

İLEYNA ARIMAN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2019



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ZEARALENONUN TOKSİK ETKİLERİNİN İNSAN
BÖBREK HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ**

İLEYNA ARIMAN

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. SİBEL ÖZDEN**

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI**

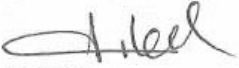
İSTANBUL-2019

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

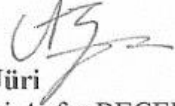
İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü . Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, YÜKSEK LİSANS Programında Yüksek Lisans öğrencisi İLEYNA ARIMAN tarafından Doç.Dr. SİBEL ÖZDEN'in danışmanlığında hazırlanan "Zearalenonun Toksik Etkilerinin İnsan Böbrek Hücrelerinde İncelenmesi " başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından. 27/05/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı**

Prof.Dr. Gül ÖZHAN

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı**Jüri-Danışman**

Doç.Dr. Sibel ÖZDEN

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı**Jüri**

Dr.Öğr.Üyesi Ayfer BECEREN

Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

İleyna ARIMAN



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının başından sonuna elinden gelen her türlü desteği gösteren üzerimde çok fazla emeği olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Sibel Özden'e teşekkürü bir borç bilirim.

Desteklerinden dolayı İ. Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Buket Alpertunga'ya ve kendisinden öğrenilecek çok şey olan ilgisi ve emeği tartışılmaz Ecem Fatma Karaman'a,

Tüm Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlileri ve Çalışanlarına,

Eğitim hayatımın tamamında yanımda olan en büyük destekçim annem Refiye Arıman'a, babam Bülent Arıman'a, hayatımın en keyifli yanları olan kız kardeşim Sebila Arıman, ablam Emine Berbergil ve eniştem Mesut Berbergil'e, bunlardan ayrı olarak daimi desteklerinden dolayı tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2017-26350.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.2. ZEA'nın Detoksifikasyonu	5
2.3. ZEA'nın Farmakokinetik Özellikleri	5
2.3.1. Absorpsiyon	5
2.3.2. Dağılım.....	5
2.3.3. Metabolizma.....	6
2.3.4. Atılım	8
2.4. ZEA'nın Toksik Etkileri	9
2.4.1. Akut Toksisite	9
2.4.2. Kronik Toksisite ve Karsinojenite	9
2.4.3. Üreme Toksisitesi	10
2.4.4. Endokrin Sistem Üzerine Toksik Etkileri	11
2.4.5. Genotoksisite.....	11
2.5. ZEA ile İlgili Yasal Düzenlemeler	12
2.6. DNA Metilasyonu ve Oksidatif Hasarla İlişkili Genler.....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler	17
3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	18
3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler	20

3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	21
3.4.1. Ortamının ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Temizliği	21
3.4.2. Hücre Dizilerinin Temini	21
3.4.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler	21
3.4.4. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Alınması	22
3.4.5. Hücre Kültürünün Devamlılığının Sağlanması (Pasajlama)	22
3.4.6. Hücrelerin Sayılması	23
3.5. ZEA Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanışı	23
3.6. Sitotoksikite Testleri	24
3.6.1. 96 Kuyucuklu Mikroplakalarda Hücre Kültürlerinin Hazırlanması	24
3.6.2. Test Maddesinin, Negatif ve Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması	25
3.6.3. ZEA'nın Hücre Kültürüne Maruziyeti	26
3.6.4. MTT Testi	28
3.6.5. NRU Testi	29
3.6.6. Sonuçların Değerlendirilmesi	30
3.7. Hücre Çoğalması (BrdU) Testi	31
3.7.1. BrdU Testi Esası	31
3.7.2. BrdU Testi Protokolü	32
3.7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi	33
3.8. Reaktif Oksijen Türlerinin Flow Sitometri ile Tayini	33
3.8.1. DCF Testinin Esası	33
3.8.2. DCF Test Protokolü	34
3.8.3. Sonuçların Değerlendirilmesi	34
3.9. ZEA'nın Hücre Dizilerine Maruziyeti	35
3.10. DNA Metilasyonunun Analizi	36
3.10.1. DNA İzolasyonu	36
3.10.2. DNA'nın Saflık ve Miktar Tayini	37
3.10.3. Global DNA Metilasyonunun Tayini	37
3.11. Gen Ekspresyonlarının Tayini	40
3.11.1. Total RNA İzolasyonu	40
3.11.2. RNA'nın Saflık ve Miktar Tayini	41
3.11.3. cDNA Sentezi	42
3.11.4. Gen Ekspresyonunun RT-PCR ile Tayini	43

3.12. Proteinlerin Western Blot Yöntemi ile Tayini	45
3.12.1. Proteinlerin İzolasyonu	45
3.12.2. Proteinlerin Miktar Tayini	46
3.12.3. <i>HSP70</i> Proteinlerinin Western Blot Tekniği ile Tayini	47
3.13. İstatistiksel Değerlendirme	51
4. BULGULAR.....	52
4.1. Sitotoksisite Sonuçları	52
4.2. BrdU Hücre proliferasyonu Testi Sonuçları	52
4.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Flow Sitometri Analizi ile Sonuçları.....	53
4.4. DNA Metilasyonu Sonuçları.....	54
4.5. Oksidatif Hasar Genlerinin Ekspresyonları	56
4.6. Western Blot Sonuçları	59
5. TARTIŞMA	61
KAYNAKLAR	65
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	80
ÖZGEÇMİŞ	81

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: ZEA'nın bazı hayvan türleri üzerindeki doza bağlı toksik etkileri (Zhang ve ark., 2018).....	11
Tablo 2-2: ZEA için izin verilen gıdalar ve maksimum limitleri (28157 sayılı Resmi Gazete, 2011).....	14
Tablo 3-1: RT-PCR ile tayininde kullanılan primer dizileri.....	44
Tablo 3-2: RT-PCR protokolü.....	45



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3-1: 96 kuyucuklu mikropalakaya hücre ekimi.	25
Şekil 3-2: ZEA'nın 1/2 oranında seyreltilmesi.	26
Şekil 3-3: 96 kuyucuklu maruziyet mikropalaka düzeni.	27
Şekil 3-5: 5-mC DNA ELISA kitinin esası.	38
Şekil 4-1: 24 saat 25-200 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde MTT ve NRU testleri sonuçları	52
Şekil 4-2: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde % hücre proliferasyonu (kontrole göre kıyasla) üzerine etkisi.	53
Şekil 4-3: HK-2 hücrelerinin FSC-H/SSC-H kanalında dağılımı.....	53
Şekil 4-4: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde %ortalama floresans şiddetine (%MFI, kontrole kıyasla) etkisi.	54
Şekil 4-5: 5-mC standardına ait kalibrasyon eğrisi.....	54
Şekil 4-6: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde %5-mC seviyeleri	55
Şekil 4-7: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde <i>DNMT1</i> genine ait relative ekspresyon seviyeleri	55
Şekil 4-8: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde <i>MGMT</i> genine ait relative ekspresyon seviyeleri	56
Şekil 4-9: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde <i>L-Fabp</i> ait relative ekspresyon seviyeleri.....	57
Şekil 4-10: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde <i>Nrf2</i> ait relative ekspresyon seviyeleri.....	57
Şekil 4-11: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde <i>Hsp70</i> genine ait relative ekspresyon seviyeleri.....	58
Şekil 4-12: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde <i>α-GST</i> genine ait relative ekspresyon seviyeleri.....	58
Şekil 4-13: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde <i>HO-1</i> genine ait relative ekspresyon seviyeleri	59
Şekil 4-14: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde Hsp70 western blot membran görüntüsü.	59

Şekil 4-15: 24 saat 0-50 μ M konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde Hsp70 protein ekspresyonuna relatif ekspresyon seviyeleri..... 60



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

5-mC	5-Metilsitozin
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
μm	Mikrometre
α -GST	Glutasyon S-transferaz tip α
α -ZAL	α -Zearalanol
α -ZOL	α -Zearalenol
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ALP	Alkalın fosfataz
ALT	Alanin aminotransferaz
APS	Amonyum persülfat
AST	Aspartat aminotransferaz
ATCC	Amerika Hücre Kültür Koleksiyonu
Atm	Atmosfer (Basıç birimi)
β -ZAL	β -Zearalanol
β -ZOL	β -Zearalenol
BrdU	Bromodeoksi üridin
BSA	Sığır serum albumini
cDNA	Komplementer DNA
cm^2	Santimetrekare
CMF-PBS	Kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tampon çözeltisi
CO_2	Karbondioksit
CYP450	Sitokrom P450
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
DCF	Diklorofluoressein
DCFH ₂	Dihidroklorofluoressein
DCFH ₂ –DA	Dihidroklorofluoressein diasetat
dCTP	Deoksisitozin trifosfat
dGTP	Deoksiganizin trifosfat
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit

DNA	Deoksiribonükleik asit
DNaz	Deoksiribonukleaz
DNMT	DNA metiltransferaz
dTTP	Deoksitimin trifosfat
EC	Avrupa Komisyonu
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi ‘European Food Safety Authority’
ELISA	Enzime bağlı immunosorbent deneyi
ER	Östrojen reseptör
ER α	Östrojen reseptör alfa
ER β	Östrojen reseptör beta
FBS	Fetal sığır serumu
FSC	İleri dağılım (‘Forward scatter’)
g	Gram
GC	Hücre büyüme kontrolü
GSH	Glutasyon
HCl	Hidroklorik asit
HK-2	İnsan böbrek epitel hücreleri
HO-1	Hem oksijenaz 1
Hsp70	Isı soku protein 70
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü
IC ₅₀	%50 oranında hücre ölümüne sebep olan konsantrasyon
JECFA	Dünya Sağlık Örgütü’nün Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Uzman Komitesi
KCl	Potasyum klorür
Kg	Kilogram
KSFM	Keratinosit serum içermeyen besiyeri
L	Litre
LD ₅₀	Medyan letal doz
L-Fabp	Karaciğer tipi yağ asidi bağlayıcı protein
LH	Lüteinleştirici hormon
LOAEL	Advers etkinin gözlemlendiği en düşük düzey MMolar
MCF-7	İnsan meme kanseri hücre dizisi
mg	Miligram

MgCl ₂	Magnezyum klorür
MGMT	O ⁶ -Metilguanin- DNA-metiltransferaz
mL	Mililitre
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NaCl	Sodyum klorür
nm	Nanometre
NOAEL	Gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen düzey
NOEL	Gözlenebilen Hiçbir etki göstermeyen düzey
Nrf2	Eritroid-2 ile ilişkili nükleer faktör 2
NRU	Nötral kırmızı alımı
O ₂	Oksijen
PBGD	Porfobilinojen deaminaz
PC	Pozitif kontrol grubu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
POD	Peroksidaz
ppb	Milyarda bir
RIPA	Radyoimmünopresipitasyon lizis tamponu
PVDF	Polivinilidin florür transfer membranı
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Dakikada dönüş
RT-PCR	Gerçek zamanlı termal döngü cihazı
SC	Çözücü kontrol grubu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
sn	Saniye
SSC	Yan dağılım ('Side scatter')
SULT	Sülfotransferazlar
TEMED	Tetrametiletilediamin
TMB	Tetrametilbenzidin
TNF- α	Tümör nekroz faktör alfa
UGT	Uridinedifosfat-glukuronoziltransferazlar
UV	Ultraviyole (Mor ötesi)
v.a.	Vücut ağırlığı
WHO	Dünya Sağlık Örgütü 'World Health Organization'

ZAN	Zearalanon
ZEA	Zearalenon



ÖZET

Arıman, İ. (2019). Zearalenonun Toksik Etkilerinin İnsan Böbrek Hücrelerinde İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Zearalenon (ZEA) bazı mantar türlerinden elde edilen dünya genelinde yaygın olarak bulunan bir mikotoksindir. Kimyasal yapısının östradiol benzerlik göstermesi sebebiyle üreme sistemi üzerine olan toksik etkileri ön plana çıkmaktadır. ZEA'nın toksik etkilerini aydınlatmak amacıyla yapılmış çeşitli hayvan deneyleri olsa da toksisite mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Yüksek Lisans tezi çalışmasında insan böbrek hücreleri (HK-2) üzerinde ZEA maruziyetinin doza bağlı toksik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda ZEA'nın HK-2 hücrelerinde sitotoksikite, hücre proliferasyonu, reaktif oksijen türleri (ROS), DNA metilasyonu ve *DNMT1*, *MGMT*, α -*GST*, *Hsp70*, *Nrf2*, *L-Fabp* ve *HO-1* genlerinin ekspresyonları üzerine etkileri incelenmiştir. HK-2 hücrelerinde ZEA'nın IC₅₀ değerleri MTT ve NRU testlerine göre sırası ile 133,42 ve 101,74 μ M olarak bulunmuştur. BrdU hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre 1, 10, 50 μ M konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti ile sırasıyla %2,1; %11,07 (p<0,05); %24,34 (p<0,001) oranında azalma görülmüştür. ROS seviyelerinde 1, 10, 50 μ M konsantrasyonlarda ZEA maruziyeti ile sırasıyla %27,69 (p<0,05); %64,25 (p<0,001) ve %103,82 (p<0,001) oranında anlamlı artış bulunmuştur. Global 5-metilsitozin seviyelerinde tüm maruziyet gruplarında anlamlı bir değişiklik gözlenmiş olup, *DNMT1* ve *MGMT* genlerinin ekspresyonlarında ise anlamlı bir artış ortaya çıkmıştır. Oksidatif hasarla ilişkili α -*GST*, *Hsp70* ve *HO-1* genlerinde anlamlı artış gözlenirken, *L-Fabp* geninde anlamlı azalma gözlenmiştir. *Nrf2* geninde ise herhangi bir değişiklik bulunmamıştır. Elde edilen bu sonuçlar ile DNA metilasyonunda değişikliklerin ve oksidatif hasarın ZEA'nın toksisitesinde önemli bir rolünün olabileceği ortaya çıkmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Zearalenon, Hücre çoğalması, Reaktif oksijen türleri, DNA metilasyonu, HK-2 hücreleri

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2017-26350.

ABSTRACT

Ariman, I. (2019). Investigation of Toxic Effects of Zearalenone on Human Kidney Cells. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Toxicology. Master Thesis. İstanbul.

Zearalenone (ZEA) is a mycotoxin that is widely found worldwide produced by several fungal species. Due to its similarity to estradiol, its toxic effects on the reproductive system has been shown. Although various animal studies have been conducted to elucidate the toxic effects of ZEA, the mechanisms of toxicity have not been fully elucidated. The aim of this Master Thesis is to investigate the dose dependent toxic effects of ZEA exposure in human kidney cells (HK-2). For this purpose, the effects of ZEA on cytotoxicity, cell proliferation, reactive oxygen species (ROS), DNA methylation and expression of *DNMT1*, *MGMT*, α -*GST*, *Hsp70*, *Nrf2*, *L-Fabp* and *HO-1* genes in HK-2 cells were investigated. IC₅₀ values of ZEA in HK-2 cells were found to be as 133.42 and 101.74 μ M according to MTT and NRU tests, respectively. ZEA exposure at the concentrations of 1, 10 and 50 μ M decreased the BrdU cell proliferation by 2.1%, 11.07% ($p < 0,05$) and 24.34% ($p < 0,001$), respectively. ROS levels were found to be significantly increase with 1, 10 and 50 μ M concentrations of ZEA as (27.69%), 64.25% and 103.82%, respectively. Significant change was observed at the levels of global 5-methylcytosine in all exposure groups, while expression of *DNMT* and *MGMT* genes increased significantly. A significant increase was observed in the expressions of α -*GST*, *Hsp70* and *HO-1* genes which are associated with oxidative damage, while a significant decrease in *L-Fabp* gene was observed. No change was found in the *Nrf2* gene. These results indicate that changes in DNA methylation and oxidative damage may have an important role in the toxicity of ZEA.

Key Words: Zearalenone, Cell proliferation, Reactive oxygen species, DNA methylation, HK-2 cells

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TYL-2017-26350.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikotoksinler *Fusarium*, *Aspergillus* veya *Penicillium* gibi mantar türleri tarafından üretilen özellikle ekim ve depolama süreçleri esnasında ortaya çıkan sekonder metabolitlerdir (Lee ve ark., 2010). Bunlar hayvan ve insanlar üzerindeki toksik etkileri sebebiyle dünya genelinde gittikçe artan bir öneme sahiptir. (Sforza ve Dall'Asta, 2006). Zearalenon (ZEA) [6-(10-hidroksi-6-okso-trans-1-undesenil)-*b*-resorsiklik asit lakton] yapısında *Fusarium* türleri tarafından üretilen bir mikotoksindir. ZEA 164-165°C'lik bir erime noktasına sahip, ultraviyole (UV) absorpsiyonunda 264 nm'de maksimum absorpsiyon gösteren beyaz kristal bir granüldür. Hidrofobik yapısından dolayı suda çözünmese de suda çözünebilen alkali ve diğer organik çözücülerde çözünebilir. Isıya dayanıklı olması depolama ve işleme sırasında yüksek sıcaklıktan etkilenmemesine sebep olur (EFSA, 2004).

ZEA gibi pek çok *Fusarium* toksini gıda ve hayvan yemlerinde yaygın olarak bulunur ve insan, hayvan ve bitkilerde çeşitli hastalıklara sebep olabilir (Lattanzio ve ark., 2012). ZEA ile kontamine olmuş tahıl ürünlerinin ticareti de dünya genelinde dağılım gösterir (Zinedine, 2007). İnsan ve hayvanlarda ZEA maruziyeti ZEA ve metabolitleriyle kontamine olmuş tahılların tüketimi ile gerçekleşebilir. ZEA hormonal etkisinden dolayı hayvanların gelişimi için kullanılan büyüme hormonları arasında yer alır. Amerika Birleşik Devletleri (A.B.D.) gibi bazı ülkelerde et üretimini arttırmak için ZEA ve metaboliti α -Zearalanol (α -ZAL) kullanımı yasaldır. Ancak, hormonal etkiye sahip her bileşiğin olası genotoksik ve karsinojenik etkisinden dolayı (ZEA için her iki durum da olasıdır) bu uygulama Avrupa Birliği üye ülkelerinde yasaklanmıştır (Moss, 2002). Dolayısıyla, ZEA'ya maruz kalmış veya gelişimi için α -ZAL verilmiş hayvanlardan elde edilen et, süt ve yumurta gibi gıdalarda da ZEA ve metabolitlerine rastlanabilir (Ashiq, 2015; Zain, 2011).

ZEA, memeli östrojen reseptörüne kompetitif olarak bağlanarak hiperöstrojenizm ve üreme sistemi bozuluklarına sebep olur (Kuiper-Goodman ve ark., 1987). Ayrıca, ZEA'nın gelişimsel toksisite, immünotoksisite ve genotoksisite gibi toksik etkileri de raporlanmıştır (Zinedine ve ark., 2007) Akut toksisitesi subakut toksisitesine göre düşüktür. Sıçanlarda oral yol ile %50 letal dozunun (LD₅₀) 4000 mg/kg/vücut ağırlığı (v.a)'dan fazla olduğu beirlenmiştir (NTP, 1982). Düşük

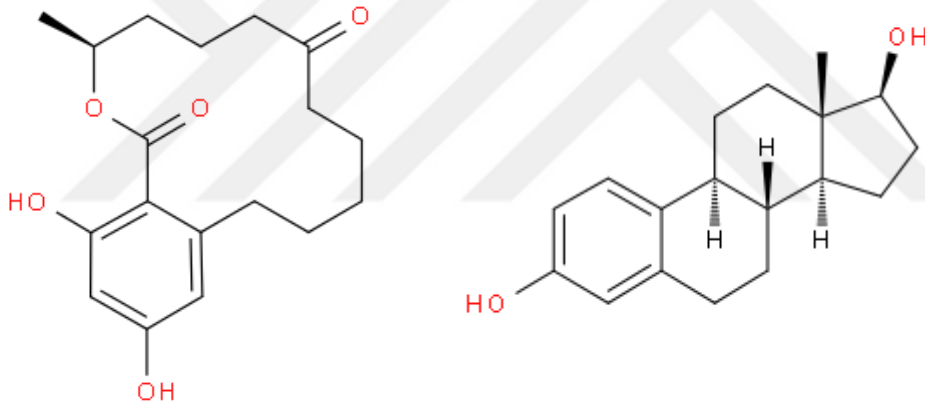
toksisitesine bağlı olarak Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (IARC) tarafından Grup 3 karsinojenler (kanserojen olarak sınıflandırılmayanlar) sınıfına alınmıştır (IARC, 2016). ZEA, farklı doz ve hücre tiplerinde toksik etkisini farklı mekanizmalarla gösterir. Düşük dozlarda östrojen benzeri etkiler göstererek hücrelerin çoğalmasını uyardığı bildirilmiştir. Yüksek dozlarda ise oksidatif stres, DNA hasarı, mitokondriyal hasar, hücre döngüsü engelleme ve apoptozu indüklemeye gibi mekanizmalarla hücre ölümüne neden olabilir. Testisler, yumurtalık, meme bezleri, uterus, vajina, epididim ve prostat gibi östrojen reseptörlerini eksprese edebilen dokulardaki hücrelerde östrojen benzeri etkiler sergileyebilir (Seng ve ark., 2001)

Tez çalışmasında ZEA'nın doza bağlı olarak gelişen toksisitesinde, oksidatif hasar ve nefrotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, ZEA'nın insan böbrek hücrelerinde (HK-2) sitotoksitesi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerinin incelenmesi, global DNA metilasyonu, *DNMT* (DNA-Metiltransferaz), *MGMT* (*O*⁶-Metilguanin-DNA-Metiltransferaz), *Hem oksijenaz 1* (*HO-1*), *karaciğer tipi yağ asidi bağlayıcı protein* (*L-Fabp*), *glutasyon transferaz tip α* (*α-GST*), *ısı çok protein 70* (*HSP 70*), *eritroid-2 ile ilişkili Nükleer faktör 2* (*Nrf2*) gibi hem oksidatif hasar hem de nefrotoksisite ile ilgili genlerde gen ve protein düzeyinde ekspresyonları üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. ZEA'nın nefrotoksik etkileri ile ilgili toksisite mekanizmasına ait çalışmaların eksikliği de göz önüne alındığında, ulusal ve uluslararası literatüre önemli katkı sağlayacağı düşünölmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Zearalenon

Zearalenon (ZEA) *Fusarium* türleri tarafından üretilen östrojenik yapıda bir mikotoksindir. Özellikle mısır, arpa, yulaf ve buğday gibi tahıllarda yaygın olarak görülür (Samir Abbès ve ark., 2006). Zearalenon makrosiklik β -resorsiklik asit lakton yapısında, *Fusarium* türlerinden özellikle *F. culmorum*, *F. roseum*, *F. graminearum*'un sekonder metaboliti olan nonsteroidal östrojenik bir mikotoksindir. Kimyasal yapısının doğal östrojenlere benzemesi nedeniyle östrojenik etki gösterir (Caldwell ve ark., 1970; Kuiper-Goodman, ve ark., 1987; Hestbjerg, ve ark., 2002). ZEA ve östradiolün kimyasal yapısı Şekil 2-1'de gösterilmiştir.



Zearalenon

Östradiol

Şekil 2-1: ZEA ve östradiolün kimyasal yapısı (www.chemspider.com)

Fusarium cinsinin mikotoksin üreten mantarları, tüm iklim bölgelerinde yetişebilen en yaygın türdür. Mikoöstrojen olan ZEA, östrojenik özelliklere sahip başlıca mikotoksinlerden biridir (Hueza ve ark., 2014). Bu mantarların dünyanın neredeyse tamamında bulunması insan ve hayvan gıdalarında sıklıkla görülmesine yol açar (Zinedine ve ark., 2007). ZEA'nın sıklıkla görüldüğü Avrupa'da 5010 tahıl örneğiyle yapılan bir çalışmada tahıl örneklerinin %32'sinde ZEA'ya rastlanılmıştır (Schothorst ve van Egmond, 2003). ZEA normal pişirme sıcaklıklarında stabilitesini korurken çok yüksek sıcaklıklarda etkisini kaybeder (Castelo ve ark., 1998). İnsanlar ZEA'ya kontamine olmuş gıdalarla doğrudan maruz kalabilecekleri gibi dolaylı olarak

mikotoksin maruziyetine uğramış hayvansal ürünler yoluyla da maruz kalabilirler. Üretim sürecinde ZEA gıdalardan uzaklaştırılmadığı için başta tahıl, et, süt, şarap, bira, kurutulmuş meyveler ve baharatlar olmak üzere bir dizi gıda ürününden tüm insan besin zincirini etkiler. ZEA ayrıca *Fusarium graminearum* mantarı ile kontamine olmuş su ile de bulaşabilir (Kriszt ve ark., 2012).

Oral maruziyetten sonra ZEA hızla emilip bağırsak dokusu ve hepatositler tarafından metabolize edilir. Bu metabolizma reaksiyonu ZEA'nın biyolojik olarak aktif temel iki indirgeyici metaboliti olan α - ve β -zearelenol'e dönüşümünü başlatır. ZEA ve metabolitlerinin östrojenik aktivitesi östrojen reseptörlerine (ER) bağlanma afiniteleri ile ilişkilidir. ER'lerin iki alttipi olan ER α ve ER β 'nin memeli dokularında eksprese olduğu bilinmekte ve ZEA bu iki alttipten çoğunlukla ER α 'ya daha yüksek afinite göstermektedir (Avrupa Gıda Güvenlik Otoritesi-Gıda Zincirinde Bulaşanlar Paneli 'European Food Safety Authority-The Panel on Contaminants in the Food Chain', EFSA-CONTAM Panel, 2011). Uterus, meme bezi, kemik, beyin gibi östrojene duyarlı organlar her iki ER'yi de içerir. Ayrıca immün sistem hücrelerinin de kendi ER'leri vardır. (Lang, T.J., 2004). Reseptör-ZEA konjugatı, östrojen yanıtı elementlere bağlanan nükleusta translokasyona sebep olur. Ayrıca hedef gen transkripsiyonunu aktive edebilir ve çeşitli organlarda östrojen benzeri yanıt oluşturabilir (Mirocha ve ark., 1981; Etienne ve Dourmad, 1994; Bovee ve ark., 2004; Metzler ve ark., 2010).

İnsanlarda ergenlik öncesi ZEA maruziyeti ile erken ergenlik arasında bir ilişki olabileceği ve kadınlarda ZEA duyarlılığının erkeklerden daha yüksek olabileceği bildirilmiştir. Laboratuvar ve çiftlik hayvanlarında dişi üreme sistemi üzerinde yapılan çeşitli *in vivo* çalışmalarda, ZEA'nın üreme organlarında işlevsel değişikliklere, embriyo-letal rezorpsiyonda artışa, doğurganlıkta düşüşe ve hormon seviyelerinde değişikliklere neden olabileceği gösterilmiştir (Kuiper-Goodman ve ark., 1987; D'mello ve ark., 1990; Collins ve ark., 2006; Massart ve Saggese, 2010). Ayrıca, gebelik sırasında ZEA maruziyeti ile fetusun henüz tamamlanmamış immün sistem yapısından dolayı toksik etkilerin daha da belirginleşebileceği üzerinde durulmaktadır (Nikaido ve ark., 2004; Massart ve Saggese, 2010).

EFSA-Gıda Zincirinde Bulaşanlar Paneli, dişi domuzlarda östrojenik etkiler için (kızarıklık/şişmiş vulva ve serviks, rahim ağırlığında artış gibi) 'etki gözlenmeyen seviye'('No Observed Effect Level', NOEL) değerine (10 μ g/kg/v.a./gün) dayanarak

ZEA için tolere edilebilir günlük alım ('Tolerable Daily Intake', TDI) değerini 0,25 µg/kg/v.a. olarak belirlemiştir (EFSA-CONTAM Panel, 2011).

2.2. ZEA'nın Detoksifikasyonu

ZEA detoksifikasyonu, ZEA'nın toksik etkilerini tamamen veya kısmi olarak ortadan kaldırmak için yapılan biyolojik, kimyasal ve fiziksel işlemlere dayanır. Yüksek konsantrasyonda ozon (O₃) (McKenzie ve ark., 1997), H₂O₂ ve sıcaklık kullanılarak kısmi bir etki sağlanabilir (Abd Alla, 1997).

Bitkilerde ZEA kontaminasyonunun en önemli sebebi böceklerdir. Bu yüzden böcek yayılımının azaltılması mikotoksin maruziyetinin sıklığını azaltmakta işe yarayabilir. Kuzey Avrupa'da kullanılan insektisidlerle mikotoksin varlığında önemli bir düşüş görülmüştür (Bernhoft ve ark. 2012).

Biyolojik kontrol ajanlarının uygulanmasının da ZEA maruziyeti ve *Fusarium* kolonizyonları üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Bu yöntem antifungal metabolitler üretilip savunma cevabını indükleyen veya ortamdaki besin için rekabet edip buna bağlı olarak mikotoksin seviyelerini düşüren bakteri ve mantarları kullanmayı içerir. Antioksidanlar gibi biyoaktif bileşiklerin kullanımı da önerilmiştir, ancak ısı, ışık, oksijen vb. karşısındaki bozulma hassasiyetleri, gıdalardaki mikotoksinlerin kontaminasyonunu önlemek amacıyla kullanımlarını önemli ölçüde azaltır (Ferrigo ve ark., 2016).

2.3. ZEA'nın Farmakokinetik Özellikleri

2.3.1. Absorpsiyon

ZEA, sıçan, tavşan, domuz ve insanlarda oral alımda yüksek oranda ve hızla emilir (Kuiper-Goodman ve ark., 1987). Domuzlarda 10 mg/kg'lık tek bir oral uygulamadan sonra toplam absorpsiyonun %80-85 olduğu tahmin edilmektedir. (Biehl ve ark., 1993). Sıçanlarda ise ZEA'nın oral ve intravenöz (i.v.) uygulamada biyoyararlanımı %2,7'dir. Bu düşük biyoyararlanım ZEA'nın presistemik metabolizması ile ilişkilidir.

2.3.2. Dağılım

Konjuge olmayan ZEA'nın erkek sıçanlarda eliminasyon yarı ömrü i.v. uygulama için 0,6-2,8 saat, oral uygulama için 16,8 saattir. Safra kanalı delikli olan sıçanlarda yapılan oral uygulamadan sonra ise 7 saattir. Bu sonuçlar sıçanlardaki ZEA

metabolizması ve yerleşiminde enterohepatik siklusun önemli olduğunu göstermiştir. Erkek sıçanlarda, ZEA sırasıyla böbrek, karaciğer, yağ dokusu, akciğer, kalp, dalak, kas, beyin ve testisler olmak üzere gastrointestinal sistem dışındaki dokularda yaygın olarak dağılır (Shin ve ark., 2009).

ZEA, α -Zearalenol (α -ZOL) ve β -Zearalenol (β -ZOL)'un konjuge olmayan ve glukuronit formları domuz karaciğerinde tayin edilmiş, α -ZOL ve β -ZOL'ün konjuge olmayan ve sülfat konjugatları domuz kasında tespit edilmiştir (Zöllner ve ark., 2002). Domuzlarda ZEA'nın plazmadan kaybolması ZEA'nın α -ZOL ve glukuronit konjugatının oluşumu ile yakından ilişkilidir (Biehl ve ark., 1993). Bu bulgu, ZEA ve α -ZOL glukuronit konjugatlarının, i.v. uygulamadan sonra domuzlardaki majör metabolitler olarak tespit edildiği diğer çalışmalarla da uyumludur.

α -ZOL'ün plazma zaman-konsantrasyon profili, ZEA'dan farklıdır, çünkü α -ZOL için herhangi bir dağılım fazı gözlemlenmemiştir. α -ZOL'ün 2,94 saatlik eliminasyon yarı ömrü, ZEA'nın 2,63 saatlik eliminasyon yarı ömrüne yakındır (Dänicke ve ark., 2005a). ZEA ve α -ZOL'ün plasentadan geçişi, i.v. uygulama yapılan sıçanlarda gösterilmiştir. Prelusky ve ark. (1990) tarafından inek sütünde ZEA, α -ZOL ve β -ZOL'ün dağılımının incelendiği bir çalışmada, verilen 6 g/kg/gün dozunda ZEA uygulandıktan sonra sütte maksimum seviyeleri ZEA için 6 ng/mL, α -ZOL için 4 ng/mL ve β -ZOL için 7 ng/mL şeklinde ölçülmüştür. Buna karşılık plazmada ölçülen ZEA seviyesi 13 ng/mL'ye denk gelmektedir.

2.3.3. Metabolizma

ZEA'nın *in vivo* metabolizması, çeşitli hayvan türleri ve insanda araştırılmıştır. Hayvanlarda ZEA için üç önemli biyotransformasyon olduğu bildirilmiştir. ZEA'nın enzimatik redüksiyonu 3α - ve 3β -hidroksteroidler tarafından katalize edilir. Bunun sonucu olarak α - ve β -ZOL ve az miktarda diğer türevleri oluşur. Şekil 2-2'de gösterildiği üzere, ZEA'nın hayvanlarda oluşan metabolitleri: α -ZOL, β -ZOL, α -zearalenol (α -ZAL), β -zearalenol (β -ZAL) ve az miktarda zearalanon (ZAN) gibi indirgenmiş faz I metabolitleri ve ZEA'nın glukoz, sülfat ve glukuronik asit ile konjuge faz II türevleridir (Metzler ve ark., 2010; Berthiller ve ark., 2013). ZEA'nın birincil indirgenmiş formlarının sitosolik ER'lere bağlanma afinitesi farklıdır ve MCF-7 (insan meme kanseri hücre hattı) hücre proliferasyonuna bağlı olarak farklı östrojenik etki

hidroksillenmesinde en etkili enzimlerin CYP2C8 ve CYP3A4/5 olduğunu göstermiştir. ZEA'nın hepatik mikrozomlar ile ilişkili *in vitro* metabolizmasına dayanarak, insanda diğer türlere oranla daha az miktarda C6/8 hidroksi-ZEA oluştuğu bildirilmiştir (maymun > köpek > tavşan > sıçan > insan > fare). ZEA katekollerinin östrojenik özellikleri bilinmemekle birlikte, alifatik C6/8 hidroksi-ZEA, insan ER α ve ER β ile transkripsiyonel aktivasyona bağlı olarak, ana bileşiğe göre daha az aktivite göstermektedir (Bravin ve ark., 2009).

ZEA ve indirgenmiş metabolitlerinin glukuronik asit ve sülfat ile faz II konjugasyon reaksiyonları, sırasıyla, uridinedifosfat-glukuronosiltransferazlar (UGT) ve sülfotransferazlar (SULT) ile katalize edilir. *İn vitro* çalışmalara göre ZEA, α - ve β -ZOL ve redüklenmiş metabolitleri olan α - ve β -ZAL, insanlarda ve çeşitli hayvan türlerinde karaciğer, bağırsak ve diğer ekstrahepatik organlarda kolayca glukuronize edilir. Karaciğer ve bağırsak insan mikrozomlarının sorumlu olduğu glukuronizasyonda tüm UGT'ler içinde en yüksek aktivite UGT1A1, 1A3 ve 1A8'e aittir. *İn vivo* olarak da ZEA ve indirgenmiş metabolitlerinin insan bağırsağı, karaciğer ve muhtemelen ekstrahepatik dokularda kolayca glukuronize olabildiği tahmin edilmektedir. İnsan karaciğer mikrozomal UGT'leri ile yapılan *in vitro* çalışmalar da, *in vivo* olarak oluşan temel glukuronitin 14-O-glukuronit olabileceğini vurgulamaktadır (Pfeiffer ve ark., 2010). ZEA maruziyeti yapılan domuzların sirkülasyonunda faz II konjuge formlarının çoğunlukta olduğu gösterilmiştir (Biehl ve ark., 1993; Dänicke ve ark., 2005b).

2.3.4. Atılım

Domuzlara 5 mg/kg/v.a. (i.v.) ve 10 mg/kg/v.a. (oral) dozlarında 3H-işaretli ZEA uygulanan bir çalışmada, radyoaktivite yüzdesi sırasıyla idrarda %57 ve %45, feçeste %7 ve %22 oranlarında ZEA tayin edilmiştir (Biehl ve ark., 1993) Sıçanlarda ise uygulanan dozun (1-100 mg/kg/v.a.) yaklaşık %55'i feçes ile, %15-20'si idrarla atıldığı bildirilmiştir (Fitzpatrick ve ark., 1988). Feçes ve idrarda esas olarak konjuge olmayan formlar bulunmaktadır. Sıçanlarda uygulanan dozun yaklaşık %10'u α -ZOL olarak atılır. 100 mg'lık tek bir oral uygulamadan sonra erkek idrarında sadece ZEA, α - ve β -ZOL'e ait konjugatlar bulunmuştur. Bunlar sırasıyla; 6 saat sonunda 3,7 μ g/mL, 3 μ g/mL ve < LOD; 12 saat sonunda 6,9 μ g/mL, 6 μ g/mL, ve 2,7 μ g/mL; 24 saat sonunda 2,7 μ g/mL, 4 μ g/mL ve 2 μ g/mL olarak ölçülmüştür (Mirocha ve ark., 1981).

2.4. ZEA'nın Toksik Etkileri

ZEA ve metabolitlerinin toksik etkileri östrodiol benzer kimyasal yapılarıyla ilişkilidir. Bu nedenle pek çok hayvan türünün üreme sistemi üzerine ciddi yan etkilere sebep olabileceği bilinmektedir (EFSA, 2017). Ayrıca bilinen etkili bir antidotu yoktur. (Cortinovis ve ark., 2013).

2.4.1. Akut Toksisite

Yapılan çalışmalar, ZEA'nın akut toksik etkisinin düşük olduğunu gösterirken (fare, sıçan ve gine domuzları için oral LD₅₀ değeri >2000-20000 mg/kg/v.a.) yine oral alımda ER'lerle bağlanmasıyla ilişkili kronik toksik etkiler gözlenmiştir (Flannigan, 1991).

2.4.2. Kronik Toksisite ve Karsinojenite

ZEA'nın karaciğer lezyonlarının oluşumunu indükleyerek hepatokarsinom gelişimine sebep olabileceği bildirilmiştir. B6C3F1 fareleri, 103 hafta boyunca erkeklerde 0, 8 ve 17 mg/kg/v.a./gün, dişilerde 0,9 ve 18 mg/kg/v.a./gün dozlarına eşdeğer olacak şekilde çeşitli ZEA konsantrasyonlarını (0, 50 ve 100 mg/kg) içeren diyetler ile beslendiğinde hayatta kalma oranları veya ağırlık değişimlerinde dikkate değer bir fark görülmemiştir. Erkek farelerde tedaviye bağlı neoplastik olmayan lezyonlar görülmezken dişilerde kemik iliğinde miyelofibroz gelişmesiyle birlikte rahim içinde fibroz, meme bezlerinde kistik kanallar gibi bazı dokularda doza bağlı östrojenik etkiler de görülmüştür. Hepatoselüler adenomlar erkek ve dişilerde 0, 50 ve 100 mg/kg konsantrasyonlarda maruziyette sırasıyla %8, %6 ve %14 ve %0, %4 ve %14 olarak belirlenmiştir. Hem erkek hem de dişilerde hipofiz adenomu insidansının istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (NTP, 1982).

FDRL Wistar farelerinin 103 hafta boyunca uygulanan ZEA maruziyetiyle, 3 mg/kg/v.a. dozda erkek ve dişilerde karaciğer ağırlığında belirgin bir artış gözlenmiştir. Bunun yanında, dişilerde en yüksek doz grubunda rahim ağırlığında artış ve femurun trabekülasyonu görülmüştür (Becci ve ark., 1982). ZEA'nın hematotoksik etki gösterebileceği de belirtilmiştir. Maaroufi ve ark. (1998) çalışmasında 1,5; 3 ve 5 mg/kg intraperitoneal olarak ZEA uygulanan dişi sıçanlarda aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalın fosfataz (ALP), serum kreatinin, bilirubin gibi biyokimyasal parametrelerin değiştiği, kan pıhtılaşma sürecinde fonksiyon bozukluğu

ve diğer kan parametrelerinde (hematokrit, platelet sayısı vb) değişiklikler gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalar, ZEA'nın östrojen yanıt reseptörleri içeren insan meme kanseri hücrelerinin büyümesini tetikleyici etkiye sahip olabileceğini göstermiştir (Ahamed ve ark., 2001). ZEA'nın östrojenik etkileri, dünya genelinde gıdalarda yüksek oranda bulunması ile aynı zamandaki meme kanseri insidansındaki artış birlikte düşünüldüğünde ZEA'nın meme kanseri oluşumunu tetikleyebileceği düşünülmüştür. (Yu ve ark., 2005).

2.4.3. Üreme Toksisitesi

Hamilelik esnasında belirli bir dozun üzerinde ZEA maruziyetinin embriyonik hayatta kalma oranını ve fetal ağırlığı azaltabileceği vurgulanmıştır (D'Mello ve ark., 1999). ZEA, 17β -Estradiol'e benzer şekilde steroid hormonların salınımını inhibe edip, preovulasyon aşamasında östrojenik cevapta bozukluklara neden olduğu ve memelilerde yumurtalık foliküllerinin olgunlaşmasını baskıladığı bildirilmiştir. ZEA'nın östrojen döngüsü üzerindeki etkileri doza ve maruziyet süresine bağlı olarak değişir (Katzenellenbogen ve Korach, 1997). ZEA, Lüteinleştirici hormon (LH) ve progesteron salgısını azaltarak ve uterus dokularının morfolojisini değiştirerek uterusu etkileyebilir. ZEA'nın feminizasyonu indüklerken serum testosteron düzeyini, testis ağırlıklarını ve spermatogenezi azaltıp libidoyu baskılayabileceği belirtilmiştir (Etienne ve Dourmad, 1994). İneklerde infertilite, süt üretiminde azalma ve hiperöstrojenizm ZEA ile ilişkilendirilmiştir (D'Mello ve ark., 1999). ZEA'nın fare, sıçan, kobay, hamster, tavşan gibi laboratuvar hayvanlarının ve evcil hayvanların üreme sisteminde değişikliklere sebep olabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu değişiklikler fertilitede azalma, embriyöetal rezorpsiyonların artması, düşük doğum ağırlığı, adrenal, tiroid ve hipofiz bezlerinin ağırlığında değişiklik ve progesteron ve östradiol serum seviyelerinde farklılıklar olarak gözlenmiştir. Ancak fare, sıçan, kobay ve tavşanda teratojenik etkiler gözlenmemiştir. Domuz ve koyunların kemirgenlere kıyasla daha duyarlı olduğu görülmüştür (Kuiper-Goodman ve ark., 1987; Bacha ve ark., 1993; 'Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives', JECFA, 2000).

ZEA'nın üreme sistemi üzerine toksik etkileri Zhang ve ark. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada derlenmiştir (Tablo 2-1).

Tablo 2-1: ZEA'nın bazı hayvan türleri üzerinde doza bağlı toksik etkileri

Tür	Kontaminasyon	Süre	Toksik etki	Kaynak
Dişi Domuz	Doğal kontaminasyon veya saf ZEA uygulaması	-	Anöstrus, vulvovajinit, LH ve progesteron salımında azalma	Etienne ve dourmad, 1994
At	Doğal kontaminasyon % 2,6 mg/kg	-	ZEA Mikotoksikoz salgını	Minervini ve ark., 2006
İnek	250 mg %99 saflaştırılmış ZEA	1 gün	İnfertilite ve süt üretiminde düşüş	Weaver ve ark., 1986
Sıçan	1,5-3 ve 5 mg/kg ZEA	-	Kan ve biyokimyasal parametrelerde değişiklikler, karaciğer toksisitesi belirtileri	Maaroufi ve ark., 1996
Fare	5-30 µM saf ZEA / hayvan	1-10 gün	Östrojen benzeri etkiler, gecikmiş vajinal açıklık, kalıcı östrus ve sterilite	Ito ve Ohtsubo, 1994

2.4.4. Endokrin Sistem Üzerine Toksik Etkileri

ZEA ve bazı metabolitleri östrojen reseptörlerine kompetitif olarak bağlanır. Hipofiz hücre hattında ZEA ER'ye 17β-estradiol ile kıyaslandığında 0,01 kat afiniteyle bağlanır ve prolaktin atılımını artırır (Kuiper ve ark., 1998; Stahl ve ark., 1998). Sinomolgus maymunlarında yapılan 90 günlük bir çalışmada hormonal etki görülmeyen seviye (NHEL) değeri <50 µg/kg v.a./gün bulunurken rheus maymunlarında yapılan 10 günlük bir çalışmada ise NHEL değeri 225 µg/kg/v.a./gün olarak bulunmuştur (Kuiper-Goodman ve ark., 1987). ZEA'nın α-ZOL'den daha az östrojenik olduğu, bu sebeple daha yüksek bir NHEL değeri ortaya çıkarabileceği öne sürülmüştür (Kuiper-Goodman ve ark., 1987). ZEA ve türevleri için sıçan uterus sitoplazmik reseptörüne bağlanma afiniteleri sırasıyla α-ZAL>α-ZOL>β-ZAL>ZEA>β-ZOL şeklindedir (Kuiper-Goodman ve ark., 1987; Eriksen ve Alexander, 1998). Minervini ve ark. (2005) ZEA ve türevlerinin, daha yüksek bir östrojenik aktiviteye neden olan α-zearalenol hariç, benzer östrojenik yanıtlar gösterebileceğini bildirmişlerdir.

2.4.5. Genotoksisite

ZEA'nın genotoksik etki gösterebileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Sığır lenfositlerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda DNA hasarı oluşumunu; Displastik Oral Keratinositlerde (DOK), Afrika yeşil maymunu böbrek epitel hücre hattında (Vero) ve insan kolon epidermal adenokarsinoma hücrelerinde (Caco-2) , Vero hücrelerinde ve

fare kemik iliği hücrelerinde DNA fragmentasyonu ve mikroçekirdek üretimini indükleyebileceği belirtilmiştir (Ouanes ve ark., 2003; Abid-Essefi ve ark., 2003, 2004; Lioi ve ark., 2004) Başka bir *in vitro* çalışmada eksojen kaynaklı metabolik aktivasyon yokluğunda Çin hamster yumurtalık hücrelerinde kardeş kromatid değişimleri, kromozomal aberasyonları ve poliploidiyi indükleyebileceği gösterilmiştir. Ayrıca ZEA'nın mitokondri ve/veya lizozomları hedef aldığını, lipid peroksidasyonunu ve hücre ölümünü indükleyerek protein ve DNA sentezini inhibe edebileceği gösterilmiştir (Kouadio ve ark., 2005). Cetin ve Bullerman (2005a) ZEA'nın memeli hücre kültürlerinde daha az sitotoksikite gösterdiğini bildirmişlerdir.

2.5. ZEA ile İlgili Yasal Düzenlemeler

F-2 toksini olarak da bilinen ZEA, pek çok *Fusarium* türü tarafından üretilen steroid olmayan bir östrojenik mikotoksindir. ZEA bir dizi tahıl ve türevlerinde bulunmakta olup, çiftlik hayvanlarında, özellikle daha hassas olan domuzlarda, mikotoksikoz ile ilgili birçok vakada rol oynamaktadır (Kuiper-Goodman ve ark., 1987). 2000 yılında JECFA ZEA için geçici maksimum TDI değerini 0,5 µg/kg/v.a. olarak belirlemiştir. CONTAM Paneli'nde, dişi domuzlarda östrojenik etkiler için (kızarıklık/şişmiş vulva ve serviks, rahim ağırlığında artış gibi) NOEL değerine (10 µg/kg v.a./gün) dayanarak ZEA için TDI değerini 0,25 µg/kg/v.a. olarak belirlemiştir (EFSA, 2011). JECFA'ya (2000) göre ZEA'nın ortalama diyet alımlarının tahminleri 1,5-3,5 µg/gün aralığındadır (sırasıyla Avrupa ve Orta Doğu bölgeleri için). Ortalama vücut kütlesi 60 kg olarak kabul edildiğinde, diyet alımlar sırasıyla günde 0,03 ve 0,06 µg/kg /v.a. tekabül eder. Bireysel diyet kayıtlarına dayalı olarak ZEA'nın ortalama diyet alımlarının tahminleri Kanada için <0,98 µg/gün (günde 0,02 µg/kg/v.a.), Danimarka için 1,2 µg/gün (günde 0,02 µg/kg/v.a.), Norveç için 1,1 µg/gün (günde 0,02 µg/kg/v.a.) ve ABD için <2,1 µg/gün (günde 0,03 µg/kg v.a.) (Avrupa Komisyonu, 2000). Avrupa Birliği'nin 19 Aralık 2006 tarihinde yayınladığı komisyon direktifinde (EC 1881/2006) gıda ürünlerinde ZEA'nın maksimum seviyeleri belirlenmiştir (Avrupa Komisyonu, 2006). Direktife göre ZEA'nın maksimum seviyeleri, mısır dışındaki işlenmemiş tahıllar için 100 µg/kg; işlenmemiş mısır için 350 µg/kg; doğrudan insan tüketimine sunulan tahıl unu, kepek için 75 µg/kg; rafine mısır yağı için 400 µg/kg; mısır bazlı atıştırmalıklar ve mısır bazlı kahvaltılık tahıllar hariç ekmek (küçük fırıncılık ürünleri dahil), hamur işleri, bisküviler, tahıl atıştırmalıkları ve kahvaltılık tahıllar için 50 µg/kg;

doğrudan insan tüketimine sunulan mısır bazlı atıştırma lıklar ve mısır bazlı kahvaltılık tahıllar için 100 µg/kg; bebekler ve küçük çocuklar için işlenmiş tahıl ve mısır bazlı gıdalar için 20 µg/kg olarak belirlenmiştir (Avrupa Komisyonu, 2006). Ayrıca, ZEA'nın faz I metabolitlerinden olan Zeranol, Avrupa Birliği dışındaki ülkelerde (A.B.D. ve Kanada) büyüme promotörü olarak kullanılmaktadır. Avrupa'da yasaklanmış ve bu nedenle resmi kontrol planlarına dahil edilmiştir (EFSA, 2017).

Türkiye'de 1997 yılında yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde (23172 sayılı Resmi Gazete, 1997) mikotoksinlerden sadece aflatoksinler, patulin ve ergot alkaloidleri için limit değerlere yer verilirken, 2002 yılında yayımlanan "Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ" (Tebliğ No: 2002/63) ile yönetmeliğe OTA için de maksimum seviyeler eklenmiştir (24885 sayılı Resmi Gazete, 2002). ZEA için maksimum bulaşan seviyeleri değerlerine ise, ilk olarak 17 Mayıs 2008 tarihli ve 26879 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan "Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği" içerisinde "Gıdalardaki Bulaşanların Maksimum Limitleri" ekinde (Tebliğ No: 2008/26) yer verilmiştir (26879 sayılı Resmi Gazete, 2008). 29 Aralık 2011 tarihli ve 28157 sayılı Resmi Gazete'de ise ZEA için maksimum limitleri verilen gıdalar listesine 'İşlenmiş mısır bazlı bebek ve küçük çocuk ek gıdaları' da eklenerek güncellenmiştir (28157 sayılı Resmi Gazete, 2011). Tablo 2-3'de ZEA için maksimum bulaşan miktarları verilmiştir.

Tablo 2-2: ZEA için izin verilen gıdalar ve maksimum limitleri (28157 sayılı Resmi Gazete, 2011).

2.5.	ZEA ⁽¹⁹⁾	Maksimum Limit (µg/kg)
2.5.1.	İşlenmemiş tahıllar ⁽²⁰⁾ (mısır hariç)	100
2.5.2.	İşlenmemiş mısır ⁽²⁰⁾ (ıslak öğütülecekler hariç) ⁽²¹⁾	350
2.5.3.	Tahıllar, tahıl unları, kepek ve rüşeym (doğrudan insan tüketimine sunulan) (Bölüm 2.5.6., 2.5.7., 2.5.8., 2.5.9., 2.5.10.'da belirtilenler hariç)	75
2.5.4.	Rafine mısır yağı	400
2.5.5.	Ekmek (hafif fırıncılık ürünleri dahil), pastacılık ürünleri, bisküvi, tahıl çerezleri, kahvaltılık tahıllar (mısır çerezleri ve mısır bazlı kahvaltılık tahıllar hariç)	50
2.5.6.	Doğrudan insan tüketimine sunulan mısır, mısır çerezleri ve mısır bazlı kahvaltılık tahıllar	100
2.5.7.	Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları ⁽³⁾ , ⁽⁹⁾ (Bölüm 2.5.8.'de belirtilenler hariç)	20
2.5.8.	İşlenmiş mısır bazlı bebek ve küçük çocuk ek gıdaları ⁽³⁾ , ⁽⁹⁾	20
2.5.9.	500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısırın kabaca öğütülmesinden elde edilen küçük parçalar ve mısır irmiği (GTİP 1103 13) veya mısırdan elde edilen pelleter (GTİP 1103 20 40) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	200
2.5.10.	500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır unu (GTİP 1102 20) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	300

(3) Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları ilgili mevzuatında tanımlanan ürünleri kapsar.

(9) Maksimum limit; kuru madde üzerinden geçerlidir. Kuru madde, mikotoksin limitlerinin resmi kontrolü için gıdalardan numune alma, numune hazırlama ve analiz metodu kriterleri ilgili mevzuatında belirtilen şekilde hesaplanır.

(19) Maksimum limit; tahıl ve tahıl ürünleri kapsamında değerlendirilmediğinden 2.4 ve 2.5 kapsamına girecek olan pirinç ve pirinç ürünlerine uygulanmaz.

(20) Maksimum limit; birincil işleme tabi tutulacak olan işlem görmemiş tahıllara uygulanır. Birincil işlem; tahıl tanesinin kurutulması haricindeki herhangi bir fiziksel veya ısı işlemleri ifade eder. Temizleme, ayıklama ve kurutma birincil işlem olarak değerlendirilmez. Uygulanan temizleme veya ayıklama sonrasında tahıl tanesinin aslını bozacak fiziksel işlemler uygulanmaz.

(21) İstisnalar sadece kullanım amacı etiketinde ve/veya ürün ile birlikte hareket eden orijinal doküman üzerinde açıkça belirtilen mısırlar için kullanılır. Örneğin; etiketinde veya herhangi bir belgesinde, "nişasta üretimi için" gibi kullanım amacı belirtilenler vb.

2.6. DNA Metilasyonu ve Oksidatif Hasarla İlişkili Genler

DNMT1 Geni: DNA metilasyonu en önemli epigenetik mekanizmalardan biridir. DNA metilasyonu sitozin (C) bazının 5. karbonuna bir metil grubu (-CH₃) takılmasıyla 5-metil sitozin (5m-C) yapısının oluşmasıdır (Bird, 2002). Bu reaksiyon DNMT tarafından yürütülmektedir (Denis ve ark., 2011). DNMT ailesi, metil vericisi olarak S-adenozil-L-metiyonin (SAM) kullanarak CpG adacıklarında bulunan sitozinin 5. karbonuna metil grubu bağlar. Memelilerde ilk tanımlanan DNA metil transferaz olan DNMT1 etkisini yarı-metillemiş DNA'ları metilleyerek gösterir (Spada ve ark., 2007). Memeli hücrelerindeki DNMT1 enzimidaki artış CpG adacıklarındaki metilasyonun artmasına sebep verir. Kanseri oluşumunda etkili genlerden biri olan tümör baskılayıcı genlerin CpG adacıklarındaki hipermetilasyon bu genleri inaktive ederek kanser oluşumuna neden olur (Jones ve Baylin, 2007).

MGMT Geni: DNA'daki nükleotitlere bağlanan alkilleyici ajanlar DNA'da hasar meydana getirirler. Bu alkilleyici ajanların guanin bazının O6 pozisyonuna bağlanmasıyla O6-MeG eklentisi oluşur. Bu eklenti hücrenin ilk replikasyonunda alkillenmiş guanin bazının karşısına tamamlayıcı baz olarak sitozin değil timin bazının geçmesine neden olur. Tüm hücre tiplerinde eksprese edilen MGMT, alkil eklentilerini kendi üzerindeki sistein aminoasidine alarak DNA'daki hasarı düzeltir (Kurtoglu ve Tekedereli, 2015). MGMT gen ekspresyonunun kolon, pankreas ve akciğer gibi kanser tiplerinde arttığı gözlenmiştir (Kaina ve ark., 2010).

HO1 Geni: HO1 hem'in biliverdine dönüşümüne aracılık eden antioksidan bir enzimdir. Bu reaksiyon sonucu son ürün olarak antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri olan bilirubin, CO ve demir oluşur (Fu ve ark., 2007; Fu ve ark., 2007). Hipoksi, hipertermi ve radyasyon gibi oksidatif stresin artmasına neden olan durumlar HO1'i aktive etmektedir (Zuckerbraun ve Biliar, 2003).

L-Fabp Geni: L-FABP, 14 kDa ağırlığında, böbrekte proksimal tübülde sentezlenen, serbest yağ asitlerinin hücre içi taşıyıcısı olan küçük sitoplazmik bir proteindir. Yapılan hayvan deneyleri idrar L-FABP düzeyinin tübülointerstisyel hasarın bir göstergesi olduğunu kanıtlamaktadır (Yokoyama ve ark., 2009). İnsan L-FABP geni, hipoksiye bir duyarlı bölge içerir ve hipoksi, L-FABP gen ekspresyonunu uyarır (Supavekin ve ark., 2003). Çalışmalar, L-FABP'nin antioksidan özelliklere sahip olduğunu bunun yanında L-FABP ekspresyonundaki artışın, böbrekteki tübüler hasara

ve oksidatif hasara karşı etkisi olduğunu göstermektedir (Nakamura ve ark., 2006; Negishi ve ark., 2007; Portilla ve ark., 2008; Yamamoto ve ark., 2007; Ferguson ve ark., 2010; Doi ve ark., 2010; Parikh ve ark., 2013)

α-GST Geni: GST'ler elektrofilik bileşiklerin glutatyon ile konjugasyonunu katalize eden detoksifiye edici izoenzimlerdir (Hayes ve Strange, 1995). Hem antioksidan aktiviteleri hem de biyokimyasal fonksiyonları vardır. Ksenobiyotiklerin glutatyondaki sisteine ait –SH grubu ile bağlayarak, onların elektrofilik bölgelerini nötralize edip suda çözünürlüklerini arttırmırlar. Ayrıca lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu özellik gösterirler (Halliwell, 1994). GST'ler tüm organlarda bulunmalarına rağmen *α-GST* sadece böbrek tübüler hücrelerinde üretilir (Sundberg ve ark., 1994). *α-GST* üzerinde yapılan çalışmalar bunun ilaçlar, kimyasallar ve bazı anestezi ajanlar tarafından meydana getirilen nefrotoksisitenin ve akut transplant reddinin erken teşhisinde kullanılabileceğini göstermiştir (Sundberg ve ark., 1999).

HSP70 Geni: HSP'ler ekspresyonları genellikle hücrelerin yüksek ısıya (42-46°C) maruz kalmasıyla artan bir protein grubu olmalarıyla birlikte hücrelerdeki enfeksiyon, inflamasyon, açlık, hipoksi, dehidratasyon, etanol, arsenik, eser metaller ve ultraviyole ışık gibi birçok toksine maruziyet durumunda da artar. Bu nedenle HSP'lere 'stres proteinleri' de denmektedir (Morimoto ve ark., 1998; Petrof ve ark., 2004; Aufrecht, 2005). Bu protein grubunda hakkında en çok çalışma yapılan *Hsp70* proteini yeni sentezlenmiş veya yanlış katlanmış proteinlerin katlanmasında, proteinlerin bir araya gelerek çökmesinin engellenmesinde, çeşitli proteinlerin membran boyunca taşınmasında ve düzenleyici proteinlerin aktivitesinin kontrolünde rol alır (Bukau ve Horwich, 1998; Hartl ve ark., 2011).

Nrf2 Geni: *Nrf2*, hücrel homeostazı korumak için gerekli olan transkripsiyon faktörlerinden biridir (Li ve ark., 2012). *Nrf2* özellikle detoksifikasyonun sorumlu olan böbrek, karaciğer ve barsaklarda eksprese edilir (Chan ve Kan, 1999). Normal şartlarda keap1 ile kompleks halde inaktif bir şekilde sitoplazmada bulunan *Nrf2* stres durumunda fosforillenen molekül kompleksinden ayrılıp aktifleşir. Nukleusa giderek antioksidan cevap elementle (ARE) etkileşime girer (Huang ve ark., 2001). Ayrıca DNA hasarına neden olabilen ksenobiyotiklere karşı koruyucu mekanizmada aktif bir rol oynayıp birçok antioksidan enzimin de ekspresyonunu artırır (Giudice ve Montella, 2006).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü ve Araştırma Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

%10 Tris-glisin poliakrilamit jel	Bio-Rad 4561034
%40 Akrilamit/Bis çözeltisi (37,5: 1)	Serva 10681.01
2-Merkaptoetanol	Merck 8057400250
2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)	Sigma-Aldrich-D6883
3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Biomatik A3338
5-mC DNA ELISA Kit	Epigentek P-1034-96
Absolu alkol	Sigma-Aldrich 32221
Adhezif kaplama kağıtları	Thermo Scientific™ AB-0558
Amonyum persülfat (>%98) (APS)	Sigma-Aldrich A3678
Anti-beta aktin antikoru	Santa Cruz Biotechnology SC-47778
Anti-heat shock protein 70 (HSP70) antikoru	Abcam ab45133
Anti-mouse IgG, HRP-bağlı antikor	Santa Cruz Biotechnology SC-2005
Anti-rabbit IgG, HRP-bağlı antikor	Santa Cruz Biotechnology SC-2357
Bromodeoksiüridin (BrdU) ELISA Tayin Kiti	Roche Life Science 11647229001
cDNA sentez kiti	Roche Life Science 05091284001
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Biomatik A2424
DNA izolasyon kiti	Roche Life Science 11796828001
DNA standardı (100 bp)	Thermo Scientific™ GeneRuler SM0241
Etilendiamin tetra asetik asid (EDTA)	Sigma E5134
Fetal sığır serumu (FBS)	Wisent-Multicell 080110
Fosfat tamponu (kalsiyum ve magnezyumsuz) (PBS-CMF) (10x)	Wisent-Multicell 311012CL

Gen ekspresyonu primerleri	Sentromer DNA Teknolojileri Ltd. Şti.
Gen ekspresyonu sybr green master karışımı	Bioline BIO-98020
Glasiyel asetik asit	Riedel-de Haen 27225
Glisin	Wisent-Multicell 800-045-LG
Keratinosit serum içermeyen besiyeri (KSFM)	Thermo Scientific™ 17005042
Nötral kırmızı	Sigma-Aldrich N7005
Ön ayırma jeli (Stacking) tamponu, 0,5 M Tris tamponu, pH 6,8	Wisent-Multicell 809-230-LL
Örnek indirgeyici ajan (Laemmli 2x)	Sigma-Aldrich S3401-10VL
PCR kontrol DNA seti (%0 ve %100 metile)	Qiagen Epiect 59695
Protein standardı (10-250 kDa)	Thermo Scientific™ 26619
Protein standardı (40-300 kDa)	Thermo Scientific™ 26625
Penisilin (100 U) / streptomisin (100 µg/mL) çözeltisi	Wisent-Multicell 450201EL
Radyoimmünopresipitasyon (RIPA) lizis tampon kiti	Santa Cruz Biotechnology SC-24948
RNA izolasyon kiti	Roche Life Science 11828665001
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich L5750
Sodyum klorür (NaCl)	J. T. Baker 0278
Tetrametiletilediamin (TEMED)	Biomatik A4008
Tripan mavisi	Fluka 93595
Tripsin (1:250)	Biomatik A4027
Tris baz	Wisent-Multicell 600-127-LG
Tris hidroklorür (Tris HCl)	Applichem A3452
Tween 20	Applichem A49640
Western blot görüntüleme çözeltisi	Santa Cruz Biotechnology SC-2048
Yağsız süt tozu	Sigma-Aldrich, Fluka 70166
Zearalenon (%99)	Sigma-Aldrich Z2125

3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Ayarlanabilir otomatik pipetler (0,1-2,5 µL; 0,5-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)	Eppendorf
Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik dispenser pipet (0,5-10 µL)	Eppendorf

Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik dispenser pipet (30-300 µL)	Eppendorf
MilliQ su cihazı	Millipore Gradient
Blok ısıtıcı (5 mL tüpler için)	Stuart SBH130D
Blok ısıtıcı (0,5µL mikrotüpler için)	Techne Dri-Block DB-2D
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik 5231 NFY
CO ₂ 'li inkübatör	Thermo-Scientific Heracell 150i
Çalkalamalı blok ısıtıcı (2 mL tüp)	Biosan TS-100C
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik 2041 D
Derin dondurucu (-80 °C)	Daihan-Scientific Wisecry
Dikey elektroforez jel tankı	Bio-Rad Mini Protean® Tetra Cell 1658040EDU
Elektronik hassas terazi	Precisa XB 220 A
Etüv	Nüve
Faz-kontrast invert mikroskop	Olympus CKX4
Flow sitometri	Acea-Novocyte
Gerçek zamanlı termal döngü cihazı ('Real-time PCR', RT-PCR)	Roche Life Science Lightcycler 480-II
Görüntüleme cihazı	Vilber Lourmat Fusion Fx
Görüntüleme cihazı yazılım programı	ImageJ
Güç cihazı	Bio-Rad PowerPac™ Basic Power Supply 1645050
Hassas terazi	Mettler H20
Laminar kabin (Biyogüvenlik seviyesi 2)	Tezsan
Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre	Biotek Epoch
Mikrosantrifüj	Hettich Micro 120
Mini orbital çalkalayıcı	Stuart SSMI
Otomatik pipetör	Eppendorf
Otomatik hücre sayımı cihazı	Luna Automated Cell Counter (Logos model: L10001)
Otoklav	Hirayama HV-50L

pH metre	Hanna HI 1131 B
Soğutmalı mikrosantrifüj	Hettich Micro 200R
Soğutmalı santrifüj	Hettich Micro Universal 32R
Spin santrifüj	Labnet C1301B
Su banyosu	Memmert WB14
Termal döngü cihazı-Altın blok	Applied Biosystems 9700
Termal döngü cihazı-Gradient	Axygen Therm-1000
Vorteks	NC 28405-Ika

3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

Dikey elektroforez jel kaseti, büyük	Bio-Rad Mini Protean® 1653311
Dikey elektroforez jel kaseti, küçük	Bio-Rad Mini Protean® 1653308
DNA saklama kutusu	Greiner Bio-One
Enjektör (10 mL; 50 mL)	Set inject
Enjektör ucu steril filtre (0,22 µm naylon)	Sartorius-Minisart
Falkon tüp (15 mL; 50 mL)	Citotest
Falkon tüpler için uygun portüp	Greiner Bio-One
Filtre kağıdı (110 mm)	Schleicher&Schvell
Hücre kültürü flaskı (25 cm ² ; 75 cm ²)	Nest
İnce duvarlı PCR tüpü (0,2 mL)	Greiner Bio-One
Kriyo vial (2 mL)	Greiner Bio-One
Lateks eldiven	Broche
Mikroplaka (6; 24; 96 kuyucuklu)	Nest
Mikrotüp (0,5 mL; 1,5 mL)	Greiner Bio-One
Mikrotüpler için uygun portüp	Greiner Bio-One
Nitril eldiven	Broche
Otoklav bandı	Sussex
Otoklavlanabilir schott şişe (250 mL; 500 mL; 1 L)	Isolab
Pastör pipeti (2 mL)	Greiner Bio-One

Pipet ucu (0,1-10 µL; 30-300 µL)	Eppendorf
Pipet ucu (0,5-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)	Nest
Polivinilidin florür (PVDF) transfer membranı, 0,45 µm	Thermo Scientific™ 88518
Serolojik pipet (10 mL; 50 mL)	Greiner Bio-One

3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.4.1. Ortamının ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Temizliği

Cam malzemeler musluk altında 7-8 defa bol su ile çalkalandı ve sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) içeren distile su dolu kovada 1 gece bekletildi. Ertesi gün tekrar musluk altında 7-8 defa yıkanarak çamaşır suyunun malzemelerden tamamen uzaklaştırılması sağlandı ve 1 gece distile su içeren kovada bekletildi. 65°C'lik etüvde kurutulan cam malzemeler, 165°C'de 2 saat süre ile kuru-sıcak hava sterilizasyonuna tabi tutuldular. Isıya dayanıklı pipet uçları, mikrotüpler, schott şişelerin kapakları gibi plastik malzemelerin ve hazırlanan çözeltilerin sterilizasyonu 121°C'de 3 atm basınçta 15 dk. otoklavda gerçekleştirildi. Besiyeri ve serum gibi ısıya dayanıksız çözeltiler ise 0,22 µm'lik steril filtrelerden geçirilerek steril edildi.

Hücre kültürü laboratuvarı çalışma alanları ve laminar kabinin içi %70'lik alkol ile düzenli olarak temizlendi. Çalışma öncesi ve sonrasında belli süreler ile hücre kültürü laboratuvarı ve laminar kabinin UV lambaları açılarak ortamın sterilizasyonu sağlandı. Hücre kültürü laboratuvarında çalışırken tek kullanımlık galoş ve eldiven kullanıldı, laboratuvar önlüklerinin ise başka çalışmalarda kullanılmamasına özen gösterildi.

3.4.2. Hücre Dizilerinin Temini

İnsan böbrek epitel hücreleri (HK-2) Amerika Hücre Kültür Koleksiyonu (American Type Cell Culture, ATCC) bankasından satın alındı. Hücre dizileri kriyo vialler içerisinde -196°C'de sıvı azot tankı içerisinde saklandı.

3.4.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler

Trypsin/EDTA çözeltisi (%0,2 / %0,04): 0,2 g tripsin ve 0,04 g EDTA tartılarak 100 mL bidistile suda çözündürüldü. 0,22 µm steril naylon filtreden geçirilerek steril edildi. 15 mL'lik falkonlara bölünerek -20°C'de saklandı.

Fetal sığır serumu (FBS): Hazır inaktive edilmiş FBS kullanıldı. Ancak, FBS inaktive edilmemiş ise; 56 °C’de 30 dk. inkübe edilerek inaktive edildi. 15 mL’lik falkonlara bölünerek -20 °C’de saklandı. Çalışma günü 37 °C’de çözündürülerek kullanıldı. FBS, besiyerine eklenmeden önce 0,22 µm steril naylon filtreden geçirilerek steril edildi.

Antibiyotik çözeltisi [penisilin (100 U) / streptomisin (100 µg/mL) %10]: 1 mL penisilin (100U) / streptomisin (100 µg/mL) ana stok çözeltisinden alınır, 10 mL’ye CMF-PBS ile tamamlanır.

Hücre dondurma çözeltisi: 5 mL DMSO (%5, v/v), 9,5 mL FBS ve 0,95 mL %1’lik antibiyotik çözeltisi hücreler için uygun besiyeri ile 100 mL’ye tamamlanarak hazırlandı.

HK-2 hücresi için besiyeri: KSFM besiyerine 10 mL inaktive edilmiş FBS (%10), 10 mL %1’lik antibiyotik çözeltisi eklenerek 100 mL olacak şekilde hazırlandı. Çalışmaya başlamadan önce besiyeri 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 15 dk. inkübe edilerek pH ve sıcaklık ayarlaması yapıldı. Taze olarak hazırlandı.

3.4.4. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Alınması

Sıvı azot tankından çıkarılan donmuş haldeki hücreler 37°C’lik su banyosunda 1-2 dk. çözülene kadar bekletildi. Vial kapağının su ile temas etmemesi için dikkat edildi. Vial %70’lik alkol ile silindi ve laminar kabin içine alındı. Hücreler, %10 FBS içeren besiyeri bulunan 15 mL’lik falkon tüpe aktarıldı, besiyerinde süspande edildi ve 1500 rpm’de 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, hücre pelleti besiyerinde tekrar süspande edildi ve DMSO’nun toksik etkisinden kurtulmak amacıyla işlem tekrar edildi. Daha sonra, hücre pelletine 1 mL besiyeri eklendi, yavaşca pipetleme yapılarak hücreler süspande edildi ve 7-10 mL besiyeri içeren 25 cm²’lik ya da 75 cm²’lik flasklara ekildi. Flasklar 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

3.4.5. Hücre Kültürünün Devamlılığının Sağlanması (Pasajlama)

Hücre kültür flasklarının tüm yüzeyini kaplamış halde bulunan yoğunlaşmış hücreler için ‘konfluent durumda’ ifadesi kullanılır. Hücreler konfluent duruma geldiğinde pasajlandı. Pasajlama için flask inkübatörden alındı, laminar kabinde flask içerisindeki besiyeri döküldü. Hücrelerin yüzeyi 2 mL CMF-PBS çözeltisi ile yıkandı. Bu adım, tripsin aktivitesini azaltacak serum protein kalıntılarını uzaklaştırmak amaçlı

yapılır. Yıkama işleminden sonra CMF-PBS döküldü ve 2 mL tripsin/EDTA çözeltisi ilave edildi, flask 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 5-10 dk. bekletildi. Tripsin ile hücrelerin flaskın yüzeyinden ayrılması sağlandı. Hücrelerin tripsin içinde gereğinden fazla beklememesi için mikroskop ile yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilmelidir. Tripsin aktivasyonunu durdurmak amacıyla flaska 2-3 mL serumlu besiyeri eklendi, pipetleme yapıldı ve hücreler 15 mL’lik falkon tüpe aktarıldı. 1500 rpm’de 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pellet 2 mL besiyeri ile süspande edildi. Hücreler hemasitometrede sayılarak, yaklaşık 10⁵ hücre/mL olacak şekilde içerisinde besiyeri bulunan flasklara ekildi. Flasklar, %90 bağıl nem, 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde inkübe edildi. Hücre dizisinin devamlılığının sağlanması için pasajlama işlemi ortalama haftada 2-3 kez yapıldı.

3.4.6. Hücrelerin Sayılması

Hücrelerin sayımı tripan mavisi testi ile yapıldı. Test, canlı hücrelerin tripan mavisi boyasını hücre içine almazken, ölü hücrelerin bozulmuş hücre membranlarından boyayı hücre içerisine alabilmeleri esasına dayanır. Işık mikroskobu ile incelendiğinde; canlı hücrelerin sadece membranları mavi renkli gözlenirken, ölü hücreler tamamıyla mavi renge boyanmış halde gözlenirler.

Hücre sayımı otomatik hücre sayım cihazı (Luna Automated Cell Counter, L10001) ile gerçekleştirildi. Ayrıca, kontrol etme amacıyla hücre sayımı Thoma lamı (hemositometre) adı verilen 1 mm² alana ve 0,1 mm derinliğe sahip 4×16 küçük kareden oluşan özel sayım lamaları (Thoma lamı) kullanılarak da ışık mikroskobunda gerçekleştirildi. 4×16 küçük kareye düşen tüm hücreler sayıldı. Hücre süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı (Formül 3-1):

$$\text{Toplam hücre sayısı/mL} = (\text{Hücre sayısı}/4) \times 10^4 \times \text{Seyreltme faktörü}$$

(Formül 3-1)

3.5. ZEA Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanışı

100 mM ZEA çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 31,836 mg ZEA 1 mL DMSO’da çözülerek ana stok çözeltisi hazırlandı.

50 mM ZEA çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 100 mM ZEA çözeltisinden 50 µL alınarak DMSO ile 100 µL’ye tamamlandı.

10 mM ZEA çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 100 mM ZEA çözeltisinden 50 μ L alınarak DMSO ile 500 μ L'ye tamamlandı.

1 mM ZEA çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 10 mM ZEA çözeltisinden 50 μ L alınarak DMSO ile 500 μ L'ye tamamlandı.

3.6. Sitotoksikite Testleri

ZEA'ya maruz bırakılan hücrelerin canlılığının tespiti MTT ve nötral kırmızı (NRU) testi uygulanarak gerçekleştirildi.

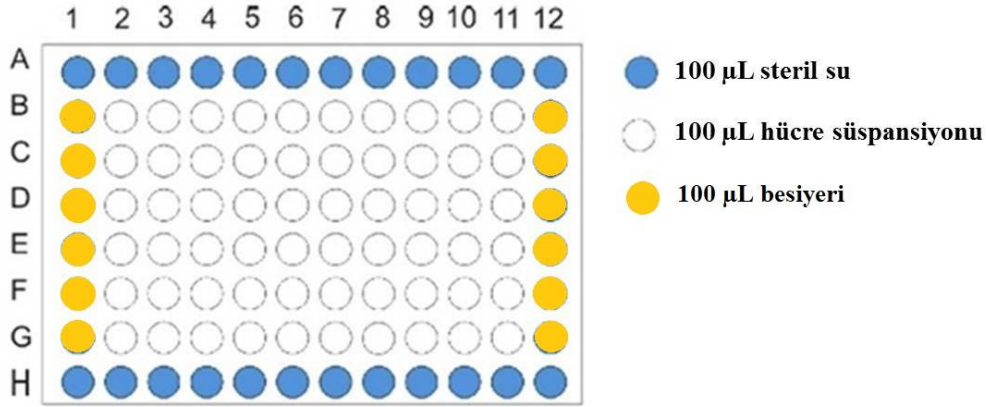
3.6.1. 96 Kuyucuklu Mikroplakalarda Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Hücre kültürlerinin mikroplakalara uygulanması esnasında kuyucuklarda düzensiz hücre yoğunluğu gerçekleşebilir. Hücre süspansiyonunun homojen olduğundan emin olunmalı ve hücre topaklarının oluşumu engellenmelidir. Aynı zamanda, testin uygun hassasiyette olması için test esnasında hücrelerin yakın bitişiklikte olması gerekir. Hücrelerin kuyucuklar arasında düzenli ve eşit dağılıp dağılmadıkları ve sağlıklı olup olmadıkları mikroskopta incelenmelidir. Hücre kültürleri aşağıda belirtildiği şekilde 96 kuyucuklu mikroplakalarda hazırlandı:

1. Bir rezervuar içerisine steril bidistile su konuldu ve inkübasyon sırasında kültür besiyerinin buharlaşmasını azaltmak amacıyla 96 kuyucuklu mikroplakanın A ve H sıralarındaki her bir kuyucuğa 100 μ L su dağıtıldı. 96 kuyucuklu mikroplakanın 1 ve 12. sütununun B-G sıralarındaki her bir kuyucuğuna ise 100 μ L besiyeri dağıtıldı (Şekil 3-1).

2. Her bir kuyucukta 1×10^4 hücre 100 μ L besiyeri içinde olacak şekilde 96 kuyucuklu mikroplakanın diğer kuyucuklarına hücreler şu şekilde dağıtıldı: $6,5 \times 10^5$ hücre 6,5 mL besiyerinde süspande edildi ve steril rezervuar içerisine hücre süspansiyonu konuldu. 96 kuyucuklu mikroplakalara Şekil 3-1'de gösterildiği şekilde 100 μ L hücre süspansiyonu dağıtıldı.

3. 96 kuyucuklu mikroplakadaki hücre süspansiyonu 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildi.



Şekil 3-1: 96 kuyucuklu mikropalakaya hücre ekimi.

3.6.2. Test Maddesinin, Negatif ve Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması

Sitotoksosite testleri için ZEA stok çözeltisinin hazırlanışı: 100 mM konsantrasyonda olacak şekilde cam vial içinde 31,836 mg ZEA 1 mL DMSO'da çözülerek stok çözelti hazırlandı.

%10'luk DMSO çözeltisinin hazırlanışı: 10 mL DMSO besiyeri ile 100 mL'ye tamamlandı. Maruziyet plakalarına uygulama sırasında 1/10 oranında seyreltilerek maruziyet sırasında konsantrasyonunun %1 olması sağlandı.

%1'lik SDS ana stok çözeltisinin hazırlanışı: 0,1 g SDS, PBS ile 10 mL'ye tamamlandı.

%0,1'lik SDS çalışma çözeltisinin hazırlanışı: %1'lik SDS ana stok çözeltisinden 1 mL alınıp besiyeri ile 10 mL'ye tamamlandı. Maruziyet plakalarına uygulama sırasında 1/10 oranında seyreltilerek hücrelere 0,1 mg/mL konsantrasyonunda SDS (~IC₅₀) pozitif kontrol olarak uygulandı (ISO-10993-5) ve çözelti içindeki PBS konsantrasyonunun da %1 olması sağlandı.

ZEA'nın çözündürüldüğü DMSO'nun hücrelere maruziyet sırasında konsantrasyonunun %1'i geçmemesi gerektiğinden dolayı 100 katı konsantrasyonda stok çözeltisi halinde DMSO içerisinde hazırlandı. Daha sonra ZEA çözeltisinin farklı konsantrasyonları besiyerinde seyreltilerek aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı:

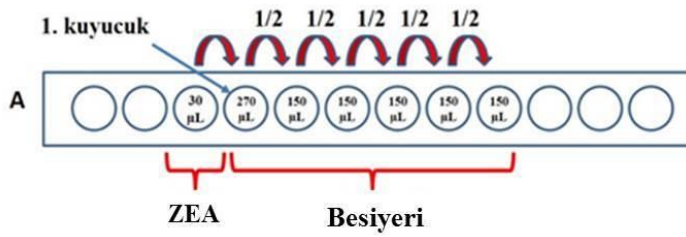
ZEA çözeltisinin seyreltilmesi: Stok çözeltiler 96 kuyucuklu mikropalakada 1/10 oranında besiyeri ile seyreltildi. Daha sonra hazırlanan bu çözeltilerden 1/2 oranında

seyreltme yapılarak toplam 6 konsantrasyonda standart çözeltileri hazırlandı. Basamaklar her iki madde için de ayrı ayrı yapıldı. Seyreltme işlemi için uygulanan plaka düzeni Şekil 3-2’de gösterildi:

1. A sırasındaki 1. kuyucuğa 270 μ L besiyeri 2.-6. kuyucuklara 150 μ L besiyeri konuldu.

2. A sırasındaki 1. kuyucuğa ZEA’nın DMSO içinde hazırlanan çözeltisinden 30 μ L konuldu ve iyice karıştırıldı.

3. 1. kuyucuktan 150 μ L alınarak 2. kuyucuğa aktarıldı ($1/2$ oranında seyreltme), iyice karıştırıldı ve bu kuyucuktan 150 μ L alınarak 3. kuyucuğa aktarıldı. Bu işlem 5. kuyucuk da dahil olmak üzere yapıldı. En son 6. kuyucuktaki fazla olan 150 μ L atıldı. Bu şekilde toplam 6 konsantrasyonda olmak üzere ZEA seyreltmeleri hazırlanmış oldu.



Şekil 3-2: ZEA’nın $1/2$ oranında seyreltilmesi.

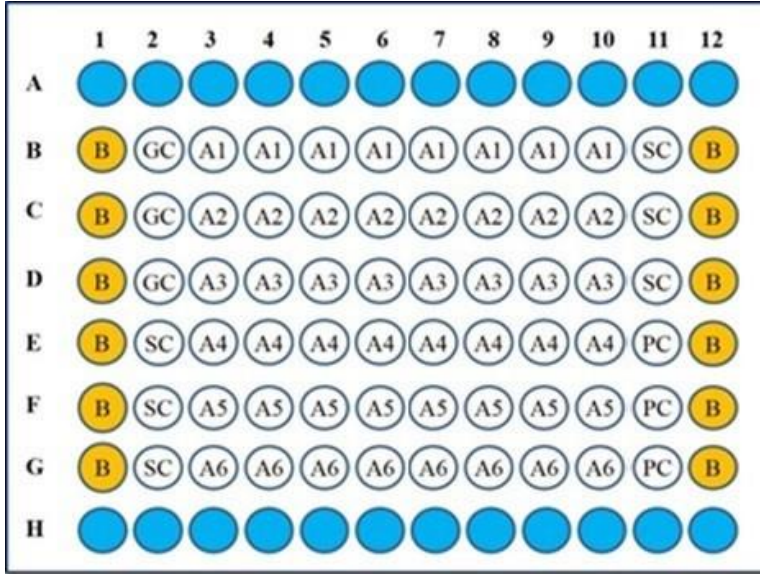
3.6.3. ZEA’nın Hücre Kültürüne Maruziyeti

1. Bölüm 3.6.1’de belirtilen 24 saatlik inkübasyonun sonunda hücre kültür mikropalakasındaki kuyucuklardan (A ve H sırası hariç) 8 kanallı pipet kullanılarak kültür besiyeri uzaklaştırıldı.

2. Bu kuyucuklara 50 μ L PBS (1x) ilave edilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi (kuyucuk yüzeyine tutunmuş olan hücrelerin kazınmamasına, zarar görmemesine dikkat edilmelidir).

3. Vakit kaybetmeden her bir kuyucuğa 90 μ L taze hücre kültürü besiyeri eklendi (hücre katmanının kurumasından dolayı oluşabilecek hücre ölümü veya stresini engellemek için hızlı yapılmalıdır).

4. Maruziyet mikropalakası **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**’te gösterildiği şekilde düzenlendi:



Şekil 3-3: 96 kuyucuklu maruziyet mikrolaka düzeni.

A + H sıraları: Steril bidistile su

B: Kültür besiyeri + hücre yok (blank, negatif kontrol)

GC: Kültür besiyeri + hücre (hücre büyüme kontrolü)

SC: Kültür besiyeri + hücre + DMSO (%1) (çözücü kontrolü)

PC: Kültür besiyeri + hücre + SDS (0,1 mg/mL) (pozitif kontrol)

A1, A2,, A6: Kültür besiyeri + hücre + ZEA'nın 6 farklı konsantrasyonu

5. 1. ve 12. Sütunların B-G kuyucuklarına 100 µL besiyeri konuldu (blank, negatif kontrol).

6. B2, C2 ve D2 kuyucuklarına 10 µL hücre kültürü besiyeri konuldu (hücre büyümesi kontrolü, GC).

7. E2, F2, G2, B11, C11 ve D11 kuyucuklarına 10 µL %10'luk DMSO çözeltisi konuldu (çözücü kontrolü, SC).

8. E11, F11 ve G11 kuyucuklarına 10 µL %0,1'lik SDS çözeltisi konuldu (pozitif kontrol, PC).

9. Bölüm 3.6.2'de belirtildiği üzere A1-A6 şeklinde yazılmış kuyucuklara seyreltmeleri yapılmış ZEA standart çözeltilerinden 10'ar µL tatbik edildi (6 konsantrasyon, her konsantrasyon için 3 tekrar yapıldı). Her test 1 mikrolakada 24 saatlik maruziyet için hazırlandı. Aynı düzende 2. farklı bir günde çalışılmak üzere toplam her konsantrasyon için 6 tekrar yapıldı.

10. 96 kuyucuklu mikrolaka 37 °C'de, %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

MTT testi ve NRU testleri için, ZEA maruziyeti yukarıda belirtildiği şekilde ayrı plakalar halinde hazırlandı.

3.6.4. MTT Testi

3.6.4.1. MTT Testinin Esası

MTT bileşiğinin tetrazolyum halkasının hücredeki (canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış) mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrojenaz enzimi ile formazana dönüşmesi esasına dayanır (Mosmann, 1983; Alley ve ark., 1988). Canlı hücrede soluk sarı renkli MTT, enzim ile tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu koyu mavi-mor renkli çözünmeyen formazan ürününe dönüşür. Böylece canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücreler mor renkte boyanırken, ölü ve mitokondriyal fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmaz. Hücreler organik çözücü (örn. isopropanol, DMSO) ile çözündürüldükten sonra, oluşan formazan çözeltisine ait rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 590 nm’de (670 nm referans dalga boyuna karşı) ölçülür. MTT’nin redüksiyonu sadece metabolik olarak aktif olan hücrelerde meydana gelir ve bu aktivitenin seviyesi hücrelerin canlılıklarıyla ölçülür (Mosmann, 1983; Alley ve ark., 1988; Fotakis ve Timbrell, 2006; Van Meerloo ve ark., 2011).

3.6.4.2. MTT Testi Protokolü

MTT çözeltisinin hazırlanışı: 5 mg MTT, 1 mL CMF-PBS (1x) içinde çözündürüldü. Çözelti +4 °C’de karanlıkta saklandı.

Deney protokolü

1. Bölüm 3.6.3’te anlatıldığı gibi ZEA ile inkübe edilen hücre kültürünü içeren 96 kuyucuklu mikropiakanın her kuyucuğuna 20 µL MTT çözeltisi eklendi.
2. 150 rpm’de inkübatör dışında 5 dk. orbital çalkalayıcıda bekletildi.
3. 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 3 saat inkübe edildi.
4. Kuyucuklardaki üstteki sıvı atıldı ve kuyucuklara 100 µL %100’lük DMSO ilave edildi.
5. 150 rpm’de inkübatör dışında 5 dk. orbital çalkalayıcıda bekletildi.
6. Oluşan rengin şiddeti 590 nm’de (670 nm referans dalga boyuna karşı) mikropiaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.

3.6.5. NRU Testi

3.6.5.1. NRU Testinin Esası

Canlı hücreler lizozomlarında nötral kırmızı boyasını tutma kapasitesine sahiptir. Böylece, hücre canlılığı nötral kırmızı boyasını tutma kapasitesi ile ölçülür. Nötral kırmızı boyası zayıf katyonik bir boya olduğundan kolaylıkla hücre mebranına penetre olur ve lizozomlarda intraselüler olarak birikir (lizozomal pH < sitoplazmik pH) ve oradaki anyonik bölgelerle lizozomal matrikse bağlanır. Hücre yüzeyinde ya da duyarlı lizozomal membrandaki değişiklikler nötral kırmızı boyasının alınmasını ve bağlanmasını azaltır. Böylelikle canlı hücreler boyayı tutarken, zarar görmüş ya da ölü hücreler tutamazlar. Boyanın nüfuz ettiği hücrelerde oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 540 nm’de (690 nm referans dalga boyuna karşı) ölçülür (Fotakis ve Timbrell, 2006; Repetto ve ark., 2008).

3.6.5.2. NRU Testi Protokolü

NRU testi için çözeltilerin hazırlanışı

Nötral kırmızı boyası ana stok çözeltisinin hazırlanışı: 100 mg nötral kırmızı boyası 10 mL hücre kültürü besiyerinde çözöldü. Çözelti steril 0,22 µm naylon enjektör ucu filtreden geçirildi. 1,5 mL’lik tüplere bölünerek -20 °C’de saklandı. Boya kristallerinin iyi çözöndürölmesi için çözelti çalışma gününden önce 37 °C’de 1 gece inkübe edildi.

Nötral kırmızı boyası çalışma çözeltisinin hazırlanışı: 100 µL nötral kırmızı ana stok çözeltisinden alındı, hücre kültürü besiyeri ile 10 mL’ye tamamlandı ve 0,22 µm naylon enjektör ucu filtreden geçirildi (Bu aşamada boya kristallerinin iyi çözöndürölmesi sağlanmalıdır).

Nötral kırmızı boyası çözöndürme çözeltisinin hazırlanışı: 150 µL glasiyel asetik asit, 7,35 mL distile su ve 7,5 mL absolu alkol karıştırılarak hazırladı. Kullanmadan hemen önce hazırlanmalı ve 1 saat içerisinde kullanılmalıdır.

Deney protokolü

1. Bölüm 3.6.3’te anlatıldığı gibi ZEA ile inkübe edilen hücre kültürünü içeren 96 kuyucuklu mikropakanın kuyucuklarındaki besiyeri atıldı ve kuyucuklar 150 µL PBS (1x) ile yıkandı.

2. Her kuyucuğa 100 μ L nötral kırmızı boyası çalışma çözeltisi eklendi ve 37°C'de 3 saat inkübe edildi.

3. Mikroplakanın kuyucuklarındaki boya çözeltisi atıldı ve 150 μ L PBS (1x) ile dikkatlice yıkandı (nötral kırmızı boyası çalışma çözeltisinden kaynaklanabilecek boya kristallerinin kalmamasına dikkat edildi).

4. Her kuyucuğa 150 μ L nötral kırmızı çözündürme çözeltisi eklendi.

5. 150 rpm'de 10 dk. inkübatör dışında orbital çalkalayıcıda bekletildi.

6. Oluşan rengin şiddeti 540 nm'de (690 nm referans dalga boyuna karşı) mikropkaya okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.

3.6.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

1. Çözücü kontrol grubundan (SC) elde edilen absorbans değeri %100 canlılığı ifade eder. Örneklerde canlı hücre oranı, çözücü kontrol grubunun (SC) absorbans değeri ile kıyaslanarak % cinsinden hesaplandı.

2. Çözücü kontrollerinin (SC) 96 kuyucuklu mikropkalanın sağ ve sol kenarında bulunması sistematik hataların belirlenmesini sağlar. Testin anlamlı olabilmesi için, sağ ve sol taraftaki çözücü kontrollerin ortalamaları ile tüm çözücü kontrollerin ortalamaları arasında %15'ten fazla fark olmaması gerekir.

3. Hücre büyüme kontrolleri (GC) çözücünün etkisini belirlemeyi sağlar. Eğer çözücü kontrollerin değerleri hücre büyüme kontrolleri ile belirgin bir fark gösterirse, test bileşiklerinin inhibisyon değerleri dikkatle yorumlanmalı, mümkünse farklı bir çözücü seçilmelidir.

4. Testin doğruluğunu kontrol etmek amacıyla her maruziyet mikropkalarına SDS çözeltisi (son konsatrasyonu 0,1 mg/mL olacak şekilde) eklenerek pozitif kontrol grubu (PC) oluşturuldu. Çalışılan koşullarda, SDS çözeltisine (0,1 mg/mL) ait hücre ölümünün yaklaşık %50 olması gerekir (ISO-10993-5).

5. Her çözücü kontrol (SC) ve örnek absorbans değerlerinden, blank (B) değerlerine ait ortalama absorbans değeri çıkarılarak düzeltilmiş absorbans değerleri elde edildi.

6. Düzeltilmiş çözücü kontrol (düzeltilmiş OD_{SC}) ve örnek (düzeltilmiş OD_{Örnek}) absorbans değerlerinin ortalaması alındı. % Relatif inhibisyon (% hücre ölümü) değeri aşağıdaki denkleme göre hesaplandı (Formül 3-2):

$$\% \text{ Relatif inhibisyon} = 100 - (\text{düzeltilmiş ort. ODÖrnek} \times 100 / \text{düzeltilmiş ort. ODSC})$$

(Formül 3-2)

7. X ekseninde maruziyet konsantrasyonu, Y ekseninde % relatif inhibisyon (% hücre ölümü) olacak şekilde excel programı kullanılarak konsantrasyona karşı % inhibisyon (% hücre ölümü) eğrisi çizildi.

8. Eğriden %50 inhibisyona (hücre ölümüne) karşılık gelen konsantrasyon hesaplanarak çalışılan maddelerin IC₅₀ (%50 oranında hücre ölümüne sebep olan konsantrasyon) değeri belirlendi.

3.7. Hücre Çoğalması (BrdU) Testi

3.7.1. BrdU Testi Esası

Hücrelerde proliferasyon düzeylerinin tespit edilmesi amacıyla, kolorimetrik ‘Bromodeoksiüridin (BrdU) ELISA Tayin Kiti’ (Roche) kullanılmıştır. Bu yöntem, çoğalan hücrelerde genomik DNA içerisine bir timidin analogu olarak dahil olan BrdU’nun antikor probolar kullanılarak işaretlenmesi ve S fazındaki hücrelerin tespit edilmesi prensibine dayanmaktadır (Russmann ve ark., 1993). BrdU testi üretici firmanın vermiş olduğu kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi. BrdU-işaretli hücreler, 370 nm’de (492 nm referans dalga boyuna karşı) mikropilaka okuyuculu spektrofotometrede ölçülerek değerlendirilmiştir.

Kit içeriği

BrdU etiketleme reaktifi (1 mL; 1000x) (Vial 1): 10 mM 5-bromo-2'-deoksiüridin PBS’te, pH 7,4. 0,2 µm enjektör ucu filtreden geçirildi.

FixDenat (2×100 mL) (Vial 2):

Anti-BrdU-POD (Stabilize edilmiş liyofilizat) (Vial 3): Peroksidaz (POD) ile konjuge edilmiş fare-fare hibrid hücrelerinden elde edilen (klon BMG 6H8, Fab fragmanları) monoklonal antikor.

Antikor seyreltme çözeltisi (100 mL) (Vial 4)

Yıkama tamponu (100 mL, PBS 10x) (Vial 5)

Substrat çözeltisi (100 mL TMB, tetrametil-benzidin) (Vial 6)

BrdU testi için çözeltilerin hazırlanışı

BrdU etiketleme reaktifı çözeltisi: BrdU etiketleme reaktifi (Vial 1) 1: 100 kültür ortamı ile seyreltildi (konsantrasyon: 100 μ M BrdU).

FixDenat çözeltisi: Kullanıma hazır halde bulunur.

Anti-BrdU-POD stok çözeltisi: Anti-BrdU-POD (Vial 3) 1,1 mL bidistilde suda çözüldü, 10 dk. boyunca çalkalanarak iyice karıştırıldı.

Anti-BrdU-POD çalışma çözeltisi: Anti-BrdU-POD stok çözeltisi 1: 100 oranında antikor seyreltme çözeltisi (Vial 4) ile seyreltildi. 96 kuyucuklu mikrolakaya için 100 μ L Anti-BrdU-POD stok çözeltisi 10 mL antikor seyreltme çözeltisinde (Vial 4) seyreltildi.

Yıkama tamponu: Konsantre yıkama çözeltisi (Vial 5) 1: 10 oranında bidistile su ile seyreltildi. 96 kuyucuklu mikrolakaya için 10 mL konsantre yıkama çözeltisi (Vial 5) 90 mL distile su ile seyreltildi.

Substrat çözeltisi: Kullanıma hazır halde bulunur.

Test maddeleri: Bölüm 3.5'te bahsedildiği şekilde ZEA için hazırlanan ana stok çözeltileri, son maruziyet konsantrasyonları 1, 10, 50 μ M olacak şekilde mikrolakaya uygulandı.

3.7.2. BrdU Testi Protokolü

1. Proliferasyon testi için çoğaltılan hücreler 96 kuyucuklu mikrolakaya her bir kuyucukta 1×10^4 hücre/100 μ L besiyeri olacak şekilde ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hücrelere son hacim 100 μ L olacak şekilde 1, 10, 50 μ M konsantrasyonlarda ZEA maruziyeti yapılarak tekrar 24 saat inkübe edildi. 'Background' kontrol ve blank için de mikrolakada yer ayrıldı.

2. 'Background' kontrol hariç her bir kuyucuğa 10 μ L BrdU etiketleme çözeltisi eklendi (son konsantrasyon: 10 μ M BrdU) ve 37°C'de 2,5 saat süreyle hücreler inkübe edildi. 'Background' kontrol, non-spesifik bağlanmaları kontrol etmek amacıyla kullanılır.

3. Inkübasyon sonrasında üst faz (besiyeri karışımı) döküldü.

4. Her bir kuyucuğa 200 μ L FixDenat (Vial 2) eklendi. Oda sıcaklığında 30 dk. inkübe edildi.

5. Mikrolakadan FixDenat çözeltisi uzaklaştırıldı.

6. Her bir kuyucuğa 100 µL anti-BrdU-POD çalışma çözeltisi ilave edildi. Yaklaşık 90 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.

7. Mikroplakadan antikor konjugatı uzaklaştırıldı ve kuyucuklar üç kez 200 µL yıkama çözeltisi (PBS, 1x) ile yıkandı.

8. Son yıkama çözeltisi de uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 100 µL substrat çözeltisi eklendi. Fotometrik ölçüm için renk değişimi yeterli oluncaya kadar (5-30 dk.) oda sıcaklığında inkübe edildi.

9. Oluşan rengin şiddeti 370 nm'de (492 nm referans dalga boyuna karşı) mikrokplaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.

3.7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Proliferasyon indeksini hesaplamak için önce kontrol ve maruziyet gruplarından blank değerlerinin ortalaması çıkarıldı. Maruziyet grubunun değerleri kontrol grubuna göre kıyaslanarak relatif BrdU hücre proliferasyonu % olarak hesaplandı.

3.8. Reaktif Oksijen Türlerinin Flow Sitometri ile Tayini

3.8.1. DCF Testinin Esası

Diklorofluoressein (DCF) testi, hücre kültür çalışmalarında ROS oluşumunun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir testtir. Hidrofobik dihidrodiklorofluoressein diasetat (DCFH₂-DA) fluoresans özellik göstermez, hücre membranını geçerek hücre esteraazlarıyla deasetilasyon sonucunda hidrofilik alkol olan dihidrodiklorofluoressein (DCFH₂) molekülünü oluşturur ve ROS varlığında oksitlenerek fluoresans veren DCF'e dönüşür. Örneklerin redoks durumu, fluoresans şiddetindeki artış tespit edilerek izelenebilir. DCF'in fluoresans özelliği flow sitometri cihazında (mavi lazer, eksitasyon 488 nm) ölçüldü (Canas ve ark., 2007).

DCF testi için çözeltilerin hazırlanışı

DCFH₂-DA stok çözeltisi: 20 mM olacak şekilde DMSO'da çözündürülerek hazırlandı.

BSA çalışma çözeltisi (%1): 30 mg BSA (Sığır serum albumin) 3 mL PBS içerisinde çözündürülerek hazırlandı.

Test maddeleri: Bölüm 3.5’te bahsedildiği şekilde ZEA için hazırlanan ana stok çözeltileri, son maruziyet konsantrasyonları 1, 10, 50 μM olacak şekilde 24 kuyucuklu mikropalakaya uygulandı.

3.8.2. DCF Test Protokolü

1. 24 kuyucuklu mikropalakalara her bir kuyucukta yaklaşık $3 \times 10^5/1$ mL besiyeri olacak şekilde dağıtılan hücreler 37°C ’de %5 CO_2 ’li inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

2. İnkübasyon sonrası ortamdaki süpernatant uzaklaştırıldı ve kuyular 1 mL PBS (1x) ile yıkandı. Taze besiyeri eklenerek son konsantrasyon 1, 10, 50 μM olacak şekilde ZEA maruziyeti yapıldı ve 24 saat inkübe edildi.

3. ‘Unstained’ kontrol hücrelerin kuyucuklarına boya eklenmemiş olup, 10 μL PBS (1x) ve 990 μL besiyeri eklenmiştir. ‘Unstained’ kontrol, hücrenin otofloresansını ölçmek için kontrol amacıyla kullanılır.

4. 24 saat maruziyet sonunda kuyucuklar 1 mL PBS (1x) ile 2 defa yıkandı ve %0,2 tripsinden 0,5 mL ilave edilerek hücreler tripsinize edildi ve mikrosantrifüj tüpüne (1,5 mL) alındı.

5. Hücre süspansiyonu 1200 rpm’de 3 dk. süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücre pelleti 3 defa 1 mL PBS (1x) ile yıkandı. Yıkamalardan sonra son olarak 1 mL PBS (1x) süspande edildi.

6. ‘Unstained kontrol’ hariç hücre süspansiyonu içeren tüplere 1 μL DCFH₂-DA (20 mM) ilave edilerek 37°C ’de %5 CO_2 ’li inkübatörde 30 dk. inkübe edildi.

7. Boyanın uzaklaştırılması için hücreler 1200 rpm’de 3 dk. santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı, 200 μL PBS (1x) ile hücreler süspande edildi.

8. 1200 rpm’de 3 dk. süre ile santrifüj edilen yıkanmış hücrelerden süpernatant uzaklaştırıldı. Hazırlanan %1’lik BSA çalışma çözeltisinden her bir tüpe 150 μL eklenerek hücreler süspande edildi.

9. ROS’a bağlı floresans yoğunluğu flow sitometride (ACEA NovoCyte) FITC kanalından (eksitasyon: 488 nm; emisyon: 530 nm) ölçüldü.

3.8.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

X eksen, hücrenin boyutu ile ilişkili olan ileri dağılım (‘Forward scatter’, FSC) parametresini temsil eder. Y eksen ise, hücre içindeki bileşenlerle ilgili olan yan dağılım (‘Side scatter’, SSC) parametresini gösterir. Analiz edilen hücreler FSC/SSC grafiğinde belirli alanlara düşerler. Bu alanlardan incelenecek hücrelerin yeri

belirlenerek kapılama yapılır. 1. Kapı (P1, HK-2), analiz edilecek hücrelerin ana popülasyonunu gösterir. Flow sitometrisinde hücrelerin floresans yoğunluğu ölçülmüş, her tüpte 10.000 hücre değerlendirilmiştir. DCF floresanı gösteren hücreler belirlenerek kapılama yapılmıştır (P1 kapısı). Reaktif oksijen radikallerinin varlığı, ortalama floresans yoğunluğu ('mean fluorescence intensity', MFI) olarak ifade edilmiştir. Maruziyet grupları arasındaki değişimin saptanmasında kontrol grubuna göre gözlenen % değişim (% MFI) kullanılmıştır.

3.9. ZEA'nın Hücre Dizilerine Maruziyeti

Her bir 25 cm²'lik flaska 1×10⁶ hücre 5 mL besiyeri içinde ekildi. CO₂'li inkübatörde 24 saat bekletildi. Flaskın içindeki besiyeri döküldü ve tekrar 5 mL taze besiyeri konuldu. Aşağıda belirtildiği şekilde ZEA maruziyeti gerçekleştirildi:

Kontrol grupları: 5 µL %100 DMSO, içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

1 µM ZEA maruziyeti: 5 µL 1 mM ZEA çözeltisi, içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

10 µM ZEA maruziyeti: 5 µL 10 mM ZEA çözeltisi, içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

50 µM ZEA maruziyeti: 5 µL 50 mM ZEA çözeltisi, içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

Bu şekilde ZEA 1, 10, 50 µM konsantrasyonlarda olacak şekilde HK-2 hücrelerine uygulandı ve 24 saat boyunca 37°C'lik %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Aynı ortam koşullarında kontrol grupları da oluşturuldu. Her bir maruziyet konsantrasyonu için 5'er adet flaska ekim yapıldı ve deneyler 2. farklı bir günde tekrar edildi. En son maruziyet süreleri tamamlandıktan sonra ZEA'ya maruz bırakılan hücreler pasajlandı ve sayıldı. Besiyeri içindeki hücreler 4 °C'de 1000 x g'de 5 dk. santrifüj edildi, üstteki besiyeri atıldı ve hücreler PBS (1x) ile yıkanarak 4 °C'de 1000 x g'de 5 dk. tekrar santrifüj edildi. Hücreler PBS (1x)'te süspande edildi ve DNA, RNA, histon ve proteinlerin izolasyonunu yapabilmek amacıyla yaklaşık 1×10⁶ sayıda hücre 200 µL PBS (1x) içinde olacak şekilde kısımlara ayrıldı.

3.10. DNA Metilasyonunun Analizi

3.10.1. DNA İzolasyonu

Hücre kültüründen genomik DNA izolasyonu ‘High Pure PCR Template Preparation Kit’ (Roche Life Science) ile üretici firmanın vermiş olduğu kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

Kit içeriği

Bağlama tamponu: 6 M Guanidin HCl / 10 mM üre / 10 mM Tris HCl / %20 Triton-X 100 (v/v) (pH 4,4).

Proteinaz K: Liyofilize proteinaz K, 4,5 mL bidistile su ile çözündürüldü. 20°C’de saklandı.

İnhibitör temizleme: 5 M Guanidin HCl / 20 mM Tris HCl / alkol (pH 6,6).

Yıkama tamponu: 2 mM Tris HCl / alkol (pH 7,5).

Elüsyon tamponu: 4 M üre / 200 mM Tris / 20 mM NaCl / 200 mM EDTA (pH 7,4).

Filtreli tüp, toplama tüpü

Deney protokolü

1. Bölüm 3.9’da belirtildiği üzere maruziyeti yapılan 1×10^6 hücre 200 μ L PBS içinde süspande edildi.

2. Üzerine 200 μ L bağlama tamponu, 40 μ L proteinaz K eklendi. Hemen karıştırıldı ve 70 °C’de 10 dk. inkübe edildi.

3. Üzerine 100 μ L isoproponal eklendi ve iyice karıştırıldı.

4. Kitin içerisinden çıkan toplama tüpüne filtreli tüp yerleştirildi.

5. Yukarıda hazırlanan çözelti filtreli tüpe konuldu ve 8000 x g’de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.

6. Filtreli tüpe 500 μ L inhibitör temizleme tamponu eklendi ve 8000 x g’de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.

7. Filtreli tüpe 500 μ L yıkama tamponu eklendi ve 8000 x g’de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı.

8. Yıkama tamponunun kalıntılarını temizlemek üzere bir kez daha 10 sn. santrifüj edildi.

9. Toplama tüpü atıldı, filtreli tüp 1,5 mL'lik mikrotüp içine yerleştirildi.

10. Önceden 70°C'ye getirilmiş elüsyon tamponundan 100 µL filtreli tüpe eklendi. 8000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi.

11. Elde edilen DNA'lar daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20°C'de buzdolabında saklandı.

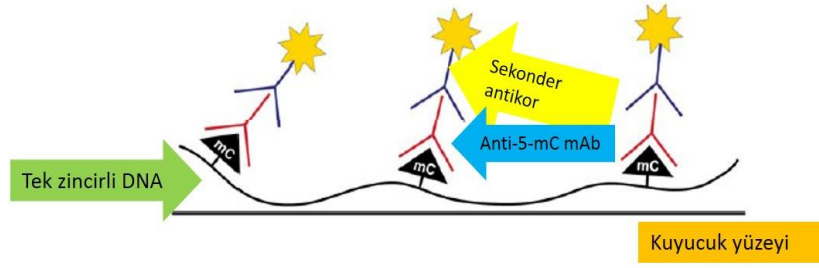
3.10.2. DNA'nın Saflık ve Miktar Tayini

1, 10, 50 µM konsantrasyonlarda ZEA maruziyeti sonrasında HK-2 hücrelerinden izole edilen DNA'ların miktarı ve saflığı 'Take-3 Plate' kullanılarak mikrolaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü. 260 nm'de ölçülen absorbans değerleri oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin ng ya da µg düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. 260 nm dalga boyunda okunan değer ile 280 nm ve 230 nm dalga boylarında ölçülen değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi verir. Saflaştırılmış DNA'da A260/A280 ve A260/A230 oranı yaklaşık 1,75-1,8 üzerinde olmalıdır.

3.10.3. Global DNA Metilasyonunun Tayini

3.10.3.1. Deneyin Esası

5-metilsitozin (5-mC) içeriğinin tayini, global olarak DNA metilasyonundaki değişiklikleri tayin etmede hızlı ve kullanışlı bir parametredir (Christman, 1982; Ramsahoye, 2002; Fuke ve ark. 2004). DNA'nın metillenmiş fraksiyonu, yakalama ve saptama antikorları kullanılarak saptanır ve daha sonra mikrolaka okuyuculu spektrofotometrede absorbansı ölçülerek kolorimetrik olarak incelenir. Metillenmiş DNA miktarı ölçülen optik dansite (OD) ile orantılıdır (Şekil 3 4). Bu amaçla, DNA'da 5-mC'nin tayini '5-mC DNA ELISA Kit' (Epigentek) ile üretici firmanın vermiş olduğu kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.



Şekil 3-4: 5-mC DNA ELISA kitinin esası.

Kit içeriği

ME1: 10x Yıkama tamponu: 4 °C’de saklanmalı.

ME2: Bağlama çözeltisi: Oda sıcaklığında saklanmalı

ME3: Negatif kontrol (20 µg/mL)*: -20 °C’de saklanmalı.

ME4: Pozitif kontrol (20 µg/mL)*: -20 °C’de saklanmalı.

ME5: Yakalama antikoru (1000 µg/mL)*: 4 °C’de saklanmalı.

ME6: Dedeksiyon antikoru (400 µg/mL)*: -20 °C’de saklanmalı.

ME7: Güçlendirici çözelti: -20 °C’de saklanmalı.

ME8: Developer çözelti: 4 °C’de saklanmalı.

ME9: Durdurucu çözelti: Oda sıcaklığında saklanmalı

*Kullanmadan önce spin yapıldı.

3.10.3.2. Deney Protokolü

1. Yıkama tamponu hazırlanışı: 13 mL ME1, 117 mL distile su içine eklendi.
2. Pozitif kontrol (ME4) standart çözeltileri aşağıdaki gösterildiği şekilde hazırlandı:

Tüp	ME4 (10 ng/µL)	1X TE	Sonuç ME4 Konsantrasyonu
1	1,0 µL	19,0 µL	0,5 ng/µL
2	1,0 µL	9,0 µL	1,0 ng/µL
3	1,0 µL	4,0 µL	2,0 ng/µL
4	2,5 µL	2,5 µL	5,0 ng/µL
5	4,0 µL	0,0 µL	10,0 ng/µL

DNA bağlama

3. Kullanılacak sayıda kuyucuk plaka çerçevesinden dikkatli bir şekilde çıkarıldı.

4. Her kuyucuğa 80 µL ME2 bağlama çözeltisi eklendi.

5. 1 µL ME3, 1 µL ME4 standart çözeltileri ve 100 ng örnek DNA'sı belirlenmiş kuyucuklara eklendi.

6. Plaka parafilm ile kaplandı ve 37 °C'de 90 dk. inkübe edildi. Her kuyu üç defa 150 µL dilüe ME1 ile yıkandı.

Metillenmiş DNA'yı yakalama

7. ME5, (1: 1000) oranında dilüe ME1 ile seyreltili.

8. Her kuyucuğa 50 µL dilüe ME5 eklendi ve oda sıcaklığında 60 dk. inkübe edildi.

9. Dilüe ME5 kuyucuklardan döküldü ve her kuyucuk 150 µL dilüe ME1 ile 3 kez yıkandı.

10. ME6, (1: 2000) oranında dilüe ME1 ile seyreltili.

11. Her kuyucuğa 50 µL dilüe ME6 eklendi ve oda sıcaklığında 30 dk. inkübe edildi.

12. Dilüe ME6 kuyucuklardan döküldü ve her kuyucuk 150 µL dilüe ME1 ile 4 kez yıkandı.

13. ME7, (1: 5000) oranında dilüe ME1 ile seyreltili.

14. Her kuyucuğa 50 µL dilüe ME7 eklendi ve oda sıcaklığında 30 dk. inkübe edildi.

15. Dilüe ME7 kuyucuklardan döküldü ve her kuyucuk 150 µL dilüe ME1 ile 5 kez yıkandı.

Sinyal tayini

16. Her kuyucuğa 100 µL ME8 ilave edildi ve 1-10 dk. ışıktan uzakta oda sıcaklığında inkübe edildi. Örnek kuyularda ve kontrol kuyularında renk değişimi

izlendi. Yeterli miktarda metile DNA bulunduğunda ME8 çözeltisinin rengi maviye döner.

17. Pozitif kontrol kuyularındaki renk maviye döndüğünde, enzim reaksiyonunu durdurmak için her bir kuyucuğa 100 µL ME9 ilave edildi. Mikrokuyucukların bulunduğu çerçeve hafifçe sallanarak çözelti karıştırıldı ve renk reaksiyonunun tamamen durdurulmasını sağlamak için 1-2 dk. beklendi. ME9 ilave edildikten sonra renk sarı renge dönüştü ve oluşan rengin şiddeti 450 nm’de mikropilaka okuyuculu spektrometrede ölçüldü.

3.10.3.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Pozitif kontrol standart çözeltileri ile hazırlanan ölçü eğrisi yardımıyla DNA örneklerindeki metilasyon oranı % olarak belirlendi.

3.11. Gen Ekspresyonlarının Tayini

3.11.1. Total RNA İzolasyonu

Hücre kültüründen total RNA izolasyonu ‘High Pure RNA Isolation Kit’ (Roche Life Science) ile üretici firmanın vermiş kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

Kit içeriği

Lizis/Bağlama tamponu: 4,5 M Guanidin-HCl, 50 mM Tris-HCl, %30 Triton X-100 (ağırlık/hacim) (pH 6,6). 25°C’de saklandı.

DNaz I (rekombinant, liyofilize): 10 KU liyofilize DNaz I. Çözündürüldükten sonra 500 µL’lik tüplere bölünerek -20°C’de saklandı.

DNaz inkübasyon tamponu: 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,0). 25°C’de saklandı.

Yıkama tamponu I: 5 M Guanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl (pH 6,6). 25°C’de saklandı.

Yıkama tamponu II: 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl (pH 7,5). 25°C’de saklandı.

Elüsyon tamponu: PCR kalitede su.

Filtreli tüp, toplama tüpü

Deney protokolü

1. Bölüm 3.9’da belirtildiği üzere hazırlanan 1×10^6 hücre 200 μL PBS (1x) içinde süspande edildi.
2. Üzerine 200 μL bağlama tamponu eklendi ve 15 sn. vorteks ile karıştırıldı.
3. Kitin içerisinden çıkan toplama tüpüne filtreli tüp yerleştirildi.
4. Yukarıda hazırlanan çözelti filtreli tüpe konuldu ve 8000 x g’de 15 sn. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.
5. Steril bir mikrotüpte her bir örnek için 90 μL DNaz inkübasyon tamponu ve 10 μL DNaz I eklendi ve karıştırıldı.
6. 100 μL DNaz I çözeltisi filtreli tüpün üst yüzeyine konuldu. 15-25°C’de 15 dk. inkübe edildi.
7. Filtreli tüpe 500 μL Yıkama tamponu I eklendi ve 8000 x g’de 15 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.
8. Filtreli tüpe 500 μL Yıkama tamponu II eklendi ve 8000 x g’de 15 sn. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.
9. Filtreli tüpe 200 μL Yıkama tamponu II eklendi ve en yüksek devirde (yaklaşık 13000 x g) 2 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpü içindeki sıvı ile birlikte atıldı.
10. Filtreli tüp 1,5 mL’lik mikrotüp içine yerleştirildi.
11. Elüsyon tamponundan 50 μL filtreli tüpe eklendi. 8000 x g’de 1 dk. santrifüj edildi.
12. Elde edilen RNA’lar, cDNA sentezi için -80°C’de saklandı.

3.11.2. RNA’nın Saflık ve Miktar Tayini

1, 10, 50 μM konsantrasyonlarda ZEA maruziyeti sonrasında HK-2 hücrelerinden izole edilen RNA’ların miktarı ve saflığı ‘Take-3 Plate’ kullanılarak mikropłaka okuyucu spektrofotometrede ölçüldü. 260 nm’deki ölçümler RNA miktarının belirlenmesinde kullanıldı. RNA’nın saflığının belirlenmesinde kullanılan A_{260}/A_{280} oranı ise yaklaşık $1,95 \pm 0,1$ olmalıdır.

3.11.3. cDNA Sentezi

cDNA tek veya çift sarmallı olabilir ve mRNA kalıbından ters transkriptaz enzimi kullanılarak sentezlenir. Eğer yapılan deney çift sarmallı cDNA gerektiriyorsa, bir başka DNA sentez basamağı ile gerçekleştirilebilir.

Ölçüm sonucunda elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi için total 500 ng olacak şekilde 'Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit' (Roche Life Science) ile üretici firmanın vermiş olduğu kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

Kit içeriği

Transkriptör ters transkriptaz: 50 µL; 200 mM potasyum fosfat, 2 mM ditiyotritol, %0,2 Triton X-100, %50 gliserol (pH 7,2)

Transkriptör ters transkriptaz reaksiyon tamponu (x5): 1 mL; 250 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 40 mM MgCl₂ (pH 8,5)

Koruyucu RNaz inhibitörü: 50 µL; 20 mM Hepes-KOH, 50 mM KCl, 8 mM ditiyotritol, %50 gliserol (pH 7,6)

Deoksünükleotid karışımı: 200 µL; 10 mM, dATP, dGTP, dCTP, dTTP

Anchored-oligo (dT)₁₈ primer: 100 µL

Random heksamer primer: 100 µL

Kontrol RNA: 20 µL

Kontrol primer, insan porfobilinojen deaminaz (PBGD) karışımı: PBGD için 5 µM ileri ve geri primer

PCR kalitede su

Deney protokolü

1. Steril, nükleaz içermeyen, ince duvarlı PCR tüpü buz içine konuldu ve içerisinde kalıp primer karışımı hazırlandı:

Toplam RNA: 500 ng

Anchored-oligo(dT)₁₈ primer (vial 5): 1 µL

Random heksamer primer (vial 6): 1 µL

Su (vial 8): Reaksiyonun toplam hacmi 13 µL olacak şekilde su eklendi.

2. Kalıp primer karışımını denatüre etmek için karışım 65°C'de 10 dk. inkübe edildi ve tüp hızlı bir şekilde buz üstüne alındı.

3. Kalıp primer karışımını içeren tüpe ters transkriptaz karışımının geri kalan bileşenleri aşağıdaki belirtildiği sırayla eklendi:

Ters transkriptaz reaksiyon tamponu (x 5): 4 µL

Koruyucu RNaz inhibitörü:	0,5 µL
Deoksinükleotid karışımı:	2 µL
Transkriptoz ters transkriptaz:	0,5 µL
Toplam hacim:	20 µL

4. Tüp içindeki maddeler dikkatli bir şekilde karıştırıldı ve spin santrifüj yapıldı. Vorteks yapılmamalıdır.

5. Daha sonra ters transkriptaz karışımı 55°C’de 30 dk. boyunca inkübe edildi.

6. Transkriptaz ters transkriptaz 85°C’de 5 dk. inkübe edilerek inaktif hale getirildi.

7. Tüp buz üstüne alınarak reaksiyon durduruldu.

8. cDNA saflaştırmaya gerek olmaksızın PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

3.11.4. Gen Ekspresyonunun RT-PCR ile Tayini

Tablo 3-1’te primer dizileri verilen nükleer reseptör genleri, karbonhidrat-lipit metabolizmasında rol oynayan genler ve oksidatif hasar ile ilişkili genlerin ekspresyonları gene özgün primerler kullanılarak RT-PCR ile gerçekleştirildi.

Kullanılan malzemeler

‘SYBR® Green PCR Master Mix’ karışımı,

Gene özgün primerler (Tablo 3-1’de deneylerde kullanılan primer dizileri gösterilmiştir.)

PCR kalitede su.

Tablo 3-1: RT-PCR ile tayininde kullanılan primer dizileri.

Gen adı	Primer dizisi (5'-3')	Sıcaklık (°C)	Kaynak
<i>L-Fabp</i>	F: TGTCGGAAATCGTGCAG R: GATTATGTCGCCGTTGAGTT	53	Wang ve ark., 2005
<i>HO-1</i>	F: ATGACACCAAGGACCAGAGC R: GTGTAAGGACCCATCGGAGA	60	Bahmani ve ark., 2011
<i>α-GST</i>	F: TTCCTTGGGCTGCCAGGC R: GTTCCAGCAAGTGCCAATCC	60	Czerwinski ve ark., 1997
<i>Hsp70</i>	F: CCGGTTCCCTGCTCTCTGTC R: CAGTCCACTACCTTTTTCGAGA	60	El Golli Bennour ve ark., 2009
<i>Nrf2</i>	F: CGGTATGCAACAGGACATTG R: ACTGGTTGGGGTCTTCTGTG	60	Lee ve ark., 2007
<i>DNMT1</i>	F: CCTCCAAAAACCCAGCCAAC R: TCCAGGACCCTGGGGATTTC	60	Ahmadnejad ve ark., 2017
<i>MGMT</i>	F: TGCACAGCCTGGCTGAATG R: GGTGAACGACTCTTGCTGGAA	58	Lai ve ark., 2008
<i>β-aktin</i>	F: AACTACCTTCAACTCCAT R: TGATCTTGATCTTCATTGTG	48	Rosa ve ark., 2009

3.11.4.1. Deney Protokolü

1. Aşağıdaki gösterildiği gibi uygun miktarlarda bileşenler ilave edilerek RT-PCR karışımı hazırlandı ve dikkatlice pipetleme yapıldı:

‘SYBR® Green PCR Master Mix’ karışımı:	10 μ L
10 μ M forward primer:	1 μ L
10 μ M reverse primer:	1 μ L
PCR kalitede su:	3 μ L
Toplam hacim:	15 μ L

2. Hazırlanan PCR karışımından 15 μ L mikropiçin her kuyucuğuna ilave edildi.

3. cDNA örnekleri steril su ile 1:5 oranında seyreltili.

4. Hazırlanan cDNA örneklerinden 5 μ L her bir kuyucuğa eklendi ve mikropiçin üzeri mikropiç filmi ile kapatıldı.

5. Mikropiç 1500 x g’de 2 dk. santrifüj edildi.

6. Mikropiç LightCycler 480 RT-PCR cihazına konularak ölçüm yapıldı. RT-PCR protokolü Tablo 3-2’de gösterilmiştir.

Tablo 3-2: RT-PCR protokolü.

Program adı	Siklus	Sıcaklık °C	Süre
Polimeraz aktivasyonu	1	95	2 dk.
Denatürasyon	40	95	5 sn.
Primerlerin hedef DNA' ya bağlanması	40	48-64	10 sn.
Uzama	40	72	5-20 sn.
Uzama	1	72	1 dk.

Sonuçların değerlendirilmesi

Tablo 3-1'te primer dizileri verilen genler ve referans gen olarak kullanılan β -aktin için spesifik RT-PCR kantitatif Ct değerleri belirlendi. Genlerin relatif ekspresyonu kontrol grubuna göre karşılaştırmalı Ct yöntemi ile değerlendirildi.

3.12. Proteinlerin Western Blot Yöntemi ile Tayini

3.12.1. Proteinlerin İzolasyonu

Hücreden proteinlerin izolasyonu RIPA lizis tampon kiti (Santa Cruz Biotechnology) ile üretici firmanın vermiş olduğu kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

Kit içeriği

1x lizis tamponu (Vial 1): 50 mL; pH 7,4 $\pm$ 0,1

Fenilmetilsülfonil florit (PMSF) (Vial 2): 500 μ L; 200mM, DMSO'da çözündürülmüş

Proteaz inhibitör kokteyli (Vial 3): 500 μ L; DMSO'da çözündürülmüş

Sodyum ortovanadat (Vial 4): 500 μ L; 100mM, suda çözündürülmüş

Deney protokolü

1. Bölüm 3.9'da belirtildiği üzere hazırlanan 1×10^6 hücre 200 μ L PBS (1x) içinde süspande edildi.

2. 4 °C' de 1000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi ve üst faz pellete zarar verilmeden uzaklaştırıldı.

3. Aşağıda gösterildiği gibi 7 örnek için verilen uygun miktarlarda bileşenler temiz bir tüpte hazırlandı. Her bir örnek tüpüne 40 μ L karışım eklenerek köpürene kadar karıştırıldı:

Lizis tamponu:	300 µL
Proteaz inhibisyon kokteyli:	15 µL
PMSF:	1,02 µL

4. Tüpler zaman kaybetmeden buz üstüne oturtuldu ve 30 dk. bekletildi. 30 dk. boyunca her 5 dk.'da bir vortekste karıştırıldı.

5. 4 °C' de 13000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi ve üst faz temiz tüpe alındı. Elde edilen proteinler daha sonraki kullanımlar için 500 µL'lik tüplere bölündü ve -80 °C'de saklandı.

6. Bradford yöntemi ile protein miktar ölçümü yapılırken her bir örnek 1/100 sulandırılarak ölçüldü. Hesaplama yapılırken bulunan değer 100 ile çarpıldı.

3.12.2. Proteinlerin Miktar Tayini

İzole edilen proteinekstrelerinde protein miktarları Bio-Rad protein tayini II kiti ile Bradford prensibine göre ölçüldü (Bradford, 1976).

Yöntemin esası

Bio-Rad protein tayini, Bradford prensibine dayanır, basit ve doğrusallığı yüksek bir yöntem olup çözülmüş proteinlerin konsantrasyonlarını tayin eder. Asidik 'coomassie® brilliant blue G-250 boyasının, eklendiği protein çözeltisinde özellikle arginin olmak üzere, esas olarak basit ve aromatik aminoasit rezidülerine bağlanması sonucu oluşan rengin şiddeti 465-595 nm'de mikropilaka okuyuculu spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanır.

Kit içeriği

Protein tayini boya reaktifi konsantresi: 450 mL boya

Sığır serum proteini (BSA, standart): BSA standardı kit protokolüne uygun olarak 1,41 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde 20 mL bidistile suda çözüldü. BSA ana stok çözeltisi 500 µL'lik tüplere bölünerek -20°C'de saklandı.

Protein standart çözeltileri

BSA ana stok çözeltisinden konsantrasyonları 8; 10; 20; 40; 80 µg/mL olacak şekilde BSA standart çözeltileri taze olarak hazırlandı ve bu çözeltiler protein tayininde standart eğri çizimi için kullanıldı. Standartlar 3'er kere tekrarlı çalışıldı.

Deney protokolü

1. 1 hacim konsantre boya reaktifi, 4 hacim distile su ile seyreltildi.
2. 10'ar μL Standart çözeltiler ve histon proteinlerinden 96 kuyucuklu mikrolarka kuyucuklarına uygun konfigürasyonda konuldu.
3. Her kuyucuğa seyreltilmiş boya reaktifinden 200 μL eklendi.
4. Oda sıcaklığında en az 5 dk. inkübe edildi. Zaman geçtikçe absorbans artacağından dolayı örnekler 1 saatten fazla oda ısısında bekletilmemelidir.
5. Oluşan rengin şiddeti 595 nm'de mikrolarka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.

Protein miktarının hesaplanması

Ölçülen her bir örnek için protein miktarı, BSA standart çözeltileri ile hazırlanan ölçü eğrisine göre hesaplandı. Protein ve histon proteinleri için ekstrelerdeki protein miktarı ng/ μL olarak hesaplandı.

3.12.3. HSP70 Proteinlerinin Western Blot Tekniği ile Tayini

İzole edilen proteinlerde HSP70 proteinlerinin tayinleri western blot tekniği kullanılarak gerçekleştirildi.

3.12.3.1. Deneyin Esası

Jelde ayırımı yapılmış proteinlerin membrana emdirilerek ilgilenilen proteinin işaretlenmiş spesifik antikor yardımıyla membran üzerinde yarı kantitatif ya da kantitatif olarak belirlenmesidir.

Çözeltilerin hazırlanışı

%0,1'lik Tuzlu ve Tween 20'li Tris tamponu (TBST) çözeltisi : 7,88 g tris hidroklorür (son konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde) tartıldı ve üzerine 800 mL deiyonize su eklendi ve pH 7,5 olacak şekilde 1 M NaOH ile ayarlandı. Üzerine 8,766 g NaCl (son konsantrasyonu 150 mM olacak şekilde) ve 1 mL Tween 20 (%0,1) eklendi ve 1000 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı.

%5'lik yağsız süt tozu çözeltisi : 5 g yağsız süt tozu, 100 mL %0,1'lik TBST çözeltisinde hazırlandı.

%2,5'lik BSA çözeltisi: 2,5 g BSA, 100 mL %0,1'lik TBST çözeltisinde hazırlandı.

%1'lik BSA çözeltisi: 1 g BSA, 100 mL %0,1'lik TBST çözeltisinde hazırlandı.

5x yürütme tamponu: 15 g tris (son konsantrasyonu 0,025 M olacak şekilde), 72 g glisin (son konsantrasyonu 0,192 M olacak şekilde) tartıldı ve üzerine 800 mL deiyonize su eklendi. Çözündürüldükten sonra 5 g SDS eklenerek ve pH 8,3 olacak şekilde ile ayarlandı. 1000 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı.

Deney esnasında kullanılmak üzere 1: 5 oranında deiyonize su ile seyreltilerek 1x yürütme tamponu hazırlandı.

10x aktarım tamponu: 60 g tris, 144 g glisin tartıldı ve üzerine 800 mL deiyonize su eklendi. Çözündürüldükten sonra pH 8,3 olacak şekilde ile ayarlandı. 1000 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı.

Hazırlanan aktarım tamponu deney esnasında kullanılmak üzere 1: 10 oranında deiyonize su ile 1x'e seyretildi. 100 mL 1x aktarım tamponuna, 200 mL HPLC kalitede metanol eklenerek deiyonize su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

Yükleme solüsyonu: 495 µL örnek indirgeyici ajana (Laemmli, 2x) 5 µL 2-merkaptoetanol eklenerek hazırlandı.

Primer antikor çözeltileri: HSP70 primer antikoru 1: 2000 oranında (Örn: 2,5 µL antikor üzerine 5 mL %1'lik BSA çözeltisi) %1'lik BSA çözeltisi ile seyreltildi.

Sekonder antikor çözeltileri: Sekonder antikor 1: 5000 oranında (Örn: 1 µL antikor üzerine 5 mL %1'lik BSA çözeltisi) %1'lik BSA çözeltisi ile seyreltildi.

3.12.3.2. Deney Protokolü

1. Bölüm 3.12.1'de izole edilen proteinlerin konsantrasyonu 30 µg olacak şekilde hesaplandı ve ince duvarlı PCR tüpüne aktarıldı.

2. Çalışma buz üzerinde gerçekleştirildi.

3. Protein örneklerine 10 µL yükleme solüsyonu ilave edildi ve son hacim 20 µL olacak şekilde deiyonize su eklendi.

4. Protein örneklerine vorteks ve daha sonra spin yapıldı.

5. Örnekler blok ısıtıcıda 95°C'de 5 dk. denatüre edildi.

6. Örnekler buz üzerine konuldu ve spin yapıldı.
7. Ticari olarak temin edilen hazır %10 tris-glisin poliakrilamit jel, dikey elektroforez tankına yerleştirildi. Tank hazırlanan 1x yürütme tamponu ile dolduruldu.
8. Birinci kuyucuğa 7 µL protein standartı ve diğer kuyucuklara da 20'şer µL protein karışımı yüklendi ve proteinlerin zarar görmemesi için tankın etrafı buzla kaplandı. 300 mA sabit olacak şekilde 30 dk. 70 V; 45 dk. 100 V; 45 dk. 125 V kademeli yükseltilerek yürütüldü.
9. Jelde yürütülmüş proteinler, ıslak aktarım yöntemiyle 0,45 µm PVDF membranla sandviç modelinde kaset içinde hazırlanarak tanka yerleştirildi. Tank aktarım tamponuyla doldurularak, 100 V 350 mA 120 dk. süre ile aktarım işlemi gerçekleştirildi. Proteinlerin zarar görmemesi için tankın etrafı buzla kaplandı.
10. Bloklama için membran küçük kap içerisinde 5 mL %5'lik yağsız süt tozu çözeltisi ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi ve %5'lik yağsız süt tozu çözeltisi döküldü.
11. 5 mL primer antikor içeren çözelti, içerisinde membran bulunan kaba konuldu ve 4°C'de gece boyunca çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Ertesi sabah 1,5 saat de oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. Primer antikor içeren çözelti atıldı.
12. Membran art arda 2 kez 5 dk. ve 2 kez 10 dk. olmak üzere %0,1'lik TBST çözeltisi ile yıkandı.
13. 5 mL sekonder antikor içeren çözelti, içerisinde membran bulunan kaba konuldu ve 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda cihazında inkübe edildi. Sekonder antikor içeren çözelti atıldı.
14. Membran art arda 2 kez 5 dk. ve 2 kez 10 dk. olmak üzere %0,1'lik TBST çözeltisi ile yıkandı.
15. Membranlar asetat kağıtları arasına koyularak western blot görüntüleme (luminol) çözeltisi eklendi, 5 dk. bekletildi ve görüntüleme cihazında 5 dk. sonrasında görüntüleme yapıldı.
16. Elde edilen bantlar, her bir protein için 'striping' işlemi yapıldıktan sonra referans olarak kullanılan β-aktin proteinine göre kıyaslama yapılarak değerlendirilmiştir.

3.12.3.3. ‘Stripping’ İşlemi

Deneyin esası

Bağlanmış primer antikorun kimyasal çözelti yardımıyla membran ile oluşturduğu bağın koparılmasıyla uzaklaştırılarak membrana aktarılan proteinlere yeni bir primer antikorun bağlanmasını sağlar. Böylece aynı örneklerde ilgili proteinin referans proteine karşı kıyaslanması mümkün olur.

Çözeltilerin hazırlanışı

‘Stripping’ tamponu: 15 g glisin ve 1 g SDS tartıldı. Üzerine 800 mL deiyonize su eklendi ve çözündürüldükten sonra 10 mL Tween 20 eklendi. pH 2,2 olacak şekilde ile ayarlandı. 1000 mL’ye deiyonize su ile tamamlandı.

Primer antikor çözeltileri: Primer antikor (β -aktin) 1: 500 oranında (Örn: 10 μ L antikor üzerine 5 mL %1’lik BSA çözeltisi) %1’lik BSA çözeltisi ile seyreltilti.

Sekonder antikor çözeltileri: Sekonder antikor 1: 5000 oranında (Örn: 1 μ L antikor üzerine 5 mL %1’lik BSA çözeltisi) %1’lik BSA çözeltisi ile seyreltilti.

Deney protokolü

1. Daha önce protein aktarımı yapılarak primer antikor bağlanmış membrana yüzeyi kaplayacak kadar ‘stripping’ tamponu eklendi, 5-10 dk. çalkalayıcıda inkübe edildi.

2. Tampon döküldü, yeniden ‘stripping’ tamponu eklendi ve 5-10 dk. çalkalayıcıda inkübe edildi.

3. Tampon döküldü, yüzeyi kaplayacak kadar PBS (1x) eklendi ve 10 dk. süre ile 2 kere çalkalayıcıda yıkandı.

4. PBS (1x) dökülerek yüzeyi kaplayacak kadar %0,1’lik TBST çözeltisi eklendi, 5 dk süre ile 2 kere yıkandı.

5. %5 yağsız süt tozu çözeltisinde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilerek bloklama yapıldı.

6. Primer antikor (β -aktin, 1: 500) çözeltisi ile 4°C’de gece boyunca çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Ertesi sabah 1,5 saat de oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. Primer antikor içeren çözelti atıldı.

7. Membran art arda 2 kez 5 dk. ve 2 kez 10 dk. olmak üzere %0,1'lik TBST çözeltisi ile yıkandı.

8. 5 mL sekonder antikor içeren çözelti, içerisinde membran bulunan kaba konuldu ve 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda cihazında inkübe edildi. Sekonder antikor içeren çözelti atıldı.

9. Membran art arda 2 kez 5 dk. ve 2 kez 10 dk. olmak üzere %0,1'lik TBST çözeltisi ile yıkandı.

10. Membranlar asetat kağıtları arasına koyularak western blot görüntüleme (luminol) çözeltisi eklendi, 5 dk. bekletildi ve görüntüleme cihazında 5 dk. sonrasında görüntüleme yapıldı.

3.13. İstatistiksel Değerlendirme

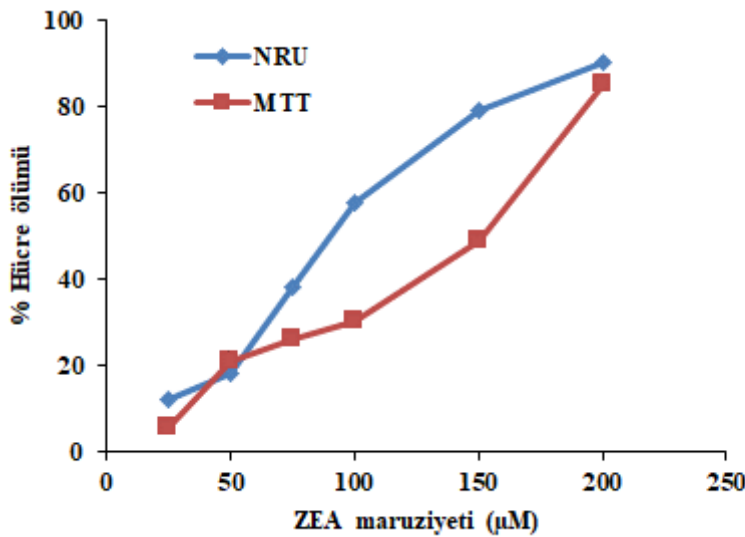
Veriler “ortalama $\pm$ standart sapma” olarak verildi. Verilerin istatistiksel olarak “SPSS 21.0 for Windows” paket programı kullanılarak değerlendirildi. Tüm parametreler için öncelikle normalite testi ve varyansların homojenliği testi uygulandıktan sonra, normal dağılım gösteren veriler için ‘Tek Yönlü Varyans’ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi) analizi ile çoklu karşılaştırma uygulandı, $p < 0,001$ ve $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Sitotoksosite Sonuçları

ZEA'nın HK-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, hücre canlılığının kantitatif ölçümüne dayanan MTT ve NRU testleri ile yapıldı. MTT ve NRU testleri için hücreler, ZEA ile 6 farklı konsantrasyonda ve 3'er tekrarlı olacak şekilde maruz bırakıldı. Aynı zamanda, testler farklı günlerde 2 kez tekrarlandı.

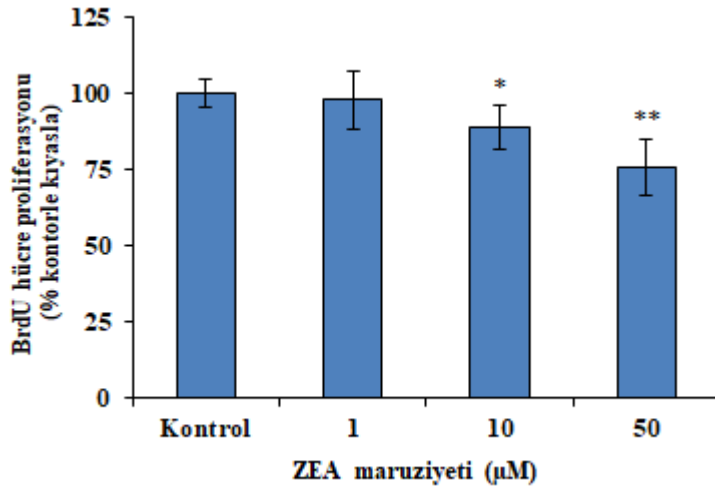
MTT ve NRU testleri ile HK-2 hücrelerinde 24 saatlik, 25; 50; 75; 100; 150 ve 200 μM konsantrasyonlarındaki ZEA maruziyetinin konsantrasyona karşı % hücre ölümü grafikleri Şekil 4-1'de gösterilmiştir. HK-2 hücrelerinde MTT ve NRU testlerine göre ZEA için IC_{50} değerleri sırası ile 133,42 ve 101,74 μM olarak belirlendi.



Şekil 4-1: 24 saat 25-200 μM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde MTT ve NRU testleri sonuçları

4.2. BrdU Hücre proliferasyonu Testi Sonuçları

24 saat 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde BrdU testi ile kontrole kıyasla hücre proliferasyonunda sırasıyla %2,1 oranında anlamlı olmayan azalma, %11,07 ($p < 0,05$) ve %24,34 ($p < 0,001$) oranlarında anlamlı azalma tespit edildi (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde % hücre proliferasyonu (kontrole göre kıyasla) üzerine etkisi.

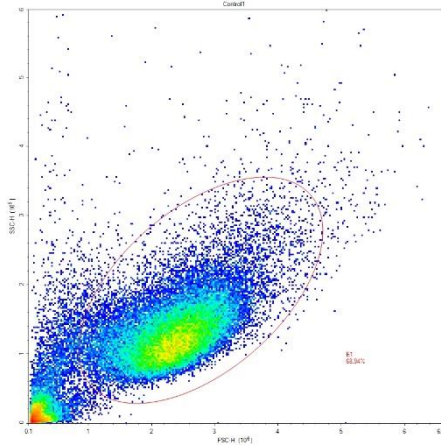
Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

*kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p < 0,05$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

**kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p < 0,001$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

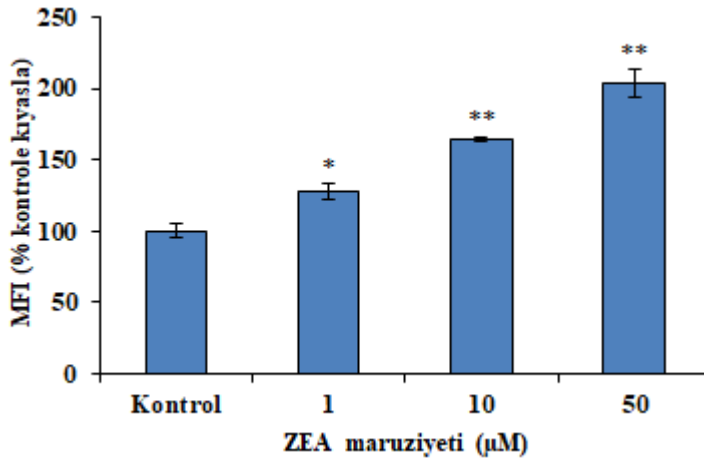
4.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Flow Sitometri Analizi ile Sonuçları

Analiz edilen hücreler FSC/SSC grafiğinde belirli alanlara düşer. Bu alandan incelenecek hücrelerin yeri belirlenerek kapılama yapılır. HK-2 hücrelerinin FSC/SSC grafiğindeki dağılımı Şekil 4-3'te gösterilmiştir.



Şekil 4-3: HK-2 hücrelerinin FSC-H/SSC-H kanalında dağılımı.

24 saat 1, 10 ve 50 µM konsantrasyonlarda ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde kontrole kıyasla ROS seviyelerinde 1, 10, 50 µM konsantrasyonlarda ZEA maruziyeti ile sırasıyla %27,69 ($p < 0,05$); %64,25 ($p < 0,001$) ve %103,82 ($p < 0,001$) oranında anlamlı artış bulundu (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde %ortalama fluoresans şiddetine (%MFI, kontrole kıyasla) etkisi.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

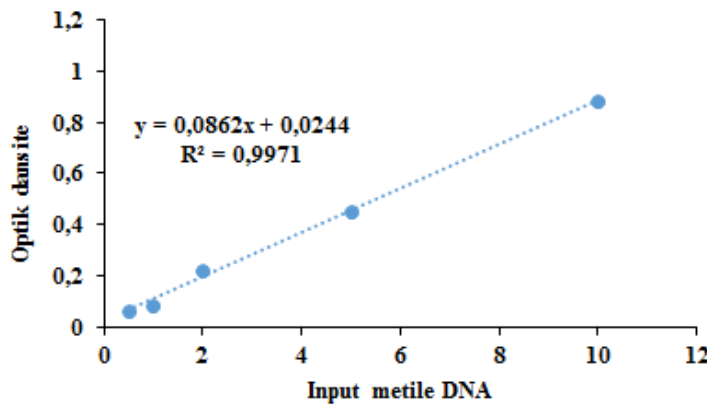
* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p < 0,05$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p < 0,001$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

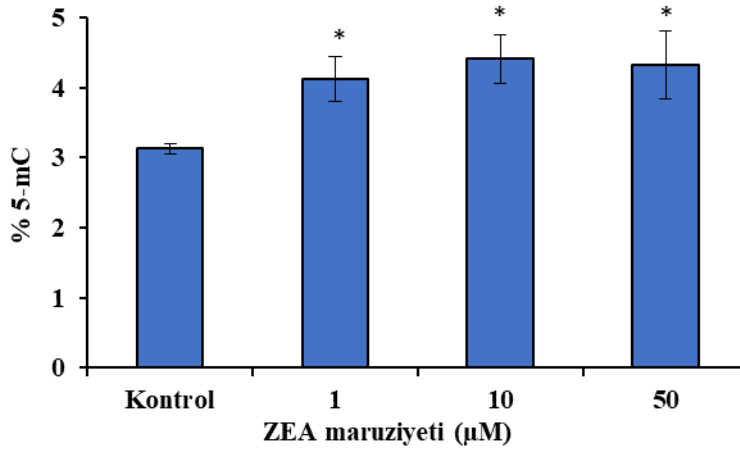
4.4. DNA Metilasyonu Sonuçları

Global 5-mC içeriğinin kantitatif tayini 5-mC Eliza kit ile gerçekleştirildi. Bölüm 3.10.3'te anlatıldığı şekilde %5-mC miktarı kit ile temin edilen standartlar ile hazırlanan standart eğri üzerinden hesaplandı (**Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**).

24 saat 1, 10 ve 50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde %5-mC seviyeleri Şekil 4-5'te gösterilmiştir. %5-mC seviyeleri kontrol grubuna kıyasla 1, 10, 50 µM ZEA maruziyeti yapılan hücrelerde sırasıyla %31,75; %40,69; %38,08 oranında anlamlı artış olarak belirlendi.



Şekil 4-5: 5-mC standardına ait kalibrasyon eğrisi.

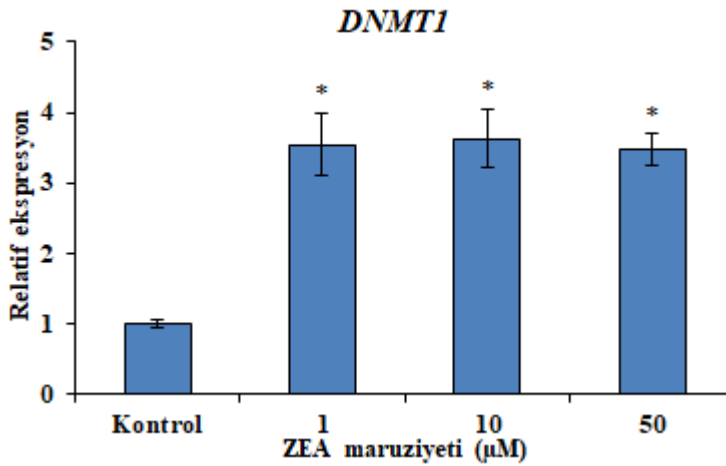


Şekil 4-6: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde %5-mC seviyeleri

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p < 0,05$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

24 saat 1, 10 ve 50 µM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde *DNMT1* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla 1, 10 ve 50 µM ZEA maruziyeti yapılan hücrelerde sırasıyla 3,54; 3,62 ve 3,45 ($p < 0,05$) kat anlamlı artış tespit edildi.



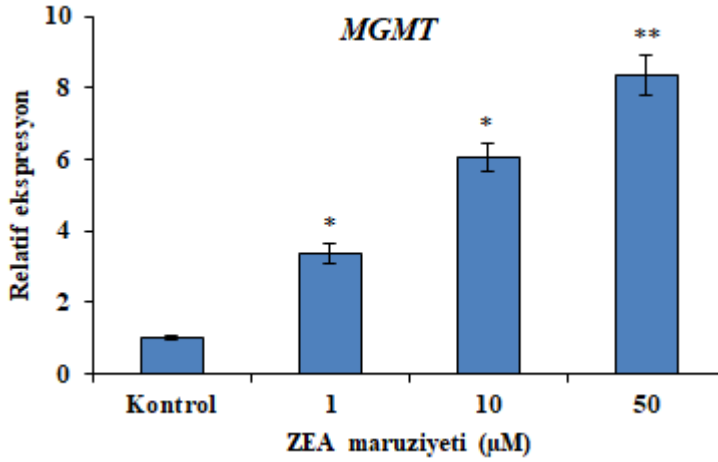
Şekil 4-7: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde *DNMT1* genine ait relative ekspresyon seviyeleri

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p < 0,05$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

24 saat 1, 10 ve 50 µM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde *MGMT* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla 1, 10 ve 50 µM ZEA

maruziyeti yapılan hücrelerde sırasıyla 3,36 ($p<0,05$); 6,05 ($p<0,05$) ve 8,36 ($p<0,001$) kat anlamlı artış tespit edildi.



Şekil 4-8: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde MGMT genine ait relative ekspresyon seviyeleri

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

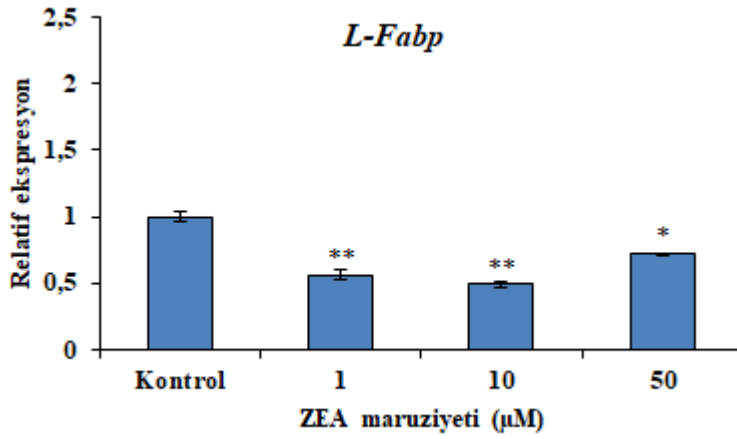
* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,05$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,001$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

4.5. Oksidatif Hasar Genlerinin Ekspresyonları

Tez çalışmasında oksidatif hasar ile ilişkili genler (*Nrf2*, *Hsp70*, *α -GST*, *HO-1*) ve *L-Fabp* çalışıldı.

***L-Fabp*:** 24 saat 1, 10 ve 50 µM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde *L-Fabp* ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla 1, 10 ve 50 µM konsantrasyonlarda sırasıyla %43,8 ($p<0,001$); %50,56 ($p<0,001$) ve %28,28 ($p<0,05$) oranında anlamlı azalma tespit edildi.



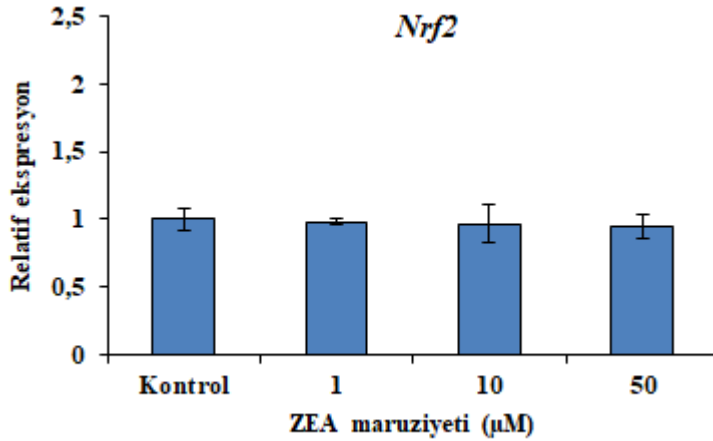
Şekil 4-9: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde *L-Fabp* ait relative ekspresyon seviyeleri

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p < 0,05$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

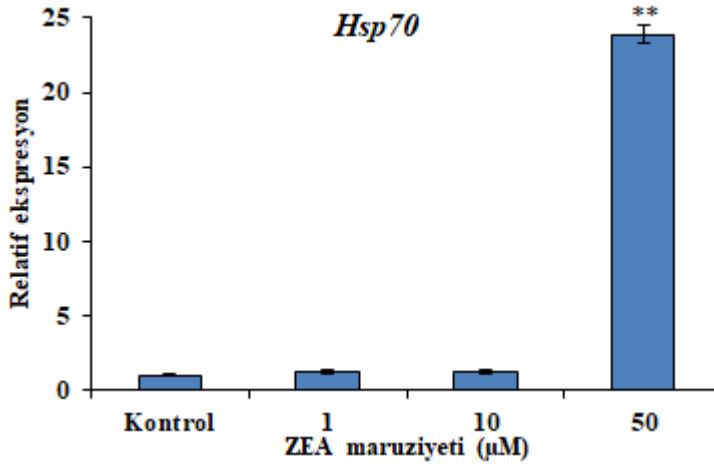
** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p < 0,001$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

***Nrf2* Geni:** 24 saat 1, 10 ve 50 µM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde *Nrf2* Geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla 1, 10 ve 50 µM konsantrasyonlarda anlamlı düzeyde değişiklik gözlenmedi.



Şekil 4-10: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde *Nrf2* ait relative ekspresyon seviyeleri

***Hsp70* Geni:** 24 saat 1, 10 ve 50 µM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde *Hsp70* Geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda anlamlı değişiklik gözlenmez iken, 50 µM konsantrasyonda ise 23,89 kat ($p < 0,001$) anlamlı artış tespit edildi.

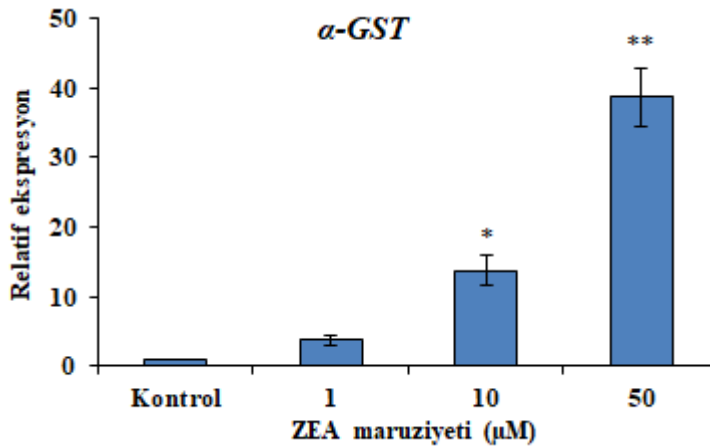


Şekil 4-11: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde *Hsp70* genine ait relative ekspresyon seviyeleri

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p < 0,001$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

α -GST Geni: 24 saat 1, 10 ve 50 µM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde α -GST geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla 1 µM konsantrasyonda sırasıyla 3,72 kat anlamlı olmayan artış, 10 ve 50 µM konsantrasyonlarda ise sırasıyla 13,82 ($p < 0,05$) ve 38,67 ($p < 0,001$) anlamlı artış tespit edildi.



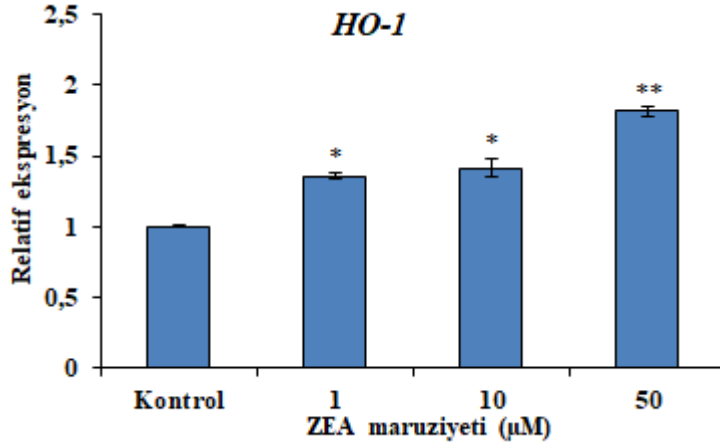
Şekil 4-12: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde α -GST genine ait relative ekspresyon seviyeleri

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p < 0,05$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p < 0,001$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

HO-1 Geni: 24 saat 1, 10 ve 50 μ M konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde *HO-1* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla 1, 10 ve 50 μ M konsantrasyonlarda sırasıyla 1,35 ($p<0,05$); 1,41 ($p<0,05$) ve 1,81 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi.



Şekil 4-13: 24 saat 0-50 μ M konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde *HO-1* genine ait relative ekspresyon seviyeleri

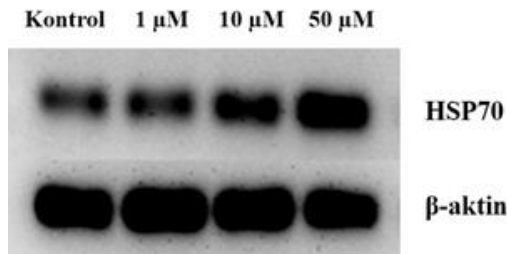
Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,05$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

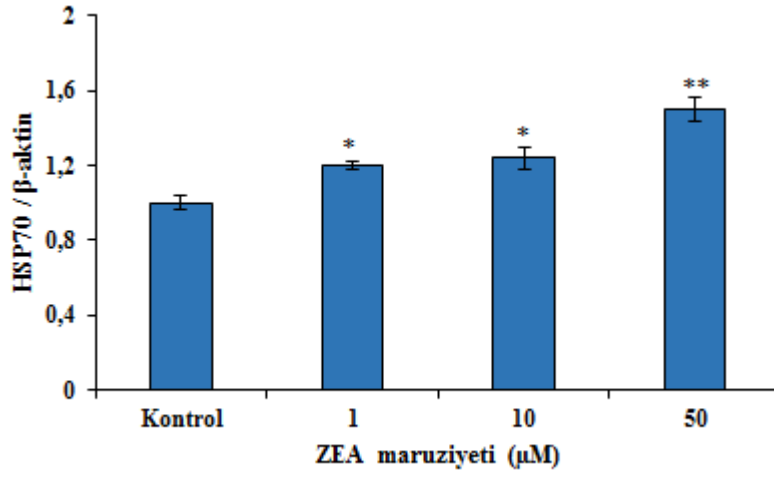
** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,001$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

4.6. Western Blot Sonuçları

ZEA maruziyeti sonucu Hsp70 için western blot yöntemiyle yapılan protein analizinden elde edilen membran görüntüsü Şekil 4-14'te verilmiştir. 24 saat 1, 10 ve 50 μ M konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde Hsp70 protein ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 1,2 kat ($p<0,05$), 1,24 kat ($p<0,05$) ve 1,5 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-15).



Şekil 4-14: 24 saat 0-50 μ M konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde Hsp70 western blot membran görüntüsü.



Şekil 4-15: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde Hsp70 protein ekspresyonuna relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. (n=3).

* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,05$;

** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,001$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

5. TARTIŞMA

Günümüzde sıklıkla kullanılan pek çok ürün endokrin bozucu olarak adlandırılan kimyasal maddeleri içermektedir ve son yıllarda bu kimyasal maddelerin olası toksik etkilerine ilişkin çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Endokrin bozucu mikotoksinlerden biri olan ZEA'nın, su ve günlük yaşamda tüketilen tahıl içeren gıda ürünlerinde bulunduğu bununla birlikte özellikle insan üreme sistemi ve gelişimi için önemli risk oluşturduğu bildirilmektedir (EFSA, 2011). Dolayısıyla, özellikle gıdalar ile sıklıkla maruz kalınan mikotoksinlerden biri olan ZEA'nın risk değerlendirme çalışmalarında toksik etki mekanizmalarının aydınlatılması ihtiyacı doğmaktadır.

ZEA gibi pek çok *Fusarium* toksini gıda ve hayvan yemlerinde yaygın olarak bulunur ve insan, hayvan ve bitkilerde çeşitli hastalıklara sebep olabilir (Lattanzio ve ark., 2012). ZEA ile kontamine olmuş tahıl ürünlerinin ticareti de dünya genelinde dağılım gösterir (Zinedine, 2007). İnsan ve hayvanlarda ZEA maruziyeti ZEA ve metabolitleriyle kontamine olmuş tahılların tüketimi ile gerçekleşebilir. ZEA, memeli östrojen reseptörüne kompetitif olarak bağlanarak hiperöstrojenizm ve üreme sistemi bozuluklarına sebep olur (Kuiper-Goodman ve ark., 1987). Ayrıca, ZEA'nın gelişimsel toksisite, immünotoksisite ve genotoksisite gibi toksik etkileri de raporlanmıştır (Zinedine ve ark., 2007). IARC tarafından Grup 3 karsinojenler (kanserojen olarak sınıflandırılmayanlar) grubuna dahil edilmiştir (IARC, 2016).

Tez çalışmasında ZEA'nın doza bağlı olarak gelişen toksisitesinde, oksidatif hasar ve nefrotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, ZEA'nın insan böbrek hücrelerinde (HK-2) sitotoksitesisi, ROS ve lipid peroksidasyonu gibi oksidatif hasar belirteçlerinin incelenmesi, *HO-1*, *L-Fabp*, *α -GST*, *Hsp70*, *Nrf2* gibi hem oksidatif hasar hem de nefrotoksisite ile ilgili genlerde gen ve protein düzeyinde ekspresyonları üzerine etkileri araştırılmıştır.

ZEA'nın HK-2 hücre dizisinde hücre canlılığı üzerine etkilerini değerlendirmek için MTT ve NRU testleri yapıldı. ZEA'nın HK-2 hücrelerinde IC₅₀ değerleri sırasıyla MTT testi için 133,42 μ M NRU testi için 101,74 μ M olarak saptandı. Benzer şekilde; Sang ve ark. (2016) insan böbrek epitel hücreleri (HEK-293) üzerinde 3-300 μ M ZEA maruziyeti ile yaptıkları hücre canlılığı testinde ciddi bir düşüş tespit edip, ZEA için

IC₅₀ değerini 80 µM olarak hesaplamışlardır. Karaman ve Özden (2018) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada insan karaciğer kanser hücrelerinde (HepG2) MTT ve NRU testlerinde IC₅₀ değerleri ZEA için sırasıyla 143,35 ve 60,45 µM olarak bildirilmiştir. El Golli Bennour ve ark. (2009)'nın HepG2 hücrelerinde yaptığı bir çalışmada, 24 saat 0-120 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti sonucu IC₅₀ değeri 110 µM olarak tespit edilmiştir. Başka bir karaciğer hücre dizisi olan CCL13 hücrelerinde ise 24 saat süre ile 0-200 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti sonucu IC₅₀ değeri 100 µM olarak belirlenmiştir (Lee ve ark., 2013). Çeşitli hücre hatlarında ZEA'nın IC₅₀ değerlerinin tez çalışmasında elde edilen sonuçlara benzer olduğu gösterilmiştir (Tatay ve ark, 2014; Venkataramana ve ark., 2014).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar ZEA'nın 0,1-10 nM aralığında farklı konsantrasyonlarda çeşitli hücre tiplerinde hücre proliferasyonunu stimüle ettiğini göstermiştir (Lecomte ve ark., 2017). Ancak, ZEA'nın hücre canlılığını inhibe edip, apoptoz ve nekroz dahil hücre ölümünü indüklediğini gösteren pek çok çalışma da bulunmaktadır. Sertoli hücrelerinde yapılan bir çalışmada 24 saatlik 15-60 µM ZEA maruziyetinde hücre canlılığında ciddi bir düşüş görülmüştür (Zheng ve ark., 2016). Tez çalışmasında HK-2 hücrelerinin 1, 10 ve 50 µM konsantrasyonlarda 24 saat boyunca ZEA maruziyetine bırakılmaları sonucunda BrdU hücre proliferasyonunun %2,1; %11,07 (p<0,05); %24,34 (p<0,001) oranında azaldığı görülmüştür. ZEA'nın çeşitli *in vitro* çalışmalarda doza bağımlı bir şekilde hücre proliferasyonunun azalmasına neden olduğu bildirilmiştir (Hou ve ark., 2015; Obremski ve Poniatowska-Broniek, 2015; Wang ve ark., 2018; Zheng ve ark., 2018). Fakat, Karaman ve Özden tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise HepG2 hücrelerinde 1, 10 ve 50 µM konsantrasyonlarda 24 saat boyunca ZEA'ya maruziyet ile kontrole kıyasla relatif hücre proliferasyonunun sırasıyla %7,2, %20,59 ve %41,71 oranlarında arttığı bildirilmiştir.

In vitro ve *in vivo* koşullarda oksidatif hasarın ZEA toksisitesinin ana yollarından biri olduğu görülmüştür (Abid-Essefiet ve ark., 2004; Fleck ve ark., 2012; Gao ve ark., 2013; Marin ve ark., 2013). Tez çalışmasında ZEA'nın ROS üzerindeki etkileri DCFDA yöntemi ile flow sitometri kullanılarak ölçülmüştür. 1, 10 ve 50 µM konsantrasyonlarda 24 saat boyunca ZEA maruziyetine bırakılan HK-2 hücrelerinde sırasıyla %27,69 (p<0,05); %64,25 (p<0,001) ve %103,82 (p<0,001) oranında anlamlı artış bulunmuştur. Diğer çalışmalarda da ZEA ve metabolitlerinin DNA hasarına yol

açıp, ROS üretimini arttırdıkları gösterilmiştir (Fleck ve ark., 2012; Tatay ve ark., 2016; 2017). So ve ark. (2014) insan bronşiyal epitel hücreleri üzerinde ZEA maruziyeti yaptıkları bir çalışmada ZEA'nın hücre ölümünü, oksidatif stresi ve ROS oluşumunu indüklediğini göstermişlerdir. Bu sebeple tez çalışmasında ZEA'nın oksidatif hasar ile ilişkili genlerden *L-Fabp*, *Nrf2*, *Hsp70*, α -*GST* ve *HO-1* gen ekspresyon düzeyleri de ölçülmüştür. Bunun sonucunda, *L-Fabp* gen ekspresyonunda anlamlı bir azalma görülürken, *Hsp70*, α -*GST* ve *HO-1* genlerinin ekspresyonlarında anlamlı artışlar görülmüştür. *Nrf2* geninde ise anlamlı bir değişiklik ölçülmemiştir. Ayrıca, *Hsp70* için western blot yöntemiyle yapılan protein ekspresyon analizinde ise anlamlı artış ölçülmüştür. Isı şoku proteinlerinin stres koşullarına cevap verme konusunda kritik bir rol oynadığı ve hasar sonrası böbrekte aşırı ifade edildiği gösterilmiştir (Schober ve ark. 1997). Tez çalışmasındaki sonuçlar ile uyumlu olarak ZEA'nın farklı hücre dizilerinde ROS oluşumuna ve *Hsp70* ekspresyonunda artışına neden olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Abid-Essefi ve diğerleri, 2003; Hassen ve diğerleri, 2005, 2007; El Golli Bennour ve diğerleri, 2009; Lee ve diğerleri, 2013). Ayrıca, elde edilen bulgulara benzer şekilde çeşitli nefrotoksik maddelere maruziyetin primer insan proksimal tübüler epitel hücrelerinde *HO-1* gen ekspresyonu seviyelerinde önemli artışlara sebep olduğu gösterilmiştir (Zager ve ark., 2012; Adler ve ark., 2016). Proksimal tübüllerde *L-fabp* ekspresyonunun bilinen nefrotoksik maddelere maruziyet ile belirgin şekilde yükseldiği bildirilmiştir (Matsui ve ark., 2011). Fakat tez çalışmasında ZEA maruziyetinin HK-2 hücrelerinde *L-fabp* ekspresyon seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir. Seçilen bu genlerin böbrek toksisitesinde idrarda saptanabilecek önemli biyogöstergeler olduğu rapor edilmiş olup (Hoffmann ve ark., 2010 Andreucci ve ark., 2017), tez çalışması ile de bu genlerin *in vitro* koşullarda da böbrek hücrelerinde kullanılabilecek önemli biyogöstergeler olabileceği gösterilmiştir.

ZEA toksisitesinde epigenetik mekanizmaların rolünün araştırılması amacıyla global DNA metilasyonu ve DNA metilasyonunda rol oynayan gen düzeyleri ölçülmüştür. 1, 10 ve 50 μ M konsantrasyonlarda 24 saat ZEA maruziyeti ile HK-2 hücrelerinde global DNA metilasyonunda anlamlı bir artış tespit edilmiş olup, *DNMT* ve *MGMT* genlerinin ekspresyon düzeylerinde de anlamlı bir artışın ortaya çıktığı rapor edilmiştir. ZEA'nın toksisitesinde epigenetik mekanizmalar çok fazla çalışılmamış olup, benzer şekilde Karaman ve Özden (2018) tarafından yapılan çalışmada ZEA'nın HepG2 hücrelerinde 1-50 μ M konsantrasyonlarda global DNA metilasyonunda artışa

sebebi olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde, fare oositlerinde ZEA'nın gelişim üzerine etkilerini incelemek amacıyla, 12 saat süre ile 10 ve 50 µM konsantrasyonlarda ZEA'nın %5-mC seviyesinde önemli artışa neden olduğu gösterilmiş, ancak DNA metiltransferazların (*DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b* ve *DNMT3L*) mRNA seviyelerinin kontrole kıyasla değişmediği rapor edilmiştir (Zhu ve ark., 2014). Han ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, domuz oositlerinde 30 saat süre ile 0-30 µM konsantrasyon aralığında ZEA'nın %5-mC seviyesinde doza bağlı olarak anlamlı artışa neden olduğunu, bu sonuçlarla tutarlı olarak DNA metiltransferazların (*DNMT3a* ve *DNMT3b*) mRNA seviyelerinde de anlamlı artış olduğu bildirilmiştir.

Sonuç olarak, tez çalışmasından elde edilen veriler de göz önüne alındığında ZEA'nın ROS oluşumunu tetiklediği, oksidatif hasarda rol oynayan genlerin (*HO-1*, *Hsp70*, *α-GST*, *L-Fabp*) ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca, ZEA'nın böbrek hücrelerinde global DNA metilasyonu üzerinde de bir takım değişikliklere sebep olabileceği gösterilmiştir. Tez çalışmasından elde edilen sonuçların, risk değerlendirme sürecinde ZEA'nın yanında diğer endokrin bozucu kimyasalların toksisitesinde ortaya çıkan anahtar moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

Abd Alla, E.S., (1997). Zearalenone: incidence, toxigenic fungi and chemical decontamination in Egyptian cereals. *Nahrung*, **41** (December (6)), 362–365.

Abes, S., Ouanes, Z., Ben Salah Abes, J., Houas, Z., Oueslati, R., Bacha, H., Othman, O., (2006). The protective effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate against haematological, biochemical and pathological changes induced by Zearalenone in mice. *Toxicon*, **47**(5): 567.

Abid-Essefi, S., Baudrimont, I., Hassen, W., Ouanes, Z., Mobio, T.A., Anane, R., Creppy, E., EBacha, H. (2003). DNA fragmentation, apoptosis and cell cycle arrest induced by zearalenone in cultured DOK, Vero and Caco-2 cells: prevention by Vitamin E. *Toxicology*, **192**, 237–248.

Abid-Essefi, S., Ouanes, Z., Hassen, W., Baudrimont, I., Creppy, E.E., Bacha, H. (2004). Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicol. In Vitro*, **18**, 467–474

Adler, M., Ramm, S., Hafner, M., Muhlich, J.L., Gottwald, E.M., Weber E., Jaklic, A., Ajay, A.K., Svoboda, D., Auerbach, S., Kelly, E.J., Himmelfarb, J., Vaidya, V.S. (2016) A Quantitative Approach to Screen for Nephrotoxic Compounds In Vitro. *J Am Soc Nephrol.*, Apr;**27**(4):1015-28.

Ahamed, S., Foster, J.S., Bukovsky, A., Wimalasena, J. (2001). Signal transduction through the ras/Erk pathway is essential for the mycoestrogen zearalenone-induced cell-cycle progression in MCF-7 cells. *Mol. Carcinog.*, **30**, 88–98.

Ahmadnejad, M., Amirizadeh, N., Mehrasa, R., Karkhah, A., Nikougoftar, M., Oodi, A. (2017). Elevated expression of DNMT1 is associated with increased expansion and proliferation of hematopoietic stem cells co-cultured with human MSCs. *Blood Research*, **52**(1), 25-30.

Andreucci, M., Faga, T., Pisani, A., Perticone, M., Michael, A. (2017). The ischemic/nephrotoxic acute kidney injury and the use of renal biomarkers in clinical practice. *European Journal of Internal Medicine*, **39** (1–8)

Ashiq, S. (2015). Natural occurrence of mycotoxins in food and feed: Pakistan perspective. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **14**, 159–175.

Aufricht, C. (2005). Heat-shock protein 70: molecular supertool? *Pediatr Nephrol*, **20**: 707–713. 2.

Bacha, H., Chekir, L., Ellouz, F., Hadidane, R., Creppy, E.E. (1993). Effects of zearalenone on fertilization and gestation in rats. In: Scudamore, K.A. (Ed.), *Proceedings of the UK Workshop, Occurrence and Significance of Mycotoxin*, The University of West London, Central Sciences Laboratory, London, pp. 258–262.

Bahmani, P., Hassanshahi, G., Halabian, R., Roushandeh, A.M., Jahanian-Najafabadi, A., Roudkenar, M.H. (2011). The expression of heme oxygenase-1 in human-derived cancer cell lines. *Iran. J. Med. Sci.*, **36**(4), 260.

Becci, P.J., Voss, K.A., Hess, F.G., Gallo, M.A., Parent, R.A., Stevens, K.R., Taylor, J.M. (1982a). Long-term carcinogenicity and toxicity study of zearalenone in the rat. *J. Appl. Toxicol.*, **2**, 247–254.

Bernhoft, A., Behrens, G.H., Ingebrigtsen, K., Langseth, W., Berndt, S., Haugen, T.B. and Grotmol, T. (2001). Placental transfer of the estrogenic mycotoxin zearalenone in rats. *Reproductive Toxicology*, **15**, 545–550.

Bernhoft, A., Torp, M., Clasen, P.E., Loes, A.K., Kristoffersen, A.B. (2012). Influence of agronomic and climatic factors on *Fusarium* infestation and mycotoxin contamination of cereals in Norway. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal., Control Expo Risk Assess*, **29** (7), 1129–1140.

Biehl, M.L., Prelusky, D.B., Koritz, G.D., Hartin, K.E., Buck, W.B. and Trenholm, H.L. (1993). Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **121**, 152–159.

Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, **16**: 6–21.

Bovee, T.F., Helsdingen, R.J., Rietjens, I.M., Keijer, J., Hoogenboom, R.L. (2004). Rapid yeast estrogen bioassays stably expressing human estrogen receptors α and β , and green fluorescent protein: A comparison of different compounds with both receptor types. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **91**, 99–109.

Bravin, F., Duca, R.C., Balaguer, P. and Delaforge, M. (2009). *In vitro* cytochrome p450 formation of a mono-hydroxylated metabolite of zearalenone exhibiting estrogenic activities: possible occurrence of this metabolite *in vivo*. *International Journal of Molecular Sciences*, **10**, 1824-1837.

Bukau, B., Horwich, A.L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, **92**, 351-366.

Caldwell, R.W., Tuite, J., Stob, M., Baldwin, R. (1970). Zearalenone production by *Fusarium* species. *Appl. Microbiol.*, **20**, 31–34.

Cañas, N., Valero, T., Villarroja, M., Montell, E., Vergés, J., García, A.G., López, MG. (2007). Chondroitin sulfate protects SH-SY5Y cells from oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J Pharmacol Exp Ther.*, **323**(3):946-53.

Castelo, M.M., Sumner, S.S., Bullerman, L.B. (1998). Stability of fumonisins in thermally processed corn products. *J. Food Prot.*, **161**, 1030–1033.

Cetin, Y., Bullerman, L.B. (2005a). Cytotoxicity of *Fusarium* mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. *Food Chem. Toxicol.*, **43**, 755–764.

Chan, K., Kan, Y. (1999). Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proc Natl Acad Sci.*, **96**:12731-6

Christman, J.K. (1982). Separation of major and minor deoxyribonucleoside monophosphates by reverse-phase high-performance liquid chromatography: A simple method applicable to quantitation of methylated nucleotides in DNA. *Analytical Biochemistry*, **119** (1):38-48

Collins, T.F., Sprando, R.L., Black, T.N., Olejnik, N., Eppley, R.M., Alam, H.Z., Rorie, J., Ruggles, D.I. (2006). Effects of zearalenone on in utero development in rats. *Food Chem. Toxicol.*, **44**, 1455–1465.

Cortinovis, C., Pizzo, F., Spicer, L. J., Caloni, F. (2013). *Fusarium* mycotoxins: effects on reproductive function in domestic animals—a review. *Theriogenology*, **80**, 557–564.

Czerwinski, M., Kiem, H.P., Slattery, J.T. (1997). Human CD34+ cells do not express glutathione S-transferases alpha. *Gene Ther.*, **4**(3), 268

D'mello, J., Placinta, C., Macdonald, A. (1999). Fusarium mycotoxins: A review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **80**, 183–205.

Dänicke, S., Brüßow, K.P., Valenta, H., Ueberschär, K.H., Tiemann, U., Schollenberger, M. (2005b). On the effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated wheat in diets for gilts on feed intake, growth performance and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone. *Molecular Nutrition & Food Research.*, **49**, 932-943.

Dänicke, S., Swiech, E., Buraczewska, L., Ueberschär, K.H. (2005a). Kinetics and metabolism of zearalenone in young female pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, **89**, 268-276.

Denis, H., Ndlovu, M.N., Fuks, F. (2011). Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO reports*, **12**: 647-56.

Doi, K., Noiri, E., Sugaya, T. (2010). Urinary L-type fatty acid-binding protein as a new renal biomarker in critical care. *Curr Opin Crit Care.*, **16**:545–9.

Dong, M., He, X.J., Tulayakul, P., Li, J.Y., Dong, K.S., Manabe, N., Nakayama, H., Kumagai, S. (2010). The toxic effects and fate of intravenously administered zearalenone in goats. *Toxicon*, **55**, 523-530.

EFSA (European Food Safety Authority). (2004). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed. *EFSA J.*, **89**, 1–35

EFSA (European Food Safety Authority). (2011). Scientific opinion on the risk for public health related to the presence of zearalenone in food. *Eur. Food Saf. Auth. J.*, **9**, 1–124.

El Golli Bennour, E., Bouaziz, C., Ladjimi, M., Renaud, F., Bacha, H. (2009). Comparative mechanisms of zearalenone and ochratoxin A toxicities on cultured HepG2 cells: is oxidative stress a common process? *Environmental Toxicology: An International Journal*, **24**(6), 538-548.

Eriksen, G.S., Alexander, J. (1998). In: Nordic Council of Ministers (Ed.), *Fusarium Toxins in Cereals – A Risk Assessment*, vol. 502. *Tema Nord*, Copenhagen, pp. 7–58

Etienne, M., Dourmad, J.Y. (1994). Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: a review. *Livest. Prod. Sci.*, **99**–113.

European Commission, (2006). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance).

European Commission, (2007). Commission regulation (EC) No. 1126/2007 on maximum levels of certain contaminants in foodstuff as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. *Off J. Eur. Union.*, 14–17.

Ferguson, M.A., Vaidya, V.S., Waikar, S.S., Collings, F.B., Sunderland, K.E., Gioules, C.J., Bonventre, J.V. (2010). Urinary liver-type fatty acid-binding protein predicts adverse outcomes in acute kidney injury. *Kidney Int.*, **77**:708–14.

Ferrigo, D., Raiola, A., Causin, R. (2016). *Fusarium* toxins in cereals: occurrence, legislation, factors promoting the appearance and their management. *Molecules*, **21** (5)

Fitzpatrick, D.W., Picken, C.A., Murphy, L.C., Buhr, M.M. (1989). Measurement of the relative binding affinity of zearalenone, alpha-zearalenol and beta-zearalenol for uterine and oviduct estrogen receptors in swine, rats and chickens: an indicator of estrogenic potencies. *Comparative Biochemistry and Physiology. C*, **94**, 691-694

Flannigan, B. (1991). Mycotoxins. In: D’Mello, J.P.F., Duffus, C.M., Duffus, J.H. (Eds.), *Toxic Substances in Crop Plants. The Royal Society of Chemistry*, Cambridge, pp. 226–257.

Fleck, S. C., Hildebrand, A. A., Muller, E., Pfeiffer, E., & Metzler, M. (2012). Genotoxicity and inactivation of catechol metabolites of the mycotoxin zearalenone. *Mycotoxin Research*, **28**, 267–273.

Food Additives (Ed.)(2004). Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO/FAO Food additives Series 44. IPCS – International Programme on Chemical Safety. WHO, Geneva

Fotakis, G., Timbrell, J.A. (2006) *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, **160**, 171-177.

Fu, W.P., Sun, C., Dai, L.M., Yang, L.F., Zhang, Y.P. (2007). Relationship between COPD and polymorphisms of HOX-1 and mEPH in a Chinese population. *Oncol Rep.*, **17**(2):483-488.

Fu WP, Zhao ZH, Fang LZ, Sun C, Liu L, Zhang JQ, et al. Heme oxygenase-1 polymorphism associated with severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Chin Med J* 2007; 20(1):12-16. 4.

Fuke, C., Shimabukuro, M., Petronis, A., Sugimoto, J., Oda, T., Miura K., Miyazaki, T., Ogura, C., Okazaki, Y., Jinno, Y. (2005). Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. *Ann Hum Genet.*, (Pt 3):196-204.

Giudice, A., Montella, M. (2006). Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway: a promising strategy in cancer prevention. *Bioessays*, **28**:169-81.

Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, **344**: 721-724

Han, J., Wang, T., Fu, L., Shi, L. Y., Zhu, C. C., Liu, J., Zhang, Y., Cui, X. S., Kimb, N. H., Sun, S. C. (2015). Altered oxidative stress, apoptosis/autophagy, and epigenetic modifications in Zearalenone-treated porcine oocytes. *Toxicology Research*, **4**(5), 1184-1194.

Hartl, F.U., Bracher, A., Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, **475**, 324–332.

Hassen, W., Ayed-Boussema, I., Oscoz, A.A., De Cerain, L.A., Bacha, H. (2007). The role of oxidative stress in zearalenone-mediated toxicity in Hep G2 cells: oxidative DNA damage, glutathione depletion and stress proteins induction. *Toxicology.*, **232**:294–302.

Hassen, W., El Golli, E., Baudrimont, I., Mobio, A. T., Ladjimi, M. M., Creppy, E. E., Bacha, H. (2005). Cytotoxicity and Hsp 70 induction in HepG2 cells in response to zearalenone and cytoprotection by sub-lethal heat shock. *Toxicology*, **207**(2), 293-301

Hayes, J.D. (1995). Strange RC. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Rad Res Commun.*, **22**: 193-207.

Hestbjerg, H., Nielsen, K.F., Thrane, U., Elmholt, S. (2002). Production of trichothecenes and other secondary metabolites by *Fusarium culmorum* and *Fusarium equiseti* on common laboratory media and a soil organic matter agar: An ecological interpretation. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 7593–7599

Hoffmann, D., Fuchs, T. C., Henzler, T., Matheis, K. A., Herget, T., Dekant, W., Hewitt, P., Mally, A. (2010). Evaluation of a urinary kidney biomarker panel in rat models of acute and subchronic nephrotoxicity. *Toxicology*, **277**, 49–58

Huang, R.F., Huang, S.M., Lin, B.S., Wei, J.S., Liu, T.Z. (2001). Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells. *Life Sci.*, **68**, 2799-2811.

Hueza, I.M., Raspantini, P.C.F., Raspantini, L.E.R., Latorre, A.O., Górniak, S.L. (2014). Zearalenone, an estrogenic mycotoxin, is an immunotoxic compound. *Toxins*, **6**, 1080–1095.

International Agency for Research on Cancer. (IARC) Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–104; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2016; Volume 7, pp. 1–25.

JECFA, 2000. Zearalenone. In: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)

Jones, P.A., Baylin, S.B. (2007). The epigenomics of cancer, *Cell*, **128**(4):683-92.

Kaina, B., Margison, Gp., Christmann, M. (2010). Targeting O-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Science: CMLS*, **67**(21):3663-81.

Karaman, E.F., Özden, S. (2018). Zearalenon ve Metabolitlerinin Enerji Metabolizmasında Rol Oynayan Genler Üzerine Etkilerinde Epigenetik Değişikliklerin İn Vitro İncelenmesi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Katzenellenbogen, B. S., Korach, K.S. (1997). A new actor in the estrogen receptor drama—enter ER-beta. *Endocrinology*, **138**, 861–862.

Kouadio, J.H., Mobio, T.H., Baudrimont, I., Moukha, S., Dano, S.D., Creppy, E.E. (2005). Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology*, **213**, 56–65

Kriszt, R., Krifaton, C., Szoboszlay, S., Cserhati, M., Kriszt, B., Kukolya, J., Czéh, A., Fehér-Tóth, S., Török, L., Szőke, Z., Kovács, K.J., Barna, T., Ferenczi, S. (2012). A new zearalenone biodegradation strategy using non-pathogenic *Rhodococcus pyridinivorans* K408 strain. *PLoS One*, **7** (9), e43608.

Kriszt, R., Krifaton, C., Szoboszlay, S., Ferenczi, S. (2012) A New Zearalenone Biodegradation Strategy Using Non-Pathogenic *Rhodococcus pyridinivorans* K408 Strain. *PLoS One*, **7** (9):e43608.

Kuiper, G.G.J.M., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., Van der Saag, P.T., Van der Burg, B., Gustafsson, J.A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor b. *Endocrinology*, **139**, 4252–4263

Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M., Watanabe, H. (1987). Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **7**, 253–306

Kurtoğlu, E.L., Tekedereli, İ. (2015). DNA onarım mekanizmaları. *Balikesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, **4**(3): 169-177.

Lai, J. C., Cheng, Y. W., Goan, Y. G., Chang, J. T., Wu, T. C., Chen, C. Y., Lee, H. (2008). Promoter methylation of O 6-methylguanine-DNA-methyltransferase in lung cancer is regulated by p53. *DNA Repair*, **7**(8), 1352-1363.

Lang, T.J. (2004). Estrogen as immunomodulator. *Clin. Immunol.*, **113**, 224–230.

Lattanzio, V.M.T., Nivarlet, N., Lippolis, V., Gatta, S.D., Huet, A.C., Delahaut, P., Granier, B., Visconti, A. (2012). Multiplex dipstick immunoassay for semi-

quantitative determination of Fusarium mycotoxins in cereals. *Anal. Chim. Acta.*, **718**, 99–108.

Lecomte, S., Lelong, M., Bourguine, G., Efstathiou, T., Saligaut, C., Pakdel, F. (2017). Assessment of the potential activity of major dietary compounds as selective estrogen receptor modulators in two distinct cell models for proliferation and differentiation. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **325**, 61–70

Lee, H., Kang, C., Yoo, Y. S., Hah, D. Y., Kim, C. H., Kim, E., Kim, J. S. (2013). Cytotoxicity and the induction of the stress protein Hsp 70 in Chang liver cells in response to zearalenone-induced oxidative stress. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **36**(2), 732-740.

Lee, K.E., Kim, B.H., Lee, C. (2010). Occurrence of Fusarium mycotoxin beauvericin in animal feeds in Korea. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **157**, 190–194

Lee, O. H., Jain, A.K., Papusha, V., Jaiswal, A.K. (2007). An auto-regulatory loop between stress sensors INrf2 and Nrf2 controls their cellular abundance. *J. Biol. Chem.*, **282**(50), 364

Li, Y., Paonessa, J.D., Zhang, Y. (2012). Mechanism of chemical activation of Nrf2. *PLoS One*, 7 p. e35122

Lioi, M.B., Santoro, A., Barbieri, R., Salzano, Ursini, M.V. (2004). Ochratoxin and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutat. Res.*, **557**, 19–24

Maaroufi, K., Chekir, L., Creppy, E.E., Ellouz, F., Bacha, H. (1996). Zearalenone induces modifications in haematological and biochemical parameters in rats. *Toxicon*, **34**, 534–540.

Malekinejad, H., Maas-Bakker, R., Fink-Gremmels, J. (2006). Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *Veterinary Journal*, **172**, 96-102.

Massart, F., Saggese, G. (2010). Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development. *Int. J.Androl.*, **33**, 369–376.

Matsui, K., Kamijo-Ikemorif, A., Sugaya, T., Yasuda, T., Kimura, K. (2011). Renal liver-type fatty acid binding protein (L-FABP) attenuates acute kidney injury in

aristolochic acid nephrotoxicity. *The American journal of pathology*, **178**(3), 1021–1032.

McKenzie, K.S., Sarr, A.B., Mayura, K., Bailey, R.H., Miller, D.R., Rogers, T.D. (1997). Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food Chem. Toxicol.*, **35** (August (8)), 807–820.

Metzler, M., Pfeiffer, E., Hildebrand, A. (2010). Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. *World Mycotoxin J.*, **3**, 385–401.

Mirocha, C.J., Pathre, S.V., Robison, T.S. (1981). Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine-milk. *Food and Cosmetics Toxicology*, **19**, 25-30

Molina-Molina, J.M., Real, M., Jimenez-Diaz, I., Belhassen, H., Hedhili, A., Torné, P., Fernández, M.F., Olea, N. (2014). Assessment of estrogenic and anti-androgenic activities of the mycotoxin zearalenone and its metabolites using in vitro receptor-specific bioassays. *Food and Chemical Toxicology*, **74**, 233–239

Morimoto RI, Santoro MG. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat Biotechnol* 1998; **16**: 833–838.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J.Immunol.Methods.*, **65**:55-63

Moss, M.O. (2002). Mycotoxin review – 2. *Fusarium*. *Mycologist.*, **16**: 158-161.

Nakamura, T., Sugaya, T., Node, K., Ueda, Y., Koide, H. (2006). Urinary excretion of liver-type fatty acid-binding protein in contrast medium-induced nephropathy. *Am J Kidney Dis.*, **47**:439–44.

National Toxicology Program (NTP). (1982). NTP Carcinogenesis Bioassay of Zearalenone in F 344/N Rats and F6C3F1 Mice (Technical Report Series No. 235), Research Triangle Park, North Carolina, Department of Health and Human Services.

Negishi, K., Noiri, E., Sugaya, T., Li, S., Megyesi, J., Nagothu, K., Portilla, D. (2007). A role of liver fatty acid-binding protein in cisplatin-induced acute renal failure. *Kidney Int.*, **72**:348–58.

Nikaido, Y., Yoshizawa, K., Danbara, N., Tsujita-Kyutoku, M., Yuri, T., Uehara, N., Tsubura, A. (2004). Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reprod. Toxicol.*, **18**, 803–811.

Ouanes, Z., Abid, S., Ayed, I., Anane, R., Mobio, T., Creppy, E., Bacha, H. (2003). Induction of micronuclei by zearalenone in Vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: protective effect of vitamin E. *Mutat. Res.*, **538**, 63–70

Parikh, C.R., Thiessen-Philbrook, H., Garg, A.X., Kadiyala, D., Shlipak, M.G., Koyner, J.L., Edelstein, C.L., Devarajan, P., Patel, U.D., Zappitelli, M., Krawczeski, C.D., Passik, C.S., Coca, S.G. (2013). Performance of kidney injury molecule-1 and liver fatty acid-binding protein and combined biomarkers of AKI after cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol.*, **8**:1079–88.

Petrof, E.O., Ciancio, M., Chang, E.B. (2004). Role and regulation of intestinal epithelial heat shock proteins in health and disease. *Chin J Dig Dis.*, **5**: 45–50.

Pfeiffer, E., Hildebrand, A., Damm, G., Rapp, A., Cramer, B., Humpf, H.U. ve Metzler, M. (2009). Aromatic hydroxylation is a major metabolic pathway of the mycotoxin zearalenone in vitro. *Molecular Nutrition & Food Research*, **53**, 1123-1133.

Pfeiffer, E., Kommer, A., Dempe, J.S., Hildebrand, A.A., Metzler, M. (2011). Absorption and metabolism of the mycotoxin zearalenone and the growth promotor zeranol in Caco-2 cells *in vitro*. *Mol. Nutr. Food Res.*, **55** (April (4)), 560–567

Portilla, D., Dent, C., Sugaya, T., Nagothu, K.K., Kundi, I., Moore, P., Noiri, E., Devarajan, P. (2008). Liver fatty acid-binding protein as a biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int.*, **73**:465– 72.

Ramsahoye, B.H. (2002). Measurement of genome wide DNA methylation by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Methods*, **27**(2):156-61.

Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc.*, **3**: 1125-1131

Rosa, S. C., Gonçalves, J., Judas, F., Mobasheri, A., Lopes, C., Mendes, A. F. (2009). Impaired glucose transporter-1 degradation and increased glucose transport and

oxidative stress in response to high glucose in chondrocytes from osteoarthritic versus normal human cartilage. *Arthritis Research & Therapy*, **11**(3), R80.

Russmann, E., Sieber, K., Doppler, C., Hinzpeter, M. (1993). Cell proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescence). In: Coligan, J. E., Bierer, B. E., Margulies, D. M., Shevach, E. M., Strober, W. and Coico, R. (eds) *Current Protocols in Immunology*. Volume 1. John Wiley & Sons, New York. Chapter 7.10. *Colloquium Roche Molecular Biochemicals*, **4**, 1–4.

Sang, Y., Li, W., Zhang, G. (2016). The protective effect of resveratrol against cytotoxicity induced by mycotoxin, zearalenone. *Food Funct.*, **7**, 3703–3715

Schober, A., Müller, E., Thureau, K., Beck, F.X. (1997). The response of heat shock proteins 25 and 72 to ischaemia in different kidney zones. *Pflugers Arch.*, **434**(3):292–299

Schothorst, R.C., van Egmond, H.P. (2003). Collection of Occurrence Data of Fusarium Toxins in Food And assessment of Dietary Intake by the Population of EU Member States; *SCOOP European Project*, task 3.2.10

Seng, D., Hoell, A., Mussler, B., Eisenbrand, G. (2001). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor alpha and beta. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **363**, R144

Sforza, S., Dall'Asta, C. (2006). Marchelli, R. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/massspectrometry. *MassSpectrom. Rev.*, **25**, 54–76.

Shier, W.T., Shier, A.C., Xie, W., Mirocha, C.J. (2001). Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicon*, **39**, 1435-1438.

Shin, B.S., Hong, S.H., Bulitta, J.B., Hwang, S.W., Kim, H.J., Lee, J.B., Yang, S.D., Kim, J.E., Yoon, H.S., Kim, D.J., Yoo, S.D. (2009). Disposition, oral bioavailability, and tissue distribution of zearalenone in rats at various dose levels. *J Toxicol Environ Health A*, **72**(21-22):1406-11.

So, M. Y., Tian, Z., Phoon, Y. S., Sha, S., Antoniou, M. N., Zhang, J., Wu, R. S. S., Tan-Un, K. C. (2014). Gene expression profile and toxic effects in human bronchial epithelial cells exposed to zearalenone. *PLoS One*, **9**(5), e96404.

Spada, F., Haemmer, A., Kuch, D., Rothbauer, U., Schermelleh, L., Kremmer, E., Carell, T., Langst, G., Leonhardt, H. (2007). DNMT1 but not its interaction with the replication machinery is required for maintenance of DNA methylation in human cells. *J Cell Biol.*, **176**:565-571.

Stahl, S., Chun, T.Y., Gray, W.G. (1998). Phytoestrogens act as estrogen agonists in an estrogen-responsive pituitary cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **152**, 41–48.

Sundberg, A.G.M., Appelkuist, E.L., Backman, L., Dallner, G. (1999). Quantitation of glutathione transferase pi in the urine by radioimmunoassay. *Nephron*, **66**: 162-169

Sundberg, A.G.M., Appelkuist, E.L., Backman, L., Dallner, G. (1994). Urinary p class glutathione transferase-pi as an indicator of tubular damage in the human kidney. *Nephron*, **67**: 308-316

Supavekin, S., Zhang, W., Kucherlapati, R., Kaskel, F.J., Moore, L.C., Devarajan, P. (2003). Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int*, **63**:1714–24.

T.C. Resmi Gazete, 16 Kasım 1997. Sayı: 23172. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği

T.C. Resmi Gazete, 17 Mayıs 2008. Sayı: 26879. Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ (No: 2008/26)

T.C. Resmi Gazete, 23 Eylül 2002. Sayı: 24885. Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ (No:2002/63)

T.C. Resmi Gazete, 29 Aralık 2011. Sayı 28157

Tatay, E., Espin, S., Garcia-Fernandez, A.J., Ruiz, M.J. (2017). Oxidative damage and disturbance of antioxidant capacity by zearalenone and its metabolites in human cells. *Toxicol. In Vitro.*, **45**, 334–339.

Tatay, E., Font, G., Ruiz, M.J. (2016). Cytotoxic effects of zearalenone and its metabolites and antioxidant cell defense in cho-k1 cells. *Food Chem. Toxicol.*, **96**, 43–49.

Van Meerloo, J., Kaspers, G.J.L., Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: The MTT assay. *Methods Mol Biol.*, **731**: 237-45

Wang, G., Gong, Y., Anderson, J., Sun, D., Minuk, G., Roberts, M. S., Burczynski, F. J. (2005). Antioxidative function of L-FABP in L-FABP stably transfected Chang liver cells. *Hepatology*, **42**(4), 871-879.

Yamamoto, T., Noiri, E., Ono, Y., Doi, K., Negishi, K., Kamijo, A., Kimura, K., Fujita, T., Kinukawa, T., Taniguchi, H., Nakamura, K., Goto, M., Shinozaki, N., Ohshima, S., Sugaya, T. (2007). Renal L-type fatty acid-binding protein in acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol.*, **18**:2894–902.

Yokoyama, T., Kamijo-Ikemori, A., Sugaya, T., Hoshino, S., Yasuda, T., Kimura, K. (2009). Urinary excretion of liver type fatty acid binding protein accurately reflects the degree of tubulointestinal damage. *Am J Pathol.*, **174**: 2096-106.

Yu, Z., Zhang, L., Wu, D., Liu, F. (2005). Anti-apoptotic action of zearalenone in MCF-7 cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **62**, 441–446.

Zager, R. A., Johnson, A. C., Becker, K. (2012). Plasma and urinary heme oxygenase-1 in AKI. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, **23**(6), 1048–1057.

Zain, M.E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *J. Saudi Chem. Soc.*, **15**, 129–144

Zhang, G.L., Feng, Y.L., Song, J.L., ve Zhou, X.S. (2018) Zearalenone: A Mycotoxin With Different Toxic Effect in Domestic and Laboratory Animals' Granulosa Cells. *Front Genet.*, **18**;9:667.

Zheng, W., Pan, S., Wang, G., Wang, Y.J., Liu, Q., Gu, J., Yuan, Y., Liu, X.Z., Liu, Z.P., Bian, J.C. (2016). Zearalenone impairs the male reproductive system functions via inducing structural and functional alterations of Sertoli cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **42**, 146–155.

Zhu, C. C., Hou, Y. J., Han, J., Cui, X. S., Kim, N. H., & Sun, S. C. (2014). Zearalenone exposure affects epigenetic modifications of mouse eggs. *Mutagenesis*, **29**(6), 489-495.

Zinedine, A., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.*, **45**, 1–18.

Zöllner, P., Jodlbauer, J., Kleinova, M., Kahlbacher, H., Kuhn, T., Hochsteiner, W., Lindner, W. (2002). Concentration levels of zearalenone and its metabolites in urine, muscle, tissue, and liver samples of pigs fed with mycotoxin-contaminated oats. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2494–2501.

Zuckerbraun, B.S., Biliar, T.R. (2003). Heme oxygenase-1. A cellular hercules. *Hepatology*, **37**:742-743.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ZEARALENONUN TOKSİK ETKİLERİNİN İNSAN BÖBREK HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%8	%3	%2	%6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	%1
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
3	ejfm.trakya.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
4	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	<%1
5	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
6	Submitted to Batman University Öğrenci Ödevi	<%1
7	Submitted to Yeditepe University Öğrenci Ödevi	<%1
8	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	İleyna	Soyadı	Arıman
Doğ.Yeri	Samsun	Doğ.Tar.	26.04.1992
Email	ileyna_ariman@hotmail.com	Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi	2015
Lise	Samsun Fen Lisesi	2010

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Eczacı	Sosyal Güvenlik Kurumu	2016-2019
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	YDS
İngilizce	İyi	İyi	İyi	-	63,75

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	94,45	94,34	75,98

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Word	İyi
Excel	Orta

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri:

Karaman EF, Arıman I, **Ozden S.** Evaluation of Nephrotoxic Effects of Zearalenone in Human Kidney Cells. 10th Congress of Toxicology in Developing Countries. 18-21 Nisan 2018. Belgrad, Sırbistan.

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Seyahat etmek,,Yüzmek, Film izlemek, Kitap okumak.