



**AKCİĞER HÜCRE HATTINDA NİTROFENİN GLOBAL GEN İFADELENMESİNE ETKİLERİNİN RNA-SEQ
YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ**

İlayda ŞEKEROĞLU

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ahmet KOÇ

Yüksek Lisans Tezi-2026

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER HÜCRE HATTINDA NİTROFENİN GLOBAL GEN İFADELENMESİNE ETKİLERİNİN RNA-
SEQ YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ

İlayda ŞEKEROĞLU

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ahmet KOÇ

Tez Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ahmet KOÇ

Prof. Dr. Şengül YÜKSEL

Dr. Öğr. Üyesi Hüsniye Gül OTLU

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-
2024-3566 Proje numarası ile desteklenmiştir

MALATYA

2026

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

ETİK ve YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI

09 / 06 / 2026

İnönü Üniversitesi Lisansüstü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak, “Prof. Dr. Ahmet KOÇ” danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “Akciğer Hücre Hattında Nitrofenin Global Gen İfadelenmesine Etkilerinin RNA-Seq Yöntemiyle İncelenmesi” başlıklı Yüksek Lisans tezimde:

1. ETİK ve BİLİMSEL SORUMLULUKLARIM:

- Tezimde yer alan verileri, bilgileri ve belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Çalışmada yararlandığım tüm kaynaklara bilimsel kurallara uygun şekilde atıfta bulunduğumu ve kaynakça gösteriminde APA 7. baskı kurallarına uyduğumu,
- Tezimin özgün olduğunu, çalışma ve yazım sürecinde patent ve telif haklarını ihlal edici hiçbir davranışta bulunmadığımı,
- Aksi bir durumda doğabilecek tüm hukuki ve akademik sonuçları kabul ettiğimi,

2. YAPAY ZEKÂ KULLANIMINA İLİŞKİN BEYANIM:

() Tez yazım sürecinde yapay zekâ tabanlı araçlardan **faydalanmadım.**

(X) Tez yazım sürecinde yapay zekâ tabanlı araçlardan **faydalandım.**

Bu durumda:

- Yapay zekâ araçlarını yalnızca bilimsel üretim sürecini desteklemek amacıyla kullandığımı,
 - Kullanımın hipotez geliştirme, teorik tartışma ve yorumlama gibi üst düzey akademik becerileri içermediğini,
 - Kullanımın tezin özgünlüğüne, bilimsel etik kurallarına ve ilgili mevzuata aykırı olmadığını,
 - Usulsüz kullanımlara (kaynak göstermeksizin metin üretimi, yanıltıcı kaynak gösterimi, otomatik içeriklerin özgün eser gibi sunulması vb.) kesinlikle başvurmadığımı,
 - Kullanılan yapay zekâ araçlarının ve işlevlerinin, danışmanımın bilgisi dâhilinde, ekte verilen tabloda şeffaf biçimde belirtildiğini,
 - Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Faaliyetlerinde Üretken Yapay Zekâ Kullanımına Dair Etik Rehber’de belirtilen ilkelere riayet ettiğimi,
- kabul ve taahhüt ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı

İlayda ŞEKEROĞLU

EK: Yapay Zekâ Kullanım Tablosu (varsa)

EK: Yapay Zekâ Kullanım Tablosu

Bu tablo, tez çalışmanızda kullanılan üretken yapay zekâ araçlarının şeffaf biçimde beyan edilmesi amacıyla hazırlanmıştır. Her satırda kullanılan aracın adı, kullanım amacı, hangi bölümde kullanıldığı ve kullanım şekli belirtilmelidir. Tablo, danışman öğretim üyesinin bilgisi dâhilinde doldurulmalı ve gerektiğinde ek belgelerle desteklenmelidir.

No	Üretken Yapay Zekâ Aracı	Kullanım Amacı	Kullanıldığı Bölüm	Kullanım Şekli
1	ChatGPT	Akademik dil ve anlatımın iyileştirilmesi	Tezin tamamı	Metinlerin akademik üslup, dil bilgisi ve anlatım açısından değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Üretilen metinler doğrudan kullanılmamıştır.

Üretken Yapay Zekâ Aracı: Kullanılan aracın adı (ör. ChatGPT, Grammarly, Zotero AI, Copilot vb.).

Kullanım Amacı: Aracın hangi amaçla kullanıldığı (ör. literatür özeti, dil kontrolü, kaynak önerisi, yazım denetimi vb.).

Kullanıldığı Bölüm: Tezin hangi bölümünde kullanıldığı (ör. Giriş, Literatür Taraması, Bulgular, Sonuç vb.).

Kullanım Şekli: Kullanım biçiminin niteliği (ör. öneri alma, metin taslağı oluşturma, dil ve imla kontrolü, kaynak listesi düzenleme, doğrudan alıntı vb.).

Bu tablo, tezde üretken yapay zekâ kullanımının şeffaf, izlenebilir ve etik kurallara uygun olmasını sağlamak için hazırlanmıştır. Araçların katkısı, tez metninin özgünlüğünü ve bilimsel sorumluluğu ortadan kaldıracak düzeyde olmamalıdır.

Örnek:

No	Yapay Zekâ Aracı	Kullanım Amacı	Kullanıldığı Bölüm	Kullanım Şekli
1	ChatGPT	Kavramsal çerçevede ön okuma ve öneri alma	Giriş, Literatür taraması, Tartışma	Literatürdeki görüşleri özetlemek için yönlendirici sorular sorulmuştur. Otomatik üretilen metin aynen kullanılmamıştır.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Akciğer Fizyolojisi ve BEAS-2B Hücre Hattı	2
2.2 Nitrofen ve Toksik Etkileri	4
2.2.1 Nitrofenin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	4
2.2.2 Nitrofenin Tarımsal Kullanımı ve Maruziyet Riski	4
2.2.3 Nitrofenin Gelişimsel ve Moleküler Toksisite Mekanizmaları	5
2.2.4 Nitrofen İle İlişkili Gelişimsel Etkiler ve Konjenital Diyafragma Hernisi	6
2.3 RNA-Seq İle Transkriptomik Analizlerin Önemi	7
2.4 RT-qPCR ve Western Blot Doğrulama Yaklaşımı	8
2.5 Çalışmanın Amacı ve Hipotezi	9
3. MATERYAL VE METOT	10
3.1 Hücre Hattı ve Kültür Koşulları	10
3.2 Nitrofen Uygulaması ve Doz Belirleme (MTT Analizi)	10
3.3 Apoptoz Analizi	11
3.4 Hücre Döngüsü Analizi	11
3.5 RNA İzolasyonu ve RNA-Seq Hazırlığı	11
3.6 RNA-Seq Dizileme ve Biyoinformatik Analiz.....	12
3.7 Seçilen Genlerin RT-qPCR ile Doğrulanması	12
3.8 Protein İzolasyonu ve Western Blot Analizi	13
3.9 İstatistiksel Analiz.....	16
4. BULGULAR.....	17
4.1 Hücrelerin Morfolojik Analizi	17
4.2 Nitrofenin BEAS-2B Hücrelerinde IC50 Değerinin Belirlenmesi	18
4.3 RNA-Seq Analizi.....	18
4.3.1 RNA Kalite Kontrol Sonuçları.....	18
4.3.2 Sekans Veri Kalite Kontrol Sonuçları	19
4.3.3 Örnekler Arası Gen Ekspresyon Benzerliğinin Çok Boyutlu Ölçekleme (MDS) Analizi.....	20

4.4 Diferansiyel Gen Ekspresyonu Analiz Sonuçları	21
4.4.1 Diferansiyel Eksprese Genlerin Belirlenmesi (Volcano Grafiği)	21
4.4.2 Diferansiyel Gen Ekspresyonu Özet Tablosu	21
4.4.3 Diferansiyel Gen Ekspresyonu Isı Haritası (Heatmap)	23
4.5 Fonksiyonel Zenginleştirme (Enrichment) Analizi	24
4.5.1 Gene Ontology (GO) Zenginleştirme Analizi	24
4.5.2 KEGG Yolak Zenginleştirme Analizi	25
4.6 RT-qPCR ile Gen İfadelenme Analizi	26
4.7 Western Blot ile Protein İfadelenme Analizi	27
4.8 Apoptoz Analizi	28
4.9 Hücre Döngüsü Analizi	29
5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	36
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	41
EKLER	42
EK-1 Etik Kurul Onay Formu Gerekmediğine Dair Yazı	42

TEŐEKKÖR

Yüksek lisans tez çalışmaları süresince bilgi ve deneyimleriyle çalışmama yön veren, her aşamada destek ve katkılarını esirgemeyen kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Ahmet KOÇ'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve tecrübeleriyle akademik gelişime katkı sağlayan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi hocalarıma,

Laboratuvar çalışmalarım süresince deneylerin her aşamasında desteklerini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren değerli abim Dr. Öğr. Üyesi Muhammed DÜNDAR'a

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde TYL-2024-3566 numaralı yüksek lisans tez projesi kapsamında sağladığı mali destekten dolayı İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (BAP),

Koşulsuz sevgi ve desteklerini esirgemeyen, en zor zamanlarımda bana güç veren ve her zaman yanımda olduklarını hissettiren değerli aileme,

Her zaman daha iyisini yapmam için beni motive eden, başarılarımla gurur duyan ve hep arkamda olan, engin yaşam deneyimiyle yoluma ışık tutan ve ne yazık ki bu süreci tamamladığımı göremeden aramızdan ayrılan sevgili dedem Muzaffer BESLER'e,

Çok teşekkür ederim.

İlayda ŞEKEROĞLU

ÖZET

Akciğer Hücre Hattında Nitrofenin Global Gen İfadelenmesine Etkilerinin RNA-Seq Yöntemiyle İncelenmesi

Amaç: Bu çalışmanın amacı, çevresel bir toksikan olan nitrofenin insan bronşiyal epitel hücre hattı BEAS-2B üzerindeki moleküler etkilerini transkriptomik düzeyde değerlendirmek ve elde edilen bulguları doğrulayıcı yöntemlerle desteklemektir.

Materyal ve Metot: BEAS-2B hücreleri kültüre edildi ve hücre canlılığı analizi sonucunda belirlenen 800 µM nitrofen ile 24 saat muamele edildi. Ardından RNA izolasyonu yapıldı ve örnekler RNA-Seq analizi için dizilendi. Diferansiyel gen ekspresyon analizi yapıldı; anlamlı genler GO ve KEGG zenginleştirme analizleri ile değerlendirildi. Seçilen genlerin ekspresyon düzeyleri RT-qPCR ile, protein düzeyindeki değişimler ise Western blot ile doğrulandı.

Bulgular: RNA-Seq analizi sonucunda 502 genin anlamlı düzeyde diferansiyel eksprese olduğu ve bu genlerin 320'sinin artan, 182'sinin azalan genler olduğu belirlendi. Zenginleştirme analizleri ile nitrofen maruziyetinin hücresel stres yanıtı, metabolik süreçler ve epitel fonksiyonları ile ilişkili yolları etkilediği gösterildi. RT-qPCR sonuçları ile RNA-Seq bulguları arasındaki uyum büyük ölçüde doğrulandı, Western blot analizleri ile de seçilen hedeflerde benzer eğilimlerin gözlemlendiği belirlendi.

Sonuç: Nitrofen maruziyetinin BEAS-2B hücrelerinde geniş kapsamlı gen ekspresyon değişimlerine yol açtığı ve stres yanıtı, metabolik düzenleme ile epitel bütünlüğüyle ilişkili yolları etkilediği belirlendi. Bulgular, nitrofenin insan hava yolu epiteli üzerindeki çok yönlü etkilerine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: BEAS-2B, Diferansiyel Gen Ekspresyonu, Nitrofen, RNA-Seq, Toksisite

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Nitrofen on Global Gene Expression in a Lung Cell Line Using the RNA-Seq Method

Aim: This study aimed to evaluate the molecular effects of nitrofen, an environmental toxicant, on the human bronchial epithelial cell line BEAS-2B at the transcriptomic level and to validate the findings with complementary methods.

Materials and Methods: BEAS-2B cells were cultured and treated with 800 μ M nitrofen for 24 hours, as determined by the cell viability assay. Total RNA was isolated and sequenced for RNA-Seq analysis. Differential gene expression analysis was performed, and significant genes were assessed by GO and KEGG enrichment analyses. Selected genes were validated by RT-qPCR, and protein-level changes were examined by Western blot.

Results: RNA-Seq analysis identified 502 significantly differentially expressed genes, including 320 upregulated and 182 downregulated genes. Enrichment analyses showed that nitrofen exposure affected pathways related to cellular stress response, metabolic processes, and epithelial function. RT-qPCR largely confirmed the RNA-Seq findings, and Western blot analysis showed similar trends at the protein level for selected targets.

Conclusion: Nitrofen exposure induced extensive gene expression changes in BEAS-2B cells and affected pathways associated with stress response, metabolic regulation, and epithelial integrity. These findings suggest that nitrofen exerts multifaceted effects on human airway epithelium.

Keywords: BEAS-2B, Differential Gene Expression, Nitrofen, RNA-Seq, Toxicity

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACE2	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2
ACTB	: Beta-Aktin
APS	: Amonyum Persülfat
ATP	: Adenozin Trifosfat
ATP8	: ATP Sentaz Membran Alt Birimi 8
BCA	: Bisinchoninik Asit Protein Tayini Yöntemi
BEAS-2B	: İnsan Bronşiyal Epitel Hücre Hattı
CD	: Farklılaşma Kümesi
cDNA	: Komplementer DNA
CO₂	: Karbondioksit
Ct	: Eşik Döngü Değeri
CYP2R1	: Sitokrom P450 Ailesi 2 Alt Aile R Üyesi 1
DESeq2	: Diferansiyel Gen Ekspresyon Analiz Yazılımı
ddH₂O	: Deiyonize Su
DMEM	: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ECL	: Geliştirilmiş Kemilüminesans
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
edgeR	: Diferansiyel Gen Ekspresyon Analiz Yazılımı
ER	: Endoplazmik Retikulum
FBS	: Fetal Bovin Serum
FDR	: Yanlış Keşif Oranı

FL1	: Floresan Kanal 1
FL2	: Floresan Kanal 2
FSC	: İleri Saçılım
GC	: Guanin-Sitozin İçeriği
GDF15	: Büyüme Farklılaşma Faktörü 15
GM-CSF	: Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
GO	: Gen Ontolojisi
GSEA	: Gen Seti Zenginleştirme Analizi
HRP	: At keşanesi peroksidazı
IC50	: Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyonu
IL-8	: İnterlökin-8
ISR	: Entegre Stres Yanıtı
KEGG	: Genom ve Gen Yolları Kyoto Ansiklopedisi
KDH	: Konjenital Diyafragma Hernisi
KLF15	: Krüppel Benzeri Faktör 15
log2FC	: Logaritmik Kat Değişimi
logCPM	: Milyonda Okuma Sayısının Logaritması
LR	: Olabilirlik Oranı
MDS	: Çok Boyutlu Ölçekleme
mRNA	: Mesajcı RNA
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NaCl	: Sodyum Klorür
NP-40	: Nonidet P-40 Deterjanı
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PI	: Propidyum İyot
PKIB	: Protein Kinaz İnhibitörü Beta
p53	: Tümör Baskılayıcı Protein p53
RT-qPCR	: Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rb	: Retinoblastoma Proteini
RIN	: RNA Bütünlük Sayısı
RNA	: Ribonükleik Asit
RNA-Seq	: RNA Dizileme
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SSC	: Yan Saçılım
SV40	: Simian Virüs 40
TEMED	: Tetrametiletilendiamin
TLR	: Toll Benzeri Reseptör
Tris-HCl	: Tris Hidroklorür
ZO-1	: Zonula Okludens-1
µM	: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 1. Hava yolu epitel bariyerinin şematik gösterimi	2
Şekil 2. BEAS-2B hücrelerinin morfolojisi ve model kullanımı	3
Şekil 3. Nitrofenin kimyasal yapısı	4
Şekil 4. Nitrofenin gelişimsel toksisite mekanizmaları	5
Şekil 5. Nitrofen sonrası morfolojik değişiklikler	17
Şekil 6. Nitrofen dozuna bağlı canlılık etkisi	18
Şekil 7. Kontrol ve nitrofen uygulanan örneklerin MDS analizi	20
Şekil 8. Volcano grafiği	21
Şekil 9. Isı haritası	24
Şekil 10. GO biyolojik süreç zenginleştirilmesi	25
Şekil 11. KEGG yolak zenginleştirilmesi	26
Şekil 12. Seçilen genlerin göreceli ekspresyonu	27
Şekil 13. Western blot analizi	28
Şekil 14. Apoptoz analizi	29
Şekil 15. Hücre döngüsü analizi	30

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 1. RT-qPCR primer dizileri	12
Tablo 2. SDS-PAGE ayırıcı jel içeriği.....	13
Tablo 3. SDS-PAGE istifleme jeli içeriği	14
Tablo 4. Western blot uygulamalarındaki antikor bilgileri.....	15
Tablo 5. RNA örneklerinin kalite kontrol sonuçları	18
Tablo 6. RNA-Seq temiz okuma ve kalite parametreleri	19
Tablo 7. En çok artan ve azalan 30 gen.....	21



1. GİRİŞ

Çevresel toksikantlara maruziyet, insan sağlığı üzerinde kısa ve uzun vadeli etkiler oluşturabilen önemli bir halk sağlığı problemidir. Özellikle gelişimsel dönemlerde maruz kalınan kimyasal ajanların, organogenez süreçlerini etkileyerek kalıcı yapısal ve fonksiyonel bozukluklara yol açabildiği bilinmektedir. Akciğer gelişimi, embriyonik ve erken postnatal dönemlerde oldukça hassas bir süreç olup, bu dönemde ortaya çıkan moleküler düzensizlikler ilerleyen yaşam evrelerinde solunum fonksiyonlarını kalıcı biçimde etkileyebilmektedir. Bu bağlamda, çevresel faktörlerin hava yolu epiteli üzerindeki etkilerinin moleküler düzeyde anlaşılması büyük önem taşımaktadır (Gluckman & Hanson, 2004; Pinkerton & Joad, 2000).

Konjenital diyafragma hernisi gibi gelişimsel anomaliler, pulmoner hipoplazi ile birlikte seyreden ciddi klinik tablolar oluşturmakta ve yenidoğan morbidite ve mortalitesinin önemli nedenleri arasında yer almaktadır. Deneysel çalışmalarda yaygın olarak kullanılan nitrofen modeli, bu tür gelişimsel bozuklukların mekanizmalarının araştırılmasına katkı sağlamış olsa da, mevcut literatürün büyük bölümü hayvan modellerine dayanmaktadır. İnsan hava yolu epiteline özgü hücresel yanıtların nitrofen maruziyeti bağlamında nasıl şekillendiği ise halen sınırlı düzeyde anlaşılmıştır (Hurt et al., 1983; Manson, 1986).

Son yıllarda yüksek çıktılı dizileme teknolojilerinin gelişmesiyle birlikte, transkriptomik yaklaşımlar hücresel yanıtların kapsamlı biçimde değerlendirilmesine olanak tanımıştır. RNA-Seq temelli analizler, toksikan maruziyeti sonrası ortaya çıkan gen ekspresyon değişimlerini sistem düzeyinde ortaya koyabilmekte ve etkilenen biyolojik yolların tanımlanmasına imkân sağlamaktadır. Bununla birlikte, transkriptomik bulguların hedefli doğrulama yöntemleri ile desteklenmesi, elde edilen sonuçların biyolojik güvenilirliği açısından kritik bir gereklilik olarak kabul edilmektedir (Love et al., 2014; Wang et al., 2009).

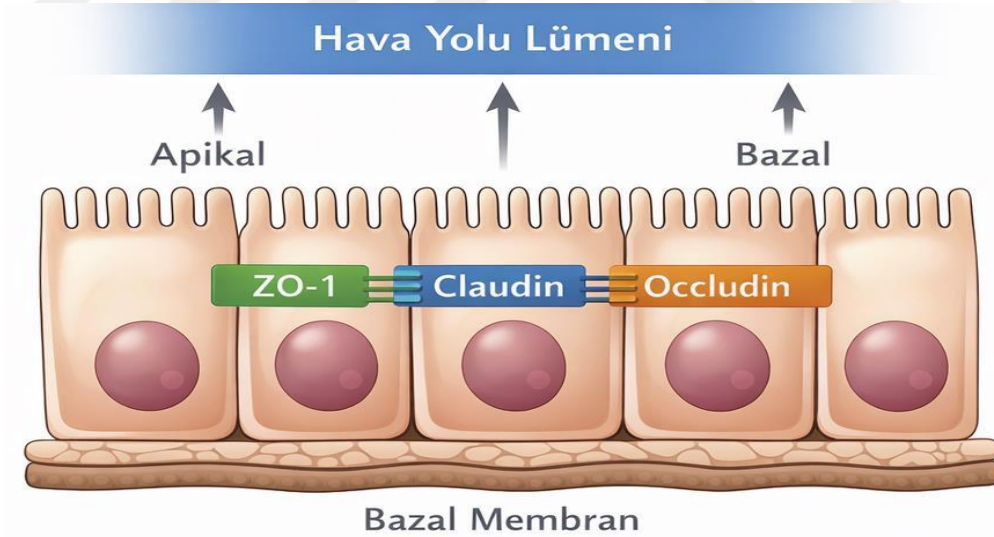
Bu tez çalışmasında, çevresel bir toksikan olan nitrofenin insan bronşiyal epitel hücre hattı BEAS-2B üzerindeki moleküler etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Bu kapsamda RNA-Seq yöntemi ile diferansiyel gen ekspresyon profilleri değerlendirilmiş, elde edilen bulgular RT-qPCR ve Western blot analizleri ile doğrulanmıştır. Böylece nitrofen maruziyetine bağlı hücresel yanıtların transkripsiyonel ve translasyonel düzeylerde bütüncül olarak incelenmesi hedeflenmiştir (Bustin et al., 2009; Conesa et al., 2016; Mahmood & Yang, 2012; Vogel & Marcotte, 2012).

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Akciğer Fizyolojisi ve BEAS-2B Hücre Hattı

Akciğer, organizmanın gaz değişimini sağlayan temel solunum organı olup, geniş yüzey alanına sahip alveoler yapısı sayesinde oksijenin kana geçişini ve karbondioksitin uzaklaştırılmasını mümkün kılar (West & Luks, 2020). Alveoller, ince bir epitel tabakası ve yoğun kapiller ağ ile çevrili olup bu yakın anatomik düzenleme, gaz difüzyonunun etkin şekilde gerçekleşmesini sağlar (Broussard et al., 2014). Hava yolu epiteli yalnızca gaz alışverişine katkıda bulunmakla kalmaz; aynı zamanda mukus üretimi ve kirpiksi hücre aktivitesi yoluyla solunan partiküllerin uzaklaştırılmasında ve epitel bariyer bütünlüğünün korunmasında kritik rol oynar (Broussard et al., 2014).

Hava yolu epitel hücreleri, sıkı bağlantı kompleksleri aracılığıyla bariyer fonksiyonunu sürdürür. Bu bağlantılar, zonula occludens-1 (ZO-1), kladinler ve okludin gibi proteinler tarafından düzenlenir ve epitel geçirgenliğinin kontrol edilmesinde merkezi öneme sahiptir (Willettts, 2012). Bariyer bütünlüğündeki bozulmaların inflamatuvar yanıtların artışı ve doku hasarı ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Willettts, 2012). Hava yolu epitel bariyerinin bu yapısal organizasyonu Şekil 1’de şematik olarak gösterilmiştir.



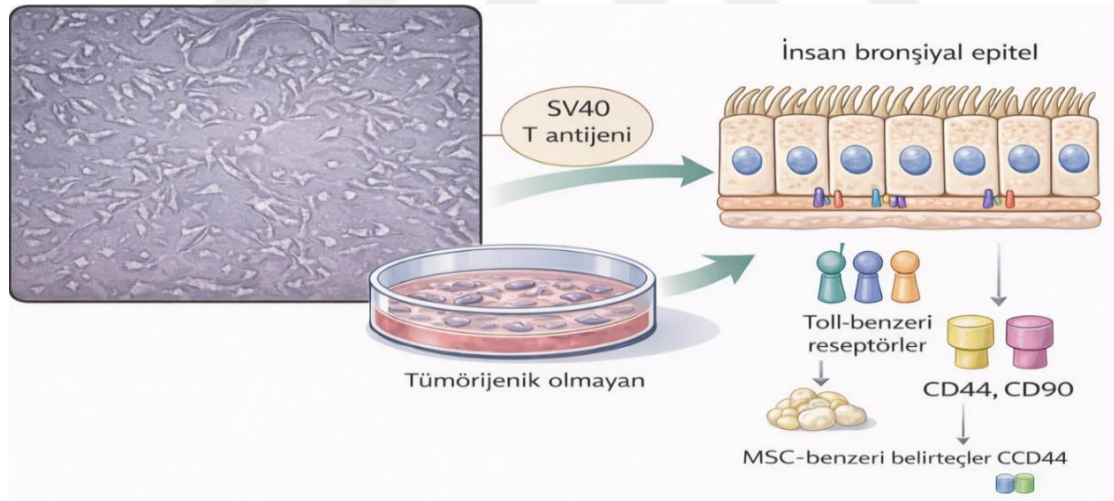
Şekil 1. Hava yolu epitel bariyerinin şematik gösterimi

BEAS-2B hücre hattı, insan bronşiyal epitelinden türetilmiş olup adenovirüs 12 ve SV40 büyük T antijeni kullanılarak ölümsüzleştirilmiştir (Han et al., 2020). SV40 büyük T antijeninin p53 ve Rb gibi tümör baskılayıcı proteinleri fonksiyonel olarak inhibe etmesi, bu hücrelerin uzun süreli kültür koşullarında proliferatif kapasitesini korumasını sağlamaktadır (Han et al., 2020). BEAS-2B hücreleri

tümörijenik olmamakla birlikte epitel karakteristiklerini sürdürmekte ve bu özellikleri sayesinde hava yolu epiteline özgü hücresel yanıtların incelenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Stewart et al., 2012).

Bazı çalışmalar, BEAS-2B hücrelerinin yalnızca epitel özellikleri sergilemekle kalmayıp, mezenkimal kök hücrelere benzer yüzey belirteçleri (CD44, CD73, CD90 ve CD105) ifade edebildiğini ve osteojenik ile adipojenik farklılaşma potansiyeline sahip olabileceğini göstermiştir (Ke et al., 1988). Bu fenotipik esneklik, BEAS-2B hücre hattını epitel bariyer fonksiyonlarının yanı sıra hücresel adaptasyon ve rejenerasyon süreçlerinin modellenmesi açısından da değerli kılmaktadır (Ke et al., 1988).

BEAS-2B hücreleri ayrıca Toll-benzeri reseptörleri (TLR1–10) eksprese etmekte ve çift sarmallı RNA gibi TLR ligandlarına yanıt olarak IL-8 ve GM-CSF başta olmak üzere çeşitli sitokin ve kemokinlerin üretimini artırabilmektedir (Willetts, 2012). Bu immün yanıt profili, BEAS-2B hücre hattının çevresel toksikantlara karşı hava yolu epitelinin inflamatuvar tepkilerinin in vitro olarak incelenmesi için uygun bir model olduğunu göstermektedir (Willetts, 2012). BEAS-2B hücrelerinin kültürdeki morfolojik görünümü ve deneysel model olarak kullanımına ilişkin şematik gösterim Şekil 2’de sunulmuştur. Dolayısıyla BEAS-2B hücreleri, insan hava yolu epiteline özgü hücresel süreçlerin moleküler düzeyde incelenmesine olanak sağlayan yaygın bir in vitro modeldir (Zhou et al., 2023).



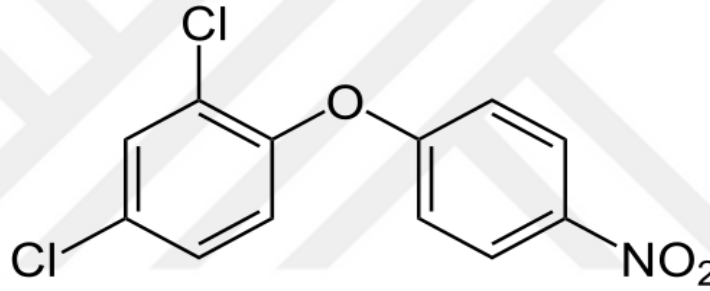
Şekil 2. BEAS-2B hücrelerinin morfolojisi ve model kullanımı

Bu özellikler doğrultusunda BEAS-2B hücre hattı, hava yolu epitel bariyer bütünlüğünün değerlendirilmesi, inflamatuvar yanıtların analizi ve epitel hasarı sonrası devreye giren onarım mekanizmalarının araştırılmasında esnek ve tekrarlanabilir bir deneysel sistem olarak kabul edilmektedir (Stewart et al., 2012; Xiao et al., 2012; Zhou et al., 2023).

2.2 Nitrofen ve Toksik Etkileri

2.2.1 Nitrofenin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Nitrofen, kimyasal formülü $C_{12}H_7Cl_2NO_3$ olan bir diphenyl ether (difenil eter) bileşiğidir ve yaygın adıyla 2,4-dikloro-1-(4-nitrofenoksi) benzen olarak tanımlanır. Moleküler ağırlığı yaklaşık $284.1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ olup zahiri fiziksel özellikleri arasında 71°C civarında bir erime noktası ve $\sim 190^\circ\text{C}$ civarında kaynama sınırları bildirilmiştir. Yapısal olarak nitrofen; bir nitro grubu (NO_2), iki klor atomu ve iki halkalı fenil-eter bağlantısı içerdiği için hem lipofilik hem de stabil bir organik molekül özelliği taşır ve çevresel ortamda kalıcılığa yatkındır. Nitrofenin kimyasal yapısı Şekil 3'te gösterilmiştir. Bu yapısal özellikler, nitrofenin biyolojik membranlardan geçişini kolaylaştırmakta ve dokularda birikim potansiyelini artırmaktadır (Hurt et al., 1983). Nitrofenin kimyasal karakteristiği ve toksikolojik profili üzerine yapılan çalışmalar, bu bileşiğin çevresel persistansı ile birlikte gelişimsel ve sistemik toksisite oluşturabildiğini göstermektedir (Manson, 1986).



Şekil 3. Nitrofenin kimyasal yapısı

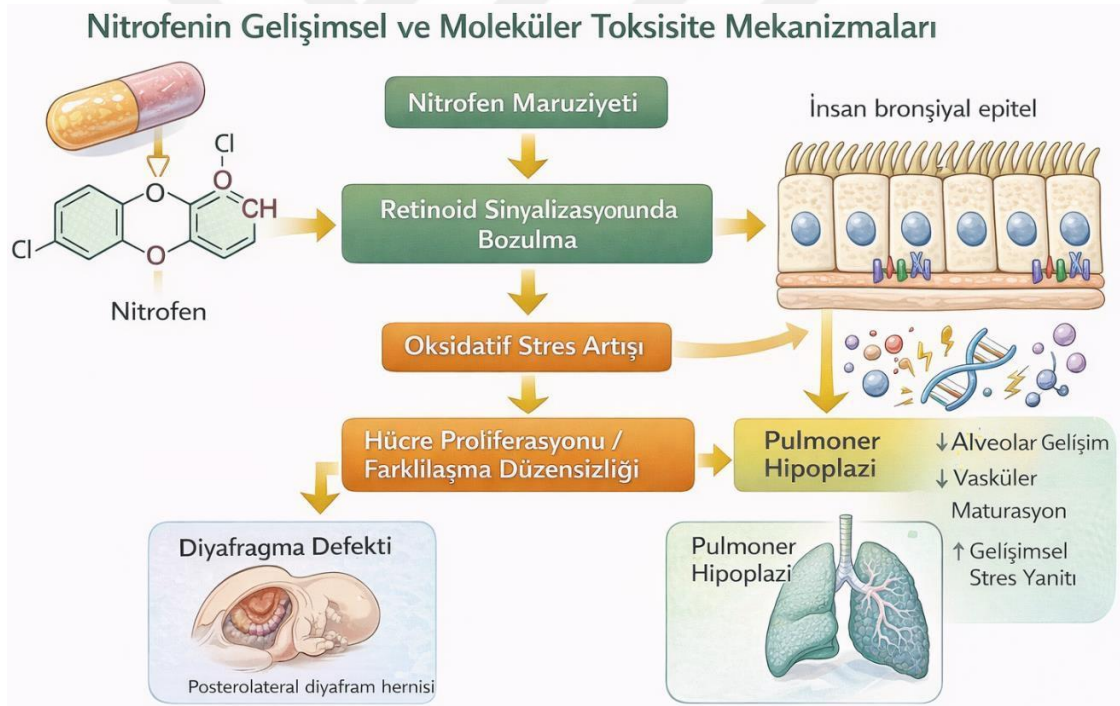
2.2.2 Nitrofenin Tarımsal Kullanımı ve Maruziyet Riski

Nitrofen, 20. yüzyılın ortalarından itibaren tarımsal alanlarda pre- ve erken post-çimlenme dönemlerinde yabancı ot kontrolü amacıyla yaygın şekilde kullanılmıştır (Kluth et al., 1990). Geçmiş uygulamalarda pirinç ve çeşitli sebze türleri dâhil olmak üzere birçok kültür bitkisinde kullanımına ilişkin kayıtlar bulunmaktadır (Sluiter et al., 1992). Ancak zamanla insan sağlığı ve çevre üzerindeki potansiyel riskleri nedeniyle birçok ülkede kullanımının kısıtlandığı veya tamamen yasaklandığı bildirilmektedir (Sluiter et al., 1992). Buna rağmen, geçmiş tarımsal uygulamalardan kaynaklanan kalıntıların 2000'li yıllarda dahi bazı gıda ve yem ürünlerinde saptanmış olması, nitrofenin çevresel mirasının sürdüğünü göstermektedir (Wang et al., 2025). Bu bulgular, düşük düzeyli ancak kronik maruziyet olasılığının tamamen ortadan kalkmadığını düşündürmektedir (Wang et al., 2025).

2.2.3 Nitrofenin Gelişimsel ve Moleküler Toksikite Mekanizmaları

Nitrofenin embriyotoksik ve teratojenik etkileri deneysel modellerde kapsamlı biçimde ortaya konmuştur. Gebeliğin belirli dönemlerinde nitrofen maruziyetinin, diyafram defektleri ve akciğer hipoplazisi gibi ciddi gelişimsel anomalilere yol açabildiği bildirilmiştir (Manson, 1986). Özellikle nitrofen ile indüklenen posterolateral diyafram hernisi modeli, konjenital diyafram hernisinin (KDH) patogenezi için incelemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Kluth et al., 1990).

Bu model çalışmaları, nitrofenin fetüste yalnızca mekanik etkiler oluşturmadığını; aynı zamanda hücre proliferasyonu, farklılaşma ve gen ekspresyonu ile ilişkili yolları bozarak organogenez sürecini doğrudan etkilediğini göstermektedir (Mahood et al., 2016). Nitrofen-KDH modellerinde akciğer gelişimindeki gerilemenin yalnızca abdominal organların torasik boşluğa herniasyonu ile açıklanamayacağı; retinoid sinyalizasyonu ve oksidatif stres yanıtları gibi moleküler mekanizmaların da sürece dâhil olduğu bildirilmektedir (Montedonico et al., 2006). Nitrofenin gelişimsel toksisiteye yol açan başlıca mekanizmaları Şekil 4'te şematik olarak sunulmuştur.



Şekil 4. Nitrofenin gelişimsel toksisite mekanizmaları

Nitrofen toksisitesinin zamanlamaya duyarlı olduğu ve gebeliğin belirli günlerinde maruziyetin daha belirgin gelişimsel bozukluklara yol açtığı gösterilmiştir; bu durum teratojenik etkinin hem zaman-bağımlı hem de doku-özü karakter taşıdığını düşündürmektedir (Keijzer et al., 2000). Transkriptomik analizler, nitrofenle muamele edilmiş fetüslerde alveolar gelişim genlerinde baskılanma, hücre döngüsü düzenleyicilerinde değişim ve vasküler gelişimle ilişkili genlerde düzensizlikler olduğunu

ortaya koymuştur; bu bulgular nitrofenin çok katmanlı bir patofizyolojik etki profiline sahip olduğunu desteklemektedir (Mahood et al., 2016).

Embriyonik dokularda gözlenen bu etkiler, yetişkin organizmalardaki akut toksisite bulgularından farklı olarak, gelişimsel programları hedef alan özgül biyolojik süreçlerin bozulduğunu düşündürmektedir (Lau et al., 1988). Güncel deneysel çalışmalar, retinoik asit yollarının modülasyonunun bazı koşullarda nitrofen kaynaklı akciğer hipoplazisinin şiddetini azaltabildiğini ve gelişimsel geriliği kısmen düzeltebildiğini bildirmiştir; bu durum nitrofen toksisitesinde retinoid metabolizmasının bozulmasının önemli bir rol oynayabileceğine işaret etmektedir (Montedonico et al., 2006). Buna ek olarak, nitrofen maruziyetinin hücrel oksidatif stres yanıtlarını aktive ettiği ve antioksidan savunma mekanizmalarının bu sürecin şiddetini modüle edebileceği gösterilmiştir; serbest radikal aracılı hücrel hasarın nitrofen ilişkili doku patolojisinde katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (Hirako et al., 2017).

Her ne kadar nitrofen temelli hayvan modelleri KDH ve akciğer gelişim bozukluklarının mekanizmalarını aydınlatmada önemli katkılar sağlamış olsa da, bu modellerin insan biyolojisini birebir yansıtmadığı ve türler arası farklılıkların sonuçların yorumlanmasında dikkate alınması gerektiği vurgulanmaktadır (Montalva & Zani, 2019). Bu nedenle, nitrofenin insan hava yolu epitel hücreleri üzerindeki doğrudan moleküler etkilerinin in vitro sistemlerde araştırılması, mevcut hayvan verilerini tamamlayıcı nitelikte önem taşımaktadır.

2.2.4 Nitrofen ile İlişkili Gelişimsel Etkiler ve Konjenital Diyafragma Hernisi

Konjenital diyafragma hernisi (KDH), diyaframın embriyonik gelişimi sırasında oluşan defektler sonucunda abdominal organların torasik boşluğa herniasyonu ile karakterize edilen ciddi bir doğumsal anomalidir ve sıklıkla pulmoner hipoplazi ile birliktelik gösterir (Puligandla et al., 2015). KDH'nin en yaygın formu olan Bochdalek hernisi, diyaframın posterolateral bölgesindeki gelişimsel açıklık nedeniyle ortaya çıkar ve çoğunlukla sol tarafta görülür (Greer, 2013; Puligandla et al., 2015). Bu defekt sonucunda gelişmekte olan akciğer üzerine mekanik baskı oluşsa da, güncel literatür akciğer hipoplazisinin yalnızca fiziksel kompresyonla açıklanamayacağını, akciğer gelişiminin diyafragma defekti oluşmadan önce de bozulmuş olabileceğini göstermektedir (Keijzer et al., 2000).

Bu görüş özellikle nitrofen ile oluşturulan deneysel KDH modelleri ile desteklenmektedir. Nitrofen maruziyeti sonrası embriyonik akciğerlerde gelişimsel geriliğin, diyafram defekti belirginleşmeden önce başladığı rapor edilmiştir (Keijzer et al., 2000; Kluth et al., 1990). Bu modellerde alveolar gelişim, dallanma morfogenezi ve vasküler yapılanma ile ilişkili gen ekspresyonlarının anlamlı şekilde etkilendiği gösterilmiş; böylece Bochdalek hernisinin yalnızca yapısal bir diyafram anomalisi değil, aynı zamanda primer akciğer gelişim bozukluğu içeren kompleks bir patoloji olduğu ortaya konmuştur (Clugston & Greer, 2007; Pober, 2007; Van Mieghem et al., 2018).

Nitrofen temelli KDH modellerinde elde edilen bulgular, özellikle retinoid (A vitamini) sinyalizasyonunun diyafram ve akciğer gelişiminde merkezi rol oynadığını ve bu yolaktaki bozulmaların hem diyafragma defektine hem de pulmoner hipoplaziye katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir (Greer, 2013). Buna ek olarak, oksidatif stres yanıtlarının ve gelişimsel sinyal ağlarının modülasyonu da nitrofen ilişkili patofizyolojide etkili mekanizmalar arasında yer almaktadır (Keijzer et al., 2000). Bu nedenle Bochdalek hernisi, moleküler ve hücresel düzeyde gelişimsel regülasyon bozukluklarının bir sonucu olarak değerlendirilmektedir (Pober, 2007).

Her ne kadar nitrofen-KDH modelleri hastalığın embriyolojik temellerinin anlaşılmasına önemli katkılar sağlamış olsa da, bu bulguların insan biyolojisine doğrudan aktarılabilirliği sınırlıdır. Bu bağlamda, insan hava yolu epitelini temsil eden in vitro sistemlerde gerçekleştirilen çalışmalar, nitrofen maruziyetine bağlı hücresel ve moleküler yanıtların doğrudan değerlendirilmesine olanak sağlayarak hayvan modeli verilerini tamamlayıcı nitelik taşımaktadır.

2.3 RNA-Seq ile Transkriptomik Analizlerin Önemi

Transkriptom, bir hücre ya da dokunun belirli bir zaman noktasında ifade ettiği tüm RNA türlerini (mRNA dâhil) ve bunların izoform çeşitliliğini yansıtan dinamik bir moleküler profildir (Wang et al., 2009). RNA-Seq, yüksek çıktılı dizileme teknolojilerini kullanarak transkriptomun kapsamlı şekilde profillenmesine olanak sağlayan, modern transkriptomik analizlerin temel yaklaşımıdır (Wang et al., 2009). Bu yöntem, gen ekspresyon düzeylerini nicel olarak ölçmenin yanı sıra alternatif ekson kullanımı ve izoform farklılıklarını da yakalayabildiği için transkriptomik karmaşıklığın değerlendirilmesinde belirgin avantaj sunar (Wang et al., 2009). RNA-Seq'in arka plan sinyalinin düşük olması ve ölçüm aralığının (dynamic range) geniş olması, düşük bolluktaki transkriptlerin saptanmasını ve yüksek bolluktaki transkriptlerin daha doğru nicellenmesini destekler (Wang et al., 2009).

RNA-Seq, mikroarray tabanlı profillemeye yaklaşımlarına kıyasla özellikle düşük ekspresyonlu genlerin tespitinde daha yüksek duyarlılık ve daha geniş dinamik aralık sağlayabildiği için diferansiyel gen ekspresyonu analizlerinde güçlü bir platform olarak öne çıkmaktadır (Zhao et al., 2014). RNA-Seq verisi, koşullar arası gen ekspresyon değişimlerinin sistematik biçimde karşılaştırılmasına olanak vererek biyolojik yanıtların moleküler düzeyde haritalanmasını mümkün kılar (Wang et al., 2009). Bu bağlamda RNA-Seq, yalnızca önceden hedeflenen genleri değil, aynı zamanda beklenmeyen yolları ve düzenleyici ağları da görünür kıldığı için hipotez üretmeye elverişli keşifsel bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (Wang et al., 2009).

RNA-Seq verileri sayım (count) temelli olduğundan, diferansiyel ekspresyon analizinde biyolojik/teknik varyasyonu modelleyen istatistiksel yöntemlerin kullanılması gereklidir (Love et al., 2014). DESeq2 gibi yöntemler, dispersiyon ve kat değişim (fold change) tahminlerinde shrinkage yaklaşımlarını kullanarak daha stabil ve yorumlanabilir diferansiyel ekspresyon sonuçları üretmeyi

amaçlar (Love et al., 2014). Benzer şekilde edgeR, aşırı saçılımı (overdispersion) hesaba katan modeller ve ampirik Bayes yaklaşımları ile replike sayım verilerinden diferansiyel ekspresyon çıkarımı yapılmasına olanak sağlar (Robinson et al., 2010). Bu analiz çıktıları, tek tek gen düzeyindeki değişimlerin ötesinde biyolojik anlamlandırma ihtiyacını doğurduğundan, gen kümeleri/yolaklar üzerinden yorumlayıcı çerçeveler kritik hâle gelir (Subramanian et al., 2005). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) gibi yaklaşımlar, tek tek genler yerine biyolojik olarak ilişkili gen setlerinde eşgüdümlü değişimleri test ederek transkriptomik veriden biyolojik içgörü üretmeyi hedefler (Subramanian et al., 2005).

Bu nedenle RNA-Seq temelli transkriptomik analizler, hücresel yanıtların kapsamlı biçimde değerlendirilmesini sağlayarak toksikan maruziyeti gibi koşullarda etkilenen süreçlerin ve moleküler yolakların sistem düzeyinde ortaya konmasına olanak tanır (Subramanian et al., 2005; Wang et al., 2009). Elde edilen keşifsel bulguların sonraki aşamalarda hedefli doğrulama yaklaşımları ile desteklenmesi, transkriptomik sonuçların biyolojik güvenilirliğini artırmak açısından yaygın olarak benimsenen bir stratejidir (Love et al., 2014; Robinson et al., 2010).

Bu bağlamda RNA-Seq temelli transkriptomik analizler, nitrofen maruziyeti gibi çevresel toksikanların hücresel düzeyde tetiklediği gen ekspresyon değişimlerini bütüncül olarak ortaya koymak açısından kritik öneme sahiptir (Mahood et al., 2016). Nitrofenle ilişkili gelişimsel bozukluklarda alveolar gelişim, hücre döngüsü regülasyonu ve vasküler yolaklarda meydana gelen transkriptomik değişimlerin rapor edilmiş olması, bu yaklaşımın toksisite mekanizmalarının çözülmesinde güçlü bir araç olduğunu göstermektedir (Mahood et al., 2016; Montedonico et al., 2006). Ayrıca oksidatif stres yanıtları ve retinoid sinyalizasyonu gibi süreçlerin RNA-Seq verileri üzerinden eş zamanlı değerlendirilmesi, nitrofenin çok katmanlı patofizyolojisinin moleküler düzeyde aydınlatılmasına olanak tanımaktadır (Hirako et al., 2017; Montedonico et al., 2006). Bu nedenle, insan hava yolu epitelini temsil eden BEAS-2B hücre hattında gerçekleştirilen RNA-Seq analizleri, nitrofen maruziyetine bağlı hücresel yanıtların tanımlanması ve hedef yolakların belirlenmesi açısından tamamlayıcı ve translasyonel değeri yüksek bir yaklaşım sunmaktadır (Hirako et al., 2017; Mahood et al., 2016).

2.4 RT-qPCR ve Western Blot Doğrulama Yaklaşımı

RNA-Seq tabanlı transkriptomik analizler hücresel yanıtların kapsamlı biçimde ortaya konmasını sağlasa da, elde edilen keşifsel bulguların hedefli yöntemlerle doğrulanması biyolojik güvenilirlik açısından kritik öneme sahiptir (Conesa et al., 2016). Bu amaçla, seçilen genlerin mRNA düzeyindeki değişimlerinin kantitatif olarak değerlendirilmesinde gerçek zamanlı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) yaygın olarak kullanılmaktadır (Bustin et al., 2009). RT-qPCR, yüksek duyarlılığı ve geniş dinamik aralığı sayesinde düşük bolluktaki transkriptlerin güvenilir şekilde

nicelenmesine olanak tanır ve RNA-Seq verilerinin bağımsız bir yöntemle teyit edilmesini sağlar (Bustin et al., 2009).

Bununla birlikte, mRNA düzeyindeki değişimlerin her zaman protein ekspresyonuna birebir yansımaya bileceği bilinmektedir; post-transkripsiyonel ve translasyonel düzenleyici mekanizmalar protein bolluğunu önemli ölçüde etkileyebilmektedir (Vogel & Marcotte, 2012). Bu nedenle, transkriptomik ve RT-qPCR sonuçlarının protein düzeyinde doğrulanması amacıyla Western blot analizi sıklıkla tercih edilmektedir (Vogel & Marcotte, 2012). Western blot, spesifik antikorlar aracılığıyla hedef proteinlerin tespit edilmesine ve göreceli ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasına imkân sağlayarak hücresel yanıtların fonksiyonel çıktılarının değerlendirilmesine katkıda bulunur (Mahmood & Yang, 2012).

RNA-Seq, RT-qPCR ve Western blot yöntemlerinin birlikte kullanılması, aynı biyolojik olayın transkripsiyonel ve translasyonel düzeylerde eş zamanlı olarak incelenmesini mümkün kılarak çok katmanlı bir doğrulama stratejisi sunmaktadır (Conesa et al., 2016; Mahmood & Yang, 2012). Bu bütüncül yaklaşım, diferansiyel gen ekspresyonu analizlerinden elde edilen aday hedeflerin biyolojik anlamlılığını güçlendirmekte ve toksikan maruziyeti gibi koşullarda ortaya çıkan moleküler değişimlerin daha sağlam biçimde yorumlanmasına olanak tanımaktadır (Bustin et al., 2009; Mahmood & Yang, 2012).

Bu bağlamda, RNA-Seq ile tanımlanan diferansiyel olarak ifade edilen genlerin RT-qPCR ile doğrulanması ve seçilen hedeflerin protein düzeyinde Western blot analizi ile değerlendirilmesi, nitrofen maruziyetine bağlı hücresel yanıtların güvenilir şekilde karakterize edilmesini amaçlayan tamamlayıcı bir strateji olarak benimsenmiştir (Bustin et al., 2009; Conesa et al., 2016; Mahmood & Yang, 2012; Vogel & Marcotte, 2012).

2.5 Çalışmanın Amacı ve Hipotezi

Amaç

Bu çalışmanın amacı, çevresel bir toksikan olan nitrofenin insan bronşiyal epitel hücre hattı BEAS-2B üzerindeki moleküler etkilerini transkriptomik düzeyde değerlendirmek ve diferansiyel olarak ifade edilen seçili gen ve proteinleri RT-qPCR ve Western blot yöntemleri ile doğrulamaktır. Bu kapsamda, nitrofen maruziyetine bağlı olarak hücresel stres, gelişimsel düzenleme ve inflamatuvar yanıtlarla ilişkili yollarda meydana gelen değişimlerin ortaya konması hedeflenmiştir.

Hipotez

Nitrofen maruziyetinin BEAS-2B hücrelerinde gen ekspresyon profillerini anlamlı şekilde değiştirdiği ve bu değişimlerin gelişimsel sinyal yolları, oksidatif stres yanıtları ve inflamatuvar süreçlerle ilişkili moleküler mekanizmaları yansıttığı hipotez edilmektedir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Hücre Hattı ve Kültür Koşulları

Çalışmada insan bronşiyal epitel hücre hattı BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™) kullanıldı. –80°C’de saklanan hücreler hızlıca çözündürülerek Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM, Gibco) içerisinde süspanse edildi ve %10 fetal bovin serum (FBS, Capricorn) ile %1 penisilin/streptomisin (Gibco) içeren taze kültür ortamına alındı. Hücreler, 25 cm² kültür flasklarında (Greiner CELLSTAR®) %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatörde (ESCO, CCL-170B-8) 37°C’de kültüre edildi.

Hücre morfolojisi ve konfluans durumu JuLI™ Br hücre görüntüleme sistemi (NanoEntek) kullanılarak düzenli olarak takip edildi. Hücreler yaklaşık %80–85 konfluansa ulaştığında tripsinizasyon ile pasajlandı. Pasajlama sırasında hücreler 1X PBS (ECO→TECH NutriCulture) ile yıkandıktan sonra 1X Tripsin-EDTA solüsyonu (Gibco) kullanılarak ayrıştırıldı ve taze besiyeri ile yeniden süspanse edilerek deneysel uygulamalarda kullanıldı. Deneylerde pasaj 20–30 aralığındaki hücreler tercih edildi.

3.2 Nitrofen Uygulaması ve Doz Belirleme (MTT Analizi)

Hücreler deneysel uygulamalar öncesinde JuLI™ Br hücre görüntüleme sistemi (NanoEntek) kullanılarak konfluans açısından kontrol edildi ve pasajlama sonrası Trypan Blue boyası ile Thoma lamında sayıldı. Hücre sayımı JuLI™ Br cihazı ile gerçekleştirildi. Hücreler, kuyu başına 1×10⁴ hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekildi ve %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatörde (ESCO, CCL-170B-8) 37°C’de 24 saat inkübe edildi.

Nitrofen (MW: 284,092 g/mol) dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek stok çözelti hazırlandı ve son DMSO konsantrasyonu %1 olacak şekilde ayarlandı. Hücrelere uygulanacak nitrofen konsantrasyonları 1600–3,12 µM aralığında seri sulandırma yöntemiyle hazırlandı. Kontrol grupları için yalnızca DMEM ve %1 DMSO içeren DMEM kullanıldı.

24 saatlik ilaç maruziyetinin ardından hücre canlılığı MTT testi ile değerlendirildi. Bu amaçla hücrelere MTT reaktifi eklendi ve plaklar 37°C’de %5 CO₂ ortamında 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında ortam uzaklaştırıldı ve oluşan formazan kristalleri DMSO ile çözüldü. Absorbans değerleri 570 nm ve referans olarak 630 nm dalga boylarında mikropilaka okuyucuda ölçüldü (Biotek Epoch Mikropilaka Spektrofotometre).

Doz optimizasyonu amacıyla deney ikinci kez 1000–100 µM aralığında tekrarlandı ve elde edilen canlılık verileri doğrultusunda çalışma konsantrasyonu olarak 800 µM nitrofen seçildi.

Belirlenen doz doğrultusunda ana deneyler için hücreler yeniden kültüre edildi ve 25 cm² kültür flasklarına (Greiner CELLSTAR®) ekildi. Hücreler yaklaşık %40–50 konfluansa ulaştığında kontrol

gruplarına %1 DMSO içeren DMEM, deney gruplarına ise 800 µM nitrofen içeren DMEM uygulandı. Tüm gruplar 37°C ve %5 CO₂ koşullarında 24 saat inkübe edildi.

3.3 Apoptoz Analizi

Kontrol ve nitrofen ile muamele edilmiş BEAS-2B hücrelerinde apoptoz düzeyleri Annexin V-FITC/PI çift boyama yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Analizler, üretici firmanın protokolüne uygun olarak Elabscience Annexin V-FITC/PI Apoptosis Kiti (E-CK-A211) ile gerçekleştirildi.

24 saatlik ilaç uygulamasının ardından hücreler tripsinizasyon ile toplandı, PBS ile yıkandı ve santrifüj sonrası elde edilen hücre pelletleri Annexin V bağlama tamponu içerisinde yeniden süspanse edildi. Hücre süspanسیونlarına Annexin V-FITC ve propidyum iyot (PI) eklendi, örnekler oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edildi. Boyama sonrası hücre örnekleri BD Accuri™ C6 Plus akış sitometresi kullanılarak analiz edildi.

Her grup için maksimum 20.000 olay kaydedildi ve hücre kalıntıları ileri saçılım (FSC) ve yan saçılım (SSC) parametrelerine göre analiz dışı bırakıldı. FITC ve PI floroforları 488 nm lazer ile uyarıldı; FITC sinyali FL1 kanalında (533/30 nm), PI sinyali ise FL2 kanalında (585/40 nm) tespit edildi. Elde edilen veriler BD Accuri™ C6 Plus yazılımı kullanılarak analiz edildi.

3.4 Hücre Döngüsü Analizi

Hücre döngüsü dağılımı, propidyum iyot (PI) boyaması sonrasında akış sitometrisi ile değerlendirildi. Hücreler %70 soğuk etanol ile fikse edildi ve -20°C'de inkübe edildi. Fiksasyon sonrasında RNase A ile muamele edilen hücrelere PI eklenerek DNA içeriği boyandı.

Boyanmış hücre örnekleri BD Accuri™ C6 Plus akış sitometresi kullanılarak analiz edildi. Grup başına maksimum 20.000 olay kaydedildi ve hücre kalıntıları FSC/SSC parametrelerine göre analiz dışı bırakıldı. PI floresansı 488 nm lazer ile uyarılarak FL2 kanalında (585/40 nm) ölçüldü. Hücre döngüsü faz dağılımları BD Accuri™ C6 Plus yazılımı kullanılarak hesaplandı.

3.5 RNA İzolasyonu ve RNA-Seq Hazırlığı

Nitrofen maruziyetinin ardından kontrol ve deney gruplarındaki BEAS-2B hücreleri toplandı ve hücre pelletleri elde edildi. Her bir hücre pelletinden toplam RNA, RNA izolasyon kiti (ECO→TECH EcoPure Total RNA Kit) kullanılarak üretici firma protokolüne uygun şekilde izole edildi.

Elde edilen toplam RNA miktarı spektrofotometrik yöntemle (Denovix DS-11 FX+ Spectrophotometer/Fluorometer) ölçüldü. RNA bütünlüğü ve olası genomik DNA kontaminasyonu %1,2 agaroz jel elektroforezi (BIORAD) ile değerlendirildi. Kalite kontrol aşamalarından geçen RNA örneklerinin bir kısmı, transkriptomik analiz amacıyla RNA-Seq hizmet alımı kapsamında dış hizmet sağlayıcı firmaya (SUGENOMIC) gönderildi.

RNA örneklerinin kalan kısmı tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi için kullanıldı. Bunun için 1 µg toplam RNA'dan, cDNA sentez kiti (abm OneScript® Plus cDNA Sentez Kiti) kullanılarak üretici protokolüne uygun şekilde cDNA elde edildi. Elde edilen cDNA örnekleri RT-qPCR analizlerinde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.6 RNA-Seq Dizileme ve Biyoinformatik Analiz

Kalite kontrol aşamalarından geçen toplam RNA örneklerinin bir kısmı RNA-Seq analizi için hizmet alımı kapsamında dış hizmet sağlayıcı firmaya gönderildi. Örneklerin dizileme öncesi uygunluğu Agilent 5400 sistemi ile değerlendirildi ve tüm örneklerin "Uygun" kriterini sağladığı belirlendi. BEAS-2B örneklerinde RNA bütünlüğünün RIN değerlerinin 7,8–9,6 aralığında olduğu raporlandı (ortalama 8,93) ve bu değerlerin kütüphane hazırlığı ile dizileme için yeterli kaliteyi gösterdiği saptandı.

Dizileme işlemleri Illumina NovaSeq platformunda gerçekleştirildi ve ham okuma (raw reads) verileri FASTQ formatında elde edildi. Ham veriler, adaptör kontaminasyonu ve düşük kaliteli okumaların uzaklaştırılması amacıyla filtrelendi; böylece analiz için temiz okuma verileri oluşturuldu. Kontrol ve nitrofen gruplarında temiz okuma sayılarının örnek başına yaklaşık 42,8–51,8 milyon aralığında olduğu ve ortalama 46,8 milyon temiz okuma elde edildiği belirlendi. Filtreleme sonrası etkin veri oranının %94,90–95,72 aralığında olduğu, dizileme hata oranının tüm örneklerde 0,01 olarak bildirildiği görüldü. Baz kalite metriklerinin yüksek olduğu, Q20 değerlerinin %98,32–98,62 ve Q30 değerlerinin %95,51–96,14 aralığında bulunduğu saptandı. GC içeriğinin örnekler arasında tutarlı olduğu ve %50,22–50,74 aralığında değiştiği belirlendi. Bu metrikler, dizileme verisinin yüksek doğrulukta ve sonraki analizler için uygun kaliteye sahip olduğunu gösterdi.

Temizlenmiş dizileme verileri üzerinden diferansiyel gen ekspresyon analizi hizmet sağlayıcı firma tarafından gerçekleştirildi. Diferansiyel olarak ifade edilen genlerin biyolojik anlamlandırılması amacıyla fonksiyonel zenginleştirme analizleri yürütüldü; bu kapsamda GO (Gene Ontology), GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) ve yolak (pathway) analizleri uygulandı. Ayrıca örnekler arası gen ekspresyon örüntülerinin görselleştirilmesi amacıyla diferansiyel genlere dayalı ısı haritaları (heatmap) oluşturuldu. Bu analizler sonucunda elde edilen diferansiyel gen ekspresyon profilleri, sonraki aşamalarda RT-qPCR ve Western blot yöntemleri ile doğrulandı.

3.7 Seçilen Genlerin RT-qPCR ile Doğrulanması

RNA-Seq analizleri sonucunda belirlenen aday genlerin (GDF15, KLF15, ATP8, CYP2R1 ve PKIB) ekspresyon düzeyleri kantitatif gerçek zamanlı PCR (RT-qPCR) ile doğrulandı. Primer dizaynları hizmet sağlayıcı firma (SUGENOMIC) tarafından gerçekleştirildi ve kullanılan primer dizileri Tablo 1'de sunuldu.

RT-qPCR analizleri StepOnePlus™ Real-Time PCR Sisteminde (Applied Biosystems) ve StepOne™ Plus v2.3 yazılımı kullanılarak yürütüldü. Her reaksiyon için 100 ng cDNA, 10 µL 2X qPCR

Master Mix (abm BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix), 200 nM ileri ve geri primer ile toplam hacim 20 µL olacak şekilde nükleaz içermeyen ddH₂O (Millipore) kullanıldı.

Amplifikasyon protokolü, başlangıçta 95°C'de 10 dakika denatürasyon basamağını takiben 40 döngü boyunca 95°C'de 10 saniye ve gen-spesifik optimize edilmiş bağlanma sıcaklıklarında (GDF15: 54°C, KLF15: 56°C, ATP8: 56°C, CYP2R1: 55°C, PKIB: 55°C) 30 saniye olacak şekilde uygulandı.

Her reaksiyon için eşik döngü (Ct) değerleri StepOne™ Plus v2.3 yazılımı ile elde edildi. Hedef genlerin relatif ekspresyon düzeyleri internal kontrol olarak β-aktin geni kullanılarak hesaplandı ve gruplar arası karşılaştırmalar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi (Livak metodu) ile gerçekleştirildi (Livak & Schmittgen, 2001). Her grup için teknik üçlü tekrarlar yapıldı ve deneyler üç bağımsız biyolojik tekrar halinde yürütüldü. RT-qPCR analizinde kullanılan primer dizileri Tablo 1'de sunuldu.

Tablo 1. RT-qPCR primer dizileri

Gen	İleri primer (5' - 3')	Geri primer (5' - 3')
p53	CAGCACATGACGGAGGTTGT	TCATCCAAATACTCCACACGC
GDF15	GTTAGCCAAAGACTGCCACTG	CCTTGAGCCCATTCCACA
KLF15	TGGTGGATCACTTGCTTTCTAC	TGGGATAGAAGGTAGTCTAGGA
ATP8	TACCACCTACCTCCCTCACC	AGGATTGTGGGGGCAATGAAT
CYP2R1	GAAAGCAGAGCCAGGTGTACG	TCATGAATAAAGGAAGGCATGG
PKIB	GGCACATACTAGAAGCAAAATACG	GATGGGCAAATCATTCTTGGA
ACTB	CACCATTGGCAATGAGCGG TTC	AGGTCTTTCGGATGTCCACGT

3.8 Protein İzolasyonu ve Western Blot Analizi

Nitrofen maruziyetinin ardından kontrol ve deney gruplarına ait BEAS-2B hücreleri toplanarak hücre pelletleri elde edildi. Protein izolasyonu, RNA izolasyonu ile eş zamanlı olarak aynı kültür flasklarından gerçekleştirildi. Hücreler öncelikle soğuk PBS ile yıkandı, santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı ve pelletler yeni eppendorf tüplerine aktarıldı. Her bir pellet üzerine %1 proteaz ve fosfataz inhibitörü (Thermo Fisher) içeren RIPA tamponu (1X RIPA: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, %1

NP-40, %0,5 sodyum deoksikolat, 1 mM EDTA ve %0,1 SDS; pH 7,4) ilave edilerek protein lizati hazırlandı.

Hücre lizis işlemi, ultrasonik homojenizatör (BANDELIN SONOPULS) kullanılarak 4 × 15 saniyelik darbeler şeklinde gerçekleştirildi. Elde edilen protein süspansiyonları küçük hacimlerde alikotlandıktan sonra -80 °C’de saklandı.

Western blot analizleri öncesinde protein konsantrasyonları BCA yöntemi (ABP Biosciences) kullanılarak üretici protokolüne uygun şekilde belirlendi. Ölçülen protein örnekleri 2X Laemmli tamponu (0,125 M Trizma baz, %4 SDS, %20 gliserol, %10 β-merkaptoetanol ve %0,02 bromofenol mavisi) ile karıştırıldı ve 95 °C’de 5 dakika denatüre edildi. Ardından örnekler SDS-PAGE jel sistemine (MiniPROTEAN Tetra Cell) yüklendi ve yürütme tamponu (%3,03 Trizma baz, %14,44 glisin ve %1 SDS) içerisinde 110 V’de 90 dakika elektroforez gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan SDS-PAGE jel içeriklerine Tablo 2 ve Tablo 3’te yer verildi.

Tablo 2. SDS-PAGE ayırıcı jel içeriği

Ayırıcı jel (%10)	
Kimyasal (içerik)	µL (mikrolitre)
1.5 Tris HCl pH 8.8	1250
ddH ₂ O	2000
30% akrilamid/bis akrilamid (37.5:1)	1670
20 % SDS	25
10% APS	25
TEMED	2,5

Tablo 3. SDS-PAGE istifleme jeli içeriği

İstifleme jeli (% 5)	
Kimyasal (içerik)	µL (mikrolitre)
1M Tris HCl pH 6.8	375
ddH ₂ O	2088
30% akrilamid/bis akrilamid (37.5:1)	506
20 % SDS	15
10% APS	15
TEMED	1.5

Elektroforez sonrası proteinler, yarı-kuru transfer tamponu (%0,58 Trizma baz, %0,29 glisin, %0,037 SDS ve %20 metanol) kullanılarak Western blot transfer sistemi (Thermo Scientific™ Pierce™ Power Blotter) ile 25 V ve 1,3 A akım altında 10 dakika boyunca PVDF membrana aktarıldı.

Transfer işlemini takiben membranlar, 1X TBS-T içerisinde hazırlanmış %5 yağsız süt tozu çözeltisi ile oda sıcaklığında 2 saat bloke edildi. Bloklama sonrasında membranlar, hedef proteinlere özgü birincil antikorlarla (%5 süt tozu içeren 1X TBS-T'de 1/1000 dilüsyon) +4°C'de gece boyunca 44 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. Inkübasyonun ardından membranlar 1X TBS-T ile 20'şer dakika olmak üzere üç kez yıkandı.

Sonrasında membranlar, HRP ile konjuge edilmiş ikincil antikorlarla (%5 süt tozu içeren 1X TBS-T'de 1/10000 dilüsyon) oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Tekrar üç kez 1X TBS-T ile yıkama yapıldıktan sonra hedef proteinler ECL (Enhanced Chemiluminescence; Elabscience) substratı kullanılarak görüntülendi (G:BOX Chemi XRQ, Syngene). Bant yoğunlukları GeneTools yazılımı (Syngene) ile analiz edildi.

İnternal kontrol olarak β -aktin proteini kullanıldı. Protein ekspresyonlarının göreceli değerlendirilmesi için her örnekten elde edilen hedef protein/ β -aktin bant yoğunluğu oranları hesaplandı, kontrol grubunun ortalaması referans değer olarak alındı ve deney gruplarına ait yoğunluklar bu değere normalize edilerek göreceli ekspresyon düzeyleri belirlendi. Bu analiz her hedef protein için üç bağımsız deney tekrarı şeklinde gerçekleştirildi. Western blot uygulamalarındaki birincil ve ikincil antikorlara ilişkin bilgiler Tablo 4'te sunuldu.

Tablo 4. Western blot uygulamalarındaki antikor bilgileri

Antikor	Şirket	Katalog Numarası
Anti-p53	Elabscience	E-AB-32469
Anti-CYP2R1	Affinity	Ab-DF3580
Anti- β -aktin	Elabscience	E-AB-40338

Bu analiz, RNA-Seq ve RT-qPCR sonuçları doğrultusunda seçilen hedef proteinlerin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi ve nitrofen maruziyetine bağlı protein düzeyindeki değişimlerin doğrulanması amacıyla gerçekleştirildi.

3.9 İstatistiksel Analiz

Her deneysel uygulama için, aynı hücre hattına ait kontrol grubu ile nitrofen uygulanmış grup arasında elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı. Aynı hücre hattına ait bu iki uygulama grubu arasındaki deneysel farklılık düzeyi Student's t-testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Elde edilen $p < 0,05$ değeri, iki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterdi. $p < 0,05$ 'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı farklılık olarak kabul edilirken, $p \geq 0,05$ değerleri farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gösterdi. Kontrol grubu ile yapılan kıyaslamalarda anlamlı farkı göstermek amacıyla grafiklerde “*” simgesi kullanıldı. İstatistiksel analizlerde her bir deneysel grubun üçlü biyolojik tekrar sonuçları değerlendirildi.



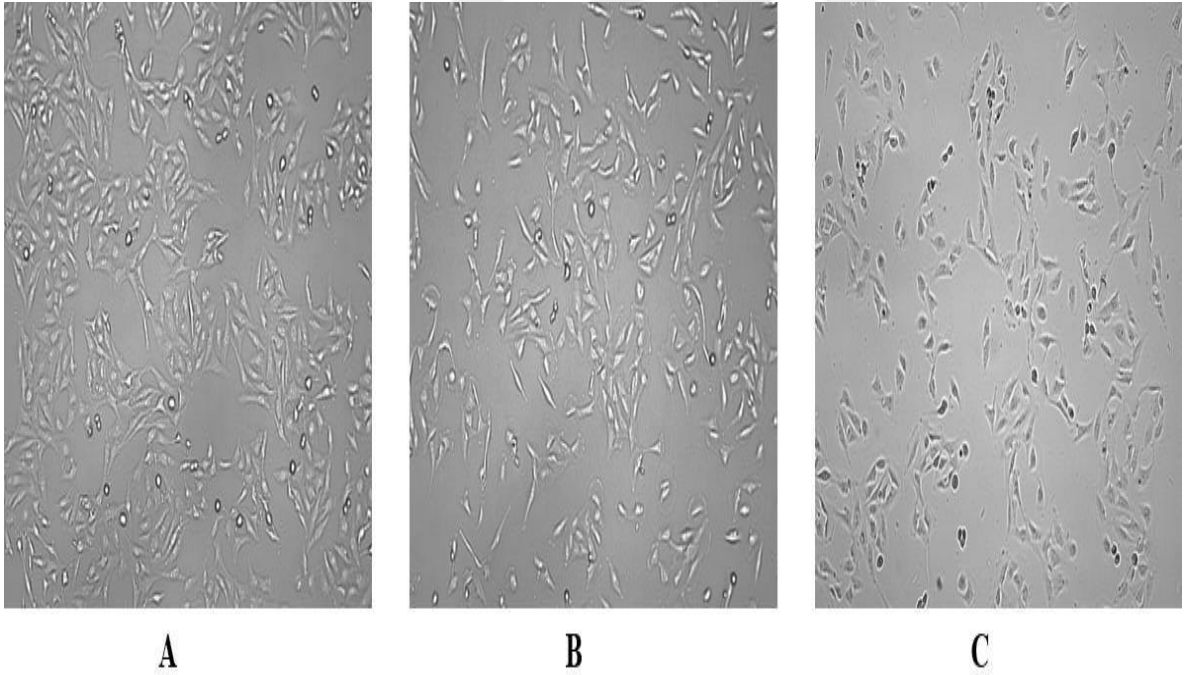
4. BULGULAR

4.1 Hücrelerin Morfolojik Analizi

Nitrofen uygulamasının BEAS-2B hücre morfolojisi üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla hücreler %40–50 konfluens düzeyine ulaştıktan sonra kontrol ve nitrofen (800 μ M) gruplarına ayrıldı ve 37 °C’de, %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat süreyle inkübe edildi. Hücre morfolojisi JuLI™ Br hücre görüntüleme cihazı kullanılarak 1× büyütmede gözlemlendi.

24 saatlik inkübasyon sonunda kontrol grubunda hücre yoğunluğunun yaklaşık %60–70 konfluens düzeyine ulaştığı gözlenirken, nitrofen uygulanan grupta bu değerin %50–60 aralığında kaldığı belirlendi. Kontrol grubunda hücrelerin tipik epitel benzeri morfolojiyi koruduğu, yüzeye tutunmuş ve yayılmış şekilde düzenli bir yapı sergilediği saptandı (Şekil 5.1A).

Buna karşılık nitrofen uygulanan grupta hücre yoğunluğunda azalma görüldü; hücrelerin kısmen yuvarlaklaştığı ve bazı hücrelerin yüzeyden ayrılma eğilimi gösterdiği belirlendi. Ayrıca hücreler arası boşlukların arttığı ve hücresel bütünlüğün kısmen bozulduğu gözlemlendi (Şekil 5.1B).



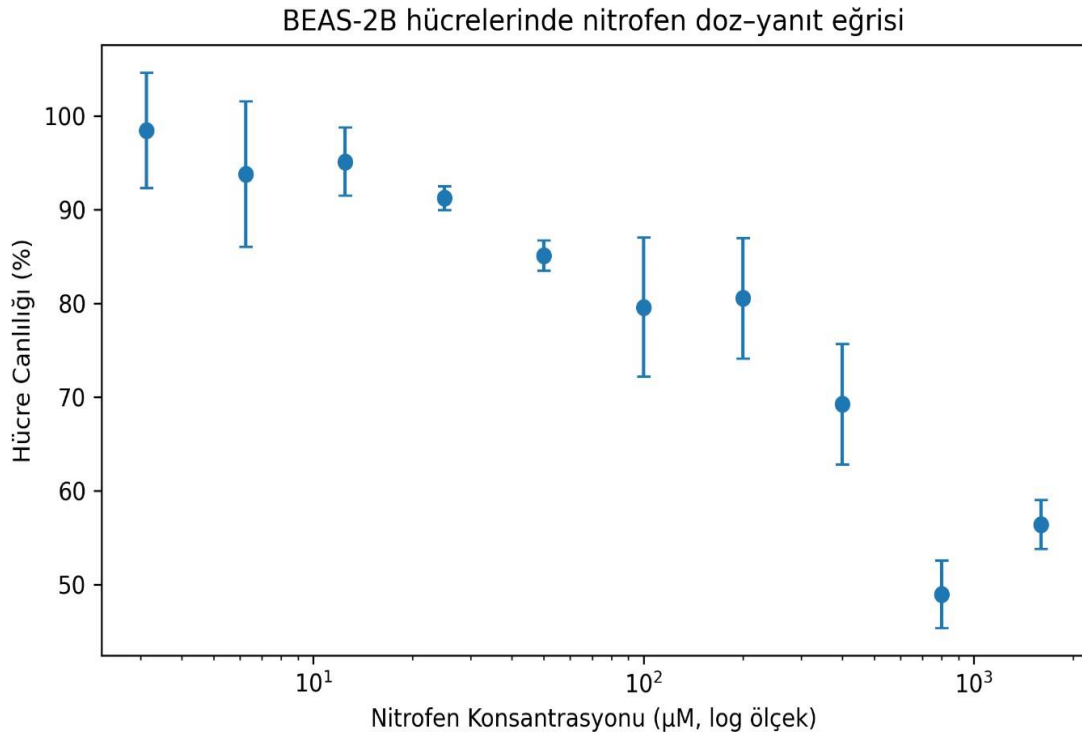
(A) 24 saat inkübasyon sonrası kontrol grubu. (B) 24 saat inkübasyon sonrası nitrofen (800 μ M) uygulanan grup. (C) İlaç uygulaması öncesi % 40–50 konfluens düzeyini temsil eden görüntü.

Şekil 5. Nitrofen sonrası morfolojik değişiklikler

4.2 Nitrofenin BEAS-2B Hücrelerinde IC50 Değerinin Belirlenmesi

BEAS-2B hücrelerinde nitrofenin hücre canlılığı üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda ilaç uygulaması yapıldı ve hücre canlılığı yüzdesi ölçüldü. Elde edilen değerler kontrol grubuna göre normalize edilerek doz–yanıt grafiği oluşturuldu.

Üç tekrar üzerinden hesaplanan IC50 değerlerinin ortalamasının yaklaşık 800 μ M olduğu belirlendi. Sonraki tüm hücre deneylerinde nitrofen dozu bu ortalama IC50 değeri esas alınarak seçildi (Şekil 6). Nitrofen konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığında doza bağlı azalma gözlemlendi.



Şekil 6. Nitrofen dozuna bağlı canlılık etkisi

4.3 RNA-Seq Analizi

4.3.1 RNA Kalite Kontrol Sonuçları

RNA-Seq analizi öncesinde çalışmada kullanılan RNA örneklerinin kalite kontrol değerlendirmesi gerçekleştirildi. Bu kapsamda örneklerin RNA konsantrasyonu, toplam RNA miktarı ve RNA bütünlüğü incelendi; elde edilen sonuçlar Tablo 5’te gösterildi.

Kontrol 1, Kontrol 2, Nitrofen 1 ve Nitrofen 2 örneklerine ait RNA konsantrasyonlarının 70,0–163,0 ng/ μ l aralığında değiştiği belirlendi. Toplam RNA miktarının ise örnekler arasında 1,05–2,45 μ g arasında olduğu saptandı.

RNA bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla hesaplanan RNA Integrity Number (RIN) değerleri incelendiğinde, örneklerin RIN değerlerinin 7,8 ile 9,6 arasında değiştiği görüldü. Kontrol 1, Kontrol 2 ve Nitrofen 1 örneklerinde RIN değerlerinin 9'un üzerinde olduğu belirlenirken, Nitrofen 2 örneğinde RIN değerinin 7,8 olduğu ölçüldü.

Kalite kontrol raporuna göre analiz edilen RNA örneklerinin tamamı sekanslama için uygun bulundu ve "Uygun" olarak raporlandı.

Tablo 5. RNA örneklerinin kalite kontrol sonuçları

Örnek Adı	Örnek ID	Kütüphane Türü	Konsantrasyon (ng/μl)	Hacim (μl)	RNA Miktarı (μg)	RIN	Sonuç
Kontrol 1	FZTR24035 1365-1B	Ökaryot mRNA	102.000	15.00	1.53000	9.10	Uygun
Kontrol 2	FZTR24035 1366-1B	Ökaryot mRNA	163.000	15.00	2.44500	9.20	Uygun
Nitrofen 1	FZTR24035 1367-1B	Ökaryot mRNA	70.000	15.00	1.05000	9.60	Uygun
Nitrofen 2	FZTR24035 1368-1B	Ökaryot mRNA	96.000	15.00	1.44000	7.80	Uygun

4.3.2 Sekans Veri Kalite Kontrol Sonuçları

Sekanslama işlemi sonrasında elde edilen ham veriler kalite kontrol (QC) aşamasından geçirildi ve adaptör dizileri, kontaminasyon içeren okumalar ile düşük kaliteli okumalar filtrelendi. Filtreleme sonrası elde edilen temiz okuma verilerine ait istatistiksel sonuçlar değerlendirildi ve sonuçlar Tablo 6'da sunuldu.

Örneklerde elde edilen ham okuma sayısının yaklaşık 44,8 milyon ile 54,6 milyon arasında değiştiği belirlendi. Filtreleme işlemi sonrasında elde edilen temiz okuma sayısının ise 42,8 milyon ile 51,8 milyon aralığında olduğu saptandı.

Filtreleme sonrası verinin etkinliğini gösteren etkin oran değerlerinin örnekler arasında %94,90 ile %95,72 arasında hesaplandığı belirlendi. Baz kalite skorları incelendiğinde Q20 oranlarının %98,32–98,62 aralığında, Q30 oranlarının ise %95,51–96,14 aralığında olduğu görüldü. Sekanslama hata oranının tüm örneklerde yaklaşık %0,01 düzeyinde olduğu saptandı.

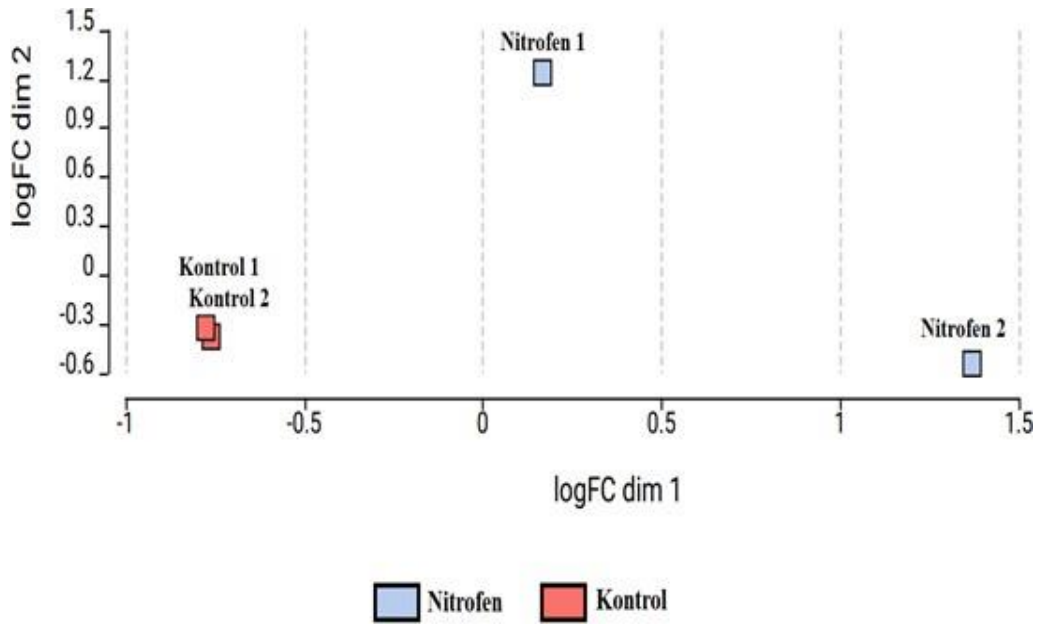
GC içeriği incelendiğinde örnekler arasında %50,22 ile %50,74 arasında değişen değerler elde edildi. Temiz baz miktarının ise 6,42 Gb ile 7,78 Gb arasında olduğu belirlendi.

Tablo 6. RNA-Seq temiz okuma ve kalite parametreleri

Örnek Adı	Temiz Okuma Sayısı	Q20 (%)	Q30 (%)	GC İçeriği (%)
Kontrol 1	42,805,750	98.62	96.14	50.22
Kontrol 2	45,094,918	98.33	95.68	50.74
Nitrofen 1	47,305,802	98.39	95.70	50.40
Nitrofen 2	51,834,030	98.32	95.51	50.39

4.3.3 Örnekler Arası Gen Ekspresyon Benzerliğinin Çok Boyutlu Ölçekleme (MDS) Analizi

Örnekler arasındaki gen ekspresyon profili benzerliğini değerlendirmek amacıyla çok boyutlu ölçekleme (Multidimensional Scaling, MDS) analizi gerçekleştirildi. MDS analizi sonuçları Şekil 7’de sunuldu. Analiz sonucunda kontrol grubuna ait örneklerin (Kontrol 1 ve Kontrol 2) birbirine yakın konumda yer aldığı, nitrofen uygulanan örneklerin (Nitrofen 1 ve Nitrofen 2) ise kontrol örneklerinden farklı bir bölgede konumlandığı belirlendi. Elde edilen dağılımın, kontrol ve uygulama gruplarına ait örneklerin gen ekspresyon profilleri bakımından ayrıldığını gösterdiği saptandı.



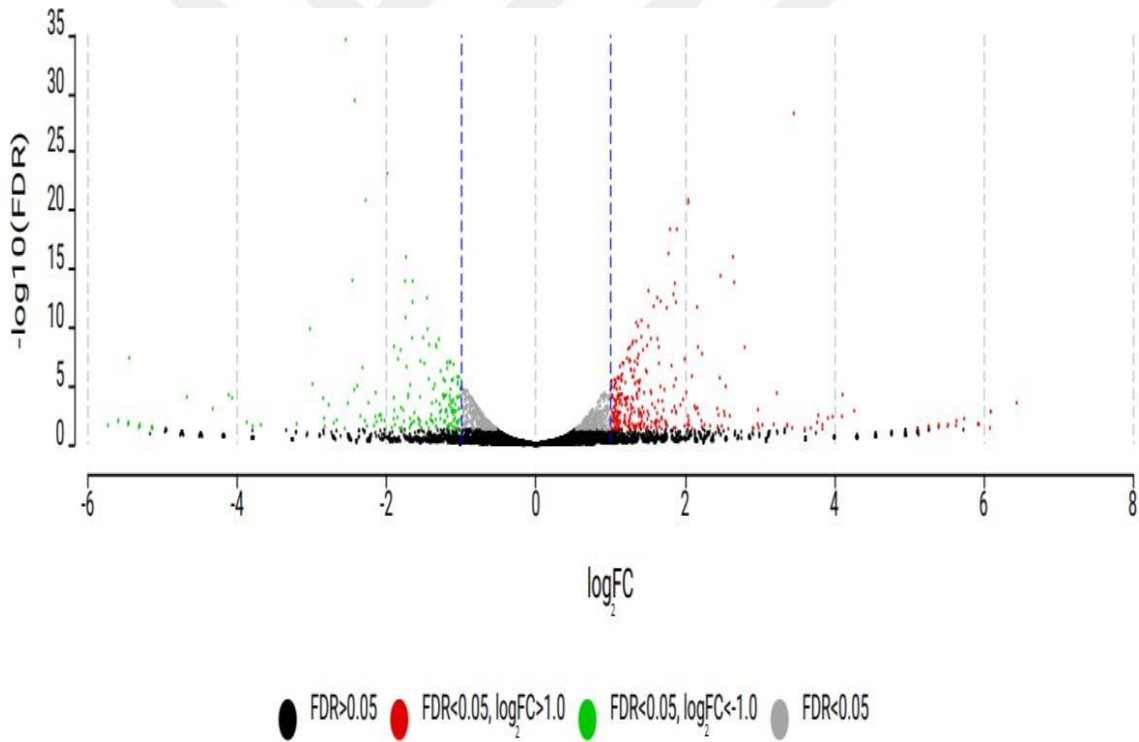
Şekil 7. Kontrol ve nitrofen uygulanan örneklerin MDS analizi

4.4 Diferansiyel Gen Ekspresyonu Analiz Sonuçları

4.4.1 Diferansiyel Eksprese Genlerin Belirlenmesi (Volcano Grafiği)

Nitrofen uygulaması ile kontrol grubu arasındaki diferansiyel gen ekspresyonunu belirlemek amacıyla RNA-Seq verileri üzerinde diferansiyel ekspresyon analizi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda $\log_2$ kat değişimi ($\log_2FC$) ve yanlış keşif oranı (FDR) eşik değerleri kullanılarak anlamlı derecede değişen genler belirlendi. Diferansiyel ekspresyon analizinde anlamlılık kriteri olarak $FDR < 0,05$ ve $|\log_2FC| > 1$ eşikleri kullanıldı.

Elde edilen sonuçlara göre toplam 502 genin anlamlı düzeyde diferansiyel eksprese olduğu belirlendi. Bu genlerin 320 tanesinin up-regüle, 182 tanesinin ise down-regüle olduğu tespit edildi. Volcano grafiğinde anlamlı derecede artan genler grafiğin sağ tarafında kırmızı noktalar ile, azalan genler ise sol tarafta yeşil noktalar ile gösterildi. Anlamlılık eşiklerini karşılamayan genler siyah ve gri noktalar ile temsil edildi. Sonuçlar Şekil 8’de sunuldu.



4.4.2 Diferansiyel Gen Ekspresyonu Özet Tablosu

Nitrofen uygulaması ile kontrol grubu arasındaki diferansiyel gen ekspresyonunu belirlemek amacıyla gerçekleştirilen RNA-Seq analizinde anlamlı düzeyde değişen genler belirlendi. Diferansiyel ekspresyon analizinde anlamlılık kriteri olarak $FDR < 0,05$ ve $|\log_2FC| > 1$ eşikleri kullanıldı. Analiz

sonucunda toplam 502 genin anlamlı düzeyde diferansiyel eksprese olduğu tespit edildi. Bu genlerin 320 tanesinin up-regüle, 182 tanesinin ise down-regüle olduğu belirlendi.

En yüksek düzeyde değişim gösteren genler incelendiğinde, ifadesi artan genler arasında LGI4, SNHG25, LOC107984965 ve BGN gibi genlerin öne çıktığı görüldü. İfadesi azalan genler arasında ise DEFB131B, CD34, PCDH18 ve LUARIS genlerinin yer aldığı belirlendi. İfade seviyesi en fazla artan ilk 30 gen ve en fazla azalan ilk 30 gen listesi Tablo 7’de sunuldu.

Tablo 7. En çok artan ve azalan 30 gen

	Genler	Kat Değişimi (FC)	FDR	logCPM	log ₂ FC	LR	P Değeri
Artan	LGI4	87.0956	0.00029	-0.47454	6.44453	21.64712	0
Artan	SNHG25	67.89043	0.03995	-0.72734	6.08514	9.73074	0.00181
Artan	LOC107984965	60.64765	0.01871	-0.84151	5.92238	11.67116	0.00063
Artan	BGN	53.44384	0.00667	-0.96537	5.73995	14.17578	0.00017
Artan	LINC02813	49.71524	0.0101	-1.03196	5.63562	13.19251	0.00028
Artan	GK-AS1	49.52186	0.02533	-1.03263	5.62999	10.91533	0.00095
Artan	SMIM2-AS1	46.03468	0.02029	-1.10166	5.52465	11.44594	0.00072
Artan	LOC105378515	45.81087	0.0287	-1.1025	5.51762	10.58562	0.00114
Artan	PKDREJ	42.26198	0.02533	-1.17531	5.40129	10.92098	0.00095
Artan	FXVD1	42.18942	0.0209	-1.17564	5.39881	11.37704	0.00074
Artan	PYY	42.0977	0.03313	-1.17598	5.39567	10.19087	0.00141
Artan	LOC105379251	42.0977	0.03313	-1.17598	5.39567	10.19087	0.00141
Artan	LOC105372145	38.45968	0.02984	-1.25311	5.26527	10.48477	0.0012
Artan	SDS	38.45968	0.02984	-1.25311	5.26527	10.48477	0.0012
Artan	LOC102723393	38.42664	0.03201	-1.25329	5.26403	10.29679	0.00133
Artan	LOC107985428	34.72899	0.04422	-1.33504	5.11807	9.47783	0.00208
Artan	LOC105372621	19.26015	0.00138	-0.25979	4.26755	17.99788	0.00002
Artan	MMP3	17.28336	0.00006	0.3194	4.11131	25.5835	0
Artan	LINC02755	17.17589	0.00407	-0.38457	4.10231	15.3441	0.00009
Artan	LOC107985284	15.73999	0.00441	-0.47335	3.97636	15.16799	0.0001
Artan	PNCK	14.33655	0.0217	-0.56956	3.84163	11.27426	0.00079
Artan	RNF44	14.3218	0.04764	-0.56988	3.84014	9.28338	0.00231
Artan	TMEM92-AS1	13.78975	0.00327	0.05872	3.78552	15.87128	0.00007
Artan	ABHD14A-ACY1	13.63485	0.0135	-0.61858	3.76923	12.46891	0.00041
Artan	ST6GALNAC3	12.86511	0.04094	-0.67152	3.68539	9.66845	0.00187
Artan	EVI2A	12.16638	0.0465	-0.72547	3.60483	9.35158	0.00223
Artan	CSTF3-DT	10.81776	0.03983	-0.83995	3.43533	9.74172	0.0018
Artan	NECTIN4	10.33339	0.02153	-0.25818	3.36924	11.29639	0.00078
Artan	ATP8	10.31129	0.02569	2.46862	3.36615	10.87968	0.00097
Artan	SPNS3	9.38013	0.00004	0.67157	3.22961	26.31574	0
Azalan	DEFB131B	-5.89771	0.0441	-0.08526	-2.56015	9.4887	0.00207

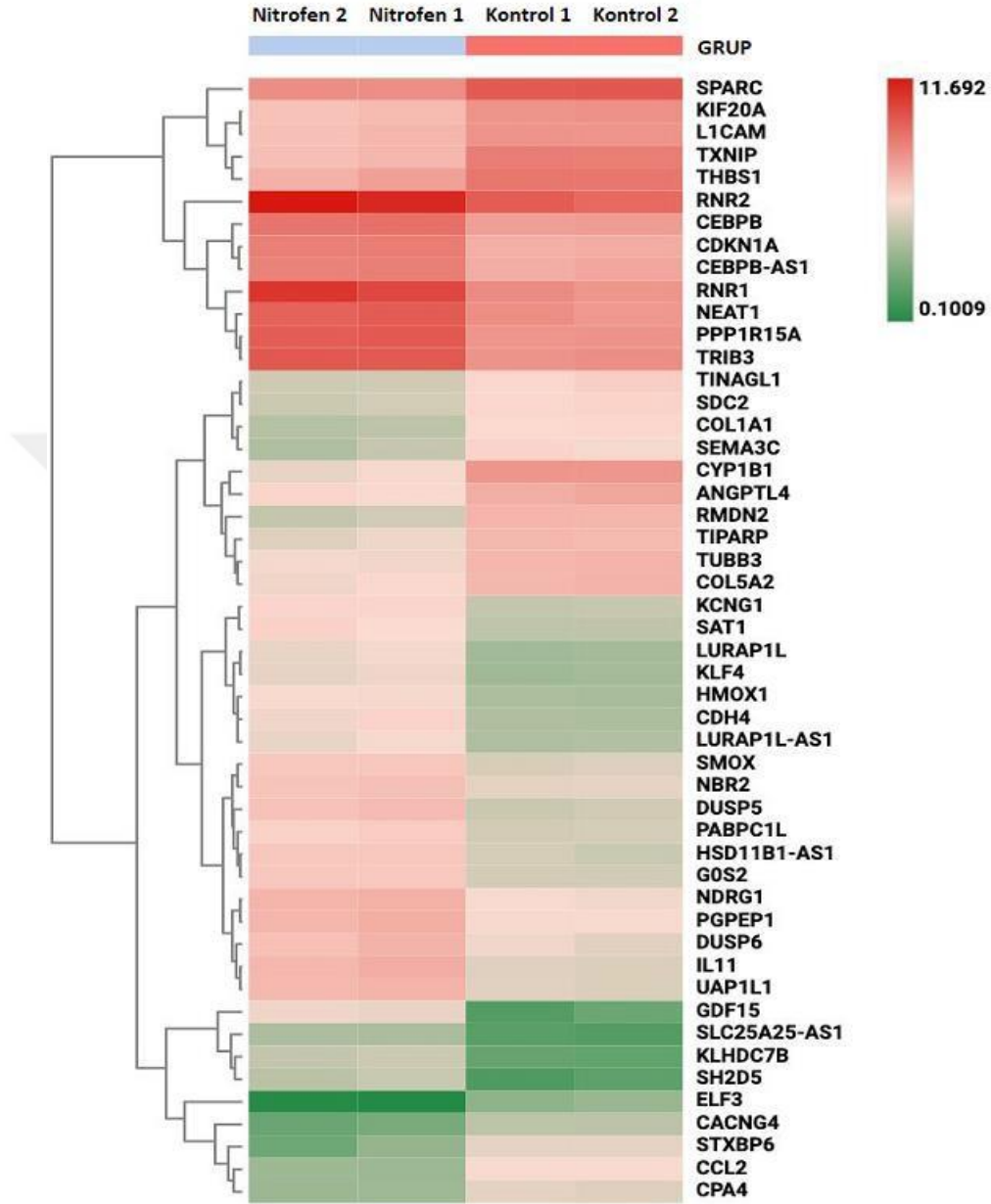
Azalan	CD34	-6.34823	0.00821	-0.01476	-2.66636	13.69055	0.00022
Azalan	PCDH18	-6.51986	0.0154	-0.23787	-2.70484	12.1485	0.00049
Azalan	LUARIS	-6.83912	0.00041	0.62286	-2.77381	20.8188	0.00001
Azalan	MYO7B	-7.09909	0.03098	-0.4557	-2.82763	10.37921	0.00127
Azalan	H2AC11	-7.13438	0.00593	0.32299	-2.83479	14.46213	0.00014
Azalan	ASB9	-7.94888	0.00001	0.9451	-2.99075	30.28745	0
Azalan	ELF3	-8.14049	0	2.04474	-3.02512	53.93953	0
Azalan	H2AC13	-9.20738	0.01789	-0.60227	-3.20279	11.78169	0.0006
Azalan	ZNF665	-12.84582	0.0217	-0.88795	-3.68323	11.27503	0.00079
Azalan	SULT2B1	-13.85262	0.02676	-0.82503	-3.79209	10.78138	0.00103
Azalan	PDK4	-14.64684	0.01314	-0.76716	-3.87252	12.54113	0.0004
Azalan	HOATZ	-16.77906	0.00011	0.02321	-4.06859	23.88139	0
Azalan	LINC01638	-17.31901	0.00006	0.05711	-4.11428	25.40685	0
Azalan	LOC105378924	-20.07825	0.00091	-0.45345	-4.32756	19.00691	0.00001
Azalan	USP34-DT	-35.14365	0.04587	-1.41455	-5.13519	9.39562	0.00218
Azalan	OSTM1-AS1	-35.25806	0.03456	-1.4142	-5.13988	10.0838	0.0015
Azalan	SHISAL1	-35.25806	0.03456	-1.4142	-5.13988	10.0838	0.0015
Azalan	STYXL2	-35.41961	0.03528	-1.4135	-5.14648	10.03316	0.00154
Azalan	ALPP	-39.49632	0.02531	-1.32638	-5.30365	10.92584	0.00095
Azalan	CRIP1	-39.5903	0.0208	-1.32604	-5.30708	11.38822	0.00074
Azalan	IMPG2	-39.77121	0.0261	-1.32534	-5.31365	10.83167	1
Azalan	RAB7B	-39.92065	0.03773	-1.32499	-5.31906	9.88229	0.00167
Azalan	ANKRD2	-43.58759	0	0.43597	-5.44585	41.64091	0
Azalan	LOC101927414	-43.83727	0.01418	-1.24322	-5.45409	12.34462	0.00044
Azalan	C4BPB	-44.01076	0.01465	-1.24253	-5.45978	12.26242	0.00046
Azalan	TMEM236	-44.1353	0.02024	-1.24218	-5.46386	11.46476	0.00071
Azalan	GAS8-AS1	-48.25768	0.00863	-1.16418	-5.59269	13.5779	0.00023
Azalan	PKIB	-48.36327	0.01099	-1.16383	-5.59584	12.98548	0.00031
Azalan	LOC105372130	-53.08796	0.02406	-1.08846	-5.73031	11.03765	0.00089

4.4.3 Diferansiyel Gen Ekspresyonu Isı Haritası (Heatmap)

Kontrol ve nitrofen uygulanan örnekler arasındaki diferansiyel gen ekspresyon örüntüsünü değerlendirmek amacıyla anlamlı derecede değişim gösteren genler kullanılarak bir ısı haritası oluşturuldu. Isı haritasında genlerin örnekler arasındaki ekspresyon düzeyleri renk skalası kullanılarak gösterildi. Yüksek ekspresyon seviyeleri kırmızı tonları ile, düşük ekspresyon seviyeleri ise yeşil tonları ile temsil edildi.

Isı haritası incelendiğinde nitrofen uygulanan örnekler ile kontrol grubuna ait örneklerin farklı ekspresyon örüntüleri gösterdiği görüldü. Nitrofen grubuna ait örneklerin birbirine daha yakın bir

kümelenme gösterdiği, kontrol örneklerinin ise ayrı bir küme oluşturduğu gözlemlendi. Diferansiyel eksprese genlerin örnekler arasındaki dağılımı Şekil 9’da sunuldu.



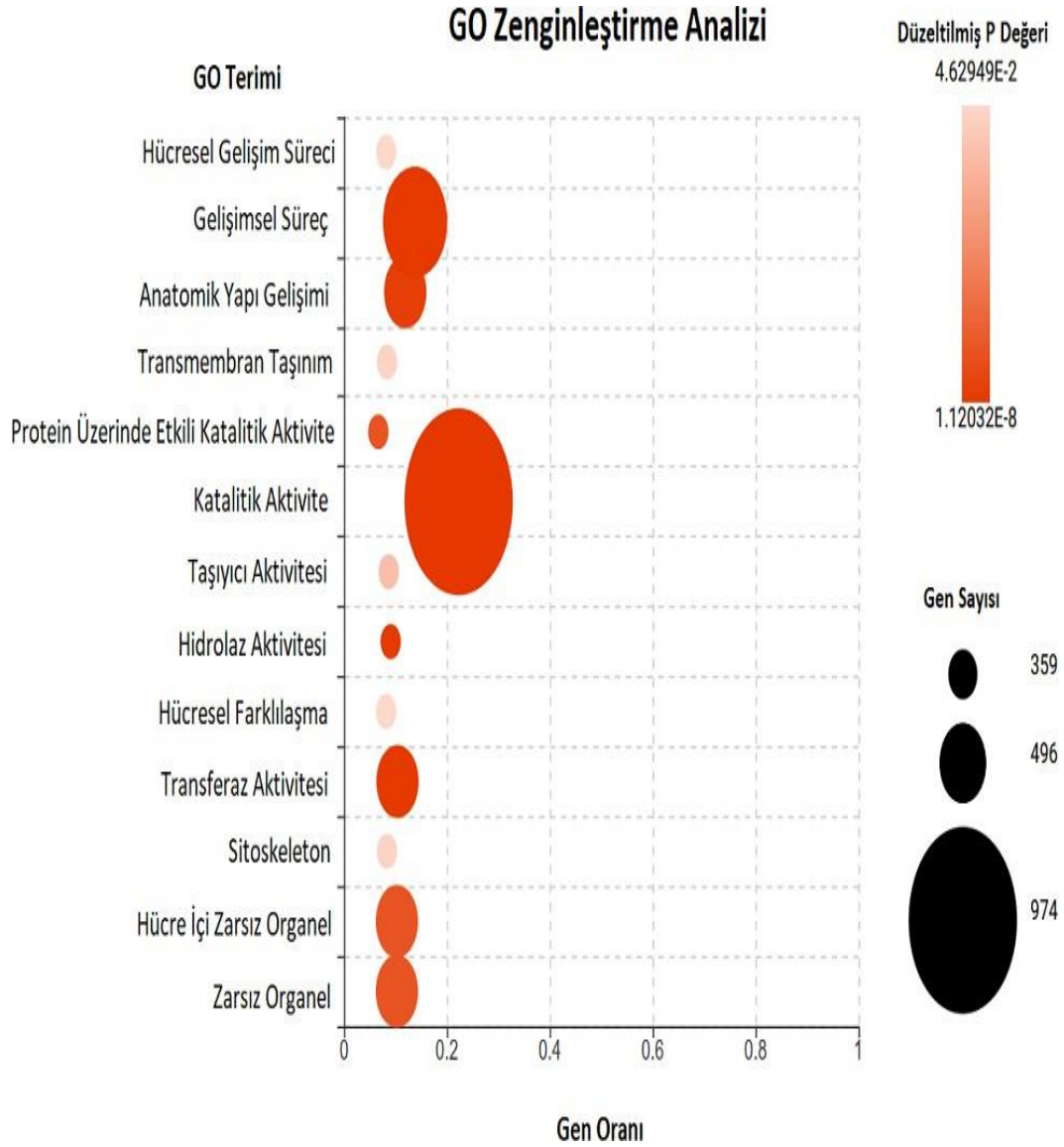
Şekil 9. Isı haritası

4.5 Fonksiyonel Zenginleştirme (Enrichment) Analizi

4.5.1 Gene Ontology (GO) Zenginleştirme Analizi

Diferansiyel ekspresyon analizi sonucunda belirlenen genlerin biyolojik süreçlerdeki dağılımını incelemek amacıyla Gene Ontology (GO) zenginleştirme analizi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda diferansiyel eksprese genlerin çeşitli biyolojik süreç kategorilerinde zenginleşme gösterdiği belirlendi.

GO analizinde özellikle gelişimsel süreçler, katalitik aktivite, taşıyıcı aktivitesi ve hücrel farklılaşma ile ilişkili süreçlerin öne çıktığı görüldü. GO zenginleştirme analizine ait sonuçlar gen oranı, düzeltilmiş p değeri ve gen sayısı dikkate alınarak Şekil 10'da sunuldu.

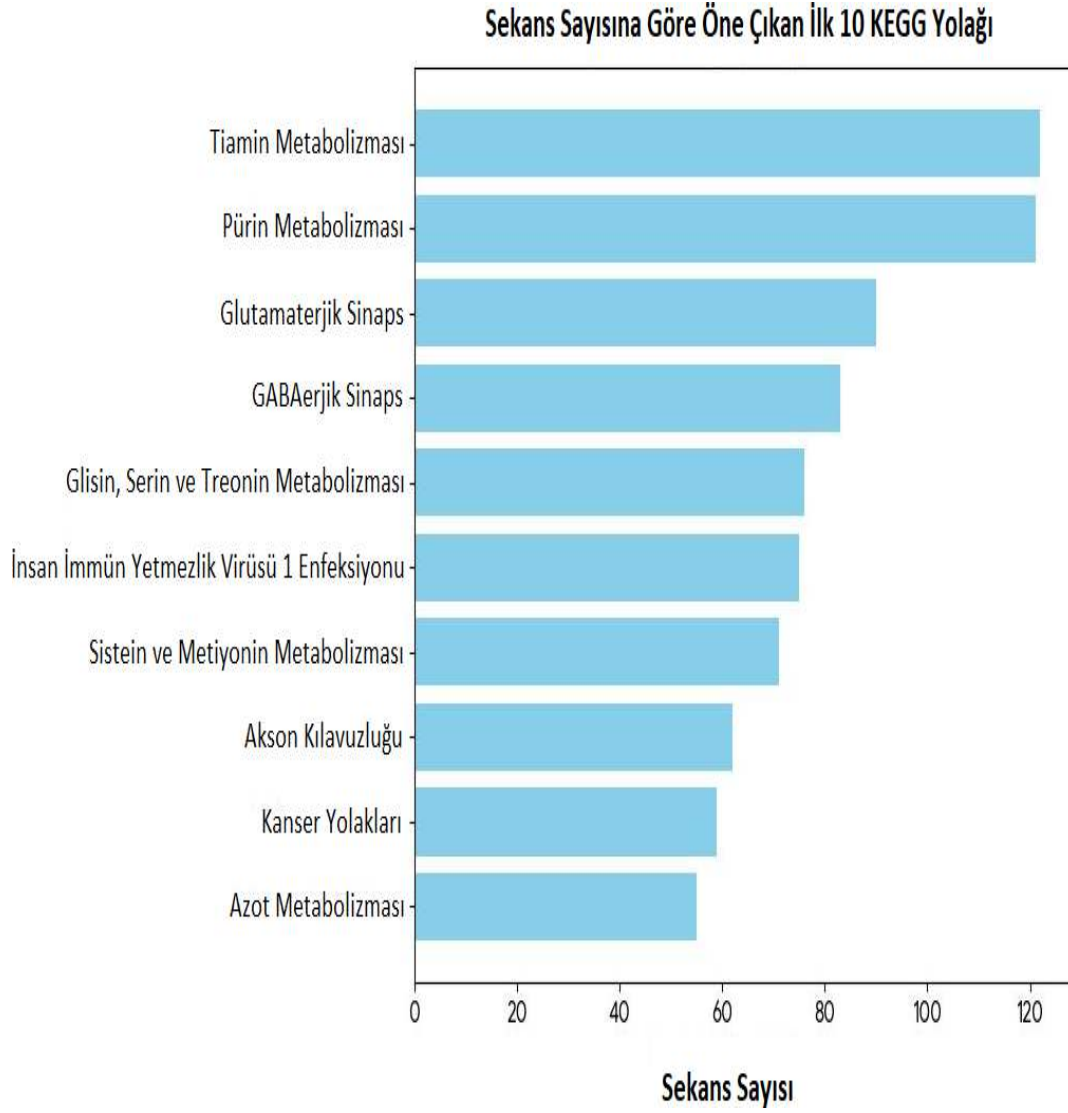


Şekil 10. GO biyolojik süreç zenginleştirme

4.5.2 KEGG Yolak Zenginleştirme Analizi

Diferansiyel ekspres genlerin yer aldığı biyolojik yolların belirlenmesi amacıyla KEGG yolak zenginleştirme analizi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda diferansiyel ekspres genlerin çeşitli metabolik ve hücrel yollarda dağılım gösterdiği belirlendi. KEGG analizinde öne çıkan yollar arasında tiamin metabolizması, pürin metabolizması, glutamaterjik sinaps, GABAerjik sinaps, glisin-serin-treonin

metabolizması, insan immün yetmezlik virüsü 1 enfeksiyonu, sistein ve metiyonin metabolizması, akson kılavuzluğu, kanser yolları ve azot metabolizması yer aldı. En yüksek sekans sayısına sahip ilk 10 yolak Şekil 11’de sunuldu.



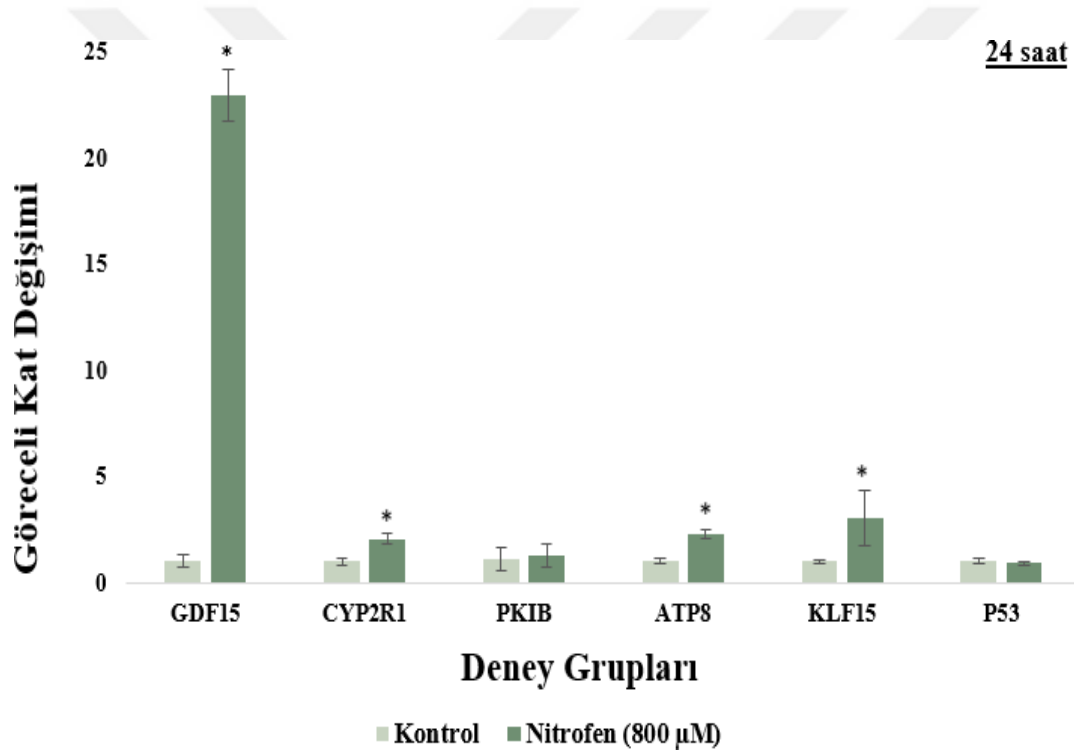
Şekil 11. KEGG yolak zenginleştirilmesi

4.6 RT-qPCR ile Gen İfadelenme Analizi

Nitrofen uygulamasının BEAS-2B hücrelerinde gen ekspresyon profili üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla seçilen genlerin mRNA düzeyleri RT-qPCR yöntemi ile analiz edildi. Ekspresyon değerleri beta-aktin referans genine göre normalize edildi ve sonuçlar kontrol grubuna göre göreceli ekspresyon düzeyleri şeklinde sunuldu. Elde edilen sonuçlara göre, 800 μ M nitrofen uygulaması sonrasında GDF15, CYP2R1, ATP8 ve KLF15 genlerinin ekspresyon düzeylerinde kontrol

grubuna kıyasla anlamlı artış gözlemlendi ($p < 0,05$). PKIB geninde sınırlı düzeyde artış saptanırken, p53 geninde hafif düzeyde ekspresyon azalması tespit edildi (Şekil 12).

RNA-Seq analizlerinde GDF15, CYP2R1, ATP8 ve KLF15 genlerinin yukarı regüle edildiği, PKIB geninin ise aşağı regüle olduğu belirlendi ($FDR < 0,05$). RT-qPCR sonuçları bu genlerde benzer yönde ekspresyon değişiklikleri göstererek RNA-Seq verileri ile büyük ölçüde uyumlu bulundu. RNA-Seq sonuçlarında özellikle GDF15 ve KLF15 genlerinin p53 sinyal yolları ile ilişkili olduğu dikkate alınarak, bu yolak üzerindeki etkinin değerlendirilmesi amacıyla p53 geninin ekspresyon düzeyi ayrıca RT-qPCR ile analiz edildi. p53 geninde sınırlı düzeyde ekspresyon değişimi gözlemlendi, ancak bu gen RNA-Seq diferansiyel ekspresyon listesinde yer almadı. Bu bulgular, nitrofen maruziyetinin BEAS-2B hücrelerinde seçilen genlerin ekspresyon profillerini anlamlı şekilde değiştirdiğini ve RT-qPCR sonuçlarının RNA-Seq verileri ile genel olarak uyumlu olduğunu gösterdi.



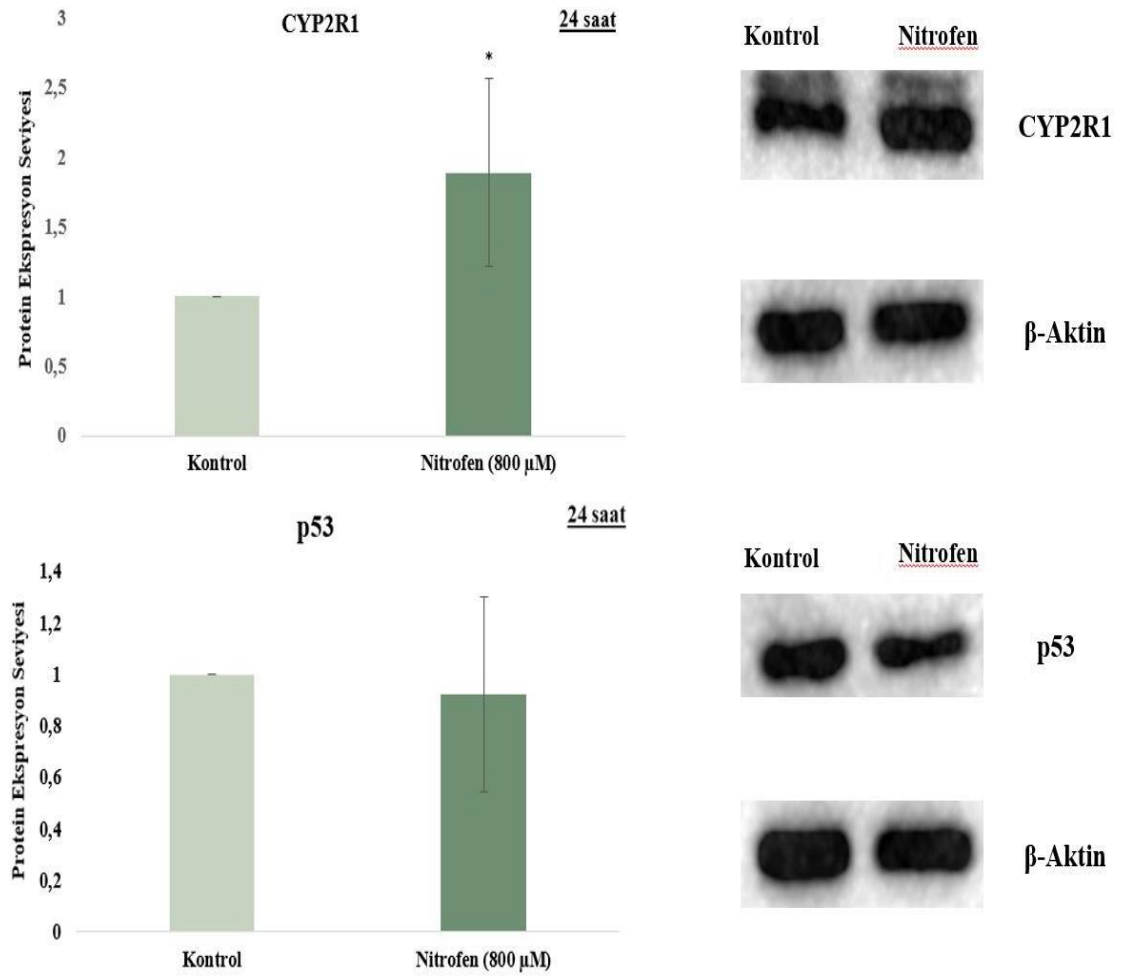
Şekil 12. Seçilen genlerin göreceli ekspresyonu * $p < 0.05$, kontrol grubuna kıyasla

4.7 Western Blot ile Protein İfade Analizi

Nitrofen uygulamasının protein ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla CYP2R1 ve p53 protein düzeyleri Western blot yöntemi ile analiz edildi. Bant yoğunlukları β -aktin yükleme kontrolüne göre normalize edildi ve sonuçlar kontrol grubuna göre göreceli ifade düzeyleri şeklinde sunuldu.

Elde edilen densitometrik analiz sonuçlarına göre, nitrofen (800 μ M) uygulanan hücrelerde CYP2R1 protein düzeyinin kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 1,9 kat arttığı gözlemlendi ($1,89 \pm 0,67$) ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Bu artış, RT-qPCR ve RNA-Seq analizlerinde CYP2R1 geninde saptanan yukarı regülasyon ile uyumlu bulundu (Şekil 13).

p53 protein düzeyinde ise nitrofen uygulaması sonrasında hafif düzeyde azalma saptandı ($0,92 \pm 0,38$), ancak bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$). Bu bulgu, RT-qPCR analizinde p53 gen ekspresyonunda tespit edilen küçük ölçekli değişim ile paralellik gösterdi (Şekil 13). Bu bulgular, nitrofen maruziyetinin BEAS-2B hücrelerinde CYP2R1 ekspresyonunu protein düzeyinde artırdığını, p53 protein düzeyinde ise belirgin bir değişim oluşturmadığını gösterdi.

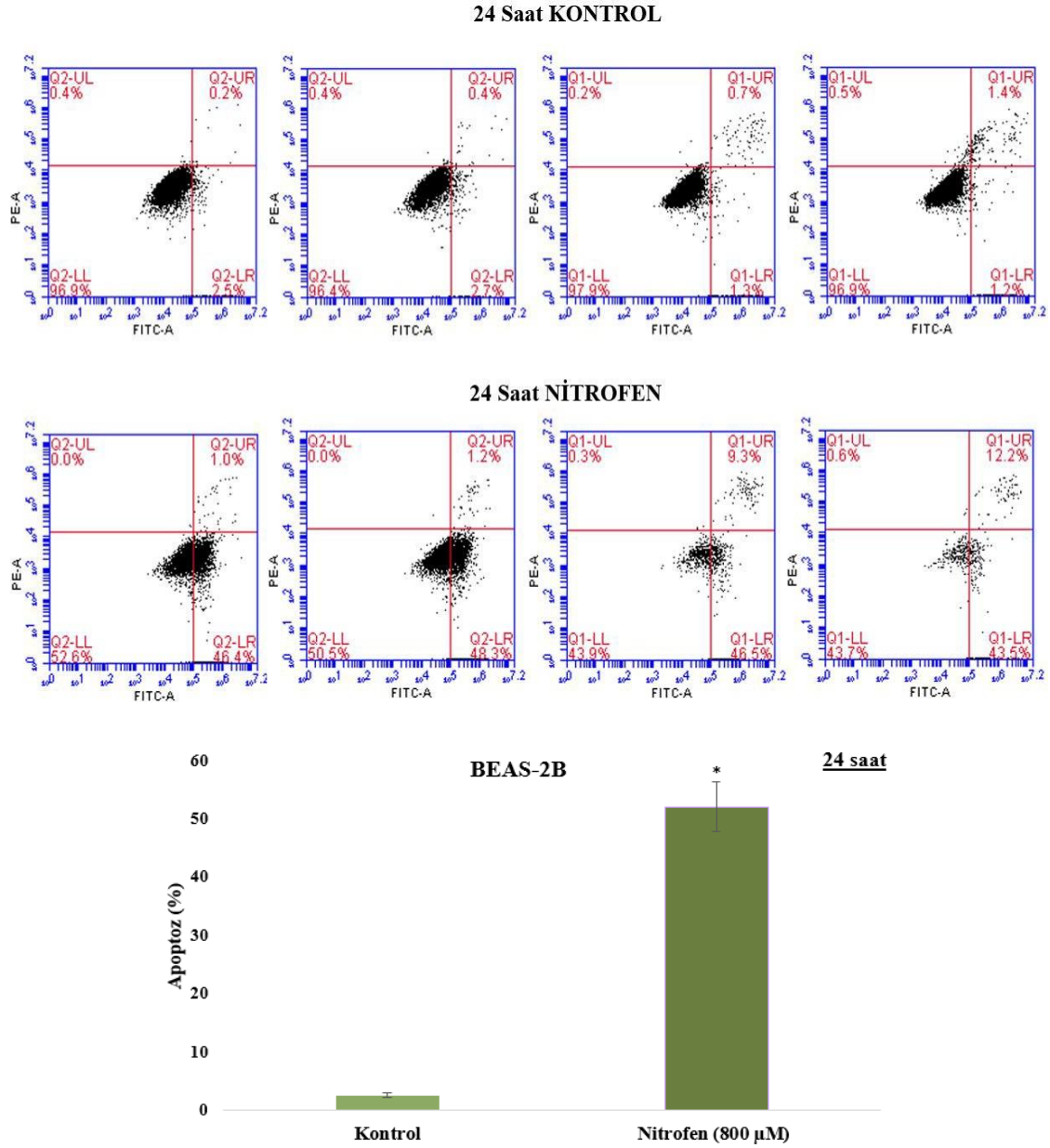


Şekil 13. Western blot analizi

4.8 Apoptoz Analizi

BEAS-2B hücrelerinde nitrofen uygulamasının hücre ölümü üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla 24 saatlik inkübasyon sonrasında akım sitometrisi ile apoptoz analizi gerçekleştirildi. Kontrol ve 800 μ M nitrofen ile muamele edilen hücre grupları Annexin V/PI boyaması kullanılarak karşılaştırıldı.

Kontrol grubunda toplam apoptotik hücre oranı ortalama $2,6 \pm 0,45$ olarak belirlenirken, nitrofen uygulanan grupta bu oran anlamlı şekilde artarak $52,1 \pm 4,3$ düzeyine yükseldi ($p < 0,05$). Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 14). Bu bulgular, nitrofen maruziyetinin BEAS-2B hücrelerinde belirgin düzeyde apoptozu indüklediğini gösterdi.

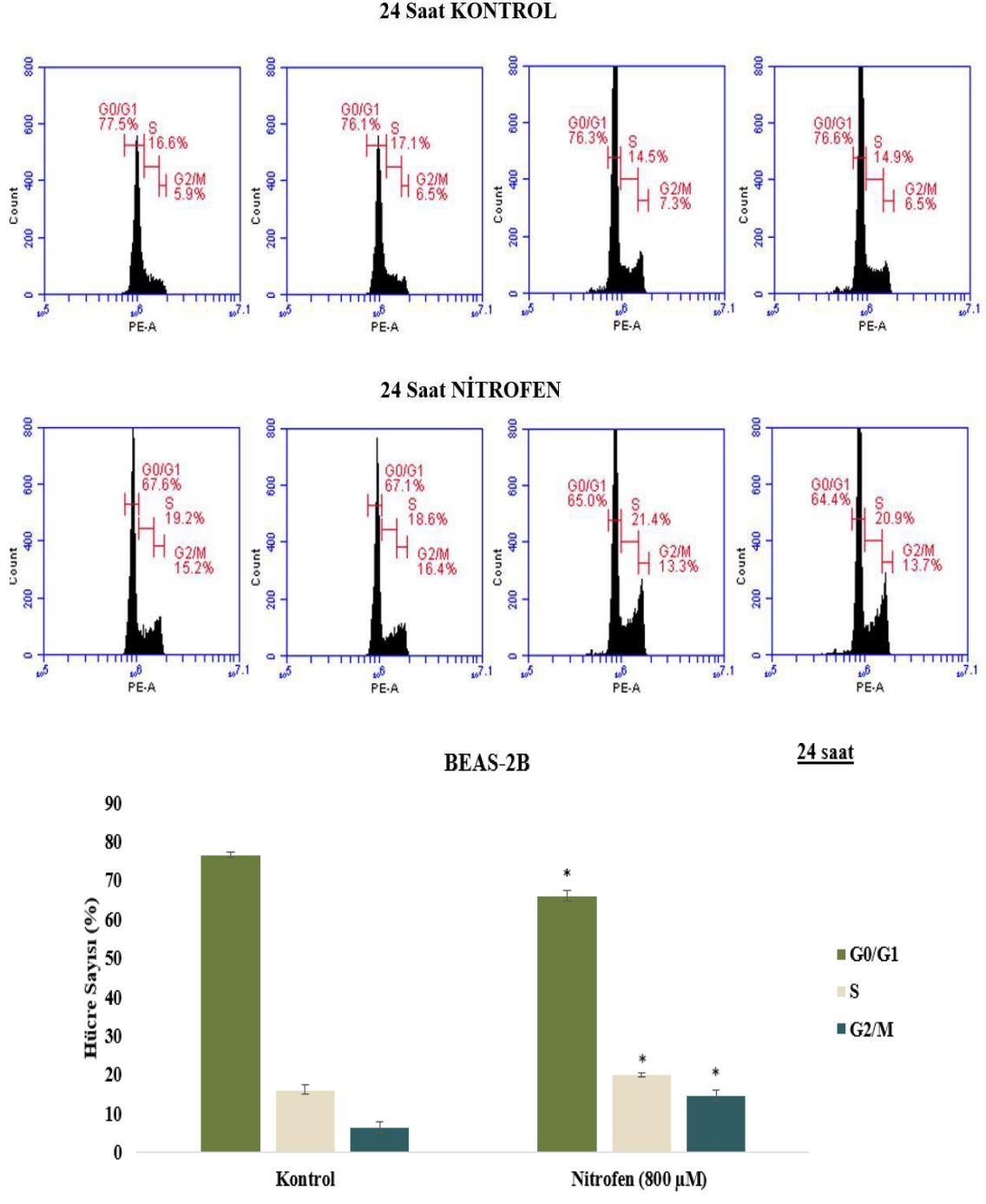


Şekil 14. Apoptoz analizi * $p < 0.05$, kontrol grubuna kıyasla

4.9 Hücre Döngüsü Analizi

Nitrofenin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla hücre döngüsü dağılımı 24 saatlik uygulama sonrasında akım sitometrisi ile analiz edildi. Kontrol grubunda hücrelerin büyük çoğunluğunun G0/G1 fazında bulunduğu gözlemlenirken ($76,63 \pm 0,62$), nitrofen uygulanan

grupta G0/G1 fazındaki hücre oranı anlamlı şekilde azalarak $66,03 \pm 1,34$ seviyesine düştü ($p < 0,05$). Buna karşılık S fazındaki hücre oranı kontrol grubunda $15,78 \pm 1,56$ iken nitrofen grubunda $20,03 \pm 0,57$ olarak arttı. Benzer şekilde G2/M fazındaki hücre oranı kontrol grubunda $6,55 \pm 1,27$, nitrofen grubunda ise $14,65 \pm 1,42$ olarak saptandı ($p < 0,05$) (Şekil 15). Bu sonuçlar, nitrofen uygulamasının hücre döngüsü dağılımını değiştirerek hücrelerin S ve G2/M fazlarında birikmesine neden olduğunu gösterdi.



Şekil 15. Hücre döngüsü analizi * $p < 0.05$, kontrol grubuna kıyasla

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada nitrofen maruziyetinin BEAS-2B insan bronşiyal epitel hücrelerinde geniş kapsamlı bir transkriptomik yeniden düzenlenmeye yol açtığı gösterilmiştir. RNA-Seq analizi sonucunda toplam 502 genin diferansiyel olarak eksprese olduğu belirlenmiş olup, bu genlerin 320'sinin yukarı regüle, 182'sinin ise aşağı regüle olduğu saptanmıştır. Ayrıca MDS analizi ve ısı haritası, kontrol ve nitrofen uygulanan örneklerin gen ekspresyon profillerinin belirgin biçimde ayrıştığını ortaya koymuştur. Bu bulgular, nitrofenin hücrelerde koordineli bir transkripsiyonel yanıt oluşturduğunu göstermektedir.

Nitrofen modeli literatürde sıklıkla konjenital diyafragma hernisi ve akciğer gelişimi bozukluklarını incelemek amacıyla kullanılmış olup, bu modelde nitrofenin gelişimsel süreçleri düzenleyen gen ağlarında erken dönemde bozulmalara yol açtığı bildirilmiştir (Greer, 2013; Keijzer et al., 2000). Bu durum, nitrofenin yalnızca morfolojik değil, aynı zamanda moleküler düzeyde de etkili olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda, bu çalışmada insan bronşiyal epitel hücre hattında gözlenen gen ekspresyon değişimleri, nitrofenin hücresel düzeyde çok yönlü etkiler oluşturduğunu desteklemektedir (Mahood et al., 2016).

Gen ekspresyon profili incelendiğinde, özellikle stres yanıtı ve metabolik adaptasyon ile ilişkili genlerin belirgin şekilde yukarı regüle olduğu görülmektedir. Bu durum, nitrofen maruziyetinin hücrelerde Entegre Stres Yanıtı (Integrated Stress Response, ISR) olarak bilinen adaptif mekanizmayı aktive ettiğini düşündürmektedir. ISR, hücrelerin amino asit eksikliği, oksidatif stres ve protein katlanma bozuklukları gibi koşullara karşı geliştirdiği temel bir savunma sistemidir (Pakos-Zebrucka et al., 2016).

ATF4, DDIT3 (CHOP) ve TRIB3 gibi genlerin artışı bu yanıtın önemli göstergeleridir. ATF4 stres koşullarında geniş bir gen grubunun transkripsiyonunu düzenlerken, DDIT3 uzun süreli stres durumlarında apoptoz ile ilişkili süreçleri aktive edebilmekte, TRIB3 ise bu sürecin dengelenmesinde rol oynamaktadır (Ohoka et al., 2005; Pakos-Zebrucka et al., 2016). Bu genlerin birlikte artışı, nitrofen maruziyetinin hücreler tarafından metabolik ve proteotoksik stres olarak algılandığını göstermektedir.

Amino asit ve nitrojen metabolizması ile ilişkili SAT1, SDS ve ACCS genlerindeki artış da bu bulguyu desteklemektedir. Özellikle SAT1'in poliamin metabolizmasındaki rolü, hücre içi metabolik dengenin yeniden düzenlendiğine işaret etmektedir (Pegg, 2009). Buna ek olarak, hücre dışı matriks ile ilişkili BGN ve MMP3 genlerindeki artış, hücresel mikroçevrede yeniden yapılanma süreçlerinin aktive olduğunu göstermektedir. Bu durum, nitrofen maruziyetinin yalnızca hücre içi süreçleri değil, hücre-matris etkileşimlerini de etkilediğini düşündürmektedir (Nagase et al., 2006; Schaefer et al., 2005). Buna karşılık aşağı regüle genler incelendiğinde, hücre döngüsü ve büyüme ile ilişkili genlerin

baskılandığı görülmektedir. SKP2 ve ANLN gibi genlerdeki azalma hücre proliferasyonunun sınırlandığını, KIT ve IGFBP ailesine ait genlerdeki azalma ise büyüme sinyallerinin baskılandığını göstermektedir (Carrano et al., 1999; Lennartsson & Ronnstrand, 2006).

Ayrıca LUM, COL5A2 ve CCDC80 gibi yapısal genlerin baskılanması, hücresel organizasyonun değiştiğini düşündürmektedir. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, nitrofen maruziyetinin hücrelerde büyümenin baskılanması ve adaptasyon mekanizmalarının ön plana çıktığı çift yönlü bir yanıt oluşturduğu söylenebilir.

Diferansiyel gen ekspresyonu ve zenginleştirme analizleri birlikte değerlendirildiğinde, nitrofen maruziyetinin hücrelerde stres yanıtı, metabolik düzenleme ve epitel fonksiyonları ile ilişkili süreçleri etkilediği görülmektedir. Bu durum, nitrofenin hücresel düzeyde çok katmanlı bir moleküler etki oluşturduğunu göstermektedir.

Up-regüle genler arasında öne çıkan GDF15, hücresel stres yanıtının önemli belirteçlerinden biri olup özellikle oksidatif stres, hipoksi ve mitokondriyal disfonksiyon durumlarında ekspresyonunun arttığı bilinmektedir (Tsai et al., 2013). Ayrıca GDF15'in p53 ile ilişkili stres yanıt yollarının aşağı akış hedeflerinden biri olduğu bildirilmiştir (Breit & Tsai, 2025). Bu bağlamda, bu çalışmada gözlenen GDF15 artışı, nitrofen maruziyetinin hücrelerde stres-adaptasyon eksenini aktive ettiğini desteklemektedir.

Benzer şekilde KLF15, metabolik homeostazın düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. KLF15'in amino asit metabolizması, lipid metabolizması ve enerji dengesi üzerinde düzenleyici etkileri olduğu bilinmektedir (Gray et al., 2007). Ayrıca bu genin stres koşullarında hücresel adaptasyon süreçlerine katkı sağladığı gösterilmiştir (Takashima et al., 2010). Bu çalışmada KLF15 ekspresyonundaki artış, nitrofen maruziyeti altında hücrelerin metabolik dengeyi korumaya yönelik bir yanıt geliştirdiğini düşündürmektedir.

Mitokondriyal fonksiyon ile ilişkili bir diğer gen olan MT-ATP8, oksidatif fosforilasyon sürecinin temel bileşenlerinden biridir. Bu genin artışı, hücresel enerji üretim süreçlerinin etkilendiğini ve mitokondriyal fonksiyonların yeniden düzenlendiğini göstermektedir (Jonckheere et al., 2012). Bu durum, nitrofen maruziyetinin hücrelerde enerji metabolizması üzerinde belirgin bir etkisi olduğunu desteklemektedir.

Bu çalışmada dikkat çeken bir diğer gen olan CYP2R1, vitamin D metabolizmasında görev alan önemli bir enzimdir. Vitamin D'nin epitel bütünlüğü, hücresel diferansiyasyon ve immün yanıtların düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle CYP2R1 ekspresyonundaki artış, nitrofen maruziyetinin epitel homeostazı ve immün düzenleme ile ilişkili süreçleri etkileyebileceğini düşündürmektedir (Chun et al., 2014).

Down-regüle genler incelendiğinde, epitel farklılaşma ve hücresel organizasyon ile ilişkili süreçlerin baskılandığı görülmektedir. Bu bağlamda ELF3 geninin azalması, epitel hücre kimliğinin korunması ve diferansiyasyon süreçlerinin olumsuz etkilendiğini göstermektedir. ELF3'ün epitel

bütünlüğünün sürdürülmesinde rol oynadığı dikkate alındığında, bu genin baskılanması nitrofenin epitel fonksiyonlarını bozucu etkisini desteklemektedir (Ng et al., 2002).

Metabolik düzenleme açısından önemli bir gen olan PDK4'ün azalması ise hücrel enerji metabolizmasının yeniden yönlendirildiğini göstermektedir. PDK4, pirüvat dehidrogenaz kompleksini inhibe ederek glukoz metabolizması ile mitokondriyal oksidasyon arasındaki dengeyi düzenlemektedir. Bu genin baskılanması, hücrelerin enerji üretim stratejilerinde değişiklikler meydana geldiğini düşündürmektedir (Holness & Sugden, 2003).

KEGG yolak analizinde öne çıkan metabolik yollar, gen düzeyindeki bulgular ile uyumlu bir şekilde hücrel metabolizmanın yeniden düzenlendiğini göstermektedir. Özellikle amino asit metabolizması ve azot metabolizması ile ilişkili yolların öne çıkması, hücrelerin stres koşullarında metabolik esneklik geliştirdiğini düşündürmektedir. Bu durum, hücrelerin enerji üretimi ve biyosentetik süreçlerini yeniden dengelemeye çalıştığını göstermektedir.

Özellikle sistein ve metiyonin metabolizması ile ilişkili değişiklikler, hücrel redoks dengesi açısından dikkat çekicidir. Bu yollar, glutatyon sentezi ile doğrudan ilişkili olup oksidatif stres ile mücadelede kritik rol oynamaktadır. Bu nedenle bu yoldaki değişiklikler, nitrofen maruziyetinin hücrelerde oksidatif stres oluşturduğunu destekleyen önemli bir bulgu olarak değerlendirilebilir (Lu, 2013).

GO ve KEGG analizlerinin birlikte değerlendirilmesi, nitrofen maruziyetinin hücrelerde yalnızca tek bir biyolojik süreci değil, stres yanıtı, metabolizma ve hücrel organizasyon gibi birbiriyle ilişkili birçok süreci eş zamanlı olarak etkilediğini göstermektedir. Bu durum, nitrofenin hücrel düzeyde kompleks ve çok boyutlu bir etki mekanizmasına sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

RNA-Seq verilerinin RT-qPCR ve Western blot analizleri ile doğrulanması, elde edilen bulguların güvenilirliğini destekleyen önemli bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir. Yüksek çıktı transkriptomik analizlerin bağımsız tekniklerle doğrulanması, gen ekspresyon değişimlerinin biyolojik anlamlılığının ortaya konulması açısından kritik öneme sahiptir (Wang et al., 2009). Bu çalışmada RT-qPCR analizlerinde GDF15, KLF15, ATP8 ve CYP2R1 genlerinde gözlenen artışların RNA-Seq sonuçları ile uyumlu bulunması, nitrofen maruziyetinin bu genler üzerinde tutarlı bir transkripsiyonel etki oluşturduğunu göstermektedir (Everaert et al., 2017).

Bununla birlikte, PKIB geni açısından RNA-Seq ve RT-qPCR sonuçları arasında yönsel farklılık gözlemlenmiştir. RNA-Seq analizinde bu genin aşağı regüle olduğu belirlenirken, RT-qPCR analizinde sınırlı düzeyde artış saptanmıştır. Bu tür uyumsuzluklar, özellikle düşük ekspresyon düzeyine sahip genlerde yöntemler arası duyarlılık farkları, primer özgüllüğü, transkript izoform çeşitliliği ve örnekler arası biyolojik varyasyon gibi faktörlerden kaynaklanabilmektedir. Bu nedenle PKIB genine ilişkin farklılık, genel eğilimi zayıflatan bir bulgudan ziyade, teknik ve biyolojik değişkenliğin bir yansıması olarak değerlendirilmelidir (Conesa et al., 2016; Zhao et al., 2014).

Protein düzeyinde yapılan doğrulamalarda ise CYP2R1 için Western blot analizinde gözlenen artış, mRNA düzeyindeki değişim ile uyumlu bulunmuştur. Bu durum, CYP2R1 geninin nitrofen maruziyetine yanıt veren ve hem transkripsiyonel hem de translasyonel düzeyde desteklenen güçlü aday genlerden biri olduğunu göstermektedir. mRNA ve protein düzeyleri arasındaki bu uyum, ilgili genin biyolojik süreçlerde aktif rol oynayabileceğine işaret etmektedir (Liu et al., 2016).

Öte yandan, p53 proteini için yapılan analizlerde belirgin bir değişiklik gözlenmemesi dikkat çekicidir. Ancak p53'ün hücrel stres yanıtındaki rolü yalnızca protein miktarı ile sınırlı değildir. Bu proteinin aktivitesi büyük ölçüde fosforilasyon, asetilasyon ve diğer post-translasyonel modifikasyonlar ile düzenlenmektedir (Levine, 2020). Bu nedenle p53 düzeyinde anlamlı bir değişim olmaksızın, aşağı akış hedef genlerin aktive olması mümkündür. Nitekim bu çalışmada GDF15 gibi stres yanıtı ile ilişkili genlerde gözlenen artış, bu yolaktaki aktivitenin dolaylı olarak sürdüğünü düşündürmektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, RNA ve protein düzeyleri arasındaki farklılıkların biyolojik sistemlerde yaygın olduğu bilinmektedir. mRNA bolluğu ile protein düzeyleri arasındaki ilişkinin translasyonel kontrol, protein stabilitesi ve yıkımı gibi mekanizmalar tarafından şekillendirildiği gösterilmiştir (Vogel & Marcotte, 2012). Bu nedenle bu çalışmada elde edilen RT-qPCR ve Western blot sonuçlarının RNA-Seq verileri ile tam nicel uyum göstermesinden ziyade, genel eğilimleri doğrulaması daha anlamlıdır.

Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan çok katmanlı doğrulama yaklaşımı, nitrofen maruziyetinin hücrelerde oluşturduğu gen ekspresyon değişimlerinin güvenilirliğini desteklemekte ve elde edilen bulguların biyolojik açıdan tutarlı olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmanın en önemli güçlü yönlerinden biri, nitrofen maruziyetinin insan bronşiyal epitel hücre hattında çok yönlü bir yaklaşımla incelenmiş olmasıdır. Nitrofen modeli literatürde çoğunlukla hayvan deneyleri üzerinden değerlendirilmiş olup, insan hücre hatlarında gerçekleştirilen çalışmalar sınırlıdır. Bu nedenle BEAS-2B hücre hattında elde edilen bulgular, nitrofenin insan hava yolu epiteli üzerindeki etkilerine dair translasyonel açıdan önemli bir katkı sunmaktadır.

Çalışmanın bir diğer güçlü yönü, yüksek çıktılı RNA-Seq analizinin RT-qPCR ve Western blot gibi doğrulayıcı yöntemlerle desteklenmiş olmasıdır. Bu çok katmanlı yaklaşım, elde edilen gen ekspresyon verilerinin yalnızca keşifsel düzeyde kalmayıp, biyolojik olarak doğrulanmasını sağlamıştır. Farklı analiz yöntemlerinin birlikte kullanılması, sonuçların güvenilirliğini artırmakta ve elde edilen bulguların metodolojik açıdan daha sağlam temellere dayandığını göstermektedir (Wang et al., 2009).

Ayrıca diferansiyel gen ekspresyonu bulgularının GO ve KEGG zenginleştirme analizleri ile birlikte değerlendirilmiş olması, nitrofenin hücrel etkilerinin yalnızca tekil genler üzerinden değil, biyolojik süreçler ve yollar düzeyinde yorumlanmasına olanak sağlamıştır. Bu yaklaşım, elde edilen verilerin biyolojik anlamlandırılmasını güçlendirmiş ve nitrofenin etki mekanizmasının daha bütüncül bir şekilde değerlendirilmesine katkı sağlamıştır (Conesa et al., 2016).

Bunun yanı sıra, hem yukarı hem de aşağı regüle genlerin birlikte ele alınması, hücrel yanıtın çift yönlü doğasının ortaya konulmasına olanak tanımıştır. Bu durum, nitrofen maruziyetinin yalnızca stres yanıtını tetiklemediğini, aynı zamanda hücre proliferasyonu, metabolizma ve hücrel organizasyon gibi temel süreçleri yeniden düzenlediğini göstermesi açısından önemlidir.

Bununla birlikte, bu çalışmanın bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Öncelikle çalışma tek bir hücre hattı ile sınırlıdır. Her ne kadar BEAS-2B hücre hattı insan bronşiyal epitelini temsil etse de, in vivo ortamın kompleks yapısını tam olarak yansıtmayabilir. Hücreler arası etkileşimler, immün yanıtlar ve doku mikroçevresi gibi faktörlerin bu modelde yer almaması, elde edilen sonuçların genellenebilirliğini sınırlayabilir (Edmondson et al., 2014).

İkinci olarak, RNA-Seq analizinin tek bir zaman noktası ve belirli bir doz koşulu altında gerçekleştirilmiş olması önemli bir kısıtlılıktır. Gen ekspresyonu dinamik bir süreç olup zaman ve doz bağımlı değişiklikler gösterebilmektedir. Bu nedenle farklı zaman noktalarında ve farklı dozlarda yapılacak çalışmalar, nitrofenin hücrel etkilerinin daha ayrıntılı anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

Bir diğer sınırlılık, protein düzeyinde doğrulamanın sınırlı sayıda gen ile yapılmış olmasıdır. Her ne kadar seçilen genler çalışmanın temel bulgularını desteklese de, daha geniş kapsamlı proteomik analizler RNA-Seq verilerinin fonksiyonel karşılıklarını daha kapsamlı şekilde ortaya koyabilir (Liu et al., 2016).

Ayrıca RNA ve protein düzeyleri arasındaki farklılıklar göz önüne alındığında, yalnızca transkriptomik verilere dayanarak biyolojik sonuçlar çıkarmanın bazı kısıtları bulunmaktadır. Translasyonel kontrol mekanizmaları ve protein stabilitesi gibi faktörler gen ekspresyonunun nihai etkisini belirleyebilmektedir (Vogel & Marcotte, 2012).

Bunun yanı sıra, bu çalışmada elde edilen bulgular mekanistik olarak yorumlanmış olmakla birlikte fonksiyonel deneylerle doğrudan test edilmemiştir. Özellikle belirlenen aday genlerin hücrel süreçlerdeki rollerinin fonksiyonel çalışmalar ile doğrulanması, elde edilen sonuçların biyolojik anlamını daha da güçlendirecektir.

Son olarak, bu çalışma transkriptomik düzeyde kapsamlı veriler sunmakla birlikte, epigenetik, proteomik ve metabolomik düzeyde analizler ile desteklenmemiştir. Çoklu omik yaklaşımların entegre edilmesi, nitrofenin etki mekanizmalarının daha derinlemesine anlaşılmasına katkı sağlayacaktır (Hasin et al., 2017).

Tüm bu sınırlılıklara rağmen, bu çalışma nitrofen maruziyetinin insan bronşiyal epitel hücrelerinde oluşturduğu gen ekspresyon değişimlerini kapsamlı bir şekilde ortaya koymakta ve literatüre önemli katkılar sunmaktadır. Elde edilen bulgular, nitrofenin hücrel düzeyde çok yönlü etkiler oluşturduğunu göstermekte ve gelecekte yapılacak çalışmalar için güçlü bir temel oluşturmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada nitrofen maruziyetinin insan bronşiyal epitel hücre hattı (BEAS-2B) üzerindeki etkileri transkriptomik düzeyde incelenmiştir. RNA-Seq analizi sonucunda nitrofen uygulamasının hücrelerde anlamlı gen ekspresyon değişikliklerine yol açtığı belirlenmiş ve toplam 502 genin diferansiyel olarak eksprese olduğu saptanmıştır. Bu durum, nitrofen maruziyetinin hücrelerde çok yönlü bir moleküler yanıt oluşturduğunu göstermektedir.

Elde edilen bulgular, nitrofenin özellikle stres yanıtı ve metabolik düzenleme ile ilişkili genlerde belirgin değişimlere neden olduğunu ortaya koymuştur. GDF15, KLF15, ATP8 ve CYP2R1 gibi genlerdeki artışlar hücresel adaptasyon süreçlerinin aktive olduğunu gösterirken, ELF3 ve PDK4 gibi genlerdeki azalma epitel fonksiyonları ve enerji metabolizmasının baskılandığını düşündürmektedir. Bu durum, hücrelerin büyümeyi sınırlayarak hayatta kalmaya yönelik bir yanıt geliştirdiğini göstermektedir.

GO ve KEGG analizleri, diferansiyel eksprese genlerin gelişimsel süreçler ve metabolik yollarda yoğunlaştığını ortaya koymuştur. Özellikle metabolizma ve redoks dengesi ile ilişkili yolların öne çıkması, nitrofenin hücresel metabolizma üzerinde yeniden düzenleyici bir etki oluşturduğunu desteklemektedir.

RNA-Seq bulgularının RT-qPCR ve Western blot analizleri ile doğrulanması, sonuçların güvenilirliğini artırmıştır. Özellikle CYP2R1 geninde hem mRNA hem protein düzeyinde gözlenen artış, bu genin nitrofen yanıtında önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışma, nitrofen maruziyetinin insan bronşiyal epitel hücrelerinde stres yanıtı ve metabolik yeniden düzenlenme ile ilişkili etkiler oluşturduğunu ortaya koymuştur. Gelecekte yapılacak çalışmalarda farklı doz ve zaman noktalarının incelenmesi ve aday genlerin fonksiyonel olarak doğrulanması, bu mekanizmaların daha ayrıntılı anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Breit, S. N., & Tsai, V. W. (2025). Metabolic Messenger: growth differentiation factor 15. *Nat Metab*, 7(9), 1732-1744.
- Broussard, A. J., Hall, S. M., & Levitzky, M. G. (2014). Respiratory system: anatomy and physiology. *Essent Pediatr Anesthesiol*, 38.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., & Shipley, G. L. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem In: Oxford University Press*.
- Carrano, A. C., Eytan, E., Hershko, A., & Pagano, M. (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol*, 1(4), 193-199.
- Chun, R. F., Liu, P. T., Modlin, R. L., Adams, J. S., & Hewison, M. (2014). Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis. *Front Physiol*, 5, 151.
- Clugston, R. D., & Greer, J. J. (2007). Diaphragm development and congenital diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg*,
- Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szczesniak, M. W., Gaffney, D. J., Elo, L. L., & Zhang, X. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol*, 17(1), 13.
- Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*, 12(4), 207-218.
- Everaert, C., Luypaert, M., Maag, J. L., Cheng, Q. X., Dinger, M. E., Hellemans, J., & Mestdagh, P. (2017). Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using whole-transcriptome RT-qPCR expression data. *Sci Rep*, 7(1), 1559.
- Gluckman, P. D., & Hanson, M. A. (2004). Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatr Res*, 56(3), 311-317.
- Gray, S., Wang, B., Orihuela, Y., Hong, E.-G., Fisch, S., Haldar, S., Cline, G. W., Kim, J. K., Peroni, O. D., & Kahn, B. B. (2007). Regulation of gluconeogenesis by Krüppel-like factor 15. *Cell Metab*, 5(4), 305-312.
- Greer, J. J. (2013). Current concepts on the pathogenesis and etiology of congenital diaphragmatic hernia. *Respir Physiol Neurobiol*, 189(2), 232-240.
- Han, X., Na, T., Wu, T., & Yuan, B.-Z. (2020). Human lung epithelial BEAS-2B cells exhibit characteristics of mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 15(1), e0227174.
- Hasin, Y., Seldin, M., & Lusi, A. (2017). Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol*, 18(1), 83.

Hirako, S., Tsuda, H., Ito, F., Okazaki, Y., Hirayama, T., Nagasawa, H., Nakano, T., Imai, K., Kotani, T., & Kikkawa, F. (2017). Role of catalytic iron and oxidative stress in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia and its amelioration by Saireito (TJ-114). *J Clin Biochem Nutr*, 61(3), 176-182.

Holness, M., & Sugden, M. (2003). Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. *Biochem Soc Trans*, 31(6), 1143-1151.

Hurt, S. S. B., Smith, J. M., & Hayes, A. W. (1983). Nitrofen: a review and perspective. *Toxicology*, 29(1-2), 1-37.

Jonckheere, A. I., Smeitink, J. A., & Rodenburg, R. J. (2012). Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis*, 35(2), 211-225.

Ke, Y., Reddel, R. R., Gerwin, B. I., Miyashita, M., McMenamin, M., Lechner, J. F., & Harris, C. C. (1988). Human bronchial epithelial cells with integrated SV40 virus T antigen genes retain the ability to undergo squamous differentiation. *Differentiation*, 38(1), 60-66.

Keijzer, R., Liu, J., Deimling, J., Tibboel, D., & Post, M. (2000). Dual-hit hypothesis explains pulmonary hypoplasia in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Pathol*, 156(4), 1299-1306.

Kluth, D., Kangah, R., Reich, P., Tenbrinck, R., Tibboel, D., & Lambrecht, W. (1990). Nitrofen-induced diaphragmatic hernias in rats: an animal model. *J Pediatr Surg*, 25(8), 850-854.

Lau, C., Cameron, A. M., Irsula, O., Antolick, L. L., Langston, C., & Kavlock, R. J. (1988). Teratogenic effects of nitrofen on cellular and functional maturation of the rat lung. *Toxicol Appl Pharmacol*, 95(3), 412-422.

Lennartsson, J., & Ronnstrand, L. (2006). The stem cell factor receptor/c-Kit as a drug target in cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 6(1), 65-75.

Levine, A. J. (2020). p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nat Rev Cancer*, 20(8), 471-480.

Liu, Y., Beyer, A., & Aebersold, R. (2016). On the dependency of cellular protein levels on mRNA abundance. *Cell*, 165(3), 535-550.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, 15(12), 550.

Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1830(5), 3143-3153.

Mahmood, T., & Yang, P.-C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*, 4(9), 429.

Mahood, T. H., Johar, D. R., Iwasiew, B. M., Xu, W., & Keijzer, R. (2016). The transcriptome of nitrofen-induced pulmonary hypoplasia in the rat model of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Res*, 79(5), 766-775.

Manson, J. M. (1986). Mechanism of nitrofen teratogenesis. *Environ Health Perspect*, 70, 137.

Montalva, L., & Zani, A. (2019). Assessment of the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia and of the dysregulated factors involved in pulmonary hypoplasia. *Pediatr Surg Int*, 35(1), 41-61.

Montedonico, S., Nakazawa, N., & Puri, P. (2006). Retinoic acid rescues lung hypoplasia in nitrofen-induced hypoplastic foetal rat lung explants. *Pediatr Surg Int*, 22(1), 2-8.

Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, 69(3), 562-573.

Ng, A. Y.-N., Waring, P., Ristevski, S., Wang, C., Wilson, T., Pritchard, M., Hertzog, P., & Kola, I. (2002). Inactivation of the transcription factor Elf3 in mice results in dysmorphogenesis and altered differentiation of intestinal epithelium. *Gastroenterology*, 122(5), 1455-1466.

Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K., & Hayashi, H. (2005). TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J*, 24(6), 1243.

Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Lujic, M., Samali, A., & Gorman, A. M. (2016). The integrated stress response. *EMBO Rep*, 17(10), 1374-1395.

Pegg, A. E. (2009). Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB life*, 61(9), 880-894.

Pinkerton, K. E., & Joad, J. P. (2000). The mammalian respiratory system and critical windows of exposure for children's health. *Environ Health Perspect*, 108(Suppl 3), 457.

Pober, B. R. (2007). Overview of epidemiology, genetics, birth defects, and chromosome abnormalities associated with CDH. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*.

Puligandla, P. S., Grabowski, J., Austin, M., Hedrick, H., Renaud, E., Arnold, M., Williams, R. F., Graziano, K., Dasgupta, R., & McKee, M. (2015). Management of congenital diaphragmatic hernia: a systematic review from the APSA outcomes and evidence based practice committee. *J Pediatr Surg*, 50(11), 1958-1970.

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140.

Schaefer, L., Babelova, A., Kiss, E., Hausser, H.-J., Baliova, M., Krzyzankova, M., Marsche, G., Young, M. F., Mihalik, D., & Götte, M. (2005). The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest*, 115(8), 2223-2233.

Sluiter, W., Bos, A. P., Silveri, F., Tenbrinck, R., Kraakslee, R., Tibboel, D., Koster, J. F., & Molenaar, J. C. (1992). Nitrofen-induced diaphragmatic hernias in rats: pulmonary antioxidant enzyme activities. *Pediatr Res*, 32(4), 394-398.

Stewart, C. E., Torr, E. E., Mohd Jamili, N. H., Bosquillon, C., & Sayers, I. (2012). Evaluation of differentiated human bronchial epithelial cell culture systems for asthma research. *J Allergy*, 2012(1), 943982.

Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., & Lander, E. S. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(43), 15545-15550.

Takashima, M., Ogawa, W., Hayashi, K., Inoue, H., Kinoshita, S., Okamoto, Y., Sakaue, H., Wataoka, Y., Emi, A., & Senga, Y. (2010). Role of KLF15 in regulation of hepatic gluconeogenesis and metformin action. *Diabetes*, 59(7), 1608-1615.

Tsai, V. W.-W., Macia, L., Johnen, H., Kuffner, T., Manadhar, R., Jørgensen, S. B., Lee-Ng, K. K. M., Zhang, H. P., Wu, L., & Marquis, C. P. (2013). TGF- β superfamily cytokine MIC-1/GDF15 is a physiological appetite and body weight regulator. *PLoS One*, 8(2), e55174.

Van Mieghem, T., Russo, F. M., Engels, A., De Catte, L., Devlieger, R., Lewi, L., & Deprest, J. (2018). Congenital Diaphragmatic Hernia. *Obstetric Imaging: Fetal Diagnosis and Care* (pp. 124-129. e121). Elsevier.

Vogel, C., & Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet*, 13(4), 227-232.

Wang, L., Xie, C., Sui, J., Yang, J., Zhou, Y., Wang, T., Chen, F., Cui, X., Yang, Y., & Zhang, W. (2025). Microbial degradation of diphenyl ether herbicides past, present and future. *J Environ Chem Eng*, 116357.

Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 10(1), 57-63.

West, J. B., & Luks, A. M. (2020). *West's respiratory physiology*. Lippincott Williams & Wilkins.

Willetts, R. (2012). *Development of a co-culture model of the human lungs for toxicity testing and identification of biomarkers of inhalation toxicity* [Aston University].

Xiao, H., Li, D. X., & Liu, M. (2012). Knowledge translation: airway epithelial cell migration and respiratory diseases. *Cell Mol Life Sci*, 69(24), 4149-4162.

Zhao, S., Fung-Leung, W.-P., Bittner, A., Ngo, K., & Liu, X. (2014). Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. *PLoS One*, 9(1), e78644.

Zhou, Y., Duan, Q., & Yang, D. (2023). In vitro human cell-based models to study airway remodeling in asthma. *Biomed Pharmacother*, 159, 114218.

ÖZGEÇMİŞ



EKLER

EK-1 Etik Kurul Onay Formu Gerekmediğine Dair Yazı

