

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PERFLOROOKTANOİK ASİTİN SİTOTOKSİSİTE VE  
OKSİDATİF STRES İNDÜKLEYİCİ ETKİLERİNİN *İN VİVO*  
VE *İN VİTRO* SİSTEMLERDE ARAŞTIRILMASI

Ecz. Burcu ÜNLÜ ENDİRLİK

Farmasötik Toksikoloji Programı  
DOKTORA TEZİ

ANKARA  
2015



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PERFLOROOKTANOİK ASİTİN SİTOTOKSİSİTE VE  
OKSİDATİF STRES İNDÜKLEYİCİ ETKİLERİNİN *İN VİVO*  
VE *İN VİTRO* SİSTEMLERDE ARAŞTIRILMASI

Ecz. Burcu ÜNLÜ ENDİRLİK

Farmasötik Toksikoloji Programı  
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Aylin GÜRBAY

ANKARA  
2015

Anabilim Dalı : **Farmasötik Toksikoloji**  
Program : **Farmasötik Toksikoloji**  
Tez Başlığı : **Perflorooktanoik Asitin Sitotoksisite ve Oksidatif Stres İndükleyici Etkilerinin *In Vivo* ve *In Vitro* Sistemlerde Araştırılması**  
Öğrenci Adı-Soyadı : **Burcu ÜNLÜ ENDİRLİK**  
Savunma Sınavı Tarihi : **08.07.2015**

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: **Prof. Dr. Hilal ÖZGÜNEŞ**  
(Hacettepe Üniversitesi)  
Danışman: **Prof. Dr. Aylin GÜRBAY**  
(Hacettepe Üniversitesi)  
Üye: **Prof. Dr. A. Nurşen BAŞARAN**  
(Hacettepe Üniversitesi)  
Üye: **Prof. Dr. Ahmet AYDIN**  
(Yeditepe Üniversitesi)  
Üye: **Doç. Dr. Ayşe EKEN**  
(Erciyes Üniversitesi)

  
(imza)

  
(imza)

  
(imza)

  
(imza)

  
(imza)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Ersin FADİLLİOĞLU  
Müdür

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve bu tez çalışmasının hazırlanması süresince bana her zaman yol gösterip destek olan ve akademik yaşamım boyunca örnek almaya devam edeceğim çok değerli danışman hocam *Prof. Dr. Aylin Gürbay'a*,

Bilgi ve yol göstericiliği ile desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen Erciyes Üniversitesi F. Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı *Doç. Dr. Ayşe Eken'e*

Doktora eğitimime başladığım ilk günden itibaren her zaman desteğini üzerimde hissettiğim Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı *Prof. Dr. Müberra Koşar'a*,

Desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen Erciyes Üniversitesi F. Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi *Yrd. Doç. Dr. İpek Boşgelmez'e*

Doktora eğitimimde emeği geçen *Hacettepe Üniversitesi F. Toksikoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma*,

Dokuların histopatolojik analizinde bana yardımcı olan Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi *Prof. Dr. Figen Öztürk'e*,

Akım sitometri yönteminin çalışılması sırasında, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı öğretim görevlisi *Dr. Hande Canpınar'a*,

Tez deneylerim sırasında, benden yardım ve desteklerini esirgemeyen araştırma görevlisi arkadaşlarım *Ecz. Duygu Paslı ve Ecz. Elçin Özger'e*,

Arkadaşlıkları ve yardımlarından dolayı, Hacettepe Üniversitesi ve Erciyes Üniversitesi'ndeki *araştırma görevlisi arkadaşlarıma*,

Varlıklarıyla bana her zaman güç veren sevgili *annem ve babama*,

Doktora eğitimim süresince, hiçbir zaman benden desteğini esirgemeyen ve her koşulda yanımda olan sevgili eşim *Alper Endirlik'e*

sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (H.Ü.B.A.B. 013 D05 301 001).

## ÖZET

**Ünlü Endirlik, B. Perflorooktanoik asitin sitotoksosite ve oksidatif stres indükleyici etkilerinin *in vivo* ve *in vitro* sistemlerde araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2015.** Perflorooktanoik asit (PFOA), toksikolojik öneme sahip kalıcı bir çevresel kirleticidir. Ancak toksik etki mekanizması tam olarak tanımlanmamıştır. Bu çalışmada, PFOA'nın olası sitotoksik ve oksidatif stres indükleyici etkileri taurin ve koenzim Q<sub>10</sub> (KoQ<sub>10</sub>) varlığı ve yokluğunda *in vivo* ve *in vitro* model sistemlerde araştırılmıştır. Bu amaçla, çalışmanın *in vivo* kısmında hayvanlar, PFOA'nın iki farklı konsantrasyonuna (15 veya 30 mg/kg/gün) oral yoldan 10 gün süreyle maruz bırakılmışlar ve karaciğer, beyin ve böbrek dokularında, lipid peroksidasyon, toplam glutatyon düzeyleri ve antioksidan enzim aktiviteleri (katalaz, glutatyon peroksidaz ve Cu-Zn süperoksit dismutaz) ölçülmüştür. PFOA uygulanan hayvanlarda vücut ağırlıklarında önemli ve doza bağımlı bir azalma ile böbrek ağırlıklarında azalmaya ek olarak hepatomegali gözlenmiştir. MDA düzeylerinin ve enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan parametrelerin değerlendirilmesi, özellikle daha düşük konsantrasyonda PFOA'nın lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistemlerde değişikliği indüklediğini göstermiştir. Farelerin 30 mg/kg PFOA verilmeden önce taurin veya KoQ<sub>10</sub>'a ön-maruziyeti karaciğer dokusunda PFOA'nın indüklediği lipid peroksidasyona karşı belirgin bir koruma sağlamıştır. Çalışmanın *in vitro* bölümünde PFOA'nın sitotoksik etkileri MTT deneyi ile belirlenmiş ve bileşiğin vero hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisinin zamana bağımlı olduğu bulunmuştur. Sitotoksosite, PFOA'nın  $\sim \geq 200 \mu\text{M}$  konsantrasyonlarında gözlenmiştir. Taurin ve KoQ<sub>10</sub> ön uygulamasının PFOA'nın indüklediği sitotoksositeye karşı kısmen koruyucu olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, PFOA'nın toksisite mekanizmasında reaktif oksijen türlerinin yer aldığına işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Perflorooktanoik asit, oksidatif stres, fare, sitotoksosite, vero hücreleri

Destekleyen Kurumlar: H.Ü.B.A.B. (013 D05 301 001).

## ABSTRACT

**Ünlü Endirlik, B. Investigation of cytotoxic and oxidative stress-inducing effects of perfluorooctanoic acid in *in vivo* and *in vitro* systems. Hacettepe University Health Sciences Institute PhD Thesis in Pharmaceutical Toxicology, Ankara, 2015.** Perfluorooctanoic acid (PFOA) is a persistent environmental pollutant of toxicological importance. However, its mechanism of toxicity was not well-characterized. The aim of this study was to investigate the possible cytotoxic and oxidative stress inducing effects of PFOA in *in vivo* and *in vitro* model systems in the presence or absence of taurine and coenzyme Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>). For this purpose, in the *in vivo* part of the study, animals were treated with two different concentrations (15 or 30 mg/kg/day) of PFOA by oral route for 10 days and lipid peroxidation, total glutathione levels, and activities of antioxidant enzymes (catalase, glutathione peroxidase and Cu-Zn-superoxide dismutase) were measured in liver, brain and kidney tissues. A significant and dose-dependent decrease in body weights and hepatomegaly in addition to reduction in kidney weights were observed in animals treated with PFOA. Evaluation of MDA levels and enzymatic and non-enzymatic antioxidant parameters showed that especially lower concentration of PFOA induced lipid peroxidation and a modification on the antioxidant systems. Pre-treatment of mice with taurine or CoQ<sub>10</sub> before the administration of 30 mg/kg of PFOA provided a marked protection against PFOA-induced lipid peroxidation in liver tissue. In the *in vitro* part of the study, cytotoxic effects of PFOA was determined by MTT assay, and it was found that the effect of the substance on the viability of vero cells was time dependent. Cytotoxicity was observed  $\sim \geq 200 \mu\text{M}$  concentrations of PFOA. Taurine or CoQ<sub>10</sub> pretreatment was partially protective against PFOA-induced cytotoxicity. These results suggest the involvement of reactive oxygen species in the mechanism of toxicity of PFOA.

**Key Words:** Perfluorooctanoic acid, oxidative stress, mice, cytotoxicity, vero cells

Supported by: H.U.B.A.B. (013 D05 301 001).

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Perflorooktanoik Asit	4
2.2. PFOA'nın Kimyasal Yapısı ve Fiziksel Özellikleri	5
2.3. PFOA'ya Maruziyet Yolları	7
2.4. İnsan Serum PFOA düzeyleri	9
2.5. PFOA'nın Farmakokinetik Özellikleri	10
2.5.1. PFOA'nın Absorpsiyonu	10
2.5.2. PFOA'nın Dağılımı	10
2.5.3. PFOA'nın Metabolizması	12
2.5.4. PFOA'nın İtrahı	13
2.6. PFOA'nın Toksik Etkilerinin Belirlenmesi Amacıyla Yapılan <i>in Vivo</i> ve <i>in Vitro</i> Çalışmalar	15
2.6.1. PFOA'nın Akut Toksikite Verileri	15
2.6.2. PFOA'nın Subakut ve Subkronik Toksikite Verileri	15
2.6.3. PFOA'nın Kronik Toksitiesi ve Kanser Oluşumu Üzerindeki Etkileri	16
2.6.4. PFOA'nın Karaciğer Üzerindeki Toksik Etkileri	17
2.6.5. PFOA'nın İmmün Sistem Üzerindeki Toksik Etkileri	17
2.6.6. PFOA'nın Üreme Sistemi ve Gelişimsel Sistem Üzerindeki Toksik Etkileri	18



2.6.7. PFOA'nın Sinir Sistemi Üzerindeki Toksik Etkileri	22
2.6.8. PFOA'nın Endokrin Bozucu Etkileri	23
2.6.9. PFOA'nın Lipid Metabolizması Üzerine Etkileri	24
2.7. PFOA'nın Olası Toksik Etki Mekanizmaları	25
2.8. PFOA'nın İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri	28
2.8.1. PFOA'nın Kanser Oluşumu Üzerindeki Etkileri	29
2.8.2. PFOA'nın Kardiyovasküler Sistem Üzerindeki Etkileri	30
2.8.3. PFOA'nın Karaciğer Enzimleri Üzerindeki Etkileri	31
2.8.4. PFOA'nın Üreme Sistemi Üzerindeki Etkileri ve Gelişimsel Toksisitesi	31
2.8.5. PFOA'nın Endokrin Sistem Üzerindeki Etkileri	34
2.8.6. PFOA'nın İmmün Sistem Üzerine Etkileri	35
2.8.7. PFOA'nın Sinir Sistemi Üzerindeki Etkileri	35
2.8.8. PFOA'nın Böbrek Üzerindeki Etkileri	36
2.8.9. PFOA'nın Diğer Organ ve Sistemler Üzerindeki Etkileri	37
2.9. Oksidatif Stres, Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma	37
2.9.1. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Bileşikleri	38
2.9.2. Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Kaynakları	42
2.9.3. Oksidatif Hasar ve Sonuçları	42
2.9.4. Antioksidan Savunma Sistemleri	45
2.10. Hücre Kültürü	53
2.10.1. Hücre Bölünmesi ve Hücre Döngüsü	55
2.10.2. Hücre Ölümü	56
2.10.3. Sitotoksisitenin Ölçümü	58
2.10.4. Vero Hücre Hattı	59
2.11. Akım Sitometrisi	59
3. GEREÇ ve YÖNTEM	62
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	62
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	64
3.3. Kullanılan Çözelti ve Reaktifler	66
3.3.1. Deney Hayvanlarına İntragastrik (ig) Yoldan Uygulanan Çözeltiler	66

3.3.2. Histopatolojik Analiz için Kullanılan Çözeltiler	66
3.3.3. Doku Homojenatlarının Hazırlanması için Kullanılan Çözeltiler	66
3.3.4. TBARS Tayininde Kullanılan Çözeltiler	66
3.3.5. Toplam GSH Tayininde Kullanılan Çözeltiler	67
3.3.6. Cu-Zn SOD Tayini için Kullanılan Çözelti ve Reaktifler	68
3.3.7. GPx Tayini için Kullanılan Çözelti ve Reaktifler	68
3.3.8. Katalaz Tayini için Kullanılan Çözeltiler	69
3.3.9. Protein Tayini için Kullanılan Çözelti ve Reaktifler	69
3.3.10. Hücre Döngüsü ve Apoptozun Belirlenmesi için Kullanılan Çözeltiler	70
3.3.11. Hücre Kültür Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler	70
3.4. Deney Düzeni ve İncelenen Parametreler	71
3.4.1. Deney Hayvanlarının Sağlanması ve Grupların Oluşturulması	71
3.4.2. Doku Örneklerinin Hazırlanması	73
3.4.3. Histopatolojik Analiz	73
3.4.4. Oksidan/Antioksidan Parametrelerin Tayini	74
3.4.5. Protein Tayini	79
3.4.6. Hücre Döngüsü ve Apoptozun Belirlenmesi	79
3.4.7. Vero Hücre Kültürlerinde Yapılan Çalışmalar	80
3.4.8. İstatistiksel Değerlendirme	83
4. BULGULAR	84
4.1. <i>In Vivo</i> Çalışma Sonuçlarına İlişkin Bulgular	84
4.1.1. PFOA ve Antioksidan Madde Uygulanan Farelerin Vücut Ağırlıklarına İlişkin Bulgular	84
4.1.2. PFOA ve Antioksidan Madde Uygulamasının Farelerin Karaciğer Ağırlıkları Üzerindeki Etkisi	85
4.1.3. PFOA ve Antioksidan Madde Uygulamasının Farelerin Beyin Ağırlıkları Üzerindeki Etkisi	86
4.1.4. PFOA ve Antioksidan Madde Uygulamasının Farelerin Böbrek Ağırlıkları Üzerindeki Etkisi	87

4.1.5. PFOA ve Antioksidan Uygulanan Farelerin Histopatolojik Analiz Bulguları	89
4.1.6. PFOA ve Antioksidan Uygulanan Farelerin Karaciğer Dokularındaki Lipid Peroksidasyonu, Toplam GSH Düzeyi ve Antioksidan Enzim Aktivitelerine İlişkin Bulgular	97
4.1.7. PFOA ve Antioksidan Uygulanan Farelerin Beyin Dokularındaki Lipid Peroksidasyonu, Toplam GSH Düzeyi ve Antioksidan Enzim Aktivitelerine İlişkin Bulgular	103
4.1.8. PFOA ve Antioksidan Uygulanan Farelerin Böbrek Dokularındaki Lipid Peroksidasyonu, Toplam GSH Düzeyi ve Antioksidan Enzim Aktivitelerine İlişkin Bulgular	108
4.1.9. PFOA ve Antioksidan Madde Uygulanan Farelerin Karaciğer ve Böbrek Dokularına ait Hücre Döngülerinde Meydana Gelen Değişiklikler	114
4.2. <i>In Vitro</i> Çalışmalara İlişkin Sonuçlar	120
4.2.1. PFOA'nın Vero Hücreleri Üzerindeki Etkileri	120
4.2.2. Vero Hücre Kültürlerinde Taurinin Etkisi	122
4.2.3. Vero Hücre Kültürlerinde KoQ <sub>10</sub> 'un Etkisi	123
4.2.4. Vero Hücrelerinde Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Oluşumu	124
5. TARTIŞMA	125
5.1. PFOA'nın Vücut ve Organ Ağırlıklarına Etkisi ve Dokularda Gözlenen Histopatolojik Değişiklikler	125
5.2. PFOA'nın Dokulardaki Oksidan ve Antioksidan Parametreler Üzerindeki Etkisi	129
5.2.1. PFOA'nın Karaciğer Dokusundaki Oksidan ve Antioksidan Parametrelere Etkileri	129
5.2.2. PFOA'nın Beyin Dokusundaki Oksidan ve Antioksidan Parametreler Üzerindeki Etkileri	133

5.2.3. PFOA'nın Böbrek Dokusundaki Oksidan ve Antioksidan Parametreler Üzerindeki Etkileri	135
5.3. PFOA'nın Hücre Döngüsü ve Apoptoz Üzerindeki Etkileri	136
5.4. PFOA'nın Vero Hücre Kültürleri Üzerindeki Etkileri	137
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	143
KAYNAKLAR	145
EKLER	
Ek 1: Etik Kurulu Onayı	
ÖZGEÇMİŞ	

## SİMGELER ve KISALTMALAR

$\Delta A$	Absorbans değişimi
$\beta$ -NADPH	$\beta$ -nikotinamid adedin dinükleotid fosfat, indirgenmiş
8-OHdG	8-hidroksideoksiguanozin
8-OHG	8-hidroksiguanozin
ABD	Amerika Bileşik Devletleri
Açil-KoA	Açil koenzim A
ALT	Alanin amino transferaz
APFO	Amonyum perflorooktanoik asit
AST	Aspartat amino transferaz
BSA	Siğir serum albümini
CAPS	3-(sikloheksilamino)-1-propansülfonik asit
CAR	Konstitütif adrostan reseptörü
CAT	Katalaz
Cu-Zn SOD	Bakır-çinko süperoksit dismutaz
DCF	2',7'-diklorofloresin
DCFH	2',7'-diklorofloresin
DCFH-DA	2',7'-diklorofloresin diasetat
diPAP	Polifloroalkil fosfat diester
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
DTNB	5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik) asit
DTPA	Dietilentriamin pentaasetik asit
ECHA	Avrupa Birliği Kimyasallar Ajansı
EFSA	Avrupa Besin Güvenliği Kurulu
ES-SOD	Hücreler arası süperoksit dismutaz
FTOH	Florotelomer alkol
GGT	Gama glutamil transferaz
GJIC	Hücreler arası kavşak boşluğu iletişimi
GPx	Glutatyon peroksidaz

GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon, indirgenmiş
GSSG	Okside glutasyon
GST	Glutasyon S-transferaz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HNE	4-hidroksi-2-nonenal
HOCl	Hipokloröz asit
HOO <sup>•</sup>	Hidroperoksil radikali
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu
IgE	İmmünglobulin E
İNT	p-iyodonitrotetrazolium viyole
KOK	Kalıcı organik kirleticiler
KoQ <sub>10</sub>	Koenzim Q <sub>10</sub> , ubikinon
KoQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub>	Redükte koenzim Q <sub>10</sub> , ubikinol
L <sup>•</sup>	Lipid radikali
LC <sub>50</sub>	Letal konsantrasyon 50
LD <sub>50</sub>	Letal doz 50
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LH	Lipid molekülü
LOAEL	Ters etki gözlenen en düşük düzey
LOO <sup>•</sup>	Peroksil radikali
LOOH	Lipid hidroperoksit
MDA	Malondialdehit
Mn-SOD	Mangan süperoksit dismutaz
MOPS	Morfolinopropan sülfonik asit
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
Na <sub>2</sub> EDTA	Disodyum etilendiamintetraasetik asit
NHANES	Amerika Bileşik Devletleri Ulusal Sağlık ve Beslenme Anketi
NO <sup>•</sup>	Nitrik oksit radikali
NOAEL	Ters etki görülmeyen düzey

O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Süperoksit anyon radikali
OAT	Organik anyon taşıyıcıları
OH <sup>•</sup>	Hidroksil radikali
ONOO <sup>-</sup>	Peroksinitrit anyonu
PBS	Fosfat tamponu
PFAA	Perfloroalkil asit
PFO <sup>-</sup>	Perflorooktanoik asit anyonu
PFOA	Perflorooktanoik asit
Pİ	Propidyum iyodür
PPAR- $\alpha$	Peroksizom proliferasyon aktive reseptör- $\alpha$
PTFE	Politetrafloroetilen
PXR	Pregnan-X reseptörü
RNA	Ribonükleik asit
RNaz	Ribonükleaz
RO <sup>•</sup>	Peroksil radikali
ROB	Reaktif oksijen bileşikleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SİT P450	Sitokrom P450
SOD	Süperoksit dismutaz
T3	Triiyodo tiroksin
T4	Tiroksin
TBA	Tiyobarbitürik asit
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif bileşikleri
TMP	1,1,3,3-tetrametoksi propan
TSH	Tiroid uyarıcı hormon
USEPA	Amerika Bileşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
VLDL	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. PFOA'nın kimyasal yapısı	6
2.2. Hücre döngüsü	56
2.3. Vero hücrelerinin mikroskop altındaki görünümü	59
4.1. Kontrol ve PFOA uygulanan Balb/c fare karaciğerlerinin görüntüsü	86
4.2. Balb/c farelerinin karaciğer dokularının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü	89
4.3. PFOA (15 mg/kg)'ya maruz bırakılmış Balb/c farelerinin karaciğer dokularının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü	90
4.4. PFOA (30 mg/kg)'ya maruz bırakılmış Balb/c farelerinin karaciğer dokularının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü	91
4.5. Taurin + PFOA (30 mg/kg)'ya maruz bırakılmış Balb/c farelerinin karaciğer dokularının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü	92
4.6. KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)'ya maruz bırakılmış Balb/c farelerinin karaciğer dokularının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü	93
4.7. Balb/c farelerinin beyin dokularının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü	94
4.8. Balb/c farelerinin beyin dokularının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü	95
4.9. Balb/c farelerinin böbrek dokularının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü	96
4.10. Balb/c farelerinin böbrek dokularının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü	97
4.11. Karaciğer dokusunda KoQ <sub>10</sub> uygulanan gruptaki hücre döngüsü dağılımını gösteren histogram	115
4.12. Böbrek dokusunda KoQ <sub>10</sub> uygulanan gruptaki hücre döngüsü dağılımını gösteren histogram	118



4.13. Farklı konsantrasyonlarda PFOA ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen vero hücrelerinin canlılık yüzdeleri	121
4.14. Vero hücrelerinde PFOA'nın indüklediği sitotoksik etkiye karşı taurinin koruyucu etkisi	122
4.15. Vero hücrelerinde PFOA'nın indüklediği sitotoksik etkiye karşı KoQ <sub>10</sub> 'un koruyucu etkisi	123
4.16. Vero hücrelerinde PFOA'nın ROB oluşumunu indükleyici etkisi	124

## TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. PFOA'nın fizikokimyasal özellikleri	6
2.2. PFOA'nın serum/plazma eliminasyon yarı ömürleri	14
4.1. Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin vücut ağırlıklarına ilişkin veriler	84
4.2. Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin karaciğer ağırlıklarına ilişkin veriler	85
4.3. Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin beyin ağırlıklarına ilişkin veriler	87
4.4. Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin böbrek ağırlıklarına ilişkin veriler	88
4.5. Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin karaciğer dokularındaki MDA düzeylerine ilişkin veriler	98
4.6. Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin karaciğer dokularındaki toplam GSH düzeylerine ilişkin veriler	99
4.7. Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin karaciğer dokularındaki Cu-Zn SOD aktivitesine ilişkin veriler	100
4.8. Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin karaciğer dokularındaki GPx aktivitesine ilişkin veriler	101
4.9. Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin karaciğer dokularındaki CAT aktivitesine ilişkin veriler	102
4.10. Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin beyin dokularındaki MDA düzeylerine ilişkin veriler	103

4.11. Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin beyin dokularındaki toplam GSH düzeylerine ilişkin veriler	104
4.12. Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin beyin dokularındaki Cu-Zn SOD aktivitesine ilişkin veriler	105
4.13. Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin beyin dokularındaki GPx aktivitesine ilişkin veriler	106
4.14. Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin beyin dokularındaki CAT aktivitesine ilişkin veriler	107
4.15. Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin böbrek dokularındaki MDA düzeylerine ilişkin veriler	108
4.16. Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin böbrek dokularındaki toplam GSH düzeylerine ilişkin veriler	109
4.17. Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin böbrek dokularındaki Cu-Zn SOD aktivitesine ilişkin veriler	111
4.18. Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin böbrek dokularındaki GPx aktivitesine ilişkin veriler	112
4.19. Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin böbrek dokularındaki CAT aktivitesine ilişkin veriler	113
4.20. Karaciğer hücrelerinin hücre döngüsünün G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki yüzde dağılımları	116
4.21. Böbrek hücrelerinin hücre döngüsünün G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki yüzde dağılımları	119

## 1. GİRİŞ

Perflorooktanoik asit (PFOA, C8), doğal olarak çevrede bulunmayan, poliflor yapısında, sekiz karbonlu bir bileşiktir. Sahip olduğu güçlü karbon-flor bağları nedeniyle çevrede ayrışmaz. Doğada ve besin zincirinde birikerek etkisini uzun yıllar devam ettirir. PFOA, kalıcı organik kirleticiler (KOK) olarak isimlendirilen çevresel kirleticiler grubunda yer almaktadır (1-3).

PFOA, endüstride ve tüketici ürünlerinin üretiminde tercih edilen bir bileşiktir. Esas olarak floropolimer üretiminde emülgatör, ayrıca kumaş, deri, döşeme ve halılarda su ve lekeye karşı direnç sağlamak, besin ambalajlarında yağ geçişini engellemek amacıyla kullanılmaktadır. PFOA, ayrıca yangın söndürücü köpüklerde, kayakların altlarına sürülen mumlarda, boya, yapıştırıcı ve cila sanayi ile teflon kaplamaların yapısında bulunmaktadır. Evlerde kullanılan temizlik ürünleri, pestisitler, kozmetik ürünler ve farmasötik preparatların da PFOA içerdiği bildirilmiştir (1-5). İnsanların PFOA'ya hangi kaynaklar yoluyla maruz kaldığı kesin olarak belirlenememiş olmakla birlikte yapılan araştırmalar sonucunda içme suyu, kontamine olmuş yiyecekler, anne sütü, kapalı ortam havası ve tozların önemli maruziyet kaynakları olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca evlerde gündelik hayatta sıkça kullanılan yapışmaz tavalar ve gıda ambalajları gibi tüketici ürünlerinin de PFOA kaynağı olduğu gösterilmiştir (3, 6-8).

PFOA'nın eliminasyon yarı ömrünün insanlarda ortalama 3,8 yıl olduğu tahmin edilmektedir (9) . PFOA'nın, çeşitli hayvanlarda karaciğer, pankreas ve testis tümörlerine yol açtığı (10), hepatotoksik (11), immünotoksik (12) ve nörotoksik (13) etkilerinin olduğu, üreme sistemi ve gelişimsel düzeyde toksisiteye (14) neden olduğu gösterilmiştir. PFOA ayrıca, endokrin bozucu bir kimyasal olarak sınıflandırılmaktadır (15). PFOA ile yapılan epidemiyolojik çalışma sonuçları, PFOA maruziyeti ile kanser oluşumu (16), kardiyovasküler hastalıklar (17), tiroid hastalıkları (18), kronik böbrek yetmezliği (19), hepatotoksisite (20), ürik asit yüksekliği (21), yüksek kolesterol (22) ve obezite (23) arasında pozitif bir ilişki bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca genel popülasyon çalışmalarından elde edilen veriler, PFOA'nın üreme sistemi ve gelişimin (24, 25) yanı sıra immün sistemi de etkilediğini göstermiştir (26-28).

Perflorooktanoik asitin toksik etki mekanizması kesin olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte en çok araştırılan ve üzerinde durulan mekanizma, PFOA'nın bir nükleer almaç (reseptör) olan peroksizom proliferasyon aktive reseptör- $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ )'yı aktive edici etkisidir (1, 3, 10). PFOA'nın ayrıca diğer nükleer reseptörlerden konstitütif androstan reseptörü (CAR) ile pregnan-X reseptörünü (PXR) de aktive ettiği bildirilmiştir (29).

Oksidatif stres, vücuttaki oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin hasara neden olabilecek yönde oksidanlar tarafına kayması olarak tanımlanır (30). PFOA gibi peroksizom proliferatörleri, fare ve sıçanlarda açıl-KoA oksidaz aktivitesini arttırmakta, bu da yağ asidi oksidasyonunun yan ürünü olarak hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) oluşturarak oksidatif hasara yol açmaktadır (31). Sıçanlar (32, 33), fareler (34-39) ve balıklar (40, 41) üzerinde yapılan sınırlı sayıda çalışma, PFOA'nın lipid peroksidasyon düzeylerinde artışa, katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzim aktivitelerinde artış ve/veya azalışa neden olduğunu göstermektedir. Yapılan bazı *in vitro* çalışmalar da, PFOA maruziyetinin hücrelerde reaktif oksijen bileşiklerinde (ROB) ve oksidatif stres düzeyinde artışa yol açtığını göstermektedir (42-46).

Taurin, vücutta hücre zarının bütünlüğünün sağlanmasında, ozmotik basıncın ve hücre içi kalsiyum düzeylerinin ayarlanmasında ve safra tuzu oluşumunda görev alan, serbest aminoasit yapısında, antioksidan özelliği olan bir maddedir (47). Koenzim Q<sub>10</sub> (KoQ<sub>10</sub>) ise mitokondriyal solunum ve oksidatif fosforilasyonda önemli bir rolü olan endojen ve yağda çözünebilir bir antioksidandır (48).

Literatür verileri dikkate alındığında, çevrede yaygın olarak bulunan ve buna bağlı olarak insan ve hayvanların biyolojik dokularında ölçülebilen düzeylerde saptanan PFOA'nın toksik etki mekanizmasının henüz tam olarak aydınlatılmadığı anlaşılmaktadır (2, 3, 49). Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, PFOA'nın oksidatif stres indükleyici etkileri olduğu ve çalışılan sistemlerde reaktif oksijen bileşikleri düzeylerinde artışa ve antioksidan enzim aktivitelerinde değişikliklere neden olduğunu bildiren kısıtlı sayıda çalışma

olmakla beraber (34, 39, 50, 51), bu bulguları doğrulamayan çalışma sonuçları da bulunmaktadır (52). Bu bilgilerden hareketle bu tez kapsamında,

- PFOA'nın toksik etki mekanizmasının araştırılması amacıyla fareler ve vero hücreleri (maymun böbrek hücreleri) kullanılarak çalışmalar yapılması,
- Bu kapsamda, PFOA'nın amonyum tuzu olan amonyum perflorooktanoik asitin (APFO) oral yoldan farelere verilmesinin ardından, lipid peroksidasyonu (MDA) ve toplam glutatyon düzeyleri (GSH) ile antioksidan enzimler, Cu-Zn süperoksit dismutaz (Cu-Zn SOD), glutatyon peroksidaz ve katalaz aktivitelerinin fare dokularında (karaciğer, beyin, böbrek), taurin ve koenzim Q<sub>10</sub>'un varlığı ve yokluğunda ölçülmesi,
- PFOA maruziyetinin bu dokularda meydana getirebileceği olası histopatolojik değişikliklerin incelenmesi,
- Bileşiğin vero hücreleri üzerindeki olası sitotoksik etkisinin, hücrelerin, bu bileşiğin çeşitli konsantrasyonları ile farklı sürelerde inkübe edilmesini takiben MTT yöntemi ile belirlenmesi,
- Sitotoksik konsantrasyonların ve bu etkinin gözlemlendiği sürelerin saptanmasının ardından, PFOA'nın seçilecek bir konsantrasyonu ve uygun zaman aralığında, taurin ve koenzim Q<sub>10</sub> gibi bileşiklerin sitotoksikite üzerindeki olası koruyucu etkilerinin değerlendirilmesi,
- PFOA'nın vero hücrelerinde ROB oluşturma olasılığının incelenmesi,
- PFOA'nın hücre döngüsüne olan etkisinin değerlendirilmesi,

amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Perflorooktanoik Asit

Perflorooktanoik asit çevrede doğal olarak bulunmayan, çeşitli ticari ürünlerin içeriğinde ve endüstriyel süreçlerde kullanılan poliflorlu bir bileşiktir (1-3). PFOA ilk kez 1947 yılında üretilmiştir (53). Hidrofobik ve lipofobik özelliğe sahip florlu karbon zinciri ile karboksilik asit gibi hidrofilik yüklü işlevsel grup içermesi nedeniyle, yağ ve suyu itme, ısı ve kimyasal tepkimelere karşı dirençli olma gibi yararlı özellikleri bulunmaktadır. Bu nedenle endüstride yaygın kullanım alanına sahiptir (2). PFOA, su, kir ve lekelenmeye dayanıklı tekstil, deri, döşeme ve halılarda; besin ile temas eden yağa dirençli kâğıt ambalajlarda; uçakların hidrolik sıvılarında; yangın söndürücü köpüklerde, alkali özellikteki temizlik ürünlerinde, yarı iletkenlerde, fotoğraf filmlerinde, pestisit formülasyonlarında, farmasötik ve kozmetik ürünlerde, takma diş temizleyicilerinde, boya, tutkal, balmumu, cila, vb. ürünlerde; sürfaktan, emülgatör, nemlendirici ajan, katkı maddesi ve kaplama maddesi gibi çeşitli endüstriyel ürünlerin bileşiminde yaygın olarak bulunur. PFOA ayrıca yapışmaz tencere ve tavaların iç yüzey kaplamalarında, su geçirmez giysi kumaşlarında, elektrik kablosu kaplamalarında, ateşe ve kimyasallara dayanıklı tüplerde ve tesisat izolasyon bantlarının üretiminde kullanılan politetrafloroetilenlerin (PTFE) ve diğer floropolimerler ve floroelastomerlerin yapımında emülgatör olarak işlev görmektedir (1, 3-5, 54).

PFOA ve diğer perflorlu bileşiklerin üretimi için elektrokimyasal florinasyon ve telomerizasyon olmak üzere iki ana yöntem bulunmaktadır (1-3). PFOA ilk kez elektrokimyasal florinasyon yöntemiyle üretilmeye başlanmıştır (53). Elektrokimyasal florinasyon yöntemiyle PFOA'nın çoğunlukla düz zincir izomeri, daha az miktarda da dallanmış zincir izomeri; telomerizasyon yöntemi ile ise sadece düz zincir izomeri üretilir (55). PFOA ayrıca florotelomer alkol (FTOH) ve polifloroalkil fosfat diester (diPAP) gibi öncü maddelerden biyolojik bozunma (biyodegradasyon) veya biyolojik dönüşüm (biyotransformasyon) yoluyla da oluşabilmektedir (56-61). diPAP'ların sıçanlarda enzimatik hidroliz sonucu FTOH'lara ve FTOH'ların da PFOA'ya metabolize olduğu bildirilmiştir (62, 63).

PFOA'nın sahip olduğu güçlü karbon-flor bağları bileşiiği, sıcaklık, asit veya kimyasal bileşiklerin yıkılmasına neden olan diğer kuvvetlere karşı dayanıklı hale getirir (64). Bu nedenle PFOA günümüzde, tüm dünyada içme suları, yüzey ve yeraltı suları, hava, çamur, toprak, tortular, toz ve kutuplardaki buz tabakası gibi yaygın bir çevrede bulunmaktadır (1, 4).

Bileşiiğin üretimi ve kullanımı, sekiz ana üretici firma tarafından Amerika Bileşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (USEPA) ile yapılan gönüllü bir anlaşma çerçevesinde kademeli olarak azaltılma sürecine girmiştir. Bu süreçte, PFOA ve ilgili bileşiklerin küresel emisyonları ve ürün içeriklerinin 2010 yılı itibariyle % 95 oranında azaltılması; 2015 yılı itibariyle de tamamen durdurulması planlanmıştır (65). Ancak, PFOA'nın gelişmekte olan ülke endüstrileri tarafından kullanımına devam edilmesi, çevrede uzun süre kalıcı olması, çeşitli öncü maddelerden de oluşabilmesi ve insanlardaki yarılanma ömrünün uzunluğu, bu bileşiiğe maruziyetin uzun bir süre daha devam edeceğini göstermektedir (2, 3, 66). Sahip olduğu bu özellikler nedeniyle, APFO'nun, Avrupa Birliği Kimyasallar Ajansı (ECHA) tarafından 2013 yılında, çok yüksek düzeyde endişe edilmesi gereken maddeler aday listesine eklenmesine karar verilmiştir (67).

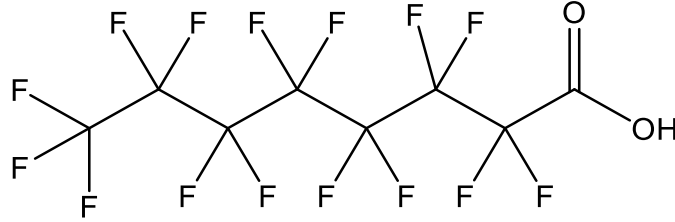
PFOA'nın sahip olduğu fiziksel ve kimyasal özelliklerinin yanı sıra yaygın kullanımı, bu bileşiiğin çevredeki dağılımının nasıl gerçekleştiğini ve insanların bu bileşiiğe hangi yollarla maruz kaldıkları konusunun tam olarak anlaşılmasını güçleştirmektedir. Kalıcı organik kirleticiler grubunda yer alan PFOA'nın toksik özellikleri ve bozunmaya karşı aşırı dirençli olması, besin zincirinde birikmesi ve insan organizmasındaki uzun yarı ömrü, bu bileşik hakkındaki endişelerin ve buna bağlı olarak araştırmaların da artışına neden olmaktadır (2).

## **2.2. PFOA'nın Kimyasal Yapısı ve Fiziksel Özellikleri**

Perflorooktanoik asit (C8), perflorlu kimyasallar grubuna ait bir perfloroalkil asit (PFAA) olup, kimyasal formülü  $CF_3(CF_2)_6COOH$ 'tır (Şekil 2.1) (1,3). PFAA'lar 4-14 karbonlu bir iskelete ve karboksilat, sülfonat veya fosfonat gibi işlevsel gruplara sahiptir (1). PFOA, sahip olduğu karboksilik asit işlevsel grubu nedeniyle PFAA'ların perflorokarboksilik asitler alt sınıfında yer alır (2).



PFOA gibi perflorlu bileşiklerde bütün hidrojen atomlarının yerini flor atomları almıştır (2).



**Şekil 2.1.** PFOA'nın kimyasal yapısı (2, 54).

PFOA, normal çevresel koşullarda beyaz katı görünümde ve molekül ağırlığı 414,1 olan bir maddedir. PFOA'nın fiziko-kimyasal özellikleri Tablo 2.1'de özetlenmiştir (53, 54, 68).

**Tablo 2.1.** PFOA'nın fizikokimyasal özellikleri (53, 54, 68).

Fizikokimyasal Özellik	Özellik
Formülü	$C_8HF_{15}O_2$
Molekül Ağırlığı	414,1
CAS Numarası	335-67-1
Görünümü	Beyaz-Katı
Erime Noktası	52-54°C
Süblimleşme Noktası	40°C (hafif)
Kaynama Noktası	189°C
pK <sub>a</sub> değeri	-0,5-3,8
Yoğunluk	1,8 g/ml
Buhar basıncı (25°C'de)	4,2 Pa
Çözünürlük (25°C'de, suda)	9,5 g/l

PFOA, sanayide genellikle amonyum tuzu şeklinde (APFO) kullanılır. APFO, çevreye salındığı zaman su varlığında hızlı bir şekilde PFOA anyonuna ( $\text{PFO}^-$ ) ve amonyum iyonuna dönüşür.  $\text{PFO}^-$  de proton alarak PFOA'ya dönüşebilir (68,69). Sulu ortamlarda PFOA ve tuzları çok kolay çözünerek çevrede kalıcı bir bileşik olan  $\text{PFO}^-$ 'yi oluşturur (68). Belirli bir pH değeri için sulu ortamlardaki  $\text{PFO}^-$  ve PFOA'nın oransal dağılımı hakkında pKa değeri önemli bir fikir verir (68). PFOA'nın sudaki çözünürlüğünün çok düşük olması, bileşiğin pKa değerinin kesin olarak hesaplanmasını zorlaştırır (70). Yapılan çeşitli çalışmalarda PFOA için farklı pKa değerleri (-0,5; 1,3; 2,8; 3,4; 3,8) hesaplanmıştır (68, 70, 71).

### 2.3. PFOA'ya Maruziyet Yolları

İnsanların PFOA'ya veya FTOH ve diPAP gibi öncü maddelerine maruziyetinin; mesleki, hava, su, toprak gibi çevresel, içme suyu ve besinlerin tüketilmesi, besin ambalaj malzemelerinden ve pişirme kaplarından geçiş; ev ve ofis gibi kapalı ortam havası ve tozlar ve çeşitli tüketici ürünlerinin (halı, kumaş, koruyucu spreylere, kayakların altına sürülen mumlar gibi) kullanımı yoluyla olabileceği bildirilmiştir (3, 6-8).

PFOA üreten ve emülsiyonlarında PFOA kullanan firmalarda çalışan işçiler için iş yeri ortamı, PFOA için önemli bir maruziyet kaynağıdır. Bu fabrikalarda çalışan işçilerin serum PFOA düzeylerinin, genel toplum serum PFOA düzeylerinden oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (1, 3). İtfaiyecilerin serum PFOA düzeylerinin de genel toplum serum PFOA düzeylerinden daha yüksek olması, itfaiyecilerin yangın söndürücü köpükler aracılığıyla mesleki olarak PFOA'ya daha fazla oranda maruz kaldığını düşündürmektedir (72).

PFOA için önemli bir maruziyet yolu da içme suyu ve gıdalardır (3, 6, 54, 73-79). İçme suyunun, özellikle PFOA üreten tesislere yakın çevrede oturan insanlar için önemli bir maruziyet kaynağı olduğu bildirilmiştir (3, 80). PFOA'nın yeni farkına varılan besin kirleticilerinden birisi olduğu ileri sürülmüştür (74, 75). Yapılan çeşitli çalışmalarda bileşiğin, süt, tereyağı, kırmızı et, balık ve deniz ürünleri, sebze, patates cipsi, pizza, hızlı tüketilen hazır gıdalar, tahıllar, hayvansal yağ, zeytinyağı, meyve suyu, gibi birçok besin

örneğinde saptandığı bildirilmiştir (6, 75, 77, 79, 81, 82). Balık ve deniz ürünlerinin, analiz edilen gıda ürünleri arasında genel olarak en yüksek PFOA düzeyine sahip olduğu belirlenmiştir (74, 75). Avrupa Besin Güvenliği Kurulu (EFSA), 2008 yılında, PFOA için 'kabul edilebilir günlük alım düzeyi'ni 1500 ng/kg/gün olarak belirlemiştir (83). PFOA ile kontamine olmuş hava, su ve yeme maruz kalan hayvan ve bitkiler yoluyla PFOA, besin zincirinin üst basamaklarına iletilir. Özellikle PFOA ile kontamine olmuş su döngüsü, bu bileşiğin besinlere geçişindeki en önemli basamaklardan bir tanesidir (76).

PFOA'ya bir başka maruziyet yolunun da pişirme kaplarından ve besin ambalaj malzemelerinden besinlere migrasyon yoluyla olduğu gösterilmiştir (77, 84-86). PTFE ile kaplı tavalarda kalıntı düzeyinde PFOA bulunduğu ve PTFE kaplı tavaların, normal pişirme sıcaklıklarında (179 ila 233°C'de) etrafa yaydıkları buharın içerisinde gaz halinde PFOA ve FTOH bulunduğu belirlenmiştir (84, 86). Mikrodalga fırında patlamış mısır hazırlanması sırasında da ambalaj kâğıdından mısırlara PFOA geçişi olduğu saptanmıştır (84).

Kumaş, deri, giysi, halı, halı bakım ürünleri, ayakkabı bakım spreyleri, yer cilası, yalıtım bandı ve kayak mumları gibi diğer tüketici ürünlerinin de PFOA için bir başka maruziyet kaynağı olduğu bildirilmiş ve bu ürünler ile yapılan analizler sonucunda ürünlerin PFOA içerdiği ve oral, solunum ve dermal yollarla bu bileşiğe maruz kalılabileceği bildirilmiştir (78, 87, 88).

PFOA'ya bir diğer maruziyet kaynağı da PFOA'ya dönüşebilen öncü maddeler olan (59, 60, 89) ve yağ geçirmez besin ambalaj kâğıtları, kişisel bakım ürünleri ve evsel temizlik ürünlerinde bulunan diPAP'lar (58, 90) ile hava ve tozda bulunan FTOH'lardır (56, 57). Bu öncü bileşiklerin sıçanlara uygulandığında PFOA'ya metabolize olduğu gösterilmiştir (7, 91). Ticari ürünlerde kullanılan floroakrilat polimerlerinin de toprakta biyolojik bozunmaya uğrayarak PFOA oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (89, 92, 93). Bazı kapalı ortamlardaki hava örneklerinde de FTOH'lerin bulunduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (7, 8). Fraser ve ark.'larının (7) yaptığı bir çalışmada, ofis havasındaki FTOH düzeyi ile ofis çalışanlarının serumlarındaki PFOA düzeyleri arasında önemli bir ilişki olduğu saptanmıştır.

Yapılan çalışmalarda gebe kadınların kordon kanında (24, 94), anne plazmasında (25) ve anne sütünde (95-98) PFOA bulunduğu saptanmıştır. Bebeklerin doğum öncesi dönemde (24, 25, 94) ve emzirme dönemlerinde (95, 97-99) PFOA'ya maruz kaldıkları ve anne sütünün, emzirilen bebekler için ana maruziyet yolu olduğu bildirilmiştir (95, 97, 99, 100). Ayrıca bebek mamalarının da, bebekler için bir başka maruziyet yolu olabileceği gösterilmiştir (96). Çocukların, vücut ağırlıklarına oranla daha çok besin tüketmeleri, toza daha çok maruz kalmaları ve evdeki halı ve döşemelerle daha çok temas halinde olmaları ve her şeyi ağızlarına götürme alışkanlıklarının fazla olması gibi nedenlerle, yetişkinlere oranla PFOA'ya daha çok maruz kaldıkları ve bu durumun serum PFOA konsantrasyonlarının artmasına neden olduğu ileri sürülmektedir (3, 8, 78).

#### **2.4. İnsan Serum PFOA Düzeyleri**

İnsan serumunda organik florin ilk kez 1968 yılında Taves tarafından (101) saptanmış olup, 1976 yılında bu bileşiğin PFOA olabileceği belirtilmiştir (2, 5, 69, 102). Günümüzde endüstrileşmiş ülkelerde yaşayan hemen hemen bütün insanların serumunda ng/ml düzeyinde PFOA bulunduğu ve bu değerlerin ortalama 2-8 ng/ml aralığında olduğu bildirilmiştir (49, 103). Yapılan bir çalışmada, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD'de) genel popülasyonda serum medyan PFOA düzeyinin 4 ng/ml olduğu saptanmış (104), 6-11 yaş grubu çocuklarla yapılan bir çalışmada ise ortalama serum PFOA düzeyi yetişkinlerden daha yüksek ve 6,13-7,58 ng/ml aralığında belirlenmiştir (105). 2007-2008 yılları arasında yapılan ABD Ulusal Sağlık ve Beslenme Anket (NHANES) çalışmasında, 12 yaş ve üstü 7876 katılımcının serum PFOA düzeylerinin geometrik ortalaması 4,13 ng/ml olarak hesaplanmış, bu değerlerin erkeklerde 4,80 ng/ml, kadınlarda ise 3,56 ng/ml olduğu bildirilmiştir (106). Mesleki yoldan bu bileşiğe maruz kalan işçiler üzerinde yapılan bir çalışmada ise ortalama serum PFOA konsantrasyonlarının 428-12000 ng/ml aralığında değiştiği bildirilmiştir (49). Amonyum perflorooktanoik asit üretiminde çalışan işçiler üzerinde yapılan bir diğer çalışmada ise, bir işçinin serumunda ölçülen PFOA düzeyinin 114100 ng/ml olduğu saptanmıştır (107).

## 2.5. PFOA'nın Farmakokinetik Özellikleri

PFOA'nın farmakokinetik özelliklerine ilişkin bilgiler daha çok hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilmiştir (108-110). PFOA veya APFO'nun insanlardaki farmakokinetik özellikleri konusunda oldukça az veri bulunmaktadır (22).

### 2.5.1. PFOA'nın Absorpsiyonu

PFOA veya APFO, oral ve solunum yoluyla alındığında iyi derecede, deri yoluyla maruziyette ise belirli bir düzeyde absorbe olur (5). Erkek sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, oral yoldan tek doz olarak verilen, <sup>14</sup>C işaretli PFOA'nın en az % 93'ünün 24 saat içerisinde absorbe olduğu gösterilmiştir (111). Yapılan bir başka çalışmada ise sıçanlara APFO, inhalasyon yoluyla 1, 8, 84 mg/m<sup>3</sup> dozlarda günde 6 saat, haftada 5 gün, iki hafta süreyle uygulanmış ve 84 mg/m<sup>3</sup> dozda APFO uygulanan sıçan kanındaki organik flor düzeyinin 108 ppm olduğu saptanmıştır (110). APFO'nun dermal toksisitesi ile ilgili olarak sıçanlar ve tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada APFO, 20, 200, 2000 mg/kg dozlarda hayvanlara dermal yoldan uygulanmış ve kandaki organik flor düzeyinin doza bağlı olarak artış gösterdiği belirlenmiştir (112).

### 2.5.2. PFOA'nın Dağılımı

PFOA, düşük düzeyde lipofiliktir ve proteinlere bağlanır (113, 114). En yüksek oranda albümine olmak üzere,  $\beta$ -lipoproteinleri ve karaciğerdeki yağ asidi bağlayıcı proteinlere de bağlandığı bildirilmiştir (113, 114). Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar, PFOA'nın en çok karaciğer, plazma ve böbrekte, daha düşük düzeylerde ise diğer dokularda dağıldığını göstermiştir (5, 109). Vanden Heuvel ve ark.'larının (108) PFOA'nın dokulara dağılımını incelemek üzere dişi ve erkek sıçanlar üzerinde yaptığı bir çalışmada, <sup>14</sup>C işaretli PFOA intraperitoneal yoldan hayvanlara uygulanmış ve PFOA dağılımının erkek sıçanlarda en yüksek oranda karaciğerde olduğu ve bunu plazma ve böbreğin izlediği gösterilmiştir. PFOA'nın kalp, testis, yağ dokusu ve gastrocnemius kaslarında ise çok daha düşük konsantrasyonlarda olduğu belirlenmiştir (108). PFOA konsantrasyonunun dişi sıçanlarda ise en yüksek düzeyde plazmada, daha düşük düzeylerde ise böbrek, karaciğer ve yumurtalıklarda ölçüldüğü

bildirilmiştir (5,108). Hundley ve ark.'larının (109) dişi ve erkek fare, sıçan, hamster ve tavşanlar üzerinde yaptığı bir diğer çalışmada, en yüksek PFOA konsantrasyonu, dişi ve erkek fareler ile erkek sıçanların karaciğerlerinde ölçülmüştür. Bu düzeyleri, azalan oranlarda olmak üzere, erkek sıçanlarda böbrekler, kan, akciğerler, kalp, deri ve testisler; dişi ve erkek farelerde ise kan, deri ve böbrekler izlemiştir. Fare ve sıçanlarda, yağ, beyin ve kas dokuları, PFOA'nın en az dağılıma uğradığı dokular olarak belirlenmiştir. Dişi hamsterlarda ise PFOA'nın dağılımı en yüksek oranda kanda ölçülmüş, bunu sırasıyla karaciğer, böbrekler, akciğerler, deri ve kalp izlemiştir. Diğer tür ve cinsiyetlerde ölçülen PFOA değerlerinin ihmal edilebilir düzeylerde olduğu bildirilmiştir (109). Sıçanlara, PFOA'nın gavaj yoluyla 0, 3, 10, 30 mg/kg dozlarda uygulandığı bir başka çalışmada da, PFOA'nın esas olarak serum, karaciğer ve böbrekte dağıldığı gösterilmiştir (115). Sıçanlar üzerinde yapılan bir diğer çalışmada, PFOA'nın doza bağlı olarak saç, serum, karaciğer, böbrek, dalak, akciğer, beyin ve kalpte artış gösterdiği ve özellikle saçın, sıçanlarda PFOA maruziyetinin biyogöstergesi olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (116). Macon ve ark.'larının (117) yapmış olduğu bir çalışmada, gebe fareler tüm gebelik süresince (1-17 gün) 0,3; 1 ve 3 mg/kg dozlarda ve geç gebelik döneminde (10-17 gün) 0,01; 0,1 ve 1 mg/kg dozlarda PFOA'ya maruz bırakılmışlar ve PFOA'nın doğumdan sonraki 7. güne kadar bütün yavru farelerin beyinlerinde bulunduğu saptanmıştır. Sözü edilen çalışmada, yenidoğanların beyninde ölçülebilir düzeylerde PFOA belirlenirken, yavrular 4 haftalık olduktan sonra ise PFOA'nın beyin dokusunda saptanamadığı bildirilmiştir. Bu durum, bileşiğin fetüste kan-beyin engelini geçtiğini ancak, kan-beyin engeli tümüyle işlevsel hale geldiğinde ise bu engeli aşamadığını göstermiştir (118).

İnsanlar üzerinde yapılan kısıtlı sayıdaki çalışmada PFOA'nın, başlıca kan, anne sütü, karaciğer, böbrek, akciğer, seminal plazma, kordon kanı, tiroid bezi ve kemiklere dağıldığı belirtilmiştir (1, 24, 94, 95, 99, 104, 119-122). Maestri ve ark.'larının (119), insanlar üzerinde yaptıkları postmortem analizlerde, PFOA'nın çeşitli dokulardaki (akciğer, böbrek, karaciğer, kan, tiroid, hipofiz, üreme bezleri, yağ doku, pankreas, iskelet kası, beyin ve bazal

gangliyon) dağılımı incelenmiş ve bütün dokularda ortalama 0,3-3,8 ng/g aralığında değişen konsantrasyonlarda PFOA saptanmıştır. Bu çalışmaya göre PFOA'nın en fazla birikim gösterdiği dokular sırasıyla akciğer, böbrek, karaciğer ve kan olurken; en az dağılım gösterdiği yapılar ise iskelet kası, beyin ve bazal gangliyon olarak belirlenmiştir (119). İnsanlar üzerinde yapılan bir başka postmortem analizde, PFOA'nın sırasıyla kemik, akciğer, karaciğer ve böbrekte dağıldığı saptanmıştır (121). Bu dokularda ölçülen ortalama PFOA konsantrasyonları sırasıyla 60,2; 29,2; 13,6 ve 2,0 ng/g'dır (121). İspanya'da, sekiz erkek ve sekiz kadın üzerinde yapılan bir postmortem çalışmada ölçülen karaciğer PFOA düzeylerinin ise, erkeklerde kadınlara oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (sırasıyla, 0,96 ve 0,45 ng/g,  $p < 0,05$ ) (123). Tiroid hastalarından alınan tiroid dokularında PFOA konsantrasyonunun ölçüldüğü bir çalışmada ise, tiroid bezindeki PFOA konsantrasyonu 0,4-4,6 ng/g aralığında bulunmuş, medyan değer ise 2 ng/g olarak hesaplanmıştır (122). İnsan saçındaki PFOA dağılımının incelendiği bir başka çalışmada ise bazı saç örneklerinde 0,4-6,1 ng/g aralığında değişen konsantrasyonlarda PFOA saptanmıştır (124). Ayrıca, insanlar üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda, PFOA'nın amniyotik sıvıda (125), anne ve göbek kordon kanı (24, 94) ile anne sütünde (97, 98) de bulunduğu gösterilmiştir.

### 2.5.3. PFOA'nın Metabolizması

PFOA, kimyasal olarak reaktif bir yapıda değildir ve bu özelliği nedeniyle metabolize olmaz (3,108,126). Vanden Heuvel ve ark.'larının (108) yaptığı ve PFOA'nın sıçanlardaki metabolizmasının incelendiği bir çalışmada bileşik, idrar ve safra örneklerinde sadece ana madde olarak saptanmıştır. Bu çalışmada, sıçanların plazma ve idrar örneklerindeki flor konsantrasyonunun PFOA uygulandıktan sonra da aynı kalması, PFOA'nın deflorinasyona uğramadığını göstermiştir. Yapılan çalışmalarda, PFOA'nın faz II metabolizmasına uğradığını gösteren herhangi bir kanıt da bulunmamıştır (126). Ophaug ve Singer'in (127) sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, PFOA'nın oral yoldan uygulanmasının ardından, serum ve idrardaki iyonik flor düzeylerinin değişmediği saptanmıştır.

#### 2.5.4. PFOA'nın İtrahı

PFOA'nın itrahına ilişkin hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda bileşiğin, idrar ve feçes yoluyla değişmeden atıldığı ve enterohepatik döngüye girdiği bildirilmiştir (5, 109, 128, 129).

PFOA'nın eliminasyon yarılanma ömrü, renal klerans oranlarındaki farklılıklar nedeniyle (3), türler arasında ve bazı türlerde de cinsiyetler arasında büyük değişkenlik göstermektedir (1, 109). Örneğin, dişi farelerde PFOA'nın eliminasyon yarılanma ömrü 2-4 saat, dişi maymun ve erkek köpeklerde 30 gün olarak bildirilmiştir (1, 109). İnsanlarda ise PFOA'nın ortalama yarılanma ömrü kadın ve erkeklerde değişiklik göstermemekte ve mesleki olarak PFOA'ya maruz kalan emekli işçilerde ölçüldüğü gibi 3,8 yıl olarak hesaplanmaktadır (9). Burris ve ark'ları (130) mesleki yoldan PFOA'ya maruz kalan 9 emekli işçide PFOA'nın ortalama serum yarılanma ömrünü 4,37 yıl (1,5-13,49 yıl aralığında) olarak belirlemiştir. PFOA'nın çeşitli tür ve cinsiyetlerdeki yarılanma ömürleri Tablo 2.2'de verilmiştir.

İnsan da dahil, türler ve cinsiyetler arasında PFOA'nın yarılanma ömründe gözlenen farklılıkların nedeni tam olarak belirlenememiştir (1, 3). Yetişkin sıçanlarda PFOA'nın atılımı, dişi ve kısırlaştırılmış erkek sıçanlarda testosteron tarafından azaltılırken (5, 131), erkek sıçanlarda östradiyol tarafından arttırılmaktadır (40). PFOA gibi birçok bileşiğin renal tübüler reabsorbsiyonları organik anyon taşıyıcıları (OAT) tarafından kontrol edilir (132,133). PFOA itrahının cinsiyetler arası değişiklik göstermesinin, böbrekteki organik anyon taşıyıcıların cinsiyetler arasında farklı ifade edilmesine bağlı olduğu ileri sürülmektedir (1, 3). Harada ve ark.'larının (134) yapmış oldukları bir çalışmada, 20-50 yaş aralığındaki erkeklerin serum PFOA düzeylerinin (12,96 ng/ml) aynı yaş grubundaki kadınların serum PFOA düzeylerine (7,89 ng/ml) oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada menstrüasyon döngüsü devam eden kadınların (20-50 yaş) serum PFOA düzeylerinin (7,89 ng/ml), 51 yaşından büyük ve menopaza girmiş kadınların sahip olduğu serum PFOA düzeyinden (12,63 ng/ml) daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada, menstrüel döngü sırasında meydana gelen kanamanın PFOA için bir eliminasyon yolu olabileceği ileri sürülmüştür.



**Tablo 2.2.** PFOA'nın serum/plazma eliminasyon yarı ömürleri (1).

<b>Tür</b>	<b>Dişi</b>	<b>Erkek</b>
<b>Sıçan</b>	2-4 saat	4-6 gün
<b>Fare</b>	17 gün	19 gün
<b>Tavşan</b>	7 saat	5,5 saat
<b>Köpek</b>	8-13 gün	20-30 gün
<b>Maymun</b>	30 gün	21 gün
<b>İnsan</b>	3,8 yıl	3,8 yıl

PFOA'nın izomer kinetiği ile ilgili yapılan kısıtlı sayıda çalışmada, bileşiğin bazı izomerlerinin vücutta daha uzun süre kaldığı belirtilmiştir (135-137). Elektrokimyasal florinasyon yöntemiyle üretilmiş olan ve yaklaşık olarak % 80 oranında düz, % 20 oranında dallanmış zincir izomeri içeren PFOA'nın, sıçanlara subkronik olarak 12 hafta süreyle verilmesinin ardından, dallanmış zincir izomerlerinin düz zincir izomerlerinden daha hızlı itrah edildiği bildirilmiştir (136).

İnsanlar üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda, idrarın PFOA için ana itrah yolu olabileceği belirtilmiştir (124, 134, 138, 139). İnsanların kan ve idrar örneklerinin analiz edildiği bir çalışmada, kandaki PFOA düzeyi ile idrardaki PFOA düzeyinin pozitif ilişkili olduğu, dallanmış PFOA izomerlerinin düz zincir izomerlerinden idrarla daha etkin bir şekilde atıldığı ve idrarın PFOA için ana eliminasyon yolu olduğu belirtilmiştir (139). Yapılan bir başka çalışmada, maruz kalınan günlük toplam PFOA miktarının yetişkinlerde ortalama % 25'inin idrar yoluyla atıldığı, erkeklerde bu oranın % 31, kadınlarda ise % 19 olduğu ve idrarın PFOA için önemli bir itrah yolu olduğu saptanmıştır (138). Bebek sahibi kadınlar üzerinde yapılan bir epidemiyolojik çalışmada (99), annelerin bebeklerini emzirdikleri aylarda serum PFOA konsantrasyonlarının ortalama % 3 azaldığı, çocukların serum PFOA konsantrasyonlarının ise ortalama % 6 arttığı görülmüştür. Bu çalışma ile PFOA için anne sütünün, anneler için bir itrah, bebekler için ise bir maruziyet yolu olduğu gösterilmiştir (99).

## **2.6. PFOA'nın Toksik Etkilerinin Belirlenmesi Amacıyla Yapılan *in Vivo* ve *in Vitro* Çalışmalar**

### **2.6.1. PFOA'nın Akut Toksikite Verileri**

Sıçanlar üzerinde yapılan çeşitli çalışmaların sonucunda PFOA için oral LD<sub>50</sub> değerleri 430 ile 680 mg/kg aralığında saptanmış, yapılan bir diğer çalışmada ise sıçanlar için oral LD<sub>50</sub> değeri 540 mg/kg olarak belirlenmiştir. (69, 114, 140). Glaza ve ark.'ları (141) tarafından sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen akut oral toksisite çalışmasında, PFOA'nın LD<sub>50</sub> değerinin erkek sıçanlarda 500 mg/kg'ın üzerinde, dişi sıçanlarda ise 250 ile 500 mg/kg aralığında olduğu belirlenmiştir (5). PFOA'ya yüksek dozlarda oral yoldan akut maruziyetin, sıçanlarda karaciğer büyümesi, serum enzim düzeylerinde artış, gastrointestinal irritasyon ve kilo kaybına neden olduğu bildirilmiştir (69). Kobaylar için ise PFOA'nın akut oral LD<sub>50</sub> değerinin 178-217 mg/kg aralığında olduğu ve bu hayvanların diğer kemiricilere göre PFOA'ya daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (69).

PFOA'ya solunum yoluyla maruz bırakılan sıçanlarda LC<sub>50</sub> değeri 0,98 mg/l olarak bulunmuştur. Bu çalışmada, PFOA'ya 4 saatin üzerinde inhalasyon yoluyla maruziyetin, sıçanlarda karaciğerde büyüme ve korneda opaklaşmaya neden olduğu belirtilmiştir (110).

Tavşanlar üzerinde yapılan akut dermal toksisite çalışmalarında ise APFO için LD<sub>50</sub> değeri 2000 mg/kg'ın üzerinde bulunmuştur (142).

### **2.6.2. PFOA'nın Subakut ve Subkronik Toksikite Verileri**

PFOA kullanılarak yapılan subakut ve subkronik toksisite çalışmalarında bileşiğin, karaciğerde hipertrofi ve kofullaşma, vücut ağırlığı ile serum kolesterol ve trigliserit düzeylerinde azalma ve ölüm oranında artış gibi etkiler meydana getirdiği bildirilmiştir (114).

Erkek sıçanlar kullanılarak yapılan 90 günlük bir toksisite çalışmasında, sıçanlara oral yoldan 0, 1, 10, 30 ve 100 ppm (yaklaşık olarak 0; 0,05; 0,5; 1,5 ve 5 mg/kg'a eşdeğer dozlar) PFOA uygulanmıştır. Bu deney sonucunda saptanan en belirgin toksisite bulgularının, karaciğer ağırlığındaki değişiklik ile 0,5 mg/kg doz ve üzerinde görülen hepatoselüler hipertrofi olduğu bildirilmiştir. Vücut ağırlığındaki azalmaların 1,5 mg/kg dozdan itibaren görüldüğü ve tüm

toksik etkiler için, ters etki görülmeyen düzeyin (NOAEL) 0,05 mg/kg olduğu bildirilmiştir (143).

Erkek *sinomolgus* maymunları üzerinde yapılan 26 haftalık bir toksisite çalışmasında ise, PFOA oral yoldan 0, 3, 10 ve 30/20 (30 mg/kg düzeydeki doz, 22. günde 20 mg/kg'a indirilmiştir) mg/kg dozlarda hayvanlara uygulanmış ve bu hayvanların çoğunda ağırlık ve iştah kaybı meydana geldiği gözlenmiştir. Ayrıca bütün gruplarda doza bağlı olarak karaciğer ağırlığında artış olduğu gözlenmiş ve bu artış dikkate alınarak ters etki gözlenen en düşük düzey (LOAEL) 3 mg/kg olarak belirlenmiştir (144).

Solunum yoluyla PFOA'ya maruziyet sonucunda meydana gelen toksisitenin değerlendirildiği 10 günlük subkronik bir çalışmada ise, PFOA'nın 84 mg/m<sup>3</sup> dozda sıçanlarda ağırlık kaybına, karaciğer ağırlığında ve serum enzimlerinde artışa, hepatoselüler hipertrofiye ve nekroza neden olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada NOAEL değeri 1 mg/m<sup>3</sup> olarak belirlenmiştir (110).

*Rhesus* maymunları ile yapılan 90 günlük bir toksisite çalışmasında ise, PFOA oral yoldan hayvanlara 0, 3, 10, 30 ve 100 mg/kg dozlarda uygulanmıştır (145). Bu çalışmada, birinci haftanın sonunda PFOA'nın 30 ve 100 mg/kg doz aralığında, hayvanlarda kilo kaybına neden olduğu bildirilmiştir. 100 mg/kg dozda PFOA uygulanan hayvanların tümü, 30 mg/kg doz verilen hayvanların ise 3 tanesinin çalışma süresi içerisinde öldüğü bildirilmiştir. 30 mg/kg dozda PFOA uygulanan grupta, hayatta kalan erkek maymunlarda, eritrosit, hemoglobin ve hematokrit düzeylerinde azalma; trombosit düzeyinde ise artış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu maymunlarda serum kolesterol düzeyleri yükselirken, toplam protein ve albümin düzeylerinde azalma olduğu bildirilmiştir (145).

### **2.6.3. PFOA'nın Kronik Toksisitesi ve Kanser Oluşumu Üzerindeki Etkileri**

PFOA'ya kronik olarak (2 yıl) maruz bırakılan hayvanlarda bileşiğin, "tümör üçlemesi" olarak nitelendirilen karaciğer, Leydig ve pankreatik asinar hücre tümörü oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (146-148).

PFOA'nın karsinogenik etkilerinin araştırılması amacıyla yapılan ve iki yıl süren bir çalışmada, erkek sıçanlara 300 ppm dozunda PFOA oral yoldan

uygulanmıştır (146). Bu çalışmanın sonucunda PFOA'nın, sıçanlarda karaciğer, testiküler Leydig ve pankreatik asinar hücre tümörü oluşumunu arttırdığı belirlenmiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarda ayrıca, PFOA'nın dietilnitrozamin tarafından indüklenen karaciğer tümör oluşumuna katkıda bulunduğu da gösterilmiştir (149,150).

PFOA, ABD Çevre Koruma Ajansı (USEPA) tarafından 2006 yılında muhtemel karsinojen olarak sınıflandırılmıştır (151). Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu (*International Agency of Research on Cancer, IARC*) ise 2008 yılında öncelikli olarak incelenmesi gereken maddeler listesine aldığı PFOA'ya, 2014 yılında Grup 2B (insanda muhtemel karsinojen) olarak sınıflandırmıştır (152).

#### **2.6.4. PFOA'nın Karaciğer Üzerindeki Toksik Etkileri**

Maymun ve sıçanlarda PFOA için başlıca hedef organ karaciğerdir (112, 144). PFOA'nın karaciğer hücreleri üzerindeki toksik etkileri, çeşitli *in vitro* (43, 44, 46, 50-52, 153, 154) ve *in vivo* (11, 137, 144, 146, 155-158) çalışmalar ile gösterilmiştir. PFOA'ya verilen başlıca hepatoselüler yanıtların, karaciğer ağırlığında artış, hepatoselüler hipertrofi, alanin amino transferaz (ALT) ve aspartat amino transferaz (AST) enzim düzeylerinde artış ve nekroz olduğu bildirilmiştir (11, 137, 144, 157-159). 2.6.3. numaralı bölümde belirtildiği üzere yapılan çalışmalarda, PFOA'ya kronik maruziyetin (2 yıl) sıçanlarda karaciğerde tümör oluşumuna neden olduğu veya PFOA'nın karaciğer tümörü oluşumuna neden olan bir kimyasal maddeyle birlikte verilmesi durumunda, karaciğerde tümör görülme sıklığını arttırdığı gösterilmiştir (146, 149, 150).

#### **2.6.5. PFOA'nın İmmün Sistem Üzerindeki Toksik Etkileri**

PFOA'nın immün sistem üzerindeki toksik etkilerinin incelendiği birçok *in vivo*, *ex vivo* ve *in vitro* çalışma bulunmaktadır (160-167). Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, PFOA'nın immün sistemi baskıladığı, dalak ve timusta atrofiye neden olduğu ve bu organlarda bulunan hücre sayıları ve lenfosit popülasyonunda azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (165-167).

PFOA'nın immün baskılayıcı özelliği, Yang ve ark.'larının (165) gerçekleştirdiği *in vivo* ve *ex vivo* araştırmalarda gösterilmiştir. Bu

çalışmalarda, PFOA uygulamasının farelerde, atların kırmızı kan hücreleriyle oluşturulan immünizasyona karşı antikor aracılıklı immün yanıtı önlediği; *ex vivo* sistemde ise T ve B hücrelerinin aktivasyonuna yanıt olarak gözlenen dalak hücre proliferasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Yang ve ark.'larının (166) yaptığı bir başka çalışmada, PPAR- $\alpha$ 'ya sahip olan ve olmayan iki fare türü üzerinde PFOA'nın immünotoksik etkileri incelenmiş ve PPAR- $\alpha$ 'ya sahip olan farelerde, dalak ve timusta ağırlık ve hücre sayısı azalması şeklinde gözlenen yanıtın, PPAR- $\alpha$ 'ya sahip olmayan farelerde meydana gelmediği belirlenmiştir. Bu çalışmada, PFOA'nın immün sistem üzerindeki etkisinden PPAR- $\alpha$ 'nın sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür. Ancak, dişi fareler üzerinde yapılan bir başka araştırmada, PFOA'nın T-hücre bağımlı antikor yanıtı baskıladığı saptanmış ve bu etkinin PPAR- $\alpha$  etki mekanizmasından bağımsız olduğu gösterilmiştir (162). PFOA'nın immün sisteme olan etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise bileşiğin, farelerde akyuvar, lenfosit ve nötrofil sayısı ile kemik iliğindeki makrofaj sayısında azalmaya yol açtığı ve bu etkinin PFOA'nın neden olduğu yem tüketimindeki azalma ile ilgili olabileceği bildirilmiştir (163).

PFOA'nın immün sistem üzerine olan etkilerinin araştırıldığı çeşitli *in vitro* çalışmalar da bulunmaktadır (160,161,164). Bu konuda yapılan bir araştırmada, PFOA'nın histamin salınımını ve proenflamatuar sitokinlerin gen ifadelerini arttırarak mast hücre aracılıklı allerjik enflamasyonu indüklediği bildirilmiştir (164). PFOA'nın ayrıca insan lökosit kültürlerinden sitokin salınmasını baskıladığı ve bunun PPAR- $\alpha$  aktivasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (161). Bir başka *in vitro* çalışmada ise PFOA'nın doğal öldürücü hücrelerde sitotoksik etki meydana getirdiği ve uyarılan makrofajlardan proenflamatuar sitokin salınımına neden olduğu bildirilmiştir (160).

#### **2.6.6. PFOA'nın Üreme Sistemi ve Gelişimsel Sistem Üzerindeki Toksik Etkileri**

Fare ve sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, gebelik döneminde PFOA'ya maruziyetin annelerde, karaciğer ağırlığında artış, fetüs resorpsiyonu, doğumun gecikmesi, doğum sonrası yavrunun hayatta kalma oranları ve gelişmesinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. PFOA'ya maruz bırakılan annelerin yavrularında ise kemik oluşumunda ve göz açma

zamanında gecikme, meme bezi gelişiminin etkilenmesi, erkek yavrularda erken, dişilerde ise gecikmiş cinsel olgunluk gibi etkilere yol açtığı bildirilmiştir (14, 117, 168-172).

Butenhoff ve ark.'larının (168) yaptıkları bir çalışmada, ebeveyn sıçanlar ve takip eden iki nesil, oral yoldan 1, 3, 10 ve 30 mg/kg dozda PFOA'ya maruz bırakılmıştır. Ebeveyn ve birinci nesil erkek sıçanlarda, PFOA'nın, uygulanan tüm dozlarında hayvanların vücut ağırlığında azalma, karaciğer ve böbrek ağırlıklarında artış olduğu bildirilmiştir. Aynı nesil yavrularda 30 mg/kg dozda, doğum ağırlığında azalma meydana geldiği ve muhtemelen bunun sonucu olarak, hayatta kalma oranında azalma olduğu belirlenmiştir. İkinci nesil yavrularda ise 30 mg/kg dozda, ağırlık azalması görülmekle birlikte hayatta kalma oranında herhangi bir azalma gözlenmemiştir. Ebeveyn ve birinci nesil yavru sıçanlarda üreme fonksiyonları için NOAEL değeri 30 mg/kg, birinci nesil yavrularda hayatta kalma, doğum ağırlığı ve cinsel olgunluk için NOAEL değeri 10 mg/kg, birinci nesil erkek yavrularda vücut ağırlığı ve organ ağırlığı değişimleri için NOAEL değeri ise < 1 mg/kg olarak saptanmıştır (168).

Fareler üzerinde yapılan bir diğer çalışmada ise, gebe farelere oral yoldan gebeliğin 1. ve 17. günleri arasında, 1, 3, 5, 10, 20 ve 40 mg/kg dozda PFOA uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, fetüs resorpsiyonunda doza bağlı olarak artış, anne karaciğerlerinde büyüme ve anne ağırlık artışında azalma ile yavrularda doğum sonrasında hayatta kalma oranında azalma ve gelişme geriliği, yavrularda göz açma zamanında gecikme ve erkek yavrularda cinsel olgunluğa erken erişme gibi belirtiler olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada, PFOA'nın gelişimsel ve fetal toksisitesi için LOAEL değeri 1 mg/kg/gün olarak belirlenirken, NOAEL değeri saptanamamıştır (14).

PFOA'ya gebelik süresince veya yavruların sütten kesilmesini izleyen dönemde düşük bir dozda maruziyetin de farelerde istenmeyen etkilere yol açtığı bildirilmiştir (169, 170). Örneğin, gebelik döneminde 0,01 mg/kg dozda PFOA'ya maruz bırakılan farelerin dişi yavruları erişkinliğe ulaştıklarında bu hayvanlarda obezite gözlenmesinin yanı sıra insülin ve leptin gibi metabolik hormonların düzeylerinde de artış meydana geldiği bildirilmiştir (170). Olgunluğa erişmemiş dişi farelerin doğumlarını izleyen 18. ve 20. günler

arasında, 0,01 mg/kg dozda PFOA'ya maruz bırakıldıkları bir başka çalışmada ise, PFOA'nın üreme sisteminde (rahim, vajina ve serviks) histopatolojik değişimlere ve rahim ağırlığında artışa neden olduğu bildirilmiştir (169).

Gelişmekte olan meme bezinin PFOA maruziyetine en hassas organlardan bir tanesi olduğu bildirilmiştir (117, 171, 173-175). Tüm gebelik boyunca (0,3-3 mg/kg doz aralığında) ve geç gebelik döneminde (0,01-1 mg/kg doz aralığında) PFOA'ya maruziyetin farelerdeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, PFOA'nın tüm dozlarında yavru memelerindeki epitel büyümenin ve bitiş ucu (terminal) tomurcuk (*endpoint bud*) sayısının azaldığı belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda meme bezlerinin, karaciğer ağırlığını etkileyen PFOA dozlarından daha düşük doz düzeylerinde etkilendiği bildirilmiştir (117). CD-1 farelerinde PFOA maruziyetinin 2 nesil boyunca incelendiği bir başka çalışmada, anne farelere 1 ve 5 mg/kg dozlarda PFOA oral yol, yavrulara ise 5 ppb konsantrasyonda PFOA içme suyu yolu ile uygulanmıştır. Sonuç olarak PFOA'nın, hem birinci hem de ikinci nesil farelerin meme bezi gelişimlerinde gecikme ve meme bezi morfolojisinde değişiklikler meydana getirdiği saptanmıştır (171).

Yang ve ark.'larının (176) erken ergenlik dönemindeki (doğumdan sonra 21-50 gün süresince) C57Bl/6 ve Balb/c fare türlerinde PFOA'nın etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, C57Bl/6 türünde meme bezi ve rahim gelişimlerinin PFOA'nın düşük dozlarında (5 mg/kg) arttığı, yüksek dozlarında ise (10 mg/kg) azaldığı gösterilmiştir. Balb/c türünde ise bütün PFOA dozlarında meme bezi ve rahim gelişiminin azaldığı belirlenmiştir. PFOA'nın ayrıca her iki türde de bütün dozlarda vajinal açıklığın oluşumunda gecikmeye neden olduğu belirtilmiştir.

PFOA'nın gelişimsel toksisite mekanizmasında PPAR- $\alpha$ 'nın rolünün araştırıldığı bir çalışmada, PPAR- $\alpha$ 'ya sahip olan (*yabanıl tip*) ve PPAR- $\alpha$ 'ya sahip olmayan (*mutant tip*) fareler kullanılmıştır (177). Bu çalışmada PFOA, farelere 0,1-20 mg/kg doz aralığında oral yoldan, gebeliğin 1-17. günleri arasında uygulanmıştır. 5 mg/kg dozda PFOA uygulanan yabanıl ve mutant tip farelerde fetüs resorpsiyonunda artış görülürken, sadece yabanıl tip farelerde yeni doğan hayatta kalma oranında azalma (0,6 mg/kg dozda PFOA ile), göz

açma zamanında gecikme (1 mg/kg dozda PFOA ile) ve yavru ağırlığında azalmaya eğilim olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, erken gebelik döneminde fetüs kaybının PPAR- $\alpha$ 'dan bağımsız olduğu; göz açma zamanındaki gecikme ile yavru ağırlığındaki azalmanın ve doğum sonrası ölüm oranındaki artışın ise PPAR- $\alpha$ 'ya bağımlı olarak PFOA tarafından indüklendiği gösterilmiştir (177). Yapılan bir başka çalışmada ise gebeliğin 1-17. günlerinde anne fareye oral yoldan uygulanan PFOA'nın, yavru farelerin akciğer ve karaciğerlerinde yağ asidi katabolizmasından sorumlu gen ifadelerinde değişikliğe neden olduğu ve PFOA'nın PPAR- $\alpha$  aktivasyonu yoluyla bu etkileri gösterdiği saptanmıştır (178). Abbott ve ark.'larının yaptıkları bir diğer çalışmada (179), CD-1 farelerinin gebeliğin 1-17. günlerinde PFOA'ya maruziyetinin, lipid ve glukoz homeostazının kontrolü ile ilgili gen ifadelerini etkilediği, yeni doğanların hayatta kalma oranını azalttığı ve yavrularda kalıcı ağırlık azalmasına neden olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, PFOA maruziyetinin, PPAR'lar ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), CAR ve PXR tarafından düzenlenen genleri indüklediği saptanmıştır. Sonuçta, yağ asidi biyosentezi, metabolizması ve  $\beta$ -oksidasyonu ile glukoz metabolizmasında önemli rolü olan genlerin etkilenmesinin, yeni doğanın hayatta kalma oranında azalmaya ve yeni doğan gelişiminin olumsuz etkilenmesine yol açabileceği ileri sürülmüştür (179).

Ergenliğin erken dönemlerinde PFOA'nın etkilerinin incelendiği bir çalışmada, PFOA'nın farelerde vajinal açıklığın oluşumunda gecikmeye neden olduğu veya bu oluşumu tamamen engellediği, östrus döngüsünü inhibe ettiği, yumurtalık steroid hormonal sentetik enzim düzeylerini ve östrojen ile progesteronun indüklediği meme büyüme faktörlerinin ifadesinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (180). Bu çalışmanın sonucunda PFOA'nın, yumurtalıkları etkileyerek -muhtemelen progesteron ve östrojen üretimini azaltarak-, meme bezi gelişimini inhibe ettiği ve bu olayın PPAR- $\alpha$  gen ifadesi aracılıklı bir mekanizmayla olduğu belirtilmiştir (180). Tüm gebelik süresince ve emzirme dönemleri boyunca (gebeliğin 2. günü, 12 haftalık sürede) annelere, sütten kesildikten sonraki dönemi takiben 12 haftalık oluncaya kadar ise yavrulara, 4 mg/kg dozda PFOA'nın oral yoldan uygulandığı bir çalışmada



bileşiğın, yavruların solunum yollarında aşırı hassasiyete ve akciğer makrofaj sayılarında aşırı artışa neden olduğu bildirilmiştir (181).

PFOA'nın erkek üreme sistemi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise erkek farelere oral yoldan 0,31; 1,25; 5 ve 20 mg/kg dozlarda PFOA, 28 gün süreyle uygulanmıştır. Bu çalışmada, PFOA'nın farelerin testislerinde testosteron ve progesteron düzeylerini düşürdüğu, seminifer tübüllere hasar verdiği ve sperm kalitesini azalttığı gösterilmiştir (182). Yapılan bir başka çalışmada ise erkek fareler 28 gün süreyle 1,25; 5 ve 20 mg/kg dozlarda PFOA'ya maruz bırakılmış ve bu farelerden sertoli hücreleri izole edilmiştir. Bu hücreler daha sonra 24 saat süreyle 300, 400 ve 500 µM konsantrasyonlarda PFOA ile inkübe edilmiş ve sonuçta bileşiğın kan-testis engelinde hasara yol açtığı ve bu hasarın erkek üreme sisteminde bozukluklara neden olabileceği belirtilmiştir (183). Erkek sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, sıçanlar 10 gün süreyle % 0,05 PFOA içeren yem ile beslenmiş ve PFOA maruziyetinin sıçan testislerinde glutatyon transferaz, glutatyon peroksidaz, fenol sülfotransferaz, fenol üridin difosfat glukronizil transferaz, katalaz, NADPH kinon oksiredüktaz ve epoksit hidrolaz gibi faz II ksenobiyotik metabolize edici enzim düzeylerini etkilediği gösterilmiştir (184).

### **2.6.7. PFOA'nın Sinir Sistemi Üzerindeki Toksik Etkileri**

PFOA maruziyetinin sinir sistemine etkilerinin araştırıldığı çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar bulunmaktadır (13, 45, 185-187).

Bu konuda Siblinski ve ark.'larının (148) yaptıkları bir çalışmada, 2 yıl süreyle PFOA uygulanan dişi sıçanlarda, doza bağımlı olarak koordinasyon kaybı ile karakterize ataksi oluşumunda artış olduğu gözlenmiştir. Doğum öncesi PFOA maruziyetinin de erkek ve dişi yavru farelerde çeşitli davranışsal değişikliklere yol açtığı belirtilmiştir (188). Bir diğer çalışmada, 10 günlük farelere PFOA (1, 4 ve 21 µmol/kg), oral yoldan uygulanmış ve fareler 2. ve 4. aya eriştiklerinde spontan (kendiliğinden gelişen) davranış ve alışkanlıklardaki değişiklikler izlenmiştir (185). Bu çalışmanın sonucunda, PFOA'nın, farelerde alışkanlıkların azalması/kaybolması ve hiperaktivite ile kendini gösteren spontan davranış bozukluğuna neden olduğu ve bu etkinin ilerleyen yaşlarda daha da olumsuz yönde geliştii belirlenmiş, doğumdan

hemen sonra gerçekleşen PFOA maruziyetinin ise kolinerjik sistemi etkilediği belirtilmiştir (185). Aynı araştırmacılar tarafından yapılan bir başka çalışmada, 10 günlük farelere oral yoldan tek doz uygulanan 21 µmol/kg konsantrasyonda PFOA'nın normal beyin gelişimi için gerekli olan 4 proteinin (kalsiyum/kalmodülün bağımlı protein kinaz II (CaMKII), büyüme ilişkili protein-43 (GAP-43), sinaptofizin ve tau) miktarını arttırdığı saptanmıştır (13). Bu proteinlerin düzeyinin beynin kritik bir gelişme evresinde değişmesinin, bir önceki çalışmada gözlenen davranış bozukluklarının altında yatan mekanizma olabileceği ileri sürülmüştür (13). Döllenen tavuk yumurtalarına inkübasyonlarının ilk günü 5 ve 10 mg/kg dozlarda PFOA'nın enjekte edildiği bir çalışmada, PFOA'nın, civcivlerin yumurtadan çıktıkları ilk günden başlayarak kendi ortamlarını tanıma gibi içgüdüsel davranışlarında bozukluğa neden olduğu saptanmıştır (189).

PFOA'nın nörolojik sistem üzerine olan etkilerinin incelendiği *in vitro* çalışmalar da bulunmaktadır (45,187). Altı-sekiz günlük sıçanlardan izole edilen serebellar granül hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, 12-100 µM konsantrasyonda 15 dakika PFOA maruziyetinin reaktif oksijen türlerinde artışa ve bileşiğin 25 µM konsantrasyonda 24 saat maruziyetinin ise hücre canlılığında azalmaya yol açtığı saptanmıştır (45). PFOA'nın gelişimsel nörotoksositeye olan etkisinin incelendiği bir başka *in vitro* çalışmada ise, sinir hücresi özelliği taşıyan (nörotipik) PC-12 hücrelerinin 100 ve 250 µM konsantrasyonlarda PFOA ile 24 saat süreyle inkübasyonun hücre canlılığında azalmaya, 10 µM konsantrasyonda PFOA ile 24 saat ve 4 gün süreyle inkübasyonunun MDA düzeyinde artışa ve 250 µM konsantrasyonda PFOA ile 6 gün süreyle inkübasyonunun ise DNA sentezinin inhibisyonuna neden olduğu bildirilmiştir (187).

#### **2.6.8. PFOA'nın Endokrin Bozucu Etkileri**

Endokrin bozucu kimyasallar sınıfında yer alan PFOA'nın, endokrin sistem üzerindeki etkileri yapılan çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir (15, 170, 180, 190-194).

CD-1 farelerinde doğum öncesi ve yetişkinlik dönemlerinde PFOA'nın etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 0,01-0,3 mg/kg doz aralığında doğum

öncesi PFOA maruziyetinin, yetişkinlikte serum insülin ve leptin düzeylerini arttırdığı belirlenmiştir (170).

Yapılan çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda PFOA'nın steroidojenezi etkilediği de bildirilmiştir (180, 191-194). Sıçan testiküler mikrozomları kullanılarak yapılan *in vitro* bir çalışmada, PFOA'nın 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrojenazı ve 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrojenaz-3'ü inhibe ederek testesteron üretimini azalttığı gösterilmiştir (193). Bir başka çalışmada ise, besin ambalajlarında kullanılan florokimyasalların, insan adrenal kortiko kanser hücrelerinde androjen düzeylerinde azalmaya, östrojen düzeylerinde artışa neden olarak steroidojenezi etkilediği saptanmıştır (192).

### 2.6.9. PFOA'nın Lipid Metabolizması Üzerine Etkileri

PFOA gibi PPAR- $\alpha$  aktivatörlerinin kemiricilerde kolesterol ve lipid düzeylerinde azalmaya neden olduğu bilinmektedir (3). PFOA'nın kemiricilerde serum lipid değerlerini düşürdüğü (137, 195) ve bu etkisinin, karaciğerde kolesterol sentezinin ve esterifikasyonunun azalması ve yağ asidi oksidasyonunun artması sonucu oluşabileceği belirtilmiştir (196). Ayrıca farelere PFOA'nın 7 gün süreyle 1,25; 2,5; 5 ve 10 mg/kg dozlarda intraperitoneal yoldan uygulanmasının, hayvanların karaciğerinde trigliserit, fosfolipid ve kolesterol düzeylerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (197). Bir hafta süresince % 0,01 oranında PFOA içeren yem ile beslenen sıçanlarda PFOA uygulamasının, trigliserit sentezinde görev alan enzimlerin düzeylerini arttırarak karaciğerdeki trigliserit düzeyini yükseltmiş olabileceği de ileri sürülmektedir (198). Fare adiposit hücreleri kullanılarak yapılan bir *in vitro* çalışmada ise PFOA'nın, bu hücrelerdeki adiposit farklılaşması ve trigliserit birikiminin yanı sıra adiposit farklılaşması ile ilgili mRNA düzeylerini arttırdığı belirlenmiş ve bileşiğin bu etkilere, PPAR- $\gamma$ 'yı aktive ederek neden olduğu ileri sürülmüştür (66). Aynı hücreler kullanılarak yapılan bir başka çalışmada da, hücreler 5-100  $\mu$ M PFOA ile 16 gün inkübe edilmiş, bileşiğin toplam gliserid düzeylerini arttırdığı, adiposit farklılaşması ve lipid metabolizmasından sorumlu olan gen ifadelerinde değişikliğe yol açtığı gösterilmiştir (199). Yüksek doz PFOA'ya akut maruziyetin serum kolesterol düzeylerine olan etkisinin araştırıldığı ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, serum PFOA

konsantrasyonu ile serum kolesterol düzeyinin ters orantılı olduğu, fakat bu sonuçların insan verileriyle uyum sağlamadığı belirtilmiştir (15).

## 2.7. PFOA'nın Olası Toksik Etki Mekanizmaları

Perflorooktanoik asitin toksik etki mekanizması henüz kesin olarak aydınlatılamamıştır (3). En çok araştırılan ve üzerinde durulan mekanizmalar, PFOA'nın peroksizom proliferatör aktive edici reseptör- $\alpha$ , konstitütif androstan alması, pregnan-X reseptör gibi nükleer almaçları aktive edici etkileriyle ilişkilidir (29). PFOA'nın, yapısal olarak serbest yağ asitlerine benzemesi nedeniyle nükleer almaçları aktive ettiği, taşıyıcı proteinlere bağlandığı ve hücre zarlarıyla etkileşime girdiği ileri sürülmüştür (3).

PFOA'nın karaciğer toksisitesini, PPAR- $\alpha$  yolağını aktive ederek meydana getirdiği bilinmektedir (1, 10, 29, 147, 179). PFOA, PPAR- $\alpha$  reseptörünü aktive ederek karaciğerde hücre büyümesinden sorumlu gen ifadesini indükler. Bu olayın sonucunda hepatosit proliferasyonu ve özellikle preneoplastik hepatik hücrelerin seçici klonal genişlemesine bağlı olarak hepatik neoplazma meydana gelir (10). PFOA'nın karaciğerdeki tümör oluşturuucu toksik etki mekanizmasının, aşağıda belirtilen nedenlere bağlı olarak insanlarda geçerli olamayacağı ileri sürülmektedir: 1) Rodentlerle karşılaştırıldığında insan karaciğerinde bulunan PPAR- $\alpha$  mRNA düzeyinin yaklaşık olarak 10 kez daha düşük olması, 2) İnsan PPAR- $\alpha$  almasıyla karşılaştırıldığında, PFOA'nın fare PPAR- $\alpha$  almasını çok daha yüksek oranda aktive etmesi, 3) PFOA ile beslenen *sinomolgus* maymunlarında hepatik hücre proliferasyonunun gözlenmemesi. Ayrıca, insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda karaciğer neoplazmalarının gözlenmemesi gibi veriler de PFOA'nın insanlarda hepatokarsinojenik bir yanıt meydana getirmesinin beklenmemesini destekler niteliktedir (10, 144, 200-202). ABD Çevre Koruma Ajansı Bilimsel Tavsiye Kurulu da 2006 yılında hazırladığı raporunda, PFOA'nın karaciğer tümörü oluşturmada PPAR- $\alpha$ 'yı aktive edici etkisinden farklı etki mekanizmalarının da sorumlu olabileceğini bildirmiştir (3, 203).

PFOA'nın hayvanlarda oluşturduğu testis ve pankreas tümörlerinin altında yatan mekanizmaların da PPAR- $\alpha$  aktivasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (10). PFOA'nın PPAR- $\alpha$  aracılıklı Leydig hücre tümör oluşumu

indükleyici etkisinden sorumlu, olası iki etki mekanizması olabileceği ileri sürülmüş ve bu mekanizmalarının da PFOA'nın steroidojenezde değişiklik oluşturmasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (204). İleri sürülen ilk mekanizma, karaciğerdeki sitokrom P450 19A1 (SİT P450 19A1) enziminin PFOA tarafından indüklenmesi sonucu östradiyol düzeylerinin artmasını ve buna bağlı olarak Leydig hücre proliferasyonuna neden olan tümör büyüme faktörü alfa düzeyindeki artış ile ilişkilidir. İleri sürülen ikinci mekanizma ise, periferik benzodiazepin reseptörünün ve/veya C-17,20 liyaz enziminin PFOA tarafından inhibe edilmesi sonucu testosteron düzeylerinin azalmasını ve buna bağlı olarak dolaşımdaki lüteinleştirici hormon düzeylerinin artması ve Leydig hücre proliferasyonunun uyarılması ile ilişkilendirilmiştir (204). Sıçanlar için geçerli olan PFOA'nın Leydig hücre tümör oluşumundaki etki mekanizmasının insanlar için geçerli olup olmadığı bilinmemektedir (10). PFOA'ya maruziyet sonucu meydana geldiği ileri sürülen üçüncü tümör çeşidi olan pankreatik asinar hücre tümörü oluşumu için ileri sürülen etki mekanizması ise, karaciğerde PPAR- $\alpha$ 'nın aktive edilmesine bağlı olarak safra asidi akışında azalma ve safra asidi bileşimininde değişiklik meydana gelmesi sonucu kolestaz oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. Kolestaz oluşumunun da kolesistokinin düzeylerini arttırarak pankreatik hücre proliferasyonuna ve sonuçta tümör oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (10). Bununla beraber, sözü edilen bu mekanizmanın da sıçanlara özgü olduğu ve insanlara uyarlanabilmesinin pek olası olmadığı ileri sürülmektedir. Bu mekanizmanın sıçanlar için de geçerliliğinin kanıtlanması için daha fazla çalışmaya gerek bulunduğu bildirilmektedir (204).

PFOA'nın PPAR- $\alpha$ 'yı aktive edici etkisinden farklı bir mekanizmayla da karaciğer toksisitesi oluşturduğuna ilişkin çalışmalar bulunmaktadır (155, 156, 205, 206). Bu çalışmalarda, PFOA'nın PPAR- $\alpha$ 'ya sahip olan ve olmayan iki farklı fare türünde de hepatotoksik olduğu gösterilmiştir (37, 156, 207). PFOA'nın PPAR- $\alpha$ 'ya sahip olmayan farelerde hepatomegali oluşturucu etkisinin, CAR'yi aktive etmesi sonucu düz endoplazmik retikulumda büyümeye neden olmasının yanı sıra peroksizomların sayısında artışa bağlı olabileceği de bildirilmiştir (204). Elcombe ve ark.'ları (29) tarafından yapılan

bir başka çalışmada da PFOA'nın, karma fonksiyonlu enzimleri indükleyici özelliği olduğu ve nükleer hormon almaç ailesinden, özellikle PPAR- $\alpha$ , CAR ve PXR'ı aktive etmesi sonucu hepatomegaliye ve sonrasında karaciğer tümörüne yol açtığı ileri sürülmüştür.

PFOA'nın östrojen benzeri etki göstermesi ve östrojen düzeylerini arttırması da ileri sürülen olası toksik etki mekanizmaları arasında yer almaktadır (146, 206, 208-210). Buhrke ve ark'larının (206) insan primer hepatosit hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada, PFOA'nın östrojen reseptör- $\alpha$ 'yı etkilediği gösterilmiştir. Biegel ve ark.'ları (146) 2 yıl süreyle oral yoldan 300 ppm PFOA uygulamasının erkek sıçanlarda östradiyol düzeylerini yükselttiğini; Wei ve ark.'ları ise (210) 14 ve 28 gün süreyle 3, 10 ve 30 mg/l konsantrasyonda PFOA maruziyetinin erkek golyan balıklarında (*Gobiocypris rarus*) östrojen benzeri etki yaptığını belirtmişlerdir. Alabalıklar üzerinde yapılan bir çalışmada da, PFOA'nın, 30 hafta süreyle 200-1800 ppm konsantasyonda verilmesinin ardından gözlenen karaciğer tümör oluşumunu, östrojenik mekanizmalarla indüklediği bildirilmiştir (209).

PFOA'nın toksik etkilerinin altında yatan bir diğer mekanizmanın da oksidatif stres ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (32, 34, 39, 44). Peroksisom proliferatörlerinin sıçan ve farelere uygulandığında açıl-KoA oksidaz aktivitesini artırarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretilmesine ve sonuçta oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir (31). Sıçanlar (32, 33, 39), fareler (34, 35, 37, 38) ve balıklar (40, 41) üzerinde yapılan sınırlı sayıda çalışmada PFOA'nın, oksidan ve antioksidan göstergelerde değişikliğe yol açtığı bildirilmiştir. Yapılan çeşitli *in vitro* çalışmalarda da PFOA'nın hücrelerde reaktif oksijen bileşiklerini arttırarak oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir (42-46).

PFOA'nın toksik etki mekanizmasında mutajenitenin rolünü inceleyen çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır (51, 153, 211). Bileşiğin toksik etkisini DNA hasarına yol açarak meydana getirdiğini gösteren çalışmaların yanı sıra (51, 211, 212), PFOA'nın DNA reaktif bir bileşik olmaması nedeniyle, sıçanlardaki tümör oluşumunu genotoksik olmayan mekanizmalarla indüklediğini gösteren sonuçlar da bulunmaktadır (10, 153).

PFOA'nın bir diğer toksik etki mekanizmasının da, hücreler arası kavşak boşluğundaki iletişimini (GJIC) inhibe etmesi sonucu gerçekleştiği ileri sürülmüştür (213). GJIC çok hücreli organizmaların normal büyümesi, gelişmesi, farklılaşması ve homeostazın sürdürülebilirliği için büyük önem taşımaktadır. Ancak GJIC'nin PFOA tarafından inhibe edilmesinin PFOA'nın karsinojenik etki mekanizmasıyla nasıl bir bağlantısı olduğu tam olarak anlaşılamamıştır (10).

Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda PFOA'nın toksik etkisini mitokondriyi etkileyerek de meydana getirebileceği bildirilmiştir (44, 214-216). Örneğin, PFOA'nın HepG2 hücrelerinde reaktif oksijen bileşiklerini arttırdığı ve kaspaz-9'u aktive ederek apoptoza neden olduğu gösterilmiş (44) ve ROB düzeylerindeki artışın, mitokondriyal membranlardaki bozulmaya bağlı olabileceği belirtilmiştir (44). Diğer taraftan, PFOA'nın diğer peroksizom proliferatörleri gibi mitokondriyal oksidatif fosforilasyonda kenetsizleyici ajan olarak işlev gördüğü de çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (215, 216) . PFOA'nın sıçan karaciğer mitokondrisi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, yüksek konsantrasyonda PFOA (100 µM) maruziyetinin dinlenme solunum hızında düşük düzeyde bir artışa, mitokondriyal membran potansiyelinde ise düşük düzeyde bir azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Bu etkilerin, PFOA'nın yüzey aktif özelliğine bağlı olarak, mitokondriyal membran geçirgenliğinde düşük düzeyde bir artışla ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir (216).

## **2.8. PFOA'nın İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri**

PFOA'nın insan sağlığı üzerindeki etkilerinin incelendiği çok sayıda epidemiyolojik çalışma bulunmaktadır (49, 104, 217). PFOA ile ilgili en kapsamlı epidemiyolojik çalışmalardan bir tanesi C8 Sağlık Projesi (C8) olup (217), Dupont fabrikasının bulunduğu çevrede yaşayan (ABD'de Ohio ve Batı Virginia bölgeleri) insanlar üzerinde yapılmış genel bir popülasyon çalışmasıdır. Çalışma, 2005-2006 yılları arasında 13 ay süreyle 50 ng/l düzeyde PFOA içeren içme suyuna maruz kalan yaklaşık 69000 kişi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya alınan bazı katılımcılar ise mesleki yoldan PFOA'ya maruz kalan kişiler arasından seçilmiştir. C8 Sağlık Projesi'nde

insanların serum örneklerinde ölçülen ortalama PFOA konsantrasyonu 28,2 ng/ml olarak bulunmuştur (217).

PFOA'nın insan sağlığı üzerinde etkilerinin araştırıldığı geniş kapsamda bir başka çalışma ise ABD Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Anketi'dir. Bu çalışmada, ABD genel toplumunda (12-80 yaş) katılımcıların diyeti ve çeşitli sağlık etmenleri konusunda bilgi toplanmaktadır. Katılımcılar fiziksel muayeneye tabi tutularak, kan ve idrar örnekleri toplanmakta ve veriler epidemiyolojik çalışmalarda ve sağlık bilimleri araştırmalarında kullanılmaktadır (218). 1999-2000 yılları ile 2003-2004 verilerinin karşılaştırıldığı bir NHANES çalışmasında, katılımcıların ortalama serum PFOA konsantrasyonu yaklaşık olarak 4 ng/ml olarak hesaplanmıştır (104). C8 ve NHANES çalışmalarından elde edilen veriler değerlendirildiğinde, C8 çalışmasında saptanan PFOA konsantrasyonunun NHANES'de ölçülen ortalama PFOA konsantrasyonundan 6-8 kat yüksek olduğu saptanmıştır (217).

Bu iki büyük çalışmanın dışında 3M ve Dupont şirketleri gibi floropolimer üreten fabrikaların kendi işçilerine uyguladığı anketler ve çeşitli ülkelerde yapılan epidemiyolojik çalışmalar da bulunmaktadır (23, 25, 219, 220).

### **2.8.1. PFOA'nın Kansere Oluşumu Üzerindeki Etkileri**

Perflorooktanoik asitin insan sağlığı üzerindeki zararlı etkileri, çeşitli mesleki maruziyet ve genel toplum çalışmalarının sonuçlarının değerlendirilmesiyle elde edilmiştir. IARC tarafından Grup 2B karsinogen olarak sınıflandırılan (152) PFOA ile ilgili epidemiyolojik çalışmalar, bileşiğin prostat (219), mesane (221), böbrek (16) ve testis (16) kanseri riskini arttırdığını göstermiştir.

APFO üretimi yapan bir firmada çalışan 3993 işçi ile yapılan bir kohort çalışmasında, PFOA'ya maruziyetin prostat kanseriyle ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (219). Üretimlerinde PFOA da kullanan Dupont fabrikasının olduğu bölgede yaşayan insanların katılımıyla yapılan bir diğer C8 Sağlık Projesi çalışmasında ise, PFOA maruziyetiyle böbrek ve testis kanseri arasında pozitif bir ilişki olduğu saptanmıştır (16).



### 2.8.2. PFOA'nın Kardiyovasküler Sistem Üzerindeki Etkileri

Çeşitli mesleki ve genel popülasyon maruziyet çalışmalarında PFOA'nın kolesterol, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve trigliserit değerlerini yükselttiği gösterilmiştir (22, 220, 222, 223). C8 Bilimsel Paneli'nde, PFOA'ya maruz kalan işçi ve genel popülasyon verilerinin değerlendirmesinin ardından, PFOA maruziyeti ile yüksek kolesterol değerleri arasında "muhtemel bir ilişki" olduğu sonucuna varılmıştır (224). 2007 yılında yayınlanan bir çalışmada, Dupont işçilerinin serum PFOA düzeyleri ile toplam kolesterol, LDL ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) değerleri arasında pozitif bir ilişki bulunmuş (22), 2010 yılında yayınlanan C8 Sağlık Projesi kapsamında da, çocuk ve ergen verilerinin değerlendirilmesi sonucunda, PFOA'ya maruziyet (ortalama serum PFOA konsantrasyonu 69,2 ng/ml) ile kolesterol ve LDL düzeylerindeki artış arasında anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır (225). Serum PFOA düzeylerindeki 1 ppm'lik artışın, toplam kolesterol düzeyindeki 1,06 (220) veya 4,04 (220) mg/dl'lik artış ile ilişkili olduğu ve kolesterol düzeylerindeki farklılığın, çalışmaya dahil edilen katılımcıların özelliklerine bağlı olarak değişiklik gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmaya katılanların 1999-2008 yılları arasında, 12-18 yaş arası 815 katılımcının verileri ile hazırlanan NHANES anketinin değerlendirilmesi sonucunda, serum PFOA düzeyleri ile toplam kolesterol ve LDL değerleri arasında pozitif bir ilişki bulunurken, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ve trigliserit değerleri arasında ise önemli bir ilişki saptanmamıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, düşük konsantrasyonda PFOA maruziyeti ile adölesanlarda görülen dislipidemi arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir (226). 12-15 yaş arası 225 Tayvanlı çocuk üzerinde yapılan bir kesit çalışmasında ise, serum PFOA düzeyleri (kız çocukları 0,92 ng/ml; erkek çocukları 1,1 ng/ml) ile toplam kolesterol, LDL ve trigliserit düzeyleri arasında anlamlı pozitif ilişki bulunurken, HDL düzeyleri arasında zayıf bir negatif ilişki olduğu belirlenmiştir (227). PFOA üretimi yapılan bir fabrikada çalışan işçilerle yapılan ve 30 yıl süren bir anket çalışmasının sonuçlarının değerlendirildiği bir araştırmada, serum PFOA düzeyleri (0,2-47,04 µg/ml) ile yüksek kolesterol ve ürik asit değerleri arasında anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır (228). NHANES anketine katılan, 12-18 yaş arasında

1772 çocuğun verileri analiz edildiğinde, bu çocukların serum PFOA konsantrasyonları ile yüksek ürik asit değerleri arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir (21). PFOA'nın kardiyovasküler hastalıklarla olan ilişkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise, 1999-2003 yılları arasındaki NHANES verileri değerlendirilmiş ve ailevi kardiyovasküler risk etmenlerinden bağımsız olarak, katılımcıların serum PFOA düzeyleri ile kardiyovasküler hastalıklar ve periferik arteriyel hastalıklar arasında pozitif bir ilişki olduğu belirlenmiştir (17).

### **2.8.3. PFOA'nın Karaciğer Enzimleri Üzerindeki Etkileri**

Yapılan çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda, PFOA'nın karaciğer enzimlerini etkilediği bildirilmiştir (20, 22, 229). Örneğin, C8 Sağlık Projesi'nin sonuçlarının değerlendirildiği bir araştırmada, serum PFOA düzeyleri ile ALT ve AST değerleri arasında pozitif bir ilişki saptanırken, gama glutamil transferaz (GGT) ve bilirubin düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir (20). Dupont işçileri ile yapılan bir çalışmada ise, serum PFOA düzeyleri ile GGT ve AST enzim düzeylerindeki artış arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur (22). 2007-2008 ve 2009-2010 yıllarında yapılan NHANES anket çalışmasının verilerinin değerlendirildiği bir başka araştırmada, PFOA düzeylerindeki artış ile ürik asit, ALT, AST, GGT ve toplam bilirubin düzeylerindeki artış arasında pozitif bir ilişkili olduğu saptanmıştır (229).

### **2.8.4. PFOA'nın Üreme Sistemi Üzerindeki Etkileri ve Gelişimsel Toksisitesi**

PFOA'ya gelişimsel dönemdeki maruziyetin, fetüste düşük doğum ağırlığı ve büyüme geriliği gözlenmesi ile ilişkili olduğu, doğurganlığı azalttığı, erkek ve kadınlarda üreme sistemini etkilediği ve çocuklarda ilerleyen yaşlarda obeziteye neden olabileceği bildirilmiştir (23, 230-236).

Danimarka Ulusal Doğum Kohort Anket Çalışması'ndan rastgele seçilen 1400 anne-çocuk çifti ile yapılan bir çalışmada, annelerin serum PFOA düzeyi ile bebeklerin doğum ağırlıkları arasında ters orantılı bir ilişki bulunurken, PFOA'ya maruziyetin erken doğum riski ile herhangi bir ilişkisinin olmadığı saptanmıştır (25). Aynı anket verileri kullanılarak yapılan bir başka çalışmada ise, birden fazla doğum yapmış kadının bebeklerini emzirme

sürelerinin uzunluğu ile anne PFOA serum düzeyleri arasında negatif bir ilişki bulunduğu, ancak tek doğum yapmış kadınlarda bu değişkenler arasında herhangi bir ilişkinin bulunmadığı belirlenmiştir (237). Bir başka çalışmada, gebe kadınların kordon kanındaki medyan PFOA düzeyi (1,6 ng/ml) ile bebeklerin doğum ağırlıkları arasında negatif bir ilişki bulunurken, hamile kalma yaşı ve yeni doğan boy uzunluğu arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır (24). Çin'de elektronik atık geri dönüşüm bölgesinde yaşayan ve yüksek düzeyde PFOA'ya maruz kalan gebe kadınlar ile yapılan bir araştırmada, doğum öncesi PFOA (serum medyan PFOA değeri 16,95 ng/ml) maruziyetinin, bebeklerde düşük doğum ağırlığı, prematüre doğum ve ölü doğumlar gözlenmesi gibi istenmeyen sonuçlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir (238). Nolan ve ark.'larının (239) yüksek düzeyde PFOA içeren içme suyuna maruz kalan bireyler üzerinde yaptıkları bir çalışmada ise, anne serum PFOA düzeyi ile gerek erken doğum gözlenmesi gerekse bebeklerin doğum ağırlığı arasında herhangi bir ilişki bulunmamış; bu araştırmacıların yapmış oldukları bir diğer çalışmada ise annelerin serum PFOA düzeyi ile annelerde görülen anemi riski ve çeşitli doğum komplikasyonlarının gözlenmesi arasında pozitif bir ilişki olduğu saptanmıştır (240).

C8 proje verileri temel alınarak yapılan bir çalışmada, PFOA'ya maruziyet düzeyleri ile düşük yapma ve erken doğum riski arasında herhangi bir ilişki saptanamamış, PFOA düzeyi ile preeklampsi oluşumu arasında ise zayıf bir ilişki olduğu belirlenmiştir (241). 2005–2006 yılları arasında içme suyu yoluyla yüksek miktarda PFOA'ya maruz kalan 1129 hamile kadının verilerinin değerlendirildiği bir çalışmada da, serum PFOA konsantrasyonları ile gebe kadınlarda gözlenen düşük oranları arasında bir ilişki olduğuna dair sınırlı sayıda kanıt bulunmuştur (242).

Fei ve ark.'larının (233) yaptığı bir çalışmada, PFOA'nın hamile kalma süresinde uzamaya, doğurganlık oranında ise azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. PFOA maruziyetinin, kadınların gebe kalma potansiyeli üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 1743 kadının gebe kalması için geçen süreler değerlendirilmiş ve sonuç olarak, serum PFOA konsantrasyonundaki artış ile ilişkili olarak kadınlardaki gebe kalma oranında

% 11 oranında azalma olduğu belirlenmiştir (243). Menstrüel döngüler arası sürelerin uzunluğu ile PFOA maruziyeti arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir kohort çalışmasında ise gebe kadınlardaki yüksek serum PFOA konsantrasyonunun bu kadınların gebe kalmadan önceki menstrüel döngüler arası sürelerin uzunluğu ( $\geq 30$  gün) ile ilişkili olduğu saptanmıştır (231). Lopez-Espinosa ve ark.'larının (244) yaptığı bir çalışmada ise, PFOA'nın kız çocuklarda erişkinliğe ulaşma yaşını geciktirdiği bildirilmiştir.

Annenin maruz kaldığı PFOA düzeylerinin (3,8 ng/ml), bu bileşiğe fetal yoldan maruz kalan erkek bebeklerin 19-21 yaşa ulaştıklarında üreme sistemleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, fetal PFOA maruziyeti ile bu gençlerin sperm konsantrasyonu ve toplam sperm sayısı arasında negatif, luteinleştirici hormon ve folikül uyarıcı hormon düzeyleri arasında pozitif bir ilişki olduğu bulunmuştur (232). 18-25 yaş arası (medyan yaş, 19 yıl) erkeklerin serumlarındaki perflorlukimyasal madde düzeyleri ile üreme sistemi işlevleri arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir başka çalışmada, hem serum medyan perflorooktanoik sülfonat (24,5 ng/ml) hem de PFOA düzeyi (4,9 ng/ml) yüksek olan erkeklerde hareketli sperm sayısının azaldığı; buna karşılık sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı ve gonadal hormonların düzeyinde ise bir değişiklik meydana gelmediği bildirilmiştir (245). 2005-2009 yılları arasında, çocuk sahibi olmak isteyen 18 yaşından büyük erişkin 501 erkeğin sperm kalitesinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise, erkeklerin serum PFOA konsantrasyonu ile sarmal kuyruklu sperm yüzdeleri arasında negatif bir ilişki olduğu saptanmıştır (246).

Obezijen olarak sınıflandırılan PFOA'ya doğum öncesi maruziyetin ileri yaşlarda obezite riskini arttırdığı ve bel çevresi kalınlığında artışa neden olduğu (23, 247), PFOA'ya gelişimsel dönemdeki maruziyetin ise ilerleyen yaşlarda obeziteye yol açabileceği bildirilmiştir (23). Danimarkalı hamile kadınlardan doğan çocuklar 20 yıl süreyle izlenmiş ve doğum öncesi PFOA'ya maruz kalan kız çocuklarında erişkinlik döneminde obezite meydana geldiği gözlenmiştir (23). Bu çalışmada ayrıca, anne medyan serum PFOA düzeyi (3,7 ng/ml) ile kız çocuklarının serum insülin ve leptin düzeyleri arasında pozitif, adiponektin düzeyleri arasına ise negatif bir ilişki olduğu saptanmıştır (23).

### 2.8.5. PFOA'nın Endokrin Sistem Üzerindeki Etkileri

Genel popülasyon ve çeşitli mesleki maruziyet çalışmalarına ilişkin sonuçlar, PFOA'ya maruziyet ile tiroid hormonları ve tiroid hastalıkları arasında bir ilişki olabileceğini göstermektedir (18, 248-251). NHANES verileri temel alınarak yapılan bir çalışmada, serum PFOA düzeyi ile tiroid hastalığı oluşumu arasında pozitif bir ilişki olduğu belirlenmiştir (18). C8 anketine katılan bireyler arasından seçilen 32254 kişilik bir grup üzerinde yapılan araştırmada, serum PFOA düzeyleri ile tiroid hastalıkları arasındaki ilişki incelenmiş ve PFOA maruziyeti ile kadın katılımcılarda hipertiroid, erkek katılımcılarda ise hipotiroid oluşumu arasında önemli bir ilişki olduğu bulunmuştur (251). C8 anket verileri kullanılarak yapılan bir başka araştırmada, 20 yaş üstü kadınlar ve 50 yaş üstü erkeklerdeki serum PFOA düzeyleri ile tiroksin (T4) düzeyleri arasında pozitif bir ilişki bulunurken, triiyodo tiroksin (T3) geri alımı arasında negatif bir ilişki olduğu saptanmıştır (248). PFOA üreten bir fabrikada çalışan ve kolesterol düşürücü ilaç kullanmayan erkek işçilerin katılımıyla yapılan bir anket çalışmasında, serum PFOA düzeyleri (ortalama 2,21 µg/ml) ile serbest T4 düzeyleri arasında negatif, T3 düzeyleri arasında ise pozitif bir ilişki bulunmuş, yüksek PFOA düzeyleri ile toplam T4 ve tiroid uyarıcı hormon (TSH) düzeyleri arasında ise herhangi bir ilişki olmadığı belirlenmiştir (250). 55-74 yaş grubundaki insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada ise, serum PFOA düzeylerindeki artışın yaş ilerledikçe, serbest ve toplam tiroksin hormon düzeylerinde daha fazla oranda artışa neden olduğu gösterilmiştir (252).

PFOA'ya maruziyet ile çocuklarda gözlenen tiroid hastalığı arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada, serum PFOA düzeyleri (29 ng/ml) ile hipotiroid oluşumu arasında pozitif bir ilişki bulunurken, toplam T4 ve TSH düzeyleri arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır (249). Hollanda'da yapılan bir kohort çalışmasında, PFOA'ya doğum öncesi maruziyetin yenidoğan tiroid hormon düzeylerine olan etkisi araştırılmış ve kız bebeklerdeki tiroksin hormonu ile serum PFOA konsantrasyonu arasında pozitif bir ilişki olduğu belirlenmiştir (253).

### 2.8.6. PFOA'nın İmmün Sistem Üzerine Etkileri

PFOA'ya maruz kalan insanlarda, bileşiğin immün sistem üzerindeki etkilerinin araştırıldığı az sayıda çalışma bulunmaktadır (26, 28, 254, 255). PFOA'nın immün sistem üzerine etkileri arasında, antikor oluşumunun azalması, immünglobulin E (IgE) düzeylerinin etkilenmesi ve çeşitli otoimmün hastalıkların görülme sıklığında artış gibi etkiler bulunmaktadır (26, 28, 255).

Tayvan'da yapılan bir kohort çalışmasında, yeni doğan erkek bebeklerin serum PFOA düzeyleri ile kordon kanındaki IgE düzeyinin pozitif ilişkili olduğu saptanmıştır (28). Bir diğer çalışmada, PFOA'ya maruziyetin 5-7 yaşındaki çocuklarda tetanoz ve difteri aşlarına karşı antikor oluşumunu azalttığı belirlenmiş ve bu durumun, çocuklarda, tetanoz ve difteriye karşı bağışıklık sistemi koruyuculuğunu azaltabileceği bildirilmiştir (26). C8 Sağlık Projesi'nin 2005-2006 verileri kullanılarak 411 yetişkin üzerinde yapılan bir değerlendirmede PFOA'nın, yaygın bir grip virüsü olan A/H3N2'ye karşı antikor yanıtını azaltarak bu virüse karşı geliştirilen aşının etkinliğini azalttığı bildirilmiştir (254).

PFOA'nın çeşitli otoimmün hastalıklarla ilişkisi de yapılan epidemiyolojik çalışmalarda incelenmiştir (255, 256). PFOA üreten bir fabrikada çalışan 3713 işçi üzerinde yapılan bir C8 çalışmasında, PFOA maruziyeti ile otoimmün hastalıklar olan ülseratif kolit ve romatoid artrit arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur (255). Bir başka C8 çalışmasında, Dupont fabrikasının bulunduğu bölgede yaşayan 32254 yetişkinin verileri incelenmiş ve ülseratif kolit oluşumu ile PFOA maruziyeti (serum medyan PFOA düzeyi 28 ng/ml) arasında güçlü bir ilişki olduğu saptanmıştır (256).

### 2.8.7. PFOA'nın Sinir Sistemi Üzerindeki Etkileri

Perflorooktanoik asitin insanlarda sinir sistemi üzerine olan etkileri ile ilgili sınırlı veri bulunmaktadır (257-259). 1999-2008 ve 2003-2004 yılları arasındaki veriler analiz edilerek hazırlanan bir NHANES raporuna göre, 12-15 yaş çocukların serum medyan PFOA düzeyi (22,6 µg/L) ile dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur (260). C8 çalışmasının verilerinin analiz edildiği bir çalışmada ise, serum PFOA düzeyleri 13-28,2 ng/ml aralığında olan çocuklarda dikkat eksikliği hiperaktivite

bozukluğu gözlenirken, daha yüksek serum düzeylerinde ise bu tür bir ilişkiye rastlanmamıştır (261). İsveç'te yapılan genel bir popülasyon çalışmasında ise, fetal PFOA maruziyeti ile çocuklarda gözlenen dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu arasında herhangi bir ilişkinin olmadığı saptanmıştır (259). Doğum öncesi PFOA maruziyetinin, yenidoğanların nörolojik davranışları ile ilişkisinin araştırıldığı bir kohort çalışmasında, 349 anne-yeni doğan çifti incelenmiştir. Bu çalışmada, yüksek serum PFOA konsantrasyonuna sahip annelerden doğan bebeklerin hipotonik olma olasılığının daha yüksek olduğu belirlenmiştir (257). Yapılan bir başka çalışmada ise, doğum öncesi anne karnında PFOA'ya maruziyet ile bebeklerin 5-9 yaşına ulaştıklarında hiperaktif davranış göstermeleri arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur (258). Danimarkalı çocuklar üzerinde yapılan bir başka araştırmada da, doğum öncesi PFOA maruziyeti ile davranışsal ve motor koordinasyon bozuklukları arasında herhangi bir ilişki bulunmadığı bildirilmiştir (262).

### **2.8.8. PFOA'nın Böbrek Üzerindeki Etkileri**

PFOA'nın insanlarda böbrek fonksiyonları üzerine etkileri olduğu ve böbrek kanserine yol açabileceği yapılan çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (16, 19, 263, 264).

Ortalama 19 yıl süreyle Dupont fabrikasında çalışmış 5791 işçi üzerinde yapılan bir kohort mortalite çalışmasında, işçilerin tahmin edilen serum PFOA düzeyi (350 ng/ml) ile bu işçilerde görülen kötü huylu (malign) ve malign olmayan böbrek hastalığı arasında pozitif bir ilişki olduğu saptanmıştır (263). 1999-2000 ve 2003-2008 yılları arasında 4587 NHANES katılımcısının glomerüler filtrasyon hızının değerlendirildiği bir çalışmada ise, PFOA maruziyeti ile kronik böbrek yetmezliği görülmesi arasında anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır (19). 1952-2011 yılları arasında Dupont fabrikasının olduğu bölgede yaşayan 3254 yetişkin üzerinde yapılan bir çalışmada ise, tahmin edilen serum PFOA konsantrasyonu (işçi için 174,4 ng/ml; toplum için 19,4 ng/ml) ile bu kişilerde gözlenen böbrek kanseri arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur (16). Dupont fabrikasının bulunduğu bölgede yaşayan insanlar üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise yüksek (30,8 µg/l-109 µg/l) ve çok

yüksek düzeyde ( $> 109 \mu\text{g/l}$ ) serum PFOA konsantrasyonuna sahip bireyler ile bu kişilerde gözlenen böbrek kanseri arasında pozitif bir ilişki saptanmıştır.

### **2.8.9. PFOA'nın Diğer Organ ve Sistemler Üzerindeki Etkileri**

PFOA ile yapılan epidemiyolojik çalışmalarda yüksek serum PFOA düzeyleri ile osteoartrit (265-267) oluşumu arasında bir ilişki olduğu ve PFOA'nın solunum sistemini de etkilediği gösterilmiştir (268).

NHANES 2005-2006 verileri temel alınarak yapılan epidemiyolojik bir çalışmada, katılımcıların serum PFOA düzeyleri ( $\geq 72 \text{ ng/ml}$ ) ile osteoartrit oluşumu arasında güçlü bir pozitif ilişki bulunmuş (266), NHANES verilerinin değerlendirildiği bir diğer çalışmada ise, serum PFOA konsantrasyonları ile kadınlarda osteoartrit görülme sıklığı arasında güçlü bir pozitif ilişki olduğu saptanmıştır (267). Galloway ve ark.'larının (265) yaptıkları bir çalışmada ise PFOA'nın, kadınlarda paratiroid hormon 2 reseptör gen ifadesini azaltarak, osteoartrite neden olabileceği bildirilmiştir.

PFOA üreten bir fabrikanın olduğu bölgede yaşayan ve içme suyuyla  $0,05 \text{ ng/ml}$  konsantrasyonun üzerinde PFOA'ya maruz kalan 566 yetişkin ile yapılan bir ankette, bu kişilerde kronik bronşit, merdiven çıkarken nefesin kesilmesi ve astım gibi solunum yolları hastalıklarının görülmesinde önemli düzeyde bir artış olduğu bildirilmiştir (268). Tayvan'da 225'i astım hastası olan 456 çocuk üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise astımlı çocukların serum PFOA konsantrasyonu ( $1,2 \text{ ng/ml}$ ) ile bu çocuklarda astım görülmesi arasında pozitif bir ilişki olduğu saptanmıştır (269).

### **2.9. Oksidatif Stres, Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma**

Oksidatif stres, oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine kayması ve potansiyel olarak hasarla sonuçlanabilecek olayların meydana gelmesi olarak tanımlanır (30). Bu tanımlamaya göre oksidatif stres, oksidanlara maruziyetin artması ve/veya oksidanlara karşı savunma mekanizmasının azalmasından kaynaklanabilir (270). Diyetle alınan antioksidanların (E, C, D vitaminleri, flavanoid ve karatoneidler vb.) azalması, antioksidan enzimlerin işlevlerini devam ettirebilmeleri için gerekli olan eser elementlerin (demir, bakır, çinko ve selenyum vb.) tükenmesi veya antioksidan



gen ifadesinde meydana gelen hatalar, oksidatif hasara yol açan prooksidanların (serbest radikal veya reaktif oksijen bileşikleri) birikmesine neden olur. Oksidatif stres sonucu, oksidatif hasar olarak adlandırılan lipid, protein ve DNA yapısında değişiklikler meydana gelir (271). Oksidatif stresin belirli kanserler (272, 273), ateroskleroz, iskemik kalp hastalığı, hipertansiyon, kardiyomiyopati, kardiyak hipertrofi ve konjestif kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklar (274), iskemi/reperfüzyon (275), romatoid artrit (276) ile Alzheimer (277) ve Parkinson (278) gibi santral sinir sistemini etkileyen hastalıklar ile yaşlanma sürecinde (279) de rol aldığı gösterilmiştir.

### **2.9.1. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Bileşikleri**

Serbest radikaller atomik veya moleküler yörüngelerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron bulunduran molekül veya molekül parçaları olarak tanımlanır. Bu eşlenmemiş elektron serbest radikale önemli derecede reaktivite kazandırır (280-282). Oksijen kaynaklı radikaller, canlı sistemler için en önemli radikal grubunu meydana getirir. Oksijen türevi serbest radikallere süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil ( $OH^{\cdot}$ ), peroksil, alkoksil ve hidroperoksil radikalleri örnek olarak verilebilir. Nitrik oksit ve nitrojen dioksit ise nitrojen içeren serbest radikallere örnektir. Oksijen ve nitrojen serbest radikalleri; hidrojen peroksit, hipokloröz asit, hipobromöz asit ve peroksinitrit gibi radikal olmayan reaktif bileşiklere dönüşebilir (281).

### **Süperoksit Anyonu**

Süperoksit anyon radikali moleküler oksijene (dioksijen) bir elektron eklenmesiyle meydana gelir. Süperoksit anyonu metabolik olaylar veya fiziksel radyasyon sonucu oksijen aktivasyonu ile oluşur ise primer reaktif oksijen bileşikleri olarak kabul edilir. Süperoksit anyonu daha sonra diğer moleküllerle doğrudan ya da enzim veya metallerin katalizlediği reaksiyonlarla etkileşerek sekonder ROB'ni de oluşturabilir (283). Süperoksit radikali serbest radikal olmasına karşın yüksek derecede reaktif değildir ve lipid membranları geçebilme özelliği yoktur. Bu nedenle üretildikleri kompartmanlardan daha uzağa gidemez (284).

Süperoksit radikali hemen hemen bütün aerobik hücreler tarafından üretilir. Süperoksit radikalının üretimi en çok hücrelerin mitokondrilerinde daha az oranda ise fagositik hücrelerdeki belirli enzimler aracılığıyla gerçekleşir (285). Süperoksit esas olarak ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, sitokrom oksidaz, sitokrom P450 enzimlerinin yer aldığı reaksiyonlar ile mitokondriyal solunum ve otooksidasyonla oluşur (272, 286). Fagositik hücrelerin yabancı maddelerle veya immün komplekslerle karşılaştığında oluşan “solunum patlaması” önemli bir süperoksit kaynağıdır (287). Mitokondride elektron taşınması sırasında az sayıda elektron oksijene zamanından önce sızarak süperoksit radikalini oluşturur. Elektron taşıma sisteminde süperoksit meydana getiren iki bölge vardır. Bunlar kompleks I (NADPH dehidrojenaz) ve kompleks III (ubisemikinon)’tür. Oluşan süperoksitlerin anyonik formu kolaylıkla mitokondrinin iç membranından geçebilir (273, 288). Hücrelerde çeşitli yollarla üretilen süperoksit, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından, dismutasyon reaksiyonu ile hidrojen peroksit ve oksijene dönüşür (Eşitlik 2.1) (289).

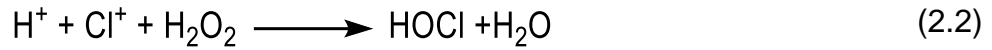


### Hidrojen Peroksit

Süperoksit radikalının büyük bir kısmı SOD enzimi veya enzimatik olmayan dismutasyonla hidrojen peroksite dönüşür (290). Glikolat oksidaz gibi bazı enzimler aracılığıyla da *in vivo* olarak  $\text{H}_2\text{O}_2$  oluşabilir.  $\text{O}_2^{\cdot-}$  radikalının aksine,  $\text{H}_2\text{O}_2$  biyolojik membranlardan geçebilir (291).  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in kendisi bir radikal olmamakla birlikte, genellikle ROB sınıfına dahil edilir (292).  $\text{H}_2\text{O}_2$  diğer ROB kadar reaktif olmamasına rağmen, membranları kolaylıkla geçebildiği için, kanser oluşumu ve hücre hasarında önemli rol oynar (285).  $\text{H}_2\text{O}_2$ , bir bölgede oluştuğu zaman uzak bölgelere yayılabilme özelliğine sahiptir ve geçiş metallerinin oksidasyonu yoluyla reaktif hidroksil radikaline dönüşerek esas toksik etkisini gösterir.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ayrıca nötrofillerde bulunan miyeloperoksidazlar tarafından daha reaktif bir ROB olan hipokloröz asite (HOCl) dönüştürülür

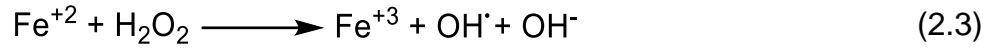
(Eşitlik 2.2).  $H_2O_2$ , bu özellikleri nedeniyle hücreler arasında ve hücre kompartmanları boyunca oluşabilecek serbest radikal hasarında aracı madde olarak görev yapar (284, 292).  $H_2O_2$  katalaz, glutatyon peroksidaz ve peroksiredoksinler tarafından moleküler oksijen ve suya dönüştürülür (285).

Peroksizomların fizyolojik koşullarda  $H_2O_2$  ürettikleri bilinmektedir. Peroksizomlardaki oksijen tüketimi daha sonra birçok molekülün oksitlenmesinde kullanılacak  $H_2O_2$ 'nin üretimine yol açar. Peroksizomlarda bulunan katalaz enzimi, hidrojen peroksiti yıkarak, daha sonra oluşabilecek toksik maddelerin birikmesinden hücreyi koruyabilir. Peroksizomlar zarar gördüğü ve katalaz enzimi baskılandığı zaman, ciddi şekilde oksidatif strese neden olabilen  $H_2O_2$  sitozole yayılır (273).

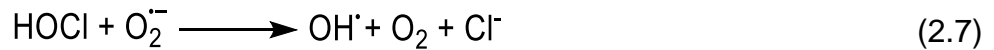


### Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali bilinen en reaktif radikal türüdür. Çok reaktif ve oldukça kısa bir yarı ömre sahip olduğu için, üretildiği yere yakın olan moleküllere zarar verir (293-295).  $OH^\bullet$  radikali farklı mekanizmalarla üretilir.  $OH^\bullet$ , *in vivo* koşullarda, esas olarak indirgenmiş geçiş metallerinin varlığında oluşur.  $H_2O_2$ ,  $Fe^{+2}$  iyonlarının katalizlediği reaksiyonla son derece reaktif olan  $OH^\bullet$  radikalini oluşturur. Bu reaksiyon *Fenton Reaksiyonu* (Eşitlik 2.3) olarak adlandırılır (287, 296, 297). Geçiş metalleri, ferritin gibi proteinlerin ve çeşitli dehidratazliyz ailesinden olan enzimlerin  $O_2^{\bullet-}$  ile reaksiyon vermesi sonucu açığa çıkabilir (273, 298).  $Fe^{+3}$  iyonu  $O_2^{\bullet-}$  radikali ile reaksiyona girerek  $Fe^{+2}$ 'ye indirgenir (Eşitlik 2.4) ve bu reaksiyon Fenton reaksiyonu ile birleşerek *Haber-Weiss Reaksiyonunu* (Eşitlik 2.5) oluşturur (295-297).



Hidroksil radikali başka mekanizmalar yoluyla da oluşabilir. Su, iyonize radyasyonla parçalanarak  $\text{OH}^\bullet$  ve hidrojen atomlarına dönüşebilir.  $\text{OH}^\bullet$ , alkilhidroperoksitlerin fotolitik bozunmasıyla da meydana gelebilir (295). Ayrıca  $\text{OH}^\bullet$ , nitrik oksitin ( $\text{NO}^\bullet$ ),  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ile hızlı bir şekilde reaksiyona girmesi sonucu oluşan peroksinitritin ( $\text{ONOO}^-$ ) bozulmasıyla (Eşitlik 2.6) da oluşabilir.  $\text{HOCl}$ 'nin  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ile reaksiyona girmesi de  $\text{OH}^\bullet$  oluşum (Eşitlik 2.7) mekanizmalarından bir diğeridir (291).



### Peroksil Radikali

Reaktif oksijen bileşikleri grubundan giren bir diğer radikal de çeşitli biyolojik reaksiyonlarda yer alan peroksil ( $\text{RO}^\bullet$ ) radikalidir. En basit peroksil radikali süperoksit radikalinin konjuge asiti olan hidroperoksildir ( $\text{HOO}^\bullet$ ). Hidroperoksil radikallerinin yağ asidi peroksidasyonlarını başlattıkları bilinir. Peroksil radikalleri DNA kırıklarına ve protein hasarlarına neden olur.  $\text{RO}^\bullet$ , süperoksitlerin indüklediği DNA hasarını arttırıcı etki gösterir (272, 273).

### 2.9.2. Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Kaynakları

Reaktif oksijen bileşikleri endojen ve eksojen kaynaklı olabilir. Mitokondri, sitokrom P450 metabolizması ve enflamatuvar hücrelerin aktivasyonu endojen kaynaklar arasında sayılır. Mitokondri, süperoksit ve hidrojen peroksitin olduğu ana kaynaklardan bir tanesidir (295, 299). Mitokondrinin dışında, ksantin oksidaz enziminin hücrenel kaynaklı oksijen türevi serbest radikal oluşturması ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$ ) da önemli bir mekanizmadır (300). Nötrofiller, ezonofiller, monositler ve makrofajlar da hücrenel ROB'nin olduğu endojen kaynaklar arasında yer alır. Makrofajların uyarılmasıyla  $O_2^{\bullet-}$ ,  $NO^{\bullet}$  ve  $H_2O_2$  gibi çeşitli ROB'nin üretiminde artış meydana gelir (301). SİT P450 enzimlerinin indüklenmesi de özellikle  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$  gibi ROB'nin üretilmesine neden olur. Mikrozom ve peroksizomlar da ROB kaynakları arasında yer alır (295). Ayrıca daha önce ayrıntılı bir şekilde belirtilmiş olduğu üzere, geçiş metalleri varlığında Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları aracılığıyla da  $OH^{\bullet}$  oluşur (296, 297).

Reaktif oksijen bileşikleri eksojen kaynaklı da olabilir. Klorlu bileşikler, metal iyonları, radyasyon, sigara dumanı ile barbitürat, parakuat, parasetamol, doksorubisin ve sisplatin gibi çeşitli ilaçlar, ozon ve azot dioksit gibi atmosferik kirleticiler eksojen kaynaklı ROB arasında sayılabilir (271, 292, 295).

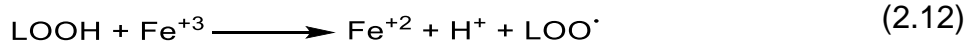
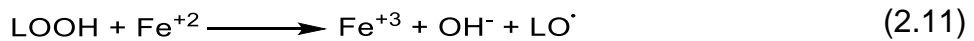
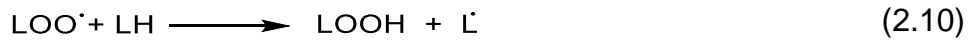
### 2.9.3. Oksidatif Hasar ve Sonuçları

Oksidatif hasar ROB'nin canlı organizmanın bileşenlerine saldırısı sonucu ortaya çıkan biyomoleküler hasar olarak tanımlanır (302). Yüksek konsantrasyonda ROB, hücrelerde yer alan lipid, nükleik asit ve proteinlere önemli ölçüde zarar verir (295).

#### Lipid Peroksidasyonu

Hücre membranları çoklu doymamış yağ asidi içerir ve bu yağ asitleri lipid peroksidasyonuna uğrama riskine sahiptir (285). Lipid peroksidasyonun başlayabilmesi için lipid molekülünden (LH) bir H atomunun  $OH^{\bullet}$  gibi bir ROB tarafından koparılması gerekir (Eşitlik 2.8). Bu reaksiyonun sonucunda oluşan lipid radikali ( $L^{\bullet}$ ) moleküler olarak tekrar düzenlemeye uğrayarak konjüge

diene dönüşür ve hızlı bir şekilde oksijen molekülüyle birleşerek peroksil radikaline ( $\text{LOO}^\bullet$ ) (Eşitlik 2.9) çevrilir. Oluşan  $\text{LOO}^\bullet$ , diğer herhangi bir sağlam lipid molekülünden H atomunu kopartabilecek güce sahiptir.  $\text{LOO}^\bullet$ , H atomuyla birleşerek lipid hidroperoksit ( $\text{LOOH}$ ) ve  $\text{L}^\bullet$  ne dönüşür (Eşitlik 2.10). Oluşan  $\text{L}^\bullet$ , lipid peroksidasyon reaksiyon zincirinin oluşmasına sebep olur. Böylece tek bir  $\text{OH}^\bullet$ , yüzlerce yağ asiti molekülünün lipid hidroperoksitlere dönüşmesine neden olur. Geçiş metallerinin de lipid peroksidasyonu başlattığı bilinmektedir. Normalde membranlarda kararlı halde bulunan lipid hidroperoksitler, geçiş metalleriyle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu başlatabilir.  $\text{Fe}^{+2}$  iyonu  $\text{LOOH}$  ile birleşerek alkoksi radikaline ( $\text{LO}^\bullet$ ) (Eşitlik 2.11),  $\text{Fe}^{+3}$  iyonu ile birleşerek ise peroksil radikaline (Eşitlik 2.12) dönüşür. Reaksiyonlar sonucu oluşan bu iki radikal de lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu başlatabilir (287).



Bu zincir reaksiyonlar ve  $\text{LOOH}$ 'nin membranlarda birikmesi protein oksidasyonuna, membranların yapısının ve fonksiyonlarının bozulmasına ve çeşitli aldehitlerin malondialdehit, akrolein, 4-hidroksi-2-nonenal (HNE), krotonaldehit oluşmasına neden olur (285, 287, 293). Hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozu gibi süreçlerde önemli fizyolojik rolleri olan bu aldehitler aynı zamanda güçlü birer karsinojendir (285, 303). MDA ve HNE'nin mutajen olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (304, 305).

Lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunun sonlanabilmesi için E vitamini ve bütillenmiş hidroksitoluen gibi fenolik antioksidanların varlığına ihtiyaç duyulur. Bu antioksidanlar LOO<sup>\*</sup>'ya bir H atomu vererek, ilgili antioksidan radikallerine dönüşür. Bu radikal de başka bir LOO<sup>\*</sup> ile reaksiyona girerek radikal olmayan bir maddeye dönüşerek zinciri sonlandırır. Bu nedenle, bu lipofilik antioksidanlar zincir kırıcı antioksidanlar olarak adlandırılır (271).

Lipid peroksidasyonunun ölçülmesi, lipid peroksitler, izoprostanlar, dien konjugatları ve lipid parçalanma ürünlerinin (malondialdehit, etan, pentan ve 4-hidroksinonenal gibi) analiz edilmesiyle gerçekleştirilir. Bunlar arasında malondialdehit, lipid peroksidasyonun güvenilir bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (281). Lipid peroksidasyon, tiyobarbitürik asit reaktif bileşiklerinin (TBARS) ölçülmesi yoluyla değerlendirilir. Bu yöntemle, oksidatif stresin neden olduğu lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeyi ölçülebilir (306). TBARS yönteminin özgünlüğü ile ilgili çeşitli tartışmalar olmakla birlikte, bu yöntem ucuz ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (307).

### **Oksidatif DNA Hasarı**

Hidroksil radikali, DNA molekülünün bütün kısımlarıyla reaksiyona girerek pürin ve pirimidin bazları ile deoksiriboz iskeletinde hasara neden olabilir (282). Meydana gelen oksidatif hasar sonucunda oluşan kalıcı genetik değişiklikler mutajenez, karsinojenez ve yaşlanma süreçlerinin ilk adımlarını oluşturur (273). ROS, DNA'ya saldırarak DNA sarmal kırıkları, DNA-protein çapraz bağlanmaları ve pürin oksidasyonu gibi mutajenik etkilere neden olabilir. Mutajenik etkiler sonrasında DNA hızlı bir şekilde onarılamazsa, kalıcı mutasyonlar oluşabilir (284, 308). En çok çalışılan DNA hasarı 8-hidroksiguanozin (8-OHG) oluşumudur. OH<sup>\*</sup> guanin bazının 8. karbonuna katılarak 8-OHG'ye dönüşür. 8-OHG ise hidrolize uğrayarak 8-hidroksideoksiguanozine (8-OHdG) dönüşür. 8-OHdG ölçümü radikal kaynaklı DNA hasarını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir (308, 309). Diğer DNA bazları da hidroksil radikali tarafından benzer şekilde oksidasyona uğrayabilir. DNA bazlarının oksidatif hasarının en önemli sonuçlarından biri mutasyon

oluşmasıdır. Oluşan bu mutasyonlar onarılamadığı zaman protein gen ifadelerinde değişikliklere yol açmaktadır (271).

### **Protein Oksidasyonu**

Proteinler de serbest radikal hasarına hedef olan moleküllerden bir tanesidir. ROB kaynaklı protein oksidasyonu sonucu karboniller, ditrozinler ve tirozinler oluşur (271). Proteinlerin ROB tarafından oksidasyona uğraması sonucu protein hidroperoksitleri gibi yüksek derecede reaktif ve kararlı bileşikler oluşur. Bu yapılar da geçiş metalleriyle etkileşerek başka radikallerin oluşmasına neden olur (310). ROB, *in vitro* olarak bir çok amino asit kalıntısıyla etkileşerek, değişime uğramış ve aktifliği azalmış enzimler ile işlevini kaybetmiş proteinlerin oluşmasına yol açar (311, 312). ROB kaynaklı protein oksidasyonunun belirlenmesi amacıyla karbonil gruplarının konsantrasyonlarının belirlenmesi sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (273).

#### **2.9.4. Antioksidan Savunma Sistemleri**

Antioksidanlar, okside olabilen substratlara oranla daha düşük konsantrasyonda oldukları halde, bu substratların oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren ya da engelleyen maddelerdir (313). Antioksidanlar etkilerini oksidatif sürecin farklı aşamalarında gösterebilir. Örneğin, lipid peroksidasyonuna karşı etkilerini; ortamdaki O<sub>2</sub> konsantrasyonunu düşürerek, OH<sup>\*</sup> ve singlet O<sub>2</sub> gibi radikalleri süpürerek, metal iyonlarını bağlayarak, peroksitleri alkol gibi radikal olmayan maddelere dönüştürerek veya zincir reaksiyon başlatabilen radikallere karşı zincir kırıcı etki meydana getirerek gösterirler (313). İyi bir antioksidan aşağıda belirtilen özelliklere sahip olmalıdır (295):

1. Özgün olarak serbest radikalleri baskılamalı,
2. Yükseltgen metallere şelat oluşturmali,
3. Diğer antioksidanlarla ilişki içinde olmalı ve onları yenileyebilmeli,
4. Gen ifadesine olumlu etkileri olmalı,
5. Kolaylıkla absorbe olabilmeli,
6. Dokularda ve biyolojik sıvılarda fizyolojik olarak uygun düzeylerde bulunmalı,



7. Hem membranda hem de sıvı ortamlarda etkilerini gösterebilmelidir.

ROB'nin oluşturduğu etkiler enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlarla dengelenir. SOD, CAT ve GPx en etkili enzimatik antioksidanlar sınıfında yer alır (306). C ve E vitamini ile karotenoidler ise enzimatik olmayan antioksidanlara örnek olarak verilebilir (295, 307). Antioksidanlar ayrıca antioksidan enzimler, zincir kırıcı antioksidanlar ve geçiş metali bağlayıcı proteinler olarak da sınıflandırılabilir (282). Zincir kırıcı antioksidanlar radikallerden elektron alarak veya radikallere elektron vererek kararlı yan ürün oluşturan küçük moleküllerdir. Zincir kırıcı antioksidanlara E vitamini, karotenoidler, flavonoidler, ubikinol-10, C vitamini ve glutatyon örnek olarak verilebilir (292, 314). Geçiş metali bağlayan proteinlere örnek olarak da ferritin, transferrin, laktoferrin ve serüloplazmin verilebilir (292).

### **Enzimatik Antioksidanlar**

#### **Süperoksit Dismutaz**

Süperoksit dismutaz,  $O_2^{\bullet-}$ 'in  $O_2$  ve  $H_2O_2$ 'ye dismutasyonunu katalizleyen antioksidan enzimdir (Eşitlik 2.13) (289). Bu reaksiyon sonucu oluşan  $H_2O_2$ , CAT ve GPx enzimleri tarafından ortadan kaldırılır (306). Bu enzimin antioksidan özelliği, 1969 yılında McCord ve Fridovich (315) tarafından keşfedilmiştir. İnsanlarda SOD, sitozolik Cu-Zn SOD, mitokondriyel mangan SOD (Mn-SOD) ve hücreler arası SOD (ektraselüler SOD, ES-SOD) olmak üzere üç şekilde bulunur (316, 317).



Cu-Zn SOD, 32 kDa molekül ağırlıklı iki eş değer alt üniteden oluşan bir enzimdir (306). Her bir alt ünite aktif bölge olarak bakır ve çinko iyonlarından oluşan çift çekirdekli metal kümesi içerir (295). Cu-Zn SOD'un insanlarda en fazla bulunduğu organ karaciğerdir (318).

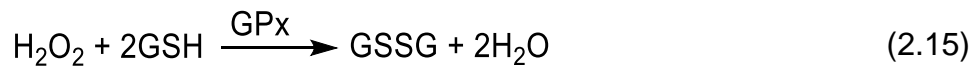
Mn-SOD, 96 kDa molekül ağırlıklı 4 alt üniteden oluşan, her bir alt ünite bir Mn atomu içeren bir enzimdir (306). Süperoksitin dismutasyonu

sırasında enzimde bulunan  $Mn^{+3}$ ,  $Mn^{+2}$ 'ye ve tekrar  $Mn^{+3}$ 'e dönüşmektedir (295). Mn-SOD da insanlarda en çok karaciğerde bulunur (318).

Ekstraselüler SOD tetramerik Cu, Zn içeren, heparin ve heparan sülfat gibi glikozaminoglikanlara karşı yüksek ilgisi olan bir glikoproteindir (306). ES-SOD dokular arası boşluklarda ve hücreler arası sıvılarda bulunur. Plazma, lenf ve sinoviyal sıvılarda bulunan SOD aktivitesinin büyük bir kısmı ES-SOD tarafından gerçekleştirilir. ES-SOD, substratı veya diğer oksidanlar tarafından indüklenmez ve düzenlenmesi sitokinler tarafından gerçekleştirilir (306).

### Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz enzimi, her biri tek selenosistein içeren 4 gruptan oluşan 80 kDa moleküler ağırlıklı bir enzimdir. GPx, vücutta selenyum bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki şekilde bulunur (319, 320). Katalazla aynı substratı ( $H_2O_2$ ) paylaşan GPx, tek başına lipid ve diğer organik hidroperoksitlerle etkin bir şekilde reaksiyona girerek oksidatif strese karşı ana koruyucu kaynaklardan bir tanesini oluşturur. GPx, GSH varlığında peroksitleri su veya alkole ayrıştırırken (Eşitlik 2.14, Eşitlik 2.15), GSH'ın yükseltgenmesini sağlar (284, 285, 292, 306).



Memelilerde 5 farklı çeşit GPx izoenzimi bulunmaktadır. Sitolik ve mitokondriyal GPx (GPx1), yağ asiti hidroperoksitlerini ve  $H_2O_2$ 'i GSH kullanarak indirger. Fosfolipid hidroperoksit GPx (GPx4), hem sitozolde hem de membranda bulunur. GPx4, perokside olmuş membranlar ve okside olmuş lipoproteinlerden üretilen fosfolipid hidroperoksitleri, yağ asiti hidroperoksitleri ve kolesterol hidroperoksitlerini doğrudan indirgeyebilir. GPx1 başlıca eritrosit, böbrek ve karaciğerde bulunurken, GPx4 renal epitel hücrelerde ve testislerde bulunur. Sitolik GPx2 ve hücreler arası GPx3, gastrointestinal sistem ve böbrek dışında diğer dokularda çok nadir olarak yer alır. Özgün olarak fare

epididimislerinde bulunan GPx5 ise selenyumdan bağımsız bir peroksidazdır (306).

### **Katalaz**

Katalaz tek ferriprotoporfirin içeren 4 eşdeğer gruptan oluşan, 240 kDa moleküler ağırlıklı, sitozol ve peroksizomlarda bulunan tetramerik yapıda bir enzimdir (286, 306). Katalaz, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile reaksiyona girerek su ve moleküler oksijen oluşturan (Eşitlik 2.16) (321) ve en yüksek dönüştürme hızına sahip olan enzimlerden biridir (295). Ayrıca CAT hidrojen donörleriyle (metanol, etanol, formik asit ve fenoller) de, peroksidaz aktivite gösterir (306).



### **Enzimatik Olmayan Antioksidanlar**

İnsan vücudunda bulunan enzimatik olmayan antioksidan bileşikler oksidan maddelerle doğrudan reaksiyona girerek bu maddeleri zararsız hale getirirler (270). Bu antioksidanlara örnek olarak C ve E vitamini, karotenoidler, tiol antioksidanları (GSH, tioredoksin, lipoik asit), doğal flavonoidler, epifiz bezinden salgılanan hormonlar ve melatonin verilebilir (295, 307). C vitamini (askorbik asit) sulu ortamlarda görev yapan güçlü bir antioksidandır. Askorbik asit, ROB ve reaktif nitrojen bileşiklerini yok ederek DNA, lipid ve protein gibi önemli biyolojik molekülleri oksidatif hasara karşı korur. Askorbik asit, membranlardaki ve lipoproteinlerdeki α-tokoferol radikallerinden α-tokoferolün yeniden üretilmesini sağlar (295, 322). E vitamini ise yağda çözünen ve en aktif formu α-tokoferol olan bir vitamindir. E vitaminin esas antioksidan özelliği lipid peroksidasyona karşı koruma sağlamasından ileri gelmektedir (323). Diğer suda çözünen antioksidanlar ürik asit, glutatyon ve serüloplazmindir. Pürin metabolizmasının son ürünü olan ürik asit hem klasik olarak antioksidan olarak hem de geçiş metallerinin şelatörü olarak görev yapar. Demir ve/veya bakıra bağlanarak metallerin katalizlediği oksidatif reaksiyonları kendisi okside

olmadan inhibe eder. Yağda çözünen diğer antioksidanlar ise  $\beta$  karoten ve ubikinondur (270).

### **Glutasyon**

Glutasyon ( $\gamma$  -L-glutamil-L-sisteinil glisin) hayvan dokularında, bitki ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan, düşük moleküler ağırlıklı bir tiyol içeren tiripeptid yapısında antioksidandır (324, 325). GSH endoplazmik retikulum, çekirdek ve mitokondride bol miktarda bulunur ve bu hücre kısımlarındaki başlıca çözünebilir antioksidandır (326). GSH, besin yoluyla ince bağırsaklardan emilebilir veya vücut hücrelerinde sentezlenebilir (281). Hücrel GSH düzeyinin artırılması ile hücrelerin oksidatif hasar, radyasyon ve belirli toksik bileşiklere karşı olan direncinin artması sağlanır. Hücrel GSH'ın miktarı geribesleme mekanizmasıyla düzenlenmekle birlikte, hücrel düzeyler ayrıca sistein gibi substratların varlığına bağlıdır. GSH'ın parçalanması  $\gamma$ -glutamil transpeptidaz enzimi tarafından başlatılır (325).

Glutasyon, radikal kaynaklı hasarı önlemekte önemli bir rol oynar. GSH'ın vücuttaki koruyucu etkileri şu şekilde sıralanabilir (295, 324, 326, 327).

1. GPx, GST gibi detoksifiye edici enzimlerin kofaktörüdür.
2. Plazma membranından aminoasit taşınmasına katkıda bulunur.
3. Hidroksil radikali ve singlet oksijeni doğrudan uzaklaştırır.
4. GSH, hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerini, GPx'in katalitik etkisiyle detoksifiye eder. GPx, SOD ile iş birliği yaparak  $H_2O_2$ 'i suya dönüştürür. Bu dönüşüm sırasında GSH, GSSG'ye okside olur. Böylece GSH toksik radikallerin vücuttan uzaklaştırılmasında kofaktör olarak görev alır. Oksidatif stres sırasında GSH düzeyi düşerken, GSSG düzeyi artar.
5. C ve E vitamini gibi önemli antioksidanları, aktif şekillerinde yeniden üretebilir.
6. Memeli karaciğerinde birçok yabancı kimyasal madde (kloroform, parasetamol ve naftalen gibi) glutasyon S-transferaz enzimi katalizörlüğünde GSH ile konjüge edilerek merkaptürik asite dönüştürülür ve idrarla vücuttan atılımı sağlanır.

GSH'in oksidasyonu ile oluşan glutatyon radikali oksidan bir radikal olmakla birlikte başka bir glutatyon radikaliyle birleşerek glutatyon disülfite (okside glutatyon, GSSG) dönüşür. GSSG de NADPH bağımlı glutatyon redüktaz enzimi tarafından tekrar GSH'a indirgenir (281). Vücuttaki oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengelerin durumu, GSSG-GSH çiftinin redoks durumuyla (GSSG/2GSH) ilişkilidir (328). GSH/GSSG oranı organizmanın oksidatif stresinin iyi bir göstergesidir. GSSG konsantrasyonunun çok fazla yükselmesi birçok enzimi oksidatif olarak hasara uğratabilir (273, 328).

### **Taurin**

Taurin (2-aminoetansülfonik asit), birçok memeli dokusunda bulunan, hücre içi serbest bir  $\beta$ -aminoasittir (329). Taurin vücutta, trombositlerde, elektriksel olarak uyarılabilen dokularda ve salgı yapan oluşumlarda yüksek miktarda bulunmakla birlikte, hücreler arası sıvıda ve diğer dokulardaki konsantrasyonu daha düşüktür (47). Taurin sülfür içeren sistein amino asitinin bir türevidir. Hücre içinde bulunan taurin iki kaynaktan sağlanmaktadır: Sistein amino asitinden biyosentetik olarak ve/veya hücreler arası boşluktan özgün olarak alınımı yoluyla. Hücreler arası taurin ise, besin yoluyla alınmakta veya karaciğer gibi bazı dokulardan sentezlenerek dolaşıma verilmektedir (330, 331). Taurinin, yapısal bir protein bileşeni olmamasına rağmen osmoregülasyon, safra asiti konjügasyonu, hücre içi kalsiyum düzeylerinin ve merkezi sinir sisteminin düzenlenmesi, hücre proliferasyonu, canlılık ve oksidan kaynaklı hasarların önlenmesi gibi birçok fizyolojik görevleri bulunmaktadır (47, 329). Ayrıca birçok ksenobiyotik taurinle konjüge olarak metabolize olur ve bu ksenobiyotiklerin suda çözünürlüğü artarak vücuttan atılımları artar (47).

Taurinin biyolojik sistemlerdeki antioksidan etkisi, biyolojik membranları stabilize etmesi (331), ROB'leri yok etmesi (332) ve lipid peroksidasyon ürünlerini azaltması ile ilişkilidir (47). Yapılan birçok araştırmada taurinin vücutta organları ağır metal, ilaç ve diğer toksinlerin oluşturduğu oksidatif hasara karşı koruduğu gösterilmiştir (330, 333-335).

Memeliler sülfür içeren aminoasitleri sisteine, daha sonra da sistein sülfinat ve sülfata metabolize ederler. Sistein sülfinatın düşük bir yüzdesi ise hipotaurine ve daha sonra da taurine metabolize edilir. Yeterli miktarda sistein sülfinatı taurine matabolize edemeyen memeliler, taurini dışarıdan besin yoluyla almak zorundadır. Taurin vücuttan taurin, taurokolat veya safra tuzu olarak uzaklaştırılır (47).

Sistein amino asitinin parçalanma ürünü olan sisteamin ve hipotaurin, hem kimyasal hem de enzimatik yollarla taurine yükseltgenir. Hipotaurinin disülfon enzimiyle taurine yükseltgenmesi, hidroksil radikalleri için, radikal bir tuzak oluşturabilir. Hipotaurin ayrıca MDA oluşumunu azaltarak lipid peroksidasyonunu önler. Hipotaurin özellikle erkek üreme sisteminde yüksek konsantrasyonda bulunur ve doymamış spermatozoa membranları için antioksidan olarak etki gösterebilir (47, 336). Taurinin oksidasyona uğrayabilme özelliği olmamasına rağmen, biyolojik sistemleri oksijene karşı koruma işlevi olduğu ileri sürülmektedir (47). Taurin süperoksit, peroksit ve hidroksil radikalleri ile zayıf olarak reaksiyona girmesine rağmen (336), bazı bulgular, taurinin amino grubu içermesi nedeniyle antioksidan özelliğe sahip olduğunu düşündürmektedir. Taurin yüksek derecede reaktif olan hipoklorit ile reaksiyona girerek N-klorotaurin oluşturur ve oluşan bu madde hücre içinde Cl<sup>-</sup> ve taurine indirgenir. Taurinin güçlü bir oksidan olan HOCl'yi yok etmesine karşın, toksik bir madde olan N-klorotaurini oluşturmasına bağlı olarak katıldığı bu reaksiyonun yararları tartışmalıdır. Taurinin ayrıca doymamış membran lipidlerindeki MDA oluşumunu azaltarak, oksidatif hasara karşı koruyucu özellik gösterdiği bildirilmiştir (47).

### **Koenzim Q<sub>10</sub>**

Koenzim Q<sub>10</sub> (ubikinon), kinon yapısında, bütün hücrelerin membranlarında bulunan ve her hücrenin normal fizyolojik koşullarda yeterli miktarlarda biyolojik olarak sentezleyebildiği bir lipittir (337). İnsanlarda bu madde, yan zincirinde her biri 5 karbondan oluşan 10 isopren içerdiği için KoQ<sub>10</sub> (2,3-dimetoksi,5-metil,6-dekaprenil benzokinon) olarak adlandırılır (338, 339).

KoQ<sub>10</sub> vücutta doğal olarak, hem okside hem de redükte şekilde bulunmaktadır. Okside KoQ<sub>10</sub> (ubikinon), mitokondriyal solunum zincirinde elektron taşıyıcısı olarak görev alırken, redükte KoQ<sub>10</sub> (ubikinol, KoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>), antioksidan olarak rol oynamaktadır (340). KoQ<sub>10</sub> antioksidan özelliği ve mitokondri enerji sistemindeki anahtar rolü nedeniyle gıda destek ürünlerinde, kozmetiklerin içeriğinde ve ilaçlarda kullanılmaktadır (341, 342).

Karaciğer, sentezlediği KoQ<sub>10</sub>'u çok düşük yoğunluklu lipoprotein ile birleştirerek dolaşımdaki lipoproteinlere antioksidan savunma sağlar. Bu yapı, organlara dağıtılamadığı için kanda ölçülen KoQ<sub>10</sub> düzeyleri, organ ve hücrelerdeki KoQ<sub>10</sub> düzeyleri hakkında tam bir bilgi sağlamaz (48). Mitokondriyal solunum sırasında ubisemikinon radikali, *protonmotive Q döngüsü* ile ubikinole indirgenir (343). KoQ<sub>10</sub>, biyolojik membranlarda KoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>'ye sitozolik NADPH-KoQ redüktaz enzimiyle indirgenir (344). KoQ<sub>10</sub>'un görevleri şu şekilde sıralanabilir (48,337):

1. KoQ<sub>10</sub>, mitokondriyal solunum zincirinin önemli bir bileşenidir. Kompleks I ve II'den kompleks III'e elektron taşıyıcısı olarak görev yapar (345, 346).
2. KoQ<sub>10</sub>, yağda çözünebilen ve endojen olarak sentezlenen bir antioksidan olup, protein, lipid ve DNA oksidasyonunu verimli bir şekilde önler. Enzimatik sistemler bu bileşiğin aktif indirgenmiş şeklini korumak için sürekli çaba harcar (347, 348).
3. KoQ<sub>10</sub>, mitokondriyal membran geçiş gözeneklerinin (*mitochondrial permeability transition pore*) açılmasını önleyerek, ATP tükenmesi, sitokrom c'nin sitozole salınması, kaspaz-9 aktivasyonu, mitokondriyal membran potansiyelinin depolarizasyonu ve DNA parçalanması gibi apoptotik olaylara karşı koyar (349).
4. KoQ<sub>10</sub>, NFκB1 bağımlı genlerin ifadesini etkileyerek çoklu antiinflamatuvar etki gösterir (350).
5. KoQ<sub>10</sub>, düşük yoğunluklu lipoproteini oksidasyondan koruyarak, antiaterosklerotik özellik gösterir (351).
6. Endotel bozukluklara karşı endotelin nitrik oksit salımını uyarıcı etki gösterir (352).

KoQ<sub>10</sub>'un indirgenmiş şeklinin de antioksidan özellik gösterdiği kanıtlanmıştır. KoQ<sub>10</sub>'un, LOO<sup>\*</sup> oluşumunu önleyerek lipid peroksidasyonunu engellediği bilinmektedir. Ayrıca KoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>, perferil radikalini azaltarak, lipid peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu önler. Bu sırada ubisemikinin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşur. KoQ<sub>10</sub> ayrıca E vitaminin yeniden üretilmesini sağlayarak da lipid peroksidasyonuna karşı koyar. KoQ<sub>10</sub>, DNA bazlarının da oksidasyonunu önleyici görev yapar. KoQ<sub>10</sub>, membranlarda bulunmasının bir üstünlüğü olarak -diğer antioksidanların tersine- lipid ve protein oksidasyonunu hem başlangıç hem de gelişme evresinde önleyebilir (347, 348).

## 2.10. Hücre Kültürü

Ana dokudan, primer kültürden veya bir hücre hattından enzimatik, mekanik veya kimyasal ayrıştırma ile alınan hücrelerden oluşturulan kültürler hücre kültürü olarak adlandırılır. “*Primer kültür*” hücrelerin izole edilmesinden hemen sonra, alt kültürleri oluşturulmadan önceki durumu tanımlar. Primer kültür tanımı henüz pasajlanmamış hücreler için kullanılmaktadır. Primer kültür, hücrelerin doku parçalarından uygun bir substrata tutunmalarını sağlayacak şekilde veya dokuyu mekanik ya da enzimatik olarak hücre süspansiyonu oluşturacak şekilde parçalamak yoluyla elde edilebilir. Bu hücreler pasajlanarak, alt kültürleri oluşturulduğunda, primer olmaktan çıkar ve “*devamlı hücre hattı*” olarak adlandırılır (353-355).

Hücre kültürleri desteğe bağımlı (yapışan, *adhere*) veya süspansiyon hücrelerle hazırlanabilir. Desteğe bağımlı hücreler cam veya plastik gibi tutunma yüzeylerine gerek duyarlar ve çoğalabilmek için bu gibi materyallerin yüzeylerine tutunmaları gereklidir. Süspansiyon halinde üretilen hücreler ise desteğe gerek duymadan, kendi ortamlarında yüzerek büyür (355, 356).

Hücre kültürü çalışmalarının çeşitli avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Hücre kültürü çalışmalarının avantajları şu şekilde sıralanabilir (353):

1. Çevresel etmenlerin (pH, sıcaklık, osmotik basınç, CO<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub> oranı) kontrolü hassas bir şekilde yapılabilir.
2. Hücre karakterizasyonu ve homojenliğinin sağlanmasına olanak verir.



3. Hücre kültürleri hem maliyet açısından hem de zaman açısından avantaj sağlar.
4. Hayvan çalışmalarında karşılaşılan kanuni, ahlaki ve etik sorunlardan kaçınılır.

Hücre kültürü çalışmalarının çeşitli avantajları olduğu gibi dezavantajları da bulunmaktadır (353):

1. Hücre kültürü çalışmalarının çok sıkı aseptik koşullarda yürütülmesi gerekir.
2. Hücreleri üretmek için ciddi miktarda çaba ve madde sarfiyatı yapmak gerekir.
3. Sürekli hücre kültürlerinin pasajları arasında değişkenlik gözlenebilir.
4. *In vitro* sistemlerde, karmaşık bir süreç olan farmakokinetiğin yeniden tasarlanması zordur. Örneğin çeşitli kimyasallar veya ilaçlar *in vivo* ortamlarda daha aktif, toksik veya daha az aktif ve toksik olmayan şekillerine metabolize olabilir. Fakat bu durumun *in vitro* koşullara uyarlanması çok kolay olmamaktadır.
5. *In vivo* sistemlerdeki doku ve sistemik cevapların (enflamasyon, böbrek yetmezliği, ateş, vasküler dilatasyon gibi) *in vitro* sistemlere de yansıtılabilmesi için daha karmaşık ve farklı modellemelerin oluşturulması gerekir.

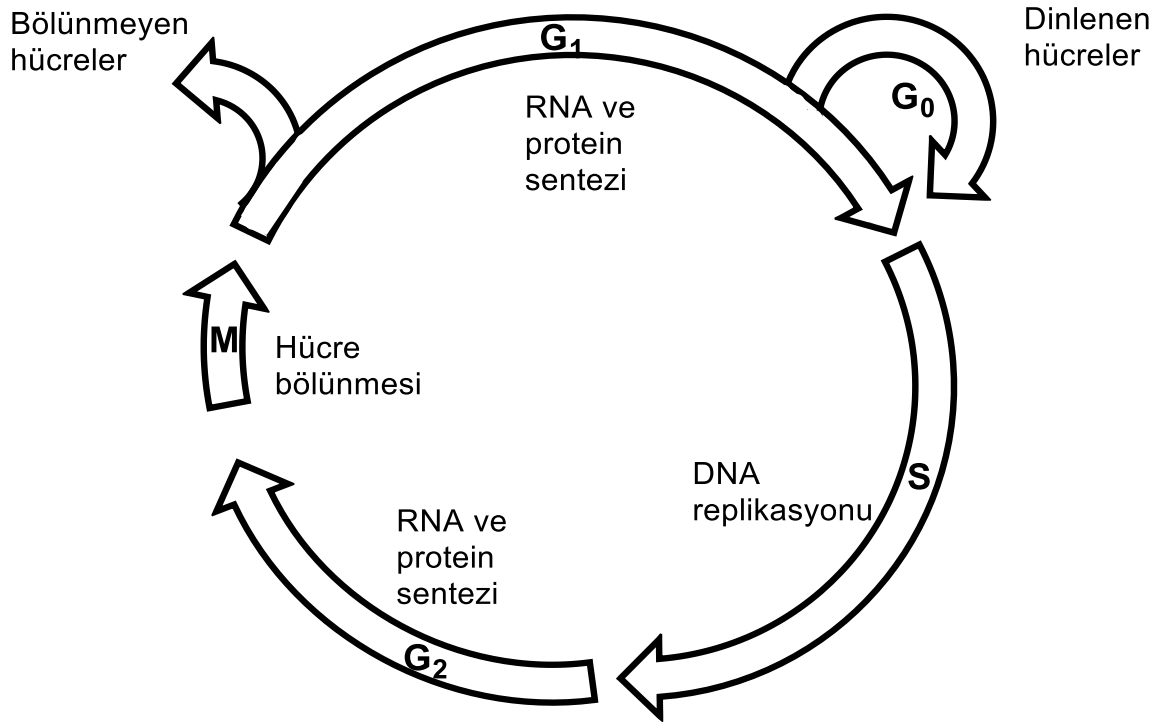
Hücrelerin kültür ortamında gelişebilmeleri için çeşitli koşulların sağlanması gerekir. *In vivo* çalışmalarda da olduğu gibi, hücre kültürü çalışmalarında da, beslenme ve çevresel koşullar oldukça önem taşır. Hücrelerin beslenmesi için gerekli temel ortam amino asit, karbonhidrat, vitamin, tuz ve hormonlardan oluşur. Ayrıca bu ortamlara serum ve antibiyotikler de eklenebilir. En fazla kullanılan hücre ortamları arasında RPMI ve DMEM sayılabilir. Hücrelerin sağlıklı bir şekilde büyüyüp gelişebilmeleri için, çevresel koşulların da uygun olması gerekir. Hücreler ancak uygun sıcaklık (36,5°C), uygun pH (7,2-7,4) ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren ortamlarda sağlıklı bir şekilde gelişebilir (354, 355, 357).

Hücre hatlarından alt kültürler hazırlandığında, hücreler çeşitli büyüme aşamalarından geçer. Hücrelerin çok yavaş büyüdüğü, hücre sayısının gözle

görülür bir şekilde artmadığı ilk aşama “oyalanma fazı” olarak adlandırılır. Büyüme faktörlerinin büyüme oranını hızlandırdığı ve hücrelerin artan hızda hücre bölünmesine maruz kaldığı ve eksponansiyel bir büyüme görülen ikinci aşama ise “büyüme fazı” olarak adlandırılır. Adhere hücreler var olan substrat alanını doldurup, birbirine yakınlaştıkça ve daha çok hücre ortamı kullanıldıkça büyüme oranı platoya erişecektir. Bu aşama da “plato fazı” olarak adlandırılır. Hücreler pasajlanmadan önce ne kadar uzun süre plato fazında kalırlarsa bir sonraki alt kültürdeki oyalanma fazları daha uzun olacaktır. Son olarak hücre ölümünün ağırlık kazandığı ve yaşayan hücre sayısının azaldığı “iniş veya hücre ölümü fazı” gerçekleşir (355).

### **2.10.1. Hücre Bölünmesi ve Hücre Döngüsü**

Organizmaların çoğalması veya büyümesi, hücrelerin çoğalmasına bağlıdır. Üremenin en basit tipi, ana bir hücrenin iki yavru hücreye bölünmesiyle gerçekleşir. Bu olay hücreyi bölünmeye hazırlayan bir dizi olayın gerçekleştiği ‘hücre döngüsü’ ve bunun bir parçası olan ‘mitoz’ bölünmeyle gerçekleşir. Mitoz ökaryotik canlılar için büyük önem taşır. Çok hücreli diploit organizmalarda, mitotik aktivite organizmanın gelişmesi ve büyümesi için önemlidir. Yaraların iyileşmesi, hücre yenilenmesi, retikülosit üretimi gibi birçok fizyolojik olay mitoz ile gerçekleştirilir. Hücre döngüsünün başlangıç evresi “interfaz” olarak adlandırılır. İnterfaz bölünmeler arasındaki ara olarak nitelendirilir. İnterfaz G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> evrelerinden oluşur (Şekil 2.2). Mitoz bölünmeden önce her bir kromozomdaki DNA’nın replikasyonun gerçekleştiği evre “S (sentez) fazı” olarak adlandırılır. Replik olmuş DNA “mitoz fazında” 2’ye ayrılır ve hücre bölünmesi gerçekleşmiş olur. S fazından önce ve sonra DNA sentezinin olmadığı, mRNA, proteinler ve birçok sitoplazmik oluşumun meydana geldiği “G<sub>1</sub>” ile büyümenin ve sentezin ikinci evresi olan mitozun başlamasına öncülük eden “G<sub>2</sub> fazları” bulunur. Hücre çoğalması ve bunun kontrolünde G<sub>1</sub> evresinin önemli bir rolü vardır. Besin yetersizliği veya bir dokunun büyüebileceği son noktaya ulaşması gibi durumlarda hücreler G<sub>1</sub> evresinden çıkarak dinlenme fazı olan “G<sub>0</sub>” evresine girerler. Eğer koşullar değişirse bu hücreler, tekrar döngüye katılabilirler. Kanser hücreleri G<sub>0</sub> fazına katılmadan, bu fazı çok hızlı bir şekilde geçerler (358-360).



Şekil 2.2. Hücre döngüsü (360) .

### 2.10.2. Hücre Ölümü

#### Apopitoz

Hücre ölümü, normal büyümenin ve olgunlaşmanın bir sonucu olarak gerçekleşebileceği gibi, çeşitli ksenobiyotiklere, mikroorganizmalara, travma ve radyasyon gibi fiziksel etkenlere maruziyet veya enflamasyon, genetik hasarlar ve kan akımının azalması gibi endojen değişikliklerin meydana gelmesi ile de gerçekleşebilir. Hücre ölümü apopitoz ve nekroz olmak üzere iki farklı şekilde meydana gelir (361).

Programlanmış hücre ölümü apopitoz olarak adlandırılır. Apopitoz ağaçtan yaprak düşmesi anlamına gelen Yunanca bir sözcüktür (358). Apopitoz ATP gerektiren, özgün morfolojik ve biyolojik özellikleri olan, dikkatli şekilde düzenlenen bir süreçtir (361). Normal fizyolojik hücre ölümü veya programlanmış hücre ölümü, çoğalan dokularda ve mitoz sırasında aşırı üreyen hücreleri engellemek amacıyla sürekli olarak meydana gelir (362). Işık

ve elektron mikroskopuyla bakıldığı zaman apoptozun ilk aşamalarında hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler hücrenin büzüşmesi ve piknozistir. Hücrenin büzüşmesi, boyutunun küçülmesi, sitoplazmanın yoğunlaşması, organellerin sıkı bir şekilde paketlenmiş bir duruma dönüşmesi ile tanımlanır. Piknozis ise kromatinlerin kondanse hale gelmesidir ki bu apoptozun en belirgin özelliklerindedir. Hematoksilen ve eozin boyama ile yapılan histolojik incelemede apoptoz tek hücrede veya küçük bir hücre grubunda gözlenir. Bu hücreler koyu eozinofilik sitoplazmaya ve yoğun mor kromatin parçalara sahip, yuvarlak veya oval görünümündedir (361). Apoptozun belirlenmesinde morfolojik görüntüleme yöntemleri (ışık ve floresan mikroskopuyla görüntüleme), immünohistokimyasal (TUNEL, anneksin V, kaspaz-3, M30 yöntemi), biyokimyasal (akım sitometrisi, agaroz jel elektroforezi, *Western blotting*) immünolojik (ELISA, florometrik yöntemler) ve moleküler biyoloji yöntemleri kullanılmaktadır (363, 364). Kondanse kromatin, çekirdek membranı çevresinde yeni ay şeklinde veya çekirdek içinde kürecikler şeklinde görülür. Sitoplazmik yoğunlaşma, hücreleri küçülmeye ve sitoplazma içinde kofullar oluşturmaya teşvik eder (365, 366). Daha sonra, çekirdek ve plazma membranları sarmal hale gelir ve kondanse kromatin, kondanse sitoplazmayla birlikte parçalanmaya uğrayarak apoptotik cisimcikler oluşturur (366).

### **Nekroz**

Nekroz hücre ölümünün sırasız ve kaza ile olan şekli olarak tanımlanır (361) Apoptoz, normal veya hastalık gibi her iki durumda da oluşabilirken, nekroz sadece hücre veya dokular ciddi bir şekilde zarar gördüğü zaman meydana gelir (362). Elektron mikroskopuyla bakıldığında nekrotik hücrelerde, membranlarda tomurcuklanma (*blebbing*) diye adlandırılan yapılar, endoplazmik retikulumda genişleme, dağılmış ribozomlar, mitokondride şişme, yoğunluk azalması ve kalsiyum çökmesi ile kondanse ve daralmış çekirdekler görülmektedir (361). Nekroz sitoplazmik membranın bütünlüğünü kaybetmesi, hücre içine hızlı bir şekilde  $Na^+$ ,  $Ca^{+2}$  girişi ve bunun sonucu olarak hücrenin şişmesi ve çekirdekte oluşan piknozisle karakterizedir. Hücresel parçalanma, lizozomal ve granüler içeriğin hücre dışı boşluklara salınması ve daha sonra

gelişen enflamasyon da nekrozun ikincil olarak gözlenen özellikleridir (362, 367).

### 2.10.3. Sitotoksisitenin Ölçümü

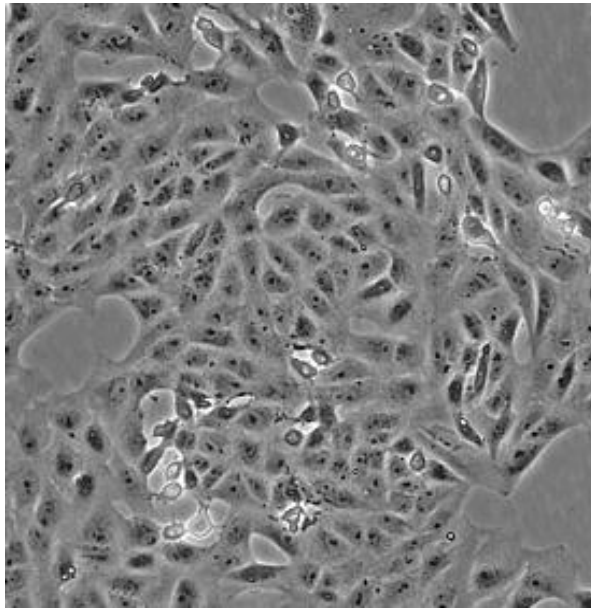
*In vitro* ortamda sistemik ve fizyolojik etkileri değerlendirmek zor olduğu için, birçok yöntem ile yalnızca hücresel düzeydeki etkiler veya sitotoksisite ölçülür. Sitotoksisite ölçümlerinde yöntem seçimi, çalışmada kullanılan maddenin cinsine, alınacak cevabın doğasına ve belirlenen hedef hücreye bağlıdır. Sitotoksisite yöntemleri 5 ana sınıfta toplanabilir: (1) Hücre canlılığını belirleyen testler (toksik maddeye hızlı ve kısa süreli maruziyette verilen cevabı ölçmek için), (2) hücrenin hayatta kalabilmesini saptayan testler (toksik maddeye uzun süreli maruziyette verilen cevabı ölçmek için), (3) metabolik testler (maddeye kısa süreli temasta metabolik cevapta meydana gelecek değişiklikleri ölçmek için), (4) dönüşüm (transformasyon) testleri (genetik mutasyonlar, büyüme kontrolünün değişmesi gibi durumların sonucunda oluşan canlılığı ölçmek için kullanılan testler), (5) irritasyon testleri (allerji ve enflamasyon gibi durumlara verilen cevabı ölçmek için kullanılan testler) (353).

### MTT Testi

MTT testi canlı hücrenin metabolik aktivitesini ölçen kolorimetrik bir testtir. 'Süksinat dehidrogenaz İnhibisyonu' veya 'SDI testi' adıyla da anılan bu testte, tetrazolyum tuzu olarak 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) kullanılır. Tetrazolyum halkası sadece metabolik olarak aktif hücrelerde mitokondriyal dehidrojenazların aktivitesi sonucu açıldığı için, bu yöntemle sadece canlı hücreler tanımlanabilir. MTT aktif olarak hücre içine alınır ve mitokondri bağımlı bir reaksiyonla formazan ürünlerine çevrilir. Bu maddeler bozulmamış hücre membranından geçemediği için, hücrelerin içinde birikir. Dimetil sülfoksit (DMSO) gibi uygun bir çözücü eklendiğinde ise bu maddeler hücre içinden salınır ve kolaylıkla kolorimetrik olarak ölçülebilir hale gelir. Sadece canlı hücreler MTT'yi indirgeyebildikleri için, indirgenmiş MTT'nin şiddeti, oluşan mavi-mor renkle orantılı olup, hücre canlılığının göstergesidir. Bu yöntem göreceli olarak yüksek düzeyde mitokondriyal aktivite gösteren hücre kültür sistemlerinde kullanılmak için uygundur (354, 368).

#### 2.10.4. Vero Hücre Hattı

Vero hücreleri, 27 Mart 1962 tarihinde Yasmura ve Kawakita (369) tarafından sağlıklı, yetişkin, Afrika kökenli, yeşil maymunlardan izole edilmiş, 1966 yılında ise bu hücreler 93. pasajlarında *American Type Culture Collection* (ATCC) tarafından alınmıştır. Vero hücreleri *adhere* (yapışan) hücreler olup, epitel hücre morfolojisini taşır (Şekil 2.3). Bu hücreler, başta viroloji çalışmaları olmak üzere, toksik bileşikler dahil çeşitli kimyasalların memeli hücrelerindeki etkilerin değerlendirilmesinde kullanılabilen hücre türleridir (370-372).



**Şekil 2.3.** Vero hücrelerinin mikroskop altındaki görünümü (373).

#### 2.11. Akım Sitometrisi

Akım sitometrisi tek bir hücrenin süspansiyon halinde ölçüm cihazının içinden geçerken çoklu fiziksel özelliklerinin eş zamanlı olarak ölçülmesi olarak tanımlanır (374). Akım sitometri yöntemi, hücrelerde yüzey antijenlerinin belirlenmesi, B hücreleri ile T hücre alt gruplarının tayini, lösemi ve lenfoma tiplemesi, toplam DNA içeriği, heterojen hücre popülasyonunun tanımlanması, hücre büyüklüğü ve granülarite, toplam hücre proteini, hücre döngüsünün analizi, apoptozis, fagositoz, enzim aktivitesi ve lokalizasyonu, hidrojen

peroksit üretimi, otoantikor tayini ve kromozom analizi, hücre alt gruplarının ayrımı (*sorting*) gibi birçok konuda kullanılmaktadır (375).

İlk akım sitometrisi 1950'li yıllarda *Wallace Coulter* tarafından icat edilen *Coulter* sayacıdır. Coulter prensibinin esası, elektrik akımı geçirilen bir hücrenin, bir açıklıktan geçerken direncinin ölçülerek, o hücrenin parçacık sayısı ve büyüklüğünün belirlenmesine dayanır. Akım sitometrisi günümüzde, lazer ışık kaynağı kullanılarak floresans ölçümü yapılmasını ifade eder. Lazer akım sitometrisinde ışığın dağılmasına bakılarak, hücrenin esas büyüklüğü ve tanecikli yapısı ölçülür. Ayrıca, floresans özellik gösteren boyalar ve çeşitli antikorlar kullanılarak, hücrelerin özel protein ifadeleri ve nükleik asit içeriği de ölçülebilir (374). Floresans boyalar DNA ve RNA gibi hücre bileşenlerine bağlanabilir. Floresans boyalara konjüğe edilen antikorlar da hücre membranlarındaki ya da hücre içindeki belirli proteinlere bağlanabilir. İşaretli hücreler, ışık kaynağından geçirildiğinde floresans moleküller üst enerji düzeylerine geçer. Tekrar normal enerji düzeylerine dönerken yüksek dalga boyuna sahip ışık saçarlar. Akım sitometrisinde, farklı floresans boyalar (eksitasyon dalga boyu aynı, emisyon dalga boyu farklı) aynı anda kullanılarak, birçok farklı hücre özellikleri eş zamanlı olarak ölçülebilir (376).

Akım sitometri cihazı, örnek toplayıcı ve taşıyıcı sistem, akış sistemi (sheath fluid), lazer ışık kaynağı, sferik ve çapraz silindirik filtreler, odaklama aynaları, sinyal dedektörleri, bilgisayar ve ayırma mekanizmasından (cell sorting) oluşmaktadır (375). Akım sitometri cihazının içinde süspansiyon halindeki hücreler, izotonik bir sıvı içine alınarak (akış sistemi), lazer ışık kaynağından çıkan monokromatik ışığa maruz bırakılır. Hücre tarafından dışarı verilen ışık optik düzeneklerle belirli dalga boyu kuşaklarını izole eden filtrelerle ve dikroik aynalara yönlendirilir. Işık sinyalleri dijital hale getirilerek bilgisayarda analiz edilir. Sonuçlar histogram veya iki boyutlu noktasal grafiklerle gösterilir (376).

Akım sitometri yöntemi ile DNA analizi yapmak için örnek, tek hücre süspansiyonu haline getirilir. Akım sitometrisinde, hücresel DNA içeriğinin ölçülmesinde DNA'nın sarmal yapısına eklenen propidyum iyodür (PI), etidyum bromür, mitramisin gibi floresans özellik gösteren boyalar kullanılır.

Propidyum iyodür DNA sarmal yapısına eklenen ve kuvvetli kırmızı floresan veren bir boyadır. Pİ hata payı çok düşük olduğu için klinikte çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. Floresans sinyali çekirdekdeki DNA miktarı ile doğrudan orantılıdır. Bu yöntemle tümör hücre topluluğundaki anormal DNA içeriği (anöploidiler) saptanabilir (375-377). Akım sitometrisi ile DNA analizinden G0 ve G1 fazında bulunan hücrelerin ortalama DNA içeriği ve hücre döngüsünde her fazda bulunan hücre sayısı hakkında bilgiler edinilir. Normal bir DNA histogramında G0/G1 fazındaki hücreler en yüksek dağılıma ve diploid (2N) DNA içeriğine sahiptir. G2/M fazında ise tetraploid (4N) bir DNA içeriği bulunur (375). Hücrelerin G2 ve M fazlarındaki DNA içeriğinin eş değer olması nedeniyle akım sitometri yöntemiyle bu iki fazı birbirinden ayırt etmek mümkün olmamaktadır. Hücre döngüsünün farklı fazlarındaki hücre yüzdelerinin hesaplanması için matematiksel modeller içeren çeşitli bilgisayar yazılımları geliştirilmiştir (377).



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1,1,3,3-tetrametoksi propan (TMP)	Sigma-Aldrich
1-bütanol	Merck
2',7'-diklorofloresin diasetat (DCFH-DA)	Sigma-Aldrich
3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT)	Serva
3-(sikloheksilamino)-1-propansülfonik asit (CAPS)	Sigma-Aldrich
5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik) asit (DTNB)	Sigma-Aldrich
Amonyum perflorooktanoik asit (APFO)	Sigma-Aldrich
$\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (İndirgenmiş) ( $\beta$ -NADPH)	Sigma-Aldrich
Bakır sülfat	Sigma-Aldrich
Dietilentriamin pentaasetik asit (DTPA)	Sigma-Aldrich
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dipotasyum hidrojen fosfat	Merck
Disodyum etilendiamintetraasetik asit ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )	Sigma-Aldrich
Disodyum hidrojen fosfat	Merck
Eozin Yellowish (Eozin Y)	Merck
Etanol	Sigma-Aldrich
Folin fenol	Sigma-Aldrich
Formaldehit	Sigma-Aldrich
Fosfat tamponu (PBS)	Biological Industries
Fosfat tamponu (PBS) ( $\text{Ca}^{+2}$ ve $\text{Mg}^{+2}$ içermeyen)	Biological Industries
Fosfat tamponu (PBS) tablet	Sigma-Aldrich
Fötal dana serumu	Biological Industries
Glasiyel asetik asit	Merck
Glutasyon (indirgenmiş şekli)	Sigma-Aldrich
Glutasyon peroksidaz	Sigma-Aldrich
Glutasyon redüktaz	Sigma-Aldrich
Hematoksilen	Merck

Hidrojen peroksit çözeltisi	Sigma-Aldrich
Hidroklorik asit (HCl)	Merck
İzotonik sodyum klorür	Polifarma
Katalaz	Sigma-Aldrich
Ketamin	Ketalar Pfizer
Koenzim Q <sub>10</sub>	Sigma-Aldrich
Ksantin oksidaz	Sigma-Aldrich
Ksantin sodyum tuzu	Sigma-Aldrich
Ksilazin	Rompun Bayer
L-Glutamin çözeltisi	Biological Industries
Metafosforik asit	Sigma-Aldrich
Mısır özü yağı	Komili
Morfolinopropan sülfonik asit (MOPS)	Sigma-Aldrich
Penisilin-Streptomisin çözeltisi	Biological Industries
Perflorooktanoik asit (PFOA)	Sigma-Aldrich
Piridin	Sigma-Aldrich
p-iyodonitrotetrazolium viyole (İNT)	Sigma-Aldrich
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck
Potasyum hidroksit (KOH)	Merck
Potasyum klorür (KCl)	Sigma-Aldrich
Propidyum iyodür (PI)	Sigma-Aldrich
RNaz	Sigma-Aldrich
RPMI-1640	Biological Industries
Sığır serum albümini (BSA)	Sigma-Aldrich
Sodyum azid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich
Sodyum bikarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
Sodyum karbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck
Sodyum-potasyum tartarat	Sigma-Aldrich
Süperoksit dismutaz	Sigma-Aldrich
Taurin	Sigma-Aldrich

t-bütil hidroperoksit	Sigma-Aldrich
Tiyobarbitürik asit (TBA)	Sigma-Aldrich
Tripsin-EDTA çözeltisi	Biochrom
Tris	Sigma-Aldrich

### 3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Akım sitometri cihazı	EPICS XLMCL, Beckman Coulter Inc.
Biyogüvenlik kabini	Esco
Buzdolabı	Beko
Buz makinası	Scotsman
Derin dondurucu (-20)	Beko
Derin dondurucu (-80)	New Brunswick Scientific
Distile su cihazı	Mes
Distile su cihazı	Nüve
Doku boyama cihazı	Thermo Shandan Varistain Gemini
ELISA plak okuyucusu	Biotek Synergy HT
Enjektör filtresi (0,2 µM por büyüklüğü)	Corning
Ependorf (1,5 ml, 2 ml)	LP
Hassas terazi	Ohaus
Hassas terazi	Mettler
Homojenizatör (cam başlıklı)	İldam
Hücre kültür kabı (75 cm <sup>2</sup> )	Corning
Hücre plağı (96 kuyucuklu)	Costar
Işık mikroskobu	Nikon optiphot
Işık mikroskobu	Leica
İnkübatör (CO <sub>2</sub> dönüşümlü)	Binder
İntragastrik sonda	

Kamera	Leica DMD 108
Krio tüp	Corning
Lam	Isolab
Lamel	Isolab
Otoklav	Rodwell
Otomatik pipet (10, 20, 100, 200, 1000, 5000 µl)	Thermo Scientific
Otomatik pipet (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Gilson
pH metre	Thermo Scientific
Polipropilen tüp (15 ml, vida kapaklı)	LP
Polipropilen tüp (3, 5 ve 10 ml kapaklı)	LP
Santrifüj	Thermo Scientific
Spektroflorometre, plak okuyuculu	Spectra Max
Spektrofotometre	Schimadzu, UV 2100S
Spektrofotometre küvetleri (1,5 ve 3 ml, kuvarz)	Hellma
Spektrofotometre küvetleri (1,5 ml, cam)	Hellma
Spektrofotometre küvetleri (1,5 ml, plastik)	LP
Steril polipropilen santrifüj tüpü (15 ml, 50 ml)	Corning
Steril serolojik pipet (2, 5, 10, 25 ml)	Corning
Terazi	Simbo
Termostatlı su banyosu	Nüve
Ultrasonik banyo	Elma
Vorteks	WiseMix
Vorteks	Velp Scientifica
Yatay karıştırıcı	Edmund Bühler

### 3.3. Kullanılan Çözelti ve Reaktifler

#### 3.3.1. Deney Hayvanlarına İntragastrik (ig) Yoldan Uygulanan Çözeltiler

**Amonyum Perflorooktanoik Asit Çözeltisi (3 mg/ml):** APFO'nun distile suda hazırlanmış çözeltisidir. Her deney günü taze olarak hazırlanır. Çözelti kullanım süresince ışıktan korunur.

**Taurin Çözeltisi (10 mg/ml):** Taurinin distile suda hazırlanmış çözeltisidir. Her deney günü taze olarak hazırlanır.

**Koenzim Q<sub>10</sub> Çözeltisi (5 mg/ml):** KoQ<sub>10</sub>'un mısır yağında hazırlanmış çözeltisidir. Her deney günü taze olarak hazırlanır. Çözelti ışıktan korunmalıdır.

#### 3.3.2. Histopatolojik Analiz için Kullanılan Çözeltiler

**Nötral Tamponlu % 10 Formalin:** % 37'lik formaldehidten 1000 ml alınarak 1900 ml'ye distile su ile tamamlanır. 4 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O ve 6,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tartılarak çözeltiliye ilave edilir.

#### 3.3.3. Doku Homojenatlarının Hazırlanması için Kullanılan Çözeltiler

**Potasyum Klorür Tamponu (6,5 M):** 1,15 g potasyum klorürün 100 ml distile suda çözülmesi ile hazırlanır.

**Metafosforik Asit Çözeltisi (% 6, a/h):** 6 g metafosforik asitin 100 ml distile suda çözülmesiyle hazırlanır. Çözelti -20°C'de 1 ay dayanıklıdır.

#### 3.3.4. TBARS Tayininde Kullanılan Çözeltiler

**Tetrametoksi Propan (TMP) Stok Çözeltisi (3,05 mM):** 50 µl tetrametoksi propan etanolde çözülerek, 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

**TMP Standart Çözeltileri:** TMP stok çözeltisinden hareketle distile su ile seyreltilerek 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300 µg/ml konsantrasyonlarda standartlar hazırlanır.

**Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi (% 8):** 2 g SDS'nin, 25 ml distile sudaki çözeltisidir.

**Asetik Asit Çözeltisi (% 20, h/h):** 20 ml asetik asit 100 ml'ye distile su ile tamamlanır. Çözeltinin pH'sı 5 N NaOH yardımıyla 3,5'a ayarlanır.

**Tiyobarbitürik Asit (TBA) Çözeltisi (% 0,8, a/h):** 64 mg NaOH 40 ml distile suda çözülür. 0,32 g TBA bu çözeltiliye eklenir ve 30°C'ye ayarlanmış ultrasonik banyoda çözülmesi ile hazırlanır.

**n-Bütanol-Piridin Çözeltisi (15:1):** 90 ml n-bütanol ve 6 ml piridin karıştırılması ile kullanımdan hemen önce hazırlanır.

### 3.3.5. Toplam GSH Tayininde Kullanılan Çözeltiler

**Potasyum Hidroksit (KOH) Çözeltisi (5 M):** 14.027 g KOH tartılır ve 50 ml distile suda çözülür.

**Morfolinopropan Sülfonik Asit (MOPS) Tamponu:** 0,4 M MOPS ve 2 mM disodyum EDTA içerir. 83,8 g MOPS ve 744,4 mg disodyum EDTA tartılarak distile suda çözülür. Çözeltinin pH'sı 5 M KOH ile pH 6,75'e ayarlanır. Çözelti hacmi 1000 ml'ye distile su ile tamamlanır.

**Metafosforik Asit Çözeltisi (% 6, a/h):** 3 g metafosforik asit tartılarak distile su ile 50 ml'ye tamamlanır. -20°C'de 1 ay dayanıklıdır.

**Sığır Serum Albümini (BSA) Çözeltisi:** 0,3 g BSA tartılır ve 5 ml distile suda çözülür. +4°C'de 1 hafta dayanıklıdır.

**Sodyum Bikarbonat Çözeltisi (% 0,5, a/h):** 0,5 g sodyum bikarbonat tartılır ve 100 ml distile suda çözülür.

**5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik) asit (DTNB) Çözeltisi (1,5 mg/ml, a/h):** 6 mg DTNB, 4 ml % 0,5'lik (a/h) sodyum bikarbonat çözeltisi içinde çözülerek, her deney günü taze hazırlanır.

**$\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) Çözeltisi (4 mg/ml, a/h):** 32 mg NADPH'ın, 8 ml % 0,5'lik (a/h) sodyum bikarbonat çözeltisi içinde çözülmesi ile her deney günü taze olarak hazırlanır.

**Glutasyon Redüktaz Çözeltisi (5 Ü/ml):** Glutasyon redüktaz çözeltisinden (219 Ü/mg protein, 3,1 mg protein/ml) 11  $\mu$ l alınarak 1500  $\mu$ l'ye MOPS tamponuyla tamamlanır. Her deney günü taze olarak hazırlanır.

**Seyreltme Çözeltisi:** 1 ml metafosforik asit ve 4 ml MOPS tamponunun karıştırılmasıyla her deney günü taze olarak hazırlanır.

**Stok GSH Çözeltisi (30 mM):** 18 mg indirgenmiş GSH, 2 ml distile suda çözülür ve her deney günü taze olarak hazırlanır.

**Ara Stok GSH Çözeltisi (3 mM):** Stok GSH çözeltisinden 50 µl alınarak 450 µl BSA çözeltisi içinde seyreltilir. Her deney günü taze olarak hazırlanır.

**Standart GSH Çözeltileri:** Ara stok GSH çözeltisi metafosforik asit çözeltisiyle seyreltilerek 0,3 mM konsantrasyonda GSH çözeltisi elde edilir. Bu çözelti (0,3 mM) santrifüj edilir ve süpernatant kısmı 1:5 (h/h) olacak şekilde MOPS tamponu ile seyreltilir. Elde edilen bu 60 µM konsantrasyonda GSH çözeltisinden seyreltme çözeltisi (1:4, h/h, metafosforik asit: MOPS) kullanılarak 2, 4, 8, 10, 16, 20, 30, 40 ve 60 µM konsantrasyonda GSH standart çözeltileri, her deney günü taze olarak hazırlanır.

### 3.3.6. Cu-Zn SOD Tayini için Kullanılan Çözelti ve Reaktifler

**Tampon (50 mM 3-(sikloheksilamino)-1-propansülfonik asit (CAPS), 0,94 mM EDTA, pH 10,2):** 1107 mg CAPS ve 34,98 mg EDTA'nın distile sudaki çözeltisinin pH'sı 5 N NaOH çözeltisi ile 10,2'ye ayarlanır. Çözeltinin hacmi 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

**Substrat Karışımının Hazırlanışı (0,05 mM Ksantin Sodyum, 0,025 mM p-iyodonitrotetrazolium viyole (İNT)):** 0,871 mg ksantin sodyum ve 1,264 mg İNT tartılarak 100 ml yukarıda hazırlanan tamponda çözülür. Her deney günü taze olarak hazırlanır.

**Ksantin Oksidaz (80 Ü/L):** Ksantin oksidazın distile su içerisindeki çözeltisidir.

**Standart SOD Çözeltileri (0,81-26,06 Ü/ml):** Stok SOD çözeltisinin (6515 Ü/ml) fosfat tamponuyla (pH 7,4) seyreltilmesi ile hazırlanır.

### 3.3.7. GPx Tayini için Kullanılan Çözelti ve Reaktifler

**Tris tamponu (50 mM):** 0,606 g trisin 100 ml distile suda çözülmesiyle hazırlanır.

**Reaksiyon Ortamı (1 mM EDTA, 2 mM GSH, 0,2 mM β-NADPH, 4 mM sodyum azid, 1000 Ü/L glutatyon redüktaz):** 37,2 mg EDTA, 61,4 mg GSH, 16,68 mg β-NADPH ve 1000 Ü/L glutatyon redüktaz 100 ml tris tamponunda çözülerek hazırlanır.

**Tert-Bütil Hidroperoksit:** Distile su içerisinde 8,8 mM konsantrasyonda hazırlanır.

**Standart GPx Çözeltileri (0,08-10,24 Ü/ml):** 111 Ü/ml stok GPx çözeltisinin fosfat tamponuyla (pH 7,4) seyreltilmesi ile hazırlanır.

### 3.3.8. Katalaz Tayini için Kullanılan Çözeltiler

**Fosfat Tamponu pH 7,0 (50 mM):** 6,81 g potasyum dihidrojen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) tartılır ve 1000 ml'ye distile su ile tamamlanır (A çözeltisi). 8,90 g disodyum hidrojen fosfat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 1000 ml'ye distile su ile tamamlanır (B çözeltisi). A çözeltisi ile B çözeltisi 1:1,5 (h/h) oranında karıştırılır ve pH 7,0'a ayarlanır.

**Hidrojen Peroksit Çözeltisi (30 mM):** 0,34 ml hidrojen peroksit (% 30) alınır ve fosfat tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır.

**Stok Katalaz Çözeltisi (14750 Ü/ml):** 18 mg katalazın (3356 Ü/mg) 4 ml fosfat tamponunda (pH 7,0) çözülmesiyle hazırlanır.

**Katalaz Ara Stok Çözeltisi (510 Ü/ml):** 350 µl katalaz stok çözeltisi fosfat tamponu ile 10 ml'ye tamamlanır.

**Standart Katalaz Çözeltileri:** Katalaz ara stok çözeltisinden hareketle fosfat tamponu ile seyreltilerek 2,5; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35 ve 40 Ü/ml katalaz standart çözeltileri hazırlanır.

### 3.3.9. Protein Tayini için Kullanılan Çözelti ve Reaktifler

**BSA Stok Çözeltisi (500 µg/ml):** 25 mg BSA'nın 50 ml distile suda çözülmesiyle hazırlanır.

**BSA Standart Çözeltileri:** BSA stok çözeltisinden hareketle distile su ile seyreltilerek 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300 µg/ml'lik standartlar hazırlanır.

**Sodyum Hidroksit (0,5 N):** 2 g sodyum hidroksit tartılır ve 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

**Sodyum Karbonat Çözeltisi (% 10, a/h):** 10 g sodyum karbonat tartılır ve 100 ml'ye 0,5 N sodyum hidroksit çözeltisi ile tamamlanır.

**Bakır Sülfat Çözeltisi (% 1, a/h):** 1 g bakır sülfat tartılır ve 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

**Potasyum Sodyum Tartarat Çözeltisi (% 2, a/h):** 2 g potasyum sodyum tartarat tartılır ve 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.



**Bakır Reaktifi:** 20 ml % 10'luk sodyum karbonat, 1 ml % 1'lik bakır sülfat ve 1 ml % 2'lik potasyum sodyum tartaratın karıştırılması ile taze olarak hazırlanır.

**Folin Fenol Reaktifi:** 5 ml folin fenolün 50 ml'ye distile su ile tamamlanması ile hazırlanır.

### 3.3.10. Hücre Döngüsü ve Apoptozun Belirlenmesi için Kullanılan Çözeltiler

**Propidyum İyodür Çözeltisi (0,1 mg/ml):** 10 mg propidyum iyodürün 100 ml distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlanır. Çözelti 0,22 µm por açıklığına sahip filtreden süzülür ve +4°C'de karanlık ortamda saklanır.

**RNAaz Çözeltisi:** 0,1 mg RNAaz, 100 ml 2 mM MgCl<sub>2</sub> içeren PBS içinde çözülür ve 1ml'lik hacimlere bölünerek -20°C'de saklanır.

**Fosfat Tamponu:** 1 adet PBS tabletinin 200 ml distile suda çözülmesiyle hazırlanır.

### 3.3.11. Hücre Kültür Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

**Stok Perflorooktanoik Asit Çözeltisi (350 mg/ml):** PFOA'nın DMSO içerisinde hazırlanmış çözeltisidir. Her deney günü taze olarak hazırlanır. Çözelti ışıktan korunarak saklanır.

### Vero Hücre Kültürünün Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler

**Hücre Kültürü Ortamı:** 500 ml RPMI içerisine, 50 ml fetal dana serumu, 5 ml penisilin-streptomisin ve 5 ml L-glutamin eklenerek hazırlanır.

### Sitotoksisite Testlerinde Kullanılan Çözeltiler

**Stok Taurin Çözeltisi (500 mM):** Taurinin distile suda hazırlanmış çözeltisidir. Her deney günü taze olarak hazırlanır.

**Stok Koenzim Q<sub>10</sub> Çözeltisi (3 mM):** KoQ<sub>10</sub>'un mutlak etanol içerisinde ultrasonik banyo yardımıyla çözülmesi ile hazırlanan taze çözeltisidir. Çözelti ışıktan korunmalıdır.

**MTT Çözeltisi (5 mg/ml) :** MTT'nin PBS içerisinde çözülmesi ile hazırlanır. Çözelti 0,2 µm por çapındaki filtreden geçirilir ve ışıktan korunarak -20°C'de saklanır.

### **ROB Tayini için Kullanılan Çözeltiler**

**Stok DCFH-DA Çözeltisi (20 mM):** DCFH-DA'nin DMSO içerisinde çözülmesi ile hazırlanır. Çözelti 0,2 µm por çapındaki filtreden geçirilir ve -20°C'de 1 ay süreyle saklanır.

**Stok Tert-Bütil Çözeltisi (150 mM):** Tert-bütil hidroperoksitin hücre kültür ortamında seyreltilmesi ile hazırlanan çözeltisidir. Her deney günü taze olarak hazırlanır.

### **3.4. Deney Düzeni ve İncelenen Parametreler**

#### **3.4.1. Deney Hayvanlarının Sağlanması ve Grupların Oluşturulması**

##### **Kullanılan Hayvanlar**

Deney hayvanları çalışmalarını yürütebilmek amacıyla, Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'ndan etik kurul izni alınmıştır (Tarih:13.02.2013, Toplantı Sayısı: 2, Karar no: 13/33).

Deneylerde, Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nden sağlanan 30-35 g ağırlığında, Balb/c türü yetişkin (10 haftalık) erkek fareler kullanılmıştır. Hayvanlar, % 40-50 bağıl nem içeren, 12 saat gece 12 saat gündüz koşulları sağlanan hayvan laboratuvarında barındırılmış ve normal yem ve su ile herhangi bir kısıtlama olmadan beslenmiştir.

Her gün tartılan hayvanlara, ağırlıklarına uygun olarak hesaplanan taze hazırlanmış madde çözeltileri veya taşıyıcılar 10 µl/g hacimde uygulanmıştır.

Olası gün içi değişkenlikleri en aza indirmek için bütün hayvan gruplarına madde veya taşıyıcı uygulaması sabah 09.00-10.00 arasında yapılmış ve hayvanların dekapitasyonları en geç saat 11.00'de tamamlanmıştır.

### Deney Grupları

Deney hayvanı grupları aşağıda belirtilen şekilde oluşturulmuştur. Kontrol gruplarında (su ve mısır yağı) 6, PFOA ve antioksidan madde uygulanan gruplarda ise 7 hayvan kullanılmıştır.

1. **Kontrol Grubu (su) (n=6):** Hayvanlara 10 gün süreyle, PFOA'nın amonyum tuzu olan amonyum perflorooktanoik asitin ve taurinin çözücüsü olan deiyonize su intragastrik yoldan verilmiştir. Son uygulamadan 24 saat sonra hayvanlara ötenazi uygulanmıştır.
2. **Kontrol Grubu (mısır yağı) (n=6):** KoQ<sub>10</sub> için taşıyıcı olarak kullanılan mısır özü yağı, 5 gün süreyle oral yoldan hayvanlara verilmiş ve son uygulamadan 24 saat sonra hayvanlara ötenazi uygulanmıştır.
3. **PFOA Grubu (15mg/kg) (n=7):** Hayvanlara 15 mg/kg/gün dozda APFO deiyonize suda çözülerek intragastrik yoldan 10 gün süreyle verilmiştir. Son dozdan 24 saat sonra hayvanlara ötenazi uygulanmıştır.
4. **PFOA Grubu (30 mg/kg) (n=7):** Hayvanlara 30 mg/kg/gün APFO, deiyonize suda çözülerek intragastrik yoldan 10 gün süreyle uygulanmıştır. Son dozdan 24 saat sonra hayvanlara ötenazi uygulanmıştır.
5. **Taurin Grubu (n=7):** Bu gruptaki hayvanlara suda çözülmüş taurin 5 gün süreyle 100 mg/kg dozda oral yoldan verilmiş ve son dozdan 24 saat sonra hayvanlara ötenazi uygulanmıştır.
6. **Taurin + PFOA Grubu (n=7):** Bu gruptaki hayvanlara suda çözülmüş taurin 100 mg/kg dozda 5 gün süreyle oral yoldan uygulanmış ardından hayvanlara 10 gün süreyle APFO (30 mg/kg) intragastrik yoldan verilmiştir. Son dozdan 24 saat sonra hayvanlara ötenazi uygulanmıştır.
7. **KoQ<sub>10</sub> Grubu (n=7):** Bu gruptaki hayvanlara mısır yağında çözülmüş KoQ<sub>10</sub>, 5 gün süreyle 50 mg/kg dozda oral yoldan verilmiş ve son dozdan 24 saat sonra hayvanlara ötenazi uygulanmıştır.
8. **KoQ<sub>10</sub> + PFOA Grubu (n=7):** Bu gruptaki hayvanlara mısır yağında çözülmüş KoQ<sub>10</sub>, 50 mg/kg dozda 5 gün süreyle oral yoldan uygulanmış, ardından hayvanlara 10 gün süreyle APFO (30 mg/kg) intragastrik yoldan verilmiştir. Son dozdan 24 saat sonra hayvanlara ötenazi uygulanmıştır.

### 3.4.2. Doku Örneklerinin Hazırlanması

Deney gruplarındaki hayvanlara madde uygulanması sonrasında, hayvanlar ketamin-ksilazin anestezisi altında, servikal dislokasyon uygulanarak dekapite edilmiş, karaciğer, beyin (beyin sapı dahil tüm serebral doku) ve böbrek dokuları çıkartılmıştır. Bütün çalışma süresince dokular buz içinde veya 0°C sıcaklıkta tutulmuştur. Doku örnekleri hemen temizlenerek, soğuk serum fizyolojik (% 0,9, a/h) ile yıkanmış ardından kurutulup tartılmıştır. Küçük miktar örnek dilimleri, rutin histolojik inceleme için % 10 nötral formalin tamponunda fikse edilmiştir. Kalan doku örnekleri lipid peroksidasyon ve toplam glutatyon düzeyleri ile enzim aktiviteleri çalışılmak üzere -80°C'lik derin dondurucuya kaldırılmıştır.

### 3.4.3. Histopatolojik Analiz

Dokuların histopatolojik olarak incelenmesi hematoksilin ve eozinle boyama yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

#### Doku Örneklerinin Tespiti ve Hematoksilin-Eozin ile Boyanması

1. Çıkarılan taze doku örnekleri nötral tamponlu %10'luk formalin içerisinde tespit edilir.
2. Doku örnekleri düşükten yüksek dereceye doğru alkol serilerinden (% 70, % 80, % 96, % 100) geçirilerek dehidrate edilir. Suyundan arındırılan doku örnekleri ksilol ile parlatılarak saydamlaştırılır. Bu işlemler, Leica ASP 300 doku takip cihazı kullanılarak yapılmıştır.
3. Doku örnekleri, 60°C'de (Shandan Histocentre 2 cihazında) eritilen parafin bloklara gömülür.
4. Örneklerden mikrotom ile 5 mikron kalınlığında kesitler alınır.
5. Kesitlerin parafini ksilolle uzaklaştırılır.
6. Kesitler boya cihazında (Thermo Shandan Varistain Gemini marka) hematoksilin–eozin ile boyanır ve entellan new ile kapatılır.
7. Bütün gruplardaki dokulardan hazırlanan bu kesitler (Nikon optiphot-2 model) ışık mikroskobu ile incelenir ve fotoğraflanır (Leica DMD108).

### 3.4.4. Oksidan/Antioksidan Parametrelerin Tayini

#### Doku Homojenatlarının Hazırlanması

1. Karaciğer, beyin ve böbrek doku örneklerinin % 10'luk homojenatları soğuk KCl tamponu ile cam-cam homojenizatör kullanılarak hazırlandı.
2. Lipid peroksidasyon tayini için tam homojenat kullanıldı.
3. Toplam GSH tayini için, tam homojenata % 6'lık metafosforik asit çözeltisi (homojenat:metafosforik asit, 5:1, h/h) eklendi, 4°C'de 4000 devir/dk'da 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant toplam GSH tayini için kullanıldı.
4. Antioksidan enzimlerin aktivite tayini için, tam doku homojenatları 4°C'de 4000 devir/dk'da 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı tekrar 4°C'de 13000 devir/dk'da 25 dk santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant kısmı kullanıldı.

#### Lipid Peroksidasyonunun Ölçülmesi

Lipid peroksidasyonu, Ohkawa ve ark.'ları (378) tarafından tanımlanan ve tiyobarbitirik asit reaktif materyal (TBARS) oluşumu esasına dayalı spektrofotometrik bir yöntem ile belirlenmiştir.

Lipid peroksidasyon son ürünlerinden olan malondialdehit tayini, tiyobarbitirik asit (TBA) ile MDA'nın oluşturduğu pembe renkli kompleksin renk şiddetinin 535 nm veya civarında spektrofotometrik bir yöntem ile ölçülmesi esasına dayanmaktadır (378).

#### TBARS Miktarı Ölçüm Yönteminin Uygulanışı

1. 0,2 ml tam doku homojenatı (% 10 a/h) üzerine 0,2 ml SDS (% 8,1), 1,5 ml asetik asit (% 20), 1,5 ml TBA çözeltisi (% 0,8) ve 0,6 ml distile su eklenir ve karıştırılır.
2. Bu karışım 95°C'de çalkalamalı su banyosunda 1 saat süre ile inkübasyona bırakılır. Pembe renk oluşumu gözlenir.
3. Su banyosundan çıkartılan örnekler, buz içerisine alınıp, 10 dk süreyle soğutulur.
4. 1 ml distile su eklenir. 5 ml n-bütanol:piridin (15:1) karışıma ilave edilir ve 30 sn vortekslenerek ekstraksiyon yapılır.
5. 4000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilir.

6. Pembe renkli kompleksin bulunduğu üst faz alınır ve bütanol piridin körüne karşı 532 nm'de spektrofotometrik olarak okunur.
7. Aynı işlemler TMP standart çözeltileri için de uygulanır.

### **TBARS Miktarının Hesaplanması**

Her deney günü standart TMP çözeltileri kullanılarak, standart eğriler oluşturulur. Bu standart eğrilerden hareketle örneklerin TBARS düzeyleri hesaplanır. Sonuçlar *nmol/mg protein* olarak ifade edilir.

### **Toplam GSH Düzeyinin Ölçülmesi**

Toplam GSH düzeyi, Akerboom ve Sies (379) tarafından tanımlanmış olan yöntem kullanılarak ölçülmüştür.

Yöntem, DTNB'nin GSH veya GSSG varlığında ve GSH redüktazla katalizlenen bir reaksiyonla, NADPH tarafından sürekli olarak indirgenmesi esasına dayanır. Ortamdaki toplam GSH miktarı, reaksiyon kinetiğinin 412 nm'de spektrofotometrik olarak izlenmesi yoluyla belirlenir.

### **Toplam GSH Tayini Yönteminin Uygulanışı**

1. Sayfa 74'te anlatıldığı şekilde hazırlanan doku homojenatları % 6'lık metafosforik asit çözeltisi ile seyreltilir.
2. Örnekler 4000 rpm'de +4°C'de 10 dk santrifüj edilir ve süpernatant ayrılır.
3. Spektrofotometre küvetine 1 ml MOPS/EDTA tamponu konur. Üzerine sırasıyla, 100 µl süpernatant, 20 µl DTNB, 20 µl GSH redüktaz ve 50 µl NADPH eklenip, küvet alt üst edilerek karıştırılır.
4. Kör deney için, örnek yerine MOPS/EDTA tamponu kullanılır.
5. Elde edilen karışımın absorbansındaki değişim, spektrofotometrenin kinetik modu kullanılarak 412 nm de köre karşı iki dakika süreyle izlenir.

### **Toplam GSH Miktarının Hesaplanması**

Örneklerin toplam GSH içeriği, her deney günü GSH standart çözeltileri ile hazırlanan standart eğriler kullanılarak hesaplanır ve sonuçlar *µmol/mg protein* olarak ifade edilir.

## **Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Ölçülmesi**

### **Cu-Zn SOD Aktivitesinin Ölçülmesi**

Örneklerin Cu-Zn SOD aktivitesi Arthur ve Boyne (380) tarafından tanımlanan yöntemle belirlenmiştir.

Bu yöntemde, ksantin-ksantin oksidaz sistemiyle süperoksit radikali üretilir. Yöntem, oluşan süperoksit radikalının, iyodonitrotetrazolyum (İNT) ile reaksiyon vermesi sonucu oluşan viyole renkli formazon boyasının verdiği renk şiddetinin 505 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Ortamdaki Cu-Zn SOD aktivitesine bağlı olarak bu reaksiyon önlenir ve % inhibisyon değeri hesaplanır (380).

### **Cu-Zn SOD Aktivitesi Ölçüm Yönteminin Uygulanışı**

1. Bir mililitre hacimli spektrofotometre küvetine 850 µl substrat karışımı (0,05 mM Ksantin sodyum, 0,025 mM İNT) konur. Üzerine 25 µl sayfa 74'te anlatıldığı şekilde hazırlanan homojenat ve 125 µl ksantin oksidaz (80 Ü/L) eklenir ve karıştırılır.
2. Spektrofotometrenin kinetik modu kullanılarak, absorbanstaki artış 505 nm'de 3 dk süreyle izlenir.
3. Standart eğri oluşturmak için 0,81-26,06 Ü/ml aralığındaki konsantrasyonlarda Cu-Zn SOD içeren standartlar hazırlanır ve yukarıdaki işlemler standartlar için de uygulanır.
4. Her deney günü kör okuma için örnek yerine 25 µl distile su kullanılarak paralel bir kör deney yapılır.
5. Her deney günü, standart SOD çözeltileri kullanılarak hazırlanan standart eğriler yardımıyla örneklerin Cu-Zn SOD aktiviteleri hesaplanır. Sonuçlar *Ü/mg protein* olarak ifade edilir.

### Cu-Zn SOD Aktivitesinin Hesaplanması

Absorbans ölçümlerinden sonra kör, numune ve standartlar için dakikadaki absorbans değişimi ( $\Delta A$ ) hesaplanır:

$$\Delta A / \text{dak. (numune, standart ve kör için)} = \frac{A_2 - A_1}{3}$$

$A_1 = 0$ . sn'deki absorbans

$A_2 = 180$ . sn'deki absorbans

Köre karşı % inhibisyon değerleri, standartlar ve numune için aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanır:

$$\% \text{ inhibisyon değeri} = 100 - \frac{(\Delta A_{\text{std/dk}} \times 100)}{\Delta A_{\text{kör/dk}}}$$

Standartlar için elde edilen % inhibisyon değerleri, standart konsantrasyonlarının ( $\text{Ü/ml}$ ) logaritmalarına karşı grafiğe geçirilerek doğru denklemi oluşturulur. Numuneler için elde edilen % inhibisyon değerleri, standart eğri kullanılarak belirlenir.

Sonuçlar protein içeriği üzerinden hesaplanarak *Ü/mg protein* olarak ifade edilir.

### GPx Aktivitesinin Ölçülmesi

Örneklerin, GPx aktivitesi Pleban ve ark.'ları (381) tarafından tanımlanan yöntemle ölçülmüştür.

GPx aktivite tayin yönteminin esası,  $\text{H}_2\text{O}_2$  varlığında indirgenmiş GSH'nin, GPx tarafından okside glutatyona (GSSG) dönüştürülmesi ve GSSG'nin glutatyon redüktaz enzimi aracılığıyla tekrar GSH'a redüklenmesi sırasında ortamda bulunan NADPH'in kullanılması ve buna bağlı olarak NADPH absorbansında meydana gelen azalmanın 340 nm dalga boyunda izlenmesi esasına dayanır (381).



### **GPx Aktivitesi Ölçüm Yönteminin Uygulanışı**

1. Bir mililitre hacimli spektrofotometre küvetine 980 µl reaksiyon karışımı (1 mM EDTA, 2 mM GSH, 0,2 mM β-NADPH, 4 mM sodyum azid, 1000 Ü/L glutatyon redüktaz) koyulur. Üzerine 20 µl sayfa 74'te anlatıldığı şekilde hazırlanan homojenat eklenir ve 5 dk süreyle oda sıcaklığında inkübe edilir.
2. Karışıma 10 µl tert-bütil hidroperoksit eklenerek reaksiyon başlatılır.
3. NADPH absorbansındaki azalma 340 nm'de 3 dk süreyle izlenir.
4. Her deney günü örnek yerine 10 µl distile su kullanılarak paralel bir kör deney yapılır.
5. Her deney günü örnekler yerine standart GPx çözeltileri kullanılarak standart eğri oluşturulur.

### **GPx Aktivitesinin Hesaplanması**

Her bir absorbans değerinden kör değeri çıkartılır ve elde edilen sonuç 3'e bölünür ve dakikadaki absorbans farkı hesaplanır. Hazırlanan standart eğriler yardımıyla, örneklerin GPx aktiviteleri hesaplanır.

Sonuçlar protein içeriği üzerinden hesaplanarak *Ü/mg protein* olarak ifade edilir.

### **Katalaz Aktivitesinin Ölçülmesi**

Örneklerin katalaz aktivitesi Aebi (321) tarafından tanımlanan yöntem kullanılarak ölçülmüştür.

Yöntemin esası, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in katalaz tarafından yıkımlanması sırasında, absorbansta meydana gelen azalmanın spektrofotometrik olarak 240 nm'de izlenmesi yoluyla ölçülmesine dayanmaktadır (321).

### **Katalaz Aktivitesi Ölçüm Yönteminin Uygulanışı**

1. Spektrofotometre küvetine 2 ml fosfat tamponu konur. Üzerine 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenerek fosfat tamponuna karşı 240 nm'de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in verdiği absorbans kontrol edilir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in absorbansı yaklaşık 0,5 olmalıdır.
2. Örnek okumaları için; spektrofotometre küvetine 2 ml fosfat tamponu ve sayfa 74'te anlatıldığı şekilde hazırlanan 1 ml homojenat eklenir.

3. Küvet alt üst edilerek karıştırılır ve absorbanstaki azalma 240 nm'de 30 sn süreyle izlenir.
4. Aynı işlemler katalaz standart çözeltileri için de uygulanır.
5. Kör deney, spektrofotometre küvetine 2 ml fosfat tamponu ve 1 ml homojenat eklenerek yapılır.

### **Katalaz Aktivitesinin Hesaplanması**

Her deney günü örnekler yerine standart katalaz çözeltileri kullanılarak standart eğriler elde edilir. Bu eğriler kullanılarak örneklerin katalaz aktiviteleri hesaplanır. Sonuçlar *Ü/mg protein* olarak ifade edilir.

### **3.4.5. Protein Tayini**

Örneklerin protein tayini Lowry ve ark.'larının (382) tanımladığı yöntemle ölçülmüştür.

Yöntem, tirozin ve triptofan artıklarının alkali bakır ve fenol reaktifi ile verdikleri mavi renkli kompleksin renk şiddetinin spektrofotometrik bir yöntemle 540 nm'de ölçülmesi esasına dayanır.

### **Protein Tayin Yönteminin Uygulanışı**

1. Distile su ile seyreltilmiş 500 µl doku homojenatının üzerine 500 µl bakır reaktifi eklenir ve 30 sn vortekslenir.
2. Oda sıcaklığında 10 dakika süre ile inkübasyona bırakılır.
3. Daha sonra bu örneklerin üzerine 1500 µl folin fenol reaktifi eklenir ve tüpler vortekslenir.
4. Tüpler, 10 dakika süreyle 50°C'lik su banyosunda bekletilir.
5. Su banyosundan alınan örnekler, köre karşı 540 nm'de okunur.
6. Her deney günü örnekler yerine standart BSA çözeltileri (10, 25, 50, 75, 100, 200, 300 µg/ml) kullanılarak standart eğri elde edilir. Bu eğriden yararlanılarak, örneklerin protein içeriği hesaplanır.

### **3.4.6. Hücre Döngüsü ve Apoptozun Belirlenmesi**

Hücre döngüsündeki değişiklikler ve apoptoz akım sitometri yöntemiyle analiz edilmiştir.

### **Akım Sitometri Yönteminin Uygulanışı**

1. Fare karaciğer ve böbrek dokuları bistüri yardımıyla parçalanarak PBS içinde hücre süspansiyonu haline getirilir.
2. Hücre süspansiyonları karıştırılarak % 80'lik etanol içinde fikse edilir ve +4°C'de 1 gece inkübe edilir.
3. Analiz öncesinde hücreler santrifüj edilerek, 1 ml PBS'de yıkanır ve hücreler üzerine tekrar 2 ml PBS ilave edilir.
4. Hücrelere 70 µl DNaz içermeyen RNaz ve daha sonra da 100 µl propidyum iyodür (0,1 mg/ml) ilave edilir ve hücreler hafifçe karıştırılır.
5. Hücreler 37°C'de karanlık ortamda 1 saat inkübasyon sonrasında akım sitometri cihazında (EPICS XLMCL, Beckman Coulter Inc., USA) analiz edilir.
6. Geç apoptozu gösteren subG1 piki ve hücre siklusu analizi iki değişkenli histogramlardan, MultiCycle (Phoenix Flow Systems San Diego,CA, USA) yazılım programı kullanılarak hesaplanır.

### **3.4.7. Vero Hücre Kültürlerinde Yapılan Çalışmalar**

Hücre kültürü çalışmaları ATCC'den sağlanan vero hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### **Vero Hücre Kültürlerinin Çoğaltılması**

Hücreler bölüm'de tanımlandığı şekilde hazırlanan hücre kültürü ortamında, % 5 CO<sub>2</sub> ve % 95 O<sub>2</sub> içeren nemli atmosferde 37°C'de, 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür kaplarında üretilmiştir. Kültür ortamı her 3 günde 1 değiştirilmiş ve kültürler haftada 1 kez tripsinlenerek alt kültürlere ayrılarak çoğaltılmıştır.

#### **Vero Hücrelerinin PFOA ile İnkübasyonu**

1. Vero hücreleri yaklaşık % 90 oranında yoğunluğa ulaştığında, tripsinlenir ve hücre kültürü ortamında süspande edilir.
2. Hücreler, 96 kuyucuklu kültür plaklarına (kör kuyucukları hariç) 100 µl hacimde ekilir.
3. Kültür plaklarındaki hücreler 24 saat süreyle 37°C'lik inkübatörde inkübe edilir.

4. Bu sürenin sonunda, hücreler PFOA'nın 8 farklı konsantrasyonuna (5, 10, 25, 50, 100, 200, 400, 500, 600, 800  $\mu\text{M}$ ) maruz bırakılır. PFOA, DMSO'da çözülmüş olup hücrelere uygulanan en yüksek DMSO konsantrasyonu % 0,1'i geçmemiştir. Her konsantrasyon 4'lü veya 8'li çalışılmıştır. Ayrıca aynı koşullarda madde içermeyen "kontrol kültürleri" (hücre ortamı ve DMSO) ve hücre içermeyen "kör deney" çalışılmıştır.
5. PFOA'nın zamana bağlı sitotoksik etkilerini değerlendirmek için hücreler 24, 48 ve 72 saat süreyle % 5  $\text{CO}_2$  ve % 95  $\text{O}_2$  içeren nemli atmosferde  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilir.

#### **Vero Hücrelerinin Taurin ile Ön-İnkübasyonu**

1. 96 kuyucuklu hücre kültür plağına ekilen hücreler, ortama PFOA eklenmeden önce taurin (0,5; 1 ve 5 mM konsantrasyonda) ile 4 saat süreyle ön-inkübasyona bırakılmıştır. Taurin, distile suda çözülmüş olup hücrelere uygulanan en yüksek su oranı % 1'i geçmemiştir.
2. Ön-inkübasyonun ardından hücreler, PFOA'nın 400 ve 500  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları ile 24 saat süreyle  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır. Her konsantrasyon 4'lü veya 8'li çalışılmıştır. Ayrıca aynı koşullarda madde içermeyen "kontrol kültürleri" (hücre ortamı ve su + DMSO) ve hücre içermeyen "kör deney" çalışılmıştır.

#### **Vero Hücrelerinin KoQ<sub>10</sub> ile Ön-İnkübasyonu**

1. 96 kuyucuklu hücre kültür plağına ekilen hücreler, ortama PFOA eklenmeden önce KoQ<sub>10</sub> (1, 5 ve 30  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda) ile 4 saat süreyle ön-inkübasyona bırakılmıştır. KoQ<sub>10</sub>, etanolde çözülmüş olup hücrelere uygulanan en yüksek etanol konsantrasyonu % 1'i geçmemiştir.
2. Ön-inkübasyonun ardından hücreler, PFOA'nın 400 ve 500  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları ile 24 saat süreyle  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır. Her konsantrasyon 4'lü veya 8'li çalışılmıştır. Ayrıca aynı koşullarda madde içermeyen "kontrol kültürleri" (hücre ortamı ve etanol + DMSO) ve hücre içermeyen "kör deney" çalışılmıştır.

### MTT ile Sitotoksisite Tayini

PFOA'ya ve antioksidan (Taurin ve KoQ<sub>10</sub>) + PFOA'ya maruz bırakılan hücrelerdeki canlılık düzeyi, Mossman (368) tarafından tanımlanan ve sayfa 58'de anlatılan MTT testi ile ölçülmüştür.

### MTT Testinin Uygulanışı

1. İnkübasyon sürelerinin sonunda, her bir kuyucuğa (kör ve kontrol grupları dahil) 10 µl MTT çözeltisi (5 mg/ml) eklenir ve hücreler 2 saat süreyle 37°C'de (368) inkübasyona bırakılır.
2. İnkübasyon sonunda, MTT içeren kültür ortamı uzaklaştırılır ve oluşan formazan kristallerinin çözünmesini sağlamak için her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklenir.
3. Hücre plağı 5 dk süreyle plak karıştırıcıda karıştırılır.
4. Oluşan rengin absorbansı 540 nm dalga boyunda mikropalak okuyucuda spektrofotometrik olarak okunur.

### Hücre Canlılığın Hesaplanması

Kontrol hücreleri ile PFOA'ya maruz bırakılan (ve/veya antioksidan + PFOA) hücrelerin verdiği absorbans değerinden kör deney için ölçülen absorbans değeri çıkartılır. PFOA'ya ve diğer maddelere (antioksidanlar, antioksidan + PFOA) maruz bırakılan hücrelerin canlılık yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanır:

$$\text{Canlılık Yüzdesi} = 100 \times \frac{A_{\text{PFOA}} - A_{\text{kör}}}{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{kör}}}$$

### 2',7'-diklorofloresin diasetat (DCFH-DA) ile ROB Tayini

Hücrelerde PFOA maruziyetini takiben meydana gelebilecek reaktif oksijen bileşiklerinin miktarı, 2',7'-diklorofloresin diasetat (DCFH-DA) reaktifi kullanılarak belirlenmiştir. DCFH-DA, hücre içine alındığında hücredeki esterazlarla floresan özelliği olmayan 2',7'-diklorofloresin bileşiğine (DCFH) hidroliz olur ve daha sonra ROB varlığında hızla yüksek floresan özelliği olan

2',7'-diklorofloresin (DCF) bileşimine dönüşür. Oluşan bu bileşiğin floresans şiddeti, 485 nm eksitasyon 535 nm emisyon dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür (42, 51, 383-385).

### **2',7'-diklorofloresin diasetat ile ROB Tayini Ölçüm Yönteminin Uygulanışı**

1. Hücreler 96 kuyucuklu hücre kültür plaklarına ekilir ve 24 saat PFOA (10, 50, 100, 400, 500 ve 800 µM konsantrasyonlarda) ile inkübe edilir.
2. 24 saat sonunda hücre ortamı uzaklaştırılır ve hücreler Ca<sup>+2</sup> ve Mg<sup>+2</sup> içermeyen PBS ile 2 kez yıkanır.
3. Kuyucuklara 100'er µl DCFH-DA çözeltisinden (10 µM) eklenir ve hücreler 37°C'de 45 dk süre ile inkübe edilir.
4. Örneklerin verdiği floresans 485 nm eksitasyon 535 nm emisyon dalga boyunda ölçülür.
5. Bu deneyde pozitif kontrol olarak tert-bütül hidroperoksit kullanılmıştır.
6. Deney ışıktan etkilendiği için karanlık ortamda yapılır.

### **Floresans Düzeyinin hesaplanması**

Kontrol, pozitif kontrol ve PFOA'ya maruz bırakılan hücrelerin verdiği floresans değerlerinden kör deneyin verdiği floresans değeri çıkartılır. PFOA'ya ve pozitif kontrole maruz bırakılan hücrelerin % floresans düzeyleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır:

$$\% \text{ Floresans Düzeyi} = 100 \times \frac{A_{\text{PFOA}} - A_{\text{kör}}}{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{kör}}}$$

### **3.4.8. İstatistiksel Değerlendirme**

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi SPSS 18 programında Kruskal Wallis analizini takiben Mann-Whitney U-testi kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart hata (SEM) olarak verilmiş,  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. *In Vivo* Çalışma Sonuçlarına İlişkin Bulgular

#### 4.1.1. PFOA ve Antioksidan Madde Uygulanan Farelerin Vücut Ağırlıklarına İlişkin Bulgular

Düşük (15 mg/kg) ve yüksek doz (30 mg/kg) PFOA uygulanan gruplardaki hayvanların vücut ağırlıkları ortalamaları, su kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, doza bağlı olarak önemli derecede (sırasıyla,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,03$ ) azalmıştır. Taurin ve 30 mg/kg PFOA'nın birlikte uygulandığı grup ile KoQ<sub>10</sub> ve 30 mg/kg PFOA'nın birlikte uygulandığı gruplarda da kontrol gruplarına göre vücut ağırlıklarında azalma gözlenmiştir. Tek başına taurin veya KoQ<sub>10</sub> uygulanan gruplarda yer alan hayvanların ağırlıklarında önemli bir değişiklik meydana gelmemiştir (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin vücut ağırlıklarına ilişkin veriler.

Grup	İlk Vücut Ağırlığı (g)	Son Vücut Ağırlığı (g)	Toplam Ağırlık Değişimi (%)
Kontrol (su)	32,83 ± 0,91	33,00 ± 0,82	1,02 ± 4,26
PFOA (15 mg/kg)	32,57 ± 1,04	28,86 ± 0,83	-11,24 ± 1,64 <sup>a</sup>
PFOA (30 mg/kg)	31,86 ± 0,96	26,71 ± 1,41	-15,80 ± 4,74 <sup>b</sup>
Taurin (100 mg/kg)	33,86 ± 1,14	32 ± 1,20	-5,46 ± 1,71
Taurin + PFOA (30 mg/kg)	32,43 ± 0,84	29,14 ± 1,39	-10,11 ± 3,60
Kontrol (mısır yağı)	33,00 ± 1,24	31,00 ± 1,51	-6,15 ± 2,22
KoQ <sub>10</sub> (50 mg/kg)	35,14 ± 0,59	33,29 ± 0,64	-5,19 ± 2,00
KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)	33,86 ± 0,40	27,57 ± 0,92	-18,35 ± 3,49 <sup>c,d</sup>

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. Su ve mısır yağı kontrol grupları için n= 6, diğer gruplar için n= 7.

<sup>a</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p < 0,05$ . <sup>b</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p < 0,03$ . <sup>c</sup>Mısır yağı grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p < 0,02$ . <sup>d</sup>KoQ<sub>10</sub> grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p < 0,02$ .

#### 4.1.2. PFOA ve Antioksidan Madde Uygulamasının Farelerin Karaciğer Ağırlıkları Üzerindeki Etkisi

Farelerin bağıl karaciğer ağırlıkları (karaciğer ağırlığı/toplam vücut ağırlığı  $\times$  100), 15 ve 30 mg/kg PFOA verilen gruplarda, doza bağılı olarak önemli ( $p= 0,003$ ) derecede artış göstermiştir. Koruyucu olarak kullanılan maddeler ile 30 mg/kg PFOA'nın birlikte verildiği gruplarda da bağıl karaciğer ağırlıklarının kontrol gruplarına göre önemli derecede (su ve mısır yağı kontrolüne göre,  $p= 0,003$ ) artış gösterdiği belirlenmiştir. PFOA ile koruyucu maddenin birlikte verildiği hayvanların bağıl karaciğer ağırlıkları, ilgili koruyucunun tek başına uygulandığı hayvanların bağıl karaciğer ağırlıklarına oranla önemli derecede artış göstermiştir (taurin ve KoQ<sub>10</sub> grubuna göre,  $p= 0,002$ ) (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2.** Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin karaciğer ağırlıklarına ilişkin veriler.

Grup	Karaciğer Ağırlığı (g)	Bağıl Karaciğer Ağırlığı (g/100 g)
Kontrol (su)	1,80 $\pm$ 0,15	5,43 $\pm$ 0,37
PFOA (15 mg/kg)	4,49 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	15,54 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>
PFOA (30 mg/kg)	4,38 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	16,44 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup>
Taurin (100 mg/kg)	1,67 $\pm$ 0,05	5,23 $\pm$ 0,10
Taurin + PFOA (30 mg/kg)	4,70 $\pm$ 0,21 <sup>a,b</sup>	16,16 $\pm$ 0,44 <sup>a,b</sup>
Kontrol (mısır yağı)	1,70 $\pm$ 0,14	5,45 $\pm$ 0,33
KoQ <sub>10</sub> (50 mg/kg)	1,75 $\pm$ 0,04	5,27 $\pm$ 0,06
KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)	4,14 $\pm$ 0,35 <sup>c,d</sup>	14,92 $\pm$ 0,93 <sup>c,d</sup>

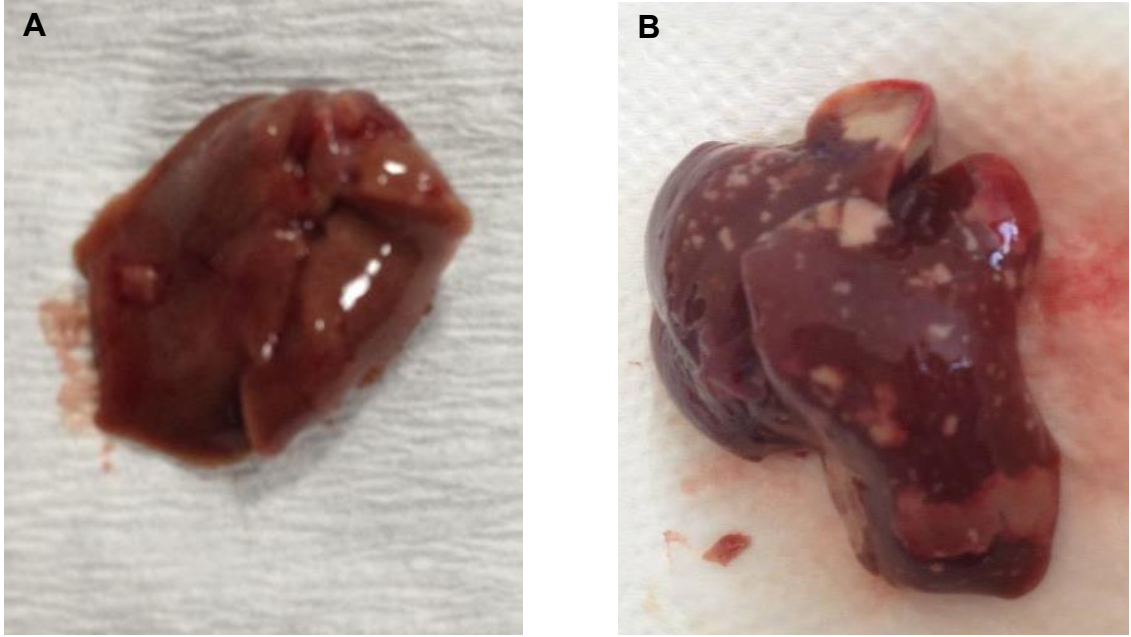
Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Su ve mısır yağı kontrol grupları için  $n= 6$ , diğer gruplar için  $n= 7$ .

<sup>a</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,003$ . <sup>b</sup>Taurin grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,002$ . <sup>c</sup>Mısır yağı grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,003$ . <sup>d</sup>KoQ<sub>10</sub> grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,002$ .



### Kontrol ve PFOA Uygulanan Fare Karaciğerlerinin Görüntüsü

PFOA uygulanan bütün gruplardaki hayvanların karaciğerleri üzerinde beyaz lekeler olduğu görülmüştür. Şekil 4.1'de kontrol (A) ve PFOA (B) uygulanan fare karaciğerlerinin fotoğraf makinesiyle çekilmiş görüntüleri verilmiştir.



**Şekil 4.1.** Kontrol ve PFOA uygulanan Balb/c fare karaciğerlerinin görüntüsü. **A**; su kontrol grubu ve **B**; 10 gün süreyle 15mg/kg PFOA uygulanan bir fareye ait karaciğer görüntüsü.

#### 4.1.3. PFOA ve Antioksidan Madde Uygulamasının Farelerin Beyin Ağırlıkları Üzerindeki Etkisi

Farelerin beyin ağırlıkları ortalamaları -tek başına veya PFOA ile birlikte KoQ<sub>10</sub> uygulanan gruplar dışında- gruplar arası farklılık göstermemektedir. Ancak bağıl beyin ağırlığı, yüksek doz PFOA (30 mg/kg) uygulanan grupta, su kontrol grubuna göre önemli ( $p < 0,05$ ) derecede artış göstermiştir. Bağıl beyin ağırlığı ortalaması ise düşük doz PFOA (15 mg/kg) verilen grupta su kontrol grubuna göre düşük düzeyde artış göstermiştir. Tek başına KoQ<sub>10</sub> uygulanan gruptaki beyin ağırlıkları ortalaması, mısır yağı kontrol grubuna göre önemli

derecede artış göstermiştir ( $p= 0,003$ ). Koenzim Q<sub>10</sub> ve PFOA verilen gruptaki ortalama beyin ağırlıkları ise sadece KoQ<sub>10</sub> verilen gruptakilere göre önemli derecede azalma göstermiştir ( $p= 0,002$ ) (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3.** Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin beyin ağırlıklarına ilişkin veriler.

Grup	Beyin Ağırlığı (g)	Bağıl Beyin Ağırlığı (g/100 g)
Kontrol (su)	0,42 ± 0,01	1,28 ± 0,05
PFOA (15 mg/kg)	0,41 ± 0,01	1,45 ± 0,06
PFOA (30 mg/kg)	0,39 ± 0,01	1,49 ± 0,08 <sup>c</sup>
Taurin (100 mg/kg)	0,41 ± 0,005	1,30 ± 0,05
Taurin + PFOA (30 mg/kg)	0,41 ± 0,002	1,41 ± 0,06
Kontrol (mısır yağı)	0,41 ± 0,003	1,34 ± 0,07
KoQ <sub>10</sub> (50 mg/kg)	0,44 ± 0,004 <sup>a</sup>	1,31 ± 0,03
KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)	0,39 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,42 ± 0,05

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. Su ve mısır yağı kontrol grupları için n= 6, diğer gruplar için n= 7.

<sup>a</sup>Mısır yağı grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,003$ . <sup>b</sup>KoQ<sub>10</sub> grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,002$ . <sup>c</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p< 0,05$ .

#### 4.1.4. PFOA ve Antioksidan Madde Uygulamasının Farelerin Böbrek Ağırlıkları Üzerindeki Etkisi

Böbrek ağırlık ortalamaları, PFOA uygulanan (15 ve 30 mg/kg) gruplarda su kontrol grubuna göre önemli derecede azalmakla birlikte (sırasıyla,  $p= 0,005$ ;  $p< 0,03$ ); bağıl böbrek ağırlıkları dikkate alındığında gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. PFOA'nın taurin ve KoQ<sub>10</sub> ile birlikte verildiği gruplardaki böbrek ağırlık ortalamaları, su ve mısır yağı kontrol gruplarına göre önemli derecede azalmıştır (sırasıyla,  $p= 0,007$ ,  $p< 0,02$ ). Bağıl böbrek ağırlıklarına göre karşılaştırma yapıldığında ise;

PFOA'nın taurin ile birlikte uygulandığı gruptaki ağırlık azalmasının, kontrol grubuna ve sadece PFOA uygulanan gruba göre önemli olduğu görülmüştür (sırasıyla,  $p < 0,04$ ,  $p = 0,004$ ). KoQ<sub>10</sub> ile PFOA'nın birlikte uygulandığı gruptaki ağırlık azalması ise mısır yağı kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemsizken, sadece PFOA uygulanan gruba göre istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0,05$ ) (Tablo 4.4).

**Tablo 4.4.** Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin böbrek ağırlıklarına ilişkin veriler.

Grup	Böbrek Ağırlığı (g)	Bağıl Böbrek Ağırlığı (g/100 g)
Kontrol (su)	0,47 ± 0,02	1,44 ± 0,05
PFOA (15 mg/kg)	0,39 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,34 ± 0,03
PFOA (30mg/kg)	0,39 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,48 ± 0,04
Taurin (100 mg/kg)	0,41 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,29 ± 0,04 <sup>c</sup>
Taurin + PFOA (30 mg/kg)	0,37 ± 0,01 <sup>d,e</sup>	1,27 ± 0,03 <sup>c,h</sup>
Kontrol (mısır yağı)	0,43 ± 0,02	1,41 ± 0,05
KoQ <sub>10</sub> (50 mg/kg)	0,47 ± 0,01	1,40 ± 0,02
KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)	0,37 ± 0,01 <sup>f,g</sup>	1,34 ± 0,04 <sup>i</sup>

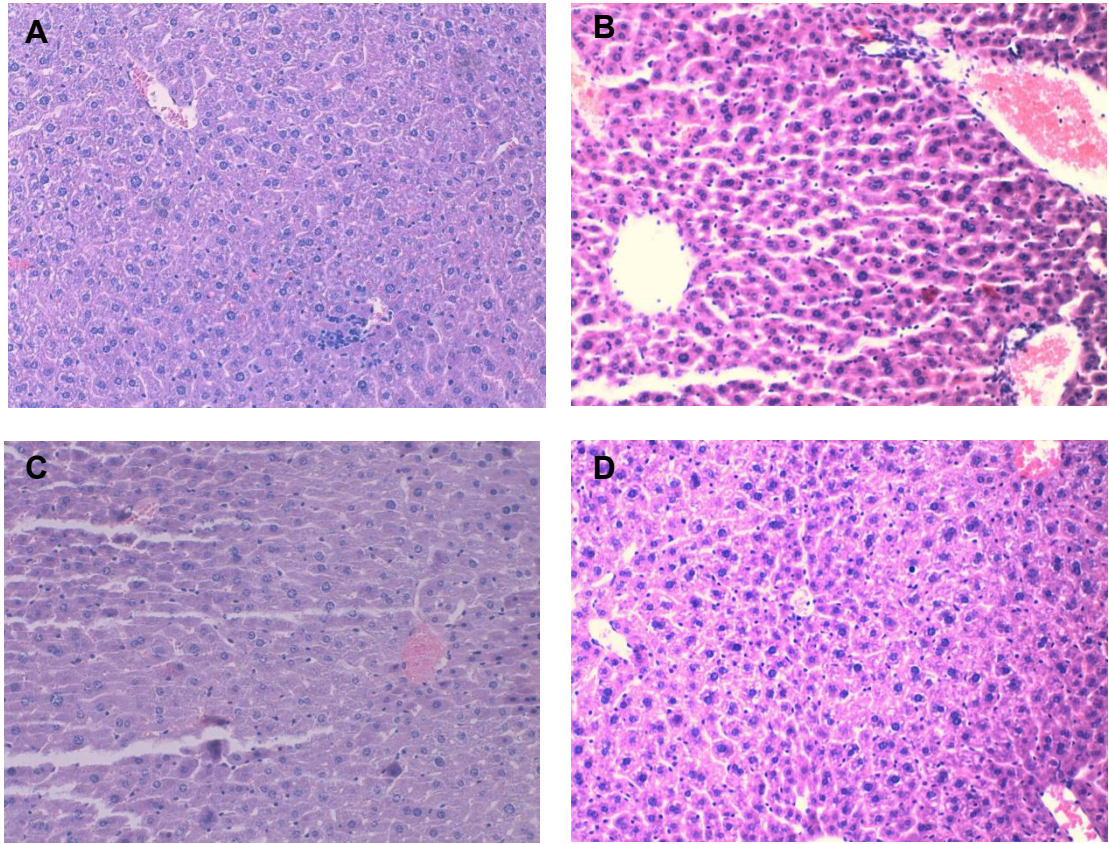
Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. Su ve mısır yağı kontrol grupları için n= 6, diğer gruplar için n= 7.

<sup>a</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p = 0,005$ . <sup>b</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p < 0,03$ . <sup>c</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p < 0,04$ . <sup>d</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p = 0,007$ . <sup>e</sup>Taurin grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p < 0,02$ . <sup>f</sup>Mısır yağı grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p < 0,02$ . <sup>g</sup>KoQ<sub>10</sub> grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p = 0,003$ . <sup>h</sup>PFOA (30 mg/kg) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p = 0,004$ . <sup>i</sup>PFOA (30 mg/kg) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p < 0,05$ .

#### 4.1.5. PFOA ve Antioksidan Uygulanan Farelerin Histopatolojik Analiz Bulguları

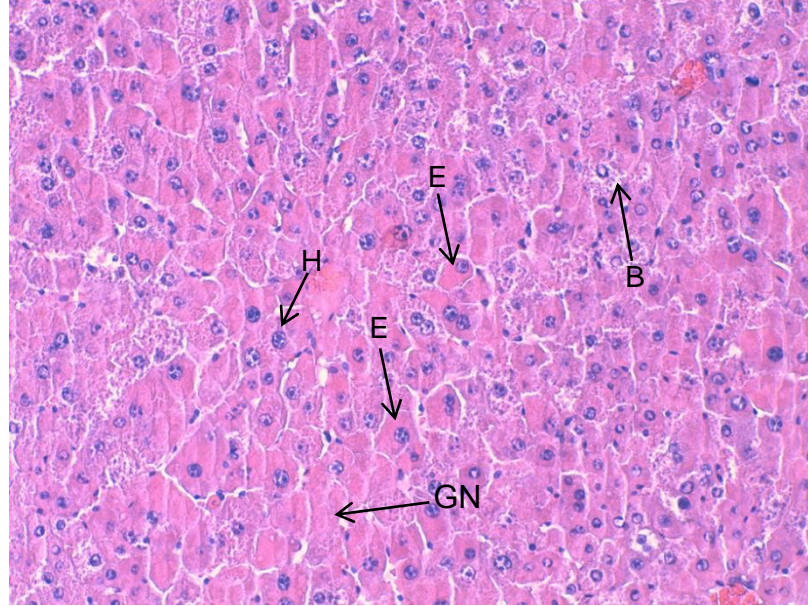
##### Karaciğer Dokusuna İlişkin Histopatolojik Bulgular

Kontrol (su ve mısır yağı), taurin ve KoQ<sub>10</sub> uygulanan gruptaki karaciğer dokuları normal histolojik görünümündedir. Bu grupta, normal görünümde hepatosit tabakaları, arada santral ven ve portal mesafe izlenmiştir (Şekil 4.2).



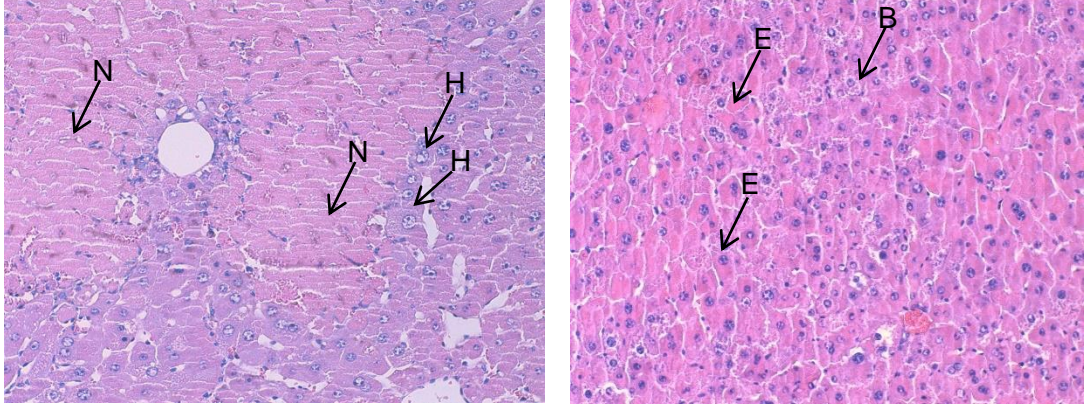
**Şekil 4.2.** Balb/c farelerinin karaciğer dokularının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü (×200). Dokular hematoxylin ve eozin ile boyanmıştır. **A**, kontrol (su) grubu; **B**, kontrol (mısır yağı) grubu; **C**, taurin grubu; **D**, KoQ<sub>10</sub> grubu.

Düşük doz PFOA (15 mg/kg) uygulanan grupta, karaciğerde hepatosellüler hipertrofi, grup hücre nekrozu, eosinofilik sitoplazmik değişiklikler ve balon (granüler) dejenerasyon gözlenmiştir (Şekil 4.3).



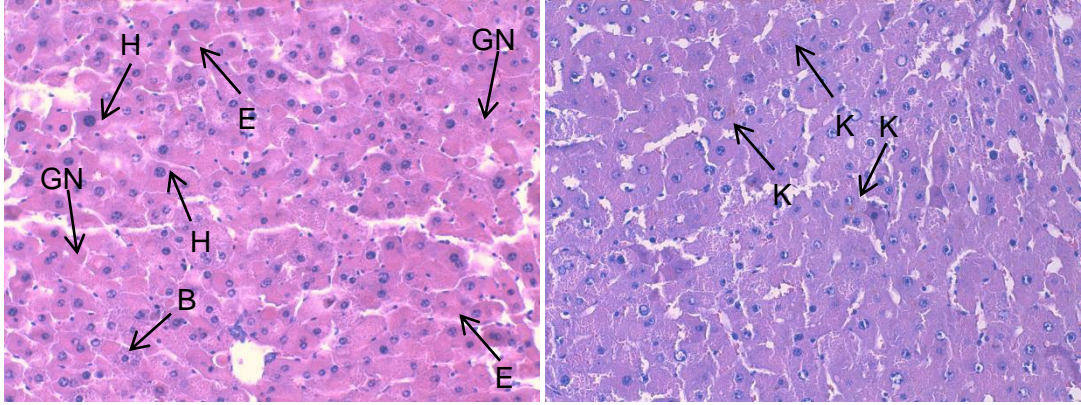
**Şekil 4.3.** PFOA (15 mg/kg)'ya maruz bırakılmış Balb/c farelerinin karaciğer dokularının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü ( $\times 200$ ). Dokular hematoksilin ve eozin ile boyanmıştır. Karaciğerde hepatosellüler hipertrofi (H), grup hücre nekrozu (GN), eosinofilik sitoplazmik (E) değişiklikler ve balon (granüler) dejenerasyon (B) gözlenmektedir.

Yüksek doz PFOA (30 mg/kg) uygulanan grupta yaygın nekroz ve hepatosellüler hipertrofi gözlenmiştir. Yüksek doz PFOA uygulanan grupta yer alan farelerin karaciğer dokularında gözlenen nekroz bulguları, diğer gruplara göre daha fazladır (Şekil 4.4).



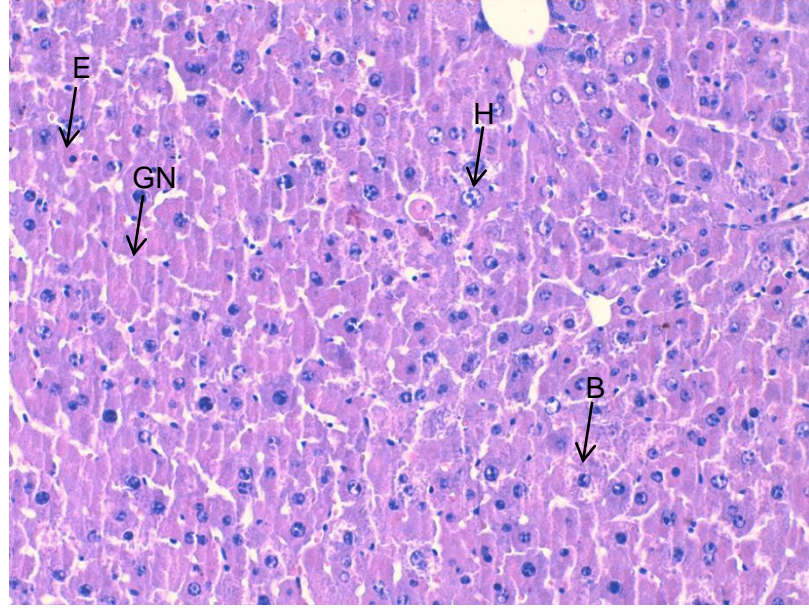
**Şekil 4.4.** PFOA (30 mg/kg)'ya maruz bırakılmış Balb/c farelerinin karaciğer dokularının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü ( $\times 200$ ). Dokular hematoksilin ve eozin ile boyanmıştır. Karaciğerde hepatosellüler hipertrofi (H), santral ven çevresinde yaygın nekroz (N), eosinofilik sitoplazmik (E) değişiklikler ve balon (granüler) dejenerasyon (B) gözlenmektedir.

Taurin ve PFOA'nın birlikte uygulandığı grupta yer alan farelerin karaciğer dokularına ait patolojik bulgular, yüksek doz PFOA uygulanan grupta yer alan hayvanların bulguları ile benzerlik göstermektedir. Bu grupta ayrıca, hepatosellüler hipertrofi, eosinofilik sitoplazmik değişiklikler, balon (granüler) dejenerasyon, grup hücre nekrozu ve hafif kolestaz gözlenmiştir (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** Taurin + PFOA (30 mg/kg)'ya maruz bırakılmış Balb/c farelerinin karaciğer dokularının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü ( $\times 200$ ). Dokular hematoksilin ve eozin ile boyanmıştır. Karaciğerde yaygın hepatosellüler hipertrofi (H), eosinofilik sitoplazmik (E) değişiklikler, balon (granüler) dejenerasyon (B), grup hücre nekrozu (GN) ve hafif kolestaz (K) gözlenmektedir.

Koenzim Q<sub>10</sub> ve PFOA'nın birlikte uygulandığı farelerin karaciğer dokularında hepatosellüler hipertrofi, grup hücre nekrozu, sitoplazmada asidofili ve granüler (balon) dejenerasyon gözlenmiştir. (Şekil 4.6).

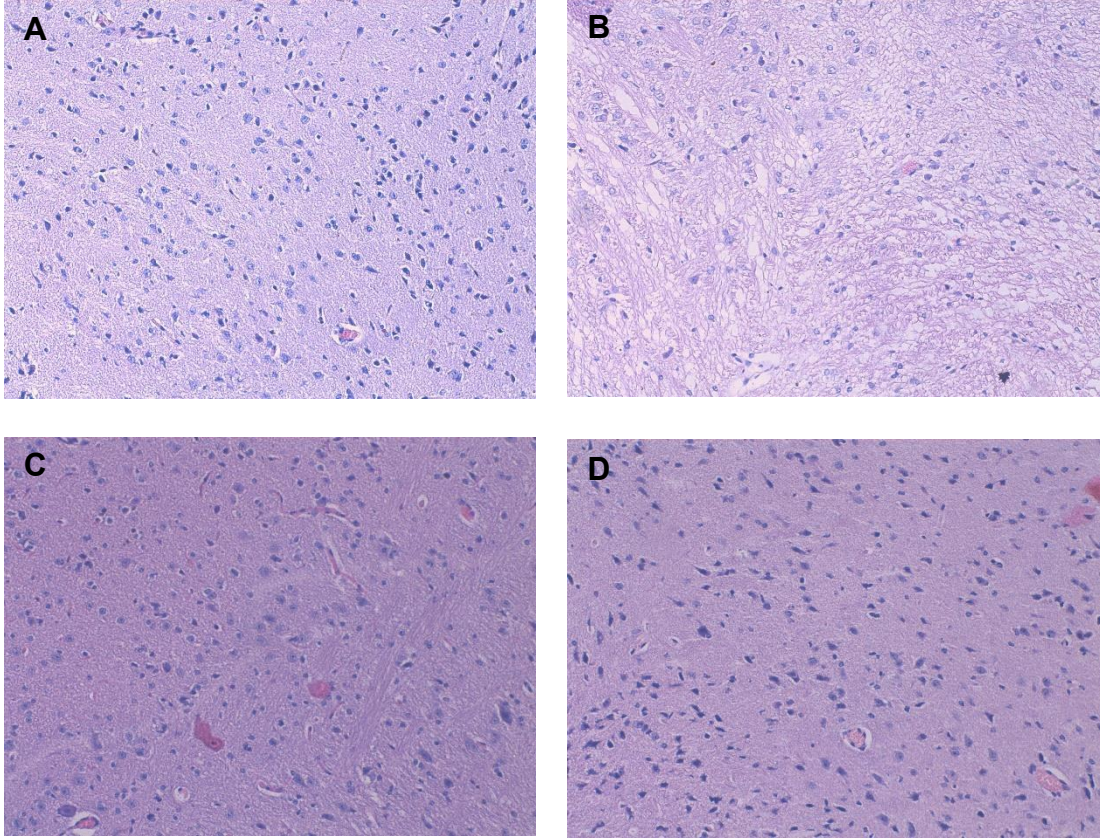


**Şekil 4.6.** KoQ<sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)'a maruz bırakılmış Balb/c farelerinin karaciğer dokularının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü (×200). Dokular hematoksilin ve eozin ile boyanmıştır. Karaciğerde hepatosellüler hipertrofi, grup hücre nekrozu (GN), eosinofilik sitoplazmik (E) değişiklikler ve balon (granüler) dejenerasyon (B) gözlenmektedir.

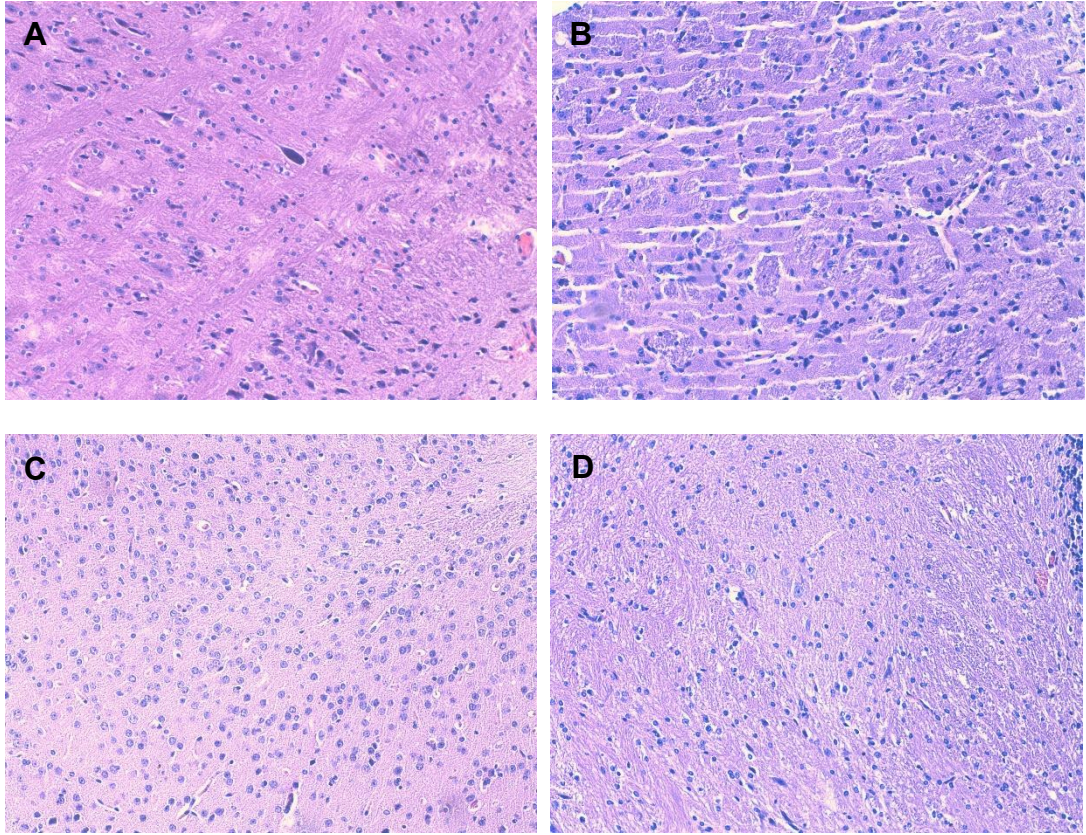


### Beyin Dokusuna İlişkin Histopatolojik Bulgular

Farelerin beyin dokularının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü Şekil 4.7 (A-D) ve Şekil 4.8 (A-D)'de gösterilmiştir. Bütün hayvan gruplarındaki farelerin beyin dokularında normal görünümlü astrositler ve sinir lifleri izlenmiş olup herhangi bir patolojik bulguya rastlanmamıştır.



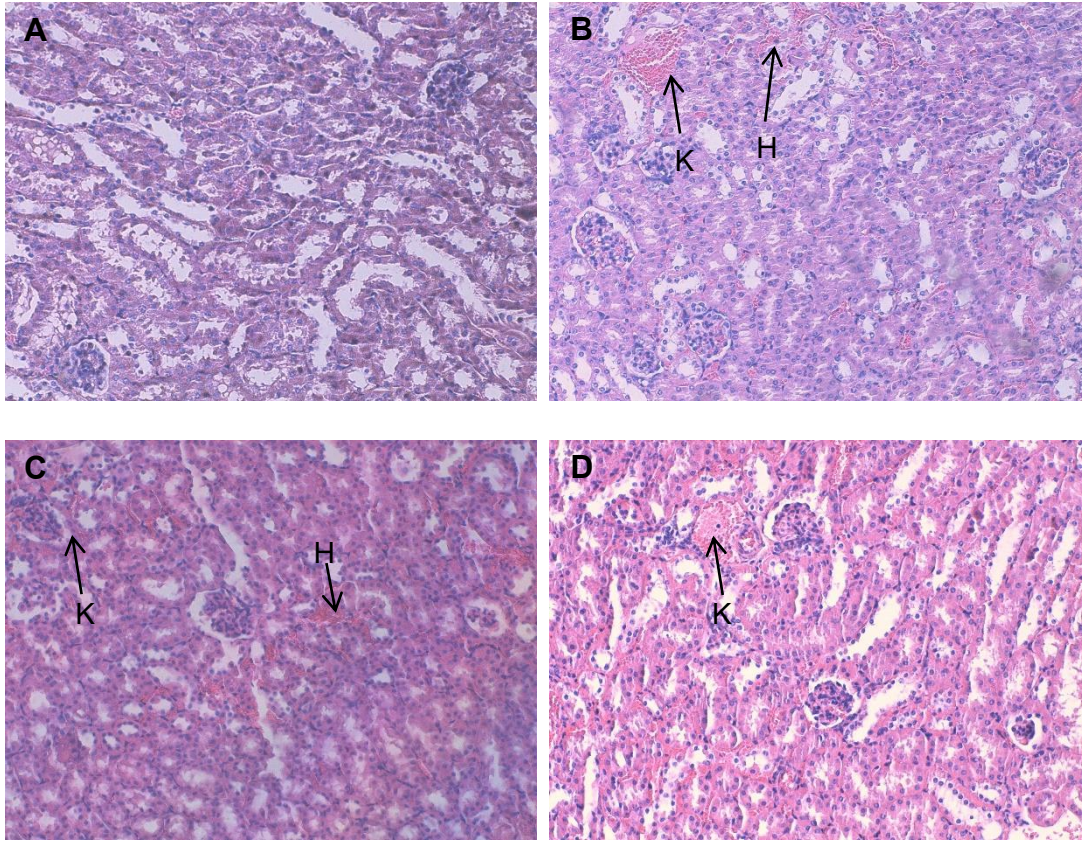
**Şekil 4.7.** Balb/c farelerinin beyin dokularının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü ( $\times 200$ ). Dokular hematoxilen ve eozin ile boyanmıştır. **A**, kontrol (su) grubu; **B**, PFOA (15 mg/kg) grubu; **C**, PFOA (30 mg/kg); **D**, taurin grubu.



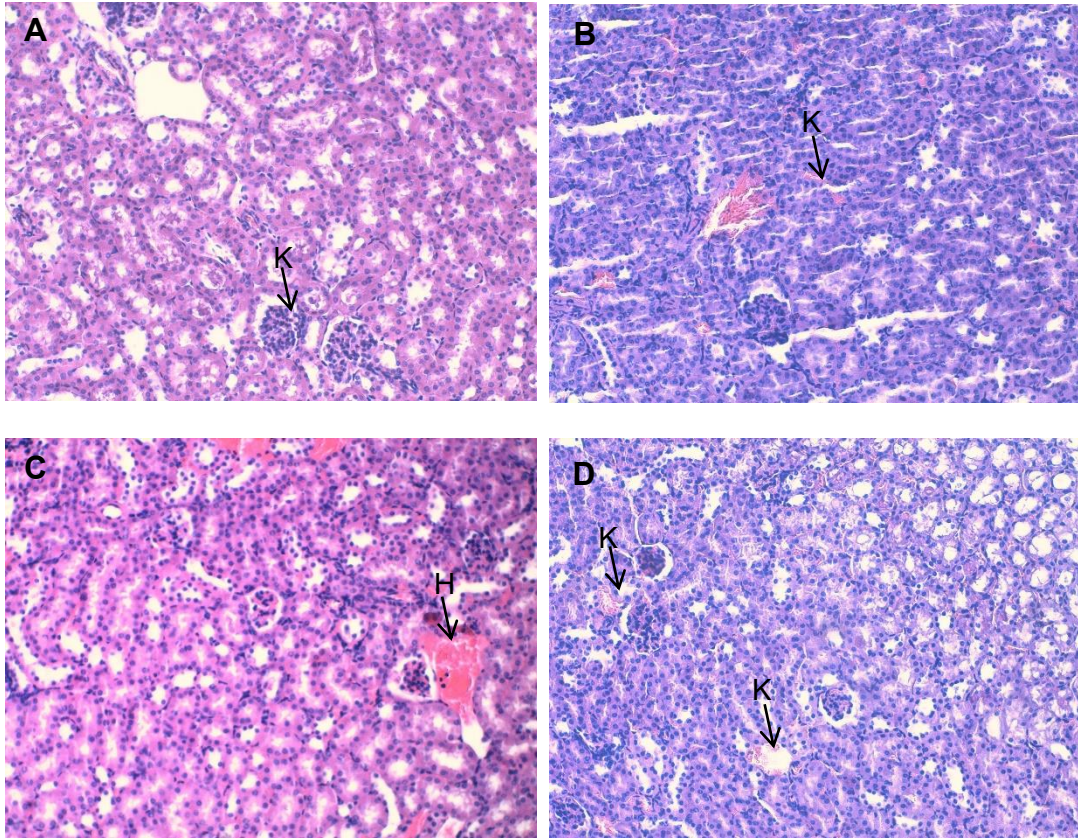
**Şekil 4.8** Balb/c farelerinin beyin dokularının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü ( $\times 200$ ). Dokular hematoksilen ve eozin ile boyanmıştır. **A**, taurin + PFOA (30 mg/kg) grubu; **B**, kontrol (mısır yağı) grubu; **C**, KoQ<sub>10</sub> grubu; **D**, KoQ<sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg) grubu.

### Böbrek Dokusuna İlişkin Histopatolojik Bulgular

Farelerin böbrek dokularının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü Şekil 4.9 (A-D) ve Şekil 4.10 (A-D)'de gösterilmiştir. Bütün hayvan gruplarındaki farelerin böbrek dokularında normal görünümlü glomerüller, proksimal, distal tübüller ve epitelleri izlenmiş olup, herhangi bir patolojik bulguya rastlanmamıştır. Bununla birlikte; bazı dokularda konjesyon ve hemoraji gözlenmiştir.



**Şekil 4.9.** Balb/c farelerinin böbrek dokularının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü ( $\times 200$ ). Dokular hematoksilin ve eozin ile boyanmıştır. **A**, kontrol (su) grubu; **B**, PFOA (15 mg/kg) grubu; **C**, PFOA (30 mg/kg); **D**, taurin grubu. Bazı gruplarda konjesyon (K) ve hemoraji (H) izlenmektedir.



**Şekil 4.10** Balb/c farelerinin böbrek dokularının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü ( $\times 200$ ). Dokular hematoxilen ve eozin ile boyanmıştır. **A**, taurin + PFOA (30 mg/kg) grubu; **B**, kontrol (mısır yağı) grubu; **C**, KoQ<sub>10</sub> grubu; **D**, KoQ<sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg) grubu. Bazı gruplarda konjesyon (K) ve hemoraji (H) izlenmektedir.

#### 4.1.6. PFOA ve Antioksidan Uygulanan Farelerin Karaciğer Dokularındaki Lipid Peroksidasyonu, Toplam GSH Düzeyi ve Antioksidan Enzim Aktivitelerine İlişkin Bulgular

##### Karaciğer Dokularındaki Lipid Peroksidasyon Düzeyleri

Karaciğer dokusuna ait MDA düzeyleri Tablo 4.5'te gösterilmiştir. MDA düzeylerinde, düşük doz PFOA (15 mg/kg) verilen grupta, su kontrol grubuna göre, düşük düzeyde bir artış gözlenirken, yüksek doz PFOA verilen grubun MDA değerlerinin kontrolden farklı olmadığı saptanmıştır. Taurin+PFOA grubunun MDA düzeyi, sadece taurin uygulanan gruptaki MDA düzeyine göre

% 18, yüksek doz PFOA uygulanan gruba göre % 19 oranında anlamlı düzeyde (sırasıyla;  $p= 0,009$ ,  $p= 0,006$ ) düşük bulunmuştur. KoQ<sub>10</sub> + APFO uygulanan gruptaki MDA düzeyinde ise, mısır yağı kontrol grubuna göre % 31 ( $p< 0,03$ ), sadece KoQ<sub>10</sub> uygulanan gruba göre % 16 ( $p< 0,04$ ), 30 mg/kg PFOA uygulanan gruba göre ise % 26 ( $p= 0,006$ ) oranında azalma olduğu saptanmıştır.

**Tablo 4.5.** Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin karaciğer dokularındaki MDA düzeylerine ilişkin veriler.

Gruplar	MDA (nmol/mg protein)
Kontrol (su)	2,04 ± 0,17
PFOA (15 mg/kg)	2,12 ± 0,04
PFOA (30 mg/kg)	2,01 ± 0,09
Taurin (100 mg/kg)	1,98 ± 0,08
Taurin + PFOA (30 mg/kg)	1,62 ± 0,07 <sup>a,b</sup>
Kontrol (mısır yağı)	2,15 ± 0,17
KoQ <sub>10</sub> (50 mg/kg)	1,77 ± 0,05
KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)	1,49 ± 0,09 <sup>a,c,d</sup>

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. Su ve mısır yağı kontrol grupları için  $n= 6$ , diğer gruplar için  $n= 7$ .

<sup>a</sup>PFOA (30 mg/kg) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,006$ . <sup>b</sup>Taurin grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,009$ . <sup>c</sup>Mısır yağı grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p< 0,03$ . <sup>d</sup>KoQ<sub>10</sub> grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p< 0,04$ .

### Karaciğer Dokularındaki Toplam Glutasyon Düzeyleri

Tablo 4.6'da karaciğer dokusuna ait toplam GSH düzeyleri gösterilmiştir. Düşük ve yüksek doz PFOA'ya maruz bırakılan grupların toplam GSH düzeyleri su kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (sırasıyla,  $p< 0,03$ ;  $p= 0,007$ ). Taurin + PFOA uygulanan grubun toplam GSH düzeyinde, 30 mg/kg PFOA uygulanan gruba göre düşük düzeyde bir azalma saptanmıştır. KoQ<sub>10</sub> + PFOA uygulanan grupta, mısır yağı kontrol grubuna

göre % 36 ( $p= 0,01$ ), KoQ<sub>10</sub> uygulanan gruba göre ise % 27 ( $p= 0,006$ ) artış gözlenirken, 30 mg/kg PFOA verilen gruba göre ise düşük düzeyde bir azalma görülmüştür.

**Tablo 4.6.** Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin karaciğer dokularındaki toplam GSH düzeylerine ilişkin veriler.

Gruplar	Toplam GSH ( $\mu\text{mol/mg protein}$ )
Kontrol (su)	1,86 $\pm$ 0,05
PFOA (15 mg/kg)	2,15 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>
PFOA (30 mg/kg)	2,13 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>
Taurin (100 mg/kg)	2,00 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>
Taurin + PFOA (30 mg/kg)	1,97 $\pm$ 0,18
Kontrol (mısır yağı)	1,41 $\pm$ 0,09
KoQ <sub>10</sub> (50 mg/kg)	1,51 $\pm$ 0,07
KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)	1,92 $\pm$ 0,09 <sup>d,e</sup>

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Su ve mısır yağı kontrol grupları için  $n= 6$ , diğer gruplar için  $n= 7$ .

<sup>a</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p < 0,03$ . <sup>b</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p=0,007$ . <sup>c</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p < 0,04$ . <sup>d</sup>Mısır yağı grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,01$ . <sup>e</sup>KoQ<sub>10</sub> grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,006$ .

### **Karaciğer Dokularındaki Antioksidan Enzim Aktiviteleri** **Karaciğer Dokularındaki Cu-Zn Süperoksit Dismutaz Aktivitesi**

Tablo 4.7'de karaciğer dokusuna ait Cu-Zn SOD aktiviteleri gösterilmiştir. Sadece PFOA uygulanan (15 ve 30 mg/kg) her iki grupta da Cu-Zn SOD aktivitesinde, su kontrol grubuna göre doza bağımlı olarak anlamlı düzeyde bir azalma olduğu saptanmıştır (sırasıyla % 40,  $p= 0,003$  ve % 53,  $p= 0,003$ ). Cu-Zn SOD aktivitesi, taurin ve PFOA'nın birlikte uygulandığı grupta, su kontrol grubuna göre % 35,7 ( $p= 0,003$ ), sadece taurin verilen gruba göre

% 13,7 ( $p < 0,02$ ) düşüş göstermiş, 30 mg/kg PFOA uygulanan gruba göre ise % 36,2 oranında ( $p = 0,002$ ) yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde, koruyucu olarak KoQ<sub>10</sub> uygulanan PFOA grubunda Cu-Zn SOD aktivitesi mısır yağı kontrol grubuna göre % 15,1 ( $p = 0,01$ ), sadece KoQ<sub>10</sub> verilen gruba göre % 30,1 oranında ( $p = 0,002$ ) daha düşük bulunmuş; 30 mg/kg PFOA uygulanan gruba göre ise % 45 oranında ( $p = 0,002$ ) daha yüksek saptanmıştır (Tablo 4.7).

**Tablo 4.7.** Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin karaciğer dokularındaki Cu-Zn SOD aktivitesine ilişkin veriler.

Gruplar	Cu-Zn SOD (Ü/mg protein)
Kontrol (su)	96,21 ± 3,91
PFOA (15 mg/kg)	57,35 ± 1,92 <sup>a</sup>
PFOA (30 mg/kg)	45,42 ± 0,72 <sup>a</sup>
Taurin (100 mg/kg)	71,68 ± 2,26 <sup>a</sup>
Taurin + PFOA (30 mg/kg)	61,87 ± 1,80 <sup>a,b,c</sup>
Kontrol (mısır yağı)	77,56 ± 1,46
KoQ <sub>10</sub> (50 mg/kg)	94,23 ± 1,79 <sup>d</sup>
KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)	65,85 ± 3,26 <sup>b,e,f</sup>

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. Su ve mısır yağı kontrol grupları için n= 6, diğer gruplar için n= 7.

<sup>a</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p = 0,003$ . <sup>b</sup>PFOA (30 mg/kg) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p = 0,002$ . <sup>c</sup>Taurin grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p < 0,02$ . <sup>d</sup>Mısır yağı grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p = 0,003$ . <sup>e</sup>Mısır yağı grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p = 0,01$ . <sup>f</sup>KoQ<sub>10</sub> grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p = 0,002$ .

### Karaciğer Dokularındaki Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi

GPx aktivitesinin, PFOA uygulanan gruplarda (15 ve 30 mg/kg) doza bağımlı olarak, su kontrol grubuna göre, önemli derecede azalma gösterdiği saptanmıştır (sırasıyla % 67, % 75,  $p= 0,003$ ). Taurin + PFOA uygulanan grubun GPx aktivitesinde su kontrol grubuna göre % 77,3 ( $p= 0,003$ ), 30 mg/kg PFOA uygulanan gruba göre % 8 ( $p< 0,05$ ), taurin grubuna göre ise % 87,7 oranında ( $p= 0,002$ ) düşüş olduğu gözlenmiştir. KoQ<sub>10</sub> + PFOA grubunda ise mısır yağı kontrol ve KoQ<sub>10</sub> grubuna göre GPx aktivitesi anlamlı derecede düşük bulunurken (sırasıyla  $p= 0,003$  ve  $p= 0,002$ ), 30 mg/kg PFOA uygulanan gruba göre herhangi bir değişiklik saptanmamıştır (Tablo 4.8).

**Tablo 4.8.** Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin karaciğer dokularındaki GPx aktivitesine ilişkin veriler.

Gruplar	GPx (Ü/mg protein)
Kontrol (su)	2,03 ± 0,06
PFOA (15 mg/kg)	0,68 ± 0,03 <sup>a</sup>
PFOA (30 mg/kg)	0,50 ± 0,01 <sup>a</sup>
Taurin (100 mg/kg)	3,73 ± 0,15 <sup>a</sup>
Taurin + PFOA (30 mg/kg)	0,46 ± 0,01 <sup>a,b,c</sup>
Kontrol (mısır yağı)	4,00 ± 0,13
KoQ <sub>10</sub> (50 mg/kg)	4,91 ± 0,09 <sup>d</sup>
KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)	0,51 ± 0,01 <sup>d,e</sup>

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. Su ve mısır yağı kontrol grupları için  $n= 6$ , diğer gruplar için  $n= 7$ .

<sup>a</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,003$ . <sup>b</sup>PFOA (30 mg/kg) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p< 0,05$ . <sup>c</sup>Taurin grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,002$ . <sup>d</sup>Mısır yağı grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,003$ . <sup>e</sup>KoQ<sub>10</sub> grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,002$ .



### Karaciğer Dokularındaki Katalaz Aktivitesi

Tablo 4.9'da PFOA ve/veya antioksidan madde uygulanan farelerin karaciğer katalaz enzim aktivitesi sonuçları gösterilmiştir. 15 mg/kg PFOA uygulanan grupta, su kontrol grubuna göre, CAT aktivitesinde % 40 ( $p= 0,003$ ), 30 mg/kg PFOA uygulanan grupta ise % 21 oranında ( $p= 0,003$ ) artış olduğu gözlenmiştir. Taurin+PFOA verilen grupta, CAT aktivitesinin su kontrol (% 35,  $p= 0,003$ ) ve sadece taurin (% 43,  $p= 0,002$ ) uygulanan gruplardan önemli derecede yüksek olduğu saptanmıştır. KoQ<sub>10</sub> + PFOA uygulanan grupta ise CAT aktivitesinin mısır yağı kontrol grubuna göre % 54,1 ( $p= 0,003$ ), KoQ<sub>10</sub> grubuna göre ise % 51,4 oranında ( $p= 0,002$ ) daha yüksek olduğu saptanmıştır. KoQ<sub>10</sub> + PFOA uygulanan grubun CAT aktivitesinde, 30 mg/kg PFOA uygulanan grubun CAT aktivitesine göre önemli derecede azalma olduğu saptanmıştır ( $p= 0,004$ ).

**Tablo 4.9.** Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin karaciğer dokularındaki CAT aktivitesine ilişkin veriler.

Gruplar	CAT (Ü/mg protein)
Kontrol (su)	450,52 ± 12,80
PFOA (15 mg/kg)	633,13 ± 15,42 <sup>a</sup>
PFOA (30 mg/kg)	545,18 ± 6,78 <sup>a</sup>
Taurin (100 mg/kg)	426,39 ± 24,59
Taurin + PFOA (30 mg/kg)	608,51 ± 14,74 <sup>a,b,c</sup>
Kontrol (mısır yağı)	319,98 ± 29,53
KoQ <sub>10</sub> (50 mg/kg)	325,82 ± 16,07
KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)	493,21 ± 12,91 <sup>b,d,e</sup>

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. Su ve mısır yağı kontrol grupları için  $n= 6$ , diğer gruplar için  $n= 7$ .

<sup>a</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,003$ . <sup>b</sup>PFOA (30 mg/kg) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,004$ . <sup>c</sup>Taurin grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,002$ . <sup>d</sup>Mısır yağı grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,003$ . <sup>e</sup>KoQ<sub>10</sub> grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,002$ .

#### 4.1.7. PFOA ve Antioksidan Uygulanan Farelerin Beyin Dokularındaki Lipid Peroksidasyonu, Toplam GSH Düzeyi ve Antioksidan Enzim Aktivitelerine İlişkin Bulgular

##### Beyin Dokularındaki Lipid Peroksidasyon Düzeyleri

Su kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 15 mg/kg PFOA verilen grubun MDA düzeylerinde herhangi bir değişim gözlenmezken, 30 mg/kg PFOA verilen grupta yer alan farelerin beyin MDA düzeylerinde % 20 oranında artış olduğu saptanmıştır ( $p= 0,004$ ). Taurin ile birlikte PFOA'nın uygulandığı grupta yer alan farelerin beyin MDA düzeyinde, hem su kontrol hem de taurin grubuna göre % 19 artış olduğu (sırasıyla,  $p= 0,003$  ve  $p = 0,002$ ) belirlenirken, 30 mg/kg PFOA uygulanan grubun beyin MDA değerine göre herhangi bir değişiklik saptanmamıştır (Tablo 4.10).

**Tablo 4.10.** Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin beyin dokularındaki MDA düzeylerine ilişkin veriler.

Gruplar	MDA (nmol/mg protein)
Kontrol (su)	3,14 ± 0,06
PFOA (15 mg/kg)	3,11 ± 0,11
PFOA (30 mg/kg)	3,78 ± 0,12 <sup>a</sup>
Taurin (100 mg/kg)	3,14 ± 0,11
Taurin + PFOA (30 mg/kg)	3,74 ± 0,05 <sup>b,c</sup>
Kontrol (mısır yağı)	3,57 ± 0,13
KoQ <sub>10</sub> (50 mg/kg)	3,59 ± 0,15
KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)	3,94 ± 0,22

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. Su ve mısır yağı kontrol grupları için  $n= 6$ , diğer gruplar için  $n= 7$ .

<sup>a</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,004$ . <sup>b</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,003$ . <sup>c</sup>Taurin grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,002$ .

### Beyin Dokularındaki Toplam Glutasyon Düzeyleri

Tablo 4.11'de farelerin beyin dokularındaki toplam GSH düzeyleri gösterilmiştir. PFOA verilen gruplardaki (15 ve 30 mg/kg) beyin toplam GSH düzeylerinde, su kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, çok düşük düzeyde bir artış görülmekle birlikte, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

**Tablo 4.11.** Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin beyin dokularındaki toplam GSH düzeylerine ilişkin veriler.

Gruplar	Toplam GSH ( $\mu\text{mol/mg protein}$ )
Kontrol (su)	0,94 $\pm$ 0,03
PFOA (15 mg/kg)	0,97 $\pm$ 0,05
PFOA (30 mg/kg)	0,96 $\pm$ 0,06
Taurin (100 mg/kg)	1,21 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
Taurin + PFOA (30 mg/kg)	1,10 $\pm$ 0,04 <sup>b,c</sup>
Kontrol (mısır yağı)	0,91 $\pm$ 0,02
KoQ <sub>10</sub> (50 mg/kg)	1,16 $\pm$ 0,03 <sup>d</sup>
KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)	0,93 $\pm$ 0,01 <sup>e</sup>

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Su ve mısır yağı kontrol grupları için n= 6, diğer gruplar için n= 7.

<sup>a</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı, p= 0,003. <sup>b</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı, p< 0,02. <sup>c</sup>Taurin grubuna göre önemli ölçüde farklı, p< 0,04. <sup>d</sup>Mısır yağı grubuna göre önemli ölçüde farklı, p= 0,003. <sup>e</sup>KoQ<sub>10</sub> grubuna göre önemli ölçüde farklı, p= 0,002

Taurin ve PFOA'nın beraber verildiği gruptaki toplam GSH düzeyi, su kontrol grubuna göre artış (p< 0,02), taurin grubuna göre ise azalma göstermiştir (p< 0,04). Taurin ile PFOA'nın beraber uygulandığı grubun toplam GSH düzeyi tek başına PFOA (30 mg/kg) uygulanan gruba göre % 14,6 oranında artış göstermiştir. Ancak bu artış düzeyi önemsizdir. Benzer şekilde KoQ<sub>10</sub> + PFOA grubunun toplam GSH düzeyi, mısır yağı kontrol grubuna göre

düşük düzeyde bir artış, KoQ<sub>10</sub> grubuna göre ise önemli derecede azalma göstermiş olup ( $p= 0,002$ ), PFOA (30 mg/kg) grubu ile karşılaştırıldığında herhangi bir değişiklik bulunmamıştır (Tablo 4.11).

### Beyin Dokularındaki Antioksidan Enzim Aktiviteleri

#### Beyin Dokularındaki Cu-Zn Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

Düşük (15 mg/kg) ve yüksek (30 mg/kg) doz PFOA verilen gruplardaki Cu-Zn SOD aktivitesi, su kontrol grubuna göre düşük düzeyde azalma göstermiştir. Taurin ve PFOA'nın beraber uygulandığı gruptaki Cu-Zn SOD aktivitesinin, su kontrol grubu ile karşılaştırıldığında düşük düzeyde azaldığı saptanmıştır (Tablo 4.12).

**Tablo 4.12.** Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin beyin dokularındaki Cu-Zn SOD aktivitesine ilişkin veriler.

Gruplar	Cu-Zn SOD (Ü/mg protein)
Kontrol (su)	86,27 ± 3,09
PFOA (15 mg/kg)	80,85 ± 1,87
PFOA (30 mg/kg)	79,93 ± 1,36
Taurin (100 mg/kg)	82,07 ± 0,83
Taurin + PFOA (30 mg/kg)	81,17 ± 1,42
Kontrol (mısır yağı)	76,45 ± 1,81
KoQ <sub>10</sub> (50 mg/kg)	79,12 ± 2,14
KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)	97,70 ± 1,24 <sup>a,b,c</sup>

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. Su ve mısır yağı kontrol grupları için  $n= 6$ , diğer gruplar için  $n= 7$ .

<sup>a</sup>PFOA (30 mg/kg) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,002$ . <sup>b</sup>Mısır yağı grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,003$ . <sup>c</sup>KoQ<sub>10</sub> grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,002$ .

KoQ<sub>10</sub>'un PFOA ile birlikte verildiği gruptaki Cu-Zn SOD aktivitesi, mısır yağı kontrol grubundan % 28 (p= 0,003), KoQ<sub>10</sub> uygulanan gruptan ve 30 mg/kg PFOA uygulanan gruptan % 23 oranında daha yüksek bulunmuştur (p= 0,002) (Tablo 4.12).

### Beyin Dokularındaki Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi

Tablo 4.13 ve Şekil 4.19'da farelerin beyin dokularındaki GPx aktivitesi gösterilmiştir. GPx aktivitelerinin, düşük (15 mg/kg) ve yüksek (30 mg/kg) doz PFOA verilen gruplar ile taurin + PFOA verilen grupta, su kontrol grubuna göre önemli derecede azaldığı belirlenmiştir (sırasıyla, % 23, p= 0,003; % 21, p= 0,003 ve % 17, p= 0,004). KoQ<sub>10</sub> + PFOA uygulanan grubun GPx aktivitesi ile gerek kontrol (mısır yağı) ve KoQ<sub>10</sub>, gerekse tek başına PFOA (30 mg/kg) uygulanan grupların GPx aktiviteleri arasında önemli bir fark bulunmamıştır.

**Tablo 4.13.** Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin beyin dokularındaki GPx aktivitesine ilişkin veriler.

Gruplar	GPx (Ü/mg protein)
Kontrol (su)	2,71 ± 0,12
PFOA (15 mg/kg)	2,09 ± 0,04 <sup>a</sup>
PFOA (30 mg/kg)	2,14 ± 0,09 <sup>a</sup>
Taurin (100 mg/kg)	2,31 ± 0,05 <sup>b</sup>
Taurin + PFOA (30 mg/kg)	2,24 ± 0,06 <sup>b</sup>
Kontrol (mısır yağı)	2,31 ± 0,04
KoQ <sub>10</sub> (50 mg/kg)	2,14 ± 0,07
KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)	2,21 ± 0,07

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. Su ve mısır yağı kontrol grupları için n= 6, diğer gruplar için n= 7.

<sup>a</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı, p= 0,003. <sup>b</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı, p= 0,004.

### Beyin Dokularındaki Katalaz Aktivitesi

PFOA uygulanan gruplarda yer alan farelerin beyin CAT aktivitelerinde, su kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, herhangi bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Beyin CAT aktivitesinin, koruyucularla PFOA'nın birlikte verildiği gruplarda, sadece PFOA (30 mg/kg) uygulan gruba göre düşük düzeyde azalma gösterdiği saptanmıştır. KoQ<sub>10</sub> ile PFOA'nın birlikte uygulandığı grubun CAT aktivitesi, tek başına KoQ<sub>10</sub> verilen gruba göre önemli derecede ( $p= 0,009$ ) daha yüksek bulunmuştur (Tablo 4.14).

**Tablo 4.14.** Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin beyin dokularındaki CAT aktivitesine ilişkin veriler.

Gruplar	CAT (Ü/mg protein)
Kontrol (su)	24,28 ± 0,59
PFOA (15 mg/kg)	25,81 ± 1,23
PFOA (30 mg/kg)	25,50 ± 1,38
Taurin (100 mg/kg)	23,45 ± 0,57
Taurin + PFOA (30 mg/kg)	22,66± 0,59
Kontrol (mısır yağı)	21,30 ± 0,86
KoQ <sub>10</sub> (100 mg/kg)	17,85 ± 0,57 <sup>a</sup>
KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)	22,36 ± 0,82 <sup>b</sup>

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. Su ve mısır yağı kontrol grupları için n= 6, diğer gruplar için n= 7.

<sup>a</sup>Mısır yağı grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p < 0,02$ . <sup>b</sup>KoQ<sub>10</sub> grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p = 0,009$ .

#### 4.1.8. PFOA ve Antioksidan Uygulanan Farelerin Böbrek Dokularındaki Lipid Peroksidasyonu, Toplam GSH Düzeyi ve Antioksidan Enzim Aktivitelerine İlişkin Bulgular

##### Böbrek Dokularındaki Lipid Peroksidasyon Düzeyleri

Tablo 4.15'te farelerin böbrek dokularındaki MDA düzeyleri gösterilmiştir. Böbrek dokusu MDA düzeyleri, düşük doz (15 mg/kg) PFOA verilen grupta su kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, % 26, yüksek doz (30 mg/kg) PFOA verilen grupta su kontrol grubuna göre % 12 oranında artış göstermiştir (sırasıyla,  $p=0,003$ ;  $p<0,02$ ).

**Tablo 4.15.** Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin böbrek dokularındaki MDA düzeylerine ilişkin veriler.

Gruplar	MDA (nmol/mg protein)
Kontrol (su)	2,68 ± 0,10
PFOA (15 mg/kg)	3,38 ± 0,08 <sup>a</sup>
PFOA (30 mg/kg)	3,00 ± 0,05 <sup>b</sup>
Taurin (100 mg/kg)	2,86 ± 0,12
Taurin + PFOA (30 mg/kg)	3,91 ± 0,08 <sup>a,c,d</sup>
Kontrol (mısır yağı)	2,72 ± 0,08
KoQ <sub>10</sub> (50 mg/kg)	2,82 ± 0,04
KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)	3,06 ± 0,08 <sup>e,f</sup>

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. Su ve mısır yağı kontrol grupları için  $n=6$ , diğer gruplar için  $n=7$ .

<sup>a</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p=0,003$ . <sup>b</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p<0,02$ . <sup>c</sup>PFOA (30 mg/kg) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p=0,002$ . <sup>d</sup>Taurin grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p=0,002$ . <sup>e</sup>Mısır yağı grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p<0,04$ . <sup>f</sup>KoQ<sub>10</sub> grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p<0,03$ .

Taurin ile PFOA'nın birlikte uygulandığı gruptaki böbrek MDA değerleri, su kontrol grubundan % 45,9 ( $p=0,003$ ), taurin grubundan % 36,7 ( $p=0,002$ ),

30 mg/kg PFOA uygulanan gruptan ise % 30,3 oranında ( $p= 0,002$ ) yüksek bulunmuştur. KoQ<sub>10</sub> ile PFOA'nın birlikte uygulandığı grupta saptanan MDA değerlerinin ise, mısır yağı kontrol grubundan % 12,5 ( $p< 0,04$ ), KoQ<sub>10</sub> grubundan % 8,5 oranında ( $p< 0,03$ ) yüksek bulunmuş, 30 mg/kg PFOA uygulanan grup ile karşılaştırıldığında ise herhangi bir fark olmadığı belirlenmiştir (Tablo 4.15).

### Böbrek Dokularındaki Toplam Glutasyon Düzeyleri

PFOA verilen gruplarda (15 ve 30 mg/kg) yer alan farelerin toplam GSH düzeylerinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde azalma (sırasıyla % 23,  $p< 0,02$ ; % 20,  $p= 0,003$ ) olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.16).

**Tablo 4.16.** Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin böbrek dokularındaki toplam GSH düzeylerine ilişkin veriler.

Gruplar	Toplam GSH ( $\mu\text{mol/mg protein}$ )
Kontrol (su)	0,79 $\pm$ 0,03
PFOA (15 mg/kg)	0,61 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
PFOA (30 mg/kg)	0,63 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
Taurin (100 mg/kg)	0,64 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
Taurin + PFOA (30 mg/kg)	0,51 $\pm$ 0,02 <sup>b,c,d</sup>
Kontrol (mısır yağı)	0,59 $\pm$ 0,03
KoQ <sub>10</sub> (50 mg/kg)	0,76 $\pm$ 0,02 <sup>e</sup>
KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)	0,63 $\pm$ 0,03 <sup>f</sup>

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Su ve mısır yağı kontrol grupları için  $n= 6$ , diğer gruplar için  $n= 7$ .

<sup>a</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p< 0,02$ . <sup>b</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,003$ . <sup>c</sup>PFOA (30 mg/kg) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,002$ . <sup>d</sup>Taurin grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,002$ . <sup>e</sup>Mısır yağı grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,003$ . <sup>f</sup>KoQ<sub>10</sub> grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p= 0,002$ .



Taurin + PFOA'nın uygulandığı gruptaki toplam GSH düzeyi; kontrol grubundan % 35 ( $p= 0,003$ ), taurin grubundan % 20 ( $p= 0,002$ ), 30 mg/kg PFOA uygulanan gruptan % 19 oranında ( $p= 0,002$ ) daha düşük bulunmuştur. KoQ<sub>10</sub> ile PFOA'nın birlikte uygulandığı grupta ölçülen toplam GSH düzeyi, sadece KoQ<sub>10</sub> uygulanan gruba göre % 17 oranında önemli düzeyde ( $p= 0,002$ ) bir azalma göstermiştir (Tablo 4.16).

### **Böbrek Dokularındaki Antioksidan Enzim Aktiviteleri**

#### **Böbrek Dokularındaki Cu-Zn Süperoksit Dismutaz Aktivitesi**

Fare böbreklerindeki Cu-Zn SOD aktivitesi, 15 mg/kg PFOA verilen grupta, kontrol grubuna oranla, önemli (% 7,  $p= 0,004$ ) ölçüde azalırken, 30 mg/kg PFOA uygulanan grupta önemli (% 10,  $p = 0,007$ ) düzeyde artış göstermiştir. Taurin ile birlikte PFOA uygulanan grupta saptanan Cu-Zn SOD aktivitesinin, kontrol ve taurin uygulanan grupların Cu-Zn SOD aktivitelerinden önemli ölçüde (sırasıyla, % 13,3;  $p= 0,007$ ; % 12,3;  $p< 0,03$ ) yüksek olduğu belirlenmiştir. Taurin + PFOA uygulanan grubun Cu-Zn SOD aktivitesi, tek başına 30 mg/kg PFOA verilen gruptaki Cu-Zn SOD aktivitesinden % 2,9 oranında daha yüksek bulunmuştur. KoQ<sub>10</sub> + PFOA verilen gruptaki Cu-Zn SOD aktivitesi, mısır yağı kontrol grubundan daha düşük, tek başına 30 mg/kg PFOA verilen gruptan % 4 ( $p< 0,05$ ), KoQ<sub>10</sub> grubundan ise % 14 ( $p= 0,009$ ) oranında daha yüksek bulunmuştur (Tablo 4.17).

**Tablo 4.17.** Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin böbrek dokularındaki Cu-Zn SOD aktivitesine ilişkin veriler.

Gruplar	Cu-Zn SOD ( $\dot{U}$ /mg protein)
Kontrol (Su)	87,19 $\pm$ 1,24
PFOA (15 mg/kg)	81,42 $\pm$ 1,19 <sup>a</sup>
PFOA (30 mg/kg)	95,98 $\pm$ 1,29 <sup>b</sup>
Taurin (100 mg/kg)	87,95 $\pm$ 3,17
Taurin + PFOA (30 mg/kg)	98,79 $\pm$ 2,18 <sup>b,c</sup>
Kontrol (mısır yağı)	103,09 $\pm$ 2,11
KoQ <sub>10</sub> (50 mg/kg)	87,09 $\pm$ 2,86 <sup>e</sup>
KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)	99,54 $\pm$ 1,25 <sup>d,f</sup>

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Su ve mısır yağı kontrol grupları için n= 6, diğer gruplar için n= 7.

<sup>a</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı, p= 0,004. <sup>b</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı, p= 0,007. <sup>c</sup>Taurin grubuna göre önemli ölçüde farklı, p< 0,03. <sup>d</sup>PFOA (30 mg/kg) grubuna göre önemli ölçüde farklı, p< 0,05. <sup>e</sup>Mısır yağı grubuna göre önemli ölçüde farklı, p= 0,004. <sup>f</sup>KoQ<sub>10</sub> grubuna göre önemli ölçüde farklı, p= 0,009.

### Böbrek Dokularındaki Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi

Tablo 4.18'de PFOA ve/veya antioksidan madde uygulanan farelerin böbrek GPx aktiviteleri verilmiştir. PFOA verilen gruplarda (15 ve 30 mg/kg) GPx aktivitesi, su kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, düşük düzeyde artış göstermiştir. Taurin + PFOA uygulanan grupta yer alan farelerin böbrek dokularındaki GPx aktivitesi, su kontrol ve taurin gruplarına göre, sırasıyla % 12 ve % 9,9 oranında artış gösterirken, 30 mg/kg PFOA grubundaki farelerin GPx aktivitesiyle yaklaşık olarak aynı düzeyde bulunmuştur. KoQ<sub>10</sub> + PFOA verilen grubun GPx aktivitesinde ise mısır yağı kontrol ve KoQ<sub>10</sub> gruplarına göre önemli derecede (sırasıyla; % 18,3; p< 0,02 ve % 29,2; p= 0,006), 30 mg/kg PFOA verilen gruba göre ise % 15,8 oranında artış olduğu saptanmıştır.

**Tablo 4.18.** Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin böbrek dokularındaki GPx aktivitesine ilişkin veriler.

Gruplar	GPx (Ü/mg protein)
Kontrol (Su)	3,66 ± 0,16
PFOA (15 mg/kg)	3,99 ± 0,17
PFOA (30 mg/kg)	4,36 ± 0,25
Taurin (100 mg/kg)	3,73 ± 0,16
Taurin + PFOA (30 mg/kg)	4,10 ± 0,15
Kontrol (mısır yağı)	4,27 ± 0,13
KoQ <sub>10</sub> (50 mg/kg)	3,91 ± 0,22
KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)	5,05 ± 0,23 <sup>a,b</sup>

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. Su ve mısır yağı kontrol grupları için n= 6, diğer gruplar için n= 7.

<sup>a</sup>Mısır yağı grubuna göre önemli ölçüde farklı, p< 0,02. <sup>b</sup>KoQ<sub>10</sub> grubuna göre önemli ölçüde farklı, p= 0,006.

### Böbrek Dokularındaki Katalaz Aktivitesi

Düşük doz (15 mg/kg) PFOA verilen grupta yer alan farelerin böbrek dokusu CAT aktiviteleri, su kontrol grubuyla kıyaslandığında, % 9,9 oranında artış gösterirken, yüksek doz (30 mg/kg) PFOA uygulanan grubun CAT aktivitesi ise su kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı (p= 0,007) düzeyde ve % 25 oranında artış göstermiştir. Taurin + PFOA verilen grupta yer alan farelerin böbrek CAT aktivitesindeki artış, taurin grubuna oranla önemli düzeyde ve % 14 oranında daha yüksek (p= 0,009), tek başına 30 mg/kg PFOA verilen gruptaki CAT aktivitesine oranla önemli ölçüde olmak üzere % 19 oranında daha düşük (p= 0,004) düzeyde bulunmuştur. Aynı şekilde KoQ<sub>10</sub> + PFOA verilen grupta yer alan hayvanların böbrek CAT aktiviteleri, KoQ<sub>10</sub> grubuna göre % 29, mısır yağı grubuna oranla % 20 oranında ve önemli olmak

üzere, daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla  $p=0,006$ ;  $p<0,03$ ). KoQ<sub>10</sub> + PFOA verilen grupta yer alan farelerin böbrek dokularında ölçülen CAT aktiviteleri, tek başına PFOA verilen grupta ölçülen CAT aktivitesine oranla anlamlı düzeyde ( $p<0,03$ ) daha düşük (% 20 oranında) bulunmuştur (Tablo 4.19).

**Tablo 4.19.** Kontrol grupları ile PFOA ve antioksidan madde uygulanan farelerin böbrek dokularındaki CAT aktivitesine ilişkin veriler.

Gruplar	CAT (Ü/mg protein)
Kontrol (Su)	201,96 ± 8,13
PFOA (15 mg/kg)	221,88 ± 10,27
PFOA (30 mg/kg)	251,78 ± 10,48 <sup>a</sup>
Taurin (100 mg/kg)	177,82 ± 5,42 <sup>b</sup>
Taurin + PFOA (30 mg/kg)	202,76 ± 5,35 <sup>c,d</sup>
Kontrol (mısır yağı)	168,82 ± 6,42
KoQ <sub>10</sub> (50 mg/kg)	156,59 ± 6,97
KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)	202,47 ± 10,63 <sup>e,f,g</sup>

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. Su ve mısır yağı kontrol grupları için  $n=6$ , diğer gruplar için  $n=7$ .

<sup>a</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p=0,007$ . <sup>b</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p<0,05$ . <sup>c</sup>PFOA (30 mg/kg) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p=0,004$ . <sup>d</sup>Taurin grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p=0,009$ . <sup>e</sup>PFOA (30 mg/kg) grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p<0,03$ . <sup>f</sup>Mısır yağı grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p<0,03$ . <sup>g</sup>KoQ<sub>10</sub> grubuna göre önemli ölçüde farklı,  $p=0,006$ .

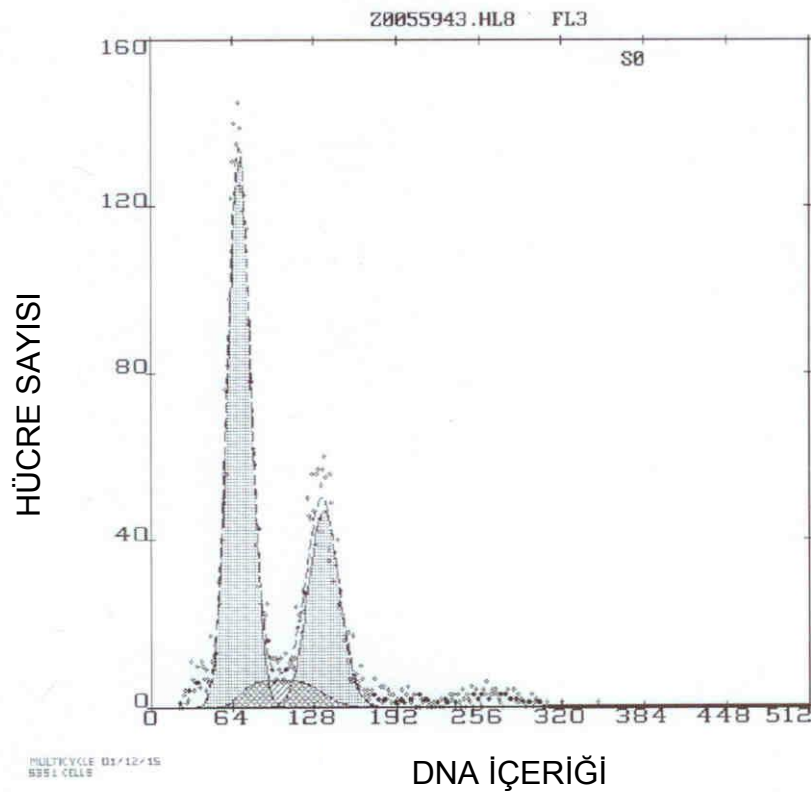
#### **4.1.9. PFOA ve Antioksidan Madde Uygulanan Farelerin Karaciğer ve Böbrek Dokularına ait Hücre Döngülerinde Meydana Gelen Değişiklikler**

##### **Karaciğer Hücre Döngüsünde Meydana Gelen Değişiklikler**

Karaciğer dokusunda, hücre döngüsü fazlarına ilişkin hücre dağılım yüzdelerinin hesaplandığı örnek histogram Şekil 4.11'de verilmiştir. PFOA uygulanan gruplarda (15 ve 30 mg/kg) karaciğer dokusu hücre döngüsünün G0/G1 fazında biriken hücre sayısı, su kontrol grubuna kıyasla düşük düzeyde bir artış göstermiştir (sırasıyla, % 7,1 ve % 6,52). Taurin + PFOA uygulanan gruptaki farelerin karaciğer hücreleri G0/G1 fazında, tek başına PFOA (30 mg/kg) uygulanan gruba kıyasla önemli derecede ( $p < 0,05$ ) daha fazla birikmiş olup hücre döngüsünde duraklamaya neden olmuştur (Tablo 4.20).

Düşük (15 mg/kg) ve yüksek doz (30 mg/kg) PFOA uygulanan gruplarda sentez fazındaki hücre yüzdesinin, su kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmayan ölçüde azalma gösterdiği belirlenmiştir. Taurin + PFOA uygulanan grupta ölçülen S fazındaki hücre yüzdesinin, kontrol, tek başına PFOA ve tek başına taurin uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında düşük düzeyde azalma gösterdiği saptanmıştır. KoQ<sub>10</sub> + PFOA'ya maruz bırakılan grupta S fazında ölçülen hücre yüzdesinin, yalnız PFOA (30 mg/kg) uygulanan gruba kıyasla önemli derecede azalma (% 68,2 oranında,  $p < 0,05$ ), mısır yağı grubuna oranla ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan ölçüde artış gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4.20).

Yüksek doz (30 mg/kg) PFOA uygulanan grupta ölçülen G2/M fazındaki hücre yüzdesinin, su kontrol grubuna göre düşük düzeyde bir azalma gösterdiği saptanmıştır. Taurin + PFOA uygulanan grubun G2/M fazındaki hücre yüzdesinde, su kontrol ve taurin uygulanan gruplara kıyasla değişiklik gözlenmezken, yalnız PFOA (30 mg/kg) uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan ölçüde artış olduğu belirlenmiştir. KoQ<sub>10</sub> + PFOA uygulanan grubun G2/M fazındaki hücre yüzdesi mısır yağı kontrol grubuna göre anlamlı olmayan ölçüde artış, 30 mg/kg PFOA uygulanan gruba göre ise önemli düzeyde artış göstermiştir (p= 0,05) (Tablo 4.20).



**Şekil 4.11.** Karaciğer dokusunda KoQ<sub>10</sub> uygulanan gruptaki hücre döngüsü dağılımını gösteren histogram.

**Tablo 4.20.** Karaciğer hücrelerinin hücre döngüsünün G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki yüzde dağılımları.

GRUP	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
Kontrol (su)	56,33 ± 4,84	22,67 ± 5,04	21,00 ± 1,73
PFOA (15 mg/kg)	60,33 ± 6,69	16,67 ± 8,95	23,33 ± 14,89
PFOA (30mg/kg)	60,00 ± 1,00	21,00 ± 0,58	15,67 ± 2,60
Taurin (100 mg/kg)	60,33 ± 7,06	17,00 ± 4,04	22,67 ± 3,93
Taurin + PFOA (30 mg/kg)	65,00 ± 0,58 <sup>a</sup>	12,00 ± 6,25	23,00 ± 5,86
Kontrol (mısır yağı)	65,00 ± 1,53	2,67 ± 1,76	32,33 ± 3,18
KoQ <sub>10</sub> (50 mg/kg)	61,33 ± 2,60	7,67 ± 4,10	31,00 ± 1,53
KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)	59,33 ± 2,33	6,67 ± 2,33 <sup>a</sup>	34,00 ± 4,04 <sup>b</sup>

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. n= 3

<sup>a</sup>PFOA (30 mg/kg) grubuna göre önemli ölçüde farklı, p< 0,05. <sup>b</sup>PFOA (30 mg/kg) grubuna göre önemli ölçüde farklı, p= 0,05.

### Böbrek Hücre Döngüsünde Meydana Gelen Değişiklikler

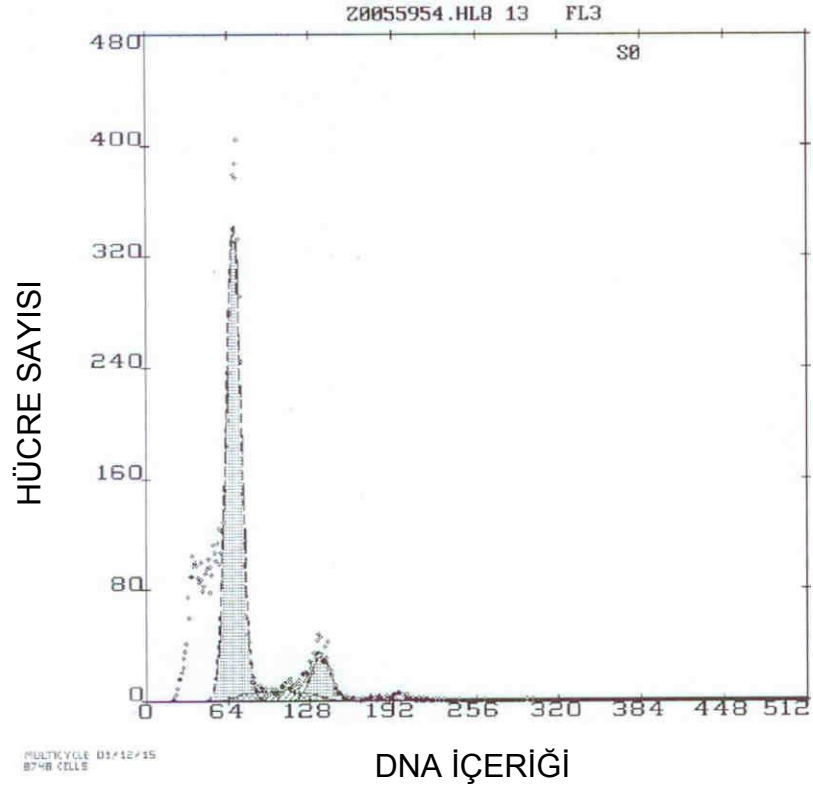
Böbrek dokusunda, hücre döngüsü fazlarındaki hücre dağılım yüzdelerinin hesaplandığı örnek histogram Şekil 4.12'de verilmiştir. Böbrek dokularından elde edilen hücreler akım sitometrisi yöntemi ile analiz edildiğinde, hücre döngüsünde G0/G1 fazındaki hücre yüzdelerinin, su kontrol grubu ile kıyaslandığında, düşük doz PFOA uygulanan grupta % 28,6 (p< 0,05), yüksek doz PFOA uygulanan grupta % 12,1 (p< 0,05) oranında azalma gösterdiği saptanmıştır. Taurin + PFOA uygulanan grupta G0/G1 fazındaki hücre yüzdesinde, su kontrol ve taurin grupları ile karşılaştırıldığında herhangi bir değişiklik saptanmamıştır, ancak 30 mg/kg PFOA uygulanan grup ile

karşılaştırıldığında hücre yüzdesinde % 12,8 oranında ve önemli düzeyde ( $p < 0,05$ ) artış olduğu belirlenmiştir. KoQ<sub>10</sub> + PFOA uygulanan grupta G0/G1 fazındaki hücre yüzdesinin, mısır yağı ve PFOA (30 mg/kg) grubu ile karşılaştırıldığında önemli derecede artış gösterdiği saptanmıştır (sırasıyla, % 6,7, % 24,3,  $p < 0,05$ ) (Tablo 4.21).

Düşük doz (15 mg/kg) ve yüksek doz (30 mg/kg) PFOA uygulanan gruplarda sentez fazındaki hücre yüzdesinin, su kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmayan ölçüde azalma gösterdiği belirlenmiştir. Taurin + PFOA uygulanan grupta ölçülen S fazındaki hücre yüzdesinde, su kontrol ve tek başına PFOA (30 mg/kg) uygulanan gruplara göre düşük düzeyde bir artış gözlenirken, tek başına taurin uygulanan gruba göre düşük düzeyde bir azalma olduğu saptanmıştır. KoQ<sub>10</sub> + PFOA'ya maruz bırakılan grupta, S fazındaki hücre yüzdesinin, tek başına PFOA (30 mg/kg) uygulanan gruba kıyasla herhangi bir değişiklik göstermediği, mısır yağı ve KoQ<sub>10</sub> gruplarına kıyasla ise düşük düzeyde bir azalma gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4.21).

Düşük (15 mg/kg) ve yüksek doz (30 mg/kg) PFOA uygulanan grupta G2/M fazındaki hücre yüzdesinin, su kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli derecede artış gösterdiği belirlenmiştir (sırasıyla, % 165,8, % 70,4,  $p < 0,05$ ). Taurin + PFOA uygulanan grubun G2/M fazındaki hücre yüzdesinde ise, su kontrol ve taurin uygulanan gruplara kıyasla değişiklik gözlenmezken, tek başına PFOA (30 mg/kg) uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan ölçüde bir azalma saptanmıştır. KoQ<sub>10</sub> + PFOA uygulanan grubun G2/M fazındaki hücre yüzdesinin, kontrol ve PFOA (30 mg/kg) gruplarına göre önemli ölçüde bir azalma (sırasıyla, % 38,9, % 70,7,  $p < 0,05$ ), KoQ<sub>10</sub> grubuna göre ise herhangi bir değişiklik göstermediği bulunmuştur (Tablo 4.21).





**Şekil 4.12.** Böbrek dokusunda KoQ<sub>10</sub> uygulanan gruptaki hücre döngüsü dağılımını gösteren histogram.

**Tablo 4.21.** Böbrek hücrelerinin hücre döngüsünün G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki yüzde dağılımları.

<b>GRUP</b>	<b>G0/G1 (%)</b>	<b>S (%)</b>	<b>G2/M (%)</b>
Kontrol (su)	82,67 ± 0,33	2,67 ± 0,67	14,67 ± 0,33
PFOA (15 mg/kg)	59,00 ± 1,53 <sup>a</sup>	2,00 ± 0,58	39,00 ± 1,00 <sup>a</sup>
PFOA (30mg/kg)	72,67 ± 6,33 <sup>a</sup>	2,33 ± 0,33	25,00 ± 6,51 <sup>a</sup>
Taurin (100 mg/kg)	83,67 ± 1,20	3,67 ± 0,67	12,67 ± 1,86
Taurin + PFOA (30 mg/kg)	82,00 ± 1,53 <sup>b</sup>	3,00 ± 0,58	15,00 ± 2,08
Kontrol (mısır yağı)	84,67 ± 2,33	3,33 ± 3,33	12,00 ± 2,08
KoQ <sub>10</sub> (50 mg/kg)	88,67 ± 2,85	3,33 ± 1,86	8,00 ± 1,00
KoQ <sub>10</sub> + PFOA (30 mg/kg)	90,33 ± 0,33 <sup>b,c</sup>	2,33 ± 0,33	7,33 ± 0,67 <sup>b,c</sup>

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. n= 3.

<sup>a</sup>Kontrol (su) grubuna göre önemli ölçüde farklı, p< 0,05. <sup>b</sup>PFOA (30 mg/kg) grubuna göre önemli ölçüde farklı, p< 0,05. <sup>c</sup>Mısır yağı grubuna göre önemli ölçüde farklı, p< 0,05.

## 4.2. *In Vitro* Çalışmalara İlişkin Sonuçlar

### 4.2.1. PFOA'nın Vero Hücreleri Üzerindeki Etkileri

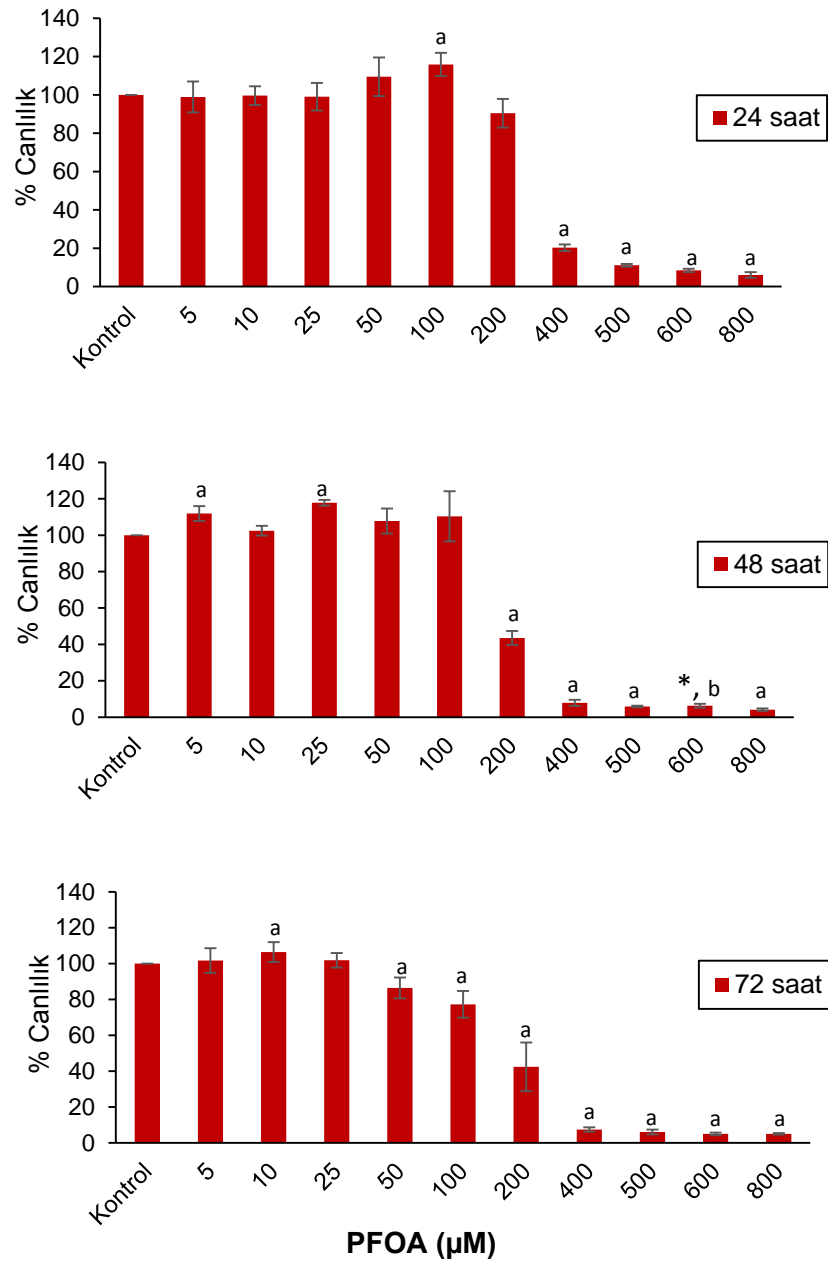
Farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 25, 50, 100, 200, 400, 500, 600, 800  $\mu\text{M}$ ) PFOA ile 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübe edilen vero hücre kültürlerinde MTT testiyle belirlenen canlılık yüzdesi sonuçları Şekil 4.13'de verilmiştir.

Hücrelerin 24 saat süreyle PFOA ile inkübasyonu sonucunda 100  $\mu\text{M}$  PFOA konsantrasyonuna kadar hücre canlılığında herhangi bir azalma gözlenmezken, 200  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda hücre canlılığında düşük düzeyde bir azalma; 400-800  $\mu\text{M}$  PFOA konsantrasyon aralığında ise önemli ( $p < 0,02$ ) ölçüde bir azalma olduğu saptanmıştır. 50 ve 100  $\mu\text{M}$  PFOA konsantrasyonlarında, hücre canlılığında sırasıyla % 9,5 ve % 15,9 olmak üzere artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.13).

Hücrelerin PFOA ile inkübasyon süresi 48 saate çıkartıldığında, 100  $\mu\text{M}$  PFOA konsantrasyonuna kadar herhangi bir sitotoksik etki gözlenmemiş, 200-800  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında ise hücre canlılığı önemli ölçüde azalmıştır (600  $\mu\text{M}$  için  $p < 0,03$ ; diğer konsantrasyonlar için  $p < 0,02$ ). PFOA'nın 5-100  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında hücre canlılığında yaklaşık % 18'e varan oranlarda artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.13).

Hücreler, PFOA ile 72 saat süreyle inkübe edildiğinde, 50  $\mu\text{M}$  ve üzerindeki PFOA konsantrasyonlarında hücre canlılığında doza bağlı ve önemli derecede ( $p < 0,02$ ) bir azalma olduğu saptanmıştır. 400  $\mu\text{M}$  ve üzerindeki konsantrasyonlarda, PFOA hücreler için yüksek düzeyde sitotoksik etki göstermiştir. 10  $\mu\text{M}$  PFOA konsantrasyonunda ise hücre proliferasyonunda yaklaşık % 6 oranında bir artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13).

Bütün inkübasyon sürelerinde, 400-800  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında, hücre canlılığı  $\leq$  % 20 olarak ölçülmüştür.



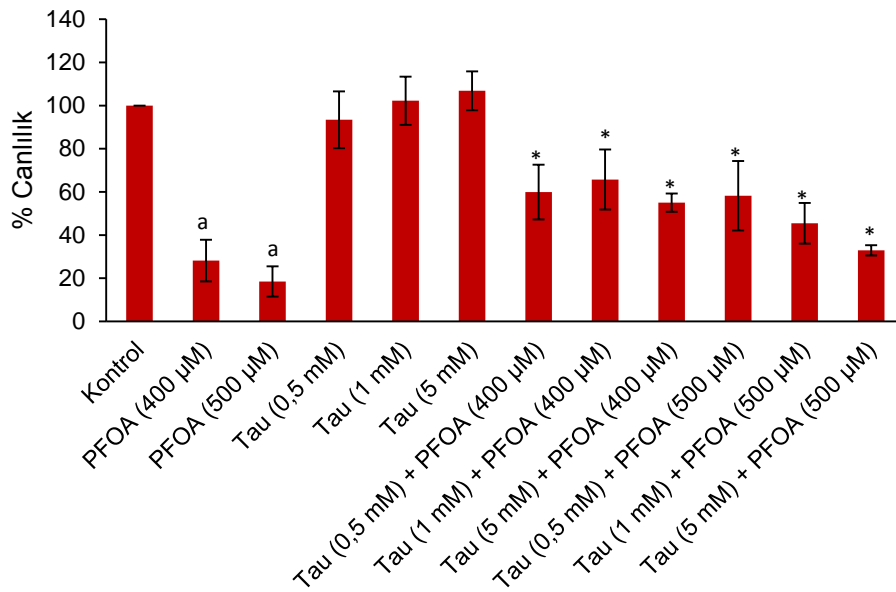
**Şekil 4.13.** Farklı konsantrasyonlarda PFOA ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen vero hücrelerinin canlılık yüzdeleri.

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Sonuçların her biri 4'lü veya 8'li çalışılmış, en az 3 veya 4 ayrı deneyin ortalama  $\pm$  SEM değeri olarak verilmiştir. \*n= 2.

<sup>a</sup>Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı,  $p < 0,02$ . <sup>b</sup>Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı,  $p < 0,03$ .

#### 4.2.2. Vero Hücre Kültürlerinde Taurinin Etkisi

Vero hücrelerinin taurin ile 0,5; 1 ve 5 mM konsantrasyonlarda 4 saat ön inkübasyonunun ardından, hücreler 400 ve 500  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda PFOA ile 24 saat inkübe edildiğinde, hücre canlılığında, tek başına PFOA'ya maruz bırakılan hücrelere oranla istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde bir artış olduğu gözlenmiştir. Taurin, 400  $\mu\text{M}$  PFOA'nın meydana getirdiği sitotoksik etkiye karşı koruyuculuğunu en yüksek 1 mM konsantrasyonda göstermiş olup, bunu azalan oranlarda 0,5 ve 5 mM'lık taurin konsantrasyonları izlemiştir. Taurinle ön inkübasyonu takiben, hücreler PFOA'nın 500  $\mu\text{M}$  konsantrasyonuna 24 saat süreyle maruz bırakıldıklarında ise, taurin konsantrasyonu arttıkça koruyuculuk oranının azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.14). Hücreler sadece taurin ile inkübe edildiklerinde ise hücre canlılığında taurin konsantrasyonuna bağlı olarak artış gözlenmiştir.



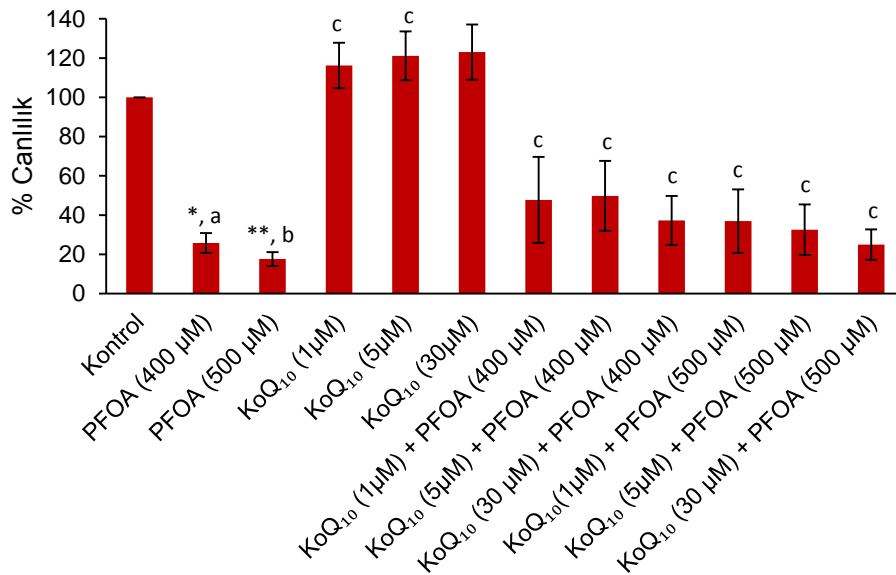
**Şekil 4.14.** Vero hücrelerinde PFOA'nın indüklediği sitotoksik etkiye karşı taurinin koruyucu etkisi.

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Sonuçların her biri 4'lü veya 8'li çalışılmış, en az 3 veya 5 ayrı deneyin ortalama  $\pm$  SEM değeri olarak verilmiştir. \*n= 2.

<sup>a</sup>Kontrol grubuna göre önemli ölçüde farklı, p< 0,02.

### 4.2.3. Vero Hücre Kültürlerinde KoQ<sub>10</sub>'un Etkisi

KoQ<sub>10</sub>'un üç ayrı konsantrasyonu (1, 5 ve 30 µM) ile 4 saat ön inkübasyona bırakılan vero hücreleri daha sonra 400 ve 500 µM konsantrasyonda PFOA ile 24 saat inkübe edildiğinde, KoQ<sub>10</sub>'un PFOA'nın meydana getirdiği sitotoksik etkiye karşı istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.15). 400 µM konsantrasyondaki PFOA'nın sitotoksik etkisine karşı, KoQ<sub>10</sub>'un 5, 1, 30 µM konsantrasyonlarında azalan sırayla koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır. Hücrelerin artan konsantrasyonda KoQ<sub>10</sub> ile ön inkübasyonları, 500 µM PFOA'nın sitotoksik etkisine karşı azalan düzeyde bir koruyucu etki meydana getirmiştir.



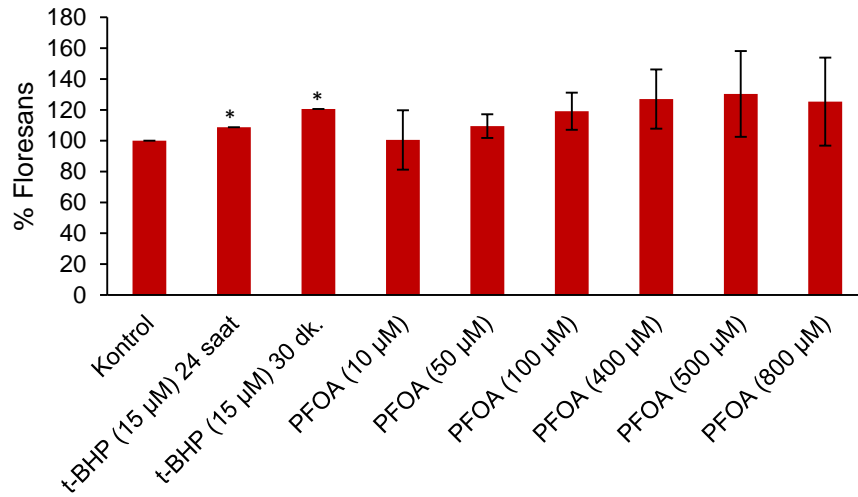
**Şekil 4.15.** Vero hücrelerinde PFOA'nın indüklediği sitotoksik etkiye karşı KoQ<sub>10</sub>'un koruyucu etkisi.

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Sonuçların her biri 4'lü veya 8'li çalışılmış, en az 3 ayrı deney değerleri ortalama ± SEM olarak verilmiştir. \*n= 5, \*\*n= 6.

<sup>a</sup>Kontrol grubuna göre önemli ölçüde farklı, p< 0,03. <sup>b</sup>Kontrol grubuna göre önemli ölçüde farklı, p< 0,02. <sup>c</sup>Kontrol grubuna göre önemli ölçüde farklı, p< 0,04.

#### 4.2.4. Vero Hücrelerinde Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Oluşumu

PFOA'nın vero hücrelerindeki reaktif oksijen bileşikleri oluşturma kapasitesi, DCFH-DA'nın DCF'ye dönüşüm reaksiyonuyla değerlendirilmiştir. 24 saat süreyle PFOA'nın 10, 50, 100, 400, 500 ve 800  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları ile inkübe edilen hücrelerdeki DCF % floresans düzeyinde 50-500  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında doza bağımlı olarak düşük düzeyde bir artış gözlenmiş, 800  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda ise bu artışta yaklaşık % 5 oranında bir azalma meydana gelmiştir. Bu deneyde pozitif kontrol olarak t-BHP kullanılmıştır (Şekil 4.16).



**Şekil 4.16.** Vero hücrelerinde PFOA'nın ROB oluşumunu indükleyici etkisi.

Sonuçların istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. n= 2, \*n= 1.

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, çevrede ve buna bağlı olarak insan ve hayvanların biyolojik örneklerinde ölçülebilir düzeylerde saptanan PFOA'nın oksidatif stres meydana getirici etkisi ile sitotoksik etkileri ve bu etkilerin mekanizmaları *in vivo* ve *in vitro* sistemler kullanılarak araştırılmıştır.

Bu amaçla, öncelikle Balb/c türü yetişkin erkek fareler kullanılarak bileşiğin oksidatif stres ve antioksidan sistemler üzerindeki etkileri üç ayrı dokuda ölçülmüş ve histopatolojik incelemeler yapılmıştır. Aynı model sistemde, taurin ve KoQ<sub>10</sub>'un olası koruyucu etkileri de değerlendirilmiştir. *In vitro* model sistem olarak seçilen maymun böbrek epitel hücre kültürlerinde ise sitotoksisite değerlendirmesi, *in vivo* sistemde kullanılan koruyucu maddeler varlığında gerçekleştirilmiştir.

### 5.1. PFOA'nın Vücut ve Organ Ağırlıklarına Etkisi ve Dokularda Gözlenen Histopatolojik Değişiklikler

Son yıllarda bilimsel ve düzenleyici kurumlar tarafından dikkatle değerlendirilen bir bileşik olarak tanımlanan PFOA ile fare ve sıçanlar üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalarda bileşiğin, hayvanların toplam vücut ağırlığında azalmaya, bağıl karaciğer ağırlıklarında ve karaciğer boyutlarında ise artışa neden olduğu gösterilmiştir (11, 33, 34, 157, 386, 387). Yapılan bazı çalışmalarda, PFOA'nın hayvanların bağıl böbrek ağırlıklarında herhangi bir değişiklik meydana getirmedeği bildirilirken (11), bazılarında ise artışa neden olduğu gösterilmiştir (168, 388). Loveless ve ark.'larının (137) farklı APFO formları ile yaptığı bir çalışmada ise bileşiklerin, fare ve sıçanların böbrek ağırlıklarında değişikliklere neden olduğu belirtilmiş, gözlenen değişikliklerin farelerde böbrek ağırlığında azalma, sıçanlarda ise artış şeklinde meydana geldiği kaydedilmiştir. PFOA'nın beyin ağırlıklarına olan etkisinin incelendiği sınırlı sayıda çalışmada ise, PFOA'nın sıçanlarda bağıl beyin ağırlıkları üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (168, 388). Hayvanlarda toplam vücut ağırlığında gözlenen azalmanın, iştah kaybına bağlı olarak, toplam yem ve su tüketimindeki azalma ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (11).



Literatürdeki sonuçlara benzer şekilde, sunduğumuz bu çalışmada da, düşük (15 mg/kg) ve yüksek (30 mg/kg) doz PFOA uygulanan gruptaki hayvanların toplam vücut ağırlıklarında, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, doza bağlı olarak önemli (sırasıyla,  $p < 0,05$ ;  $p < 0,03$ ) düzeylerde azalma olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada, taurin + PFOA (30 mg/kg) uygulanan farelerin vücut ağırlığında gözlenen azalmanın, tek başına 30 mg/kg PFOA verilen hayvanlara oranla daha düşük düzeyde olması, Manna ve ark.'larının (335) sonuçlarıyla uyum göstermektedir. İlgili çalışmada da Manna ve ark.'ları (335), bu tez kapsamında uygulanan doz ve sürede taurin verdikleri farelere, 3 gün süreyle kadmiyum uyguladıklarında, taurinin kadmiyumun neden olduğu vücut ağırlığındaki azalma üzerinde koruyucu etki gösterdiğini ve kilo kaybında (bu çalışmada gözlenene benzer şekilde) bir iyileşme meydana geldiğini göstermişlerdir.

PFOA'ya maruz bırakılan hayvanlarda, bu bileşiğe verilen yanıtın en duyarlı göstergelerinden bir tanesinin hepatoselüler hipertrofi ile birlikte karaciğer ağırlığında gözlenen değişimler olduğu bildirilmiştir (143). PFOA, sıçan, fare ve *rhesus* maymunlarında potent peroksizom proliferatörü bir bileşik olarak tanımlanmaktadır (44, 149, 389). Kemiricilerin PFOA'ya maruziyeti sonucunda, peroksizomal yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonunda artışın yanı sıra peroksizom sayısı ve boyutunda da artış meydana gelmesine bağlı olarak hepatoselüler hipertrofiyi de içeren karakteristik bir dizi morfolojik ve biyokimyasal değişiklik oluşmaktadır (11, 214, 390, 391). PFOA'nın indüklediği peroksizom proliferasyonu sonucunda, özellikle yüksek dozlarda, hepatoselüler hipertrofi meydana geldiği bildirilmiştir (69, 196). Fare ve sıçanlarla yapılan bazı çalışmalarda, yüksek PFOA dozlarında, difüze hepatoselüler hipertrofiye, asidofilik dejenerasyon ve/veya nekrozun eşlik ettiği gösterilmiştir (11, 69). Farelerde gözlenen karaciğer ağırlığındaki artışın kısmen, peroksizom, düz endoplazmik retikulum ve mitokondri proliferasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (11, 137, 157).

Literatürle uyumlu olarak bu çalışmada da PFOA uygulamasına bağlı olarak, hayvanların bağıl karaciğer ağırlıklarında önemli düzeyde ( $p < 0,003$ , her iki doz ile) artış olduğu saptanmıştır. Ayrıca PFOA uygulanan hayvanların

karaciğer dokularının üzerinde gözle görülebilen beyaz lekeler olduğu gözlenmiştir. Cui ve ark.'larının (157) yaptığı bir çalışmada, 28 gün boyunca perflorooktansülfonik asite (PFOS) maruz bırakılan sıçanlarda karaciğer dokularının yüzeyinde sarı lekeler olduğu belirlenmiş ve bu lekelerin PFOS'nin indükleyebileceği hepatik enflamasyonla ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında, dokular histopatolojik olarak incelendiğinde herhangi bir enflamasyon bulgusuna rastlanmamış, ancak makroskobik olarak karaciğer dokularında görülen bu beyaz lekelerin, nekroz bulgularıyla uyumlu olduğu saptanmıştır.

Bu tez çalışmasında, PFOA uygulanan farelerin karaciğer dokularında hepatomegalinin yanı sıra eosinofilik (asidofilik) sitoplazma, balon dejenerasyon ve nekroz gözlenmiş olup, elde ettiğimiz sonuçların, yukarıda belirtildiği gibi literatürlerde gözlenen histopatolojik bulguları destekler nitelikte olduğu görülmektedir (11, 157). Özellikle yüksek doz PFOA uygulanan grupta gözlenen nekrozun, diğer çalışma gruplarına oranla daha yaygın olması, literatür verileri ile de uyum göstermektedir (69). Nitekim çalışmamızda, düşük ve yüksek doz PFOA uygulanan hayvan grupları ile KoQ<sub>10</sub> veya taurin ile birlikte, PFOA uygulanan gruplarda yer alan farelerin karaciğerlerinde de hepatoselüler hipertrofi ve nekroz gözlenmiş olmakla birlikte, koruyucu olarak KoQ<sub>10</sub> uygulanan grupta izlenen nekroz bulgularının PFOA verilen gruba göre daha az olduğu saptanmıştır.

Sunulan bu tez çalışmasında, farelere PFOA uygulanmasının, bağlı beyin ağırlıkları üzerinde - yüksek doz uygulamada önemli ( $p < 0,05$ ) olmak üzere- her iki doz düzeyinde de artış meydana getirdiği gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan PFOA dozunun (15 mg/kg), 2 yıl süreyle sıçanlara uygulandığı bir kronik toksisite çalışmasında da, PFOA'nın erkek sıçanların beyin ağırlıklarında artışa neden olduğu bildirilmiştir (388). Ancak her iki çalışmadaki PFOA'ya maruziyet süreleri arasında büyük fark olması nedeniyle bir karşılaştırma yapılması olanağı bulunmamaktadır.

Cui ve ark.'ları tarafından yapılan bir çalışmada, 28 gün süreyle 20 mg/kg PFOA'ya maruz bırakılan sıçan beyinleri histopatolojik olarak incelendiğinde, serebral gliositlerde fokal hiperplazi ve hafif fokal hemoraji,

venlerin ve nörositlerin etrafındaki boşluklarda genişleme ve ayrıca sinir liflerinin fokal demiyelizasyonunun eşlik ettiği serebral arakinoid inferior kaval venlerde dilatasyon ve konjesyon varlığı belirlenmiştir (157). Bu tez çalışması kapsamında yapılan histopatolojik analizlerde ise, beyin dokusunda herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmamıştır. Gerek hayvan türünün gerekse PFOA uygulama süresinin literatürdeki çalışmalardan farklı olması, beyin dokularında herhangi bir histopatolojik değişiklik gözlenmemesinin bir nedeni olabilir. Erişebildiğimiz kadarıyla literatürde hayvanların beyin dokuları üzerinde yapılmış histopatolojik bir çalışma bulunmaması nedeniyle sonuçlarımızın karşılaştırılması sadece Cui ve ark'larının (157) çalışmasıyla sınırlı kalmıştır.

Literatürde, PFOA'nın böbrekler üzerindeki etkilerinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Son ve ark.'larının (11) yaptıkları bir çalışmada, fareler içme suyu yoluyla 2, 10, 50 ve 250 ppm konsantrasyonlarda PFOA'ya 21 gün süreyle maruz bırakıldıklarında hayvanların böbrek boyutları ve bağıl böbrek ağırlıklarında herhangi bir değişiklik meydana gelmediği bildirilmiştir. Ancak, Butenhoff ve ark.'larının (168) sıçanlar üzerinde yaptıkları çok nesilli bir gelişimsel toksisite çalışmasında, PFOA maruziyetinin ebeveyn ve birinci nesil sıçanların bağıl böbrek ağırlıklarında artış meydana getirdiği; 90 gün ve 2 yıl süren iki ayrı toksisite çalışmasında da PFOA uygulamasının sıçanlardaki bağıl böbrek ağırlıklarında artışa neden olduğu gösterilmiştir (69). Bu tez çalışmasında hayvanların bağıl böbrek ağırlıklarında 15 mg/kg dozda düşük düzeyde bir azalma gözlenirken, 30 mg/kg dozda herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Elde ettiğimiz verilerin literatürdeki verilerden farklı olmasının, uygulanan doz ve süredeki farklılığın yanı sıra hayvan türündeki farklılıklardan da kaynaklanmış olabileceği düşünülebilir.

PFOA verilen hayvanların böbreklerinde meydana gelen histopatolojik değişikliklerin incelendiği bir çalışmada, önemsiz düzeyde glomeruli ve karmaşık tübül yapısı varlığı ile renal korteks ve medullada konjesyon, sitoplazmik asidofili düzeyinde artış olduğu gösterilmiştir (157). Bu tez kapsamında yapmış olduğumuz çalışmada, farelerin böbrek dokusunda hafif konjesyon ve hemoraji dışında başka bir patolojik bulguya rastlanmamıştır.

Son ve ark.'larının (11) yapmış oldukları çalışmada da, PFOA uygulanan gruptaki farelerin böbreklerinde, karaciğer dokusuna kıyasla çok daha düşük oranda histopatolojik değişiklik gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu bulgunun sunduğumuz çalışmadaki verilere benzer olduğu düşünülebilir.

## **5.2. PFOA'nın Dokulardaki Oksidan ve Antioksidan Parametreler Üzerindeki Etkisi**

### **5.2.1. PFOA'nın Karaciğer Dokusundaki Oksidan ve Antioksidan Parametrelere Etkileri**

Literatürde, PFOA ve oksidatif stres konusunda, *in vivo* modeller kullanılarak yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (32-34, 392). PFOA'nın ve perflorlu bileşikler arasında yer alan ve peroksizom proliferatörü olarak tanımlanan perflorononanoik asit ve perflorododekanoik asitin karaciğerde lipid peroksidasyon düzeylerini arttırdığını gösteren çeşitli çalışmalar bulunmakla birlikte (35, 36, 39, 40, 393, 394), bu bileşiklerin lipid peroksidasyon düzeylerinde herhangi bir değişiklik yapmadığını (395-397) veya bu düzeyleri azalttığını (398) gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. PFOA'ya maruziyet sonucunda oksidatif stres parametrelerinin incelendiği ve Yang ve ark.'larının (39) fareler üzerinde yaptığı bir çalışmada, PFOA'nın karaciğerde oksidatif stres göstergeleri olan MDA ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir. Kamendulis ve ark.'larının (36) fareler üzerinde yaptıkları bir başka araştırmada ise hayvanlara 7 gün süreyle 0,5; 2,5; 5 mg/kg dozlarda PFOA verilmiş ve bileşiğin karaciğerde ve pankreasta lipid peroksidasyon ürünü olan 8-iso-PGF<sub>2α</sub> düzeylerini doza bağlı olarak arttırdığı belirlenmiştir. Somon balıkları kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada da PFOA maruziyeti sonucunda oksidatif strese verilen yanıtta ve lipid peroksidasyon düzeyinde değişiklikler meydana geldiği bildirilmiştir (40). Sunduğumuz bu tez çalışmasında ise karaciğer MDA değerlerinde, 15 mg/kg PFOA verilen grupta düşük düzeyde bir artış olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar Yang ve ark.'ları (39) ile Kamendulis ve ark.'larının (36) gerçekleştirdiği *in vivo* çalışmalarda elde edilen sonuçlar ile uyum göstermekte ve bir peroksizom proliferatörü olarak

tanımlanan PFOA'nın lipid peroksidasyon indükleyici etkileri konusunda yapılmış çeşitli çalışmalar için de bir örnek oluşturmaktadır.

Sinha ve ark.'ları (399), kadmiyumun lipid peroksidasyon oluşturuca etkisine karşı, bu çalışmada uygulanan doz ve sürede, taurinin koruyucu etkisini araştırmışlar ve taurinin kadmiyumun indüklediği lipid peroksidasyon düzeylerinde azalmaya neden olduğunu belirlemişlerdir. Song ve ark.'ları (339) ise 100 mg/kg KoQ<sub>10</sub>'un 3 hafta süreyle farelere uygulanmasının N-nitrozodietilaminin oluşturduğu lipid peroksidasyona karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermişlerdir.

Bu tez çalışmasında da taurin ve KoQ<sub>10</sub>'un karaciğerde ölçülen MDA düzeylerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç, her iki koruyucunun da 15 mg/kg PFOA uygulanan grupta ölçülen MDA düzeyinde gözlenen düşük düzeyde yükselmeye karşı da etkili olabileceğini düşündürmektedir. Taurin antioksidan etkisini, hipokloröz asit (47, 400), nitrik oksit (401), hidrojen peroksit (402) ve daha az oranda hidroksil radikalini (336) süpürerek doğrudan, membranlardaki su ve iyon geçirgenliğindeki artışı önleyerek ise dolaylı yoldan göstermektedir (331, 334, 400). KoQ<sub>10</sub> ise mitokondriyal solunum zincirinde elektron taşıyıcı olarak görev yapmakta ve serbest radikalleri süpürerek, hücre membranlarında lipid peroksidasyonun oluşumunu başlangıç ve ilerleme fazında önleyerek ve E vitamininin yeniden üretilmesine katkıda bulunarak antioksidan işlev göstermektedir (338, 347). PFOA'nın karaciğer dokusunda MDA düzeylerinde artışa neden olması ve bu artışın bir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> süpürücüsü olan taurin ve lipid peroksidasyonu önleyen KoQ<sub>10</sub> tarafından azaltılması, PFOA'nın oksidatif stres oluşturuca etkilerinin doğrulanması açısından önem taşımaktadır.

Yapılan çeşitli *in vivo* çalışmalarda PFOA'nın ve perflorodekanoik asitin karaciğerdeki toplam GSH (34) ve redükte GSH düzeylerini arttırdığı (403) gösterilmiş olmakla birlikte, PFOA'nın toplam GSH düzeylerini değiştirmediğini (395) gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Mashayeki ve ark.'larının (397) sıçanlardan izole edilmiş karaciğer mitokondrileri üzerinde yapmış oldukları çalışmada ise PFOA'nın redükte glutatyon düzeylerini değiştirmediği gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada 21 gün süreyle 1, 5, 10 mg/kg dozlarda

PFOA uygulanan farelerin karaciğerlerindeki toplam glutatyon düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (34). Bu çalışmaya benzer şekilde bizim çalışmamızda da PFOA, her iki dozda (15 ve 30 mg/kg) da karaciğerdeki toplam GSH düzeylerini arttırmıştır. Toplam GSH düzeylerinin artmasının, düşük düzeydeki oksidatif strese verilen adaptif bir cevap olduğu düşünülebilir (34, 41). Sıçan karaciğerinde metiokarb tarafından indüklenen oksidatif hasara karşı taurinin koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, hayvanlara 21 gün süreyle 50 mg/kg taurin uygulanmasının GSH düzeyinde meydana gelen artışta azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (404). Benzer şekilde, bu tez çalışmasında da farelere koruyucu olarak taurin veya KoQ<sub>10</sub> verilmesi, PFOA (30 mg/kg) tarafından artırılan toplam GSH düzeylerinin kontrol grubunda gözlenen toplam GSH düzeylerine yaklaşmasını sağlamıştır.

Literatürde, PFOA ve peroksizom proliferatörlerinin karaciğer SOD aktivitesini düşük dozda artırıp yüksek dozda azalttığını gösteren çalışmalar bulunduğu gibi (41, 393, 405), SOD aktivitesini arttırdığını (36, 40, 50, 396) gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Zhang ve ark.'ları (393) yapmış oldukları bir çalışmada, PFOA gibi bir perflorlu karboksilik asit olan perflorododekanoik asiti sıçanlara oral yoldan 14 gün boyunca 1, 5 ve 10 mg/kg dozlarda uygulamışlar ve karaciğer SOD aktivitesinde 1 mg/kg dozda artış, 5 ve 10 mg/kg dozlarda ise azalma olduğunu saptamışlardır. Bu tez çalışmasında da PFOA'nın, 15 ve 30 mg/kg dozlarda Cu-Zn SOD aktivitesinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Doz düzeyleri dikkate alındığında bizim çalışmamızın Zhang ve ark.'larının çalışmasıyla uyumlu olduğu söylenebilir. Cu-Zn SOD aktivitesindeki azalmanın, süperoksit radikalinin aşırı üretiminin sonucunda oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in enzimdeki sistein amino asitini oksidasyona uğratarak enzimin aktivitesini kaybetmesinden kaynaklanabileceği bildirilmektedir (41, 394). Ayrıca süperoksit radikalinin fazla oranda üretilmesini önleyebilmek amacıyla kullanılan SOD'un aktivitesinde azalma meydana gelebileceği düşünülebilir. Taurinin, kadmiyum tarafından indüklenen oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin incelendiği bir çalışmada, kadmiyum uygulanan gruptaki farelerin karaciğer SOD aktivitelerinde azalma olduğu gözlenmiştir. Bu farelere, bu çalışmada kullanılan benzer doz ve

sürede taurin uygulanmasının, SOD aktivitesini kontrol grubunda gözlenen düzeylere yaklaştırdığı bildirilmiştir (406). Sunulan bu tez çalışmasında da, sözü edilen çalışmayla uyumlu olarak, taurin uygulamasının, PFOA uygulanan grupta ölçülen Cu-Zn SOD aktivitesindeki azalmada iyileşmeye neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca KoQ<sub>10</sub> uygulanmasının da karaciğer SOD aktivitesi üzerinde benzer bir etkisinin olduğu gözlenmiştir.

Peroksizom proliferatörlerinin karaciğerde GPx aktivitesini baskıladığı bilinmektedir (396, 398, 405, 407, 408). Yapılan çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmada, PFOA'nın karaciğer GPx aktivitesini düşürdüğü gösterilmiştir (41, 50, 395). Kawashima ve ark.'larının (395) yaptıkları bir çalışmada, sıçanlar % 0,01 (a/a) oranında PFOA içeren yem ile 2 veya 26 hafta süresince beslenmiş ve sıçanların karaciğerindeki GPx aktivitesinin her iki uygulama süresinde de azaldığı saptanmıştır. Sıçanlar ile yapılan bir başka çalışmada ise hayvanlar, peroksizom proliferatörü olan nafenopin içeren yem ile (100 mg/kg) 55-59 hafta beslenmiş ve GPx aktivitesinin % 40-% 50 oranında azaldığı saptanmıştır (407). Tatlısu çipura (*Oreochromis niloticus*) balığından izole edilen hepatositler ile yapılan *in vitro* bir çalışmada ise, hücreler 24 saat süreyle 1, 5, 15 ve 30 mg/l konsantrasyonlarda PFOA'ya maruz bırakılmışlar ve GPx aktivitesinin uygulanan bütün PFOA dozlarında azaldığı belirlenmiştir (41). Sunulan bu tez çalışmasında da, literatürle uyumlu olarak PFOA'nın, GPx aktivitesinde doza bağlı bir azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Ancak çalışmamızda, PFOA (30 mg/kg) verilen gruba koruyucu olarak taurin veya KoQ<sub>10</sub> uygulamasının GPx aktivitesindeki azalma üzerinde herhangi bir etki göstermediği saptanmıştır. Karaciğer dokusunda elde edilen bu sonuçlar, organik peroksitler ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye karşı etkin olan GPx'in, lipid peroksitleri de indirgeyici özelliği dikkate alındığında önem taşımakta ve PFOA'nın bu model sistemde oksidatif stres indükleyici etkisini doğrular nitelik taşıyan bir bulgu olarak değerlendirilmektedir.

Yapılan çeşitli çalışmalarda, PFOA ve peroksizom proliferatörlerinin karaciğerde CAT aktivitesinde artışa neden olduğu saptanırken (32, 36, 38, 40, 41, 50, 395, 398), bazı çalışmalarda ise bu bileşiklerin CAT aktivitesinde önce artışa, doz arttıkça ise azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (34, 390,

393). Ahmed ve ark.'ları (34), farelere 21 gün süreyle oral yoldan PFOA uygulamış, 1 ve 5 mg/kg PFOA dozlarında karaciğer CAT aktivitesinde doza bağlı olarak artış, 10 mg/kg PFOA uygulanan farelerin karaciğer CAT aktivitesinde ise bileşiğin 5 mg/kg olarak uygulanan dozunda görülen aktiviteye oranla azalma olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada, sıçanlara oral yoldan 14 gün süreyle 1, 5 ve 10 mg/kg dozlarda perflorododekanoik asit uygulanmış, CAT aktivitesinin kontrol grubuna göre 1 mg/kg dozda arttığı, 5 ve 10 mg/kg uygulanan dozlarda ise azaldığı bildirilmiştir (393). Yapmış olduğumuz bu çalışmada da, literatürle uyumlu olarak, PFOA her iki konsantrasyonda da (15 ve 30 mg/kg) CAT aktivitesini arttırmış olmakla birlikte, düşük doz PFOA uygulanan grubun CAT aktivitesi, yüksek doz PFOA uygulanan grubun CAT aktivitesinden daha yüksek bulunmuştur. Artan CAT aktivitesinin, peroksizom proliferasyonu sonucu prooksidan üretiminin artmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir (34, 41). PFOA'nın yüksek dozlarında CAT aktivitesinde gözlenen azalmanın ise, artan oksidatif stresin sonucu olarak antioksidan sistemlerin kapasitelerinin aşılmasına bağlanabilir (409). Özden ve ark.'ları (404) taurinin metiokarb tarafından oluşturulan oksidatif hasara karşı koruyuculuğunu araştırmak amacıyla sıçanlara 20 gün süreyle 50 mg/kg taurin uygulamışlardır. Sonuç olarak taurin uygulamasının, metiokarb uygulanan grubun karaciğerlerinde görülen CAT aktivitesindeki artışta azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında ise, farelere taurin uygulamasının, 30 mg/kg dozda PFOA verilen grupta artmış olan CAT aktivitesini, yukarıda belirtilen çalışmanın sonuçlarından farklı olarak daha da arttırdığı gözlenmiştir. Bununla birlikte KoQ<sub>10</sub> uygulaması ise PFOA uygulanan gruptaki artmış CAT aktivitesini azaltıcı yönde etki göstermiştir.

### **5.2.2. PFOA'nın Beyin Dokusundaki Oksidan ve Antioksidan Parametreler Üzerindeki Etkileri**

Literatürde PFOA maruziyeti ile beyinde oksidatif stres oluşumu arasındaki ilişkiyi araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır (45,187,397). Beyin hücreleriyle yapılan *in vitro* çalışmalarda PFOA'nın hücrelerdeki reaktif oksijen bileşiklerinin düzeylerini ve lipid peroksidasyon düzeylerini arttırarak oksidatif strese yol açabileceği bildirilmiştir (45, 187). Reistad ve ark.'ları (45)



tarafından 6-8 günlük sıçanlardan izole edilmiş beyincik hücrelerinde yapılan çalışmada ise, PFOA'nın (6, 12, 15, 50, 100  $\mu$ M konsantrasyonlarda) doza bağımlı olarak reaktif oksijen bileşiklerinin oluşumunu arttırdığı bildirilmiştir. Sinir hücresi özelliği taşıyan (nörotipik) PC-12 hücreleriyle yapılan bir başka çalışmada da, bu hücrelerin 10  $\mu$ M PFOA ile 24 saat inkübasyonunun ardından lipid peroksidasyon göstergesi olan MDA düzeylerinin arttığı saptanmıştır (187). Mashayekhi ve ark.'larının (397) sıçanlardan izole edilmiş beyin mitokondrileri üzerinde yaptıkları bir çalışmada, PFOA'nın lipid peroksidasyon düzeylerini arttırdığı, indirgenmiş glutatyon düzeylerini ise değiştirmediği bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada PFOA'nın, mitokondriyal kompleks I ve kompleks III'teki ROB oluşumunu arttırdığı da belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da Mashayekhi ve ark.'larının (397) bulgularıyla paralel olarak PFOA'nın, 30 mg/kg dozda beyinde MDA düzeyini arttırdığı, toplam GSH miktarını ise her iki dozda da değiştirmediği görülmüştür. PFOA'nın ayrıca antioksidan enzimlerden Cu-Zn SOD aktivitesinde düşük düzeyde, GPx aktivitesinde ise önemli derecede azalmaya yol açtığı saptanmıştır. Bu bulgular, PFOA'nın beyin dokusunda da oksidatif stresi indüklediğini göstermesi açısından önem taşımaktadır.

Diğer taraftan, fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, farelere 5 gün süreyle 100 mg/kg taurin uygulanmasının ardından 3 gün boyunca kadmiyum verilmiş ve taurin uygulamasının, beyinde kadmiyum tarafından arttırılan lipid peroksidasyon düzeylerini azalttığı, kadmiyum tarafından azaltılan GSH düzeyleri ile SOD, GPx, CAT aktivitelerini ise arttırdığı bildirilmiştir (399). Yapılan bir başka çalışmada ise sıçanlara 28 gün boyunca KoQ<sub>10</sub> (12 mg/kg) ve alüminyum klorür (AlCl<sub>3</sub>) uygulanmış, AlCl<sub>3</sub>'ün azalttığı beyin GSH düzeyleri ile SOD, GPx ve CAT aktivitelerinin KoQ<sub>10</sub> tarafından arttırıldığı, AlCl<sub>3</sub>'ün arttırdığı beyin lipid peroksidasyon düzeyinin ise KoQ<sub>10</sub> tarafından azaltıldığı bildirilmiştir (410). Bu tez çalışmasında da, benzer süre ve dozda taurin uygulamasının, incelenen oksidatif stres parametreleri üzerinde herhangi bir etkisinin bulunmadığı gözlenmiş, KoQ<sub>10</sub> uygulamasının ise Cu-Zn SOD aktivitesini arttırdığı ve incelenen diğer oksidatif stres parametreleri üzerinde ise bir etkisinin bulunmadığı saptanmıştır.

### 5.2.3. PFOA'nın Böbrek Dokusundaki Oksidan ve Antioksidan Parametreler Üzerindeki Etkileri

Böbrekte PFOA ile oksidatif stres oluşumu arasındaki ilişkiyi araştıran *in vivo* bir çalışmada, somon balıkları 1., 3. ve 7. günlerde PFOA içeren (0,2 mg/kg) yem ile beslenmiş, 0., 2., 6., 8. günler ile PFOA maruziyetinin kesilmesini izleyen 7. günde örnekler toplanmıştır (40). Arukwe ve Mortensen (40) tarafından yapılan bu çalışmanın sonucunda balıkların böbrek MDA düzeylerinde artış olduğu saptanmıştır. Bu tez çalışmasında, böbrek dokusunda gözlenen MDA düzeylerindeki artış ile toplam GSH düzeyindeki azalma, PFOA için bir atılım organı olan böbreklerin bu bileşiğe yüksek miktarda maruz kalması ve bu organın oksidatif stresten önemli ölçüde etkilendiğinin göstergesi olması açısından önem taşımaktadır. Bu veriler, PFOA'nın indüklediği oksidatif strese karşı böbreklerin karaciğer dokusundan daha duyarlı olduğunu ileri süren Arukwe ve Mortensen'in bulguları ile de uyumludur. Ayrıca bu tez çalışmasında, böbrek CAT aktivitesinde artış olarak elde ettiğimiz sonuç da, PFOA'ya maruz bırakılan hayvanlarda ölçülen böbrek katalaz gen ekspresyonlarında artışın gösterildiği bu çalışma (40) ile uyumludur. Bu tez çalışmasında, PFOA'ya maruz bırakılan farelerin, böbrek GPx aktivitelerinde artış gözlenirken, Cu-Zn SOD aktivitesinde ise düşük dozda (15 mg/kg) azalma, yüksek dozda (30 mg/kg) ise artış olduğu saptanmıştır. Bu bilgiler, PFOA'nın oksidatif stres meydana getirici etkisini destekler nitelikte olup, Arukwe ve Mortensen'in (40) PFOA maruziyeti sonucunda bu enzimlerin gen ifadelerinde herhangi bir değişiklik saptamadığı çalışmanın sonuçları ile benzerlik göstermemiştir.

Böbrek dokularında arseniğin indüklediği oksidatif hasara karşı taurinin koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, sıçanlara 5 gün 100 mg/kg dozda taurin uygulanmasının ardından 14 gün süreyle arsenik uygulanmıştır. Arsenik varlığında MDA düzeylerinde gözlenen artış ile GSH düzeyi ve SOD, CAT, ve GPx aktivitelerinde gözlenen azalmanın, taurin varlığında MDA için azalma GSH ve antioksidan enzimler için artış yönünde değişim gösterdiği ve taurinin koruyucu etkili olduğu gösterilmiştir (411). Bu çalışma ile benzer süre ve konsantrasyonda taurin uygulanan bu tez çalışmasında, PFOA'nın böbrek

dokusunda indüklediği lipid peroksidasyon düzeyindeki artışa karşı taurinin herhangi bir koruyucu etkisinin olmadığı saptanmıştır. KoQ<sub>10</sub>'un böbreklerdeki akut sisplatin uygulamasının oluşturduğu toksisiteye karşı olan koruyucu etkisinin incelendiği bir çalışmada, farelere 6 gün boyunca 10 mg/kg dozda KoQ<sub>10</sub>, 1 gün süreyle ise sisplatin uygulanmış ve KoQ<sub>10</sub>'un sisplatin tarafından oluşturulan oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır (412). Sunulan bu tez çalışmasında, KoQ<sub>10</sub>'un yukarıdaki çalışmada belirtilen koruyucu özelliğine benzer bir etki gözlenmemiştir. Sonuçta, meydana gelen bu hasarın KoQ<sub>10</sub>'un etki gösterdiği yolakla ilişkili olmadığı düşünülebileceği gibi, bu sonucun KoQ<sub>10</sub>'un uygulandığı doz ve inkübasyon süresi ile de ilişkili olabileceği düşünülebilir.

### 5.3. PFOA'nın Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkileri

PFOA ile ilgili yapılan *in vitro* çalışmalarda bileşiğin hücre döngüsünü etkilediği ve apoptoza yol açtığı bildirilmiştir (42-44, 413). HepG2 hücreleri ile yapılan bir çalışmada, hücrelerin PFOA'nın düşük konsantrasyonu (50 µM) ile 24 saat süreyle inkübasyonunun, hücre döngüsünün G2/M fazındaki hücre sayısını arttırdığı ve S fazındaki hücre sayısını ise azalttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, PFOA'nın daha yüksek konsantrasyonlarda (100 ve 150 µM) G0/G1 fazında duraklamaya neden olduğu, G2/M ve S fazlarında ise hücre sayısında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (413). HepG2 hücreleriyle yapılan bir başka çalışmada ise hücrelerin 200 ve 400 µM PFOA ile 24 saat inkübasyonunun, hücrelerin sub-G0/G1 fazında birikmesine neden olduğu, PFOA ile birlikte glutatyonun öncü maddesi olan N-asetilsistein veya mitokondriyal membran geçiş gözenekleri inhibitörü olan siklosporin A uygulanmasının ise PFOA'nın neden olduğu apoptoz düzeyinde azalma meydana getirdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen veriler, PFOA'nın apoptozu, ROB ve mitokondri aracılıklı bir yolakla indüklediğini göstermiştir (44). Huang ve ark'larının (43) sağlıklı insan karaciğer hücrelerinde yaptıkları bir çalışmada, PFOA'nın, hücre döngüsünün G0/G1 ile S fazındaki hücre sayısında azalmaya, proapoptotik sub-G0/G1 fazı ile G2/M fazındaki hücre sayısında artışa neden olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada, PFOA'nın hücre döngüsünü G2/M fazında duraklattığı ve p53-bağımlı mitokondriyal yolağı

etkileyerek apoptoz düzeyinde artış meydana getirdiği bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında da Shabalina ve ark'larının (413) çalışmasına benzer olarak, hayvanlara yüksek doz PFOA uygulamasının, karaciğer dokusunda hücre döngüsünün G0/G1 fazındaki hücre sayısını istatistiksel olarak anlamlı olmayan ölçüde arttırdığı, G2/M fazındaki hücre sayısını ise azalttığı belirlenmiştir. Koruyucu olarak taurin uygulaması, hücre döngüsünün G0/G1 fazında duraklamasına neden olurken, KoQ<sub>10</sub> uygulanması ise hücre döngüsünün G2/M fazında duraklamasına neden olmuştur.

Vero hücreleriyle yapılan bir çalışmada ise PFOA'nın hücre döngüsünün G0/G1 fazında duraklamaya, S ve G2/M fazında bulunan hücre sayısında ise azalmaya neden olduğu gösterilmiş ve hücre içi ROB düzeyindeki artışın bir sonucu olarak, hücre döngüsünün G1 fazında duraklatıldığı ve apoptoz meydana geldiği bildirilmiştir (42). Bu tez çalışmasında ise PFOA uygulaması, sözü edilen çalışmadan farklı olarak, böbrek dokusundaki hücre döngüsünde, G0/G1 fazındaki hücre sayısında azalmaya, G2/M fazındaki hücre sayısında ise artışa neden olmuştur. Koruyucu olarak taurin ve KoQ<sub>10</sub> uygulamaları ise PFOA verilen grupta gözlenen G2/M fazındaki hücre sayısındaki artışı azaltırken, G0/G1 fazında gözlenen hücre sayısındaki azalışı arttırmıştır.

Karaciğer ve böbrek hücrelerinde apoptoz tespit edilememiştir. Kullandığımız yöntem ile sub G1 pikinin belirlendiği geç apoptoz saptanmaktadır. Bu tez çalışmasında apoptozun saptanamaması, PFOA'ya maruziyet süresi uzatıldığında ve/veya hayvanlara daha yüksek konsantrasyonda PFOA verildiğinde, yukarıda sözü edilen çeşitli *in vitro* çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olarak apoptoz gözlenebileceğini düşündürmektedir.

#### **5.4. PFOA'nın Vero Hücre Kültürleri Üzerindeki Etkileri**

PFOA ile ilgili yapılan hücre kültürü çalışmalarında, bileşiğin insan karaciğer, plasenta, periferal kan, meme kanseri, adrenokortikal karsinoma, HepG2 (insan karaciğer kanser hücresi) hücreleri ile sıçan tiroid ve serebellar granül hücreleri ve vero hücreleri gibi çeşitli hücrelerin proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (42, 45, 50, 52, 154, 160, 191, 414-418). Bu çalışmalarda

hücre canlılığındaki azalmanın gözlemlendiği PFOA konsantrasyonunun, -hücre türüne ve inkübasyon süresine bağlı olarak değişmekle birlikte- genelde 50  $\mu\text{M}$  ve üzeri konsantrasyonlar (42, 50, 415, 419), daha sık olarak da 100-200  $\mu\text{M}$  ve üzeri konsantrasyonlar olduğu bildirilmiştir (42, 50, 52, 414, 415).

PFOA'nın hücre proliferasyonunu inhibe edici etkisinin yanı sıra, düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığını arttırıcı yönde etkisi olduğu da birçok çalışmada gösterilmiştir (154, 160, 415, 418). Hu ve ark.'larının (418) insan karaciğer hücre hattında yaptıkları bir çalışmada, hücreler PFOA'nın çeşitli konsantrasyonlarıyla (12,5-1200  $\mu\text{M}$ ) 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Bu çalışmada PFOA'nın hücre canlılığını % 50 oranında azalttığı konsantrasyon 647  $\mu\text{M}$  olarak saptanmış olup, bileşiğin yaklaşık olarak 71-316  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında ise hücre proliferasyonunda artış meydana getirdiği gösterilmiştir. Çalışma sonucunda "J şeklinde" bifazik bir doz-yanıt eğrisi elde edilmiştir. HepG2 hücreleriyle yapılan bir başka çalışmada ise PFOA'nın 48 saat süre sonunda 5-50  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunda anlamlı bir artışa neden olduğu; 50  $\mu\text{M}$ 'dan daha yüksek konsantrasyonlarda ise hücre canlılığında azalma meydana getirdiği belirlenmiştir (415). Sunduğumuz bu tez çalışmasında da literatürle uyumlu bir şekilde, hücrelerin düşük konsantrasyonlarda PFOA ile inkübasyonunun [24 (50 ve 100  $\mu\text{M}$ ), 48 (5-100  $\mu\text{M}$ ), ve 72 saat (10  $\mu\text{M}$ )] hücre canlılığında artışa neden olduğu saptanmıştır. Gözlenen bu etkinin bifazik olması *hormesis* kavramıyla açıklanmaktadır (420, 421). "Hormesis" düşük dozlarda az düzeyde uyarıcı, yüksek dozlarda inhibe edici etkinin görüldüğü doz-yanıt ilişkisi olarak tanımlanır ve bu etkinin radyasyon dahil ağır metaller (kadmiyum, kurşun gibi) antibiyotik ve birçok ksenobiyotikle meydana geldiği bilinmektedir (421-423). Bu tez çalışmasında da, PFOA'nın vero hücrelerinin canlılığı üzerinde *hormesis* ile tanımlanan bir doz-yanıt ilişkisi meydana getirdiği belirlenmiştir.

Vero hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, hücrelerin PFOA ile 24 saat inkübasyonu sonucunda, PFOA'nın 220  $\mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonu ile hücrelerin MTT'yi metabolize etme yeteneklerinin % 50 oranında azaldığı belirlenmiştir. HepG2 hücreleriyle yapılan bir çalışmada ise hücrelerin PFOA ile 24 saat inkübasyonu sonucunda bileşiğin 200  $\mu\text{M}$  ve üzeri

konsantrasyonlarda hücre canlılığını azalttığı bildirilmiştir (52). Buhrke ve ark.'larının (415) HepG2 hücreleri ile yapmış oldukları çalışmada da, hücrelerin PFOA ile 48 saat inkübasyonunu takiben, bileşiğin 100  $\mu\text{M}$  ve üzeri dozlarında, hücre canlılığında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada hücreler PFOA ile 72 saat inkübe edilmiş ve nötral kırmızı testiyle bileşiğin bu hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi belirlenmiş, 50  $\mu\text{M}$  ve üzeri PFOA konsantrasyonlarında hücre canlılığının anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir (415). Bu tez çalışmasında da, literatürdeki çalışmalara benzer şekilde, hücrelerin 24 saat süreyle PFOA ile inkübasyonu sonucunda, bileşiğin 200-400  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığındaki bir doz düzeyinde hücre canlılığını % 50 oranında azalttığı, 400-800  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında ise, hücre canlılığını % 20-% 6 oranlarına düşürdüğü saptanmıştır. HepG2 hücre hattında yapılan bir diğer çalışmada da, PFOA ile hücrelerin 48 ve 72 saat inkübe edilmesinin ardından, hücre canlılığında 50  $\mu\text{M}$  ve üzeri konsantrasyonlarda anlamlı olarak bir azalma gözlemlendiği belirtilmiştir (50).

PFOA'nın vero hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT yöntemi kullanılarak araştırıldığı bu tez çalışmasında da, literatürdeki diğer sonuçlara benzer olarak, hücreler PFOA ile 48 saat süreyle inkübe edildiğinde, bileşiğin 100  $\mu\text{M}$ 'dan daha yüksek olan konsantrasyonlarında, 72 saat süreyle inkübe edildiğinde ise 50  $\mu\text{M}$  ve üzerindeki PFOA konsantrasyonlarında hücre canlılığında doza bağlı ve önemli derecede bir azalma olduğu saptanmıştır. MTT testi, metabolik olarak aktif hücrelerin canlılığını (mitokondriyal dehidrojenazların aktivitesini) ve mitokondriyal hasarı belirleyen bir testtir (368). PFOA ile yapılan *in vitro* çalışmalarda bileşiğin mitokondriyi etkilediği ve toksik etkisini buna bağlı olarak gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür (44, 50, 216, 424). Yapılan çalışmalarda, PFOA'nın mitokondriyal membranların geçirgenliğini arttırdığı, buna bağlı olarak da ATP sentezini inhibe ettiği ve ardından oksidatif stres ve apoptoza yol açtığı gösterilmiştir (44, 216, 424). PFOA'nın ayrıca elektron taşıma sisteminde kenetsizleyici ajan olarak da görev yaparak oksidatif fosforilasyonu bozduğu bildirilmiştir (216). Bu tez çalışması kapsamında bütün inkübasyon sürelerinde (24, 48 ve 72 saat) 400  $\mu\text{M}$  ve üzerindeki konsantrasyonlarda, PFOA'nın hücreler için yüksek düzeyde

( $\geq$  % 80) ve önemli derecede ( $p < 0,02$ ) sitotoksik etki göstermiş olduğu ve bileşiğin hücre canlılığını inhibe ettiği en düşük konsantrasyonunun, inkübasyon süresinin uzamasına bağlı olarak azaldığı saptanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar literatür verileri ile uyum göstermektedir ve vero hücrelerinde 10 farklı konsantrasyonda PFOA ile 24, 48 ve 72 saatlik üç ayrı inkübasyon süresinin ardından doz- ve zamana bağımlı sitotoksitenin gösterildiği ilk çalışma olması ve bu konuda ileride yapılması planlanan çalışmalarımıza temel oluşturması açısından önem taşımaktadır.

Fare hepatositlerinde arsenik tarafından indüklenen sitotoksositeye karşı taurinin koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, hücreler 14 mM taurin ile 2 saat ön inkübasyona bırakılmış, ardından 2 saat süre ile arsenik ile inkübe edilmiştir. Taurin ile ön inkübasyonun, azalan hücre canlılığında artışa neden olduğu dolayısı ile koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (425). Domuz böbrek epitel hücreleriyle yapılan bir başka çalışmada ise, 100  $\mu$ M ve 1 mM konsantrasyonda taurin ile hücrelerin 4 saat ön inkübasyona bırakılması da, çalışmada kullanılan toksik maddenin oluşturduğu sitotoksosite üzerinde koruyucu etki göstermiştir (426). Yine aynı hücreler kullanılarak yapılan bir başka çalışmada, hücrelerin 10 mM taurin ile 30 ve 60 dk ön inkübasyona bırakılması da, hücre canlılığında, toksik madde ( $\text{FeCl}_3$  + L-dopa) uygulanan gruba oranla, sırasıyla % 21 ve % 33 oranında artış meydana getirmiştir (427).

Bu tez çalışmasında, maymun böbrek epitel hücrelerinin (vero), taurin ile (0,5, 1 ve 5 mM) ön inkübasyonunun, PFOA'nın indüklediği sitotoksositeye karşı anlamlı olmayan düzeyde bir koruyuculuk sağladığı saptanmıştır. Bu verinin, PFOA'nın vero hücrelerinde meydana getirdiği sitotoksik etkinin oksidatif stres ile ilişkili olabileceği konusunda bir ön bilgi sağladığı düşünülebilir. Buna karşılık glutasyonu tüketilmiş sıçan hepatositlerinde yapılan bir başka çalışmada ise taurin ön inkübasyonunun (60,120 ve 180 dk, 200  $\mu$ M konsantrasyon), izoniazid ve hidrazin tarafından indüklenen sitotoksositeye karşı herhangi bir koruyucu etki göstermediği bildirilmiştir (428). Araştırmacılar, taurin uygulama süresinin bu hücrelerdeki antioksidan enzimlerin yenilenmesi için yeterli olmadığını ve bu nedenle taurinin koruyucu etkisini tam olarak gösteremediğini ileri sürmüşlerdir.

Fare kolon kanseri hücreleriyle yapılan bir çalışmada, hücreler 10  $\mu$ M KoQ<sub>10</sub> ile 2 saat ön inkübasyonunun ardından, 24 saat süre ile simvastatine maruz bırakılmış ve simvastatinin sitotoksik ve oksidatif stres meydana getirici etkilerinin, KoQ<sub>10</sub> uygulaması ile baskılandığı belirlenmiştir (429). Tavşan kornea keratositleriyle yapılan bir başka çalışmada ise, hücreler bir önceki çalışmayla benzer şekilde, KoQ<sub>10</sub> ile 2 saat ön inkübasyona bırakıldıktan sonra, hücrelerde farklı yollar kullanılarak (adriamisin, seramid veya radyasyon uygulaması, serum kısıtlaması) apoptozun indüklenmesi sağlanmıştır. Bu hücrelerde gözlenen sitotoksik etkinin, hücrelere KoQ<sub>10</sub> uygulaması ile azaldığı ve bu etkinin KoQ<sub>10</sub>'un -serbest radikal süpürücü etkisinden bağımsız olarak- mitokondriyal permeabilite geçiş porunu inhibe etmesi sonucu, apoptoz oluşumunu önlemesi ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (349).

Bu tez çalışmasında, literatürle uyumlu olarak, vero hücrelerinin KoQ<sub>10</sub> ile ön inkübasyonunun, PFOA'nın indüklediği sitotoksositeye karşı anlamlı olmayan düzeyde bir koruyuculuk sağladığı belirlenmiştir.

Literatürde, sinir hücrelerinde rotenonun oluşturduğu sitotoksik etkiye karşı KoQ<sub>10</sub>'un koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, KoQ<sub>10</sub>'un hücre canlılığını arttırdığı, ROB üretimini azalttığı ve mitokondriyal membran potansiyelinin devamlılığını sağladığı bildirilmiştir (430). Bu çalışmada rotenonun elektron taşıma sisteminde kompleks I inhibisyonu yaptığı, ROB üretiminde artışa yol açtığı ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu bozduğu belirtilmiştir. KoQ<sub>10</sub>'un, hücrede ROB üretimini azaltarak mitokondriyal permeabilite geçiş porunun oluşumunu engellediği veya doğrudan bu porlara bağlanarak porun açılmasını engellediği ve apoptotik faktörlerin salınımı ile hücre ölümünü önlediği ileri sürülmüştür (430). Rotenonda gözlenen toksik etki mekanizmasına benzer şekilde, PFOA'nın hücrede mitokondriyal membran por açıklığını arttırdığı, oksidatif fosforilasyonu bozduğu, oksidatif stres ve apoptoza neden olduğu bildirilmiştir (44, 216, 424). Vero hücreleriyle yapmış olduğumuz bu çalışmada da, KoQ<sub>10</sub>'un yukarıda belirtilen mekanizmaya benzer bir mekanizma aracılığıyla veya KoQ<sub>10</sub>'un radikal süpürücü özelliğine bağlı olarak hücre ölümünde azalmaya neden olduğu ileri



sürülebilir. Ancak bu mekanizmaların aydınlatılması için ayrıntılı çalışmalara gerek bulunmaktadır.

Yapılan birçok *in vitro* çalışmada PFOA'nın hücrelerde reaktif oksijen bileşiklerin düzeylerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (42-46, 50, 153, 431, 432). Freire ve ark.'ları (42) vero hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada, PFOA'nın (50, 200 ve 500 µM) ROB oluşumunu 24 saat sonunda, sadece 500 µM konsantrasyonda anlamlı olmak üzere, doza bağlı olarak arttırdığını saptamışlardır. PFOA'nın bu hücrelerde meydana getirdiği sitotoksik etkinin, hücrelerde oksidatif stres ve apoptoz oluşturmaya bağlı olarak meydana geldiği bildirilmiştir. HepG2 hücreleriyle yapılan bir diğer çalışmada ise, PFOA'nın ROB üretiminde artışa, toplam antioksidan kapasitesinde ise azalmaya neden olarak, oksidatif stresi indüklediği ve DNA hasarını arttırdığı gösterilmiştir (46). Benzer şekilde Yao ve ark.'ları da (51), PFOA'nın HepG2 hücrelerinde genotoksik etki meydana getirdiğini ve bu duruma da hücre içi ROB'nin düzeyini arttırarak oksidatif DNA hasarına yol açmak suretiyle neden olduğunu bildirmişlerdir. Zhao ve ark.'ları (433) memeli hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada, PFOA'nın mutajenik olduğunu ve bu etkisini mitokondri bağımlı ROB üretimini arttırarak gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Ancak, literatürde PFOA'nın hücrelerdeki ROB düzeyini etkilemediğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin Florentin ve ark.'larının (52) HepG2 hücreleriyle yaptığı bir çalışmada, hücreler PFOA (50-800 µM) ile 24 saat inkübe edilmiş ve ROB üretiminde herhangi bir artış olmadığı saptanmıştır. Sunduğumuz bu tez çalışmasında da PFOA'nın, literatürde var olan ve bu bileşiğin ROB oluşumuna neden olduğunu gösteren çalışma sonuçlarına benzer şekilde, 50-500 µM konsantrasyon aralığında, vero hücrelerinde ROB düzeyinde doza bağımlı olarak düşük düzeyde bir artış meydana getirdiği saptanmıştır. Ancak ROB tayini amacıyla yapılan deney sayımızın az olması, güvenilir bir yorum yapılmasını engellemekte ve sonuçlarımızın tekrarlanmasını gerektirmektedir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Toksik etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamış, kalıcı bir çevresel kirlenici olan PFOA'nın oksidatif stres ve/veya sitotoksik etkilerinin araştırılması amacıyla yapılan bu tez çalışmasında, *in vivo* ve *in vitro* model sistemler kullanılmış ve aşağıda özetlenen sonuçlar elde edilmiştir:

1. İki ayrı dozda (15 ve 30 mg/kg, ig, 10 gün) PFOA uygulanan farelerin vücut ağırlıklarında önemli ve doza bağımlı bir azalma gözlenirken, karaciğer ve böbrek ağırlıklarında, önemli düzeylerde olmak üzere, sırasıyla artış ve azalma olduğu, beyin ağırlığının ise sadece yüksek doz PFOA uygulanan grupta azaldığı gözlenmiştir.
2. Dokular histopatolojik olarak analiz edildiğinde, PFOA'nın, karaciğer dokusunda hepatoselüler hipertrofi ve nekroz gibi patolojik değişikliklere yol açtığı, beyin ve böbrek dokularında ise herhangi bir histopatolojik değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir.
3. Bileşiğin, karaciğer MDA değerlerinde, 15 mg/kg PFOA verilen grupta düşük düzeyde bir artışa neden olduğu belirlenmiştir. MDA değerlerinin beyin dokusunda yüksek, böbreklerde ise her iki doz düzeyinde de artış gösterdiği saptanmıştır. Taurin ve KoQ<sub>10</sub> uygulamasının ise lipid peroksidasyona karşı sadece karaciğer dokusunda koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir.
4. PFOA'ya maruziyetin, fare toplam glutasyon düzeyleri ile antioksidan enzim (Cu-Zn SOD, GPx ve CAT) aktivitelerinde artış ve azalış şeklinde gözlenen değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Bu değişikliklerin, genel olarak karaciğer ve beyin dokularında benzer yönde olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, PFOA'nın hayvanlarda antioksidan sistemler düzeyinde de etki yaptığını göstermesi açısından önemli olup, PFOA'nın oksidatif stres indükleyici, dolayısı ile serbest radikal meydana getirici etkileri için destekleyici bir veri niteliği taşımaktadır.
5. PFOA'nın karaciğer ve böbrek dokusundaki hücre döngülerinde değişikliklere neden olduğu görülmüş olup, herhangi bir apoptoz

bulgusuna rastlanmamıştır. Bu bulguların, ayrıntılı çalışmalarla desteklenmesine gerek bulunmaktadır.

6. Vero hücrelerinin PFOA'nın 10 farklı konsantrasyonu ile 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübasyonunun, böbrek hücrelerinde doz- ve zamana bağlı sitotoksik etki meydana getirdiği belirlenmiştir. Bu hücrelerin taurin ve KoQ<sub>10</sub> ile ön inkübasyonunun, PFOA'nın meydana getirdiği sitotoksik etkiye karşı düşük düzeyde bir koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir. PFOA'nın bu hücrelerde ROB düzeylerinde de artışa neden olduğu gösterilmiştir. Bu veriler, literatürde PFOA ile gerçekleştirilen sitotoksisite çalışmalarından elde edilen veriler ile uyum göstermektedir.

Sonuç olarak, çevresel maruziyet ve/veya günlük yaşantı ile ilişkili olarak her yaşta insanın maruz kalabileceği, toksik etki mekanizması tam olarak aydınlatılmamış bir çevresel kirletici olan PFOA konusunda bu tez kapsamında elde edilen veriler, bileşiğin toksisite mekanizmasının aydınlatılması konusunda yapılacak ileri çalışmalar için bir ön bilgi niteliğinde olup, kapsamlı çalışmalar ile daha ayrıntılı bilgilere ulaşılmasına gerek bulunmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Lau, C., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens, A., Seed, J. (2007). Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicological Sciences*, 99(2), 366-394.
2. Lindstrom, A.B., Strynar, M.J., Libelo, E.L. (2011). Polyfluorinated compounds: past, present, and future. *Environmental Science & Technology*, 45(19), 7954-7961.
3. Post, G.B., Cohn, P.D., Cooper, K.R. (2012). Perfluorooctanoic acid (PFOA), an emerging drinking water contaminant: a critical review of recent literature. *Environmental Research*, 116, 93-117.
4. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2009). Toxicological profile for perfluoroalkyls. Erişim: 21 Mayıs 2015, <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp200.pdf>
5. Kudo, N., Kawashima, Y. (2003). Toxicity and toxicokinetics of perfluorooctanoic acid in humans and animals. *The Journal of Toxicological Sciences*, 28(2), 49-57.
6. Domingo, J.L. (2012). Health risks of dietary exposure to perfluorinated compounds. *Environment International*, 40, 187-195.
7. Fraser, A.J., Webster, T.F., Watkins, D.J., Nelson, J.W., Stapleton, H.M., Calafat, A.M. ve diğerleri. (2011). Polyfluorinated compounds in serum linked to indoor air in office environments. *Environmental Science & Technology*, 46(2), 1209-1215.
8. Shoeib, M., Harner, T., M. Webster, G., Lee, S.C. (2011). Indoor sources of poly-and perfluorinated compounds (PFCS) in Vancouver, Canada: implications for human exposure. *Environmental Science & Technology*, 45(19), 7999-8005.
9. Olsen, G.W., Burris, J.M., Ehresman, D.J., Froehlich, J.W., Seacat, A.M., Butenhoff, J.L. ve diğerleri. (2007). Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and

- perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environmental Health Perspectives*, 1298-1305.
10. Klaunig, J.E., Hocevar, B.A., Kamendulis, L.M. (2012). Mode of Action analysis of perfluorooctanoic acid (PFOA) tumorigenicity and Human Relevance. *Reproductive Toxicology*, 33(4), 410-418.
  11. Son, H.-Y., Kim, S.-H., Shin, H.-I., Bae, H.I., Yang, J.-H. (2008) Perfluorooctanoic acid-induced hepatic toxicity following 21-day oral exposure in mice. *Archives of toxicology*, 82(4), 239-246.
  12. DeWitt, J.C., Peden-Adams, M.M., Keller, J.M., Germolec, D.R. (2012) Immunotoxicity of perfluorinated compounds: recent developments. *Toxicologic Pathology*, 40(2), 300-311.
  13. Johansson, N., Eriksson, P., Viberg, H. (2009). Neonatal exposure to PFOS and PFOA in mice results in changes in proteins which are important for neuronal growth and synaptogenesis in the developing brain. *Toxicological Sciences*, 108(2), 412-418.
  14. Lau, C., Thibodeaux, J.R., Hanson, R.G., Narotsky, M.G., Rogers, J.M., Lindstrom, A.B. ve diğerleri. (2006). Effects of perfluorooctanoic acid exposure during pregnancy in the mouse. *Toxicological Sciences*, 90(2), 510-518.
  15. White, S.S., Fenton, S.E., Hines, E.P. (2011). Endocrine disrupting properties of perfluorooctanoic acid. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(1-2), 16-26.
  16. Barry, V., Winquist, A., Steenland, K. (2013). Perfluorooctanoic acid (PFOA) exposures and incident cancers among adults living near a chemical plant. *Environmental Health Perspectives*, 121(11-12), 1313-1318.
  17. Shankar, A., Xiao, J., Ducatman, A. (2012). Perfluorooctanoic acid and cardiovascular disease in US adults. *Archives of Internal Medicine*, 172(18), 1397-1403.

18. Melzer, D., Rice, N., Depledge, M.H., Henley, W.E., Galloway, T.S. (2010). Association between serum perfluorooctanoic acid (PFOA) and thyroid disease in the U.S. National Health and Nutrition Examination Survey. *Environmental Health Perspectives*, 118(5), 686-692.
19. Shankar, A., Xiao, J., Ducatman, A. (2011). Perfluoroalkyl chemicals and chronic kidney disease in US adults. *American Journal of Epidemiology*, 174(8), 893-900.
20. Gallo, V., Leonardi, G., Genser, B., Lopez-Espinosa, M.-J., Frisbee, S.J., Karlsson, L. ve diğerleri. (2012). Serum Perfluorooctanoate (PFOA) and Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) Concentrations and Liver Function Biomarkers in a Population with Elevated PFOA Exposure. *Environmental Health Perspectives*, 120(5), 655-660.
21. Geiger, S.D., Xiao, J., Shankar, A. (2013). Positive association between perfluoroalkyl chemicals and hyperuricemia in children. *American Journal of Epidemiology*, 177(11), 1255-1262.
22. Sakr, C.J., Kreckmann, K.H., Green, J.W., Gillies, P.J., Reynolds, J.L., Leonard, R.C. (2007) Cross-sectional study of lipids and liver enzymes related to a serum biomarker of exposure (ammonium perfluorooctanoate or APFO) as part of a general health survey in a cohort of occupationally exposed workers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 49 (10), 1086-1096.
23. Halldorsson, T.I., Rytter, D., Haug, L.S., Bech, B.H., Danielsen, I., Becher, G. ve diğerleri. (2012). Prenatal exposure to perfluorooctanoate and risk of overweight at 20 years of age: a prospective cohort study. *Environmental Health Perspectives*, 120(5), 668-673.
24. Apelberg, B.J., Witter, F.R., Herbstman, J.B., Calafat, A.M., Halden, R.U., Needham, L.L. ve diğerleri. (2007). Cord serum concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in relation to weight and size at birth. *Environmental Health Perspectives*, 115 (11), 1670-1676.

25. Fei, C., McLaughlin, J.K., Tarone, R.E., Olsen, J. (2007). Perfluorinated chemicals and fetal growth: a study within the Danish National Birth Cohort. *Environmental Health Perspectives*, 115 (11), 1677-1682.
26. Grandjean, P., Andersen, E.W., Budtz-Jorgensen, E., Nielsen, F., Molbak, K., Weihe, P. ve diğerleri. (2012). Serum vaccine antibody concentrations in children exposed to perfluorinated compounds. *The Journal of American Medical Association*, 307(4), 391-397.
27. Granum, B., Haug, L.S., Namork, E., Stolevik, S.B., Thomsen, C., Aaberge, I.S. ve diğerleri. (2013). Pre-natal exposure to perfluoroalkyl substances may be associated with altered vaccine antibody levels and immune-related health outcomes in early childhood. *Journal of Immunotoxicology*, 10(4), 373-379.
28. Wang, I.J., Hsieh, W.S., Chen, C.Y., Fletcher, T., Lien, G.W., Chiang, H.L. ve diğerleri. (2011). The effect of prenatal perfluorinated chemicals exposures on pediatric atopy. *Environmental Research*, 111(6), 785-791.
29. Elcombe, C.R., Elcombe, B.M., Foster, J.R., Farrar, D.G., Jung, R., Chang, S.-C. ve diğerleri. (2010). Hepatocellular hypertrophy and cell proliferation in Sprague–Dawley rats following dietary exposure to ammonium perfluorooctanoate occurs through increased activation of the xenosensor nuclear receptors PPAR $\alpha$  and CAR/PXR. *Archives of Toxicology*, 84(10), 787-798.
30. Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291-295.
31. Gonzalez, F.J., Shah, Y.M. (2008). PPAR $\alpha$ : mechanism of species differences and hepatocarcinogenesis of peroxisome proliferators. *Toxicology*, 246(1), 2-8.
32. Badr, M.Z., Birnbaum, L.S. (2004). Enhanced potential for oxidative stress in livers of senescent rats by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist perfluorooctanoic acid. *Mechanisms of Ageing and Development*, 125(1), 69-75.

33. Mehrotra, K., Morgenstern, R., Lundqvist, G., Becedas, L., Bengtsson Ahlberg, M., Georgellis, A. (1997). Effects of peroxisome proliferators and/or hypothyroidism on xenobiotic-metabolizing enzymes in rat testis. *Chemico-Biological Interactions*, 104(2), 131-145.
34. Ahmed, D.Y., Ellah, M.R.A. (2012). Effect of exposure to perfluorooctanoic acid on hepatic antioxidants in mice. *Comparative Clinical Pathology*, 21(6), 1643-1645.
35. Cai, Y., Appelkvist, E.L., Depierre, J.W. (1995). Hepatic oxidative stress and related defenses during treatment of mice with acetylsalicylic acid and other peroxisome proliferators. *Journal of Biochemical Toxicology*, 10(2), 87-94.
36. Kamendulis, L.M., Wu, Q., Sandusky, G.E., Hocevar, B.A. (2014). Perfluorooctanoic acid exposure triggers oxidative stress in the mouse pancreas. *Toxicology Reports*, 1, 513-521.
37. Minata, M., Harada, K.H., Kärrman, A., Hitomi, T., Hirose, M., Murata, M. ve diğerleri. (2010). Role of Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\alpha$ . in Hepatobiliary Injury Induced by Ammonium Perfluorooctanoate in Mouse Liver. *Industrial Health*, 48(1), 96-107.
38. Sohlenius, A.-K., Andersson, K., DePierre, J.W. (1992). The effects of perfluoro-octanoic acid on hepatic peroxisome proliferation and related parameters show no sex-related differences in mice. *Biochemical Journal*, 285, 779-783.
39. Yang, B., Zou, W., Hu, Z., Liu, F., Zhou, L., Yang, S. ve diğerleri. (2014). Involvement of oxidative stress and inflammation in liver injury caused by perfluorooctanoic acid exposure in mice. *Biomed Research International*, 2014, 409837.
40. Arukwe, A., Mortensen, A.S. (2011). Lipid peroxidation and oxidative stress responses of salmon fed a diet containing perfluorooctane sulfonic- or perfluorooctane carboxylic acids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 154(4), 288-295.



41. Liu, C., Yu, K., Shi, X., Wang, J., Lam, P.K., Wu, R.S. ve diğerleri. (2007). Induction of oxidative stress and apoptosis by PFOS and PFOA in primary cultured hepatocytes of freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquatic Toxicology*, 82(2), 135-143.
42. Freire, P.F., Martin, J.P., Herrero, O., Peropadre, A., de la Pena, E., Hazen, M. (2008). In vitro assessment of the cytotoxic and mutagenic potential of perfluorooctanoic acid. *Toxicology in Vitro*, 22(5), 1228-1233.
43. Huang, Q., Zhang, J., Martin, F.L., Peng, S., Tian, M., Mu, X. ve diğerleri. (2013). Perfluorooctanoic acid induces apoptosis through the p53-dependent mitochondrial pathway in human hepatic cells: a proteomic study. *Toxicology Letters*, 223(2), 211-220.
44. Panaretakis, T., Shabalina, I.G., Grandér, D., Shoshan, M.C., DePierre, J.W. (2001). Reactive oxygen species and mitochondria mediate the induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells by the rodent peroxisome proliferator and hepatocarcinogen, perfluorooctanoic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 173(1), 56-64.
45. Reistad, T., Fonnum, F., Mariussen, E. (2013). Perfluoroalkylated compounds induce cell death and formation of reactive oxygen species in cultured cerebellar granule cells. *Toxicology Letters*, 218(1), 56-60.
46. Wielsoe, M., Long, M., Ghisari, M., Bonefeld-Jorgensen, E.C. (2014). Perfluoroalkylated substances (PFAS) affect oxidative stress biomarkers in vitro. *Chemosphere*, 129, 239-245.
47. Huxtable, R. (1992). Physiological actions of taurine. *Physiological Reviews*, 72(1), 101-163.
48. Bentinger, M., Tekle, M., Dallner, G. (2010). Coenzyme Q--biosynthesis and functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(1), 74-79.

49. Steenland, K., Fletcher, T., Savitz, D.A. (2010). Epidemiologic evidence on the health effects of perfluorooctanoic acid (PFOA). *Environmental Health Perspectives*, 1100-1108.
50. Hu, X.Z., Hu, D.C. (2009). Effects of perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate exposure on hepatoma Hep G2 cells. *Archives of Toxicology*, 83(9), 851-861.
51. Yao, X., Zhong, L. (2005). Genotoxic risk and oxidative DNA damage in HepG2 cells exposed to perfluorooctanoic acid. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 587(1), 38-44.
52. Florentin, A., Deblonde, T., Diguio, N., Hautemaniere, A., Hartemann, P. (2011). Impacts of two perfluorinated compounds (PFOS and PFOA) on human hepatoma cells: cytotoxicity but no genotoxicity? *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(6), 493-499.
53. Prevedouros, K., Cousins, I.T., Buck, R.C., Korzeniowski, S.H. (2006). Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. *Environmental Science & Technology*, 40(1), 32-44.
54. Rahman, M.F., Peldszus, S., Anderson, W.B. (2014). Behaviour and fate of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in drinking water treatment: a review. *Water Research*, 50, 318-340.
55. Gebbink, W.A., Glynn, A., Berger, U. (2015). Temporal changes (1997-2012) of perfluoroalkyl acids and selected precursors (including isomers) in Swedish human serum. *Environmental Pollution*, 199, 166-173.
56. Buck, R.C., Franklin, J., Berger, U., Conder, J.M., Cousins, I.T., de Voogt, P. ve diğeri. (2011). Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 7(4), 513-541.

57. Butt, C.M., Berger, U., Bossi, R., Tomy, G.T. (2010). Levels and trends of poly- and perfluorinated compounds in the arctic environment. *Science of The Total Environment*, 408(15), 2936-2965.
58. D'eon, J.C., Crozier, P.W., Furdui, V.I., Reiner, E.J., Libelo, E.L., Mabury, S.A. (2009). Observation of a commercial fluorinated material, the polyfluoroalkyl phosphoric acid diesters, in human sera, wastewater treatment plant sludge, and paper fibers. *Environmental Science & Technology*, 43(12), 4589-4594.
59. Lee, H., D'eon, J., Mabury, S.A. (2010). Biodegradation of polyfluoroalkyl phosphates as a source of perfluorinated acids to the environment. *Environmental Science & Technology*, 44(9), 3305-3310.
60. Sinclair, E., Kannan, K. (2006). Mass loading and fate of perfluoroalkyl surfactants in wastewater treatment plants. *Environmental Science & Technology*, 40(5), 1408-1414.
61. Taxvig, C., Rosenmai, A.K., Vinggaard, A.M. (2014). Polyfluorinated alkyl phosphate ester surfactants - current knowledge and knowledge gaps. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 115(1), 41-44.
62. D'eon, J.C., Mabury, S.A. (2007). Production of perfluorinated carboxylic acids (PFCAs) from the biotransformation of polyfluoroalkyl phosphate surfactants (PAPS): exploring routes of human contamination. *Environmental Science & Technology*, 41(13), 4799-4805.
63. Rand, A.A., Mabury, S.A. (2014). Protein binding associated with exposure to fluorotelomer alcohols (FTOHs) and polyfluoroalkyl phosphate esters (PAPs) in rats. *Environmental Science & Technology*, 48(4), 2421-2429.
64. Vaalgamaa, S., Vähätalo, A.V., Perkola, N., Huhtala, S. (2011). Photochemical reactivity of perfluorooctanoic acid (PFOA) in conditions representing surface water. *Science of The Total Environment*, 409(16), 3043-3048.

65. United States Environmental Protection Agency. (2010). The 2010/2015 PFOA Stewardship Program. Erişim: 18 Mayıs 2015, <http://www.epa.gov/oppt/pfoa/pubs/stewardship/>
66. Yamamoto, J., Yamane, T., Oishi, Y., Kobayashi-Hattori, K. (2015). Perfluorooctanoic acid binds to peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 79(4), 636-639.
67. European Chemical Agency. (2013). Candidate List of Substances of Very High Concern for Authorisation Erişim: 9 Mayıs 2015, <http://echa.europa.eu/web/guest/candidate-list-table>
68. Barton, C.A., Kaiser, M.A., Russell, M.H. (2007). Partitioning and removal of perfluorooctanoate during rain events: the importance of physical-chemical properties. *Journal of Environmental Monitoring*, 9(8), 839-846.
69. Kennedy, G.L., Butenhoff, J.L., Olsen, G.W., O'Connor, J.C., Seacat, A.M., Perkins, R.G. ve diğerleri. (2004). The toxicology of perfluorooctanoate. *Critical Reviews in Toxicology*, 34(4), 351-384.
70. Goss, K.U. (2008). The pKa values of PFOA and other highly fluorinated carboxylic acids. *Environmental Science & Technology*, 42(2), 456-458.
71. Armitage, J.M., MacLeod, M., Cousins, I.T. (2009). Modeling the global fate and transport of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanoate (PFO) emitted from direct sources using a multispecies mass balance model. *Environmental Science & Technology*, 43(4), 1134-1140.
72. Laitinen, J.A., Koponen, J., Koikkalainen, J., Kiviranta, H. (2014). Firefighters' exposure to perfluoroalkyl acids and 2-butoxyethanol present in firefighting foams. *Toxicology Letters*, 231(2), 227-232.
73. Gebbink, W.A., Glynn, A., Darnerud, P.O., Berger, U. (2015). Perfluoroalkyl acids and their precursors in Swedish food: The relative

- importance of direct and indirect dietary exposure. *Environmental Pollution*, 198, 108-115.
74. Kantiani, L., Llorca, M., Sanchis, J., Farre, M., Barcelo, D. (2010). Emerging food contaminants: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(6), 2413-2427.
  75. Perez, F., Llorca, M., Kock-Schulmeyer, M., Skrbic, B., Oliveira, L.S., da Boit Martinello, K. ve diğeri. (2014). Assessment of perfluoroalkyl substances in food items at global scale. *Environmental Research*, 135, 181-189.
  76. Pico, Y., Farre, M., Llorca, M., Barcelo, D. (2011). Perfluorinated compounds in food: a global perspective. *Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition*, 51(7), 605-625.
  77. Tittlemier, S.A., Pepper, K., Seymour, C., Moisey, J., Bronson, R., Cao, X.-L. ve diğeri. (2007). Dietary exposure of Canadians to perfluorinated carboxylates and perfluorooctane sulfonate via consumption of meat, fish, fast foods, and food items prepared in their packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 3203-3210.
  78. Trudel, D., Horowitz, L., Wormuth, M., Scheringer, M., Cousins, I.T., Hungerbühler, K. (2008). Estimating consumer exposure to PFOS and PFOA. *Risk Analysis*, 28(2), 251-269.
  79. Vassiliadou, I., Costopoulou, D., Kalogeropoulos, N., Karavoltsos, S., Sakellari, A., Zafeiraki, E. ve diğeri. (2015). Levels of perfluorinated compounds in raw and cooked Mediterranean finfish and shellfish. *Chemosphere*, 127, 117-126.
  80. Emmett, E.A., Shofer, F.S., Zhang, H., Freeman, D., Desai, C., Shaw, L.M. (2006). Community exposure to perfluorooctanoate: relationships between serum concentrations and exposure sources. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 48(8), 759-770.
  81. Halldorsson, T.I., Fei, C., Olsen, J., Lipworth, L., McLaughlin, J.K., Olsen, S.F. (2008). Dietary predictors of perfluorinated chemicals: a study from

- the Danish National Birth Cohort. *Environmental Science & Technology*, 42(23), 8971-8977.
82. Wu, X.M., Bennett, D.H., Calafat, A.M., Kato, K., Strynar, M., Andersen, E. ve diğeri. (2015). Serum concentrations of perfluorinated compounds (PFC) among selected populations of children and adults in California. *Environmental Research*, 136, 264-273.
  83. European Food Safety Authority. (2008). Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. Erişim: 21 Mayıs 2015, <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/653.pdf>
  84. Begley, T., White, K., Honigfort, P., Twaroski, M., Neches, R., Walker, R. (2005). Perfluorochemicals: potential sources of and migration from food packaging. *Food Additives and Contaminants*, 22(10), 1023-1031.
  85. Schlummer, M., Solch, C., Meisel, T., Still, M., Gruber, L., Wolz, G. (2015). Emission of perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCA) from heated surfaces made of polytetrafluoroethylene (PTFE) applied in food contact materials and consumer products. *Chemosphere*, 129, 46-53.
  86. Sinclair, E., Kim, S.K., Akinleye, H.B., Kannan, K. (2007). Quantitation of gas-phase perfluoroalkyl surfactants and fluorotelomer alcohols released from nonstick cookware and microwave popcorn bags. *Environmental Science & Technology*, 41(4), 1180-1185.
  87. Kotthoff, M., Muller, J., Jurling, H., Schlummer, M., Fiedler, D. (2015). Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in consumer products. *Environmental Science and Pollution Research International*.
  88. Liu, X., Guo, Z., Krebs, K.A., Pope, R.H., Roache, N.F. (2014). Concentrations and trends of perfluorinated chemicals in potential indoor sources from 2007 through 2011 in the US. *Chemosphere*, 98, 51-57.

89. Butt, C.M., Muir, D.C., Mabury, S.A. (2014). Biotransformation pathways of fluorotelomer-based polyfluoroalkyl substances: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(2), 243-267.
90. Jin, H., Zhang, Y., Zhu, L., Martin, J.W. (2015). Isomer profiles of perfluoroalkyl substances in water and soil surrounding a chinese fluorochemical manufacturing park. *Environmental Science & Technology*, 49(8), 4946-4954.
91. Vestergren, R., Cousins, I.T., Trudel, D., Wormuth, M., Scheringer, M. (2008). Estimating the contribution of precursor compounds in consumer exposure to PFOS and PFOA. *Chemosphere*, 73(10), 1617-1624.
92. Russell, M.H., Berti, W.R., Szostek, B., Buck, R.C. (2008). Investigation of the biodegradation potential of a fluoroacrylate polymer product in aerobic soils. *Environmental Science & Technology*, 42(3), 800-807.
93. Washington, J.W., Ellington, J.J., Jenkins, T.M., Evans, J.J., Yoo, H., Hafner, S.C. (2009). Degradability of an acrylate-linked, fluorotelomer polymer in soil. *Environmental Science & Technology*, 43(17), 6617-6623.
94. Midasch, O., Drexler, H., Hart, N., Beckmann, M., Angerer, J. (2007). Transplacental exposure of neonates to perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate: a pilot study. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 80(7), 643-648.
95. Kärman, A., Ericson, I., van Bavel, B., Darnerud, P.O., Aune, M., Glynn, A. ve diğerleri. (2007). Exposure of perfluorinated chemicals through lactation: levels of matched human milk and serum and a temporal trend, 1996-2004, in Sweden. *Environmental Health Perspectives*, 226-230.
96. Llorca, M., Farre, M., Pico, Y., Teijon, M.L., Alvarez, J.G., Barcelo, D. (2010). Infant exposure of perfluorinated compounds: levels in breast milk and commercial baby food. *Environment International*, 36(6), 584-592.
97. Tao, L., Ma, J., Kunisue, T., Li belo, E.L., Tanabe, S., Kannan, K. (2008). Perfluorinated compounds in human breast milk from several Asian

- countries, and in infant formula and dairy milk from the United States. *Environmental Science & Technology*, 42(22), 8597-8602.
98. Völkel, W., Genzel-Boroviczeny, O., Demmelmair, H., Gebauer, C., Koletzko, B., Twardella, D. ve diğerleri. (2008). Perfluorooctane sulphonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in human breast milk: results of a pilot study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211(3), 440-446.
  99. Mondal, D., Weldon, R.H., Armstrong, B.G., Gibson, L.J., Lopez-Espinosa, M.J., Shin, H.M. ve diğerleri. (2014). Breastfeeding: a potential excretion route for mothers and implications for infant exposure to perfluoroalkyl acids. *Environmental Health Perspectives*, 122(2), 187-192.
  100. Fromme, H., Mosch, C., Morovitz, M., Alba-Alejandre, I., Boehmer, S., Kiranoglu, M. ve diğerleri. (2010). Pre- and postnatal exposure to perfluorinated compounds (PFCs). *Environmental Science & Technology*, 44(18), 7123-7129.
  101. Taves, D.R. (1968). Evidence that there are two forms of fluoride in human serum. *Nature*, 217(5133), 1050-1.
  102. Guy, W., Taves, D., Brey Jr, W. (1976). Organic fluorocompounds in human plasma: Prevalence and characterization. 117-134.
  103. Vestergren, R., Cousins, I.T. (2009). Tracking the pathways of human exposure to perfluorocarboxylates. *Environmental Science & Technology*, 43(15), 5565-5575.
  104. Calafat, A.M., Wong, L.Y., Kuklennyik, Z., Reidy, J.A., Needham, L.L. (2007). Polyfluoroalkyl chemicals in the U.S. population: data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004 and comparisons with NHANES 1999-2000. *Environmental Health Perspectives*, 115(11), 1596-1602.
  105. Kato, K., Calafat, A.M., Wong, L.-Y., Wanigatunga, A.A., Caudill, S.P., Needham, L.L. (2009). Polyfluoroalkyl compounds in pooled sera from



- children participating in the National Health and Nutrition Examination Survey 2001–2002. *Environmental Science & Technology*, 43(7), 2641–2647.
106. Kato, K., Wong, L.-Y., Jia, L.T., Kuklennyik, Z., Calafat, A.M. (2011). Trends in Exposure to Polyfluoroalkyl Chemicals in the US Population: 1999–2008†. *Environmental Science & Technology*, 45(19), 8037-8045.
  107. Olsen, G.W., Burris, J.M., Burlew, M.M., Mandel, J.H. (2000). Plasma cholecystokinin and hepatic enzymes, cholesterol and lipoproteins in ammonium perfluorooctanoate production workers. *Drug and Chemical Toxicology*, 23(4), 603-620.
  108. Heuvel, J.P.V., Kuslikis, B.I., Van Rafelghem, M.J., Peterson, R.E. (1991). Tissue distribution, metabolism, and elimination of perfluorooctanoic acid in male and female rats. *Journal of Biochemical Toxicology*, 6(2), 83-92.
  109. Hundley, S., Sarrif, A., Kennedy Jr, G. (2006). Absorption, distribution, and excretion of ammonium perfluorooctanoate (APFO) after oral administration to various species. *Drug and Chemical Toxicology*, 29(2), 137-145.
  110. Kennedy, G., Hall, G., Brittelli, M., Barnes, J., Chen, H. (1986). Inhalation toxicity of ammonium perfluorooctanoate. *Food and Chemical Toxicology*, 24(12), 1325-1329.
  111. Gibson, S., Johnson, J. (1979). Absorption of FC-143-14C in rats after a single oral dose. Subsidiary of 3M. St. Paul, MN: Riker Laboratories. *Inc., US EPA Public Docket AR-226-0427*.
  112. Kennedy, G.L. (1985). Dermal toxicity of ammonium perfluorooctanoate. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 81(2), 348-355.
  113. Han, X., Snow, T.A., Kemper, R.A., Jepson, G.W. (2003). Binding of perfluorooctanoic acid to rat and human plasma proteins. *Chemical Research in Toxicology*, 16(6), 775-781.

114. Stahl, T., Mattern, D., Brunn, H. (2011). Toxicology of perfluorinated compounds. *Environmental Sciences Europe*, 23(1), 1-52.
115. Ylinen, M., Kojo, A.H., Hanhijarvi, H. H, and Peura, P. (1990). Disposition of perfluorooctanoic acid in the rat after single and subchronic administration. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 44, 46-53.
116. Gao, B., He, X., Liu, W., Zhang, H., Saito, N., Tsuda, S. (2014). Distribution of perfluoroalkyl compounds in rats: Indication for using hair as bioindicator of exposure. *Journal of Exposure Science Environmental Epidemiology*.
117. Macon, M.B., Villanueva, L.R., Tatum-Gibbs, K., Zehr, R.D., Strynar, M.J., Stanko, J.P. ve diğerleri. (2011). Prenatal perfluorooctanoic acid exposure in CD-1 mice: low-dose developmental effects and internal dosimetry. *Toxicological Sciences*, 122 (1), 134-145.
118. Bauer, H., Bauer, H., Lametschwandtner, A., Amberger, A., Ruiz, P., Steiner, M. (1993). Neovascularization and the appearance of morphological characteristics of the blood-brain barrier in the embryonic mouse central nervous system. *Developmental Brain Research*, 75 (2), 269-278.
119. Maestri, L., Negri, S., Ferrari, M., Ghittori, S., Fabris, F., Danesino, P. ve diğerleri. (2006). Determination of perfluorooctanoic acid and perfluorooctanesulfonate in human tissues by liquid chromatography/single quadrupole mass spectrometry. *Rapid Communications Mass Spectrometry*, 20(18), 2728-2734.
120. Olsen, G.W., Burriss, J.M., Burlew, M.M., Mandel, J.H. (2003). Epidemiologic assessment of worker serum perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) concentrations and medical surveillance examinations. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 45(3), 260-270.

121. Perez, F., Nadal, M., Navarro-Ortega, A., Fabrega, F., Domingo, J.L., Barcelo, D. ve diğeri. (2013). Accumulation of perfluoroalkyl substances in human tissues. *Environment International*, 59, 354-362.
122. Pirali, B., Negri, S., Chytiris, S., Perissi, A., Villani, L., La Manna, L. ve diğeri. (2009). Perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid in surgical thyroid specimens of patients with thyroid diseases. *Thyroid*, 19(12), 1407-1412.
123. Kärman, A., Domingo, J.L., Llebaria, X., Nadal, M., Bigas, E., van Bavel, B. ve diğeri. (2010). Biomonitoring perfluorinated compounds in Catalonia, Spain: concentrations and trends in human liver and milk samples. *Environmental Science and Pollution Research*, 17 (3), 750-758.
124. Perez, F., Llorca, M., Farre, M., Barcelo, D. (2012). Automated analysis of perfluorinated compounds in human hair and urine samples by turbulent flow chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(7), 2369-2378.
125. Stein, C.R., Wolff, M.S., Calafat, A.M., Kato, K., Engel, S.M. (2012). Comparison of polyfluoroalkyl compound concentrations in maternal serum and amniotic fluid: a pilot study. *Reproductive Toxicology*, 34 (3), 312-316.
126. Ylinen, M., Hanhijärvi, H., Jaakonaho, J., Peura, P. (1989). Stimulation by oestradiol of the urinary excretion of perfluorooctanoic acid in the male rat. *Pharmacology & Toxicology*, 65(4), 274-277.
127. Ophaug, R., Singer, L. (1980). Metabolic handling of perfluorooctanoic acid in rats. *Experimental Biology and Medicine*, 163(1), 19-23.
128. Johnson, J.D., Gibson, S.J., Ober, R.E. (1984). Cholestyramine-enhanced fecal elimination of carbon-14 in rats after administration of ammonium [<sup>14</sup>C] perfluorooctanoate or potassium [<sup>14</sup>C] perfluorooctanesulfonate. *Toxicological Sciences*, 4(6), 972-976.

129. Butenhoff, J., Kennedy, G., Hinderliter, P., Lieder, P., Jung, R., Hansen, K. ve diğerleri. (2004). Pharmacokinetics of perfluorooctanoate in cynomolgus monkeys. *Toxicological Sciences*, 82(2), 394-406.
130. Burris, J., Lundberg, J., Olsen, G., Simpson, C., Mandel, J. (2002). Determination of serum half-lives of several fluorochemicals. US EPA Office of Pollution Prevention and Toxics (OPPT) AR226-1086.
131. Vanden Heuvel, J.P., Davis, J.W., Sommers, R., Peterson, R.E. (1992). Renal excretion of perfluorooctanoic acid in male rats: inhibitory effect of testosterone. *Journal of Biochemical Toxicology*, 7(1), 31-36.
132. Han, X., Nabb, D.L., Russell, M.H., Kennedy, G.L., Rickard, R.W. (2011). Renal elimination of perfluorocarboxylates (PFCAs). *Chemical Research In Toxicology*, 25(1), 35-46.
133. Weaver, Y.M., Ehresman, D.J., Butenhoff, J.L., Hagenbuch, B. (2009). Roles of rat renal organic anion transporters in transporting perfluorinated carboxylates with different chain lengths. *Toxicological Sciences*, 113(2), 305-14.
134. Harada, K., Inoue, K., Morikawa, A., Yoshinaga, T., Saito, N., Koizumi, A. (2005). Renal clearance of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in humans and their species-specific excretion. *Environmental Research*, 99(2), 253-261.
135. Benskin, J.P., De Silva, A.O., Martin, L.J., Arsenault, G., McCrindle, R., Riddell, N. ve diğerleri. (2009). Disposition of perfluorinated acid isomers in Sprague-Dawley rats; part 1: single dose. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(3), 542-554.
136. De Silva, A.O., Benskin, J.P., Martin, L.J., Arsenault, G., McCrindle, R., Riddell, N. ve diğerleri. (2009). Disposition of perfluorinated acid isomers in Sprague-Dawley rats; part 2: subchronic dose. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(3), 555-567.
137. Loveless, S.E., Finlay, C., Everds, N.E., Frame, S.R., Gillies, P.J., O'Connor, J.C. ve diğerleri. (2006). Comparative responses of rats and

- mice exposed to linear/branched, linear, or branched ammonium perfluorooctanoate (APFO). *Toxicology*, 220(2-3), 203-217.
138. Zhang, T., Sun, H., Qin, X., Gan, Z., Kannan, K. (2015). PFOS and PFOA in paired urine and blood from general adults and pregnant women: assessment of urinary elimination. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(7), 5572-5579.
139. Zhang, Y., Beesoon, S., Zhu, L., Martin, J.W. (2013). Biomonitoring of perfluoroalkyl acids in human urine and estimates of biological half-life. *Environmental Science & Technology*, 47(18), 10619-10627.
140. Griffith, F., Long, J. (1980). Animal toxicity studies with ammonium perfluorooctanoate. *The American Industrial Hygiene Association Journal*, 41(8), 576-583.
141. Glaza, S. (1997). Acute oral toxicity study of T-6669 in rats. *Corning Hazelton Inc. CHW*, 61001760.
142. Glaza, S. (1995). Acute dermal toxicity study of T-6342 in rabbits. *Corning Hazelton Inc., Madison WI., 3 M Company, St Paul. US EPA AR226*, 427.
143. Perkins, R. (1992). Investigation of ammonium perfluorooctanoate effect on hormone levels and peroxisomal proliferation in the rat. *Toxicologist*, 12(1), 38.
144. Butenhoff, J., Costa, G., Elcombe, C., Farrar, D., Hansen, K., Iwai, H. ve diğerleri. (2002). Toxicity of ammonium perfluorooctanoate in male cynomolgus monkeys after oral dosing for 6 months. *Toxicological Sciences*, 69(1), 244-257.
145. Goldenthal, E., Jessup, D., Geil, R., Mehring, J. (1978). Ninety day subacute rhesus monkey toxicity study. Study No. 137-092, *International Research and Development Corporation*, Mattawan, MI. FYI-0500-1378.
146. Biegel, L.B., Hurtt, M.E., Frame, S.R., O'Connor, J.C., Cook, J.C. (2001). Mechanisms of extrahepatic tumor induction by peroxisome proliferators in male CD rats. *Toxicological Sciences*, 60(1), 44-55.

147. Klaunig, J.E., Babich, M.A., Baetcke, K.P., Cook, J.C., Corton, J.C., David, R.M. ve diğerleri. (2003). PPAR $\alpha$  agonist-induced rodent tumors: modes of action and human relevance. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 33(6), 655-780.
148. Sibinski, L., Allen, J., Erickson, E. (1987). Two year oral (diet) toxicity/carcinogenicity study of fluorochemical FC-143 in rats. *3M Company/Riker Exp No 0281CR0012 M*, 3.
149. Abdellatif, A.G., Preat, V., Taper, H.S., Roberfroid, M. (1991). The modulation of rat liver carcinogenesis by perfluorooctanoic acid, a peroxisome proliferator. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 111(3), 530-537.
150. Nilsson, R., Beije, B., Preat, V., Erixon, K., Ramel, C. (1991). On the mechanism of the hepatocarcinogenicity of peroxisome proliferators. *Chemico-Biological Interactions*, 78(2), 235-250.
151. United States Environmental Protection Agency.(2006). Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Fluorinated Telomers Risk Assessment. Erişim: 21 Nisan 2015, <http://www.epa.gov/oppt/pfoa/pubs/pfoarisk.html>
152. International Agency for Research on Cancer Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–112. (2014). Erişim: 5 Mayıs 2015, <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>
153. Eriksen, K.T., Raaschou-Nielsen, O., Sørensen, M., Roursgaard, M., Loft, S., Møller, P. (2010). Genotoxic potential of the perfluorinated chemicals PFOA, PFOS, PFBS, PFNA and PFHxA in human HepG2 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 700(1), 39-43.
154. Scharmach, E., Buhrke, T., Lichtenstein, D., Lampen, A. (2012). Perfluorooctanoic acid affects the activity of the hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 $\alpha$ ). *Toxicology Letters*, 212(2), 106-112.

155. Quist, E.M., Filgo, A.J., Cummings, C.A., Kissling, G.E., Hoenerhoff, M.J., Fenton, S.E. (2015). Hepatic Mitochondrial Alteration in CD-1 Mice Associated with Prenatal Exposures to Low Doses of Perfluorooctanoic Acid (PFOA). *Toxicologic Pathology*, 43(4), 546-557.
156. Filgo, A.J., Quist, E.M., Hoenerhoff, M.J., Brix, A.E., Kissling, G.E., Fenton, S.E. (2015). Perfluorooctanoic Acid (PFOA)-induced Liver Lesions in Two Strains of Mice Following Developmental Exposures: PPARalpha Is Not Required. *Toxicologic Pathology*, 43(4), 558-568.
157. Cui, L., Zhou, Q.F., Liao, C.Y., Fu, J.J., Jiang, G.B. (2009). Studies on the toxicological effects of PFOA and PFOS on rats using histological observation and chemical analysis. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56(2), 338-349.
158. Perkins, R.G., Butenhoff, J.L., Kennedy Jr, G.L., Palazzolo, M.J. (2004). 13-week dietary toxicity study of ammonium perfluorooctanoate (APFO) in male rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 27(4), 361-378.
159. Botelho, S.C., Saghafian, M., Pavlova, S., Hassan, M., DePierre, J.W., Abedi-Valugerdi, M. (2015). Complement activation is involved in the hepatic injury caused by high-dose exposure of mice to perfluorooctanoic acid. *Chemosphere*, 129, 225-231.
160. Brieger, A., Bienefeld, N., Hasan, R., Goerlich, R., Haase, H. (2011). Impact of perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoic acid on human peripheral leukocytes. *Toxicology In Vitro*, 25(4), 960-968.
161. Corsini, E., Avogadro, A., Galbiati, V., dell'Agli, M., Marinovich, M., Galli, C.L. ve diğeri. (2011). In vitro evaluation of the immunotoxic potential of perfluorinated compounds (PFCs). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 250(2), 108-116.
162. DeWitt, J.C., Williams, W.C., Creech, N.J., Luebke, R.W. (2015). Suppression of antigen-specific antibody responses in mice exposed to perfluorooctanoic acid: Role of PPARalpha and T- and B-cell targeting. *Journal of Immunotoxicology*, 1-8.

163. Qazi, M.R., Bogdanska, J., Butenhoff, J.L., Nelson, B.D., DePierre, J.W., Abedi-Valugerdi, M. (2009). High-dose, short-term exposure of mice to perfluorooctanesulfonate (PFOS) or perfluorooctanoate (PFOA) affects the number of circulating neutrophils differently, but enhances the inflammatory responses of macrophages to lipopolysaccharide (LPS) in a similar fashion. *Toxicology*, 262(3), 207-214.
164. Singh, T.S., Lee, S., Kim, H.-H., Choi, J.K., Kim, S.-H. (2012). Perfluorooctanoic acid induces mast cell-mediated allergic inflammation by the release of histamine and inflammatory mediators. *Toxicology Letters*, 210(1), 64-70.
165. Yang, Q., Abedi-Valugerdi, M., Xie, Y., Zhao, X.-Y., Möller, G., Nelson, B.D. ve diğerleri. (2002). Potent suppression of the adaptive immune response in mice upon dietary exposure to the potent peroxisome proliferator, perfluorooctanoic acid. *International Immunopharmacology*, 2(2), 389-397.
166. Yang, Q., Xie, Y., Alexson, S.E., Nelson, B.D., DePierre, J.W. (2002). Involvement of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the immunomodulation caused by peroxisome proliferators in mice. *Biochemical Pharmacology*, 63(10), 1893-1900.
167. Yang, Q., Xie, Y., Depierre, J. (2000). Effects of peroxisome proliferators on the thymus and spleen of mice. *Clinical & Experimental Immunology*, 122(2), 219-226.
168. Butenhoff, J.L., Kennedy, G.L., Jr., Frame, S.R., O'Connor, J.C., York, R.G. (2004). The reproductive toxicology of ammonium perfluorooctanoate (APFO) in the rat. *Toxicology*, 196(1-2), 95-116.
169. Dixon, D., Reed, C.E., Moore, A.B., Gibbs-Flournoy, E.A., Hines, E.P., Wallace, E.A. ve diğerleri. (2012). Histopathologic changes in the uterus, cervix and vagina of immature CD-1 mice exposed to low doses of perfluorooctanoic acid (PFOA) in a uterotrophic assay. *Reproductive Toxicology*, 33(4), 506-512.



170. Hines, E.P., White, S.S., Stanko, J.P., Gibbs-Flournoy, E.A., Lau, C., Fenton, S.E. (2009). Phenotypic dichotomy following developmental exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) in female CD-1 mice: Low doses induce elevated serum leptin and insulin, and overweight in mid-life. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 304(1-2), 97-105.
171. White, S.S., Stanko, J.P., Kato, K., Calafat, A.M., Hines, E.P., Fenton, S.E. (2011). Gestational and chronic low-dose PFOA exposures and mammary gland growth and differentiation in three generations of CD-1 mice. *Environmental Health Perspectives*, 119(8), 1070-1076.
172. Koustas, E., Lam, J., Sutton, P., Johnson, P.I., Atchley, D.S., Sen, S. ve diğerleri. (2014). The Navigation Guide - evidence-based medicine meets environmental health: systematic review of nonhuman evidence for PFOA effects on fetal growth. *Environmental Health Perspectives*, 122(10), 1015-1027.
173. Tucker, D.K., Macon, M.B., Strynar, M.J., Dagnino, S., Andersen, E., Fenton, S.E. (2015). The mammary gland is a sensitive pubertal target in CD-1 and C57Bl/6 mice following perinatal perfluorooctanoic acid (PFOA) exposure. *Reproductive Toxicology*, 54, 26-36.
174. White, S.S., Calafat, A.M., Kuklennyik, Z., Villanueva, L., Zehr, R.D., Helfant, L. ve diğerleri. (2007). Gestational PFOA exposure of mice is associated with altered mammary gland development in dams and female offspring. *Toxicological Sciences*, 96(1), 133-144.
175. White, S.S., Kato, K., Jia, L.T., Basden, B.J., Calafat, A.M., Hines, E.P. ve diğerleri. (2009). Effects of perfluorooctanoic acid on mouse mammary gland development and differentiation resulting from cross-foster and restricted gestational exposures. *Reproductive Toxicology*, 27(3-4), 289-298.
176. Yang, C., Tan, Y.S., Harkema, J.R., Haslam, S.Z. (2009). Differential effects of peripubertal exposure to perfluorooctanoic acid on mammary

- gland development in C57Bl/6 and Balb/c mouse strains. *Reproductive Toxicology*, 27(3-4), 299-306.
177. Abbott, B.D., Wolf, C.J., Schmid, J.E., Das, K.P., Zehr, R.D., Helfant, L. ve diğerleri. (2007). Perfluorooctanoic acid induced developmental toxicity in the mouse is dependent on expression of peroxisome proliferator activated receptor-alpha. *Toxicological Sciences*, 98(2), 571-581.
  178. Rosen, M.B., Thibodeaux, J.R., Wood, C.R., Zehr, R.D., Schmid, J.E., Lau, C. (2007). Gene expression profiling in the lung and liver of PFOA-exposed mouse fetuses. *Toxicology*, 239(1-2), 15-33.
  179. Abbott, B.D., Wood, C.R., Watkins, A.M., Tatum-Gibbs, K., Das, K.P., Lau, C. (2012). Effects of perfluorooctanoic acid (PFOA) on expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) and nuclear receptor-regulated genes in fetal and postnatal CD-1 mouse tissues. *Reproductive Toxicology*, 33(4), 491-505.
  180. Zhao, Y., Tan, Y.S., Strynar, M.J., Perez, G., Haslam, S.Z., Yang, C. (2012). Perfluorooctanoic acid effects on ovaries mediate its inhibition of peripubertal mammary gland development in Balb/c and C57Bl/6 mice. *Reproductive Toxicology*, 33(4), 563-576.
  181. Ryu, M.H., Jha, A., Ojo, O.O., Mahood, T.H., Basu, S., Detillieux, K.A. ve diğerleri. (2014). Chronic exposure to perfluorinated compounds: Impact on airway hyperresponsiveness and inflammation. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 307(10), 765-774.
  182. Zhang, H., Lu, Y., Luo, B., Yan, S., Guo, X., Dai, J. (2014). Proteomic analysis of mouse testis reveals perfluorooctanoic acid-induced reproductive dysfunction via direct disturbance of testicular steroidogenic machinery. *Journal of Proteome Research*, 13(7), 3370-3385.
  183. Lu, Y., Luo, B., Li, J., Dai, J. (2015). Perfluorooctanoic acid disrupts the blood-testis barrier and activates the TNFalpha/p38 MAPK signaling pathway in vivo and in vitro. *Archives of Toxicology*.

184. Mehrotra, K., Morgenstern, R., Bengtsson Ahlberg, M., Georgellis, A. (1999). Hypophysectomy and/or peroxisome proliferators strongly influence the levels of phase II xenobiotic metabolizing enzymes in rat testis. *Chemico-Biological Interactions*, 122(2), 73-87.
185. Johansson, N., Fredriksson, A., Eriksson, P. (2008). Neonatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) causes neurobehavioural defects in adult mice. *Neurotoxicology*, 29(1), 160-169.
186. Mariussen, E. (2012). Neurotoxic effects of perfluoroalkylated compounds: mechanisms of action and environmental relevance. *Archives of Toxicology*, 86(9), 1349-1367.
187. Slotkin, T.A., MacKillop, E.A., Melnick, R.L., Thayer, K.A., Seidler, F.J. (2008). Developmental neurotoxicity of perfluorinated chemicals modeled in vitro. *Environmental Health Perspectives*, 116(6), 716-722.
188. Onishchenko, N., Fischer, C., Wan Ibrahim, W.N., Negri, S., Spulber, S., Cottica, D. ve diğerleri. (2011). Prenatal exposure to PFOS or PFOA alters motor function in mice in a sex-related manner. *Neurotoxicity Research*, 19(3), 452-461.
189. Pinkas, A., Slotkin, T.A., Brick-Turin, Y., Van der Zee, E.A., Yanai, J. (2010). Neurobehavioral teratogenicity of perfluorinated alkyls in an avian model. *Neurotoxicology and Teratology*, 32(2), 182-186.
190. Jensen, A.A., Leffers, H. (2008). Emerging endocrine disruptors: perfluoroalkylated substances. *International Journal of Andrology*, 31(2), 161-169.
191. Kraugerud, M., Zimmer, K.E., Ropstad, E., Verhaegen, S. (2011). Perfluorinated compounds differentially affect steroidogenesis and viability in the human adrenocortical carcinoma (H295R) in vitro cell assay. *Toxicology Letters*, 205(1), 62-68.
192. Rosenmai, A.K., Nielsen, F.K., Pedersen, M., Hadrup, N., Trier, X., Christensen, J.H. ve diğerleri. (2013). Fluorochemicals used in food

- packaging inhibit male sex hormone synthesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 266(1), 132-142.
193. Zhao, B., Chu, Y., Hardy, D.O., Li, X.K., Ge, R.S. (2010). Inhibition of 3beta- and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities in rat Leydig cells by perfluorooctane acid. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 118(1-2), 13-17.
194. Zhao, Y., Tan, Y.S., Haslam, S.Z., Yang, C. (2010). Perfluorooctanoic acid effects on steroid hormone and growth factor levels mediate stimulation of peripubertal mammary gland development in C57BL/6 mice. *Toxicological Sciences*, 115(1), 214-224.
195. Van Esterik, J.C., Sales, L.B., Dolle, M.E., Hakansson, H., Herlin, M., Legler, J. ve diğ erleri. (2015). Programming of metabolic effects in C57BL/6JxFVB mice by in utero and lactational exposure to perfluorooctanoic acid. *Archives of Toxicology*.
196. Haugom, B., Spydevold, O. (1992). The mechanism underlying the hypolipemic effect of perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluorooctane sulphonic acid (PFOSA) and clofibrac acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1128(1), 65-72.
197. Kudo, N., Kawashima, Y. (1997). Fish oil-feeding prevents perfluorooctanoic acid-induced fatty liver in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 145(2), 285-293.
198. Kudo, N., Mizuguchi, H., Yamamoto, A., Kawashima, Y. (1999). Alterations by perfluorooctanoic acid of glycerolipid metabolism in rat liver. *Chemico-Biological Interactions*, 118(1), 69-83.
199. Watkins, A.M., Wood, C.R., Lin, M.T., Abbott, B.D. (2015). The effects of perfluorinated chemicals on adipocyte differentiation in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 400, 90-101.

200. Maloney, E.K., Waxman, D.J. (1999). trans-Activation of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  by structurally diverse environmental chemicals. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 161 (2), 209-218.
201. Palmer, C.N., Hsu, M.-H., Griffin, K.J., Raucy, J.L., Johnson, E.F. (1998). Peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$  expression in human liver. *Molecular Pharmacology*, 53 (1), 14-22.
202. Tugwood, J.D., Holden, P.R., James, N.H., Prince, R.A., Roberts, R.A. (1998). A peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR $\alpha$ ) cDNA cloned from guinea-pig liver encodes a protein with similar properties to the mouse PPAR $\alpha$ : implications for species differences in responses to peroxisome proliferators. *Archives of Toxicology*, 72 (3), 169-177.
203. United States Environmental Protection Agency. (2006). Draft Risk Assessment of Potential Human Health Effects Associated with PFOA and Its Salts. Erişim: 5 Nisan 2015, [http:// www. epa.gov/sab /pdf/sab\\_06\\_006.pdf](http://www.epa.gov/sab/pdf/sab_06_006.pdf)
204. Andersen, M.E., Butenhoff, J.L., Chang, S.C., Farrar, D.G., Kennedy, G.L., Jr., Lau, C. ve diğerleri. (2008). Perfluoroalkyl acids and related chemistries--toxicokinetics and modes of action. *Toxicological Sciences*, 102(1), 3-14.
205. Peters, J.M., Gonzalez, F.J. (2011). Why toxic equivalency factors are not suitable for perfluoroalkyl chemicals. *Chemical Research In Toxicology*, 24(10), 1601-1609.
206. Buhrke, T., Krüger, E., Pevny, S., Rößler, M., Bitter, K., Lampen, A. (2015). Perfluorooctanoic acid (PFOA) affects distinct molecular signalling pathways in human primary hepatocytes. *Toxicology*, 333, 53-62.
207. Nakagawa, T., Ramdhan, D.H., Tanaka, N., Naito, H., Tamada, H., Ito, Y. ve diğerleri. (2012). Modulation of ammonium perfluorooctanoate-

- induced hepatic damage by genetically different PPAR $\alpha$  in mice. *Archives of Toxicology*, 86(1), 63-74.
208. Benninghoff, A.D., Bisson, W.H., Koch, D.C., Ehresman, D.J., Kolluri, S.K., Williams, D.E. (2011). Estrogen-like activity of perfluoroalkyl acids in vivo and interaction with human and rainbow trout estrogen receptors in vitro. *Toxicological Sciences*, 120(1), 42-58.
209. Tilton, S.C., Orner, G.A., Benninghoff, A.D., Carpenter, H.M., Hendricks, J.D., Pereira, C.B. ve diğeri. (2008). Genomic profiling reveals an alternate mechanism for hepatic tumor promotion by perfluorooctanoic acid in rainbow trout. *Environmental Health Perspectives*, 116(8), 1047.
210. Wei, Y., Dai, J., Liu, M., Wang, J., Xu, M., Zha, J. ve diğeri. (2007). Estrogen-like properties of perfluorooctanoic acid as revealed by expressing hepatic estrogen-responsive genes in rare minnows (*Gobiocypris rarus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(11), 2440-2447.
211. Yahia, D., Haruka, I., Kagashi, Y., Tsuda, S. (2014). 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage induced by perfluorinated compounds in TK6 cells. *Environmental Toxicology*.
212. Takagi, A., Sai, K., Umemura, T., Hasegawa, R., Kurokawa, Y. (1991). Short-term exposure to the peroxisome proliferators, perfluorooctanoic acid and perfluorodecanoic acid, causes significant increase of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats. *Cancer Letters*, 57(1), 55-60.
213. Upham, B.L., Deocampo, N.D., Wurl, B., Trosko, J.E. (1998). Inhibition of gap junctional intercellular communication by perfluorinated fatty acids is dependent on the chain length of the fluorinated tail. *International Journal of Cancer*, 78(4), 491-495.
214. Berthiaume, J., Wallace, K.B. (2002). Perfluorooctanoate, perfluorooctanesulfonate, and N-ethyl perfluorooctanesulfonamido

- ethanol; peroxisome proliferation and mitochondrial biogenesis. *Toxicology Letters*, 129(1), 23-32.
215. Keller, B.J., Marsman, D.S., Popp, J.A., Thurman, R.G. (1992). Several nongenotoxic carcinogens uncouple mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1102(2), 237-244.
216. Starkov, A., Wallace, K. (2002). Structural determinants of fluorochemical-induced mitochondrial dysfunction. *Toxicological Sciences*, 66(2), 244-252.
217. Frisbee, S.J., Brooks, A.P., Jr., Maher, A., Flensburg, P., Arnold, S., Fletcher, T. ve diğerleri. (2009). The C8 health project: design, methods, and participants. *Environmental Health Perspectives*, 117(12), 1873-1882.
218. National Health and Nutrition Examination Survey. (t.y.). About the National Health and Nutrition Examination Survey. Erişim: 25 Nisan 2015, [http://www.cdc.gov/nchs/nhanes/about\\_nhanes.html](http://www.cdc.gov/nchs/nhanes/about_nhanes.html)
219. Lundin, J.I., Alexander, B.H., Olsen, G.W., Church, T.R. (2009). Ammonium perfluorooctanoate production and occupational mortality. *Epidemiology*, 20(6), 921-928.
220. Sakr, C.J., Leonard, R.C., Kreckmann, K.H., Slade, M.D., Cullen, M.R. (2007). Longitudinal study of serum lipids and liver enzymes in workers with occupational exposure to ammonium perfluorooctanoate. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 49(8), 872-879.
221. Leonard, R. (2003). Epidemiology Surveillance Program. Cancer Incidence Report 1959-2001 and All-Case Mortality Report 1957-2000 at the Washington Works, Parkersburg, WV. DuPont (Rapor No): USEPA AR226-1307-6.
222. Winqvist, A., Steenland, K. (2014). Modeled PFOA exposure and coronary artery disease, hypertension, and high cholesterol in community

- and worker cohorts. *Environmental Health Perspectives*, 122(12), 1299-1305.
223. Steenland, K., Tinker, S., Frisbee, S., Ducatman, A., Vaccarino, V. (2009). Association of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate with serum lipids among adults living near a chemical plant. *American Journal of Epidemiology*, 170(10), 1268-1278.
224. Betts, K.S. (2014). PFOA and high cholesterol: basis for the finding of a probable link. *Environmental Health Perspectives*, 122(12), A338.
225. Frisbee, S.J., Shankar, A., Knox, S.S., Steenland, K., Savitz, D.A., Fletcher, T. ve diğerleri. (2010). Perfluorooctanoic acid, perfluorooctanesulfonate, and serum lipids in children and adolescents: results from the C8 Health Project. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*, 164(9), 860-869.
226. Geiger, S.D., Xiao, J., Ducatman, A., Frisbee, S., Innes, K., Shankar, A. (2014). The association between PFOA, PFOS and serum lipid levels in adolescents. *Chemosphere*, 98, 78-83.
227. Zeng, X.W., Qian, Z., Emo, B., Vaughn, M., Bao, J., Qin, X.D. ve diğerleri. (2015). Association of polyfluoroalkyl chemical exposure with serum lipids in children. *Science of The Total Environment*, 512-513, 364-370.
228. Costa, G., Sartori, S., Consonni, D. (2009). Thirty years of medical surveillance in perfluorooctanoic acid production workers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 51(3), 364-372.
229. Gleason, J.A., Post, G.B., Fagliano, J.A. (2015). Associations of perfluorinated chemical serum concentrations and biomarkers of liver function and uric acid in the US population (NHANES), 2007-2010. *Environmental Research*, 136, 8-14.
230. Johnson, P.I., Sutton, P., Atchley, D.S., Koustas, E., Lam, J., Sen, S. ve diğerleri. (2014). The Navigation Guide - evidence-based medicine meets environmental health: systematic review of human evidence for PFOA



- effects on fetal growth. *Environmental Health Perspectives*, 122(10), 1028-1039.
231. Lyngso, J., Ramlau-Hansen, C.H., Hoyer, B.B., Stovring, H., Bonde, J.P., Jonsson, B.A. ve diğerleri. (2014). Menstrual cycle characteristics in fertile women from Greenland, Poland and Ukraine exposed to perfluorinated chemicals: a cross-sectional study. *Human Reproduction*, 29(2), 359-367.
232. Vested, A., Ramlau-Hansen, C.H., Olsen, S.F., Bonde, J.P., Kristensen, S.L., Halldorsson, T.I. ve diğerleri. (2013). Associations of in utero exposure to perfluorinated alkyl acids with human semen quality and reproductive hormones in adult men. *Environmental Health Perspectives*, 121(4), 453-458.
233. Fei, C., McLaughlin, J.K., Lipworth, L., Olsen, J. (2009). Maternal levels of perfluorinated chemicals and subfecundity. *Human Reproduction*, 24(5), 1200-1205.
234. Maisonet, M., Terrell, M.L., McGeehin, M.A., Christensen, K.Y., Holmes, A., Calafat, A.M. ve diğerleri. (2012). Maternal concentrations of polyfluoroalkyl compounds during pregnancy and fetal and postnatal growth in British girls. *Environmental Health Perspectives*, 120(10), 1432-1437.
235. Bach, C.C., Bech, B.H., Brix, N., Nohr, E.A., Bonde, J.P., Henriksen, T.B. (2015). Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances and human fetal growth: a systematic review. *Critical Reviews in Toxicology*, 45(1), 53-67.
236. Lam, J., Koustas, E., Sutton, P., Johnson, P.I., Atchley, D.S., Sen, S. ve diğerleri. (2014). The Navigation Guide - evidence-based medicine meets environmental health: integration of animal and human evidence for PFOA effects on fetal growth. *Environmental Health Perspectives*, 122(10), 1040-1051.
237. Fei, C., McLaughlin, J.K., Lipworth, L., Olsen, J. (2010). Maternal concentrations of perfluorooctanesulfonate (PFOS) and

- perfluorooctanoate (PFOA) and duration of breastfeeding. *Scandinavian Journal of Work Environment and Health*, 36 (5), 413-421.
238. Wu, K., Xu, X., Peng, L., Liu, J., Guo, Y., Huo, X. (2012). Association between maternal exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) from electronic waste recycling and neonatal health outcomes. *Environment International*, 48, 1-8.
239. Nolan, L.A., Nolan, J.M., Shofer, F.S., Rodway, N.V., Emmett, E.A. (2009). The relationship between birth weight, gestational age and perfluorooctanoic acid (PFOA)-contaminated public drinking water. *Reproductive Toxicology*, 27(3-4), 231-238.
240. Nolan, L.A., Nolan, J.M., Shofer, F.S., Rodway, N.V., Emmett, E.A. (2010). Congenital anomalies, labor/delivery complications, maternal risk factors and their relationship with perfluorooctanoic acid (PFOA)-contaminated public drinking water. *Reproductive Toxicology*, 29(2), 147-155.
241. Stein, C.R., Savitz, D.A., Dougan, M. (2009). Serum levels of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate and pregnancy outcome. *American Journal of Epidemiology*, 170(7), 837-846.
242. Darrow, L.A., Howards, P.P., Winquist, A., Steenland, K. (2014). PFOA and PFOS serum levels and miscarriage risk. *Epidemiology*, 25(4), 505-512.
243. Velez, M.P., Arbuckle, T.E., Fraser, W.D. (2015). Maternal exposure to perfluorinated chemicals and reduced fecundity: the MIREC study. *Human Reproduction*, 30(3), 701-709.
244. Lopez-Espinosa, M.J., Fletcher, T., Armstrong, B., Genser, B., Dhatariya, K., Mondal, D. ve diğeri. (2011). Association of Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) with age of puberty among children living near a chemical plant. *Environmental Science & Technology*, 45(19), 8160-8166.

245. Joensen, U.N., Bossi, R., Leffers, H., Jensen, A.A., Skakkebaek, N.E., Jorgensen, N. (2009). Do perfluoroalkyl compounds impair human semen quality? *Environmental Health Perspectives*, 117(6), 923-927.
246. Louis, G.M., Chen, Z., Schisterman, E.F., Kim, S., Sweeney, A.M., Sundaram, R. ve diğerleri. (2015). Perfluorochemicals and human semen quality: the LIFE study. *Environmental Health Perspectives*, 123(1), 57-63.
247. Holtcamp, W. (2012). Obesogens: an environmental link to obesity. *Environmental Health Perspectives*, 120(2), 62-68.
248. Knox, S.S., Jackson, T., Frisbee, S.J., Javins, B., Ducatman, A.M. (2011). Perfluorocarbon exposure, gender and thyroid function in the C8 Health Project. *The Journal of Toxicological Sciences*, 36(4), 403-410.
249. Lopez-Espinosa, M.J., Mondal, D., Armstrong, B., Bloom, M.S., Fletcher, T. (2012). Thyroid function and perfluoroalkyl acids in children living near a chemical plant. *Environmental Health Perspectives*, 120(7), 1036-1041.
250. Olsen, G.W., Zobel, L.R. (2007). Assessment of lipid, hepatic, and thyroid parameters with serum perfluorooctanoate (PFOA) concentrations in fluorochemical production workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 81(2), 231-246.
251. Winquist, A., Steenland, K. (2014). Perfluorooctanoic acid exposure and thyroid disease in community and worker cohorts. *Epidemiology*, 25(2), 255-264.
252. Shrestha, S., Bloom, M.S., Yucel, R., Seegal, R.F., Wu, Q., Kannan, K. ve diğerleri. (2015). Perfluoroalkyl substances and thyroid function in older adults. *Environment International*, 75, 206-214.
253. De Cock, M., de Boer, M.R., Lamoree, M., Legler, J., van de Bor, M. (2014). Prenatal exposure to endocrine disrupting chemicals in relation to thyroid hormone levels in infants - a Dutch prospective cohort study. *Environmental Health*, 13(1), 106.

254. Looker, C., Luster, M.I., Calafat, A.M., Johnson, V.J., Burleson, G.R., Burleson, F.G. ve diğerleri. (2014). Influenza vaccine response in adults exposed to perfluorooctanoate and perfluorooctanesulfonate. *Toxicological Sciences*, 138(1), 76-88.
255. Steenland, K., Zhao, L., Winqvist, A. (2015). A cohort incidence study of workers exposed to perfluorooctanoic acid (PFOA). *Occupational and Environmental Medicine*, 72(5), 373-380.
256. Steenland, K., Zhao, L., Winqvist, A., Parks, C. (2013). Ulcerative colitis and perfluorooctanoic acid (PFOA) in a highly exposed population of community residents and workers in the mid-Ohio valley. *Environmental Health Perspectives*, 121(8), 900-905.
257. Donauer, S., Chen, A., Xu, Y., Calafat, A.M., Sjodin, A., Yolton, K. (2015). Prenatal exposure to polybrominated diphenyl ethers and polyfluoroalkyl chemicals and infant neurobehavior. *Journal of Pediatrics*, 166(3), 736-742.
258. Hoyer, B.B., Ramlau-Hansen, C.H., Obel, C., Pedersen, H.S., Hernik, A., Ogniev, V. ve diğerleri. (2015). Pregnancy serum concentrations of perfluorinated alkyl substances and offspring behaviour and motor development at age 5-9 years--a prospective study. *Environmental Health*, 14, 2.
259. Ode, A., Kallen, K., Gustafsson, P., Rylander, L., Jonsson, B.A., Olofsson, P. ve diğerleri. (2014). Fetal exposure to perfluorinated compounds and attention deficit hyperactivity disorder in childhood. *PLoS One*, 9(4), e95891.
260. Hoffman, K., Webster, T.F., Weisskopf, M.G., Weinberg, J., Vieira, V.M. (2010). Exposure to polyfluoroalkyl chemicals and attention deficit/hyperactivity disorder in U.S. children 12-15 years of age. *Environmental Health Perspectives*, 118(12), 1762-1767.

261. Stein, C.R., Savitz, D.A. (2011). Serum perfluorinated compound concentration and attention deficit/hyperactivity disorder in children 5-18 years of age. *Environmental Health Perspectives*, 119(10), 1466-1471.
262. Fei, C., Olsen, J. (2011). Prenatal exposure to perfluorinated chemicals and behavioral or coordination problems at age 7 years. *Environmental Health Perspectives*, 119(4), 573-578.
263. Steenland, K., Woskie, S. (2012). Cohort mortality study of workers exposed to perfluorooctanoic acid. *American Journal of Epidemiology*, 176 (10), 909-917.
264. Vieira, V.M., Hoffman, K., Shin, H.-M., Weinberg, J.M., Webster, T.F., Fletcher, T. (2013). Perfluorooctanoic acid exposure and cancer outcomes in a contaminated community: a geographic analysis. *Environmental Health Perspectives*, 121 (3).
265. Galloway, T.S., Fletcher, T., Thomas, O.J., Lee, B.P., Pilling, L.C., Harries, L.W. (2015). PFOA and PFOS are associated with reduced expression of the parathyroid hormone 2 receptor (PTH2R) gene in women. *Chemosphere*, 120, 555-562.
266. Innes, K.E., Ducatman, A.M., Luster, M.I., Shankar, A. (2011). Association of osteoarthritis with serum levels of the environmental contaminants perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate in a large Appalachian population. *American Journal of Epidemiology*, 174(4), 440-450.
267. Uhl, S.A., James-Todd, T., Bell, M.L. (2013). Association of Osteoarthritis with Perfluorooctanoate and Perfluorooctane Sulfonate in NHANES 2003-2008. *Environmental Health Perspectives*, 121(4), 447-452.
268. Anderson-Mahoney, P., Kotlerman, J., Takhar, H., Gray, D., Dahlgren, J. (2008). Self-reported health effects among community residents exposed to perfluorooctanoate. *NEW SOLUTIONS: A Journal of Environmental and Occupational Health Policy*, 18 (2), 129-143.

269. Dong, G.H., Tung, K.Y., Tsai, C.H., Liu, M.M., Wang, D., Liu, W. ve diğerleri. (2013). Serum polyfluoroalkyl concentrations, asthma outcomes, and immunological markers in a case-control study of Taiwanese children. *Environmental Health Perspective*, 121 (4), 507-513.
270. Davies, K.J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB life*, 50(4-5), 279-289.
271. Kalyanaraman, B. (2013). Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biology*, 1(1), 244-257.
272. Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266(1-2), 37-56.
273. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84.
274. Dhalla, N.S., Temsah, R.M., Netticadan, T. (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of Hypertension*, 18(6), 655-673.
275. Granger, D.N., Stokes, K.Y., Shigematsu, T., Cerwinka, W.H., Taylor, A., Krieglstein, C.F. (2001). Splanchnic ischaemia-reperfusion injury: mechanistic insights provided by mutant mice. *Acta Physiologica Scandinavica*, 173(1), 83-91.
276. Maurice, M.M., Nakamura, H., van der Voort, E.A., van Vliet, A.I., Staal, F.J., Tak, P.P. ve diğerleri. (1997). Evidence for the role of an altered redox state in hyporesponsiveness of synovial T cells in rheumatoid arthritis. *Journal of Immunology*, 158(3), 1458-1465.
277. Butterfield, D.A., Castegna, A., Lauderback, C.M., Drake, J. (2002). Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its

- sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiology of Aging*, 23(5), 655-664.
278. Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 53 Suppl 3, S26-36; discussion S36-28.
279. Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *The Journals of Gerontology*, 11(3), 298-300.
280. Buettner, G.R., Schafer, F.Q. (2000). Free radicals, oxidants, and antioxidants. *Teratology*, 62(4), 234-234.
281. Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.
282. Halliwell, B., Gutteridge, J. (2011). Free radicals in biology and medicine. NY: Oxford University Press.
283. Fridovich, I. (1986). Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 247(1), 1-11.
284. Nordberg, J., Arner, E.S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11), 1287-1312.
285. Karihtala, P., Soini, Y. (2007). Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS*, 115(2), 81-103.
286. Pippenger, C., Browne, R.W., Armstrong, D. (1998). Regulatory antioxidant enzymes. Free radical and antioxidant protocols. 299-313. Springer.
287. Halliwell, B., Gutteridge, J. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219(1), 1.
288. Turrens, J.F. (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports*, 17(1), 3-8.

289. Fridovich, I. (1974). Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 41(0), 35-97.
290. Fridovich, I. (1989). Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *Journal of Biological Chemistry*, 264(14), 7761-7764.
291. Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J., Aruoma, O.I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33(7), 601-617.
292. Young, I.S., Woodside, J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54(3), 176-186.
293. Halliwell, B. (1989). Tell me about free radicals, doctor: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 82(12), 747-752.
294. Kappus, H. (1987). Oxidative stress in chemical toxicity. *Archives of Toxicology*, 60(1-3), 144-149.
295. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interaction*, 160(1), 1-40.
296. Leonard, S.S., Harris, G.K., Shi, X. (2004). Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(12), 1921-1942.
297. Stohs, S.J., Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(2), 321-336.
298. Liochev, S.I., Fridovich, I. (1994). The role of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in the production of HO<sub>2</sub>: in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(1), 29-33.
299. Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Park, A.M., Kira, Y., Imada, I. ve diğeri. (2003). Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry*, 10(23), 2495-2505.



300. Li, C., Jackson, R.M. (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 282(2), C227-241.
301. Conner, E.M., Grisham, M.B. (1996). Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition*, 12(4), 274-277.
302. Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1147-1150.
303. Rice-Evans, C., Burdon, R. (1993). Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Progress In Lipid Research*, 32(1), 71-110.
304. Basu, A.K., Marnett, L.J. (1983). Unequivocal demonstration that malondialdehyde is a mutagen. *Carcinogenesis*, 4(3), 331-333.
305. Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11(1), 81-128.
306. Mates, J.M., Perez-Gomez, C., Nunez de Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32(8), 595-603.
307. McCall, M.R., Frei, B. (1999). Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biology and Medicine*, 26(7-8), 1034-1053.
308. Marnett, L.J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21(3), 361-370.
309. Wiseman, H., Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*, 313, 17-29.
310. Sen, S., Chakraborty, R. (2011). The role of antioxidants in human health. *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*, 1-37.
311. Butterfield, D.A., Koppal, T., Howard, B., Subramaniam, R., Hall, N., Hensley, K. ve diğ erleri. (1998). Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective

- action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitrone and vitamin E. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 854, 448-462.
312. Stadtman, E.R., Berlett, B.S. (1998). Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metabolism Reviews*, 30(2), 225-243.
313. Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 280(1), 1-8.
314. Halliwell, B. (1995). How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society Symposium*, 61, 73-101.
315. McCord, J.M., Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.
316. Fridovich, I. (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 23, 239-257.
317. Landis, G.N., Tower, J. (2005). Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(3), 365-379.
318. Marklund, S. (1980). Distribution of CuZn superoxide dismutase and Mn superoxide dismutase in human tissues and extracellular fluids. *Acta Physiologica Scandinavica Supplementum*, 492, 19-23.
319. Mates, J. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153(1), 83-104.
320. Tappel, A.L. (1978). Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Methods In Enzymology*, 52, 506-513.
321. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods In Enzymology*, 105, 121-126.
322. Carr, A., Frei, B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *Federation of American Societies For Experimental Biology*, 13(9), 1007-1024.

323. Pryor, W.A. (2000). Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(1), 141-164.
324. Browne, R.W., Armstrong, D. (1998). Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods in Molecular Biology*, 108, 347-352.
325. Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal of Biological Chemistry*, 263(33), 17205-17208.
326. Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(10), 577-586.
327. Aydın, A., Sayal, A., Işimer, A. (2001). Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi. *Gülhane Askeri Tıp Akademisi* (20), 1-87.
328. Jones, D.P., Carlson, J.L., Mody, V.C., Cai, J., Lynn, M.J., Sternberg, P. (2000). Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(4), 625-635.
329. Chesney, R.W. (1985). Taurine: its biological role and clinical implications. *Advances in Pediatrics*, 32, 1-42.
330. Das, J., Ghosh, J., Manna, P., Sil, P.C. (2012). Taurine protects rat testes against doxorubicin-induced oxidative stress as well as p53, Fas and caspase 12-mediated apoptosis. *Amino Acids*, 42(5), 1839-1855.
331. Wright, C.E., Tallan, H.H., Lin, Y.Y., Gaull, G.E. (1986). Taurine: biological update. *Annual Review of Biochemistry*, 55, 427-453.
332. Wright, C.E., Lin, T.T., Lin, Y.Y., Sturman, J.A., Gaull, G.E. (1985). Taurine scavenges oxidized chlorine in biological systems. *Progress In Clinical and Biological Research*, 179, 137-147.
333. Boşgelmez, İ.İ., Söylemezoğlu, T., Güvendik, G. (2008). The protective and antidotal effects of taurine on hexavalent chromium-induced oxidative stress in mice liver tissue. *Biological Trace Element Research*, 125(1), 46-58.

334. Gurer, H., Ozgunes, H., Saygin, E., Ercal, N. (2001). Antioxidant effect of taurine against lead-induced oxidative stress. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(4), 397-402.
335. Manna, P., Sinha, M., Sil, P.C. (2009). Taurine plays a beneficial role against cadmium-induced oxidative renal dysfunction. *Amino Acids*, 36(3), 417-428.
336. Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J. (1988). The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochemical Journal*, 256(1), 251-255.
337. Turunen, M., Olsson, J., Dallner, G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1660(1-2), 171-199.
338. Crane, F.L. (2001). Biochemical functions of coenzyme Q10. *Journal of The American College of Nutrition*, 20(6), 591-598.
339. Song, H.S., Kim, H.R., Park, T.W., Cho, B.J., Choi, M.Y., Kim, C.J. ve diğeri. (2009). Antioxidant Effect of CoQ(10) on N-nitrosodiethylamine-induced Oxidative Stress in Mice. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 13(4), 321-326.
340. Sourris, K.C., Harcourt, B.E., Tang, P.H., Morley, A.L., Huynh, K., Penfold, S.A. ve diğeri. (2012). Ubiquinone (coenzyme Q10) prevents renal mitochondrial dysfunction in an experimental model of type 2 diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(3), 716-723.
341. Fu, X., Ji, R., Dam, J. (2009). Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of Bio-Quinone Q10 in mice and rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 53(1), 1-5.
342. Littarru, G.P., Tiano, L. (2007). Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q10: recent developments. *Molecular Biotechnology*, 37(1), 31-37.

343. Mitchell, P. (1975). Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Letters*, 56(1), 1-6.
344. Kettawan, A., Takahashi, T., Kongkachuichai, R., Charoenkiatkul, S., Kishi, T., Okamoto, T. (2007). Protective effects of coenzyme q(10) on decreased oxidative stress resistance induced by simvastatin. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 40(3), 194-202.
345. Beyer, R.E. (1992). An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. *Biochemistry and Cell Biology*, 70(6), 390-403.
346. Matthews, R.T., Yang, L., Browne, S., Baik, M., Beal, M.F. (1998). Coenzyme Q10 administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 95(15), 8892-8897.
347. Bentinger, M., Brismar, K., Dallner, G. (2007). The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*, 7, S41-S50.
348. Ernster, L., Forsmark-Andree, P. (1993). Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clinical Investigation*, 71(8 Suppl), S60-65.
349. Papucci, L., Schiavone, N., Witort, E., Donnini, M., Lapucci, A., Tempestini, A. ve diğ erleri. (2003). Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 28220-28228.
350. Schmelzer, C., Lindner, I., Vock, C., Fujii, K., Doring, F. (2007). Functional connections and pathways of coenzyme Q10-inducible genes: an in-silico study. *IUBMB Life*, 59(10), 628-633.
351. Thomas, S.R., Neuzil, J., Stocker, R. (1996). Cosupplementation with coenzyme Q prevents the prooxidant effect of alpha-tocopherol and

- increases the resistance of LDL to transition metal-dependent oxidation initiation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 16(5), 687-696.
352. Hamilton, S.J., Chew, G.T., Watts, G.F. (2007). Therapeutic regulation of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 4(2), 89-102.
353. Freshney, R.I. (2000). *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique*. New York: Wiley-Liss.
354. Barile, F.A. (2007). *Principles of toxicology testing*. CRC Press.
355. Langdon, S.P. (2004). *Cancer cell culture: Methods and Protocols*. New Jersey: Humana Press.
356. Aşan, E., Dağdeviren, A. (2012). *Moleküler Histoloji Hücre*. Ankara: Atlas Kitapçılık.
357. Davis, J.M. (1994). *Basic cell culture: a practical approach*. IRL Press.
358. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell* (6 bs.). New York: Garland Science.
359. Klug, W.S., Cummings, M.R., (2003). *Genetik kavramlar*. (C. Öner, Çev.), Ankara: Palme Yayıncılık. (2000).
360. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Kreiger, M., Scott, M.P., Bretscher, A. ve diğerleri. (2011). *Moleküler hücre biyolojisi*. (H. Geçkil, M. Özmen, ve Ö. Yeşilada, Çev) Ankara: Palme Yayıncılık. (2008).
361. Smart, R.C., Hodgson, E. (2008). *Molecular and biochemical toxicology*. New Jersey: John Wiley & Sons.
362. Padanilam, B.J. (2003). Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *American Journal of Physiology, Renal Physiology*, 284(4), F608-627.
363. Coşkun, G., Özgür, H. (2011). Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3).

364. Galluzzi, L., Aaronson, S.A., Abrams, J., Alnemri, E.S., Andrews, D.W., Baehrecke, E.H. ve diğerleri. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death & Differentiation*, 16(8), 1093-1107.
365. Kerr, J.F. (1971). Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *The Journal of Pathology*, 105(1), 13-20.
366. Wyllie, A.H., Kerr, J.F., Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology*, 68, 251-306.
367. Barros, L.F., Hermosilla, T., Castro, J. (2001). Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comperative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 130(3), 401-409.
368. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
369. Yasumura, Y., Kawatika, Y. (1963). Studies on SV40 virus in tissue culture cells. *Nippon Rinsho*, 21, 1201-1215.
370. Ammerman, N.C., Beier-Sexton, M., Azad, A.F. (2008). Growth and maintenance of Vero cell lines. *Current Protocols Microbiology*, Appendix 4, Appendix 4E.
371. American Type Culture Collection. Erişim: 15 Mayıs 2015, [http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-81.aspx?geo\\_%20country=tr#generalinformation](http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-81.aspx?geo_%20country=tr#generalinformation)
372. Sheets, R. (2000) History and characterization of the VERO cell line. *The Vaccine and Related Biological Product Advisory Commite*.
373. American Type Culture Collection. Erişim: 15 Mayıs 2015, <http://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/2/D/F/B/1771.ashx>

374. Bakke, A.C. (2001). The principles of flow cytometry. *Laboratory Medicine*, 32(4), 207-211.
375. Yılmaz, M.T., Deniz, G. (1999). Flow Cytometry ve Tıpta Kullanımı. İstanbul. Bilim Medya Grup. Aktüel Tıp Dergisi.
376. Brown, M., Wittwer, C. (2000). Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry*, 46(8 Pt 2), 1221-1229.
377. Nunez, R. (2001). DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Current issues in molecular biology*, 3, 67-70.
378. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351-358.
379. Akerboom, T.P., Sies, H. (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods In Enzymology*, 77, 373-382.
380. Arthur, J., Boyne, R. (1985). Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. *Life Sciences*, 36(16), 1569-1575.
381. Pleban, P.A., Munyani, A., Beachum, J. (1982). Determination of selenium concentration and glutathione peroxidase activity in plasma and erythrocytes. *Clinical Chemistry*, 28(2), 311-316.
382. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
383. Keston, A.S., Brandt, R. (1965). The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Analytical Biochemistry*, 11(1), 1-5.
384. LeBel, C.P., Ischiropoulos, H., Bondy, S.C. (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, 5(2), 227-231.



385. Wang, H., Joseph, J.A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(5-6), 612-616.
386. Rigden, M., Pelletier, G., Poon, R., Zhu, J., Auray-Blais, C., Gagnon, R. ve diğerleri. (2014). Assessment of Urinary Metabolite Excretion After Rat Acute Exposure to Perfluorooctanoic Acid and Other Peroxisomal Proliferators. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 1-11.
387. Wang, L., Wang, Y., Liang, Y., Li, J., Liu, Y., Zhang, J. ve diğerleri. (2013). Specific Accumulation of Lipid Droplets in Hepatocyte Nuclei of PFOA-exposed BALB/c Mice. *Scientific Reports*, 3, 2174.
388. Butenhoff, J.L., Kennedy, G.L., Jr., Chang, S.C., Olsen, G.W. (2012). Chronic dietary toxicity and carcinogenicity study with ammonium perfluorooctanoate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, 298 (1-3), 1-13.
389. Dzhekova-Stojkova, S., Bogdanska, J., Stojkova, Z. (2001). Peroxisome proliferators: their biological and toxicological effects. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 39 (6), 468-474.
390. Ikeda, T., Aiba, K., Fukuda, K., Tanaka, M. (1985). The induction of peroxisome proliferation in rat liver by perfluorinated fatty acids, metabolically inert derivatives of fatty acids. *Journal of Biochemistry*, 98(2), 475-482.
391. Pastoor, T.P., Lee, K.P., Perri, M.A., Gillies, P.J. (1987). Biochemical and morphological studies of ammonium perfluorooctanoate-induced hepatomegaly and peroxisome proliferation. *Experimental and Molecular Pathology*, 47(1), 98-109.
392. Feng, M., He, Q., Meng, L., Zhang, X., Sun, P., Wang, Z. (2015). Evaluation of single and joint toxicity of perfluorooctane sulfonate, perfluorooctanoic acid, and copper to *Carassius auratus* using oxidative stress biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 161, 108-116.

393. Zhang, H., Shi, Z., Liu, Y., Wei, Y., Dai, J. (2008). Lipid homeostasis and oxidative stress in the liver of male rats exposed to perfluorododecanoic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 227(1), 16-25.
394. Yang, S., Liu, S., Ren, Z., Jiao, X., Qin, S. (2014). Induction of oxidative stress and related transcriptional effects of perfluorononanoic acid using an in vivo assessment. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 160, 60-65.
395. Kawashima, Y., Suzuki, S., Kozuka, H., Sato, M., Suzuki, Y. (1994). Effects of prolonged administration of perfluorooctanoic acid on hepatic activities of enzymes which detoxify peroxide and xenobiotic in the rat. *Toxicology*, 93(2-3), 85-97.
396. Xie, W., Wu, Q., Kania-Korwel, I., Tharappel, J.C., Telu, S., Coleman, M.C. ve diğeri. (2009). Subacute exposure to N-ethyl perfluorooctanesulfonamidoethanol results in the formation of perfluorooctanesulfonate and alters superoxide dismutase activity in female rats. *Archives of Toxicology*, 83(10), 909-924.
397. Mashayekhi, V., Tehrani, K.H., Hashemzaei, M., Tabrizian, K., Shahraki, J., Hosseini, M.J. (2015). Mechanistic approach for the toxic effects of perfluorooctanoic acid on isolated rat liver and brain mitochondria. *Human & Experimental Toxicology*.
398. Tomaszewski, K.E., Agarwal, D.K., Melnick, R.L. (1986). In vitro steady-state levels of hydrogen peroxide after exposure of male F344 rats and female B6C3F1 mice to hepatic peroxisome proliferators. *Carcinogenesis*, 7(11), 1871-1876.
399. Sinha, M., Manna, P., Sil, P.C. (2008). Cadmium-induced neurological disorders: prophylactic role of taurine. *Journal of Applied Toxicology*, 28 (8), 974-986.
400. Timbrell, J.A., Seabra, V., Waterfield, C.J. (1995). The in vivo and in vitro protective properties of taurine. *Genetic Pharmacology*, 26 (3), 453-462.

401. Redmond, H.P., Wang, J.H., Bouchier-Hayes, D. (1996). Taurine attenuates nitric oxide- and reactive oxygen intermediate-dependent hepatocyte injury. *Archives of Surgery*, 131 (12), 1280-1287; discussion 1287-1288.
402. Cozzi, R., Ricordy, R., Bartolini, F., Ramadori, L., Perticone, P., De Salvia, R. (1995). Taurine and ellagic acid: two differently-acting natural antioxidants. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 26 (3), 248-254.
403. Chen, L.C., Tatum, V., Glauert, H.P., Chow, C.K. (2001). Peroxisome proliferator perfluorodecanoic acid alters glutathione and related enzymes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 15(2), 107-113.
404. Ozden, S., Catalgol, B., Gezginci-Oktayoglu, S., Karatug, A., Bolkent, S., Alpertunga, B. (2013). Acute effects of methiocarb on oxidative damage and the protective effects of vitamin E and taurine in the liver and kidney of Wistar rats. *Toxicology and Industrial Health*, 29 (1), 60-71.
405. O'Brien, M.L., Twaroski, T.P., Cunningham, M.L., Glauert, H.P., Spear, B.T. (2001). Effects of peroxisome proliferators on antioxidant enzymes and antioxidant vitamins in rats and hamsters. *Toxicological Sciences*, 60(2), 271-278.
406. Sinha, M., Manna, P., Sil, P.C. (2009). Induction of necrosis in cadmium-induced hepatic oxidative stress and its prevention by the prophylactic properties of taurine. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 23 (4), 300-313.
407. Huber, W., Kraupp-Grasl, B., Esterbauer, H., Schulte-Hermann, R. (1991). Role of oxidative stress in age dependent hepatocarcinogenesis by the peroxisome proliferator nafenopin in the rat. *Cancer Research*, 51(7), 1789-1792.
408. Gonzalez, F.J. (2002). The peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha): role in hepatocarcinogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 193(1-2), 71-79.

409. Xu, D., Li, C., Chen, H., Shao, B. (2013). Cellular response of freshwater green algae to perfluorooctanoic acid toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 88, 103-107.
410. Majumdar, A.S., Nirwane, A., Kamble, R. (2014). Coenzyme q10 abrogated the 28 days aluminium chloride induced oxidative changes in rat cerebral cortex. *Toxicology International*, 21 (2), 214-221.
411. Roy, A., Manna, P., Sil, P.C. (2009). Prophylactic role of taurine on arsenic mediated oxidative renal dysfunction via MAPKs/ NF-kappaB and mitochondria dependent pathways. *Free Radical Research*, 43 (10), 995-1007.
412. Fouad, A.A., Al-Sultan, A.I., Refaie, S.M., Yacoubi, M.T. (2010). Coenzyme Q10 treatment ameliorates acute cisplatin nephrotoxicity in mice. *Toxicology*, 274 (1), 49-56.
413. Shabalina, I.G., Panaretakis, T., Bergstrand, A., DePierre, J.W. (1999). Effects of the rodent peroxisome proliferator and hepatocarcinogen, perfluorooctanoic acid, on apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Carcinogenesis*, 20(12), 2237-2246.
414. Peng, S., Yan, L., Zhang, J., Wang, Z., Tian, M., Shen, H. (2013). An integrated metabonomics and transcriptomics approach to understanding metabolic pathway disturbance induced by perfluorooctanoic acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 86, 56-64.
415. Buhrke, T., Kibellus, A., Lampen, A. (2013). In vitro toxicological characterization of perfluorinated carboxylic acids with different carbon chain lengths. *Toxicology Letters*, 218(2), 97-104.
416. Coperchini, F., Pignatti, P., Lacerenza, S., Negri, S., Sideri, R., Testoni, C. ve diğerleri. (2015). Exposure to perfluorinated compounds: in vitro study on thyroid cells. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(3), 2287-2294.
417. Gorrochategui, E., Perez-Albaladejo, E., Casas, J., Lacorte, S., Porte, C. (2014). Perfluorinated chemicals: differential toxicity, inhibition of

- aromatase activity and alteration of cellular lipids in human placental cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 277(2), 124-130.
418. Hu, J., Li, J., Wang, J., Zhang, A., Dai, J. (2014). Synergistic effects of perfluoroalkyl acids mixtures with J-shaped concentration-responses on viability of a human liver cell line. *Chemosphere*, 96, 81-88.
419. Henry, N.D., Fair, P.A. (2013). Comparison of in vitro cytotoxicity, estrogenicity and anti-estrogenicity of triclosan, perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid. *Journal of Applied Toxicology*, 33 (4), 265-272.
420. Calabrese, E.J., Baldwin, L.A. (2001). Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22 (6), 285-291.
421. Klaunig, J.E. (2005). Cancer biology and hormesis: commentary. *Critical Reviews in Toxicology*, 35 (6), 593-594.
422. Gürbay, A., Gonthier, B., Barret, L., Favier, A., Hincal, F. (2007). Cytotoxic effect of ciprofloxacin in primary culture of rat astrocytes and protection by Vitamin E. *Toxicology*, 229 (1-2), 54-61.
423. Calabrese, E.J. (2009). Getting the dose–response wrong: why hormesis became marginalized and the threshold model accepted. *Archives of Toxicology*, 83 (3), 227-247.
424. Hagens, A., Vergauwen, L., Benoot, D., Laukens, K., Knapen, D. (2013). Mechanistic toxicity study of perfluorooctanoic acid in zebrafish suggests mitochondrial dysfunction to play a key role in PFOA toxicity. *Chemosphere*, 91(6), 844-856.
425. Sinha, M., Manna, P., Sil, P.C. (2007). Taurine, a conditionally essential amino acid, ameliorates arsenic-induced cytotoxicity in murine hepatocytes. *Toxicology In Vitro*, 21 (8), 1419-1428.
426. Huang, J.S., Chuang, L.Y., Guh, J.Y., Yang, Y.L., Hsu, M.S. (2008). Effect of taurine on advanced glycation end products-induced hypertrophy in

- renal tubular epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 233 (2), 220-226.
427. Eppler, B., Dawson, R., Jr. (2002). Cytoprotective role of taurine in a renal epithelial cell culture model. *Biochemical Pharmacology*, 63 (6), 1051-1060.
428. Heidari, R., Babaei, H., Eghbal, M.A. (2013). Cytoprotective effects of taurine against toxicity induced by isoniazid and hydrazine in isolated rat hepatocytes. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 64 (2), 15-24.
429. Qi, X.F., Kim, D.H., Yoon, Y.S., Kim, S.K., Cai, D.Q., Teng, Y.C. ve diğerleri. (2010). Involvement of oxidative stress in simvastatin-induced apoptosis of murine CT26 colon carcinoma cells. *Toxicology Letters*, 199 (3), 277-287.
430. Li, H., Chen, G., Ma, W., Li, P.A. (2014). Water-soluble coenzyme q10 inhibits nuclear translocation of apoptosis inducing factor and cell death caused by mitochondrial complex I inhibition. *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (8), 13388-13400.
431. Kawamoto, K., Oashi, T., Oami, K., Liu, W., Jin, Y., Saito, N. ve diğerleri. (2010). Perfluorooctanoic acid (PFOA) but not perfluorooctane sulfonate (PFOS) showed DNA damage in comet assay on *Paramecium caudatum*. *Journal of Toxicological Science*, 35(6), 835-841.
432. Liu, X., Jin, Y., Liu, W., Wang, F., Hao, S. (2011). Possible mechanism of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate on the release of calcium ion from calcium stores in primary cultures of rat hippocampal neurons. *Toxicology in Vitro*, 25(7), 1294-1301.
433. Zhao, G., Wang, J., Wang, X., Chen, S., Zhao, Y., Gu, F. ve diğerleri. (2011). Mutagenicity of PFOA in mammalian cells: role of mitochondria-dependent reactive oxygen species. *Environmental Science & Technology*, 45(4), 1638-1644.

## Ek 1: Etik Kurul Onayı

### ERCIYES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI KAYSERİ-TÜRKİYE

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

ETİK KURULUN ADRESİ : Erc.Üni. Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi

Tarih: 13.02.2013

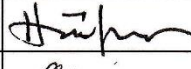
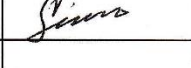
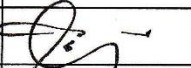


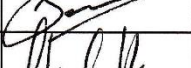

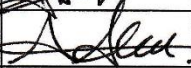
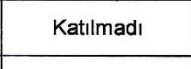
Toplantı Sayısı: 02

Karar No: 13/33

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul 13.02.2013 tarihinde

Prof. Dr. Harun ÜLGER

Başkanlığı'nda toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Unvanı	Bölümü	İmza
Harun Ülger	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	
Abdullah İnci	Prof. Dr.	Vet. Fakültesi	
Özlem Canöz	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	
Coşkun Tez	Prof. Dr	Fen Fakültesi	
Fusun F. Erdoğan	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Ahmet Öztürk	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
M. Betül Aycan.	Doç. Dr.	Ecz. Fakültesi	
Gökçen Y. Çelik	Doç. Dr.	Ecz. Fakültesi	
Servet Kesim	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Aydın ALAN	Yrd. Doç. Dr.	DEKAM	
Asiye Gökbelen	Yar. Sevenler Der. Baş.	Sivil top. kuruluşu temsilcisi	Katılmadı
Serap A. Eroğlu	Avukat	Kurumla ilişkisi olmayan üye	Katılmadı


Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden .Doç. Dr.Aylin GÜRBAY tarafından sunulan "Perflorooktanoik asitin sitotoksikite ve oksidatif stres indükleyici etkilerinin in vivo ve in vitro sistemlerde araştırılması" adlı araştırma projesi incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına oy birliğiyle karar verildi.

Tarih : 13.02.2013

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Harun ÜLGER

İmzası :



ASLININ AYNIĞI  
  
Prof. Dr. Harun ÜLGER  
Erciyes Üniversitesi  
Hayvan Deneyleri  
Yerel Etik Kurul Başkanı

## **ÖZGEÇMİŞ**

1986 yılında Kayseri’de doğdu. 2004 yılında Nuh Mehmet Küçükçalık Anadolu Lisesi’nden, 2010 yılında Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden mezun oldu. 2010 yılında Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı. Aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’ne bağlı olarak Farmasötik Toksikoloji doktora programına başladı. Halen Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmalarını sürdürmektedir.



