratuvar hayvanları. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ya-yınları*, 42, (2010)
- Keane, R. W., Kraydieh, S., Lotocki, G., Bethea, J. R., Krajewski, S., Reed, J. C. and Dietrich W D. 'Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury', *J Neuropathol Exp Neurol*, 60: 422-429, (2001).
- Keller, B.J., Marsman, D.S., Popp, J.A and Thurman, R.G. 'Several nongenotoxic carcinogens uncouple mitochondrial oxidative phosphorylation', *Biochim Biophys Acta*, 1102(2):237-44, (1992).
- Kelly, B.C., Ikonomou, M.G., Blair, J.D., Surridge, B., Hoover, D., Grace, R. and Gobas, F.A. 'Perfluoroalkyl contaminants in an Arctic marine food web: trophic magnification and wildlife exposure', *Environ Sci Technol*, 43(11):4037-43, (2009).
- Kern, P., Keilholz, L., Forster, C., Seegenschmiedt, M.H., Sauer, R. and Herman, M. 'In vitro apoptosis in peripheral blood mononuclear cells induced by low-doseradiotherapy displays a discontinuous dose-dependence', *Int J Radiat Biol*, 75:995-1003, (1999).
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. 'Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics', *Br J Cancer*, 26: 239-245, (1972).

- Kiess, W. and Gallaher, B. 'Hormonal control of programmed cell death apoptosis', *Eur J Endocrin*, 18: 482-491, (1998).
- Kolev, Tsonko, M. "DFT and Experimental Studies of the Structure and Vibrational Spectra of Curcumin", *International Journal of Quantum Chemistry (Wiley Periodicals)*, 102 (6): 1069–79, (2005).
- Korsmeyer, S. J. 'Bcl-2 initiates a new category of oncogenes; regulators of cell death', *Blood*, 80: 879-886, (1992).
- Kroemer, G. and Reed, J.C. 'Mitochondrial control of cell death', *Nat Med*, 6(5):513-9, (2000).
- Kuo, M.L., Huang, T.S. and Lin, J.K. 'Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells', *Biochim Biophys Acta*, 1317:95-100, (1996).
- Lau, C., Thibodeaux, J.R., Hanson, R.G., Rogers, J.M., Grey, B.E., Stanton, M.E., Butenhoff, J.L. and Stevenson, L.A. 'Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. II: postnatal evaluation', *Toxicol Sci*, 74(2):382-92, (2003).
- Leo, W. Y., Yeung, M. K., So Guibin Jiang, S., Taniyasu, N., Yamashita Maoyong S. and Yongning, W. 'Perfluorooctanesulfonate and Related Fluorochemicals in Human Blood Samples from China', *Environ. Sci. Technol.*, 40 (3):715–720, (2006).
- Levison, D. A. and Hopwood, D. 'Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium', *J Pathol*, 119: 159-166, (1976).

- Litton Bionetics, Inc. 'Mutagenicity evaluation of T-2014 CoC in the Ames Salmonella/microsome plate test', No 20838, (1978).
- Liu, C., Yu, K., Shi, X., Wang, J., Lam, P.K., Wu, R.S. and Zhou, B. 'Induction of oxidative stress and apoptosis by PFOS and PFOA in primary cultured hepatocytes of freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*)', *Aquat Toxicol*, 82(2):135-43, (2007).
- Liu, Y., Dargusch, R., Maher, P. and Schubert, D. "A broadly neuroprotective derivative of curcumin", *J Neurochem*, 105: 1336–45, (2008).
- Loos, R., Gawlik, B.M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S. and Bidoglio, G. 'EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters', *Environ Pollut*, 157(2):561-8, (2009).
- Luebker, D.J., Case, M.T., York, R.G., Moore, J.A., Hansen, K.J. and Butenhoff, J.L. 'Two-generation reproduction and cross-foster studies of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in rats', *Toxicology*, 215(1-2):126-48, (2005).
- Majno, G. and Torisl, A. 'Apoptosis oncosis and necrosis', *Am J Pathol*, 146: 3-15, (1995).
- Mancuso, C. and Barone, E. "Curcumin in clinical practice: myth or reality?", *Trends Pharmacol Sci.*, 30 (7): 333–4, (2009).

- Mariola, J. E., Benjamin, N., and Benedikt, M. K. ' Pharmacological targets in the ubiquitin system offer new ways of treating cancer, neurodegenerative disorders and infectious diseases', Expert Reviews in Molecular Medicine, 13 : 35(17 pages), (2011).
- Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. and Heddle, J.A. 'The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program', *Mutat Res.*, 239:29-80, (1990).
- Mecchi, M. S. 'Salmonella - Escherichia coli/mammalian-microsome reverse mutation assay with PFOS', Covance Laboratories Inc., 20784-0-409, (1999).
- Meesters, R.J. and Schröder, H.F. 'Perfluorooctane sulfonate--a quite mobile anionic anthropogenic surfactant, ubiquitously found in the environment', *Water Sci Technol*, 50(5):235-42, (2004).
- Meyne, J., Littlefield, L.G. and Moyzis, R.K.' Labelling of human centromeres using an alphoid DNA consensus sequence: Application to the scoring of chromosome aberrations', *Mutat Res*, 226:75-9, (1989).
- Millerk, D.M., Blume, S. and Borst, M., 'Oncogenes: Malignant transformation and modern medicine', *Am J Med Sci*, 300: 59-65, (1990).
- Milobedzka, J., Kostanecki, S. V. and Lampe, V. "Zur Kenntnis des Curcumins", *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 43 (2): 2163–2170, (1910).
- Miyashita, T., Krajewski, S. and Krajewsko, M. 'Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 bax gene expression in vivo', *Oncogene*, 9: 1799- 1805, (1994).

- Mohamad, H., Lajis, N. H., Abas, F., Ali, A. M., Sukari, M. A., Kikuzaki H., and Nakatani, N. 'Antioxidative constituents of *Etlingera elatior*', *J Nat Prod*, 68:285-8, (2005).
- Moos, P.J., Edes, K., Mullally, J.E. and Fitzpatrick, F.A. "Curcumin impairs tumor suppressor p53 function in colon cancer cells", *Carcinogenesis*, 25(9): 1611–7, (2004).
- Nakano, R. 'Apoptosis: Gene directed cell death', *Horm Res*, 48: 2-4, (1997).
- Newton, K. and Strasser, A. 'The Bcl-2 family and cell death regulation', *Curr Opin Genet Dev*, 8: 68-75, (1998).
- Ng, T.P., Chiam, P.C., Lee, T., Chua, H.C., Lim, L. and Kua, E.H. "Curry consumption and cognitive function in the elderly", *American Journal of Epidemiology* (Oxford University Press), 164 (9): 898-906, (2006).
- Norppa, H., Renzi, L. and Lindholm, C. 'Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis- blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization', *Mutagenesis*, 8:519-25, (1993).
- Nowell, P. C. 'Cytogenetics of tumor progression', *Cancer*, 65: 2172-2175, (1990).
- Olivero-Verbel, J., Tao, L., Johnson-Restrepo, B., Guette-Fernández, J., Baldiris-Avila, R., O'byrne-Hoyos, I. and Kannan, K. ' Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in biological samples from the north coast of Colombia', *Environmental Pollution*, 142(2): 367–372, (2006).

- Olsen, G., Burris, J.M., Mandel, J.H. and Zobel, L.R. 'Serum perfluorooctane sulfonate and hepatic and lipid clinical chemistry tests in fluorochemical production employees.', *J Occup Environ Med*, 41(9):799-806, (1999).
- Olsen, G., Burris, J.M., Mandel, J.H. and Zobel, L.R. 'Serum perfluorooctane sulfonate and hepatic and lipid clinical chemistry tests in fluorochemical production employees', *J Occup Environ Med*, 41(9):799-806, (1999).
- Pam, M., Akaishi, T., Schubert, D. and Abe, K. "A pyrazole derivative of curcumin enhances memory", *Neurobiol Aging*, 31: 706–9, (2010).
- Panaretakis, T., Shabalina, I.G., Grandér, D., Shoshan, M.C. and DePierre, J.W. '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*, 173(1):56-64, (2001).
- PFOS, <http://www.fluoridealert.org/pesticides/pfos.uk.report.2004.pdf> , (20.02.2009).
- Plumlee, M.H., Larabee, J. and Reinhard, M. 'Perfluorochemicals in water reuse', *Chemosphere*, 72(10):1541-7, (2008).
- POPRC1, http://www.pops.int/documents/meetings/poprc/meeting_docs/en/POPRC1-INF9-c.pdf, (20.02.2009).
- Ramachandran, C. you You, W. 'Differential sensitivity of human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines to curcumin', *Breast Cancer Res Treat*, 54:269-78, (1999).

- Rao, R. V., Hermel, E. and Castro-Obregon, S., 'Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation', *J Biol Chem*, 276: 869-874, (2001).
- Ravindran, J., Prasad, S. and Aggarwal, B.B. "Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively?", *The AAPS journal*, 11(3): 495–510, (2009).
- Rosin, M.P. and Anwar, W. 'Chromosomal damage in urothelial cells from Egyptians with chronic *Schistosoma Haematobium* infections', *Int J Cancer*, 50:539-43, (1992).
- Roy, S.K., Thilagar, A.K. and Eastmond, D.A. 'Chromosome breakage is primarily responsible for the micronuclei induced by 1,4-dioxane in the bone marrow and liver of young CD-1 mice', *Mutation Research*, 586 :28–37, (2005).
- Rupnow, B.A., Murtha, A.D., Alarcon, R.M., Giaccia, A.J. and Knox, S.J. 'Direct evidence that apoptosis enhances tumor response to fractionated radiotherapy', *Can Res*, 58:1779-84, (1998).
- Schmid, W. 'The micronucleus test for cytogenetic analysis', In: Hollaender A, ed. *Chemical Mutagens, principles and methods for their detection*, Vol., New York: Plenum, 4:31-53, (1976).
- Schmid, W. 'The micronucleus test', *Mutat Res*, 31:9-15, (1975).

- Schmitt, B., Holscher, D. and Schneider, B. "Variability of phenylpropanoid precursors in the biosynthesis of phenylphenalenones in *Anigozanthos preissii*", *Phytochemistry*, 53 (3): 331–337, (2000).
- Schwabenbauer, C. 'Influence of the blood sampling site on some haematological and clinical-chemical parameters in Sprague-Dawley rats.', *Comp Haematol Int.*, 1:112, (1991).
- Schwartzman, R. A. and Cidloski, J. A. 'Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death', *Endocrine Reviews*, 14: 133-144, (1993).
- Seacat, A.M., Thomford, P.J., Hansen, K.J., Olsen, G.W., Case, M.T. and Butenhoff, J.L. 'Subchronic toxicity studies on perfluorooctanesulfonate potassium salt in cynomolgus monkeys' *Toxicol*, 68(1): 249–264, (2002).
- Senft, C., Polacin, M., Priester, M., Seifert, V., Kögel, D. and Weissenberger, J., "The nontoxic natural compound Curcumin exerts anti-proliferative, anti-migratory, and anti-invasive properties against malignant gliomas", *BMC Cancer*, 10:491, (2010).
- Shahverdi, A., Kamyarmollazadeh, M., Mehrdad, I. and Mahsachitsazian, Y., "The combination effect of curcumin with different antibiotics against *Staphylococcus aureus*", *International Journal of Green Pharmacy*, 3: 141, (2009).

- Shanmugavelu, M., Adluri, R. S., Venugopal, P. M. and Namasivayam, N., 'Protective effect of quercetin on nicotine-induced prooxidant and antioxidant imbalance and DNA damage in Wistar rats', *Toxicology*, 243:207, (2008).
- Shishodia, S., Sethi, G., Aggarwal, B.B. 'Curcumin: getting back to the roots', *Annals New York Academy Sciences*, 1056: 17-206, (2005).
- Shukla, P.K., Khanna, V.K., Ali, M.M., Khan, M.Y. and Srimal, R.C. "Anti-ischemic effect of curcumin in rat brain", *Neurochemical research*, 33 (6): 1036–43, (2008).
- Smith, C.N., Neptun, D.A. and Irons, R.D. 'Effect of sampling site and collection method on variations in baseline clinical pathology parameters in Fischer-344 rats : II. Clinical hematology.', *Fund Appl Toxicol* 7(4):658-663, (1986).
- Spencer, S., Cataldo, N. A. and Jaffe, R. B. 'Apoptosis in the human female reproductive tract', *Obstetrical and Gynecological Survey*, 5: 314- 323, (1996).
- Srinivasan, M., Ram Sudheer, A., Raveendran Pillai, K., Raghu Kumar, P., Sudhakaran, P.R. and Menon, V.P. 'Modulatory effects of curcumin on γ -radiation-induced cellular damage in primary culture of isolated rat hepatocytes', *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24(2): 98–105, (2007).
- Starkov, A.A. and Wallace, K.B. 'Structural determinants of fluorochemical-induced mitochondrial dysfunction', *Toxicol Sci*, 66(2):244-52, (2002).
- Stich, H.F. and Rosin, M.P. 'Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and intervention', *Cancer Lett*, 22:241-53, (1984).

- Stich, H.F., Stich, W. and Parida, B.B. 'Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: Betel quid chewers', *Cancer Lett*, 17:125-34, (1982).
- Sudheer, A. R. 'Influence of ferulic acid on nicotine-induced lipid peroxidation, DNA damage and inflammation in experimental rats as compared to N-acetylcysteine', *Toxicology*, 243:317–329, (2008).
- Syu, W.J., Shen, C.C., Don, M. J., Ou, J. C., Lee G. H., and Sun, C. M. 'Cytotoxicity of curcuminoids and some novel compounds from *Curcuma zedoaria*', *J Nat Prod*, 61:1531-4, (1998).
- Şekeroğlu, V. ve Atlı-Şekeroğlu, Z. 'Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi.', *Türk Hij. Den. Biyol. Derg.*, 68(4):241-52, (2011).
- Takagi, T., Takayasu, M., Mizuno, M., Yoshimoto, M. and Yoshida, J. 'Caspase activation in neuronal and glial apoptosis following spinal cord injury in mice', *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 43: 20-29, (2003).
- Takahashi, K., Schwarz, E., Ljubetic, C., Murray, M., Tessler, A. and Saavedra, R.A. 'DNA plasmid that codes for human Bcl-2 gene preserves axotomized Clarke's nucleus neurons and reduces atrophy after spinal cord hemisection in adult rats', *J Comp Neurol*, 404: 159-71, (1999).
- Tao, L., Kannan, K., Wong, C.M., Arcaro, K.F. and Butenhoff, J.L. 'Perfluorinated compounds in human milk from Massachusetts', *U.S.A. Environ Sci Technol*, 42(8):3096-101, (2008).

- Thibodeaux, J.R., Hanson, R.G., Rogers, J.M., Grey, B.E., Barbee, B.D., Richards, J.H., Butenhoff, J.L., Stevenson, L.A., and Lau, C. 'Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. I: maternal and prenatal evaluations', *Toxicol Sci*, 74(2):369-81, (2003).
- Thomford, P. J. '104-week dietary chronic toxicity and carcinogenicity study with perfluorooctane sulfonic acid potassium salt (PFOS; T-6295) in rats', *Covance Laboratories Inc*, 6329-183, (2002).
- Thompson, C.B. 'Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease', *Science*, 267: 1456-1462, (1995).
- Thresiamma, K.C., George, J. and Kuttan, R. 'Protective effect of curcumin, ellagic acid and bax on radiation induced genotoxicity', *J Exp Clin Cancer Res*, 17:431-4, (1998).
- Tiwari, H., and Rao, M.V. 'Curcumin supplementation protects from genotoxic effects of arsenic and fluoride', *Food and Chemical Toxicology*, 48(5): 1234–1238, (2010).
- Tomanin, R., Ballarin, C., Nardini, B., Mastragello, G. and Sarto, F. 'influence of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes by cytokinesis block method', *Mutagenesis*, 6(2):123-126, (1991) .
- Touchette, N. and Fogle, S. 'Apoptosis: it chimes with mitosis *JNIH Res* 3:75, 1991.
- Trudel, D., Horowitz, L., Wormuth, M., Scheringer, M., Cousins, I.T. and Hungerbühler, K. 'Estimating consumer exposure to PFOS and PFOA.', *Risk Anal*, 28(2):251-69, (2008).

Vijayalaxmi. "Genetic effects of turmeric and curcumin in mice and rats", *Mutat Res.*, 79 (2): 125–32, (1980).

Von Ledebur, M.M. and Schmid, W. 'The micronucleus test: Methodological aspects', *Mutat Res.*, 19:109-17, (1973).

Wagner, A.J., Small, M.B. and Itoy, N. 'Myc-mediated apoptosis is blocked by ectopic expression of bcl-2', *Mol Cell Biol*, 13: 2432-2440, (1993).

Walton, M.I., Whysong, D., Connor, P.M, Hockenbery, D., Korsmeyer, S.J. and Kohn, K.W. 'Constitutive expression of human Bcl-2 modulates nitro-gen mustard and camptothecin induced apoptosis', *Cancer Res*, 53:1853-61, (1993).

Widel, M., Kolosza, Z., Jedrus, S., Lukaszczyk, B., Raczek- Zwierzycka, K. and Swierniak, A. 'Micronucleus assay in vivo provides significant prognostic information in human cervical carcinoma: The updated analysis.', *Int J Radiat Biol*, 77:631-6, (2001).

Wikipedia , 'curcumin', <http://en.wikipedia.org/wiki/Curcumin> (28 April 2012).

Wikipedia, the free encyclopedia, 'Perfluorooctanesulfonic acid', http://en.wikipedia.org/wiki/Perfluorooctane_sulfonate (15 Aralık 2012).

Wingrave, J. M., Schaecher, K. E. and Sribnick, E. A. 'Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria mediated

neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats', *Journal of Neuroscience Res*, 73: 95-104, (2003).

Wu, A., Ying, Z. and Gomez-Pinilla, F. "Dietary curcumin counteracts the outcome of traumatic brain injury on oxidative stress, synaptic plasticity, and cognition", *Experimental Neurology*, 197 (2): 309, (2006).

Wu, A., Ying, Z., Schubert, D. and Gomez-Pinilla, F. "Brain and spinal cord interaction: a dietary curcumin derivative counteracts locomotor and cognitive deficits after brain trauma", *Neurorehabil Neural Repair*, 25: 332–42, (2011).

Wu, B. P. 'How diet influences the aging process of the rat.', *Proc Soc Exp Biol Med.*, 205(2):97-105, (1994).

Wyllie, A. H. 'Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation', *Nature*, 284: 555- 556, (1980).

Wyllie, A. H. 'The genetic regulation of apoptosis', *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 5: 97-104, (1995).

Xu, Y., Ku, B, Cui, L., Li, X., Barish, P.A., Foster, T.C. and Ogle, W.O. "Curcumin reverses impaired hippocampal neurogenesis and increases serotonin receptor 1A mRNA and brain-derived neurotrophic factor expression in chronically stressed rats", *Brain Res*, 1162: 9, (2007).

Yang, F., Lim, G.P., Begum, A.N., Ubeda, O.J., Simmons, M.R., Ambegaokar, S.S., Chen, P.P., Kaye, R., Glabe, C.G., Frautschi, S.A. and Cole, G.M, "Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo", *J. Biol. Chem*, 280: 5892–901, (2005).

Yılmaz, İ., 'Erişkin ratlarda deneysel varikozel oluşturulması sonrası Testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin Yükselmesi; ve yükselmiş olan apoptozisin varikosektomi Sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile Değerlendirilmesi', *Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Üroloji Kliniği*, (2005).

Yoshida, K., Yamazaki, H., Ozeki, S., Inoue, T., Yoshioka, Y. and Yoneda, M., 'Mitochondrial genotype and radiationinduced mikronucleus formation in human osteosarcoma cells in vitro', *Oncol Rep.*, 3:615-9, (2001).

Yoshino, M., Haneda, M. and Naruse, M. 'Prooxidantactivity of curcumin: copper-dependent formationof 8-hydroxy-2(‘)-deoxyguanosine in DNA and induction of apoptotic cell death', *Toxicol In Vitro*, 18:783-9, (2004).

Zamani, A.G. and Durakbaşı, H.G. 'Sigaranın bukkal mukoza hücrelerinde, ürotelyal hücrelerde ve periferik kan lenfositlerindeki genotoksik etkileri', *Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu Proje Çalışması*, (2002).

Zhang, L., Li, Y., Zeng, H., Li, M., Wan, Y., Schluesener, H. J., Zhang, Z. and Xu, S. ' Perfluorooctane Sulfonate Induces Apoptosis in N9 Microglial Cell Line', *International Journal of Toxicology*, 30(2):207-215, (2011).

Zheng, L., Dong, G.H., Jin, Y.H. and He, Q.C. 'Immunotoxic changes associated with a 7-day oral exposure to perfluorooctanesulfonate (PFOS) in adult male C57BL/6 mice', *Arch Toxicol*, 83(7):679-89, (2009).

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

Adı Soyadı: Dilek EKE

Doğum Tarihi: 10.03.1981

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	Malatya Kubilay Lisesi		1995-1998
Lisans	Biyoloji	İnönü Üniversitesi	1999-2003
Yüksek Lisans	Biyoloji	Mersin Üniversitesi	2004-2007

Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Biyolog	Mersin Üniversitesi Araştırma Hastanesi / Kan Merkezi	2008-2009
Biyolog	Sağlık Bakanlığı/Malatya Halk Sağlığı / Sıtma Savaş Birimi	2009-

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

1. Celik,A., Eke, D., Ekinci, S., Yıldırım, ‘The Protective Role of Curcumin on Perfluorooctan sulfonate-induced Genotoxicity Single cell gel electrophoresis and Micronucleus test’ Food and Chemical Toxicology 53 249–255, (2013).

2. Celik, A., Diler, S.B., Eke, D., ‘Assessment of genetic damage in buccal epithelium cells of painters: micronucleus, nuclear changes, and repair index.’, DNA and cell biology, 29(6):277-84, (2010).
- 3 . Çelik, A., Büyükakıllı , B., Çimen, B., Taşdelen, B., Öztürk, İ, Eke, D., Assessment of Cadmium Genotoxicity in Peripheral Blood and Bone Marrow Tissues of Male Wistar Rats 19(2) 135-140 (2009).
4. Eke, D., and Çelik, A., ‘Genotoxicity of Thimerosal in Cultured Human Lymphocytes with and without Metabolic Activation Sister Chromatid Exchange Analysis Proliferation Index and Mitotic Index’. Toxicology in vitro, 22, 927-934, (2008).
5. Eke, D., Çelik, A., ‘S9 Aktivasyon Sistemi ile Muamele Edilmiş İnsan Lenfositlerinde Thimerosal’ın Genotoksitesisi 1. Kardeş Kromatid Değişimi 2. Proliferasyon indeks 3. Mitotik İndeks’, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 HAZİRAN 2008, Karadeniz Teknik Üniversitesi, TRABZON
6. Eke, D., Çelik, A., Thimerosal’ın Genotoksitesinin Sitokinesis Blok Mikronukleus Test Sistemi Kullanılarak in vitro Değerlendirilmesi’, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 HAZİRAN 2008, Karadeniz Teknik Üniversitesi, TRABZON
7. Eke, D. and Çelik, A. Genotoxic Effect of Thimerosal, A Preservative in Vaccines, on Human Lymphocyte Cells 6th International Congress of Turkish Society of Toxicology. 2 Kasım -5 Kasım 2006 Antalya/Belek.