

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .

Tez, Yüksek Lisans'sa, **YÜKSEK LİSANS TEZİ**;

Doktora ise **DOKTORA TEZİ** ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

ZEARALENON VE METABOLİTLERİNİN ENERJİ
METABOLİZMASINDA ROL OYNAYAN GENLER
ÜZERİNE ETKİLERİNDE EPİGENETİK
DEĞİŞİKLİKLERİN *IN VITRO* İNCELENMESİ

ECEM FATMA KARAMAN

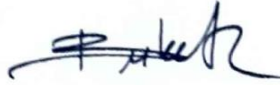
DANIŞMAN
DOÇ. DR. SİBEL ÖZDEN

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2018

TEZ ONAYI**DOKTORA TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, DOKTORA Programında Doktora öğrencisi Ecem Fatma KARAMAN tarafından Doç Dr. Sibel ÖZDEN'in danışmanlığında hazırlanan "Zearalenon ve Metabolitlerinin Enerji Metabolizmasında Rol Oynayan Genler Üzerine Etkilerinde Epigenetik Değişikliklerin In Vitro İncelenmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 01 /11/ 2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı**

Prof.Dr. Buket ALPERTUNGA
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

**Jüri-Danışman**

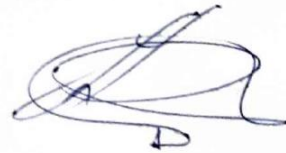
Doç Dr. Sibel ÖZDEN
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

**Jüri**

Prof.Dr. Türkan YURDUN
Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

**Jüri**

Prof.Dr. Pınar AKSOY SAĞIRLI
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

**Jüri**

Doç.Dr. Muhammed HAMİTOĞLU
Yeditepe 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.

Ecem Fatma Karaman

(İmza)



İTHAF

Aileme (kediler dahil) ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Her konuda anlayışını ve desteğini esirgemedi sunan, emeğini ödeyemeyeceğim 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, desteği ve gülüyüzü için şükran duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Gül Özhan'a ve Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'nın diğer üyelerine; pirosekanslama çalışmalarındaki desteklerinden dolayı Koç Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji ve Hepatoloji Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Müjdat Zeybel'e ve sevgili arkadaşım Buket Yiğit'e; İ. Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Pelin Arda Pirinççi ve Dr. Öğr. Üyesi Serap Sancar Baş'a, sevgili arkadaşım Cansu Özal Coşkun'a;

Gülerek hatırlayacağımız birçok güzel anıyı benden esirgemedikleri için sevgili dostlarım Arş. Gör. Dr. Ezgi Öztaş ve Arş. Gör. Dr. Mehtap Kara'ya, Farmakognozi Anabilim Dalı'dan Arş. Gör. Selin Tufan'a; sevgili çalışma arkadaşlarım Tuğçe Boran'a, Ayşe Tarbın Jannuzzi'ye, Ayşenur Günaydın'a, Mine Çağlayan'a, Merve Arıcı'ya, Şeyda Bayoğlu'na; sevgili ağabeyim İ. Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Botanik Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Hakan Özden'e;

Beni benden iyi bilir canım dostlarım Bircan Aykurt'a, Nurullah Aydoğdu'ya, Ebru Kanımdan'a, Sıdika Tapşın'a, Merve Öztürk'e, Tuğba Akhan'a; kendimi bildim bileli yanımda olan canım dostlarım, kankardeşlerim Ece Kul'a, Pelin Köse ve Gürkan Köse'ye; ablaları olmaktan gurur duyduğum kardeşlerim Dilara Karaman ve Levent Karaman'a, evlatları ve torunu olduğum için beni hep şanslı hissettiren annem Gülşen Karaman ve babam Adem Karaman'a, rahmetli dedem Hasan Sarı'ya; ailemize 2,5 yıl önce katılan, buldukları her fırsatta tez yazım sürecimi bir şekilde sabote etmeye çalışan kedilerim, asabi kızım Letafet'e ve hakiki Tosun Paşası oğlum Ziver'e teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmam sırasında TÜBİTAK-BİDEB "2211-C/Öncelikli Alanlara Yönelik Doktora Burs Programı" 2015/2 kapsamında bursiyer olarak desteklenmiş olduğumdan dolayı TÜBİTAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 58568.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XİV
ÖZET	XİX
ABSTRACT.....	XX
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mikotoksinler.....	3
2.2. Zearalenon.....	5
2.2.1. ZEA'nın Kimyasal Yapısı, Fizikokimyasal Özellikleri ve Modifiye Formları ..	5
2.3. ZEA'ya Maruziyet	7
2.4. ZEA'nın Toksikokinetiği	9
2.5. ZEA'nın Toksik Etki Mekanizmaları	13
2.5.1. Östrojenik Aktivite.....	14
2.5.2. Genotoksik Etkileri	14
2.5.3. Epigenetik Modifikasyonlar Üzerine Etkileri	17
2.5.4. Proliferasyon ve Apoptoz Üzerine Etkileri.....	18
2.5.5. Oksidatif Hasar Üzerine Etkiler	18
2.6. ZEA'nın Toksik Etkileri	20
2.6.1. Akut Toksisite	20
2.6.2. Subakut/Subkronik Toksisite	21
2.6.3. Kronik Toksisite ve Karsinojenite	22
2.6.4. Üreme ve Gelişim Üzerine Toksik Etkileri.....	26
2.6.5. İmmünotoksik Etkileri	29
2.6.6. Nörotoksik Etkileri.....	31

2.6.7. Hormonal Sistem Üzerine Toksik Etkileri.....	32
2.6.8. Metabolik Hastalıklar Üzerine Toksik Etkileri.....	33
2.7. ZEA ile İlgili Yasal Düzenlemeler	34
2.8. Epigenetik	37
2.9. Metabolik Fonksiyon Bozuklukları	39
2.9.1. Karbonhidrat ve Lipit Metabolizmasında Rol Oynayan Genler	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	44
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler	44
3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	46
3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler	47
3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	49
3.4.1. Ortamının ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Temizliği	49
3.4.2. Hücre Dizilerinin Temini	49
3.4.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler	49
3.4.4. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Alınması	50
3.4.5. Hücre Kültürünün Devamlılığının Sağlanması (Pasajlama).....	50
3.4.6. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	51
3.4.7. Hücrelerin Sayılması.....	51
3.5. ZEA ve α -ZOL Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanışı	52
3.6. Sitotoksite Testleri.....	52
3.6.1. 96 Kuyucuklu Mikroplakalarda Hücre Kültürlerinin Hazırlanması	52
3.6.2. Test Maddesinin, Negatif ve Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması.....	53
3.6.3. ZEA ve α -ZOL'ün Hücre Kültürüne Maruziyeti	55
3.6.4. MTT Testi	56
3.6.4.1. MTT Testinin Esası.....	56
3.6.4.2. MTT Testi Protokolü.....	56
3.6.5. NRU Testi	57
3.6.5.1. NRU Testinin Esası.....	57
3.6.5.2. NRU Testi Protokolü.....	57
3.6.6. Sonuçların Değerlendirilmesi	58
3.7. Hücre Çoğalması (BrdU) Testi	59
3.7.1. BrdU Testi Esası	59
3.7.2. BrdU Testi Protokolü	60

3.7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi	61
3.8. Reaktif Oksijen Türlerinin Flow Sitometri ile Tayini.....	61
3.8.1. DCF Testinin Esası	61
3.8.2. DCF Test Protokolü	62
3.8.3. Sonuçların Değerlendirilmesi	63
3.9. ZEA ve α -ZOL'un Hücre Dizilerine Maruziyeti	63
3.10. DNA Metilasyonunun Analizi	64
3.10.1. DNA İzolasyonu	64
3.10.2. DNA'nın Saflık ve Miktar Tayini	65
3.10.3. Global DNA Metilasyonunun Tayini.....	66
3.10.3.1. Deneyin Esası.....	66
3.10.3.2. Deney Protokolü.....	67
3.10.3.3. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	68
3.10.4. Pirosekanslama Tekniği ile Gene-özü DNA Metilasyonunun Tayini	68
3.10.4.1. Bisüfit DNA Modifikasyonu.....	68
3.10.4.2. Pirosekanslama Tekniği	70
3.11. Gen Ekspresyonlarının Tayini	75
3.11.1. Total RNA İzolasyonu	75
3.11.2. RNA'nın Saflık ve Miktar Tayini	76
3.11.3. cDNA Sentezi	77
3.11.4. Gen Ekspresyonunun RT-PCR ile Tayini.....	78
3.11.4.1. Deney Protokolü.....	80
3.12. Proteinlerin Western Blot Yöntemi ile Tayini	81
3.12.1. Proteinlerin İzolasyonu	81
3.12.2. Histon Proteinlerinin İzolasyonu	82
3.12.3. Proteinlerin Miktar Tayini	83
3.12.4. Proteinlerin Western Blot Tekniği ile Tayini.....	84
3.12.4.1. Deneyin Esası.....	84
3.12.4.2. Deney Protokolü.....	85
3.12.4.3. 'Stripping' İşlemi	87
3.12.5. Histon Modifikasyonlarının Western Blot Tekniği ile Tayini	88
3.12.5.1. Deneyin Esası.....	88
3.12.5.2. Deney Protokolü.....	90

3.13. İstatistiksel Değerlendirme	91
4. BULGULAR.....	92
4.1. Sitotoksisite Sonuçları	92
4.2. BrdU Hücre Proliferasyonu Testi Sonuçları	93
4.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Flow Sitometri Analizi ile Sonuçları.....	95
4.4. ZEA ve α -ZOL'e Maruz Bırakılmış HepG2 Hücrelerinden İzole Edilen DNA ve RNA'ların Miktarları ve Saflıkları.....	96
4.5. DNA Metilasyonu Sonuçları.....	97
4.5.1. Global DNA Metilasyonu Sonuçları.....	97
4.5.2. <i>DNMT1</i> Ekspresyon Sonuçları.....	100
4.5.3. Pirosekanslama Tekniği ile Gene özgü DNA Metilasyonu Sonuçları	101
4.6. Real-Time PCR ile Gen Ekspresyonu Sonuçları	102
4.7. Protein Miktar Tayini Sonuçları	117
4.8. Western Blot Tekniği ile PPAR γ ve Hsp70 Proteinlerinin Ekspresyon Sonuçları	117
4.9. Western Blot Tekniği ile Global Histon Modifikasyonları Sonuçları	120
5. TARTIŞMA	124
KAYNAKLAR	136
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	166
ÖZGEÇMİŞ	167

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Gıda ve yemlerde başlıca mikotoksin üreten küfler ve ürettikleri mikotoksinler (Doyle ve ark., 1982; Golob, 2007).....	4
Tablo 2-2: ZEA'nın fizikokimyasal özellikleri (Sigma-Aldrich Ürün Güvenlik Bilgi Formu, 2015).	6
Tablo 2-3: ZEA ile yapılmış genotoksisite testlerinin sonuçları (JECFA, 2000).	15
Tablo 2-4: ZEA ile yapılmış akut toksisite çalışmalarının sonuçları (JECFA, 2000). ...	20
Tablo 2-5: ZEA ile yapılmış toksisite çalışmalarında çeşitli hayvanlar üzerinde belirlenen NOAEL ve LOAEL değerleri (EFSA, 2017).	23
Tablo 2-6: ZEA için izin verilen gıdalar ve maksimum limitleri (28157 sayılı Resmi Gazete, 2011).	36
Tablo 3-1: Pirosekanslama yönteminde kullanılmak üzere <i>PPARγ</i> geni için tasarlanan piroPCR ve pirosekanslama primer dizileri.	72
Tablo 3-2: PiroPCR protokolü.	73
Tablo 3-3: RT-PCR ile tayininde kullanılan primer dizileri.	79
Tablo 3-4: RT-PCR protokolü.	80
Tablo 4-1: 24 saat 7,81-250 μ M konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde MTT ve NRU testleri % ölüm ve standart sapma değerleri.	92
Tablo 4-2: 24 saat 0-50 μ M konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde % hücre proliferasyonu ve standart sapma değerleri.	94
Tablo 4-3: 24 saat 0-50 μ M konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde % MFI ve standart sapma değerleri.	95
Tablo 4-4: 24 saat 0-50 μ M konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinden izole edilen DNA ve RNA'ların miktar ve saflıkları.	97
Tablo 4-5: 24 saat 0-50 μ M konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde relatif %5-mC ve standart sapma değerleri.	98

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: ZEA ve metabolitlerinin kimyasal yapıları (Ben Salem ve ark., 2016).	7
Şekil 2-2: ZEA'nın faz I ve II biyotransformasyon reaksiyonları, metabolitleri ve rol oynayan enzimler (Mukherjee ve ark., 2014).	12
Şekil 2-3: Epigenetik modifikasyonlar (Sawan ve ark., 2008).	377
Şekil 2-4: A. Nükleozom yapısı; B. Kromatin yapısı.	38
Şekil 3-1: 96 kuyucuklu mikroplakaya hücre ekimi.	53
Şekil 3-2: ZEA ve α -ZOL'ün 1/2 oranında seyreltilmesi.	54
Şekil 3-3: 96 kuyucuklu maruziyet mikroplaka düzeni.	55
Şekil 3-4: 5-mC DNA ELISA kitinin esası.	66
Şekil 3-5: Sitozinin bisülfid ile deaminasyon reaksiyonu.	69
Şekil 3-6: Pirosekanslama yönteminin aşamaları (Harrington ve ark., 2013).	71
Şekil 3-7: Pirosekanslama vakumlu çalışma standı ve örnek 96 kuyucuklu piro mikroplakası.	74
Şekil 3-8: PyroMark Q96 kartuşunun şematik diyagramı.	75
Şekil 3-9: Histon proteinlerinin izolasyon basamakları.	82
Şekil 4-1: 24 saat 7,81-250 μ M konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde MTT ve NRU testleri sonuçları.	93
Şekil 4-2: 24 saat 7,81-250 μ M konsantrasyon aralığında α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde MTT ve NRU testleri sonuçları.	93
Şekil 4-3: 24 saat 0-50 μ M konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde % hücre proleferasyonu (kontrolle göre kıyasla) üzerine etkisi.	94
Şekil 4-4: HepG2 hücrelerinin SSC-H/FSC-H kanalında dağılımı.	95
Şekil 4-5: 24 saat 0-50 μ M konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde %ortalama fluoresans şiddetine (%MFI, kontrolle karşı) etkisi.	96
Şekil 4-6: 5-mC standardına ait kalibrasyon eğrisi.	98
Şekil 4-7: 24 saat 0-50 μ M konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde % 5-mC seviyeleri.	99
Şekil 4-8: 24 saat 0-50 μ M konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde <i>DNMT1</i> genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.	100

Şekil 4-9: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA ve α-ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinden elde edilen bisülfid modifikasyonlu DNA'ların piroPCR sonucu jel görüntüleri.....	101
Şekil 4-10: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde <i>PPARγ</i> promotör bölgesinde % metilasyon üzerine etkisi.	102
Şekil 4-11: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında α-ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde <i>PPARγ</i> promotör bölgesinde % metilasyon üzerine etkisi.....	102
Şekil 4-12: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA ve α-ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde <i>AhR</i> genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.	103
Şekil 4-13: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA ve α-ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde <i>LXRα</i> genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.	104
Şekil 4-14: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA ve α-ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde <i>PPARα</i> genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.	105
Şekil 4-15: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA ve α-ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde <i>PPARγ</i> genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.....	106
Şekil 4-16: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA ve α-ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde <i>L-fabp</i> genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.....	107
Şekil 4-17: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA ve α-ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde <i>LDLR</i> genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.....	108
Şekil 4-18: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA ve α-ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde <i>GAPDH</i> genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.....	109
Şekil 4-19: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde <i>Glut2</i> genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.....	110
Şekil 4-20: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA ve α-ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde <i>IGF-1</i> genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.	111
Şekil 4-21: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA ve α-ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde <i>Akt1</i> genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.	112
Şekil 4-22: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA ve α-ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde <i>HK2</i> genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.....	113
Şekil 4-23: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA ve α-ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde <i>HO-1</i> genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.	114
Şekil 4-24: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA ve α-ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde <i>Hsp70</i> genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.	115

Şekil 4-25: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve $\alpha\text{-ZOL}$ maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde <i>Nrf2</i> genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.....	116
Şekil 4-26: Protein standart ölçü eğrisi.....	117
Şekil 4-27: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve $\alpha\text{-ZOL}$ maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde PPAR γ ve Hsp70 western blot membran görüntüleri. ...	118
Şekil 4-28: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve $\alpha\text{-ZOL}$ maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde PPAR γ protein ekspresyonuna ait relatif ekspresyon seviyeleri.....	118
Şekil 4-29: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve $\alpha\text{-ZOL}$ maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde Hsp70 protein ekspresyonuna ait relatif ekspresyon seviyeleri.....	119
Şekil 4-30: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve $\alpha\text{-ZOL}$ maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde global histon modifikasyonları için western blot membran görüntüleri.....	120
Şekil 4-31: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve $\alpha\text{-ZOL}$ maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde H3K27me3 global histon modifikasyonuna ait relatif ekspresyon seviyeleri.....	121
Şekil 4-32: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve $\alpha\text{-ZOL}$ maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde H3K9me3 global histon modifikasyonuna ait relatif ekspresyon seviyeleri.....	122
Şekil 4-33: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve $\alpha\text{-ZOL}$ maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde H3K9ac global histon modifikasyonuna ait relatif ekspresyon seviyeleri.....	123

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

α -GST	Alfa glutatyon S-transferaz
α -ZAL	Alfa zearalanol
α -ZOL	Alfa zearalenol
β -ZAL	Beta zearalanol
β -ZOL	Beta zearalenol
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
μ M	Mikromolar
5-mC	5-metilsitozin
A.B.D.	Amerika Birleşik Devletleri
AChE	Asetilkolinesteraz
Actb	β -aktin geni
AFB1	Aflatoksin B1
AhR	Aril hidrokarbon reseptörü
Akt1	RAC-alfa serin/treonin protein kinaz
AR	Androjen reseptör
ATCC	Amerikan hücre kültür bankası ('American Type Culture Collection')
ATP	Adenozin trifosfat
BEAS-2B	İnsan bronşiyal epitelyal hücreleri
BPA	Bisfenol A
BSA	Sığır serum albümini
C	Sitozin bazı
Caco-2	İnsan kolorektal adenokarsinoma hücresi
CAR	Konstitütif antrostan reseptörü
CAT	Katalaz
CHO-K1	Çin hamsteri yumurtalık hücreleri
CMF-PBS	Kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tampon çözeltisi
CO ₂	Karbondioksit
COMT	Katekol-O-metiltransferaz
CONTAM	Gıda Zincirindeki Bulaşanlar Paneli

CpG	Sitozin fosfat guanin
DMEM/F12	Dulbecco'nun modifiye edilmiş eagle besiyeri /F12
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNMT	DNA metiltransferaz
DON	Deoksinivalenol
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
ER	Östrojen reseptör
ER α	Östrojen reseptör alfa
ER β	Östrojen reseptör beta
FB1	Fumonisin B1
FBS	Fetal sığır serumu
FSH	Folikül uyarıcı hormone
FXR	Farnesoid X reseptörü
G	Guanin bazı
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
GC	Guanin sitozin
Glut2	Glukoz taşıyıcı protein 2
GnRH	Gonadotropin salgılayıcı hormon
GPx	Glutatyon peroksidaz
GRIP1	Glutamat reseptör etkileşim protein
GSH	İndirgenmiş glutatyon
GST	Glutatyon S-transferaz
hAR	İnsan androjen reseptörü
HDAC	Histon deasetilaz
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonik asit
HK2	Hekzokinaz 2
HO-1	Hem oksijenaz 1
HRP	Horseradish peroksidaz enzimi
HSD	Hidroksisteroid dehidrojenaz
Hsp70	Isı şoku protein 70
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü

IC ₅₀	%50 İnhibisyon konsantrasyonu
IGF-1	İnsulin benzeri büyüme faktörü 1
IgG	İmmünglobulin G
JECFA	Gıda Katkıları Hakkında Ortak FAO/WHO Uzman Komitesi
kg	Kilogram
LD ₅₀	Medyan letal doz
LDH	Laktat dehidrojenaz
LDLR	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü
L-fabp	Karaciğer-tipi yağ asit bağlama proteini
LH	Luteinize edici hormon
LOAEL	Gözlenen en düşük yan etki seviyesi ('Lowest observed adverse effect level')
LXR α	Karaciğer X reseptörü alfa
M	Molar
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
MFI	Ortalama floresans yoğunluğu
MGMT	O ⁶ -metilguanin-DNA metiltransferaz
miRNA	Mikro RNA
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MMP	Matriks metalloproteinaz
mRNA	Mesajcı RNA
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NAC	N-asetilsistein
N-CoR	Nükleer reseptör korepresör 1
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
NAFLD	Alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması
NO	Nitrik oksit
NOAEL	Hiçbir yan etkinin gözlenmediği seviye ('No observed adverse effect level')

NOEL	Etki gözlenmeyen seviye ('No observed effect level')
Nrf2	Nükleer faktör (eritroid türevi 2) benzeri 2
NRU	Nötral kırmızı alım testi
NTP	Ulusal Toksikoloji Programı
O ₂	Oksijen
OD	Optik dansite
OTA	Okratoksin A
PALM	PC3-AR-lusiferaz-MMTV, androjene duyarlı prostatik hücre dizisi
PBS	Fosfat tamponu çözeltisi
PBP	Proksimal dizi elementi-bağlayıcı protein
PC-3	İnsan prostat kanser hücresi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Pgc-1 α	Peroksizom çoğaltıcı aktifleştirici reseptör gama koaktivatör 1-alfa
PMTDI	Geçici maksimum TDI ('Provisional Maximum Tolerable Daily Intake')
PPAR α	Peroksizom çoğaltıcı aktifleştirici reseptör alfa
PPAR γ	Peroksizom çoğaltıcı aktifleştirici reseptör gama
PXR	Pregnan X reseptörü
RAL	Resorsilik asit lakton
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Dakikadaki dönüş
RT-PCR	Gerçek zamanlı termal döngü cihazı ('Real-Time PCR')
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SH-SY5Y	İnsan nöroblastoma hücresi
SOD	Süperoksit dismutaz
SRC-1	Steroid reseptör koaktivatör 1
SREBP-1c	Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 1
T2DM	Tip 2 diyabet
TBST	Tuzlu ve Tween 20'li tris tamponu
TDI	Tolare edilebilir günlük alım miktarı ('tolerable daily intake')
TIMP	Matriks metalloproteinazlar doku inhibitörleri
TM3	Fare Leydig hücre dizisinde
UV	Ultraviyole (Mor ötesi)

v.a.	Vücut ağırlığı
ZAN	Zearalanon
ZEA	Zearalenon
ZEA-14Glc	Zearalenon-14-glukozit
ZEA-16Glc	Zearalenon-16-glukozit
ZEA-14Sulf	Zearalenon-14-sülfat



ÖZET

Karaman, E. F. (2018). Zearalenon ve Metabolitlerinin Enerji Metabolizmasında Rol Oynayan Genler Üzerine Etkilerinde Epigenetik Değişikliklerin *In Vitro* İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Zearalenon (ZEA), çeşitli *Fusarium* türleri tarafından üretilen steroid olmayan östrojenik bir mikotoksindir. Mısır, buğday, yulaf ve soya fasülyesi gibi tahıl ürünlerini ve suları kontamine ederek insan sağlığı üzerine olumsuz etkilerde bulunur. Doktora tez çalışmasında bir endokrin bozucu olan ZEA ve metaboliti α -ZOL'ün epigenetik modifikasyonlar ve metabolik yollar üzerine etkisi HepG2 hücrelerinde incelenerek metabolik fonksiyon bozukluklarıyla muhtemel ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır. HepG2 hücrelerinde MTT ve NRU testlerine göre IC₅₀ değerleri sırasıyla ZEA için 143,35 ve 60,45 μ M; α -ZOL için ise 111,42 ve 35,73 μ M olarak belirlendi. BrdU testi ile hücre proliferasyonunda 1-50 μ M konsantrasyonlarda 24 saat ZEA maruziyeti sonrasında %7,2-41,71 oranında; 24 saat α -ZOL maruziyeti sonrasında ise %11,78-44,33 oranında kontrole kıyasla anlamlı artış tespit edildi. ROS oluşumunda 50 μ M ZEA ve 50 μ M α -ZOL maruziyeti sonucunda %48,1 ve %49,6 oranında kontrole kıyasla anlamlı artış gözlemlendi. Global DNA metilasyonu seviyelerinde 10 ve 50 μ M ZEA maruziyeti 1,46 ve 2,54 kat; 1-50 μ M konsantrasyonlarda α -ZOL maruziyeti ise 1,53-1,58 kat anlamlı artışa neden oldu. 1-50 μ M konsantrasyonlarda ZEA ve α -ZOL maruziyeti *PPAR γ* ekspresyonu ve promotör DNA metilasyon seviyelerinde anlamlı düzeylerde değişikliklere neden olmuştur. Aynı zamanda, 1-50 μ M konsantrasyonlarda ZEA ve α -ZOL maruziyetinin nükleer reseptör genleri (*AhR*, *LXR α* , *PPAR α* , *PPAR γ*), karbonhidrat ve lipit metabolizmasında rol oynayan genler (*L-fabp*, *LDLR*, *GAPDH*, *Glut2*, *Igf-1*, *Akt1*, *HK2*) ve oksidatif hasar ile ilişkili genlerin (*HO1*, *Hsp70*, *Nrf2*) ekspresyon seviyelerini önemli derecede değiştirdiği gösterildi. Ayrıca, 1-50 μ M konsantrasyonlarda ZEA ve α -ZOL maruziyetinin western blot tekniği ile global histon modifikasyonları (H3K27me, H3K9me3, H3K9ac) üzerinde anlamlı değişikliklere neden olduğu görüldü. Tez çalışmasından elde edilen sonuçların, endokrin bozucu kimyasalların toksisitesinde ortaya çıkan anahtar moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Zearalenon; α -zearalenol; epigenetik mekanizmalar; nükleer reseptör genleri; karbonhidrat ve lipit metabolizması; oksidatif hasar.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 58568.

ABSTRACT

Karaman, E. F. (2018). Investigation of the Effects of Zearalenone and Its Metabolites in the Genes Related to Energy Metabolism *In Vitro*: Relation with the Epigenetic Alterations. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Pharmaceutical Toxicology. Doctorate Thesis. Istanbul.

Zearalenone (ZEA), produced by various *Fusarium* species, is a non-steroidal estrogenic mycotoxin. It contaminates cereals such as corn, wheat, oat and soybean and water, therefore it has negative effects on human health. In doctorate thesis, the effects of ZEA and its metabolite α -ZOL on epigenetic modifications and metabolic pathways have been investigated in HepG2 cells in order to elucidate the possible relationship between metabolic dysfunctions. According to the MTT and NRU tests, the IC₅₀ values were determined as 143.35 and 60.45 for ZEA and 111.42 and 35.73 μ M for α -ZOL, respectively. At the concentrations of 1-50 μ M of ZEA and α -ZOL exposures for 24 h were significantly increased cell proliferation by BrdU assay in the rates of 7.2-41.71% for ZEA, 11.78-44.33% for α -ZOL, respectively, compared to the control. 50 μ M of ZEA and α -ZOL exposure significantly increased levels of ROS generation in the rates of 48.1% and 49.6%, respectively, compared to the control. ZEA caused an increase in global DNA methylation levels at 1.46 and 2.54 fold after 10 and 50 μ M of ZEA exposure and at 1.53-1.58 fold after 1-50 μ M α -ZOL exposure. 1-50 μ M of ZEA and α -ZOL exposure caused alterations in *PPAR γ* expression and promoter DNA methylation significantly. Besides, 1-50 μ M of ZEA and α -ZOL exposure showed significant alterations in the expression levels of nuclear receptor genes (*AhR*, *LXR α* , *PPAR α* , *PPAR γ*), carbohydrate-lipid metabolism related genes (*L-fabp*, *LDLR*, *GAPDH*, *Glut2*, *Igf-1*, *Akt1*, *HK2*), and oxidative stress genes (*HO1*, *Hsp70*, *Nrf2*). In addition, 1-50 μ M of ZEA and α -ZOL exposure resulted in significant changes in global histone modifications (H3K27me, H3K9me3, H3K9ac) by western blot technique. It is expected that results from this thesis will contribute to better understanding of key molecular events in the toxicity of endocrine disrupting chemicals for risk assessment process.

Key Words: Zearalenone; α -zearalenol; epigenetic mechanisms; nuclear receptor genes; carbohydrate and lipid metabolism; oxidative damage.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 58568.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Organizmaya dışarıdan alınarak endokrin fonksiyonları ve homeostazı bozan, doğal ya da sentetik maddeler endokrin bozucu kimyasallar olarak adlandırılır. Endokrin bozucu kimyasallar hormon yapımını, taşınmasını, yıkımını ve atılımını değiştirebildikleri gibi hedef hücrelerdeki etkilerini de değiştirmektedirler (Choi ve Jeung, 2003). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, endokrin etkiler gösteren çevresel kimyasalların gen ifadesindeki değişiklikler üzerindeki rolünün epigenetik mekanizmalar ile de ilişkili olabileceği ortaya çıkmaktadır (Fleisch ve ark., 2012; Greally ve Jacobs, 2013).

Endokrin bozucu olduğu bilinen nonsteroidal östrojenik bir mikotoksin olan Zearalenon, *Fusarium* türleri tarafından üretilir ve mısır, arpa, buğday, sorgum, darı ve pirinç gibi küçük tanelerde ve soya fasulyesinde sıklıkla bulunur. Ayrıca, kontamine bitkilerden yüzey sularına geçme özelliği ile suları kontamine ettiği tespit edilmiş, özellikle hasat zamanı oldukça yüksek seviyelerde olduğu ve bu yolla da maruziyetin gerçekleşebileceği bildirilmiştir (Maragos, 2012; Waśkiewicz ve ark., 2012; Gromadzka ve ark., 2015). Zearalenon ve metabolitlerinin çiftlik hayvanları üzerinde anabolik aktiviteleri vardır ve karaciğer, böbrek ve immun sistem üzerine toksik etki gösterir (Kuiper-Goodman ve ark., 1987; Abbès ve ark., 2006). ZEA, tahıl ürünlerini kontamine ederek sadece insan sağlığını değil, aynı zamanda kontamine olan tahıllarla beslenen veya Zeranol olarak adlandırılan sentetik ticari formülasyonun anabolik madde olarak kullanımı çiftlik hayvanlarında da olumsuz etkilere sebep olmaktadır (Hagler ve ark., 2001). Maruziyeti sonucu insan ve hayvan sağlığını olumsuz etkilemesi risk değerlendirmesinin önemini ortaya çıkarmaktadır.

Son zamanlarda endokrin bozucu kimyasalların neden olduğu üreme ve gelişimsel toksisite yanında obezite, diyabet, insülin direnci, alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması gibi metabolik fonksiyon bozukluklarıyla ilişkili metabolik hastalıklar üzerine etkilerine de yoğunlaşmaktadır. Endokrin bozucu özelliklere sahip maddelerin metabolik fonksiyon bozuklukları üzerine toksisite etki mekanizmaları genel olarak şu şekildedir: 1) Adipoz doku gelişiminden sorumlu endokrin yolaklarının bozulması, 2) Yağ hücreleri sayısının artması, 3) Beyinde seksüel dimorfik, iştah ve ödül merkezleri üzerindeki etkileri aracılığıyla gıda alımı ve metabolizmanın değişmesi,

4) Pankreas, adipoz doku, karaciğer, beyin gibi endokrin ya da endokrin ilişkili dokular üzerine etkileri aracılığıyla insülin hassasiyeti ve lipid metabolizmasını etkilemesidir. Tez çalışmasında zearalenon ve metaboliti α -zearalenolün toksik etkilerinde epigenetik mekanizmaların rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, zearalenonun üreme, gelişim ve endokrin sistemleri üzerine toksik etkileri belirlenmiş olup, enerji metabolizması ve metabolik fonksiyonlar üzerine yapılmış moleküler düzeyde çalışmalar bulunmamaktadır. Dolayısıyla, tez çalışmasında zearalenonun günümüzde önemli sağlık sorunlardan biri olan metabolik hastalıklar üzerine olası etkilerinde epigenetik mekanizmaların rolünün araştırılması odak noktası olmuştur. Ksenobiyotik metabolizmasında başlıca hedef organlardan biri karaciğerdir. Bununla birlikte karaciğer, karbonhidrat, lipid, protein ve eser element metabolizmasında önemli bir rol oynayan, temel bir metabolik organdır ve metabolik işlevi insülin ve diğer metabolik hormonlar tarafından kontrol edilmektedir. Bu sebeple tez çalışmasında, HepG2 hücre dizisi kullanılmış ve bir endokrin bozucu olan ZEA'nın karbonhidrat ve lipid metabolizmasında rol oynayan genler üzerine etkileri incelenerek metabolik yollardaki etkileri araştırılmıştır.

Bu amaçla, tez çalışmasında HepG2 hücre dizisinde zearalenon ve metaboliti α -zearalenolün sitotoksik etkileri, global DNA metilasyonu, metabolik yollarda rol oynayan genlerde mRNA seviyeleri, *PPAR γ* promotör bölge DNA metilasyonu ve global histon modifikasyonları üzerine etkileri araştırılmıştır. Böylelikle, belirlenen genler aracılığıyla zearalenon ve metabolitinin metabolik yollar ile ilişkisi açıklanmaya çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinler

Mikotoksin terimi mantar anlamına gelen ‘myco’ ve zehir anlamındaki ‘toxin’ kelimelerinin birleştirilmesinden türemiştir. Mikotoksinler, esas olarak tahılların oluşturduğu gıda ve yem ürünlerinde filamentöz mantarlar (küfler) tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. Bu düşük molekül ağırlıklı bileşikler, mikroorganizmalara, hayvanlara ve insanlara karşı bir dizi toksik etki gösterebilir (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi, ‘European Food Safety Authority’, EFSA, 2017).

Küfler, doğada serbest halde bol miktarda bulunur ve saprofilik özellikleri ile birçok organik maddeyi kullanarak büyüme ve çoğalmaları için gerekli yapıları diğer etmenlere ihtiyaç duymadan sentezleyebilir. Bu özelliklerinden dolayı koruyucu tabakaları zarar görmüş olan birçok gıda maddeleri üzerinde rahatlıkla kolonize olabilir. Günümüzde çeşitli küf cinsleri tarafından üretilen yaklaşık 300 mikotoksinin varlığı bilinmektedir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar farklı mikotoksinlerin farklı organları etkilediğini ve akut toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilere sahip olduğunu, bazılarının bu etkilerin birkaçını birden gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, mikotoksinler buğday, arpa, mısır ve pirinç gibi gıda kaynaklarının yaygın kontaminantları olup, insan ve hayvan sağlığı açısından da risk oluşturmaktadır. Mikotoksinlerin çoğu *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinsleri tarafından sentezlenmektedir (Creppy, 2002; Omurtag, 2002; Bennett ve Klich, 2003;). Tablo 2-1’de bu dört cinsin oluşturduğu başlıca mikotoksinler görülmektedir (Doyle ve ark., 1982; Golob, 2007).

Mikotoksin oluşumunu etkileyen en önemli faktörler çevresel faktörlerdir. Tarım ürünü veya gıdanın nem içeriği (sıcaklıkla beraber bağıl nem) küf sporlarının çimlenmesini ve misellerin¹ gelişmesini sağlayarak toksin oluşumunu etkileyen en önemli faktördür. Mikotoksin oluşumunu etkileyen faktörler (Tunail, 2000; Bozoğlu, 2009): tarım ürünü ve gıdanın çeşidi; ürünün yetiştirildiği ve depolandığı ortamın fiziksel koşulları (nem içeriği, sıcaklığı, pH’sı) (%70’den fazla nem ve 12-47 °C

¹ Küf sporlarının bir çeşidi.

arasındaki sıcaklık mikotoksin üretimi için optimum koşulları sağlamaktadır); ürünün olgunluk durumu, hasat işlemleri, depolama koşulları; ortamda diğer yarışmacı mikroorganizmaların varlığı; yetersiz gübreleme ve kuraklık (bitkilerdeki koruma sistemlerinin zarar görmesi sonucu küflerin bitkide kolayca kolonize olması); mekanik işlemlerin ve böceklerin bitkilerdeki koruyucu yapıyı bozmalarıdır.

Tablo 2-1: Gıda ve yemlerde başlıca mikotoksin üreten küfler ve ürettikleri mikotoksinler
(Doyle ve ark., 1982; Golob, 2007).

<i>Aspergillus</i> toksinleri	<i>Penicillium</i> toksinleri	<i>Fusarium</i> toksinleri	<i>Alternaria</i> toksinleri
Aflatoksinler (AFB1, B2, G1, G2)	Sitrinin	Zearalenon (F-2 toksin)	Alternariol
AFM1 (AFB1 metaboliti)	Okratoksin A	Trikotesenler	Alternariolmono-metil-eter
Aspertoksin	Sitreoviridin	Deoksinivalenol	Altertoksin
Sitrinin	Rubratoksin A	Nivalenol	Tenuazonikasit
Sterigmatosistin	Rubratoksin B	Diasetoksisirpenol	
Okratoksin A	Patulin	T-2 toksin	
Patulin	Penisilikasit	HT-2 toksin	
Penisilikasit	P-R (Pen. requeforti) toksin	Tremortin	
	Luteosikrin	Fusarin-C	
	İzlanditoksin	Fumonisin B1	
	Ksantosilin-X	Moniliformin	
	Siklopiazonikasit		
	Sitromisetin		
	Rugulosin		
	Ksantomegnin		
	Rugulovasin A		
	Rugulovasin B		
	Verrukulotoksin		
	Emodin		

İnsanların mikotoksinlere başlıca maruziyet kaynağı beslenmedir. Doğrudan kontamine olmuş gıdalar ya da kontamine yemler ile beslenen hayvanlardan elde edilen gıdaların tüketilmesiyle maruziyet gerçekleşir. İnsan ve hayvanlarda mikotoksinlerin sebep oldukları olaylar mikotoksin zehirlenmeleri “mikotoksikozis” olarak bilinmektedir. Bu durum, mikotoksinin kimyasal yapısına, toksik etkilerine maruz kalma süresine, kişinin yaş ve beslenme durumuna, kişinin maruz kaldığı diğer

kimyasallarla toksinin kimyasal etkileşimine bağlı olarak ortaya çıkar. Temel olarak mikotoksin üretimi ve buna bağlı olarak yemeklerin ve gıda maddelerinin kontaminasyon düzeyleri; substrat kompozisyonu ve yapısı, nem ve sıcaklık gibi faktörler değiştirilerek azaltılabilir. Mikotoksinlerin küfler tarafından sentezi, genetik olarak düzenlenir ve aminoasit ve yağ asidi metabolizması ile ilişkilendirilir (Fink-Gremmels, 1999).

Mikotoksinler içinde en çok incelenen ve toksisite oluşturma potansiyeli en yüksek olanı aflatoksin grubundan hepatotoksik ve karsinojenik olduğu bilinen Aflatoksin B1 (AFB1)'dir. Son yıllarda mikotoksin çalışmaları üzerinde yoğunlaşılın diğer mikotoksin grupları ise okratoksinler, patulin, trikotesenler, zearalenon ve fumonisinlerdir. Toksik etkileri üzerine sınırlı çalışmalar olan zearalenonun toksisite mekanizmalarının araştırılması konusunda ilgi giderek artmaktadır. Bundan dolayı tez çalışmasında zearalenonun toksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2.2. Zearalenon

Zearalenon (ZEA), çeşitli *Fusarium* türleri tarafından üretilen bir mikotoksindir. Moleküler etki mekanizması tam olarak açıklanamamış olsa da memelilerde kronik östrojenik etkileri olduğu bildirilmiştir. Östrojenik aktivitesi olan hepatotoksik bir mikotoksindir. ZEA'nın toksik etkisinin östrojen reseptörlerine (ER) bağlanması ve dişilerde endokrin regülasyonunu bozması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (EFSA, 2017).

2.2.1. ZEA'nın Kimyasal Yapısı, Fizikokimyasal Özellikleri ve Modifiye Formları

ZEA, *Fusarium culmorum*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium semitectum* ve özellikle *Fusarium graminearum* tarafından üretilen bir mikotoksindir. Küfler tarafından üretilen büyük bir sekonder metabolit grubunu oluşturan poliketid yolu ile biyosentezi yapılır (Huffmann ve ark., 2010). ZEA, ilk olarak 1962'de Stob ve ark. tarafından *Fusarium* ile enfekte olmuş mısırdan izole edilmiştir. ZEA'nın 150 °C'ye kadar ısıya dayanıklı olduğu ve bozunmanın sadece daha yüksek sıcaklıklarda veya alkali koşullar altında olduğu gözlenmiştir (EFSA, 2011).

ZEA, beyaz renkli ve kristal yapıda bir bileşiktir, suda çözünmez fakat sulu alkali ve etanol, aseton ve etil asetat gibi çeşitli organik çözücülerde çözünür. 294 nm'de uyarıldığında 460 nm'de tipik bir floresan ışımaya gösterir. ZEA'nın fizikokimyasal özellikleri Tablo 2-2'de verilmiştir.

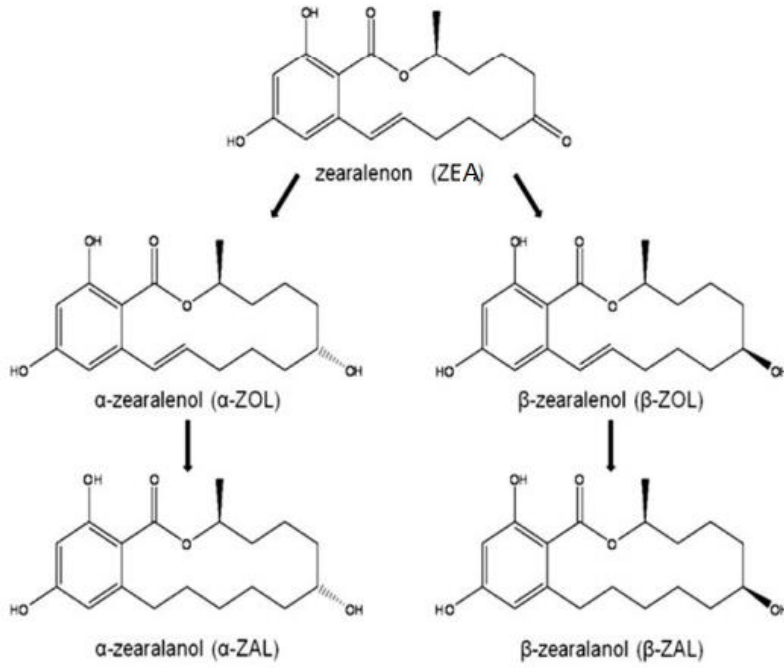
Tablo 2-2: ZEA'nın fizikokimyasal özellikleri (Sigma-Aldrich Ürün Güvenlik Bilgi Formu, 2015).

Genel Adı	Zearalenon
IUPAC adlandırması	(2E,11S)-15,17-dihidroksi-11-metil-12-oksabisiklo [12.4.0]oktadeka-1(14),2,15,17-tetraen-7,13-dion
CAS numarası	17924-92-4
Görünüş	Fiziksel hali: Kristal; Renk: beyaz
Koku	Uygun veri yoktur.
Kimyasal formülü	C ₁₈ H ₂₂ O ₅
Moleküler ağırlığı	318,36 g/mol
Erime noktası/Donma noktası	Erime noktası/erime aralığı: 161 - 162 °C

ZEA, bitkiler, küfler ve hayvanlarda faz I ve faz II reaksiyonları ile biyotransformasyona uğrar. ZEA'nın hayvanlarda oluşan metabolitleri: α -zearalenol (α -ZOL), β -zearalenol (β -ZOL), α -zearalanol (α -ZAL), β -zearalanol (β -ZAL) ve az miktarda zearalanon² (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). Biyolojik modifikasyonun yanı sıra ZEA'nın gıda ve yemlerde kimyasal modifikasyonu *cis*-izomerizasyon gibi termal olmayan reaksiyonlar ile de meydana gelebilir (Köppen ve ark., 2012). Böylece, ZEA'nın modifiye formları, *in vivo* biyotransformasyon yoluyla (bitkilerde, küflerde veya hayvanlarda) veya proses degradasyonu ile oluşan konjuge formlar veya metabolitler olarak tanımlanabilir.

ZEA, kimyasal olarak bir keto grubu ve bir olefinik çift bağ taşıyan makrosiklik β -resorsilik asit lakton (RAL) olarak sınıflandırılabilir. ZEA ve metabolitlerinin kimyasal yapısı Şekil 2-1'de gösterilmiştir.

² α -ZAL'in okside formu (mikrobiyal dehidrojenazlar ile gerçekleştirilen geri dönüşebilir oksidasyon reaksiyonu).



Şekil 2-1: ZEA ve metabolitlerinin kimyasal yapıları (Ben Salem ve ark., 2016).

2.3. ZEA'ya Maruziyet

Ilıman ve sıcak iklim bölgelerinde ekinlerde bulunan *Fusarium* türleri tarafından üretilen ZEA, esas olarak hasat öncesi ve aynı zamanda kötü depolama koşullarında da hasat sonrası tahıllarda birikir. ZEA, mısır, buğday, arpa, sorgum, çavdar ve diğer tahıllarda yaygın olarak görülen bir mikotoksindir. İnsanlar için ZEA maruziyetinin ana kaynakları olarak; tahıllar, öğütülmüş tahıl ürünleri, kahvaltılık gevrekler, fırıncılık ürünleri ve atıştırmalıklar, bebek mamaları, mısır tohumu yağı, buğday tohumu yağı, ekmek, rulolar ve makarna gibi tahıl bazlı ürünler kabul edilmektedir (EFSA, 2011).

ZEA ve modifiye formlarının kontamine ettiği hayvan yemlerinin kullanılmasından sonra hayvansal gıdalara geçişi hem kalitatif hem de kantitatif (hayvan dokusuna aktarılan metabolitlerin tipleri) olarak değerlendirilmelidir. Hayvan dokusunda ve yemdeki ZEA ve modifiye formlarının konsantrasyonları arasındaki oranın hesaplanmasıyla, aktarım veya taşınım faktörlerinin niceliksel değerlendirmesi mümkündür. Yapılan bir araştırmadan elde edilen verilerle ZEA, α -ZOL ve β -ZOL'ün çiftlik hayvanlarında toplam ZEA kalıntılarının çoğunluğunu oluşturduğu öne sürülmüştür (Danicke ve Winkler, 2015).

EFSA Gıda Zincirindeki Bulaşanlar Paneli ('Panel on Contaminants in the Food Chain', CONTAM), dişi domuzlarda östrojenik etkiler için (kızarıklık/şişmiş vulva ve serviks, rahim ağırlığında artış gibi) 'etki gözlenmeyen seviye' ('Non Observed Effect Level', NOEL) değerine (10 µg/kg vücut ağırlığı (v.a.)/gün) dayanarak ZEA için tolere edilebilir günlük alım ('Tolerable Daily Intake', TDI) değerini 0,25 µg/kg v.a. olarak belirlemiştir (EFSA, 2011).

Toksikolojik, çevresel ve epidemiyolojik çalışmalar mikotoksinlerin problemini tek tek ele alsa da, genellikle aynı kontamine yiyeceklerde birden fazla mikotoksin bulunabilmektedir. Potansiyel olarak çoklu mikotoksinlere maruz kalan insanlar için risk değerlendirmesi, gıda tüketim verilerinin eksikliği ve belirli bir mikotoksin için aynı gıda maddelerinde bulunan diğer mikotoksinler ile sinerjistik ve antagonistik etkileri de bilinmediğinden dolayı yapılamamaktadır. Örneğin, AFB1 ve okratoksin A (OTA) birlikte en sık rastlanan mikotoksinler olmasına rağmen, normal olarak aynı anda ortaya çıkmalarından kaynaklanan risk dikkate alınmamaktadır (Viegas ve ark., 2011). Bununla birlikte, aynı anda farklı mikotoksinlerin bir arada verilmesiyle etkilerinin incelendiği *in vivo* çalışmalar da mevcuttur. 14 günlük çoklu mikotoksin çalışmasında (Szabó ve ark., 2018); sıçanlara ZEA (15 µg/hayvan/gün), deoksinivalenol (DON; 30 µg/hayvan/gün) ve fumonisin B1 (FB1; 150 µg/hayvan/gün) 1 mL suda gavajla ayrı ayrı, 2'li (FD, FZ ve DZ) ve 3'lü kombinasyonları (FDZ) halinde verilmiştir. Vücut ağırlığı etkilenmezken, karaciğer ve böbrek ağırlıkları DON ve FDZ'ye kıyasla ZEA'da artmıştır. Renal fosfolipitler üzerine en güçlü etkiyi ZEA göstermiştir. ZEA'nın FB1 ve DON ile antagonistik ilişkide olduğu bildirilmiştir (Szabó ve ark., 2018). 18-23 haftalık, AF (123 µg/kg), ZEA (260,2 µg/kg) ve kombinasyonlarının kuşlarda yumurtalar üzerine toksik etkilerinin incelendiği bir çalışmada (Jia ve ark., 2016) ise; AF ve AF + ZEA grupları, kontrol grubuna göre daha düşük yumurta üretimi, gıda tüketimi ve kabuk kalınlığı sergilediği gösterilmiş olup, AF ve ZEA, yumurta üretimi ve gıda tüketimi üzerinde sinerjik etki de bildirilmiştir. (Jia ve ark., 2016). 6 haftalık domuz yavruları üzerinde yapılan başka bir çalışmada; 4 hafta boyunca 8 mg DON/kg veya 0,8 mg ZEA/kg içeren diyetlerle beslenmiştir (Reddy ve ark., 2018). Maruziyet sonrası böbreklerde immün ilişkili genler üzerine etkileri incelenmiş ve DON ve ZEA'nın bu gen ağları ve sinyal yollarını baskıladığı gösterilmiştir (Reddy ve ark., 2018).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda sucul ortamda küflerin ve toksik metabolitlerinin varlığı ve bunların sucul ekosistemi kontamine etmesi hususundaki farkındalık artmaktadır. Bu bileşiklerin kaynaklarından biri atık su arıtma amacıyla kullanılan bitkilerden çıkan atıklardır. ZEA'nın da kontamine bitkilerden yüzey sularına geçme özelliği ile suları kontamine ettiği özellikle hasat zamanı oldukça yüksek seviyelerde olduğu gösterilmiş olup bu yol ile de maruziyetin gerçekleşebileceği bildirilmiştir (Maragos, 2012; Waśkiewicz ve ark., 2012; Gromadzka ve ark., 2015). A.B.D.'de yapılan bir çalışmada (Maragos, 2012); göllerden, akarsulardan ve bir tarladaki hendekten elde edilen su örneklerinde ZEA'ya rastlanmıştır. Tespit sıklığı yüksek olmasına rağmen sularda belirlenen seviyesi düşüktür. Bu nedenle, küfler çevresel östrojenlere maruz kalınmasında önemli olsa da ZEA'nın su ile maruziyet katkısının düşük olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, Çin'de yapılan bir çalışmada, ZEA'nın hava aracılığıyla taşınabilen bir mikotoksin olduğu da ileri sürülmüş olup ZEA'nın havadaki konsantrasyonu $2,363 \text{ ng/m}^3$ olarak belirlenmiştir. Kümes hayvanı çalışanı tarafından günlük olarak solunan ZEA'nın $17,432\text{--}20,512 \text{ ng}$ 'a ulaşabileceği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2008).

2.4. ZEA'nın Toksikokinetiği

Absorpsiyon: Oktanol ve su ($\log K_{ow}$) partision katsayısının nispeten yüksek (3,13) olması ile lipofilik özellik göstermesinden dolayı ZEA oral maruziyetin ardından hızla emilir (Kuiper-Goodman ve ark., 1987). Ayrıca indirgenmiş ZEA metabolitlerinin insan kolorektal adenokarsinoma (Caco-2) hücre modelinde gösterildiği gibi biyolojik membranları kolaylıkla geçebileceği düşünülmektedir (Pfeiffer ve ark., 2011). Epitelyal hücre modelinde, hem ZEA hem de indirgenmiş metabolitleri olan α -ZOL ve β -ZOL'ün ABCC ('ATP-binding cassette transporter') taşıyıcı proteinleri ile etkileşime girebileceği bildirilmiştir (Videmann ve ark., 2009). ZEA ve metabolitlerinin çoğu absorpsiyona uğradıktan sonra barsaklarda hidroliz ile serbest bırakıldıktan sonra yeniden absorbe edilir.

Dağılım: Dağılıma ilişkin bilgilerin çoğu ana bileşik ZEA ile ilişkilidir. ZEA'nın dağılım hacmi fazladır ve ZEA rahim, yumurtalık folikülleri ve testisler gibi dokulara da dağılır (Kuiper-Goodman ve ark., 1987). ZEA ile yapılan mevcut çalışmaları içeren bir derlemede; gıda üreten hayvanlarda (emziren inekler, besi sığırları, domuzlar, tavşanlar ve kuş türleri) uzun süreli maruz kalmaya rağmen

karaciğerde ardından böbrek, yağ ve kas dokusunda çok sınırlı miktarda ZEA bulunduğu bildirilmiştir (Danicke ve Winkler, 2015). Ayrıca, az sayıdaki raporda aynı dokularda, modifiye ZEA metabolitlerinin de ana bileşikten daha düşük konsantrasyonlarda bulunduğu belirtilmektedir (EFSA, 2017).

Metabolizma: Karaciğer öncesi ZEA'nın biyotransformasyon reaksiyonlarına rumen³ ve enterik mikroorganizmalar aracılık etmekte olup, biyotransformasyonun enterik hücrelerde de meydana gelebileceği bilinmektedir. Kimus⁴ mikroorganizmaları, gastrointestinal seviyede ZEA ve modifiye formlarının metabolizmasında önemli rol oynarlar. ZEA biyotransformasyonunda rumen mikrobiyotanın da önemli fonksiyonları olduğu belirtilmiştir (Danicke ve ark., 2004). Danicke ve Winkler (2015)'a ait bir derlemede, *in vitro* çalışmalar ile çoğunlukla α -ZOL ve β -ZOL oluşumu ile sonuçlanan indirgeme reaksiyonlarının baskın olduğu gösterilmiştir. İnsan dışkılarıyla yapılan *in vitro* çalışmalar insan enterik mikroflorasının ZEA glukozitlerini hidroliz etme yeteneğinin olduğunu işaret etmektedir (Kovalsky Paris ve ark., 2014). Caco-2 hücreleri ile yapılan *in vitro* çalışmalar, enterik hücrelerin α -ZAL ve β -ZAL'in yanı sıra, ZEA, ZAN, α -ZOL ve β -ZOL gibi çeşitli oranlarda indirgenmiş, glukuronit ve sülfat konjugasyonlu metabolitleri oluşturan hem faz I hem de faz II biyotransformasyonlarını gerçekleştirmede tamamen yetkin olduklarını göstermektedir (Pfeiffer ve ark., 2011).

Prehepatik metabolizmadan sonra ZEA karaciğerde faz I ve faz II biyotransformasyon reaksiyonlarına uğrar. Faz I reaksiyonları çoğunlukla indirgeme reaksiyonları olup sırasıyla α -ZOL ve β -ZOL, daha sonra α -ZAL ve onun stereoizomeri β -ZAL oluşur (EFSA, 2004). Genel olarak α - ve β -hidroksisteroid dehidrojenazların (HSD) memeli türlerinde ZEA indirgenmesini gerçekleştiren başlıca enzimler olduğu kabul edilir. Bu tür enzimler, hem testosteron, östradiol ve progesteronun sentezini hem de hormonal olarak daha aktif olan keto türevlerinin (-CO) daha az aktif olan indirgenmiş türevlerine (-COH) dönüştürülmesini içeren steroid hormon homeostazında önemli bir rol oynar. (Penning ve ark., 2004). Oluşan metabolit miktarı ve oranı ZEA konsantrasyonuna göre değişmekle birlikte, memeli hepatositlerinin primer hücre

³ Geviş getiren hayvanların birinci mide bölümü.

⁴ Mideden bağırsağa geçen yarı sindirilmiş haldeki besin maddeleri.

kültürlerinde ZEA'nın çoğunlukla α -ZOL'e metabolize edildiği gösterilmiştir (Malekinejad, 2013).

Son dönemde yapılan *in vitro* çalışmalar, sitokrom P (CYP) enzimleri aracılı ZEA hidroksilasyonunun varlığını doğrulamaktadır, ancak evcil hayvan türlerinde CYP aracılı ZEA hidroksile türevlerinin oluşumu hakkında oldukça az bilgi bulunmaktadır (EFSA, 2017). Sıçan ve insan karaciğer mikrozomlarında, aromatik hidroksilasyon, esas olarak 13- ve 15-OH katekol ZEA türevlerinin oluşmasına neden olan C13 ve C15'te meydana gelir (Fleck ve ark., 2012). CYP1B aracılı endojen steroid hormon 17 β -östradiol'ün oksidasyonu ile oluşturulan katekolöstrojenlere benzer şekilde, daha sonra reaktif oksijen türleri ('reactive oxygen species', ROS) ve DNA hasarı oluşumuna neden olan kinonlara okside olabilirler. Ek olarak, sıçan eritrositlerinin de ZEA'yı çoğunlukla indirgenmiş bir α - türevine dönüştürebildiği belirtilmiştir (Chang ve Lin, 1984).

Tüm indirgenmiş formlarının yanı sıra ZEA'nın kendisi de, hemen hemen östrojenik aktiviteden yoksun, polar türevlerin oluşumuyla sonuçlanan faz II reaksiyonlarına tabi tutulur. Konjugasyon esas olarak üridin difosfo glukuronoziltransferazlar (UGT) ile gerçekleştirilir, her bir hidroksil grubu daha sonra safra veya idrar atılımına maruz kalabilecek glukuronitleri oluşturmaya eğilimlidir. Tercih edilen eliminasyon yolunda (biliyer ve idrar yolu) ve glukuronidasyon pozisyonunda olduğu gibi ZAN, ZEA ve indirgenmiş metabolitlerinin glukuronidasyonu kapsamında türlerle ilgili farklılıklar vardır (EFSA CONTAM Panel 2011, 2016). Sülfat konjugasyonunun ZEA ve tüm indirgenmiş metabolitleri için ek bir konjugasyon yolu olabileceği ortak bir görüş olmasına rağmen, bu tür sülfat türevlerinin hem yapıları hem de enzimolojisi ile ilgili sınırlı bilgi mevcuttur (Metzler ve ark., 2010). Şekil 2-2'de ZEA'nın biyotransformasyon reaksiyonlarında rol oynayan enzimler ve oluşan metabolitleri ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Endojen steroidal östrojenlerin kanser gelişim riski iki mekanizma ile ilişkidir: 1) hormonal aktivite ve 2) sitokrom P450 (CYP450) katalizli, katekollere metabolik aktivasyondan sonra genotoksik etkiler (Bolton ve Thatcher, 2008). Benzer şekilde, ZEA ve α -ZOL de belirgin bir östrojenik aktivite gösterir ve katekol metabolitlerinin oluşumuna neden olan aromatik hidroksilasyona uğrar. Katekol-O-metiltransferaz (COMT) ile katekollerin daha sonra metilasyona uğraması, genellikle detoksifiye edici bir yolak olarak kabul edilir (Pfeiffer ve ark., 2009). Aktivasyon ve inaktivasyon reaksiyonları arasındaki dengesizlikler, DNA'nın alkilenmesine neden olan veya redoks döngüsü ile ROS üretebilen reaktif semikinonlar ve kinonların oluşumuna yol açabilir. Katekol metabolitlerinin oluşmasıyla birlikte ZEA, endojen östrojenlerle başka bir benzerliği daha taşımış olmaktadır (Fleck ve ark., 2012).

Genel olarak, ZEA metabolitlerinin östrojenik aktivitesindeki iyi bilinen farklılıklar nedeniyle, türe bağlı metabolik profilin, mikotoksin duyarlılığı üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir.

Atılım: Çoğu türde ZEA ve indirgenmiş metabolitlerinin yaygın olarak safra yolu ile atılımı nedeniyle esas olarak glukuronitler halinde dışkı yoluyla atılır. Enterohepatik sıklusa uğramaları özellikle domuzlarda vücuttaki mikotoksin ve türevlerinin nispeten uzun süren kalıcılığını açıklayabilmektedir (EFSA CONTAM Panel 2011, 2016). Ayrıca, tavşan ve insanda idrar atılımı oranı diğer türlere göre daha yüksektir (Kuiper-Goodman ve ark., 1987). Hem ZEA hem de metabolitlerinin küçükbaş, sığır ve domuzlarda süt ile atıldığı da bildirilmiştir (Dacasto ve ark., 1995; EFSA, 2004; Danicke ve ark., 2014; Flores-Flores ve ark., 2015). Yumurtlayan tavuklarda C₁₄-ZEA veya etiketlenmemiş bileşik ile yapılan çalışmalar yumurta sarısında ZEA ve lipofilik metabolitlerin artan birikimini göstermiştir (EFSA, 2004).

2.5. ZEA'nın Toksik Etki Mekanizmaları

ZEA, toksik etkisinin büyük çoğunluğunu östrojen reseptörlerine (ER) bağlanma yeteneği ve dolayısıyla, özellikle dişilerde, üreme sisteminin endokrin regülasyonunu bozmasıyla ilişkili olduğu bilinmektedir (EFSA, 2017). ZEA ve metabolitlerinin anabolik aktiviteleri vardır ve karaciğer, böbrek ve immun sistem üzerine toksik etki gösterir (Abbès ve ark., 2006). Ayrıca, hücre ölümünü indüklediği, lipid peroksidasyonuna neden olduğu, protein ve DNA sentezini inhibe ederek genotoksik

etkiler gösterebileceği ve böbrekte fagolizozomal hassasiyete neden olabileceği bildirilmiştir (Gao ve ark., 2013).

2.5.1. Östrojenik Aktivite

ZEA'nın en belirgin biyolojik aktivitesi endojen östrojen gibi davranabilmesi yani östrojenik özellikte olmasıdır. Birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ZEA'nın ER'lere bağlanarak östrojene benzer bir cevap oluşturduğunu göstermiştir (EFSA, 2004). ZEA pasif olarak hücre membranını geçer ve ER'lere bağlanır. Reseptör-ZEA kompleksi hızla nükleusa taşınır, östrojen duyarlı elementlere ('estrogen responsive elements') bağlanır ve böylece gen transkripsiyonunu aktive eder (EFSA, 2004). 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 (EFSA CONTAM Panel, 2011). ER'lere bağlanmasının yanı sıra ZEA'nın endokrin etkileri diğer mekanizmaları da içerir. ZEA ve indirgenmiş metabolitleri steroidlerin sentezinde rol oynayan iki enzim olan 3 α -HSD ve 3 β -HSD için yarışmalı substratlardır (Fink-Gremmels ve Malekinejad, 2007).

ZEA ve modifiye formları, östrojenik aktivitelerinde oldukça farklılık gösterir (EFSA CONTAM Panel, 2016). Kemirgenlerde değerlendirilen uterotropik⁵ aktivitesine göre, ZEA ve modifiye formlarının östrojenik aktivitesi şöyle sıralanabilir: α -ZOL > α -ZAL > ZEA ~ ZAN ~ β -ZAL > β -ZOL (EFSA CONTAM Panel, 2016). Bununla birlikte, ZEA ve modifiye formlarının ER'lere göreceli bağlanma afinitesi ve iki ER türünün gen ekspresyon seviyeleri türler arasında da farklılık göstermektedir (Metzler ve ark., 2010).

2.5.2. Genotoksik Etkileri

ZEA'nın genotoksik etkisi EFSA tarafından değerlendirilmiştir (EFSA CONTAM Panel, 2011, 2016). ZEA, bakteriyel mutasyon testlerinde negatif; çeşitli hücre kültürü sistemlerinde ve aynı zamanda *in vivo* çalışmalarda klastojenik ve anojenik etki gösterdiği bildirilmiştir (EFSA CONTAM Panel, 2011, 2016). ZEA'nın genotoksik etkilerine ait sonuçlar Tablo 2-3'te verilmiştir.

⁵ Rahim üzerine etki gösteren.

Tablo 2-3: ZEA ile yapılmış genotoksisite testlerinin sonuçları (JECFA, 2000).

Test Sistemi	Test Nesnesi	Konsantrasyon	Sonuç	Kaynak
Ters mutasyon	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA1538	100 µg/mikroplaka ^a	Negatif	Kuczuk ve ark., 1978
Ters mutasyon	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA98, TA100	400 µg/mikroplaka ^a	Negatif	Wehner ve ark., 1978
Ters mutasyon	<i>S. typhimurium</i> TA1538, TA98, TA100	50 µg/mikroplaka ^a	Negatif ^b	Bartholomew ve Ryan, 1980
Ters mutasyon	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100	Belirtilmemiş ^a	Negatif	Stark, 1980
Ters mutasyon	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA1538, TA98, TA100	50 µg/mikroplaka ^a	Negatif ^b	Ingerowski ve ark., 1981
Ters mutasyon	<i>S. typhimurium</i> (Suş belirtilmemiş)	1000 µg/mikroplaka ^a	Negatif	Tennant ve ark., 1987
Ters mutasyon	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA98, TA100 (ön-inkübasyon)	1000 µg/mikroplaka ^a	Negatif	Mortelmans ve ark., 1986
Gen mutasyonu	<i>S. typhimurium</i> TA1535/pSK100, umu mutasyonu	29,5 µg/L	Negatif	Kasamaki ve Urasawa, 1993
Gen mutasyonu	<i>B. subtilis</i> H17, M45 rec+/-	100 µg/disk 20 µg/disc	Pozitif ^h Negatif	Ueno ve Kubota, 1976
SOS tamiri	<i>E. coli</i> C600	478 mg/L	Pozitif ^c	Ghedira-Chekir ve ark., 1998
SOS kromotest	<i>E. coli</i> PQ37	30 mg/L ^a	Negatif	Krivobok ve ark., 1987
Planlanmamış DNA tamiri	Sıçan hepatositleri	32 mg/L	Negatif	Williams ve ark., 1989b
Nokta mutasyonları/ Mitototik rekombinasyon	<i>S. cerevisiae</i> D3	1000 µg/mikroplaka ^a	Negatif	Kuczuk ve ark., 1978
İleri mutasyon	Fare lenfoma L5178Y Tk+/- hücreleri	60 mg/L ^a	Negatif	McGregor ve ark., 1988
İleri mutasyon	Fare lenfoma L5178Y Tk+/- hücreleri	65 mg/L	Negatif	Tennant ve ark., 1987
Kromozomal aberasyon	Çin hamsteri yumurtalık hücreleri	15 mg/L 50 mg/L	Pozitif ^{de} Negatif ^f	Galloway ve ark., 1987
Kromozomal aberasyon	İnsan fibroblast (HAIN55 ve CPAE)	9,5 µg/L	Zayıf pozitif	Kasamaki ve Urasawa, 1993
Kromozomal aberasyon	Çin hamsteri yumurtalık hücreleri	15 mg/L	Pozitif ^{dl} Negatif ^f	Tennant ve ark., 1987

Kromozomal aberasyon	Çin hamsteri V79 hücreleri	32 mg/L	Negatif ^a	Thurst ve ark., 1983
Kardeş kromatit değişimi	Çin hamsteri yumurtalık hücreleri	12,5 mg/L 40 mg/L	Pozitif ^{d,e} Pozitif ^f	Galloway ve ark., 1987
Kardeş kromatit değişimi	Çin hamsteri yumurtalık hücreleri	12,5 mg/L	Pozitif ^d Negatif ^f	Tennant ve ark., 1987
Kardeş kromatit değişimi	Çin hamsteri V79 hücreleri	32 mg/L	Negatif ^a	Thurst ve ark., 1983
Kardeş kromatit değişimi	İnsan periferel lenfositleri	3 mg/L ^g	Zayıf pozitif	Kuiper-Goodman ve ark., 1987
Hücre siklusu gecikmesi	Çin hamsteri V79 hücreleri	32 mg/L	Negatif ^a	Thurst ve ark., 1983

^a Metabolik aktivasyonlu ve metabolik aktivasyon olmadan

^b Sonraki en yüksek konsantrasyonda sitotoksik

^c 6 mmol/L vitamin E ile ön-inkübasyon etkiyi engelledi

^d Metabolik aktivasyon olmadan

^e Tetraploidi ve gecikmiş hücre siklusu

^f Metabolik aktivasyonlu

^g 30 mg/L'de DNA sentezinin tamamen inhibisyonu

^h pH 6, 7 veya 8'de M45rec-, 2-3 mm ve H17rec +, 0-1 mm büyüme inhibisyonu

Caco-2 hücrelerinde ZEA ve ana metabolitlerinin DNA fragmentasyonu oluşturma üzerine etkisi Comet ve difenilamin testleriyle değerlendirilmiştir (Abid-Essefi ve ark., 2009). ZEA ve metabolitlerinin gösterdiği çeşitli toksik etkilerin DNA fragmentasyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmiş, bununla birlikte gözlenen toksik etkilerin ZEA'nın α -ZOL ve β -ZOL'e metabolizması ile hafiflediği de gözlenmiştir.

ZEA ve metabolitlerinin toksik etkisi, *in vivo* (Balb/c farelerinin kemik iliği hücreleri) ve *in vitro* (HeLa hücreleri) olarak kromozomal aberasyon testi ile DNA hasarının indüklenmesinde ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Sonuçlar, ZEA ve α -ZOL toksisitelerinin aynı olduğunu ve her iki bileşiğin de β -ZOL'den daha sitotoksik olduğunu göstermiştir. Her üç maddenin de fare kemik iliği hücrelerinde ve HeLa hücrelerinde kromozomal mutasyonların oranını arttırdığı görülmüştür. ZEA ve α -ZOL aynı düzeylerde genotoksik etkiler gösterirken her ikisinin β -ZOL'den daha toksik olduğu gösterilmiştir (Ayed ve ark., 2011).

2.5.3. Epigenetik Modifikasyonlar Üzerine Etkileri

Epigenetik modifikasyonlar, çeşitli kanserler, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik bozukluklar, tip 2 diyabet (T2DM), astım gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkilendirilmiş ve aynı zamanda kimyasallar ve mikotoksinlerin aracılık ettiği toksik etki ve karsinogenезin altında yatan bir mekanizma olabileceği öne sürülmüştür (Portela ve Esteller, 2010; Ostry ve ark., 2017). Son dönemde yapılan araştırmalarda da çevresel ksenobiyotiklere maruziyet ile epigenetik değişiklikler arasındaki ilişki sıklıkla incelemektedir (Liu ve ark., 2008; Zhu ve ark., 2017).

ZEA ve metabolitlerinin epigenetik modifikasyonlar üzerine etkilerini gösteren çalışmalar kısıtlıdır. Domuz oositlerinin ZEA'ya maruz bırakıldığı bir çalışmada; 30 µM konsantrasyonda ZEA'nın global DNA metilasyon (%5-mC, 5-metilsitozin) seviyesini ve DNA metiltransferazların (DNMT) gen ekspresyonu seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada benzer şekilde global histon modifikasyonları (H3K4me2, H3K9me3, H3K27me3) ve çeşitli histon metiltransferazların mRNA seviyelerinde de artış gözlenmiştir (Han ve ark., 2015). Bununla birlikte, 10 ve 50 µM ZEA'nın fare oositlerinde %5-mC seviyesini arttırdığı, H3K4me2, H3K9me3 ve H4K20me2/me3 seviyelerini ise azalttığı bildirilmiştir (Zhu ve ark., 2014). Çin'de kümes hayvanı çalışanları tarafından günlük olarak solunan ZEA'nın hava aracılığıyla taşınması sonucu dokularda 17,432–20,512 ng'a ulaşabileceği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2008). Bu nedenle, insan bronşiyal epitelyal BEAS-2B hücrelerinde ZEA'nın epigenetik modifikasyonlar üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; 40 µM ZEA'nın global DNA metilasyonu seviyesini kontrollere göre önemli derecede düşürdüğü ve kromatin modifiye eden genlerden histon deasetilaz 1 ve 2 (HDAC1 ve 2)'nin ekspresyonunu da azalttığı gösterilmiştir (So ve ark., 2014).

Epigenetik modifikasyonların bir başka mekanizmasını oluşturan mikroRNA (miRNA) regülasyonu üzerine ZEA'nın etkisinin incelendiği bir çalışmada; 40 µg/kg/gün dozda ZEA maruziyeti yapılan cinsel olarak olgunlaşmamış domuzların karaciğer ve kolonlarında miRNA ekspresyonu analiz edilmiştir. Karaciğerde 35 gün boyunca ZEA uygulaması, miR-15a, miR-21 ve miR-192 ekspresyonunda anlamlı bir artışa neden olurken; kolonda 42 gün boyunca ZEA uygulaması miR-15a, miR-34a ve miR-192 ekspresyonunu arttırmıştır (Brzuzan ve ark., 2015). Ekspresyonları artan bu

miRNA'lar kanser oluşum ve gelişim süreçlerinde önemli rol oynadığı da bildirilmiştir (Jin ve ark., 2018).

2.5.4. Proliferasyon ve Apoptoz Üzerine Etkileri

ZEA, doğal östrojenik bileşiklere benzer olarak insan meme bezi epitel hücre dizisi T47D ve insan meme adenokarsinoma hücre dizisi MCF-7'de konsantrasyona bağlı olarak proliferasyon uyarıcı bir etkiye neden olduğu gösterilmiştir. Bu proliferatif etki, ER'lerin varlığı ile ilişkilendirilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda ZEA proliferasyonu tetiklerken, yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığında azalmaya neden olmuştur (Kowalska ve ark., 2016). α -ZAL'ün adipoz dokuda aromataz aktivasyonunu uyararak ve östrojen biyosentezini artırarak meme kanseri hücresi büyümesini teşvik ettiği bildirilmiştir (EFSA, 2017). Yapılan bir çalışmada, 2–50 nM α -ZAL'in (Zeranol), insan primer meme preadiposit kültürlerinde aromataz aktivitesi, aromataz mRNA ekspresyonu ve östrojen üretimini önemli ölçüde artırdığı gözlenmiştir (Zhong ve ark., 2016). ZEA'nın hücre proliferasyonunu uyarma yeteneği, MCF-7 hücrelerinde siklin bağımlı kinazları aktive etme yeteneği ile gösterilmiştir; ZEA, siklin D1 protein seviyelerini arttırabilir ve retinoblastoma gen ürününün hiperfosforilasyonu ile sonuçlanan siklin bağımlı kinaz (Cdk)-2'yi aktive edebilir. Cdk-2'nin bu aktivasyonu ayrıca mitoz ve G1 ile S faz geçişlerinin de artışına yol açmaktadır (Fink-Gremmels, 2008).

ZEA'nın periferik kan mononükleer hücreleri ve lösemili hücre dizilerinde, mitokondriyal potansiyelde değişiklikler ve sitokrom C salımının indüksiyonuna ek olarak pro ve anti-apoptotik proteinler olan Bax ve Bcl-2'nin modülasyonu aracılığıyla da apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Banjerdpongchai ve ark., 2010). Ek olarak ZEA, primer sıçan Sertoli hücrelerinde hem ekstrinsik hem de intrinsik apoptotik yolları aktive edebilme yeteneği göstermiştir (Xu ve ark., 2016).

2.5.5. Oksidatif Hasar Üzerine Etkiler

ZEA'nın toksisitesinde rol oynayan etki mekanizmalarından birinin de özellikle ROS üretiminin artışı ile birlikte oksidatif hasar olabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Abid-Essefi ve ark., 2009; El Golli Bennour ve ark., 2009; Fleck ve ark., 2012; Liu ve ark., 2014; Qin ve ark., 2015; Fan ve ark., 2017). Abid-Essefi ve ark. (2009), ZEA'nın toksik etkilerinin temel nedeninin ana molekül (ZEA) veya ana metabolitlerine (α -ZOL ve β -ZOL) bağlı olup olmadığını değerlendirmişlerdir. Bu

amaçla, Caco-2 hücreleri kullanılarak, malondialdehit (MDA) üretimi ile oksidatif hasar indüksiyonu, hücre içi sinyal yolağını belirlemek için de kaspaz-3 aktivasyonu incelenmiştir. Sonuçlara göre, ZEA'nın yanı sıra iki metabolitinin de hücre ölümüne ve MDA oluşumunda artışa neden olduğu gösterilmiştir. ZEA'nın α -ZOL ve β -ZOL'e göre toksik etkilerinin daha kuvvetli olduğu gösterilmiştir (Abid-Essefi ve ark., 2009).

HepG2 hücre dizisinde ZEA'nın hücre canlılığı, koruyucu ve adaptif yanıtın bir parametresi olarak *ısı şoku proteini 70* ('heat shock protein 70', *HSP70*) ve *HSP27* gen ekspresyonları, oksidatif hasar ve hücre ölümü sinyal yolları üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir (El Golli Bennour ve ark., 2009). Sonuçlar, ZEA'nın hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini, ROS üretimi, *HSP70* ve *HSP27* gen ekspresyonlarını önemli derecede arttırdığını göstermiştir (El Golli Bennour ve ark., 2009).

Sprague-Dawley erkek sıçanları, dişi sığır ve domuzların karaciğerlerinden hazırlanan mikrozomlarda ZEA ve α -ZOL'ün katekol metabolitlerinin genotoksik etki ile oksidatif hasar mekanizmaları araştırılmıştır (Fleck ve ark., 2012). Katekol metabolitlerinin miktarının doğrudan oksidatif hasar artışı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Sonuçlara göre, ZEA ve α -ZOL'ün katekol metabolitlerinin oksidatif hasarı tetikleyen DNA hasarına sebep olabilecekleri gösterilmiştir (Fleck ve ark., 2012). Liu ve ark. (2014), 96 adet gebe Sprague-Dawley sıçanlarının gebeliklerinin 1-7. gününden itibaren 0,3; 48,5; 97,6 veya 146,0 mg/kg konsantrasyonlarda ZEA içeren diyetler ile beslediği çalışmada; ZEA'nın gebe sıçanlarda doza bağlı olarak oksidatif hasara neden olabileceği gösterilmiştir. Yüksek ZEA seviyelerinin yutulması, süttten kesilen yavrularda da oksidatif hasarın artışı ve düşük sitokin ekspresyonu gibi geri dönüşü olmayan hasara neden olduğu gösterilmiştir. Maternal ZEA'nın neden olduğu uzun süreli hasara işaret eden gastrointestinal glutatyon peroksidaz (*GPx*) mRNA ekspresyonunun artmış olduğu, süttten kesilmiş yavrularda saptanmıştır (Liu ve ark., 2014).

Domuz granüloza hücrelerinde 15, 30 ve 60 μ M konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti ile *in vitro* ROS seviyeleri, antioksidan enzimlerinin mRNA seviyesi ve aktivitesi araştırılmıştır. Sonuçlar, kontrol ile karşılaştırıldığında, ZEA'nın yüksek ROS seviyeleri ile oksidatif hasarı indüklediğini, antioksidan enzimlerin ekspresyonunu ve aktivitesini azalttığını göstermiştir (Qin ve ark., 2015). Domuz ince bağırsak IPEC-J2 hücreleri kullanılarak yapılan başka bir *in vitro* çalışmada ise 48 saat süre ile 7 ve 8

$\mu\text{g/mL}$ kosantrasyonlarında ZEA'nın MDA seviyelerini önemli bir şekilde arttırdığı ve antioksidan enzim aktivitelerini azalttığı görülmüştür. ROS birikimi yüksek doz gruplarında artmış, antioksidan enzim aktivitelerinin azalmasıyla mitokondriyal hasarın da tetiklendiği bildirilmiştir (Fan ve ark., 2017).

2.6. ZEA'nın Toksik Etkileri

Genel olarak, ZEA ve modifiye formlarının hayvanlar üzerinde etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla çalışmalar üç tipte incelenmektedir: 1) Saf ZEA ve modifiye formlarını kullanarak kontrollü deneyler, 2) Doğal olarak kontamine olmuş gıda maddeleri ile kontrollü yemleme deneyleri ve fungal materyel ile kontamine edilmiş beslenme, 3) Saha çalışmaları ve epidemiyolojik gözlemler. Doğal kontaminasyon yolu ile diyeteye eklenen saf ZEA ve modifiye formları kullanılarak yapılan kontrollü deneylerin toksisite testleri için en uygun yol olduğu bildirilmiştir (EFSA, 2017).

2.6.1. Akut Toksisite

ZEA ile akut toksisite çalışmalarının sonuçları Tablo 2-4'te özetlenmiştir. Genç dişi domuzlara, 0; 3,5; 7,5 veya 11,5 mg/kg v.a. dozlarında jelatin kapsüllerde oral olarak tek doz ZEA verildiğinde, vulva vajinit ve genişlemiş üreme yolları, dozlamadan bir hafta sonra tüm hayvanlarda gözlemlenmiştir (Farnworth ve Trenholm, 1981).

Tablo 2-4: ZEA ile yapılmış akut toksisite çalışmalarının sonuçları (JECFA, 2000).

Tür	Cinsiyet	Uygulama yolu	LD ₅₀ (mg/kg v.a.)	Kaynak
Fare	E/D	Oral	>2000	Ulusal Toksikoloji Programı ('National Toxicology Program', NTP), 1982
Fare	D	Oral	>20000	Hidy ve ark., 1977
Fare	D	İntraperitoneal	>500	Hidy ve ark., 1977
Sıçan	E/D	Oral	>4000	NTP, 1982
Sıçan	E/D	Oral	>10000	Hidy ve ark., 1977
Sıçan	E	İntraperitoneal	5500	Hidy ve ark., 1977
Kobay	D	Oral	> 5000	Hidy ve ark., 1977
Kobay	D	İntraperitoneal	2500	Hidy ve ark., 1977

E: Erkek; D: Dişi.

2.6.2. Subakut/Subkronik Toksikite

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada; 13 hafta boyunca günde 0, 4,5, 15, 45, 150 veya 450 mg/kg v.a. dozlarına eşdeğer 0, 30, 100, 300, 1000 veya 3000 mg/kg dozlarında ZEA içeren diyetler ile beslenen B6C3F1 fare gruplarında 3000 mg/kg dozları alan 2 dişi farenin öldüğü rapor edilmiştir. >300 mg/kg dozlarını alan erkek farelerde kilo artışı, %14 veya daha fazla oranda baskılanmış; 1000 veya 3000 mg/kg dozlarını içeren diyetle beslenen erkek farelerde seminal kesecik ve testislerin atrofisi ve adrenallerin sitoplazmik vakuolizasyonu bulunmuş ve 3000 mg/kg dozları alan erkek farelerde prostatın skuamöz metaplazisi gözlenmiştir. Maruziyet gruplarındaki tüm dişi farelerde rahimde endometriyal hiperplazi görülmüş, ancak insidans doza bağlı olmamıştır. Her >100 mg/kg doz içeren diyet ile beslenen dişi farelerde osteoporoz gözlenmiş ve >300 mg/kg doz içeren diyetle beslenen dişi farelerde kemik iliği miyelofibrosisi görülmüştür (NTP, 1982).

Dişi B6C3F1 fareleri (26 kontrol ve 8 maruziyet grubundan oluşan), 0 veya 10 mg/kg dozlarında (günde 0 veya 1,5 mg/kg v.a.'ya eşdeğer) ZEA içeren diyetlerle 8 hafta boyunca beslenmiştir. Vücut ağırlığı artışı veya gıda tüketiminde maruziyet yapılan hayvanlar ile kontrol grubu arasında fark görülmemiştir. Timüs, dalak, karaciğer, böbrek, rahim, ince bağırsak, kolon, kalp, beyin, akciğer ve kemik iliğinde brüt ve histopatolojik değerlendirme sonucunda ZEA maruziyetine bağlı bir değişiklik görülmemiş ve maruziyet grubu ile kontrol grubu hayvanların organ ağırlıklarının benzer olduğu bildirilmiştir. Hematolojik incelemede, maruziyet yapılan hayvanların eritrosit sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülürken, diğer parametreler değişmediği rapor edilmiştir (Forsell ve ark., 1986).

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada ise; 13 hafta boyunca günlük 0, 3, 10, 30, 100 ya da 300 mg/kg v.a.'na eşdeğer olan 0, 30, 100, 300, 1000 ya da 3000 mg/kg ZEA içeren diyetler ile beslenen Fischer 344/N sıçanlarında, uygulamaya bağlı ölümler görülmemiştir. Yemde >100 mg/kg'lık dozu alan her 2 cinsiyetteki sıçanlarda vücut ağırlığı artışı %17'den fazla oranda baskılanmıştır. 1000 veya 3000 mg/kg dozlarında ZEA ile beslenen sıçanlarda, seminal vezikül atrofisi ve prostat fibromusküler hiperplazisi; en yüksek doz grubunda her 2 cinsiyetteki hayvanlarda ise meme bezinde duktal hiperplazi gözlenmiştir. >100 mg/kg ZEA içeren diyetle beslenen sıçanlarda, rahimde endometriyal hiperplazi görülmüştür. Hipofiz hiperplazisi, 100 mg/kg ZEA

içeren diyetle beslenen dişilerin 1/10'ünde ve iki yüksek dozda hem erkek hem de dişilerde gözlenmiştir. En yüksek iki dozda erkek sıçanlarda ve maruziyet gruplarındaki tüm dişi sıçanlarda osteoporoz görülmüştür (NTP, 1982).

2.6.3. Kronik Toksikite ve Karsinojenite

Kronik toksisite testlerinde, 'hiçbir advers etkinin gözlenmediği seviye' ('No Observed Adverse Effect Level', NOAEL) ve NOAEL değeri olmadığında 'gözlenen en düşük yan etki seviyesi' ('Lowest Observed Adverse Effect Level', LOAEL) değerleri kimyasal risk değerlendirmesinde kullanılabilecek doz tanımlayıcılarıdır.

EFSA'nın 2011 yılında gerçekleştirdiği ZEA risk değerlendirmesinde (EFSA CONTAM Panel, 2011), TDI değeri (0,25 µg/kg v.a./gün) olgunlaşmamış domuz yavrularında gözlenen östrojenik etkiler için belirlenen 10 µg/kg v.a. NOAEL değerinden ve 40 belirsizlik faktöründen (toksikokinetikte türler arası değişkenlik için 4 ve insanlar arası değişkenlik için 10) türetilmiştir. Dişi domuzlarda yumurtalık, rahim ve vulva için 'gözlenen en düşük etki seviyeleri' ('Lowest Observed Effect Level', LOEL), 17-200 µg/kg v.a./gün arasında değişmekte olup, genel olarak NOEL değeri 10,4 µg/kg v.a./gün'dir.

Risk karakterizasyonu için koyun, domuz, kümes hayvanları, balık ve köpekler için tanımlanan NOAEL veya LOAEL değerleri kullanılmıştır. Sığır, at, tavşan, keçi, ördek, kedi ve vizonlar için ZEA'ya maruziyetten kaynaklanan sağlık riski, NOAEL veya LOAEL değerleri tanımlanmadığı için değerlendirilememiştir. ZEA toksisite çalışmalarıyla çeşitli hayvanlar üzerinde belirlenen NOAEL/LOAEL değerleri Tablo 2-5'te verilmiştir.

7 haftalık 50 erkek ve 50 dişi B6C3F1 farelerinden oluşan gruplar üzerinde yapılan bir çalışmada; fareler 103 hafta boyunca 0, 50 veya 100 mg/kg (maksimum tolere edilen doz) dozlarında ZEA içeren diyetler ile beslenmiştir. Günlük ZEA tüketim miktarı, erkeklerde yaklaşık 0, 8 ve 17 mg/kg v.a., dişilerde ise yaklaşık 0, 9 ve 18 mg/kg v.a. olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında sağkalım açısından anlamlı bir fark görülmemiş ve farelerin %64-88'i çalışmanın sonuna kadar yaşamıştır. Vücut ağırlığı artışında doza bağlı değişiklikler olmamıştır. Erkek farelerde maruziyetle ilişkili neoplastik olmayan lezyonlara rastlanılmazken, dişilerde rahimde fibrozis, meme bezlerinde sistik kanallar ve kemik iliğinde miyelofibrozis gibi çeşitli dokularda östrojen ile ilgili etkiler görülmüştür. Erkeklerde düşük dozda 3/50'ünde, yüksek dozda

7/49'sinde; dişilerde ise düşük dozda 2/49'sinde ve yüksek dozda 7/49'sinde hepatoselüler adenomlar gözlenmiştir. Hipofiz adenomu insidansında istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler hem erkek (düşük doz 4/45, yüksek doz 6/44) hem de dişilerde (düşük doz 2/43, yüksek doz 13/42) gözlenmiştir ve artan insidans yüksek dozda erkek ve dişilerde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (NTP, 1982).

Tablo 2-5: ZEA ile yapılmış toksisite çalışmalarında çeşitli hayvanlar üzerinde belirlenen NOAEL ve LOAEL değerleri (EFSA, 2017).

Tür	NOAEL	LOAEL	Gözlenen advers etki	Kaynak
Koyun	28 µg/kg v.a./gün, 10 gün	56 µg/kg v.a./gün	Depresif ovülasyon oranları ve düşük yavrulama yüzdesi	Smith ve ark., 1990
Domuz	10,4 µg/kg v.a./gün (NOEL), 95 gün	17,6 µg/kg v.a./gün (LOEL)	Şişmiş ve kızarmış vulva, rahim ağırlığının artması	Döll ve ark., 2003
Tavuk	7500 µg/kg v.a./gün, 3 hafta	30000 µg/kg v.a./gün	Lenfosit sayısında azalma	Chi ve ark., 1980
Hindi	9100 µg/kg v.a./gün, 8 hafta	19000 µg/kg v.a./gün	Burun deliğinde şişme	Allen ve ark., 1981
Köpek	Veri yok	25 µg/kg v.a./gün, 100 gün	Miyometriyum ve endometriyumda dejeneratif lezyonlar, rahim bezlerinde genişleme ve atrofi, hematolojik değerlerde değişiklikler, AST ve ALT'de azalma	Gajęcka ve ark., 2007; 2008a,b

ALT: alanin aminotransferaz; AST: aspartat aminotransferaz.

28 günlük 90 erkek ve 90 dişi FDRL Wistar sıçanı ve kontrol grubunda 140 erkek ve 140 dişi sıçandan oluşan gruplar üzerinde yapılan çalışmada; sıçanlar 104 hafta boyunca yaklaşık 0; 0,1; 1 veya 3 mg/kg/gün dozlarında ZEA içeren diyetlerle beslenmiştir. Uygun günlük dozları devam ettirebilmek amacıyla, diyetteki ZEA konsantrasyonu, bir önceki haftada ölçülen vücut ağırlıkları ve gıda tüketimine göre haftalık olarak ayarlanmıştır. ZEA, ana jenerasyonda üreme parametreleri üzerinde herhangi bir etki göstermemekle birlikte, F1 jenerasyonunun erkeklerinde kontroller ile

kıyaslandığında, vücut ağırlığı artışında geçici ama anlamlı bir düşüşe neden olmuştur. 13, 26, 65 ve 104. haftalarda her gruptan 10 hayvandan alınan örneklerle yapılan hematolojik, klinik kimyasal veya üriner parametre ölçümleri ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir. Çalışmanın sonunda, 3 mg/kg v.a. dozlarına maruz kalan erkek ve dişilerde karaciğer ağırlıklarının anlamlı derecede arttığı ve iki yüksek dozda dişilerde rahim ağırlıklarının arttığı bildirilmiştir. Maruziyetlere bağlı tümör oluşumu gözlenmemiştir (Becci ve ark., 1982a). Bu çalışmada NOEL değeri 0,1 mg/kg v.a./gün olarak belirlenmiştir.

5 haftalık 50 erkek ve 50 dişi Fischer 344 sıçanlarından oluşan gruplar üzerinde yapılan bir çalışmada; sıçanlar, 103 hafta boyunca 0, 25 veya 50 mg/kg (maksimum tolere edilen doz) dozlarında ZEA içeren diyetler ile beslenmiştir. Maruziyet gruplarındaki sıçanların ortalama vücut ağırlığı artışı, kontrollere göre daha düşük olmuş ve 44 haftalık maruziyetin ardından yüksek dozda erkeklerde %19 ve dişilerde %11 oranında meydana gelen düşüşlerin doza bağlı olabileceği bildirilmiştir. Gruplar arasında sağkalım açısından anlamlı bir fark gözlenmemiş ve sıçanların %74-82'si çalışmanın sonuna kadar hayatta kalmıştır. Gözlenen neoplastik olmayan lezyonlar, erkeklerde meme bezlerinde kist veya kistik kanallar, testiküler atrofi, prostat bezinin inflamasyonu, hepatoselüler sitoplazmik vakuolizasyon insidansının artması ve her iki cinsiyette de kronik progresif nefropati insidansının artması olmuştur. Erkeklerde her iki dozda ve dişilerde ise düşük dozda retinopati ve katarakt insidansının arttığı bildirilmiştir. Maruziyetler ile ilişkili tümör insidansında artış gözlenmemiştir. Düşük dozda erkek sıçanlarda, hipofiz adenomları insidansında anlamlı bir artış olmasına karşın önemli bir doza bağlı değişiklik görülmemiştir. Hipofiz bezi adenom ve karsinomlarının kombine insidansı maruziyete bağlı değişiklik göstermemiştir (NTP, 1982).

Tunus popülasyonunda, ZEA metaboliti (α -ZAL) seviyeleri ile meme kanseri insidansı arasında bir korelasyon bulunmuştur (Belhassen ve ark., 2015). Endometrial kanser hayvan modelleri üzerinde birçok araştırma yapılmış, ancak sadece birkaç tanesi insan hücrelerine odaklanmıştır. Birkaç yıl boyunca ZEA'ya maruz kalmanın, endometrial kanser gelişimi ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Tomaszewski ve ark., 1998).

Yapılan *in vivo* çalışmalara ek olarak, kanser oluşum ve gelişim aşamalarında rol oynayan mekanizmalar (proliferasyon, apoptoz gibi) üzerinde ZEA ve metabolitlerinin etkisini incelemek amacıyla, *in vitro* çalışmalar da yapılmıştır (Ben Salem ve ark., 2015a; Yang ve ark., 2017; Zheng ve ark., 2018). ZEA ve metabolitlerinin farklı hücrelerde hücre proliferasyonunu tetiklediği ve hücre siklusu regülasyonuna müdahale ettiği de yine çeşitli *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir (Khosrokhavar ve ark., 2009; Cortinovis ve ark., 2014; Abassi ve ark., 2016; Kowalska ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2018; Zheng ve ark., 2018). ZEA, östrojen duyarlı genlerin ekspresyonunu değiştirerek hücre proliferasyonunu uyarır ve ER'lere bağlanma yeteneği nedeniyle, fizyolojik östrojende olduğu gibi hücre proliferasyonunda rolü olan östrojenle düzenlenen genlerin ekspresyonunu da etkilediği bildirilmiştir (Darbre ve ark., 2002).

ZEA'nın, hücre proliferasyonuna ek olarak, kanser hücrelerinin belirgin özellikleri olan hücre migrasyonu, koloni oluşumu ve DNA fragmentasyonuna da neden olduğu gösterilmiştir (Abid-Essefi ve ark., 2003; Abassi ve ark., 2016). *In vivo* çalışmalar ZEA'nın, hormona bağlı tümör oluşumu riskini arttırabileceğini ve farklı organlarda kanser insidansının artmasında önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir (Tomaszewski ve ark., 1998; Yu ve ark., 2005). ZEA'nın 'gap junction' hücreler arası iletişim ('gap junctional intercellular communication', GJIC) işlevini bozabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur; ZEA konneksinlerin ekspresyonunu etkilemiş ve GJIC aktivitesini inhibe etmiştir (Othmen ve ark., 2008; Zheng ve ark., 2017). GJIC işlev bozukluğunun kanser oluşumu için öncü olduğu bilinmektedir, özellikle invazyon aşamasında 'gap junction'larda fonksiyon kaybı olmaktadır (Mesnil ve ark., 2005). ZEA'nın, hücre büyümesi ve ölüm arasındaki dinamik dengeyi bozarak onkogenlerin anormal regülasyonuna neden olabileceği gösterilmiştir. ZEA'nın, hücre siklusuna müdahale ederek siklin proteinleri gibi faz geçişlerinde rol alan proteinlerin ekspresyonunu ve *c-Myc*, *c-Fos* ve *c-Jun* gibi proto-onkogenlerin ekspresyonlarını arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, ZEA'nın fare Leydig hücre dizisinde (TM3), *PTEN* ve *p53* gibi tümör süpresör genlerin ekspresyonlarını azaltarak da normal hücrelerin (tümör hücreleri de dahil olmak üzere) anormal hücrelere dönüşümünü indüklediği gösterilmiştir (Zheng ve ark., 2017).

Ayrıca, Xu ve ark. (2010), Zeranol maruziyetinin özellikle obez kadınlarda meme kanseri riskini arttırabileceği hipotezini öne sürmüştür. Bu amaçla, insan normal meme epitel primer hücre kültürlerine 24 saat süre ile 5, 10 ve 20 nM konsantrasyonlarında Zeranol ve 1,5; 3 ve 6 nM konsantrasyonlarında leptin maruziyeti yapılmış, hücre kültür ortamında leptinin de bulunmasıyla obezite modeli oluşturularak Zeranol⁶'ün meme kanseri geliştirme riski *in vitro* araştırılmıştır. Leptin, esas olarak adipositler tarafından salgılanan ve obez bireylerde ekspresyonu artan bir proteindir. Meme kanseri gelişiminde önemli bir rol oynadığı ve meme kanseri hücre büyümesini desteklediği bilinmektedir (Rose ve ark., 2004). Sonuç olarak, leptin, hücrelerin Zeranol'e duyarlılığını arttırmış ve Zeranol de hücrelerin leptin salgılama yeteneğini arttırmıştır. Zeranol hücre bölünmesinde rol oynayan *Siklin D1* ekspresyonunu doza bağlı arttırarak hücre proliferasyonunu tetiklemiştir. Bu nedenle, Zeranol'ün leptin indüklü meme neoplazisinde rol oynayabileceği bildirilmiştir (Xu ve ark., 2010). Başka bir çalışmada ise, insan normal ve kanserli meme epitel primer hücre kültürlerine Zeranol maruziyetinin tümör süpresör genlerinden *p53*'ün ekspresyonunu azaltarak hücre proliferasyonunu tetiklediği rapor edilmiştir (Ye ve ark., 2011).

ZEA ile ilişkili tümörlerin, ZEA'nın hormonal etkisine bağlı olduğu öne sürülmüştür (NTP, 1982). Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi ('International Agency for Research on Cancer', IARC), bu çalışmalardan elde edilen veriler doğrultusunda deney hayvanlarında ZEA'nın karsinojenik etkisine ilişkin sınırlı kanıt bulunduğu karar vermiş ve ZEA'yı "İnsandaki karsinojenik etkileri yönünden sınıflandırılmayan etkenler" (Grup 3) grubunda sınıflandırmıştır (IARC, 1993).

2.6.4. Üreme ve Gelişim Üzerine Toksik Etkileri

ZEA ve metabolitlerinin yapısı ve şekli, endojen estrogen 17 β -östradiole benzerlik gösterir. Bu benzerlikten ötürü, ZEA, ER'lere bağlanarak ilgili genleri aktive eder ve özellikle üreme sisteminde değişikliklere neden olur (Wang ve ark., 2014).

Yenidoğan dişi C57BL/Crgl fareleri ile yapılan üreme toksisitesi çalışmasında, 5 gün boyunca, 1 μ g/gün ZEA deri altından enjekte edilmiş olup, maruziyet yapılan farelerde rahim stromasında yoğun kolajen birikimi olduğu, hayvanların %56'sında

⁶ Sentetik α -ZAL, çiftlik hayvanlarında büyüme promotörü olarak kullanılır.

rahim bezlerinin görülmediği ve %59'u skuamöz metaplazi geliştiği bildirilmiştir (Williams ve ark., 1989a). Doğumdan sonra 1-3. gün veya 1-5. günlerde 10-30 µg ZEA'nın 4-9 dişi ICR farelerine intraperitoneal enjeksiyonu, vajinal açılmanın gecikmesine ve hayvanların %60-80'inde sürekli östrusa neden olduğu bildirilmiştir. 10. günde 30 µg'lık tek dozun hayvanlarda vajinal açılmayı hızlandırdığı, ancak 1, 3, 5 veya 8. günlerde verilen aynı dozun fareleri etkilemediği gösterilmiştir. 1, 3 ya da 5. günlerde ZEA maruziyeti yapılan 8 haftalık farelerde sürekli östrus insidansının anlamlı olarak arttığı, ancak 8 veya 10. günlerde maruziyet yapılan farelerde aynı durum söz konusu olmadığı bildirilmiştir (Ito ve Ohtsubo, 1994).

FDRL Wistar sıçanları ile yapılan bir başka çalışmada ise, diyetle günlük 0; 0,1; 1 veya 10 mg/kg v.a. dozlarında ZEA verilmiştir. 4 haftalık maruziyetten sonra, F0 nesli, F1 nesli üretmek için çiftleştirilmiş ve cinsel olgunlukta F1 nesli, F2 nesli elde etmek için yetiştirilmiştir. F0 ve F1 nesillerine, laktasyon dönemi hariç, çiftleşme ve gebelik boyunca ZEA verilmiştir. ZEA, sadece en yüksek dozda canlı F1 yavrularının sayısını azalttığı gözlenirken, günde 1 ve 10 mg/kg v.a. dozlarında canlı F2 yavrularının sayısını azalttığı rapor edilmiştir. F1 ve F2 nesillerinde en yüksek dozda fertilitede önemli ölçüde azalma bildirilmiştir (Becci ve ark., 1982b).

Gebeliğin 9. gününde gavaj ile 5-20 mg/kg v.a. dozlarında ZEA verilen CBA/Ca farelerinde teratojenik etki bulunmamıştır (Arora ve ark. 1981, 1983). Gebeliğin 6-15. günlerinde dişi Wistar sıçanlarına gavaj ile günlük 1-10 mg/kg v.a. dozlarında verilen ZEA, gecikmiş kemikleşmeye bağlı olduğu düşünülen minör iskelet deformasyonlarına neden olmuştur (Ruddick ve ark. 1976). İki nesilli bir çalışmada, her iki nesilden FDRL Wistar sıçanlarına diyetle 0; 0,1; 1 veya 10 mg/kg v.a./gün dozlarında ZEA verilmiştir. 4 hafta maruziyetten sonra, F0 nesli F1 neslini üretmek için çiftleştirilmiş ve her iki neslin sıçanlarına, laktasyon dönemi hariç, çiftleşme ve gebelik boyunca ZEA maruziyeti yapılmıştır. Gebeliğin 20. gününde, günde 10 mg/kg v.a. dozlarında ZEA içeren diyetle beslenen dişilerde, rezorpsiyon sayısında artış ile birlikte ortalama canlı yavru sayısında, korpus luteumda ve implantasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı azalma bulunmuştur. En yüksek dozda, gecikmiş fetal gelişim ile ilişkili yumuşak doku anormallikleri de bildirilmiştir. 1 mg/kg v.a. dozunda azalan büyüme-gelişim ile ilişkili minör iskelet anormallikleri gözlenmiştir. Belirgin teratojenik etki saptanmamıştır (Becci ve ark., 1982b).

ZEA maruziyetinin erken dönem fare oojenezi sırasında mayoza girişi, DNA çift zincir kırıkları ve primordial folikül düzeneği üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada; ZEA maruziyetinin diploid evre germ hücrelerinin yüzdesini önemli ölçüde azalttığı ve daha fazla germ hücresinin zigoten veya pakiten aşamalarında kaldığını gösterilmiş olup, mayozla ilgili genlerin mRNA ekspresyon seviyesi ZEA maruziyetinden sonra önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Liu ve ark., 2017). Gao ve ark. (2017) yaptıkları bir çalışmada ise; 64 gebe sıçan dört gruba ayrılarak tüm gebelik döneminde 0, 5, 10 ve 20 mg/kg ZEA içeren diyetle beslenmiştir; F1 erkek fetüsün canlılığının etkilenmediği, ZEA'ya prenatal maruziyet sonrası yeni doğan vücut ağırlığının ise anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Doğum sonrası 21. günde erkek sıçanlarda vücut ağırlığı azalmıştır. Ayrıca, ZEA maruziyeti yapılan sıçanlarda, spermatozit ve olgun sperm oranlarının azalmasının (%35 ve %31) yanısıra seminifer tübül atrofi ile erişkin testis ağırlığı artmıştır. Bu arada, ZEA maruziyeti yapılan sıçanlarda östradiol artarken, luteinize edici hormon (LH) ve testosteron dolaşım seviyeleri azalmıştır (Gao ve ark., 2017). Ayrıca, zebra balığı modeli, *Danio rerio* embriyoları üzerinde yapılan bir çalışmada; 350, 550, 750 ve 950 µg/L konsantrasyonlarda ZEA'nın gelişim üzerine etkileri incelenmiştir (Muthulakshmi ve ark., 2018); 550 µg/L'den yüksek dozlarda ZEA'nın, perikardiyal ödem, hiperemi, yumurta kesesi ödemi, omurga eğriliği ve kalp atım hızında azalma gibi gelişimsel kusurları tetiklediği ve bunun da konsantrasyon ve zamana bağlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir (Muthulakshmi ve ark., 2018).

Yukarıda bahsedilen hayvan çalışmalarına ek olarak, Bandera ve ark. (2011), 9-10 yıla kadar New Jersey'de genç kızlarda ZEA'nın idrar konsantrasyonunun kısa boy ve meme gelişimi ile ilişkisinin incelendiği bir çalışma yürütmüştür. Bu popülasyon üzerinde gerçekleştirilen uzun süreli çalışmanın, ZEA'nın idrar konsantrasyonunun kısa boy ve meme gelişimi ile anlamlı olarak ilişkili olduğu gözlenmiş ve endokrin profilinde erken değişikliklerin daha sonraki kanser gelişimi ile nasıl ilişkili olabileceğine dair kanıt sağlayabileceği düşünülmüştür. ZEA'nın dişi üreme sisteminin morfolojik yapısını etkileyebilen Wnt-7a sinyal yolağını da modüle ettiği bildirilmiştir (Wagner ve Lehmann, 2006).

İnsan plasenta koryokarsinom hücre dizisinde 48 saat 0,1; 1 ve 10 µM konsantrasyonlarında ZEA ve metabolitlerinin (α -ZOL ve β -ZOL) toksisitesinin

incelendiği bir çalışmada; ZEA hücre farklılaşmasını tetiklerken ZEA'nın aksine indirgenmiş metabolitler trofoblast farklılaşmasına neden olmamıştır. Ayrıca, ZEA ve metabolitleri, plasental hücrelerin taşıma fonksiyonunu değiştirebilen nükleer reseptörler (LXR, PXR, PR) ile potansiyel etkileşim yoluyla, ABC taşıyıcı proteinleri ekspresyonunda önemli değişiklikleri de indüklemiştir (Prouillac ve ark., 2012). 35 günlük sıçanlardan izole edilen olgunlaşmamış Leydig hücrelerinde 24 saat süre ile 0,05–50 µM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti sonrasında 50 nM gibi düşük konsantrasyonda *CYP11a1*, *HSD3β1* ve *Steroid 5α-redüktaz 1'in (SRD5α1)* ekspresyon seviyelerinin azalmasıyla olgunlaşmamış Leydig hücrelerinde androjen üretimi ve steroidojenik enzim aktiviteleri inhibe edilmiştir. Sonuç olarak ZEA maruziyetinin Leydig hücre gelişimi ve steroidogenezi bozabileceği bildirilmiştir (Zhou ve ark., 2018).

2.6.5. İmmünotoksik Etkileri

Enfeksiyona ve otoimmüniteye karşı immün cevapta, güçlü cinsiyet farklılıkları görülebilmektedir. ER'ler çoğu immün sistem hücresinde eksprese olmakta ve sinyal yollarının regülasyonunda görev almaktadır (Kovats, 2015).

Sütten yeni kesilen 8 dişli B6C3F1 faresi 6 hafta boyunca 10 mg/kg ZEA (1,5 mg/kg v.a./gün'e eşdeğer) içeren diyetle beslendiğinde; 26 kontrol hayvanına kıyasla immüno globulin G, M veya A'nın serum konsantrasyonlarında hiçbir farklılık görülmemiştir. ZEA'nın diyetle verilmesi lökosit sayısı veya farklı lenfosit, polimorfonükleer nötrofil, monosit veya eozinofil sayıları üzerinde hiçbir etkiye sebep olmadığı bildirilmiştir (Forsell ve ark., 1986).

40 ve 80 mg/kg v.a. gibi yüksek subkronik dozlarında ZEA verilen Balb/c farelerinde lipopolisakkarit modülasyonu üzerinde immüno lojik etkiler incelenmiştir (Salah-Abbes ve ark., 2010). ZEA tüketen fareler, vücut ağırlığı artışında ve immün sistem ile ilişkili organların ağırlıklarında doza bağlı bir azalma göstermiştir. Ayrıca, dalak histopatolojisinde atrofi ve lenfoit tükenmesi görülmüştür. ZEA'nın toplam alyuvar ve lenfosit sayıları üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde, ZEA, farelerde antikor ve regülatör sitokinlerin üretimini de değiştirdiği bildirilmiştir (Salah-Abbes ve ark., 2010).

Yapılan başka bir çalışmada ise, 28 gün boyunca gavaj ile günlük 3 mg/kg ZEA verilen yumurtalıkları alınmış sıçanlarda vücut ağırlığı artışı, besin tüketimi, hematolojik parametreler, kazanılmış immün cevaplar, makrofaj aktivitesi, lenfoit

organlar ve bu organlardaki hücrelerin yapısal olarak nitelikleri değerlendirilmiştir (Hueza ve ark., 2014). ZEA vücut ağırlığı artışı ve besin tüketimini azaltmıştır. Hematolojik parametreler üzerinde bir etkisi görülmesi de, ZEA, histolojik ve timosit fenotipi değişiklikleriyle timus atrofisine ve dalakta β hücre yüzdesindeki azalmaya neden olmuştur. Kazanılmış ve doğuştan gelen immün cevapları ile ilgili olarak, gecikmiş tipte hipersensitivitede istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Bununla birlikte, ZEA verilen sıçanlarda, makrofajlar tarafından antikor üretimi ve peroksit salımı bozulmuştur. Bu çalışmada gözlenen sonuçların ZEA'nın ER'ler üzerindeki aktivitesi ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Hueza ve ark., 2014).

Pistol ve ark. (2014, 2015), ZEA içeren diyetle beslenen domuzların karaciğer ve dalak örneklerinin incelendiği 2 ayrı çalışmada; ZEA'nın pro- ve antiinflamatuvar araçlar ve ilgili sinyal yolları üzerine etkisini incelemişlerdir. İlk çalışmada, ZEA'nın proinflamatuvar (TNF α , IL-8, IL-6, IL-1 β ve interferon- γ) ve antiinflamatuvar (IL-10 ve IL-4) sitokinleri ve inflamatuvar süreçlere dahil olan diğer moleküller (matriks metalloproteinazlar (MMP)/matriks metalloproteinazlar doku inhibitörleri (TIMP), PPAR γ ve NF- κ B1 gibi nükleer reseptörler, mitojen aktive edilmiş protein kinazlar (MAPK)) üzerindeki etkisi domuz yavrularının karaciğer örneklerinde araştırılmıştır (Pistol ve ark., 2014). ZEA'nın hem gen ekspresyonu hem de protein seviyelerinde pro- ve antiinflamatuvar sitokin seviyelerinde önemli bir azalmaya neden olduğu, MMP ve TIMP gibi diğer inflamatuvar araçların seviyelerinde azalma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, diyetel ZEA'nın maruz bırakılmış domuz yavrularının karaciğerindeki *NF- κ B1* ve *TAK1/p38a MAPK* genlerinin ifadelerinde dramatik bir azalmayı indüklediği ve *PPAR γ* mRNA ekspresyonu üzerinde ise hiçbir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Bu çalışma ZEA'nın hepatik hücrel immün cevabın birkaç önemli parametresini değiştirdiği vurgulanmıştır (Pistol ve ark., 2014). Diğer çalışmada ise, 18 günlük süttten yeni kesilmiş domuz yavrularının dalak örneklerinde mikrodizi analizi ile ZEA'nın tüm genom ekspresyonu, pro- (TNF α , IL-8, IL-6, IL-1 β , interferon- γ) ve antiinflamatuvar (IL-10, IL-4) sitokinler, inflamatuvar süreçlere dahil olan diğer moleküller (MMP'ler/TIMP'ler), ayrıca sinyal molekülleri, (p38/JNK1/JNK2-MAPK'lar) ve nükleer reseptörler (PPAR γ /NF κ B/AP-1/STAT3/c-JUN) üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Mikrodizi analizi, ZEA maruziyeti ile ekspresyon seviyeleri değişen genlerin toplamının %46'sının hücrel sinyal yollarında, %13'ünün sitokin ağında ve %10'unun inflamatuvar cevapta yer aldığını göstermiştir. ZEA, proinflamatuvarların

(TNF α , IL-8, IL-6, IL-1 β) ekspresyonunu ve üretimini arttırırken, dalakta interferon- γ , IL-4 ve IL-10 sitokinleri üzerinde hiçbir etki göstermemiştir (Pistol ve ark., 2015). Bahsedilen hayvan çalışmalarından elde edilen veriler ışığında ZEA'nın immünotoksik özellikte olabileceği düşünülmektedir.

2.6.6. Nörotoksik Etkileri

ZEA'nın nörotoksik etkileri ile ilgili veriler oldukça sınırlıdır. Ancak zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarında yapılan bir çalışmada, ZEA'nın embriyotoksik etkileri, kalp hızı, oksidatif hasar göstergeleri (ROS, lipid peroksidasyonu, nitrik oksit (NO)), antioksidan savunma sistemi (süperoksit dismutaz, (SOD), katalaz (CAT), GPx, glutatyon S-transferaz (GST) ve indirgenmiş glutatyon (GSH), metabolik biyogöstergeler (laktat dehidrogenaz (LDH) ve NO), nörotoksik etkileri (asetilkolinesteraz (AChE)), genotoksik etkileri (Comet analizi ve akrinin turuncu boyaması) çeşitli testler ve histolojik analizler yapılarak değerlendirilmiştir (Muthulakshmi ve ark., 2018). Çalışmada, LC₁₀ ve LC₅₀ değerleri göz önüne alınarak 350, 550, 750 ve 950 mg/L konsantrasyonları çalışılmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda ZEA maruziyetinde oksidatif hasar göstergelerinde anlamlı artış, antioksidan savunma sisteminde azalma ve metabolik biyogöstergelerdeki değişiklikler gözlenmiştir. ZEA'nın nörotoksik etkileri, daha yüksek maruziyet gruplarında (750 ve 950 mg/L) AChE aktivitesinin anlamlı şekilde inhibe edilmesi ile gözlenmiştir (Muthulakshmi ve ark., 2018).

Olgunlaşmamış dişi Wistar sıçanlarına doğum sonrası 18. günden itibaren 10 gün süreyle etinil östradiol (10 μ g/kg) ve ZEA (10 mg/kg) ile maruziyet yapılmıştır. Ergenliğin bir belirteci olarak vajinal açıklık kaydedilmiş, nöropeptid ve ilgili transkripsiyon faktörü mRNA seviyeleri kantitatif gerçek zamanlı PCR ve *in situ* hibridizasyon histokimya yöntemiyle ölçülmüştür. Bu değişiklikler, anteroventral ve rostral periventriküler hipotalamustaki ergenliğin başlaması için önemli fonksiyonları olan *kiss1* mRNA artışına ve preoptik alanda artmış kisspeptin fiber yoğunluğuna paralel olarak gerçekleşmiştir. Çalışmada, hipotalamusta ZEA ve etinil östradiolün gonadotropin salgılayıcı hormon (GnRH) mRNA artışını uyarmak için anteroventral ve rostral periventriküler hipotalamus nöronlarını doğrudan aktive ettiği bildirilmiştir (Kriszt ve ark., 2015).

Yapılan bir *in vitro* çalışmada ise SH-SY5Y hücre dizisinde ZEA'nın neden olduğu nörotoksik etkisinde olası etki mekanizması ve oksidatif hasarın rolünü değerlendirilmiştir (Venkataramana ve ark., 2014). ZEA'nın, ROS oluşumunu, yüksek MDA seviyelerini ve mitokondriyal membran potansiyeli kaybını tetiklediği, ayrıca Comet analizi ile doza bağlı bir şekilde DNA hasarında artışa neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, ZEA maruziyetinin, SH-SY5Y hücrelerinde nöronal gen ekspresyonu üzerinde belirgin bir baskılayıcı etki gösterdiği bildirilmiş; bir antioksidan olan N-asetilsistein (NAC) kullanılmasının toksinin indüklediği ROS oluşumunu tersine çevirdiği ve ayrıca mitokondriyal membran potansiyeli kaybını da azalttığı rapor edilmiştir. SH-SY5Y hücrelerinde artan ROS üretiminin ve dolayısıyla ZEA aracılı nörotoksik etkinin oluşabileceği öne sürülmüştür (Venkataramana ve ark., 2014).

2.6.7. Hormonal Sistem Üzerine Toksik Etkileri

ZEA, endokrin bozucu olduğu bilinen bir mikotoksindir ve bazı östrojenik etkileri, kısa ve uzun süreli toksisite ve üreme toksisitesi çalışmalarında gösterilmiştir.

ER α ve ER β , vücutta ve ayrıca prostat ve merkezi sinir sistemi gibi dokulardaki hücrelerde farklı şekilde dağılım göstermektedir (Shughrue ve ark., 1996; Kuiper ve ark., 1997; Prins ve ark., 1998). Birçok çalışma, ZEA ve türevlerinin, ER reseptör kompleksinin nükleusa translokasyonunu başlattığını göstermiştir. Hedef dokularda ve hücrelerde ZEA'nın ER'lere bağlanması, 17 β -östradiolün <1-10'u kadardır; α -ZOL ise, daha kuvvetli bir bağlanma gösterirken, β -ZOL daha az bağlanma kapasitesine sahiptir (Kuiper-Goodman ve ark., 1987).

5 hafta boyunca, günde 20 mg/kg v.a. dozlarında ZEA ile oral olarak maruziyet yapılan 70 günlük erkek sıçanlarda, serum prolaktin değerlerinin arttığı fakat vücut ve testis ağırlıkları, serum LH ve folikül uyarıcı hormon (FSH) konsantrasyonları, Sertoli hücreleri, spermatogonya, erken ve geç primer spermatositler ve uzun ve yuvarlak spermatitlerin hacim fraksiyonları gibi diğer parametrelerin etkilenmediği bildirilmiştir (Milano ve ark., 1995). Yumurtalıkları alınmış Charles River CD sıçanlarında, 8 mg/kg v.a. ZEA'nın veya 0,8 ya da 8 mg/kg v.a. dozlarında ZOL'ün subkutan enjeksiyonunun LH salgılanmasını inhibe etmediği ve progesteronun indüklediği LH salgılanması için östrojenik tetiklemenin sağlanmadığı; bununla birlikte GnRH ile indüklenen LH salgılanmasını bloke ettiği bildirilmiştir (Hughes ve ark., 1991). Gebeliğin 15-20. günlerinde 20 ng 17 β -östradiol veya 2 μ g ZEA'nın (10 μ g/kg v.a.'yaa eşdeğer) hamile

farelere günlük enjeksiyonu meme bezlerindeki terminal uç tomurcuklarının yoğunluğunu arttırdığı, epitelyal farklılaşma ve yoğunluğu da indüklediği gösterilmiştir (Hilakivi-Clarke ve ark., 1998).

18 gün boyunca ZEA içeren diyetle (1,1; 2 veya 3,2 mg/kg) beslenen süten yeni kesilen domuz yavrularında testosteron, progesteron, östradiol, LH, FSH ve prolaktin için serum hormon seviyeleri incelendiği çalışmada (Chen ve ark., 2015); en yüksek maruziyet seviyesinde hayvanlarda LH serum seviyelerinin azaldığı, ancak 2 mg/kg ve üzeri ZEA içeren diyet ile beslenen grupta ise prolaktin serum seviyeleri arttığı bildirilmiştir. Diyet ile ZEA seviyeleri arttıkça, progesteron dışında test edilen tüm serum hormonları üzerinde doğrusal etkiler gözlenmiştir (Chen ve ark., 2015).

ZEA, α -ZOL ve β -ZOL'ün nükleer reseptörlere bağlanma ve steroidogenez üzerine endokrin bozucu etkilerinin incelendiği bir çalışmada, insan meme bezi hücre dizisinden raportör gen testi ('reporter gene assay', RGA) ile oluşturulan hücre dizileri ve H295R steroidogenez analizi kullanılmıştır (Frizzell ve ark., 2011). Progesteronun progestajen reseptörüne bağlanmasının ZEA, α -ZOL ve β -ZOL varlığında sinerjistik olarak arttığı gösterilmiştir. 10 μ M konsantrasyonda ZEA, α -ZOL ve β -ZOL; H295R steroidogenez analizinde progesteron, östradiol, testosteron ve kortizol hormonlarının üretimini arttırdığı bildirilmiştir. Bu sonuçlar, ZEA ve metabolitlerinin nükleer reseptör seviyesinde potansiyel endokrin bozucu kimyasallar (EDC) gibi rol oynadığını ve hormon üretimini de değiştirdiğini ortaya koymaktadır (Frizzell ve ark., 2011). Zhong ve ark. (2016), Zeranol'ün adipoz dokuda aromataz aktivasyonunu uyararak ve östrojen biyosentezini artırarak meme kanseri hücre büyümesini desteklediğini öne sürmüştür. 2-50 nM aralığındaki Zeranol'ün, insan primer meme preadipositlerinde aromataz aktivitesi, aromataz mRNA ekspresyonu ve östrojen üretimini önemli ölçüde artırabildiği bildirilmiştir (Zhong ve ark., 2016).

2.6.8. Metabolik Hastalıklar Üzerine Toksik Etkileri

ZEA'nın obezite, T2DM gibi metabolik hastalıklar üzerine toksik etkileri hakkında yapılmış çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bununla birlikte, ZEA ve indirgenmiş metabolitlerinden Zeranol'ün hayvancılıkta kilo alımını arttırdığı gösterilmiştir. Tek başına (Ralgro®) veya trenbolon asetat ile bağlantılı (Forplix®) Zeranol, sığır, koyun ve domuzlarda büyüme hızlandırıcı olarak kullanılmıştır (Hidy ve ark., 1977; Willemart ve Bouffault, 1983; Bories ve ark., 1992). Bu verilerden yola çıkılarak 1996'da Nogowski

tarafından yayınlanan bir çalışmada (Nogowski, 1996), dişi sıçanlarda ZEA takviye edilmiş besinlerle ZEA'nın karbonhidrat ve lipit metabolizması üzerine etkileri incelenmiştir. Endojen östrojen etkisinden kaçınmak amacıyla deney öncesi sıçanların yumurtalıkları alınmıştır. Sonuçlara göre ZEA'nın hayvanların günlük vücut ağırlığı artışını değiştirmedeği, rahim ağırlıklarının ise deney sonunda önemli derecede artış gösterdiği bildirilmiştir. 14 gün boyunca, 200 µg ZEA ile beslenen sıçanlarda kandaki insülin seviyeleri önemli derecede artış gösterirken, glukagon seviyelerinde hafif azalma görülmüştür. Hem karaciğer hem de kas glukojen içeriğinin maruziyet sonrası arttığı bildirilmiştir. ZEA ile kan serum ve doku kolesterol konsantrasyonlarının değişmediği ancak serum ve karaciğer trigliserit konsantrasyonlarının ise önemli derecede arttığı rapor edilmiştir. ZEA'nın uygulama yollarının farklı olmasının elde edilecek sonuçları etkileyebileceği de belirtilmiş olup, ZEA'nın karbonhidrat ve lipit metabolizması üzerinde etkili olabileceği öne sürülmüştür (Nogowski, 1996).

Düşük ZEA dozlarına maruziyetin hematolojik ve biyokimyasal değişiklikler üzerine etkilerini inceleyen bir çalışmada; domuz yavrularına 42 gün boyunca 40 µg/kg v.a./gün veya plasebo dozlarında ZEA uygulanmıştır (Gajęcka ve ark., 2016). Deney gruplarında, glukoz, ALT, total protein ve demir gibi seçilmiş biyokimyasal kan veya hematolojik parametrelerde hafif fakat istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler gözlenmiştir. Maruziyet grubunda elde edilen vücut ağırlığı artışı değerleri, süreç boyunca kontrol grubuna göre daha yüksek olmuştur. Araştırmacılar tarafından gözlenen değişikliklere, glukoz konsantrasyonlarında azalma ve daha yüksek total protein seviyeleri eşlik etmiş, bunun da vücut ağırlığı artış oranını etkilemiş olabileceği öne sürülmüştür (Gajęcka ve ark., 2016).

2.7. ZEA ile İlgili Yasal Düzenlemeler

F-2 toksini olarak da bilinen ZEA, pekçok *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 Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü'nün Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Uzman Komitesi ('Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives', JECFA) ZEA için geçici maksimum TDI ('Provisional Maximum Tolerable Daily Intake', PMTDI) 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 atıştırmalıklar 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 2-6’da ZEA için maksimum bulaşan miktarları verilmiştir.

Tablo 2-6: 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.

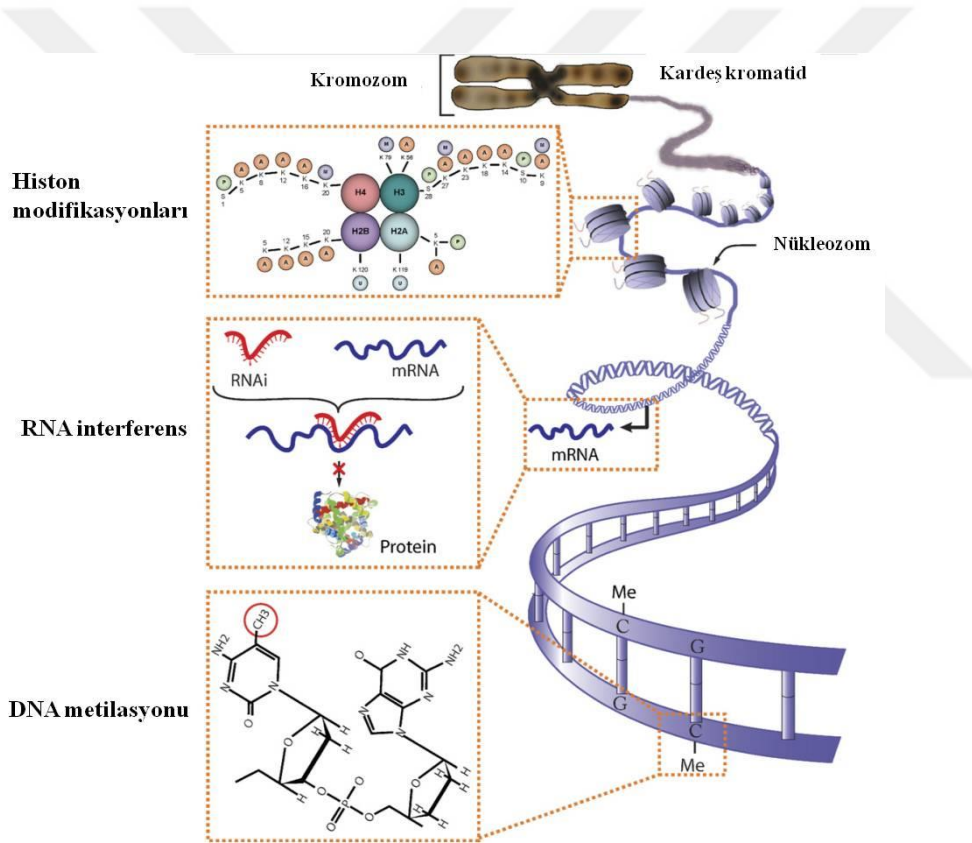
⁽¹⁹⁾ Maksimum limit; tahıl ve tahıl ürünleri kapsamında değerlendirilmediğinden 2.4 ve 2.5 kapsamına girecek olan pirinç ve pirinç ürünlerine uygulanmaz.

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

2.8. Epigenetik

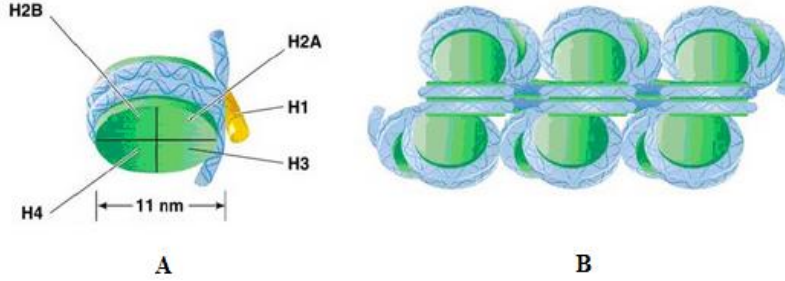
DNA dizisindeki değişikliklerden kaynaklanmayan, mitoz ve/veya mayoz bölünme ile kalıtsal olarak aktarılan gen ifadesi değişikliklerini inceleyen bilim dalı 'Epigenetik' olarak adlandırılmaktadır. Epigenetik modifikasyonlar; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, mikroRNA'ların (miRNA) regülasyonu olmak üzere başlıca üç temel mekanizma ile açıklanmaktadır (Şekil 2-3) (Sawan ve ark., 2008). Bu mekanizmaların herhangi birindeki hata, genlerin ifadesinin aşırı artmasına veya baskılanmasına sebep olarak epigenetik hasarlara neden olmaktadır. Gen ifadesinde oluşan değişiklikler, DNA'nın farklı kromatin yapılarına paketlenmesiyle ortaya çıkmaktadır.



Şekil 2-3: Epigenetik modifikasyonlar (Sawan ve ark., 2008).

Ökaryotik hücrelerde DNA, histon proteinlerine bağlanır ve oluşan bu yapıya kromatin denir. Kromatin, hücre çekirdeğinde DNA, histon ve histon olmayan proteinlerden oluşan bir kompleks yapıdır (Tsankova ve ark., 2007). Kromatinin temel yapısal birimi olan nükleozom H2A, H2B, H3 ve H4 histon proteinlerinden ikişer tane içeren bir histon oktomerinin etrafına sarılmış 146 baz çiftlik DNA molekülünden

oluşmaktadır (Conley ve ark., 2006). Bu protein yapılar birbirlerine H1 histonlarıyla bağlanırlar (Şekil 2-4).



Şekil 2-4: A. Nükleozom yapısı; B. Kromatin yapısı.

Epigenetik mekanizmalar, DNA ve histonlar arasındaki ilişkiyi düzenleyerek genin transkripsiyonel olarak aktif veya inaktif olmalarını sağlarlar. Bu mekanizmaların herhangi birinde oluşan modifikasyon, genlerin ifadesinin aşırı artmasına veya baskılanmasına sebep olarak epigenetik hasarlara neden olmaktadır. Değişimler, nesilden nesile DNA'daki diziyle değil, mitoz veya mayoz bölünme yoluyla aktarılır. Kromatin yapısında meydana gelen başlıca epigenetik modifikasyonlar; DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarıdır. DNA metilasyonu, genomun geri dönüşebilir doğal bir modifikasyon mekanizması olup, CpG dinükleotidinde bulunan, guanozin (G) tarafından takip edilen sitozin (C) bazının 5. konumundaki karbonuna bir metil grubu (-CH₃) bağlanması ile gerçekleşir ve sonuçta 5-metilsitozin (5-mC) oluşur (Herman ve Baylin, 2003). Bu DNA metilasyon süreci, DNMT'ler tarafından kontrol edilir. DNMT3A ve DNMT3B *de novo* metilasyon için gereklidir, oysa DNMT1 hücre bölünmesi sırasında metilasyon kalıplarının sürdürülmesini sağlar. Genom genelinde dağınık halde bulunan CpG dinükleotidlerinin %70'i metillenmiş durumdadır. CpG adaları ise özellikle dokularda devamlı ifade edilen bazı genlerin promotör bölgeleri ve ilk ekzonlarında ve metillenmemiş halde bulunurlar (Jones ve Takai, 2001). Genlerin promotör bölgelerindeki CpG adacıklarında görülen DNA metilasyonu, kromatin yapısının organizasyonunda ve gen ifadesinin kontrolünde önemli rol oynamaktadır. Transkripsiyon faktörlerinin ve diğer koaktivatörlerin promotöre bağlanabildiği aktif kromatin yapısı, metillenmemiş CpG dinükleotidleri içerir. Buna karşın, transkripsiyon faktörlerinin promotöre bağlanamadığı inaktif kromatin yapısı metillenmiş CpG dinükleotidleri içerir (Esteller, 2007). Bir genin metillenme derecesi ile ifade edilme

derecesi arasında ters bir ilişki vardır. Hücre farklılaşmasıyla beraber farklı dokularda farklı genlerin ifade edilmesinin temelinde bu düzenleme yatmaktadır. Histon modifikasyonları ise, enzimler yardımıyla histon proteinlerine başka moleküllerin eklenmesi veya çıkarılmasıyla oluşur. Böylece, histon proteinlerinin -amino ucunda asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubiquitinizasyon, ADP ribozilasyon ve sumozilasyon gibi çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar gerçekleşir (Tsankova ve ark., 2007).

2.9. Metabolik Fonksiyon Bozuklukları

T2DM, insülin direnci, obezite, NAFLD, steatoz vb, çeşitli nedenlerle metabolik fonksiyon bozuklukları sonucu ortaya çıkan metabolik hastalıklardır. Obezite başta olmak üzere bir kısmı, genetik, davranışsal ve çevresel faktörler arasındaki etkileşimin neden olduğu karmaşık bir hormonal hastalıktır (Stanley ve ark., 2005). Ayrıca, ROS üretimi ve inaktivasyonu arasında bir dengesizliğin ortaya çıktığı normal metabolik süreçlerin bozulması durumu olan metabolik hastalıklar, oksidatif hasar ile de karakterizedir. Günümüzde pek çok EDC'nin karbonhidrat-lipit metabolizmasında değişikliklere neden olarak metabolik fonksiyon bozukluklarına neden olduğu bilinmektedir (Ropero ve ark., 2008; Sargis ve ark., 2010).

Ksenobiyotik metabolizmasında başlıca hedef organlardan biri karaciğerdir. Bununla birlikte karaciğer, karbonhidrat, lipit, protein ve eser element metabolizmasında önemli bir rol oynayan, temel bir metabolik organdır ve metabolik işlevi insülin ve diğer metabolik hormonlar tarafından kontrol edilmektedir. Bu sebeple tez çalışmada, HepG2 hücre dizisi kullanılmış ve bir endokrin bozucu olan ZEA'nın karbonhidrat ve lipit metabolizmasında rol oynayan genler üzerine etkileri incelenerek metabolik yollardaki değişiklikler araştırılmıştır.

2.9.1. Karbonhidrat ve Lipit Metabolizmasında Rol Oynayan Genler

ZEA ve metaboliti α -ZOL'ün metabolik hastalıklar üzerine etkilerini incelemek amacıyla, nükleer reseptör genleri, ER sinyal yolağı ile de ilişkili olabilen metabolik yollarda rol oynayan genler ve oksidatif hasar ile ilişkili genler seçilmiştir. Bu genlerin maruziyet sonrası mRNA seviyelerindeki ve *PPAR* γ için gen spesifik metilasyon seviyesindeki değişiklikler analiz edilmiştir.

PXR (Pregnan X reseptörü, 'Pregnane X Receptor'): Endobiyotik ve ksenobiyotik klirensi ile ilişkili genlerin uyumlu ekspresyonunu düzenleyen bir nükleer reseptördür. Lipit, glukoz ve enerji metabolizmasında da önemli görevleri vardır, çeşitli PXR ligandlarının, hastalarda plazma lipit seviyelerini değiştirebildiği, PXR'nin transkripsiyon faktörleriyle etkileşimi sonucu glukoneogenezi azaltarak enerji metabolizmasını düşürebildiği, ayrıca *PXR* gen varyantlarının NAFLD'de hastalığın şiddetiyle ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Sookoian ve ark., 2010).

AhR (Aryl hidrokarbon reseptörü, 'Aryl Hydrocarbon Receptor'): Ksenobiyotik metabolizmasında rol oynayan, önemli bir nükleer reseptördür. İmmunotoksosite ve normal vasküler gelişim için önemlidir. Ayrıca, bu reseptörün aktivasyonu ile hepatosit CD36 ekspresyonunun, yağ asidi alımının ve steatozun arttığı bildirilmiştir (Lee ve ark., 2010).

ERα (Östrojen reseptör alfa, 'Estrogen Receptor Alpha'): Cinsiyet hormonlarıyla aktive edilen, nükleer reseptör ER'lerin 2 temel alt sınıfından biridir. ERα, çeşitli organ sistemlerinin fizyolojik gelişiminde ve işlevinde üreme, merkezi sinir sistemi, iskelet ve kardiyovasküler sistemler de dahil olmak üzere değişen derecelerde rol oynar. Pek çok biyolojik fonksiyonuna ek olarak, 17β-östradiol gibi endojen östrojenlerin reseptörü aktive etmesiyle, vücut ağırlığı regülasyonu ve metabolik fonksiyonlarda da önemli roller üstlendiği bilinmektedir (Chen ve ark., 2009).

ERβ (Östrojen reseptör beta, 'Estrogen Receptor Beta'): Cinsiyet hormonlarıyla aktive edilen nükleer reseptörlerin (ER) iki temel alt sınıfından biridir. ERβ, antiproliferatif etkilere sahip olabilir ve bu nedenle üreme dokusunda ERα'nın hareketlerini engelleyebilir (Weihua ve ark., 2000). Vücut ağırlığı regülasyonunda ERα kadar net olmasa da adipoz dokuda fonksiyonları olduğu gösterilmiştir (Naaz ve ark., 2002).

LXRα (Karaciğer X reseptörü alfa, 'Liver X Receptor Alpha'): Makrofaj fonksiyonu için anahtar regülatördür, lipit homeostazı ve inflamasyonu da kapsayan süreçlerde transkripsiyonel olayları kontrol eder. Tiroid hormonları aktivasyonu için de oldukça önemlidir. İndüklenebilen *LXRα* karaciğerde, adrenal bezlerde, bağırsakta, adipoz dokuda, makrofajlarda, akciğerde ve böbrekte yüksek oranda eksprese edilir (Korf ve ark., 2009).

PPAR α (*Peroksizom çoğaltıcı aktifleştirici reseptör alfa*, '*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha*'): Nükleer reseptör PPAR'ların alt sınıfıdır, bir transkripsiyon faktörü ve karaciğerde lipit metabolizmasının ana regülatörüdür. PPAR α 'nın aktivasyonu, peroksizomal ve mitokondriyal yağ asidi β -oksidasyonu, yağ asidi taşınması, yağ asidi bağlanması ve aktivasyon süreçlerine dahil olan genlerin ekspresyonunu arttırarak yağ asitlerinin alınmasını, kullanılmasını ve katabolizmasını arttırır (Kersten ve ark., 1999).

PPAR γ (*Peroksizom çoğaltıcı aktifleştirici reseptör gama*, '*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*'): Nükleer reseptör PPAR'ların başka bir alt sınıfıdır, yağ asidi depolamasını ve glukoz metabolizmasını düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. PPAR γ tarafından aktive edilen genler, yağ hücrelerinde lipit alımını ve adipogenezi uyarır (Jones ve ark., 2005).

Pgc-1 α (*Peroksizom çoğaltıcı aktifleştirici reseptör gama koaktivatör 1-alfa*, '*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha*'): Hücrersel enerji metabolizmasının regülasyonunda merkezi rol oynayan transkripsiyon koaktivatör ailesinin bir üyesidir. Mitokondriyal biyogenezi uyarır ve hem karbonhidrat hem de lipit metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynar. Obezite, T2DM ve kardiyomiyopati gibi hastalıklarla yakından ilişkili olması ve lipit metabolizmasındaki düzenleyici işlevi, tedavide farmakolojik hedef haline gelmiştir (Liang ve Ward, 2006).

L-fabp (*Karaciğer-tipi yağ asit bağlama proteini*, '*Liver-type Fatty Acid-Binding Protein*'): Esas olarak, uzun zincirli yağ asitlerinin, endokannabinoidlerin, fitokannabinoidlerin ve diğer hidrofobik moleküllerin bağlanması, taşınması ve metabolizma süreçlerini kapsar ve karaciğerde eksprese edilir (Smathers ve Petersen, 2011).

LDLR (*Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü*, '*Low Density Lipoprotein Receptor*'): Kolesterol açısından zengin LDL'nin endositozuna aracılık eder, plazma LDL seviyesini düzenler (Leren, 2014).

SREBP-1c (*Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 1*, '*Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1*'): SREBP1 izoformlarından biridir. SREBP-1c, glukoz metabolizması, yağ asidi ve lipit üretimi için gerekli genleri düzenler ve ekspresyonu insülin ile düzenlenir. İnsülin ile uyarılan SREBP-1c, glikokinaz enziminin aktivasyonu

ile glikolizi arttırır ve lipogenezini (karbonhidratların yağ asitlerine dönüşümü) uyarır (Ferré ve Foufelle, 2010).

GAPDH (Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz, ‘Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase’): Glikolizin 6. aşamasını (gliseraldehid 3-fosfatın, D-gliserat 1,3-bisfosfata dönüşümünü) katalizleyen bir enzimdir, enerji ihtiyacını karşılamak için glukozun parçalanmasında görev alır (Sirover, 2011).

Glut2 (Glukoz taşıyıcı protein 2, ‘Glucose Transporter 2’): Esas olarak karaciğer ve pankreatik β hücrelerinde bulunan *Glut2*, hücre membranları boyunca glukoz taşınmasını kolaylaştırır, karaciğer ve kan arasında glukoz transferi için ana taşıyıcıdır ve renal glukoz geri emiliminde rol oynar (Gould ve ark., 1991). T2DM’de önemli rol oyandığı düşünülmektedir.

IGF-1 (İnsülin benzeri büyüme faktörü 1, ‘Insulin-like Growth Factor 1’): IGF-1, insüline moleküler yapıda benzer bir hormondur. Çocukluk döneminde önemli bir rol oynar ve yetişkinlerde anabolik etkilere sahip olmaya devam eder. IGF-1, büyüme hormonunun etkilerinin birincil aracıdır. IGF-1, sistemik vücut büyümesini uyarır ve vücudun hemen hemen her hücresinde, özellikle iskelet kası, kıkırdak, kemik, karaciğer, böbrek, sinir, deri, hematopoetik ve akciğer hücrelerinde büyümeyi teşvik edici etkiye sahiptir (Yakar ve ark., 2002).

Akt1 (RAC-alfa serin/treonin protein kinaz, ‘RAC-alpha Serine/Threonine-Protein Kinase’): Akt sinyal yolağı metabolizma için önemli bir regülatördür. İnsülinin, insülin reseptörüne bağlanmasından sonra Akt aktive edilir, glukoz üretiminin tetiklenmesini hafifletir (Brunett ve ark., 1999). Akt, hepatik lipit metabolizmasında rol oynayan genlerle etkileşim halindedir (Tsuchida ve ark., 2004).

HK2 (Heksokinaz 2, ‘Hexokinase 2’): Heksokinazlar, çoğu glukoz metabolizması yollarının ilk adımı olan, glukoz-6-fosfat üretmek üzere glukozun fosforilasyonundan sorumludur. Mitokondri dışı membranında yer alır. Genin ekspresyonu insüline duyarlıdır ve sıçandaki çalışmalar, hızla büyüyen kanser hücrelerinde görülen glikoliz oranının arttığını göstermiştir. Hücresel ortamdaki değişikliklere karşı metabolik cevaplarda adaptif rol üstlenir (Wyatt ve ark., 2010).

HO-1 (Hem oksijenaz 1, ‘Heme Oxygenase 1’): HO, Hem degradasyonunu kataliz eden enzimdir. HO-1 ise, dalak, karaciğer ve böbreklerde en yüksek

konsantrasyonlara sahip stres ile indüklenen bir izoformdur. HO ekspresyonu oksidatif hasar ile indüklenir ve bu ifadeyi arttıran hayvan modellerinde koruyucu görünmektedir. Heme oksijenaz reaksiyonlarından salınan karbon monoksit vasküler tonu bağımsız olarak etkileyebilir veya nitrik oksit sentazın işlevini etkileyebilir (Elbirt ve Bonkovsky, 1999).

α -GST (Alfa glutasyon S-transferaz, 'Alpha Glutathione S-Transferase'):

Daha önce ligandinler olarak bilinen GST'ler, detoksifikasyon amacıyla ksenobiyotik substratlara GSH konjugasyonunu katalize etme yetenekleri ile bilinen ökaryotik ve prokaryotik faz II metabolik izozimlerin bir ailesini içerir. α -GST, karaciğer ve böbrekte en bol bulunan GST formudur (Knapen ve ark., 1999).

Hsp70 (Isı şoku protein 70, 'Heat Shock Protein 70'):

Hsp70 proteinleri, hücreleri termal veya oksidatif hasara karşı koruyucu rolleri vardır. Bu hasarlar normal olarak proteinlere zarar vermekte, kısmi açılma ve muhtemel agregasyona neden olmaktadır. Hsp70, hasarla açığa çıkan hidrofobik kalıntılara geçici olarak bağlanarak kısmen denatüre olmuş proteinlerin toplanmasını engeller ve yeniden katlanmalarına olanak sağlar (Ritossa, 1996).

Nrf2 (Nükleer faktör (eritroid türevi 2) benzeri 2, 'Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-like 2'):

Nrf2, hasar ve inflamasyon ile tetiklenen oksidatif hasara karşı koruma sağlayan antioksidan proteinlerin ekspresyonunu düzenleyen temel bir lösin fermuar (bZIP) proteindir (Moi ve ark., 1994). Nrf2 ile ilgili hücre içi sinyal yolağını uyaran çeşitli ilaçlar, oksidatif hasarın neden olduğu hastalıkların tedavisi için incelenmektedir.

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
α -zearalenol (%99)	Sigma-Aldrich Z0166
Absolu alkol	Sigma-Aldrich 32221
Adhezif kaplama kağıtları	Thermo Scientific™ AB-0558
Amonyum persülfat (>%98) (APS)	Sigma-Aldrich A3678
Anti-asetil histon H3K9 antikoru	Milipore 07-352
Anti-beta aktin antikoru	Santa Cruz Biotechnology SC-47778
Anti-heat shock protein 70 (HSP70) antikoru	Abcam ab45133
Anti-histon 3 (H3) antikoru	Abcam ab61251
Anti-mouse IgG, HRP-bağlı antikor	Santa Cruz Biotechnology SC-2005
Anti-peroksizom çoğaltıcı aktifleştirilmiş reseptör gama (PPAR γ) antikoru	Thermo Scientific™ MA5-14889
Anti-rabbit IgG, HRP-bağlı antikor	Santa Cruz Biotechnology SC-2357
Anti-trimetil histon H3K27 antikoru	Milipore 07-449
Anti-trimetil histon H3K9 antikoru	Milipore 07-442
Ayırma jeli (Resolving) tamponu, 1,5 M Tris HCl tamponu, pH 8,8	Bio-Rad 161-0798
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
Dubelco'nun modifiye edilmiş eagle besiyeri/F12 besiyeri (DMEM/F12)	Wisent-Multicell 319010CL
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
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 Epitect 59695
Pirosekanslama 'annealing' tamponu	Qiagen PyroMark 979009
Pirosekanslama bağlama tamponu	Qiagen PyroMark 979006
Pirosekanslama denatürasyon solüsyonu	Qiagen PyroMark 979007
Pirosekanslama PCR kiti	Qiagen PyroMark 978703
Pirosekanslama primerleri	Macrogen
Pirosekanslama reaksiyonu karışım kiti (enzim ve substrat karışımı, nükleotitler (A, C, G, T))	Qiagen PyroMark 972807
Pirosekanslama yıkama tamponu	Qiagen PyroMark 979008
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
Sığır serum albumini (BSA)	Applichem A7906
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich L5750

Sodyum klorür (NaCl)	J. T. Baker 0278
Streptavidin sefaroz	GE Healthcare 17511301
Tetrametiletilediamin (TEMED)	Biomatik A4008
Total histon ekstraksiyon kiti	Epigentek OP-0006
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
Blok ısıtıcı (96 kuyucuklu mikrolaka)	EuroClone Dry Bath EMK20
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik 5231 NFY
CO ₂ 'li inkübatör	Thermo-Scientific Heracell 150i
Çalkalamalı blok ısıtıcı (2 mL tüp)	Biosan TS-100C
Çalkalamalı blok ısıtıcı (96 kuyucuklu mikrolaka)	EuroClone T-Shaker EMS100
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
Pirosekanslama cihazı	Qiagen PyroMark Q96 ID (53047) 9001525
Pirosekanslama vakumlu çalışma standı	Qiagen PyroMark Q96 Vacuum Workstation 9001525
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
Pirosekanslama kartuşu	Qiagen PyroMark Q96 Cartridge 979004
Pirosekanslama 96 kuyucuklu PCR mikroplakası	Thermo Scientific™ AB0600L
Pirosekanslama 96 kuyucuklu piro mikroplakası	Qiagen PyroMark 978754
Pirosekanslama PCR mikroplakası kaplama jelatini	Thermo Scientific™ AB-0558
Polivinilidin florür (PVDF) transfer membranı, 0,2 µm	Bio-Rad 1620177
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 hepatoselüler karsinoma hücreleri (HepG2) 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

Tripsin/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.

HepG2 hücresi için besiyeri: DMEM/F12 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. çözülmeye 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 süspand edildi ve 1500 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, hücre pelleti besiyerinde tekrar süspand edildi ve DMSO'nun toksik etkisinden kurtulmak amacıyla işlem tekrar edildi. Daha sonra, hücre pelletine 1 mL besiyeri eklendi, yavaşca pipetleme yapılarak hücreler süspand 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 10^5 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 Dondurulması ve Saklanması

Hücre kültüründe meydana gelebilecek risklere karşı hücreler belli aralıklar ile dondurularak saklandı. Bölüm 3.4.5'te elde edilen hücre pelletinin üzerine 1 mL hücre dondurma çözeltisi eklendi ve pastör pipeti ile pipetleme yapılarak karıştırıldı. Yaklaşık 10^6 hücre/mL olacak şekilde hazırlanan hücre stokları soğuğa dayanıklı kriyo viallere aktarıldı, sırasıyla -20 °C'de 30 dk., -80 °C'de 16-24 saat bekletildikten sonra sıvı azot tankına kaldırılarak saklandı.

3.4.7. 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 ve α -ZOL 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 μ L alınarak DMSO ile 100 μ L'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.

100 mM α -ZOL çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 32,038 mg α -ZOL 1 mL DMSO'da çözülerek ana stok çözeltisi hazırlandı.

50 mM α -ZOL çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 100 mM α -ZOL çözeltisinden 50 μ L alınarak DMSO ile 100 μ L'ye tamamlandı.

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

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

3.6. Sitotoksikite Testleri

ZEA ve α -ZOL'e maruz bırakılan hücrelerin canlılığının tespiti MTT ve nötral kırmızı (NRU) testi uygulanarak gerçekleştirildi.

3.6.1. 96 Kuyucuklu Mikroplakalarda Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

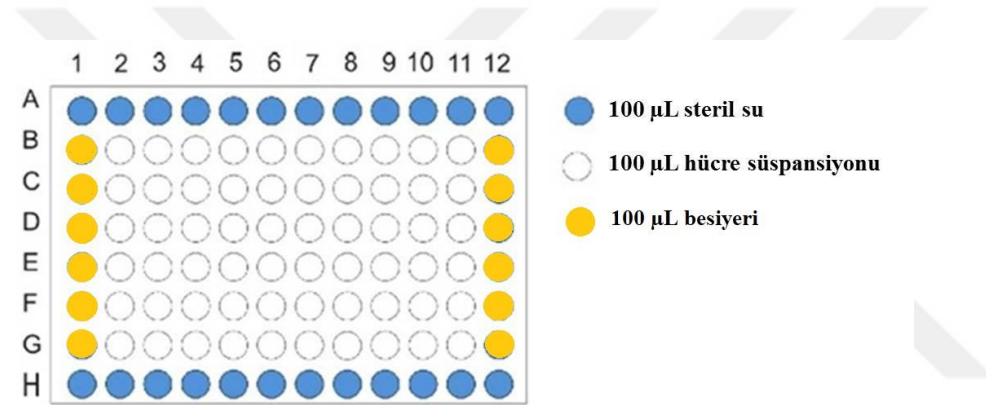
Hücre kültürlerinin mikroplakalara uygulanması esnasında kuyucuklarda düzensiz hücre yoğunluğu gerçekleşebilir. Hücre süspansiyonunun homojen olduğundan emin olunmalı ve hücre topaklarının oluşumu engellenmelidir. Aynı zamanda, testin uygun hassasiyette olması için test esnasında hücrelerin yakın bitişiklikte 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 içerisinde steril bidistile su konuldu ve inkübasyon sırasında kültür besiyerinin buharlaşmasını azaltmak amacıyla 96 kuyucuklu mikroplakanın A ve

H sıralarındaki her bir kuyucuğa 100 µL su dağıtıldı. 96 kuyucuklu mikropolanın 1 ve 12. sütununun B-G sıralarındaki her bir kuyucuğuna ise 100 µL besiyeri dağıtıldı (Şekil 3-1).

2. Her bir kuyucukta 1×10^4 hücre 100 µL besiyeri içinde olacak şekilde 96 kuyucuklu mikropolanın 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 mikropolalara Şekil 3-1’de gösterildiği şekilde 100 µL hücre süspansiyonu dağıtıldı.

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



Şekil 3-1: 96 kuyucuklu mikropolaya hücre ekimi.

3.6.2. Test Maddesinin, Negatif ve Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması

Sitotoksosite testleri için ZEA ve α-ZOL stok çözeltisinin hazırlanışı: 100 mM konsantrasyonda olacak şekilde cam vial içinde 31,836 mg ZEA ve 32,038 mg α-ZOL 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.

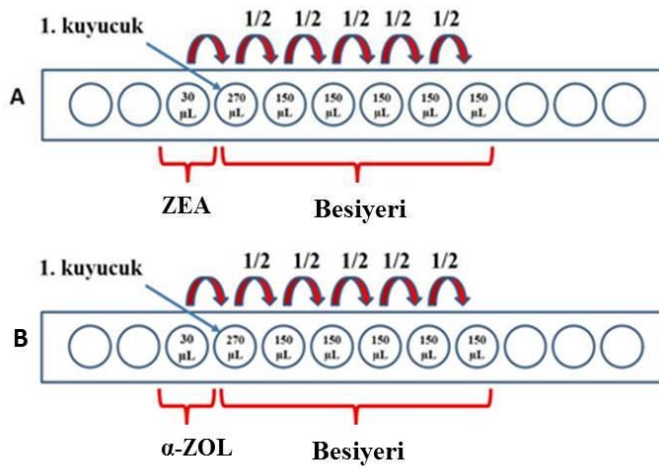
ZEA ve α -ZOL'ün çözündürüldüğü DMSO'nun hücrelere maruziyet sırasında konsantrasyonunun %1'i geçmemesi gerektiğinden dolayı 100 katı konsantrasyonda stok çözeltisi halinde DMSO içerisinde hazırlandı. Daha sonra ZEA ve α -ZOL çözeltisinin farklı konsantrasyonları besiyerinde seyreltilerek aşağıda belirtildiği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

ZEA ve α -ZOL 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 ve α -ZOL'ün 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 ve α -ZOL seyreltmeleri hazırlanmış oldu.



Şekil 3-2: ZEA ve α -ZOL'ün 1/2 oranında seyreltilmesi.

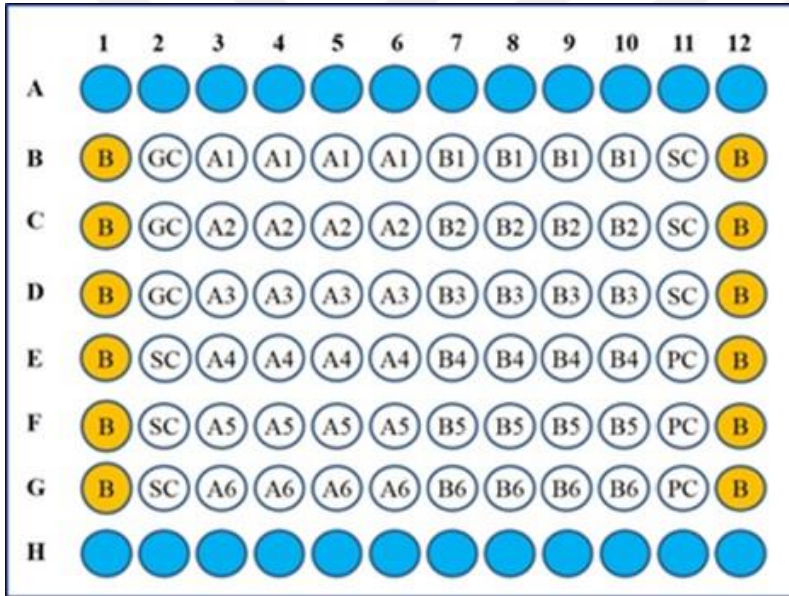
3.6.3. ZEA ve α -ZOL'un Hücre Kültürüne Maruziyeti

1. Bölüm 3.6.1'de belirtilen 24 saatlik inkübasyonun sonunda hücre kültürü mikropkaskındaki 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 mikropkaskası Şekil 3-3'te gösterildiği şekilde düzenlendi:



Şekil 3-3: 96 kuyucuklu maruziyet mikropkaska 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
 B1, B2,, B6: Kültür besiyeri + hücre + α -ZOL'un 6 farklı konsantrasyonu

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

6. B2, C2 ve D2 kuyucuklarına 10 μ L 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, B1-B6 şeklinde yazılmış kuyucuklara seyreltmeleri yapılmış α-ZOL standart çözeltilerinden 10'ar µL tatbik edildi (6 konsantrasyon, her konsantrasyon için 3 tekrar yapıldı). Her test 1 mikropalakada 24 saatlik maruziyet için hazırlandı. Aynı düzende 2. farklı bir günde çalışılmak üzere toplam her konsantrasyon için 6 tekrar yapıldı.

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

MTT testi ve NRU testleri için, ZEA ve α-ZOL 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 ve α -ZOL ile inkübe edilen hücre kültürünü içeren 96 kuyucuklu mikrolakanın her kuyucuğuna 20 μ L 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 μ L %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) mikrolaka 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 membranına 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 çözüldü. Çözelti steril 0,22 μ m naylon enjektör ucu filtreden geçirildi. 1,5 mL'lik tüplere bölünerek -20 °C'de saklandı. Boya kristallerinin iyi çözündürülmesi 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 çözündürülmesi sağlanmalıdır).

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

Deney protokolü

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

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

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

4. Her kuyucuğa 150 µL 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) mikropalaka 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 mikropalkanın 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 mikropkaskasına SDS çöztisi (son konsantrasyonu 0,1 mg/mL olacak şekilde) eklenerek pozitif kontrol grubu (PC) oluşturuldu. Çalışılan koşullarda, SDS çöztisine (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.

7. % Relatif inhibisyon (% hücre ölümü) değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Formül 3-2):

$$\% \text{ Relatif inhibisyon} = 100 - (\text{düzeltilmiş ort. OD}_{\text{Örnek}} \times 100 / \text{düzeltilmiş ort. OD}_{\text{SC}})$$

(Formül 3-2)

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

9. 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 probalar 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) mikropkaka okuyuculu spektrofotometrede ölçülerek değerlendirilmiştir.

Kit içeriği

BrdU etiketleme reaktifi (1 mL; 1000x) (Vial 1): 10 mM 5-bromo-2'-deoksi üridin 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 reaktifi çözeltisi: BrdU etiketleme reaktifi (Vial 1) 1: 100 kültür ortamı ile seyreltildi (konsantrasyon: 100 µM 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 mikropkaya için 100 µL 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 mikropkaya 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 ve α-ZOL için hazırlanan ana stok çözeltileri, son maruziyet konsantrasyonları 1, 10, 50 µM olacak şekilde mikropkaya uygulandı.

3.7.2. BrdU Testi Protokolü

1. Proliferasyon testi için çoğaltılan hücreler 96 kuyucuklu mikropkaya her bir kuyucukta 1×10^4 hücre/100 µL besiyeri olacak şekilde ekilerek 24 saat inkübasyona

bırakıldı. Hücrelere son hacim 100 µL olacak şekilde 1, 10, 50 µM konsantrasyonlarda ZEA ve α-ZOL maruziyeti yapılarak tekrar 24 saat inkübe edildi. 'Background' kontrol ve blank için de mikrolakada yer ayrıldı.

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

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

4. Her bir kuyucuğa 200 µL 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. Mikrolakadan 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) mikrolaka 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 esterazlarıyla 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 ve α -ZOL için hazırlanan ana stok çözeltileri, son maruziyet konsantrasyonları 1, 10, 50 μ M 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 CO₂'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 μ M olacak şekilde ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapıldı ve 24 saat inkübe edildi.

3. 'Unstained' kontrol hücrelerin kuyucuklarına boya eklenmemiş olup, 10 μ L PBS (1x) ve 990 μ L 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 μ L DCFH₂-DA (20 mM) ilave edilerek 37 C°'de %5 CO₂'li inkübatörde 30 dk. inkübe edildi.

7. Boyanın uzaklaştırılması için hücreler 1200 rpm'de 3 dk. santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı, 200 μ L 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 eksenini, hücrenin boyutu ile ilişkili olan ileri dağılım ('Forward scatter', FSC) parametresini temsil eder. Y eksenini 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 kapılma yapılır. 1. Kapı (P1, HEPG2), analiz edilecek hücrelerin ana popülasyonunu gösterir. Flow sitometrisinde hücrelerin floresans yoğunluğu ölçülmüş, her tüpe 10.000 hücre değerlendirilmiştir. DCF floresanı gösteren hücreler belirlenerek kapılma 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 ve α-ZOL'ün Hücre Dizilerine Maruziyeti

Her bir 25cm²'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 ve α-ZOL maruziyetleri 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.

1 μ M α -ZOL maruziyeti: 5 μ L 1 mM α -ZOL çözeltisi, içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

10 μ M α -ZOL maruziyeti: 5 μ L 10 mM α -ZOL çözeltisi, içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

50 μ M α -ZOL maruziyeti: 5 μ L 50 mM α -ZOL çözeltisi, içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

Bu şekilde ZEA ve α -ZOL 1, 10, 50 μ M konsantrasyonlarda olacak şekilde HepG2 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 ve α -ZOL'e 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 süspende edildi ve DNA, RNA, histon ve proteinlerin izolasyonunu yapabilmek amacıyla yaklaşık 1×10⁶ sayıda hücre 200 μ L 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 μ L 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.

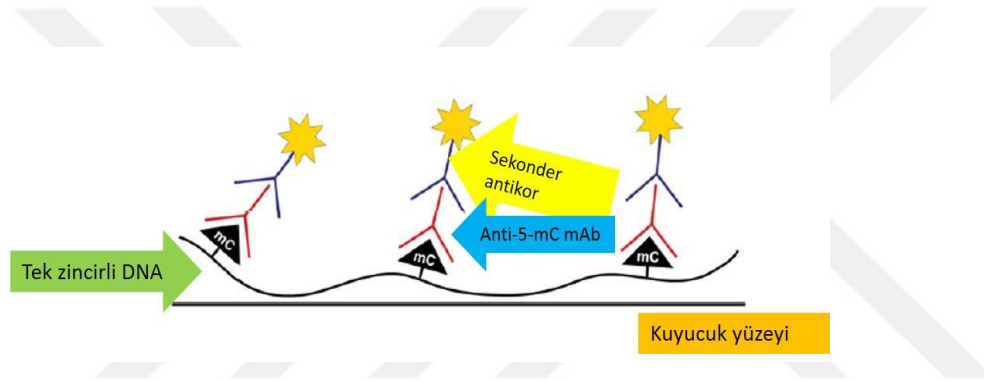
3.10.2. DNA'nın Saflık ve Miktar Tayini

1, 10, 50 μ M konsantrasyonlarda ZEA ve α -ZOL maruziyeti sonrasında HepG2 hücrelerinden izole edilen DNA'ların miktarı ve saflığı 'Take-3 Plate' kullanılarak mikropilaya okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü. 260 nm'de ölçülen absorbans değerleri oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin ng ya da μ g 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 A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} 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 antikoru kullanılarak saptanır ve daha sonra mikropılaka 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 atırıldı.

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/ μ L)	1X TE	Sonuç ME4 Konsantrasyonu
1	1,0 μ L	19,0 μ L	0,5 ng/ μ L
2	1,0 μ L	9,0 μ L	1,0 ng/ μ L
3	1,0 μ L	4,0 μ L	2,0 ng/ μ L
4	2,5 μ L	2,5 μ L	5,0 ng/ μ L
5	4,0 μ L	0,0 μ L	10,0 ng/ μ L

DNA bağlama

3. Kullanılacak sayıda kuyucuk plaka çerçevesinden dikkatli bir şekilde çıkarıldı.
4. Her kuyucuğa 80 μ L ME2 bağlama çözeltisi eklendi.
5. 1 μ L ME3, 1 μ L 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 μ L dilüe ME1 ile yıkandı.

Metillenmiş DNA'yı yakalama

7. ME5, (1: 1000) oranında dilüe ME1 ile seyreltildi.
8. Her kuyucuğa 50 μ L dilüe ME5 eklendi ve oda sıcaklığında 60 dk. inkübe edildi.
9. Dilüe ME5 kuyucuklardan döküldü ve her kuyucuk 150 μ L dilüe ME1 ile 3 kez yıkandı.
10. ME6, (1: 2000) oranında dilüe ME1 ile seyreltildi.
11. Her kuyucuğa 50 μ L dilüe ME6 eklendi ve oda sıcaklığında 30 dk. inkübe edildi.
12. Dilüe ME6 kuyucuklardan döküldü ve her kuyucuk 150 μ L dilüe ME1 ile 4 kez yıkandı.
13. ME7, (1: 5000) oranında dilüe ME1 ile seyreltildi.
14. Her kuyucuğa 50 μ L 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 kuyularında ve kontrol kuyularında renk değişimi izlendi. Yeterli miktarda metile DNA bulunduğu 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 mikroplaka okuyucu spektrometrede ölçüldü.

3.10.3.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

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

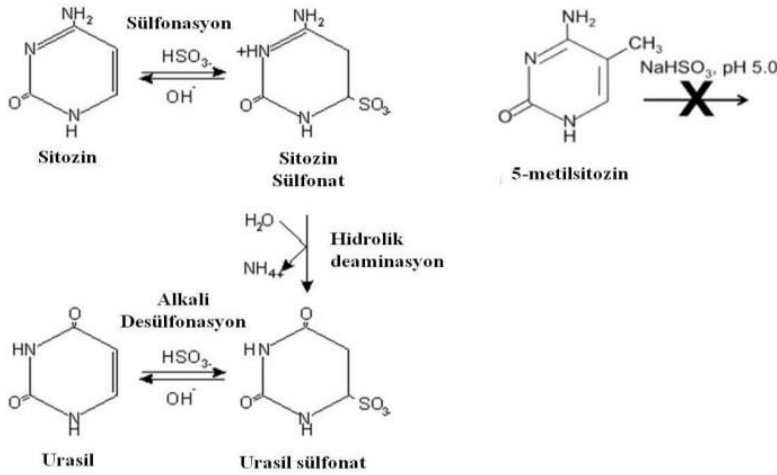
3.10.4. Pirosekanslama Tekniği ile Gene-özü DNA Metilasyonunun Tayini

Bisülfid modifikasyonu yapılan DNA örneklerinde, *PPARγ* geninin promotör bölgelerinde belirlenen CpG adalarında kantitatif DNA metilasyonu tayini, pirosekanslama yöntemi ile gerçekleştirildi.

3.10.4.1. Bisülfid DNA Modifikasyonu

Deneyin esası

Bisülfid modifikasyonu, metile olmayan sitozinlerin (C) urasile (U) deaminasyonunu içermektedir (Frommer ve ark., 1992). Metile sitozinler, uygulama sırasında değişmeden kalır (Şekil 3-5). Metillenmiş sitozinlere karşı metillenmemiş sitozinleri belirlemek ve ayırt etmek için, genomik DNA'da sodyum bisülfid modifikasyonu, DNA metilasyon analizi için oldukça önemli bir aşamadır (Frommer ve ark., 1992).



Şekil 3-5: Sitozinin bisülfit ile deaminasyon reaksiyonu.

Bisülfit modifikasyonu, 'EZ DNA Methylation Gold Kit' (Zymo Research) ile üretici firmanın vermiş olduğu kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

Kit içeriği

- CT dönüşüm belirteci
- Dilüsyon tamponu
- Çözücü tamponu
- Bağlama tamponu
- Yıkama tamponu
- Desülfonasyon tamponu
- Elüsyon tamponu
- Filtreli tüp, toplama tüpü

Bisülfit DNA modifikasyonu için çözeltilerin hazırlanışı

CT dönüşüm belirteci: Kit içinde bulunan toz halindeki CT Dönüşüm Belirteci'ne 900 µL su, 300 µL dilüsyon tamponu ve 50 µL çözücü tamponu eklendi. Vorteks ile oda sıcaklığında karıştırılarak belirtecin tamamen çözünmesi sağlandı.

Yıkama tamponu: 24 mL %100'lük etanol, 6 mL yıkama tamponuna eklendi ve karıştırıldı.

Deney protokolü

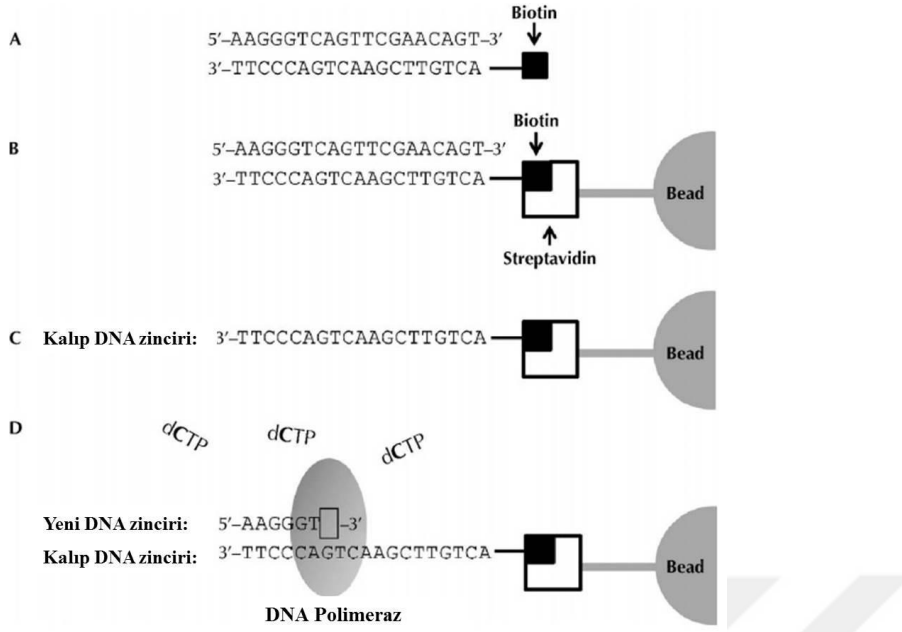
1. 0,5 mL mikrotüpe 20 µL DNA örneği (1 µg) ve 130 µL CT dönüşüm belirteci eklendi. DNA örneğinin hacmi 20 µL'den az ise aradaki fark su ile tamamlanmalıdır.

2. Örnek tüpleri blok ısıtıcıda 98 °C’de 10 dk., 64°C’de 2,5 saat süre ile inkübe edildi.
3. Filtreli tüp, toplama tüpüne yerleştirildi. Üzerine 600 µL bağlama tamponu eklendi.
4. İkinci basamakta inkübasyon sonrası elde edilen örnek, bağlama tamponu içeren filtreli tüpe aktarıldı. Toplama tüpünün kapağı kapatıldı ve 3-4 kere altüst edilerek karıştırıldı.
5. 11000 x g’de 30 sn. santrifüj edildi. Toplama tüpünün içindeki sıvı atıldı.
6. 100 µL yıkama tamponu filtreli tüpe eklendi. 14000 rpm’de (maksimum hızda) 30 sn. santrifüj edildi, toplama tüpünün içindeki sıvı atıldı.
7. 200 µL desülfonasyon tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 17 dk. bekletildi. İnkübasyondan sonra 14000 rpm’de (maksimum hızda) 30 sn. santrifüj edildi.
8. 200 µL yıkama tamponu eklendi ve 14000 rpm’de (maksimum hızda) 30 sn. santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandı.
9. Toplama tüpü atıldı, filtreli tüp 1,5 mL’lik mikrotüp içine yerleştirildi.
10. 10 µL elüsyon tamponu doğrudan filtreli tüpe eklendi ve 14000 rpm’de (maksimum hızda) 30 sn. santrifüj edildi.
11. Elde edilen bisülfite modifikasyonlu DNA örnekleri daha sonraki deneysel çalışmalar için -80 °C’de saklandı.

3.10.4.2. Pirosekanslama Tekniği

Deneyin esası

Pirosekanslama yöntemi, Ronaghi ve ark. (1996)’nın geliştirdiği, DNA sentezinin gerçek zamanlı görüntülenebildiği, sentez yoluyla dizileme ‘sequencing by synthesis’ prensibine dayalı bir yöntemdir. Yöntemin aşamaları Şekil 3-6’da gösterilmiştir. Bu yöntem aynı zamanda, bisülfite modifikasyonu yolu ile yapay sitozin/timin (C/T) dönüşümü ile gerçek zamanlı, lokal ve global olarak DNA metilasyonunun ölçümüne izin verir. DNA CpG metilasyonunun hem global hem de tek tek genlerdeki kantitatif analizi, patofizyolojik koşullara dahil olan genlerin düzenlenmesini aydınlatmaya yardımcı olur (Delaney ve ark., 2015).



Şekil 3-6: Pirosekanslama yönteminin aşamaları (Harrington ve ark., 2013).

A. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) amplifikasyonu, gösterilen PCR ürününü üretmek için 5' ucunda (dolu kareler) biyotin etiketli ters primer kullanılarak gerçekleştirilir, B. Biyotinli PCR ürünü, 'bead'ler (gri yarım daireler) üzerine kaplanan streptavidine (beyaz, açık poligonlar) bağlanır, C. 'Bead' mıknatıs aracılığıyla immobilize hale getirilir; DNA denatüre edilir ve üst iplikçik yıkanır, D. Tamamlayıcı primer (5'-AAGGGT-3') uzamaya başlar ve eğer tamamlayıcı deoksiniükleotid trifosfat (dNTP) eklendiyse (dCTP), DNA polimeraz (gri oval), açık kutunun pozisyonunda uzamaya başlayan zincire dNTP'yi dahil edecektir (Her bir 'bead', burada tek bir molekül tarafından temsil edilen sayısız PCR ürünleri ile kaplanmıştır).

Kullanılan malzemeler

Pirosekanslama primerleri

'PyroMark PCR Kit'

-Pirokit master karışımı (3×0,85 mL; 2x): HotStarTaq DNA polimeraz ve optimize edilmiş PyroMark PCR tamponu (3 mM MgCl₂ ve dNTP'ler) içerir.

-Yükleme boyası (CoralLoad®) (1,2 mL; 10x): Jel yükleme reaktifi, portakal boyası, kırmızı boya içerir.

-Q solüsyonu (2 mL; 5x)

-MgCl₂ (1,2 mL; 25 mM)

-RNaz içermeyen su (1,9 mL)

PCR kontrol DNA seti (%0 ve %100 metile)

Streptavidin sefaroz

Pirosekanslama bağlama tamponu

Pirosekanslama 'annealing' tamponu

Pirosekanslama denatürasyon solüsyonu

Pirosekanslama yıkama tamponu

'PyroMark Gold Q96 Reagents' kiti

-Enzim karışımı: DNA polimeraz, ATP sülfürilaz, lusiferaz, apiraz ve tek zincirli bağlama proteini (SSB) içerir.

-Substrat karışımı: Adenosin 5' fosfosülfat (APS) içerir.

-Adenin (dATPαS) (5×620 µL)

-Sitozin (dCTP) (5×620 µL)

-Guanin (dGTP) (5×620 µL)

-Timin (dTTP) (5×620 µL)

Deney protokolü

1. İlk olarak bisülfite modifikasyonlu DNA örneklerinde, *PPARγ* geni için özel tasarlanan primerler ile 'PyroMark PCR Kit' (Qiagen) kullanılarak piroPCR yapıldı (Zeybel ve ark., 2012). *PPARγ* geninin promotöründe belirlenen CpG adaları için tasarlanan PCR primer ve sekanslama primer dizileri Tablo 3-1'de verilmiştir.

Tablo 3-1: Pirosekanslama yönteminde kullanılmak üzere *PPARγ* geni için tasarlanan piroPCR ve pirosekanslama primer dizileri.

Gen adı	Primer dizisi (5'-3')	Kaynak
<i>PPARγ</i>	F: GGAAAGAGGGGTTTTAAGTTTAGG	Zeybel ve ark., 2012
	R: CAATAACCTTTTCTTTTCCTACCA	
	Sekanslama: GGGGTTTTAAGTTTAGGAG	

2. Pirosekanslama için 'PyroMark PCR Kit' kullanılarak (Qiagen) piroPCR karışımı aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı:

Pirokit master karışımı (Hot start):	12,5 µL
Q solüsyonu:	2,5 µL
Yükleme boyası (CoralLoad®):	2,5 µL
Primer karışımı (10 µM):	2 µL
Nükleaz içermeyen su:	3,5 µL
Bisülfite modifikasyonlu DNA:	2 µL
Toplam hacim:	25 µL

3. %0 ve %100 metile DNA'lar (Epitect, Qiagen) ve negatif kontrol için su kullanılarak PCR karışımı eklenen bisüfit modifikasyonlu DNA örnekleriyle birlikte Tablo 3-2'de belirtilen PCR koşullarında ilgili gen bölgesinin çoğaltılması sağlandı:

Tablo 3-2: PiroPCR protokolü.

Program adı	Siklus	Sıcaklık °C	Süre
Polimeraz aktivasyonu	1	95	15 dk.
Denatürasyon	50	95	15 sn.
Primerlerin hedef DNA' ya bağlanması		55	30 sn.
Uzama		72	30 sn.
Uzama	1	72	5 dk.

4. Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde 2,5 µL yüklenerek mA sabit olacak şekilde 100 V'ta 30 dk. süreyle yürütüldü. Kalan 20 µL PCR ürünü, her bir örnek için 2 tekrar yapılacak şekilde pirosekanslama aşamasına devam edildi.

5. Pirosekanslama aşaması için aşağıda belirtildiği gibi piro karışımı hazırlandı:

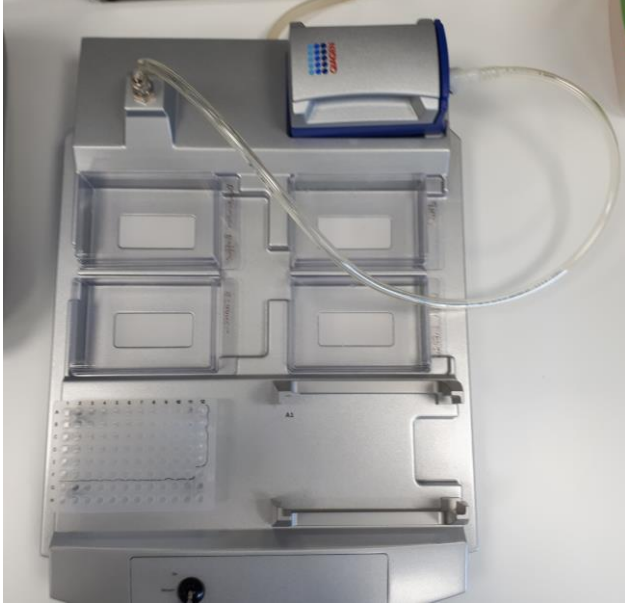
Streptavidin sefaroze:	2 µL
Bağlama tamponu:	38 µL
PCR kalitede su:	30 µL
PCR ürünü:	10 µL
Toplam hacim:	80 µL

6. 96 kuyucuklu PCR mikroplakasının her bir kuyucuğuna öncelikle 70 µL piro karışımı, daha sonra her bir kuyucuğa 10 µL ilgili PCR ürünü eklendi. Mikroplakanın üstü jelatin ile kaplanarak 24 °C'de 1400 rpm'de 10 dk. boyunca çalkalamalı blok ısıtıcıda inkübe edildi.

7. Bekleme esnasında 'annealing' karışımı hazırlanarak 96 kuyucuklu piro mikroplakasının her bir kuyucuğuna 40 µL eklendi. Karışım aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı:

Sekanslama primeri (10 µM):	1,6 µL
'Annealing' tamponu:	38,4 µL
Toplam hacim:	40 µL

8. Pirosekanslama vakumlu çalışma standında (Şekil 3-7) 96 mikroplakaya uygun dişli aparat yardımıyla ön yıkama için distile su vakumlandı. Daha sonra hem piro hem de PCR mikroplakası çalışma standındaki mikroplaka tutucuya yerleştirildi. 5 sn. etil alkol, 5 sn. denatürasyon solüsyonu (Qiagen), 10 sn. yıkama tamponunda (Qiagen) tutulan dişli aparat ile PCR mikroplakası vakumlandı ve piro mikroplakası hizasına denk getirilerek kuyucuklara aynı düzende aktarıldı.

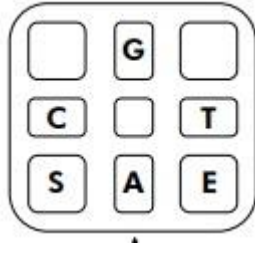


Şekil 3-7: Pirosekanslama vakumlu çalışma standı ve örnek 96 kuyucuklu piro mikroplakası.

9. 96 kuyucuklu piro mikroplakası blok ısıtıcıda 80 °C'de 2 dk. süre ile inkübasyona bırakıldı, ardından 10 dk. soğuması için bekletildi.

10. Yazılım programı çalıştırıldı ve primer ve örnek isimleri girildi. Sentez aşaması için gerekli olan enzim, substrat ve nükleotit miktarları yazılımdan hesaplandı. Pirosekanslama aşaması için bekleme süresinde 'PyroMark Q96' pirosekanslama kartuşuna (Qiagen) 'PyroMark Gold Q96 Reagents' kiti (Qiagen) kullanılarak gerekli olan enzim ve substrat karışımı, nükleotit miktarları aşağıda belirtildiği gibi eklendi (Şekil 3-8):

Enzim/Substrat karışımı:	451 µL
Adenin:	132 µL
Sitozin:	99 µL
Guanin:	197 µL
Timin:	148 µL



Şekil 3-8: PyroMark Q96 kartuşunun şematik diyagramı.

11. Piro mikropalakası ve pirosekanslama kartuşu cihazda ilgili yerlere yerleştirilerek cihaz çalıştırıldı ve *PPAR γ* geni için kantitatif metilasyon analizi gerçekleştirildi.

Sonuçların değerlendirilmesi

PPAR γ geninde çoğalan bölgelerdeki metilasyon seviyesini hesaplamak için, yazılım programına girilen örnekler için verilen % DNA metilasyonu değerleriyle, öncelikle kontrol ve maruziyet gruplarından 2'şer tekrar olan her bir DNA örneğinin ortalaması alındı. Daha sonra bu ortalama değerlerinden kontrol ve maruziyet gruplarının genel ortalamaları belirlenerek, maruziyet gruplarının değerlerinin kontrol grubuna göre kıyaslanmasıyla relatif DNA metilasyonu % olarak hesaplandı.

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 μ L'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 μ L PBS (1x) içinde süspande edildi.
2. Üzerine 200 μ L 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 μ L DNaz inkübasyon tamponu ve 10 μ L DNaz I eklendi ve karıştırıldı.
6. 100 μ L DNaz I çözeltisi filtreli tüpün üst yüzeyine konuldu. 15-25 °C’de 15 dk. inkübe edildi.
12. Filtreli tüpe 500 μ L Yıkama tamponu I eklendi ve 8000 x g’de 15 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.
13. Filtreli tüpe 500 μ L Yıkama tamponu II eklendi ve 8000 x g’de 15 sn. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.
14. Filtreli tüpe 200 μ L 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.
15. Filtreli tüp 1,5 mL’lik mikrotüp içine yerleştirildi.
16. Elüsyon tamponundan 50 μ L filtreli tüpe eklendi. 8000 x g’de 1 dk. santrifüj edildi.
17. Elde edilen RNA’lar, cDNA sentezi için -80 °C’de saklandı.

3.11.2. RNA’nın Saflık ve Miktar Tayini

1, 10, 50 μ M konsantrasyonlarda ZEA ve α -ZOL maruziyeti sonrasında HepG2 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'lerden 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)

Deoksinükleotid 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
<hr/>	
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 3-3’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 3-3’te deneylerde kullanılan primer dizileri gösterilmiştir.)

PCR kalitede su.

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

Gen adı	Primer dizisi (5'-3')	Sıcaklık (°C)	Kaynak
<i>PXR</i>	F: CATGAGGGGGGTAGCAAAGC R: TGCAGGGGATCTCCCTCTTC	58	Ayed-Boussema ve ark., 2011
<i>AhR</i>	F: TGGACAAGGAATTGAAGAAGC R: AAAGGAGAGTTTTCTGGAGGAA	53	Ayed-Boussema ve ark., 2011
<i>ERα</i>	F: CGACGCCAGGGTGGCAGAGAAAGATT R: GGCCAAAGGTTGGCAGCTCTCATGTC	64	Jang ve ark., 2015
<i>ERβ</i>	F: TAGTGGTCCATCGCCAGTTAT R: GGGAGCACACTTCACCAT	55	Arts ve ark., 1997
<i>LXRα</i>	F: AACCCACAGAGATCCGTCCACAAA R: ATTCATGGCC CTGGAGAACTCGAA	63	Sangkitikomol ve ark., 2010
<i>PPARα</i>	F: CATTACGGAGTCCACGCGT R: ACCAGCTTGAGTCGAATCGTT	58	Rogue ve ark., 2011
<i>PPARγ</i>	F: CTGAATGTGAAGCCATTGAA R: GTGGAAGAAGGAAATGTTGG	54	Harada ve ark., 2005
<i>Pgc-1α</i>	F: CCCAGATCTTCCTGAACTTG R: GCTAGCAAGTTTGCCTCATT	57	Aatsinki ve ark., 2014
<i>L-fabp</i>	F: TGTCGAAATCGTGCAG R: GATTATGTCGCCGTTGAGTT	53	Wang ve ark., 2005
<i>LDLR</i>	F: CAATGTCTCACCAAGCTCTG R: TCTGTCTCGAGGGGTAGCTG	59	Sangkitikomol ve ark., 2010
<i>Srebp-1c</i>	F: CGCGGAGCCATGGATTGC R: GGGCTGGGGTAGCCTAAC	59	Reimer ve ark., 2004
<i>GAPDH</i>	F: TGTGGGCATCAATGGATTTGG R: ACACCATGTATTCCGGGTCAAT	57	Hao ve ark., 2014
<i>Glut2</i>	F: ACAGCCTATTCTAGTGGCAC R: TTGCTAAAGCAGCAGGACGT	56	Reimer ve ark., 2004
<i>IGF-1</i>	F: CTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGAC R: CAGCCTCCTTAGATCACAGCTC	57	Srinivasa ve ark., 2016
<i>Akt1</i>	F: TCCTCCTCAAGAATGATGGCA R: GTGCGTTCGATGACAGTGGT	58	Wang ve ark., 2013
<i>HK2</i>	F: CAAAGTGACAGTGGGTGTGG R: GCCAGGTCCTTCACTGTCTC	60	Guo ve ark., 2017
<i>HO-1</i>	F: ATGACACCAAGGACCAGAGC R: GTGTAAGGACCCATCGGAGA	60	Maeda ve ark., 2008
<i>α-GST</i>	F: TTCCTTGGGCTGCCAGGC R: GTTCCAGCAAGTGCCAATCC	60	Mi ve ark., 2015
<i>Hsp70</i>	F: CCGGTTCCCTGCTCTCTGTC R: CAGTCCACTACCTTTTTTCGAGA	60	Chiang ve ark., 2008
<i>Nrf2</i>	F: CGGTATGCAACAGGACATTG R: ACTGGTTGGGGTCTTCTGTG	60	Guha ve ark., 2017
<i>DNMT1</i>	F: CCTCCAAAACCCAGCCAAC 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 µL
10 µM forward primer:	1 µL
10 µM reverse primer:	1 µL
PCR kalitede su:	3 µL
<hr/>	
Toplam hacim:	15 µL

2. Hazırlanan PCR karışımından 15 µL mikroplakanın her kuyucuğuna ilave edildi.

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

4. Hazırlanan cDNA örneklerinden 5 µL her bir kuyucuğa eklendi ve mikroplakanın üzeri mikroplaka filmi ile kapatıldı.

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

6. Mikroplaka LightCycler 480 RT-PCR cihazına konularak ölçüm yapıldı. RT-PCR protokolü Tablo 3-4’te gösterilmiştir.

Tablo 3-4: 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 3-3’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 ± 0,1

Fenilmetilsülfonil florit (PMSF) (Vial 2): 500 µL; 200mM, DMSO'da çözüldürülmüş

Proteaz inhibitör kokteyli (Vial 3): 500 µL; DMSO'da çözüldürülmüş

Sodyum ortovanadat (Vial 4): 500 µL; 100mM, suda çözüldürülmüş

Deney protokolü

1. Bölüm 3.9'da belirtildiği üzere hazırlanan 1×10^6 hücre 200 µL PBS (1x) içinde süspende 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 µL 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.

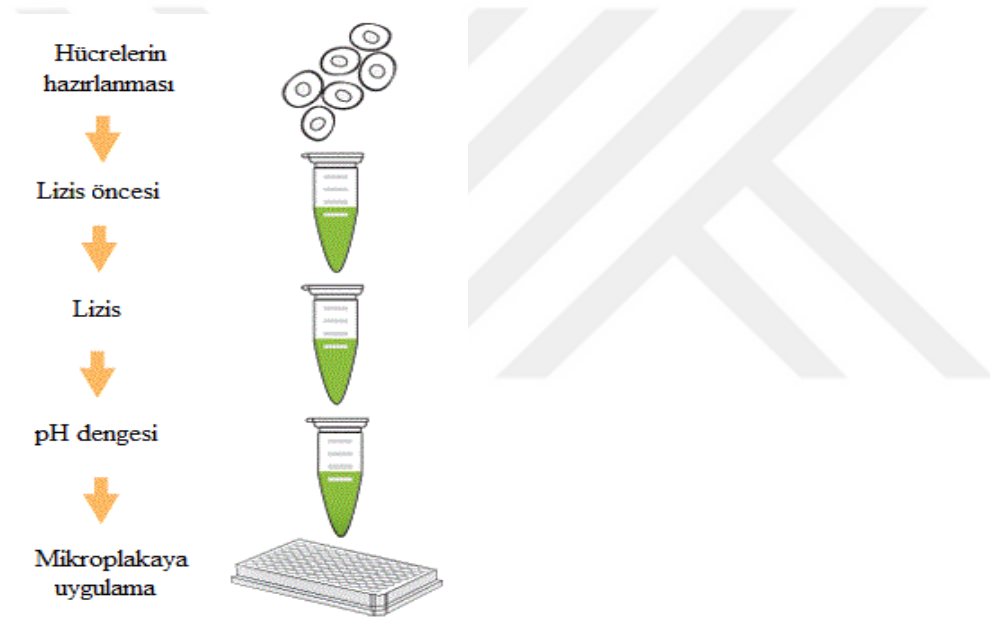
6. Bradford yöntemi ile protein miktar ölçümü yapılırken her bir örnek 1/100 sulandırılarak ölçüldü. Hesaplama yapılırken bulunan değer 100 ile çarpıldı.

3.12.2. Histon Proteinlerinin İzolasyonu

Hücreden histon proteinlerinin izolasyonu EpiQuick™ toplam histon ekstraksiyon kiti (Epigentek) ile üretici firmanın vermiş olduğu kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi (Şekil 3-9).

Kit içeriği

10x ön-lizis çözeltisi	10 mL
Lizis çözeltisi	20 mL
Balans tamponu	8 mL
DTT çözeltisi	20 µL



Şekil 3-9: Histon proteinlerinin izolasyon basamakları

Deney protokolü

1. Bölüm 3.9'da belirtildiği üzere hazırlanan 1×10^6 hücre 200 µL PBS (1x) içinde süspende edildi.
2. PBS (1x) ile yıkanan hücreler 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Hücreler 4 °C'de 1000 x g'de 5 dk. santrifüj edildi. Üstteki sıvı atıldı.
3. 10x ön-lizis çözeltisi, distile su ile 1: 10 oranında seyreltilerek 1X ön-lizis çözeltisi hazırlandı (1 mL 10x ön-lizis çözeltisi + 9 mL su şeklinde).
4. Hücre pelletine 200 µL 1x ön-lizis çözeltisi eklendi ve süspende edildi ve 10 dk. buz içinde nazikçe karıştırılarak lizis edildi.

5. Lizatlar 4 °C' de 10000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi ve üst faz uzaklaştırıldı.
6. Hücre pelletine 200 µL lizis çözeltisi eklendi ve tekrar süspand edildi ve 30 dk. buz içinde inkübe edildi.
7. Hücre süspansiyonu 4 °C'de 12000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi ve üstteki sıvı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi.
8. Balans tamponuna 1: 500 oranında DTT çözeltisi eklenerek balans-DTT tamponu hazırlandı (1 µL DTT çözeltisi + 500 µL balans tamponu şeklinde).
9. Üstteki sıvıya 60 µL (0,3 hacimde) balans-DTT tamponu eklendi.
10. Böylece histon proteinlerinin izolasyonu gerçekleştirildi ve protein konsantrasyonu ölçülmek üzere hazır hale getirildi.
11. Elde edilen histon proteinleri daha sonraki kullanımlar için 500 µL'lik tüplere bölündü ve -80 °C'de saklandı.

3.12.3. Proteinlerin Miktar Tayini

İzole edilen protein ve histon proteinleri ekstralarında 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 mikrolaka 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 mikrolaka 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 ekstrlerdeki protein miktarı $\text{ng}/\mu\text{L}$ olarak hesaplandı.

3.12.4. Proteinlerin Western Blot Tekniği ile Tayini

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

3.12.4.1. 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'luk 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 seyreltili. 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: PPAR γ primer antikor 1: 1000 oranında (Örn: 5 µL antikor üzerine 5 mL %2,5'luk BSA çözeltisi) %2,5'luk BSA çözeltisi ile seyreltili. HSP70 primer antikor 1: 2000 oranında (Örn: 2,5 µL antikor üzerine 5 mL %1'lik BSA çözeltisi) %1'lik BSA çözeltisi ile seyreltili.

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

3.12.4.2. 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 poliakrilamid 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.

3.12.4.3. 'Stripping' İşlemi

Deneyin esası

Bağlanmış primer antikorun kimyasal çözelti yardımıyla membrane 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 çözüldürüldükten sonra 10 mL Tween 20 eklendi. pH 2,2 olacak şekilde 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 seyreltildi.

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 seyreltildi.

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.

3.12.5. Histon Modifikasyonlarının Western Blot Tekniği ile Tayini

İzole edilen histon proteinlerinde histon H3K27me3, H3K9me3 ve H3K9ac tayinleri western blot tekniği kullanılarak gerçekleştirildi.

3.12.5.1. Deneyin Esası

Jelde ayırımı yapılmış proteinlerin membrana emdirilerek ilgilenilen proteinin işaretlenmiş spesifik antikor yardımıyla membrane 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.

%2,5'luk 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.

%10'luk APS çözeltisi: 1 g APS, 10 mL deiyonize suda çözülerek hazırlandı. 500 µL'lik tüplere bölünerek -20 °C'de saklandı.

%10'luk SDS çözeltisi: 1 g SDS, 10 mL deiyonize suda çözülerek 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 seyreltildi. 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-merkaptolanol eklenerek hazırlandı.

Primer antikor çözeltileri: Primer antikorlar her bir antikor için uygun seyreltme oranlarında (H3, 1: 1000; H3K27me3, 1: 1000; H3K9me3, 1: 500; H3K9ac, 1: 5000) (Örn: 1: 1000 seyreltme oranı için 5 µL antikor üzerine 5 mL %2,5'luk BSA çözeltisi) %2,5'luk BSA çözeltisi ile seyreltildi.

Sekonder antikor çözeltileri: Sekonder antikor 1: 5000 oranında (Örn: 1 µL antikor üzerine 5 mL %2,5'luk BSA çözeltisi) %0,1'lik BSA çözeltisi ile seyreltildi.

%12'lik SDS poliakrilamid jelin hazırlanışı

%12'lik 'resolving' jel (alt kısım):

Su:	4,309 mL
%40 Akrilamid/Bis çözeltisi (37,5: 1):	2,997 mL
'Resolving' tamponu (pH 8,8):	2 mL
%10 SDS:	80 µL
%10 APS:	80 µL
TEMED:	8 µL

%4'lük 'stacking' jel (üst kısım):

Su:	2,9 mL
%40 Akrilamid/Bis çözeltisi (37,5: 1):	0,75 mL
'Stacking' tamponu (pH 6,8):	1,25 mL

% 10 SDS:	50 µL
% 10 APS:	50 µL
TEMED:	7 µL

3.12.5.2. Deney Protokolü

1. Bölüm 3.12.2’de izole edilen histon proteinlerinin konsantrasyonu 2 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 35 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. %12’lik manuel olarak hazırlanan SDS poliakrilamid jel, dikey elektroforez tankına yerleştirildi. Tank hazırlanan 1x yürütme tamponu ile dolduruldu.

8. Birinci kuyucuğa 7 µL protein standartı ve diğer kuyucuklara da 35’er 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 0,2 µm PVDF membranla sandviç modelinde kaset içinde hazırlanarak tanka yerleştirildi. Tank aktarım tamponuyla doldurularak 100 V 80 mA 720 dk. süre ile aktarım gerçekleştirildi. Aktarım işlemi 4 °C’de yapıldı.

10. Bloklama için membran küçük kap içerisinde 5 mL %2,5’luk BSA çözeltisi ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi ve %2,5’luk BSA çözeltisi döküldü.

11. 5 mL primer antikor içeren çözelti, içerisinde membran bulunan kaba konuldu ve 1,5 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. 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, referans olarak kullanılan H3 histon proteinine göre kıyaslama yapılarak değerlendirilmiştir.

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. Sitotoksikite Sonuçları

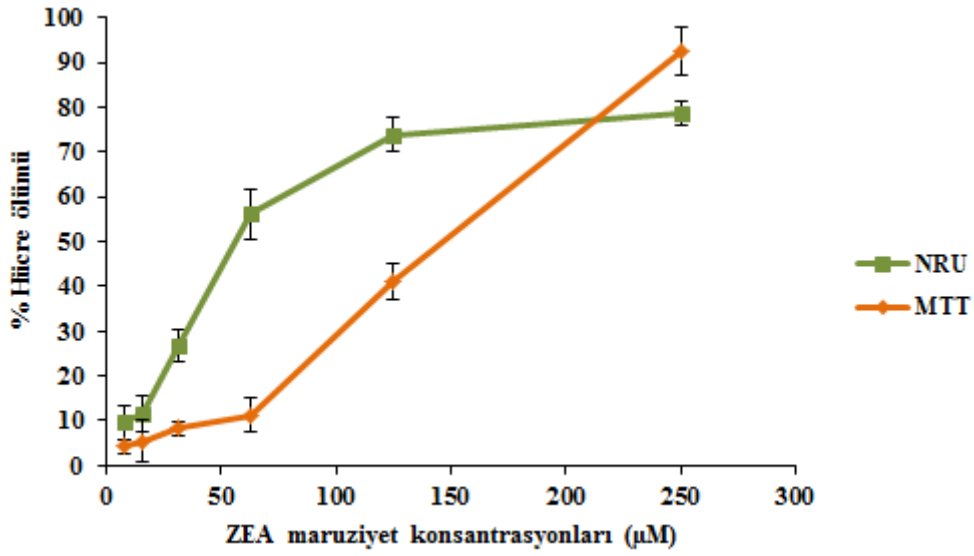
ZEA ve α -ZOL'ün HepG2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, hücre canlılığının kantitatif ölçümüne dayanan MTT ve NRU testleri ile yapıldı. MTT ve NRU testleri için hücreler, ZEA ve α -ZOL ile 6 farklı konsantrasyonda ve 3'er tekrarlı olacak şekilde maruz bırakıldı. Aynı zamanda, testler farklı günlerde 2 kez tekrarlandı.

Tablo 4-1'de 7,81-250 μ M konsantrasyon aralığında 6 doz ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde MTT ve NRU testleri % ölüm ve standart sapma değerleri gösterilmiştir. MTT ve NRU testleri ile HepG2 hücrelerinde 24 saatlik, 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125; ve 250 μ M konsantrasyonlarındaki ZEA ve α -ZOL maruziyetinin konsantrasyona karşı % hücre ölümü grafikleri Şekil 4-1 ve Şekil 4-2'de gösterilmiştir. HepG2 hücrelerinde MTT ve NRU testlerine göre ZEA için IC₅₀ değerleri sırası ile 143,35 ve 60,45 μ M; α -ZOL için ise IC₅₀ değerleri sırası ile 111,42 ve 35,73 μ M olarak belirlendi.

Tablo 4-1: 24 saat 7,81-250 μ M konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde MTT ve NRU testleri % ölüm ve standart sapma değerleri.

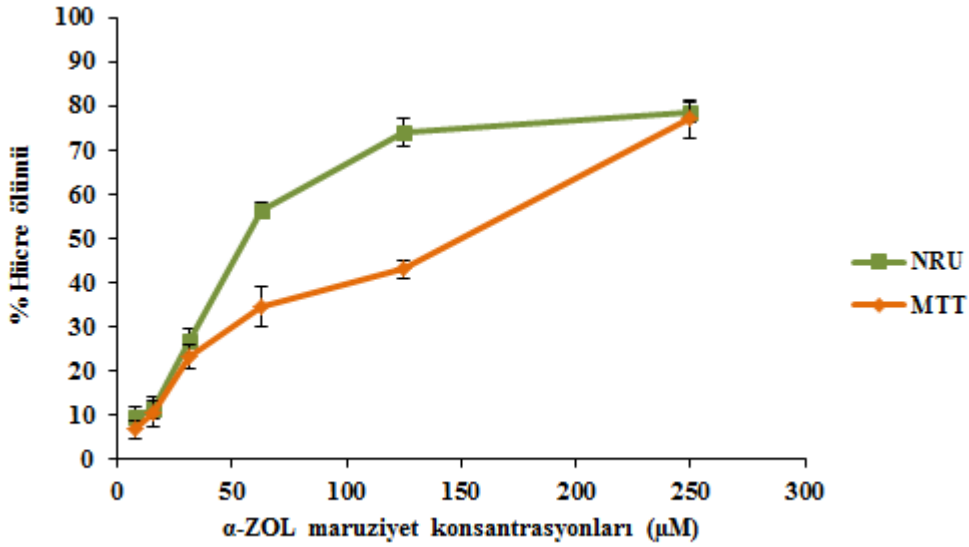
Maruziyet konsantrasyonları	ZEA		α -ZOL	
	MTT	NRU	MTT	NRU
	% Ölüm \pm SD	% Ölüm \pm SD	% Ölüm \pm SD	% Ölüm \pm SD
7,81 μ M	4,19 \pm 1,69	9,57 \pm 3,91	6,67 \pm 2,19	14 \pm 2,47
15,62 μ M	5,48 \pm 4,53	11,63 \pm 4,06	10,42 \pm 3,02	34,89 \pm 2,46
31,25 μ M	8,39 \pm 1,57	26,72 \pm 3,73	23,25 \pm 2,59	56,62 \pm 2,77
62,5 μ M	11,29 \pm 3,89	56,19 \pm 5,61	34,5 \pm 4,341	65,62 \pm 1,83
125 μ M	41,15 \pm 4,14	73,84 \pm 3,78	43 \pm 2,18	70,5 \pm 3,16
250 μ M	92,51 \pm 5,31	78,57 \pm 2,63	76,92 \pm 4,23	82,42 \pm 2,21

SD: Standart sapma ('standard deviation').



Şekil 4-1: 24 saat 7,81-250 µM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde MTT ve NRU testleri sonuçları.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 4-2: 24 saat 7,81-250 µM konsantrasyon aralığında α-ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde MTT ve NRU testleri sonuçları.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.2. BrdU Hücre Proliferasyonu Testi Sonuçları

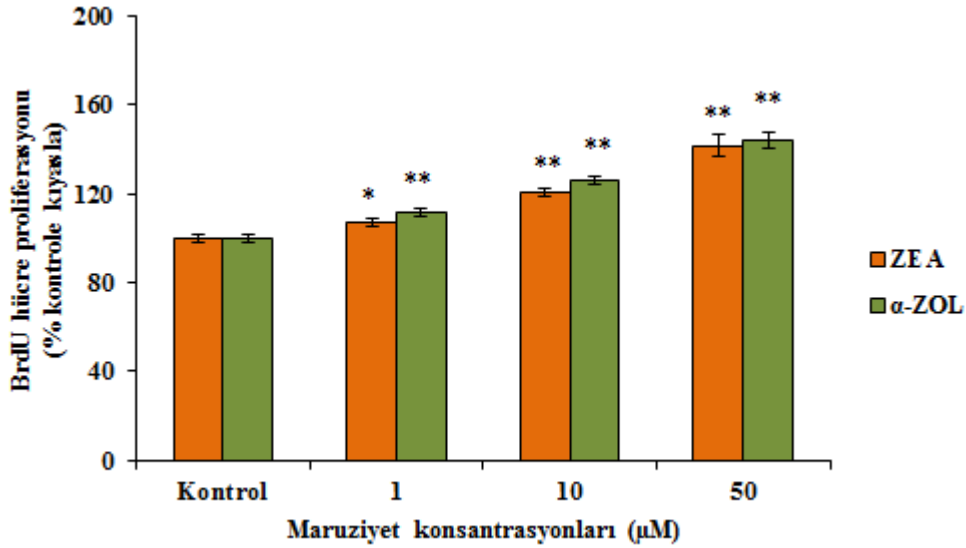
24 saat 1, 10 ve 50 µM konsantrasyonlarda ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde BrdU testi ile kontrole kıyasla hücre proliferasyonunda sırasıyla %7,2

($p<0,05$), %20,59 ($p<0,001$) ve %41,71 ($p<0,001$) oranlarında anlamlı artış tespit edildi (Tablo 4-2). 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda $\alpha\text{-ZOL}$ maruziyetinden sonra ise BrdU testi ile kontrole kıyasla hücre proliferasyonunda sırasıyla %11,78 ($p<0,001$), %26,18 ($p<0,001$) ve %44,33 ($p<0,001$) oranlarında anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-3).

Tablo 4-2: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve $\alpha\text{-ZOL}$ maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde % hücre proliferasyonu ve standart sapma değerleri.

Maruziyet konsantrasyonları	ZEA	$\alpha\text{-ZOL}$
	% Hücre proliferasyonu \pm SD	% Hücre proliferasyonu \pm SD
Kontrol	100 \pm 1,85	100 \pm 1,85
1 μM	107,21 \pm 2,18	111,78 \pm 1,63
10 μM	120,59 \pm 1,71	126,18 \pm 1,99
50 μM	141,71 \pm 4,76	144,33 \pm 3,79

SD: Standart sapma ('standard deviation').

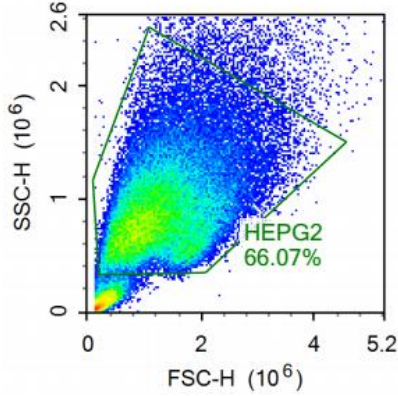


Şekil 4-3: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve $\alpha\text{-ZOL}$ maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde % hücre proliferasyonu (kontrole göre kıyasla) üzerine etkisi.

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).

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. HepG2 hücrelerinin FSC/SSC grafiğindeki dağılımı Şekil 4-4'te gösterilmiştir.

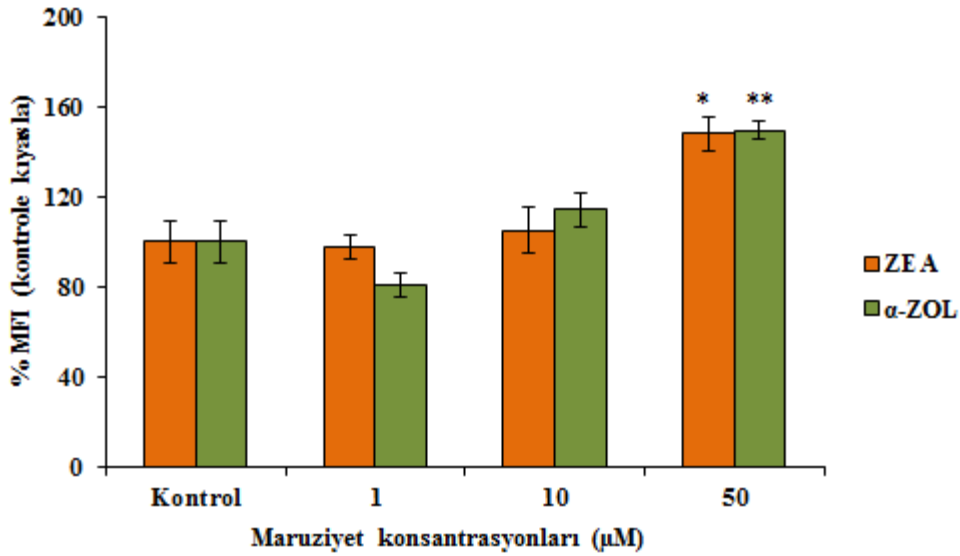


Şekil 4-4: HepG2 hücrelerinin SSC-H/FSC-H kanalında dağılımı.

24 saat 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde kontrole kıyasla ROS üretiminde sırasıyla %2,1 oranında anlamlı olmayan azalma, %5,33 oranında anlamlı olmayan artış ve %48,1 ($p<0,05$) oranında anlamlı artış bulundu (Tablo 4-3; Şekil 4-5). 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda α -ZOL maruziyeti ise kontrole kıyasla ROS üretiminde sırasıyla %10,84 oranında anlamlı olmayan azalma, %14,36 oranında anlamlı olmayan artış ve %49,6 ($p<0,001$) oranında anlamlı artışa neden oldu (Tablo 4-3; Şekil 4-5).

Tablo 4-3: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde % MFI ve standart sapma değerleri.

Maruziyet konsantrasyonları	ZEA	α -ZOL
	% MFI \pm SD	% MFI \pm SD
Kontrol	100 \pm 9	100 \pm 9
1 μM	97,99 \pm 5,19	80,84 \pm 5,58
10 μM	105,33 \pm 10	114,36 \pm 7,83
50 μM	148,09 \pm 7,24	149,62 \pm 4,16



Şekil 4-5: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve α-ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde %ortalama fluoresans şiddetine (%MFI, kontrole karşı) etkisi.

Tüm değerler ortalama ± 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).

4.4. ZEA ve α-ZOL'e Maruz Bırakılmış HepG2 Hücrelerinden İzole Edilen DNA ve RNA'ların Miktarları ve Safılıkları

24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve α-ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinden izole edilen DNA ve RNA'ların miktarı ve saflığı 'Take-3 Plate' kullanılarak mikropilaka okuyucu spektrofotometrede ölçüldü. HepG2 hücrelerine ait DNA ve RNA'ların miktarı ve saflığı Tablo 4-4'te gösterilmiştir. İzole edilen DNA ve RNA'ların A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranlarında saflıklarının iyi olduğu görüldü ve DNA ve RNA örnekleri ileri analizler için kullanıldı.

Tablo 4-4: 24 saat 0-50 μ M konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinden izole edilen DNA ve RNA'ların miktar ve saflıkları.

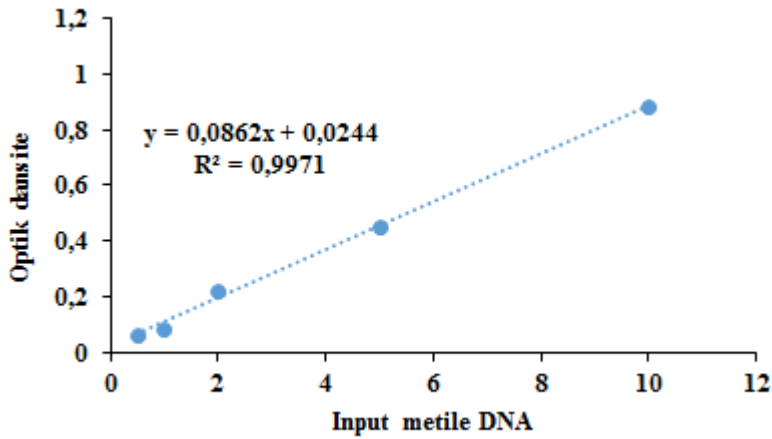
Maruziyet konsantrasyonları		DNA Örnekleri			RNA Örnekleri	
		A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Miktarı (ng/ μ L)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Miktarı (ng/ μ L)
Kontrol 24 saat	0 μ M	1,887	2,097	210,071	2,051	304,376
	0 μ M	1,878	2,007	105,673	2,054	278,662
	0 μ M	1,846	1,915	282,264	2,064	282,156
	0 μ M	1,853	2,003	271,277	2,063	287,839
	0 μ M	1,842	1,884	121,335	2,049	237,559
ZEA 24 saat	1 μ M	1,914	2,083	263,211	2,088	218,925
	1 μ M	1,895	2,036	298,347	2,082	442,609
	1 μ M	1,909	2,012	261,472	2,069	235,695
	1 μ M	1,878	1,952	166,151	2,035	498,784
	1 μ M	1,916	2,005	146,702	2,062	635,002
	10 μ M	1,926	2,032	195,394	2,052	351,022
	10 μ M	1,878	2,076	100,642	2,054	504,35
	10 μ M	1,909	2,007	151,525	2,058	157,518
	10 μ M	1,921	2,003	201,347	2,051	262,805
	10 μ M	1,825	1,904	181,929	2,048	231,869
	50 μ M	1,973	2,019	165,341	2,054	161,737
	50 μ M	1,956	1,843	158,82	2,029	168,738
	50 μ M	1,827	1,926	165,916	2,051	104,488
	50 μ M	1,885	1,963	194,958	2,042	146,11
50 μ M	1,931	1,856	107,611	2,035	169,961	
α -ZOL 24 saat	1 μ M	1,919	2,06	155,274	1,976	167,177
	1 μ M	1,864	2,206	131,231	1,916	396,861
	1 μ M	1,945	2,003	149,173	1,873	209,555
	1 μ M	1,909	2,301	144,277	1,968	194,185
	1 μ M	1,831	1,951	150,912	1,932	442,842
	10 μ M	1,832	2,42	137,046	1,935	195,905
	10 μ M	1,876	2,077	132,949	2,007	302,329
	10 μ M	1,833	2,356	94,557	1,924	232,959
	10 μ M	1,898	1,96	98,53	2,015	423,364
	10 μ M	1,902	2,156	134,887	1,989	135,423
	50 μ M	1,876	1,899	103,983	1,981	293,408
	50 μ M	1,915	1,965	93,807	2,025	318,365
	50 μ M	1,882	2,148	112,166	1,855	156,658
	50 μ M	1,877	1,957	95,657	2,025	403,573
50 μ M	1,872	2,009	107,778	1,919	200,993	

4.5. DNA Metilasyonu Sonuçları

4.5.1. Global 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 (Şekil 4-6).

24 saat 1, 10 ve 50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve $\alpha\text{-ZOL}$ maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde %5-mC seviyeleri Tablo 4-5 ve Şekil 4-7’de gösterilmiştir. %5-mC seviyeleri, kontrol grubuna kıyasla 1 μM ZEA maruziyeti yapılan hücrelerde %14 kat anlamlı olmayan azalma olarak belirlenirken; 10 ve 50 μM ZEA maruziyeti yapılan hücrelerde sırasıyla, %46 ($p<0,05$) ve %154 ($p<0,001$) kat anlamlı artış görüldü. 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda $\alpha\text{-ZOL}$ maruziyeti ise sırasıyla, %58 ($p<0,001$), %53 ($p<0,001$) ve %58 ($p<0,001$) kat anlamlı artışa neden oldu.

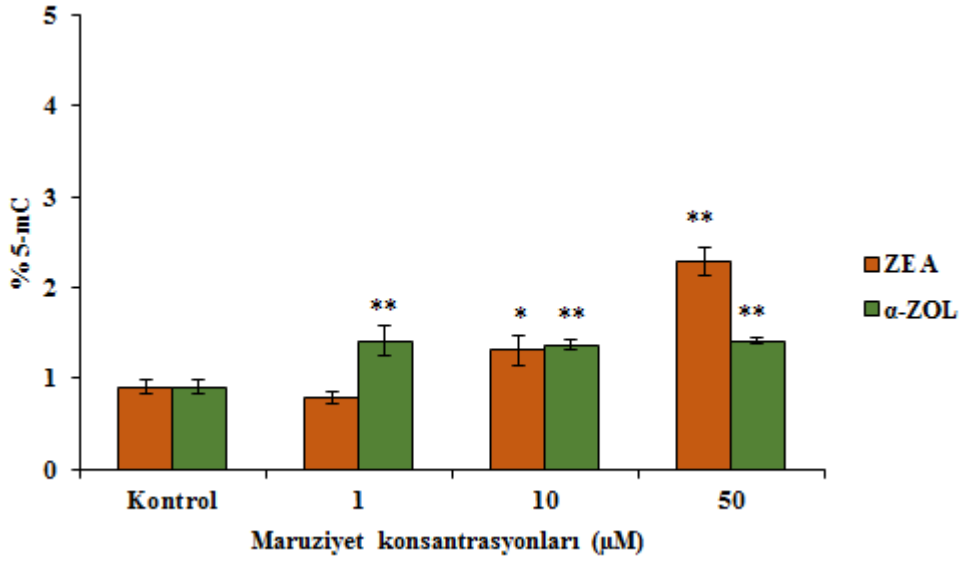


Şekil 4-6: 5-mC standardına ait kalibrasyon eğrisi.

Tablo 4-5: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve $\alpha\text{-ZOL}$ maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde relatif %5-mC ve standart sapma değerleri.

Maruziyet konsantrasyonları	ZEA	$\alpha\text{-ZOL}$
	%5-mC \pm SD	%5-mC \pm SD
Kontrol	0,91 \pm 0,08	0,91 \pm 0,082
1 μM	0,79 \pm 0,06	1,41 \pm 0,16
10 μM	1,31 \pm 0,16	1,37 \pm 0,056
50 μM	2,29 \pm 0,16	1,42 \pm 0,029

SD: Standart sapma ('standard deviation').

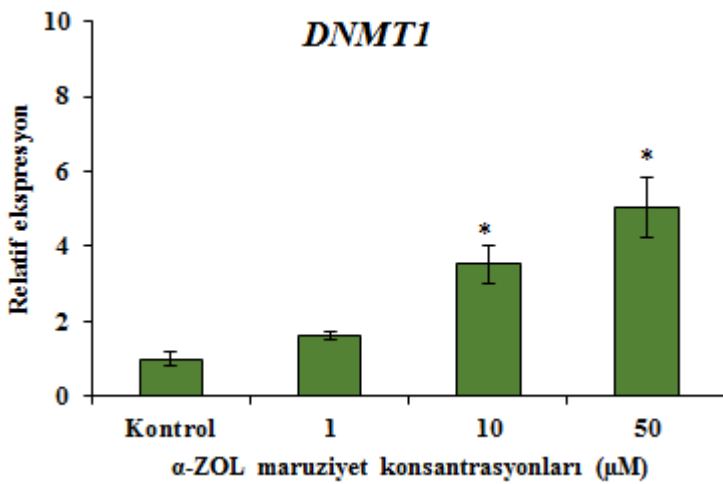
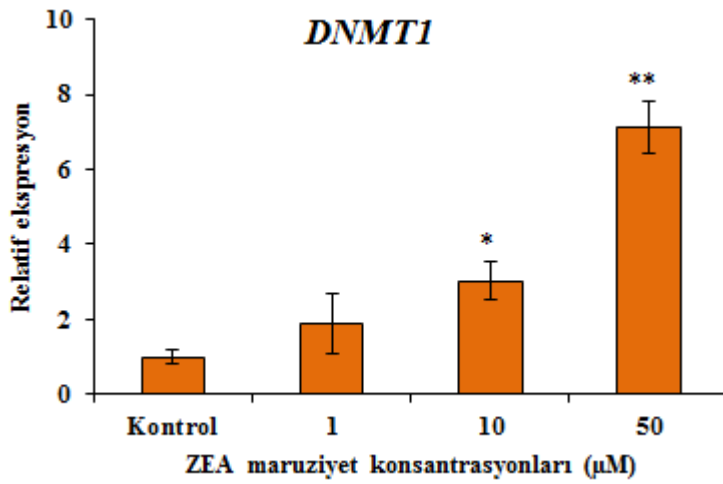


Şekil 4-7: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA ve α-ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde % 5-mC seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± 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).

4.5.2. DNMT1 Ekspresyon Sonuçları

24 saat 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *DNMT1* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 1 μM konsantrasyonda 1,87 kat anlamlı olmayan azalma, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda sırasıyla 3,02 kat ($p<0,05$) ve 7,13 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi. α -ZOL maruziyetinde ise 1 μM konsantrasyonda 1,62 kat anlamlı olmayan artış, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda sırasıyla 3,52 kat ($p<0,05$) ve 5,05 kat ($p<0,05$) anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-8).



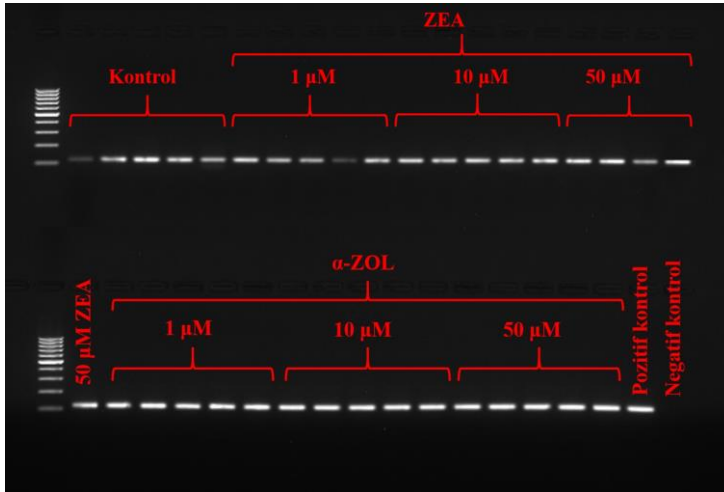
Şekil 4-8: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *DNMT1* genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.

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).

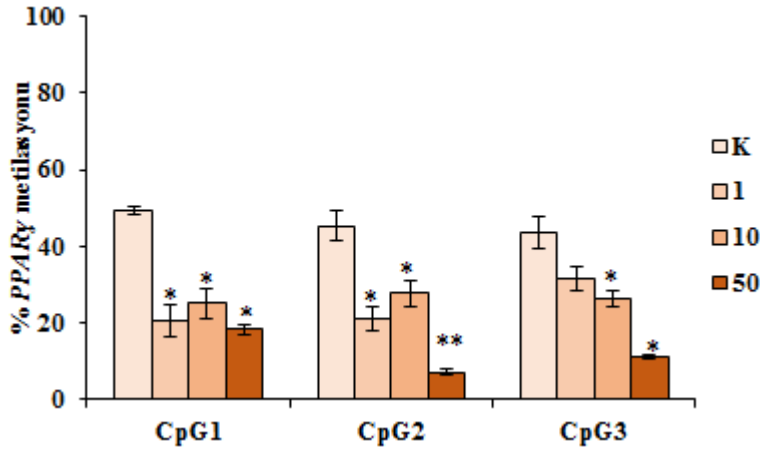
4.5.3. Pirosekanslama Tekniği ile Gene özđü DNA Metilasyonu Sonuçları

PiroPCR sonucu bisülfıt modifikasyonlu DNA örneklerinin jel görüntüleri Şekil 4-9'da verilmiştir. 24 saat 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *PPAR γ* geninin promotör bölgesinde CpG1 için kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %28,44 ($p<0,05$), %24,06 ($p<0,05$) ve %30,94 ($p<0,05$) oranında metilasyonda anlamlı azalma tespit edildi. CpG2 için kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %24,29 ($p<0,05$), %17,62 ($p<0,05$) ve %38,11 ($p<0,001$) oranında; CpG3 için ise kontrol grubuna kıyasla 1 μM konsantrasyonda %11,71 anlamlı olmayan azalma, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda sırasıyla %17,1 ($p<0,05$) ve %32,23 ($p<0,05$) oranında metilasyonda anlamlı azalma tespit edildi (Şekil 4-10).

24 saat 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarında α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *PPAR γ* geninin promotör bölgesinde CpG1 için kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %46,97 ($p<0,001$), %46,93 ($p<0,001$) ve %46,69 ($p<0,001$) oranında metilasyonda anlamlı artış tespit edildi. CpG2 için kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %44,62 ($p<0,001$), %44,4 ($p<0,001$) ve %45,25 ($p<0,001$) oranında; CpG3 için ise kontrol grubuna kıyasla %47,12 ($p<0,001$), %46,79 ve %46,51 ($p<0,001$) oranında metilasyonda anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-11).



Şekil 4-9: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralğında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinden elde edilen bisülfıt modifikasyonlu DNA'ların piroPCR sonucu jel görüntüleri.

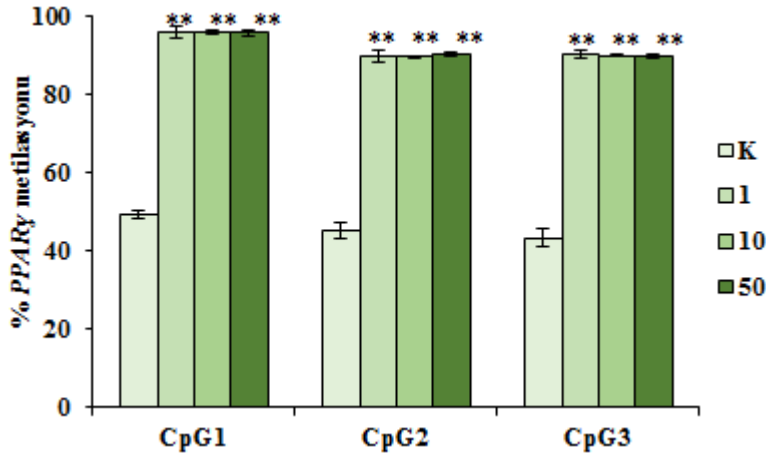


Şekil 4-10: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *PPAR γ* promotör bölgesinde % metilasyon üzerine etkisi.

K: Kontrol grubu; 1: 1 μM ZEA; 10: 10 μM ZEA; 50: 50 μM ZEA.

Tüm değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. (n=5). * kontrol grubundan önemli ölçüde farklı p<0,05;

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



Şekil 4-11: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *PPAR γ* promotör bölgesinde % metilasyon üzerine etkisi.

K: Kontrol grubu; 1: 1 μM α -ZOL; 10: 10 μM α -ZOL; 50: 50 μM α -ZOL.

Tüm değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. (n=5). * kontrol grubundan önemli ölçüde farklı p<0,05;

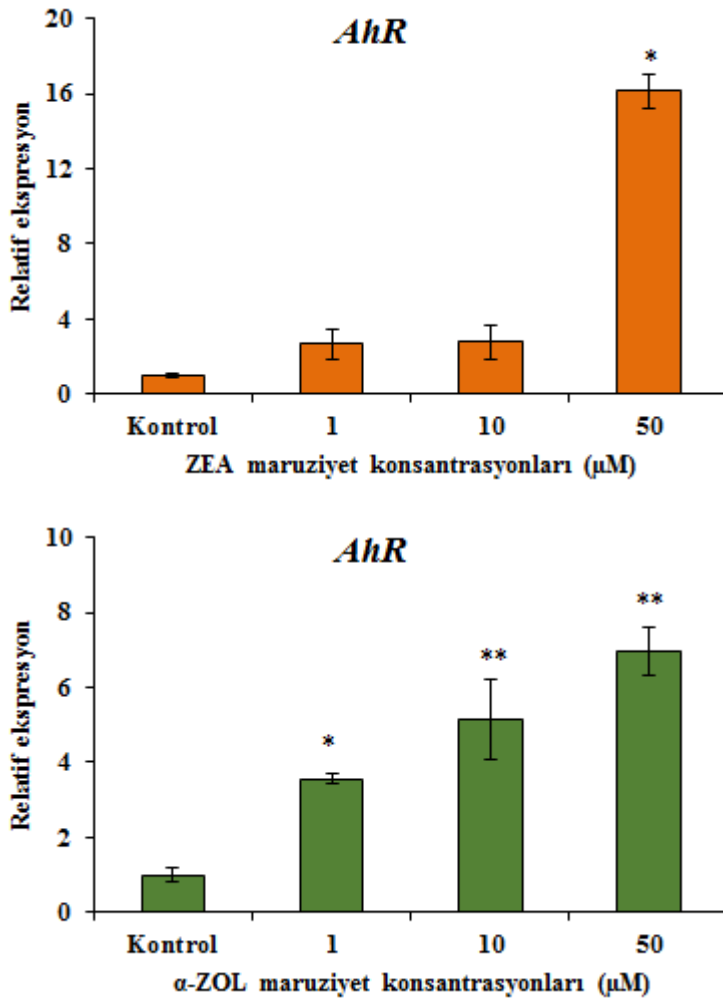
** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı p<0,001 (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

4.6. Real-Time PCR ile Gen Ekspresyonu Sonuçları

Tez çalışmasında nükleer reseptör genleri (*AhR*, *PXR*, *LXR α* , *PPAR α* , *PPAR γ* , *ER α* , *ER β*), karbonhidrat-lipit metabolizmasında rol oynayan genler (*L-fabp*, *LDLR*, *Srebp-1c*, *GAPDH*, *Glut2*, *Igf-1*, *Akt1*, *HK2*), oksidatif hasar ile ilişkili genler (*α -GST*, *HO-1*, *Hsp70*, *Nrf2*) ve DNA metiltransferazlar (*DNMT1*, *MGMT*) çalışıldı.

Çalışılan genlerden *PXR*, *ERα*, *ERβ*, *Pgc-1α*, *α-GST* ve *MGMT*'nin HepG2 hücre dizisinde kontrollerde de eksprese olmadığı görüldü. *Srebp-1c* gen ekspresyonu hem ZEA hem de α -ZOL maruziyetinde değişmezken, *Glut2* gen ekspresyonu sadece α -ZOL maruziyetinde değişiklik göstermedi.

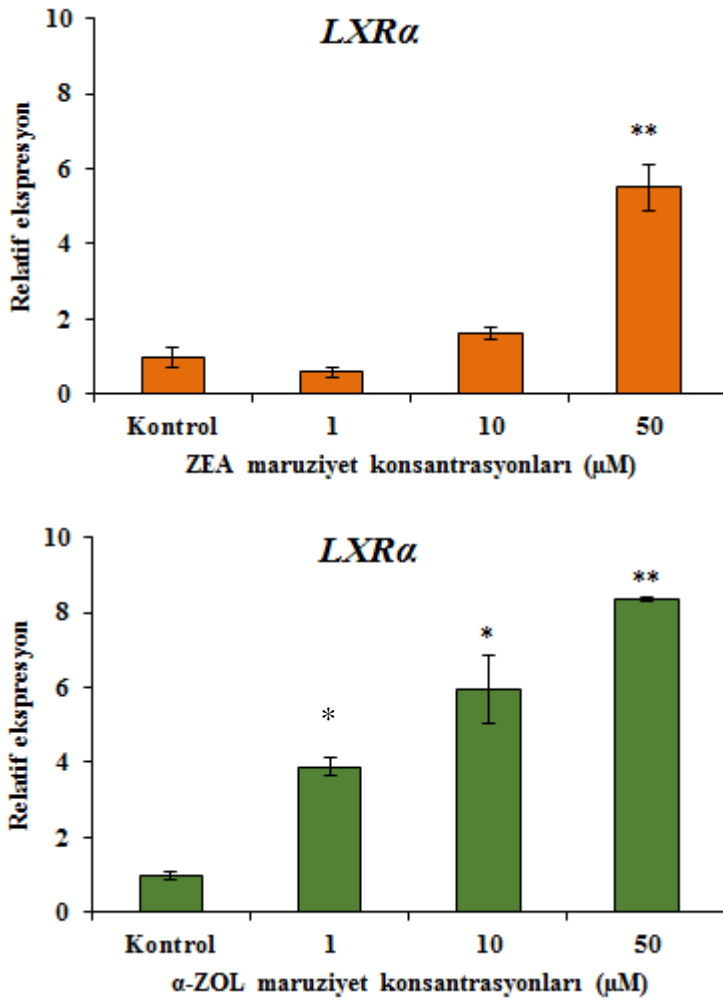
AhR geni: 24 saat 1, 10 ve 50 μ M konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *AhR* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda sırasıyla 2,7 ve 2,77 kat anlamlı olmayan artış, 50 μ M konsantrasyonda 16,14 kat ($p<0,05$) anlamlı artış tespit edildi. Aynı konsantrasyonlarda α -ZOL maruziyetinde ise sırasıyla 3,57 kat ($p<0,05$), 5,17 kat ($p<0,001$) ve 6,97 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-12).



Şekil 4-12: 24 saat 0-50 μ M konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *AhR* genine ait 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).

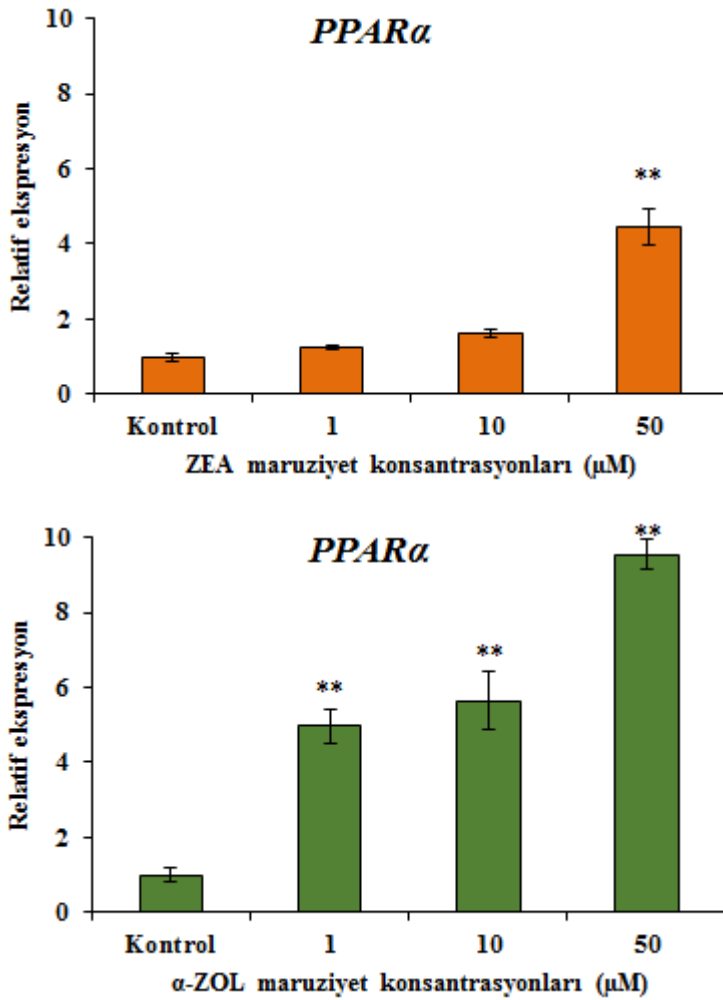
LXR α : 24 saat 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde LXR α geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 1 ve 10 μM konsantrasyonlarda sırasıyla 1,72 kat anlamlı olmayan azalma ve 1,63 kat anlamlı olmayan artış, 50 μM konsantrasyonda 5,5 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi. α -ZOL maruziyetinde ise 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonda sırasıyla 3,87 kat ($p<0,05$), 5,95 kat ($p<0,05$) ve 8,34 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-13).



Şekil 4-13: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde LXR α genine ait 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).

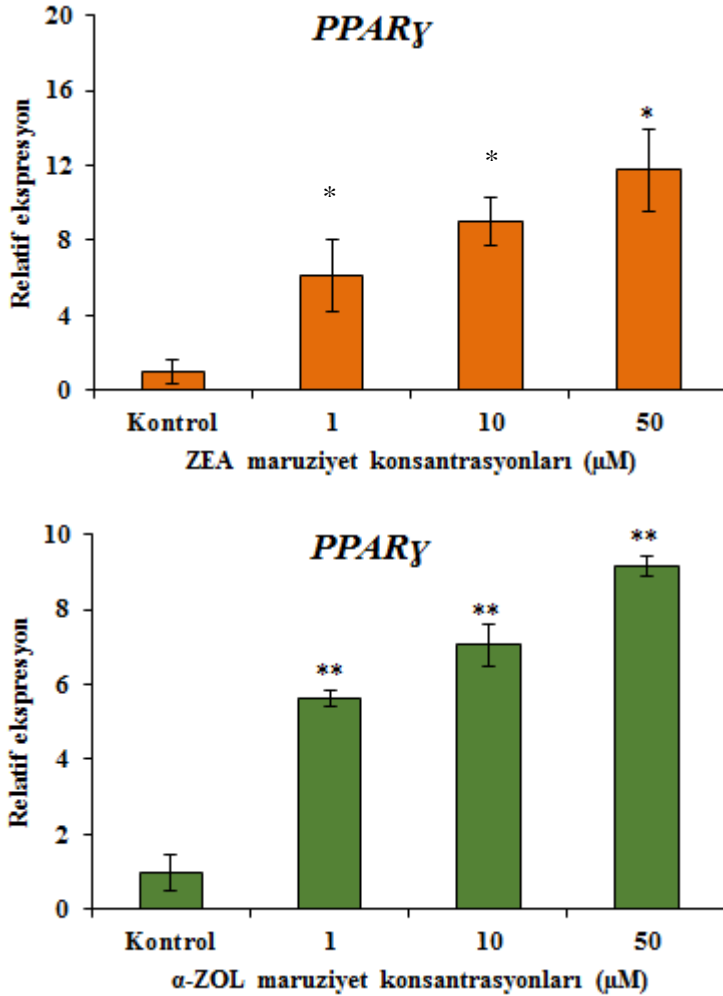
PPAR α : 24 saat 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde **PPAR α** geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 1 ve 10 μM konsantrasyonlarda sırasıyla 1,27 ve 1,63 kat anlamlı olmayan artış, 50 μM konsantrasyonda 4,45 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi. Aynı konsantrasyonlarda α -ZOL maruziyetinde ise sırasıyla 4,97 kat ($p<0,001$), 5,64 kat ($p<0,001$) ve 9,53 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-14).



Şekil 4-14: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde **PPAR α genine ait 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).

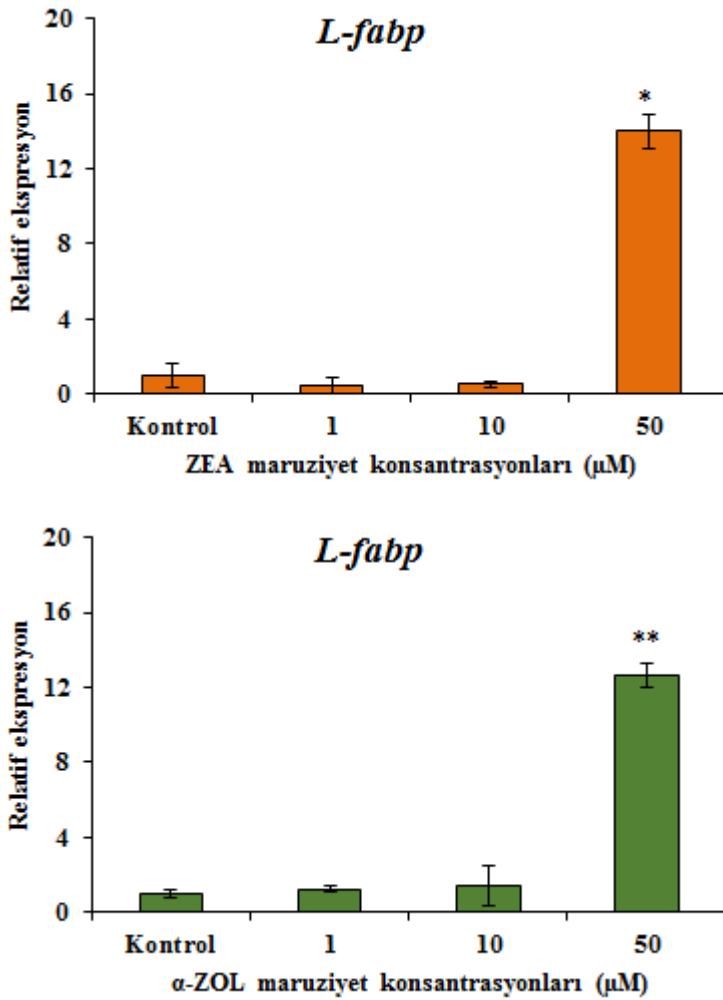
PPAR γ : 24 saat 1, 10 ve 50 μ M konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde **PPAR γ** geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; sırasıyla 6,13 kat ($p<0,05$), 8,99 kat ($p<0,05$) ve 11,78 kat ($p<0,05$) anlamlı artış tespit edildi. Aynı konsantrasyonlarda α -ZOL maruziyetinde ise sırasıyla 5,64 kat ($p<0,001$), 7,05 kat ($p<0,001$) ve 9,16 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-15).



Şekil 4-15: 24 saat 0-50 μ M konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde **PPAR γ genine ait 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).

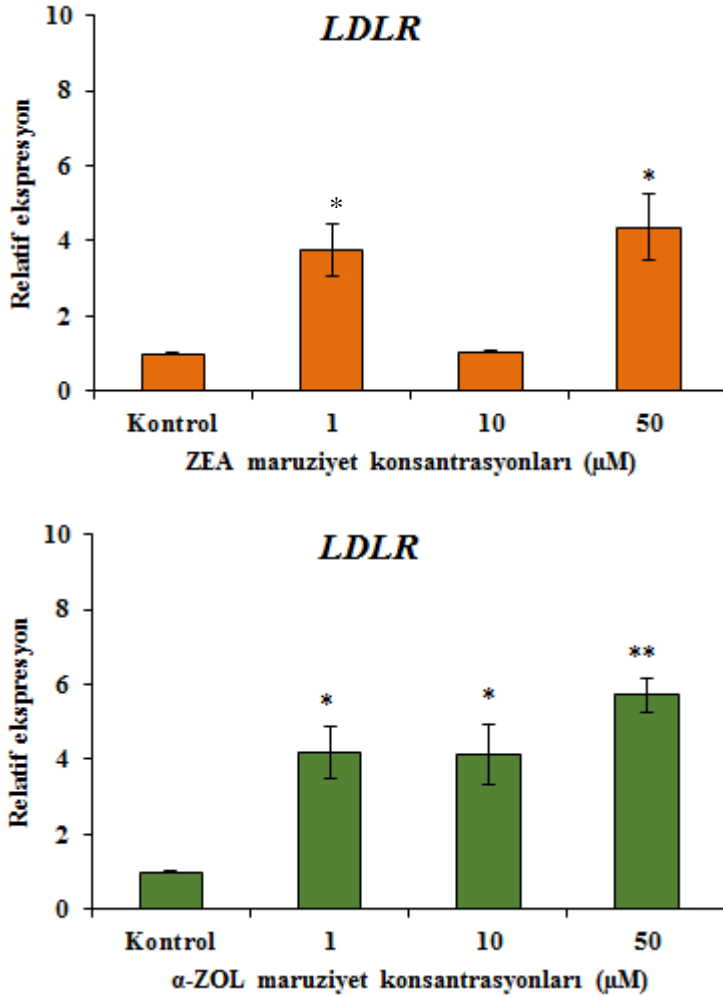
L-fabp: 24 saat 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *L-fabp* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 1 ve 10 μM konsantrasyonlarda sırasıyla 2,22 ve 1,85 kat anlamlı olmayan azalma, 50 μM konsantrasyonda 13,99 kat ($p<0,05$) anlamlı artış tespit edildi. α -ZOL maruziyetinde ise 1 ve 10 μM konsantrasyonlarda sırasıyla 1,25 ve 1,4 kat anlamlı olmayan artış, 50 μM konsantrasyonda 12,66 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-16).



Şekil 4-16: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *L-fabp* genine ait 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).

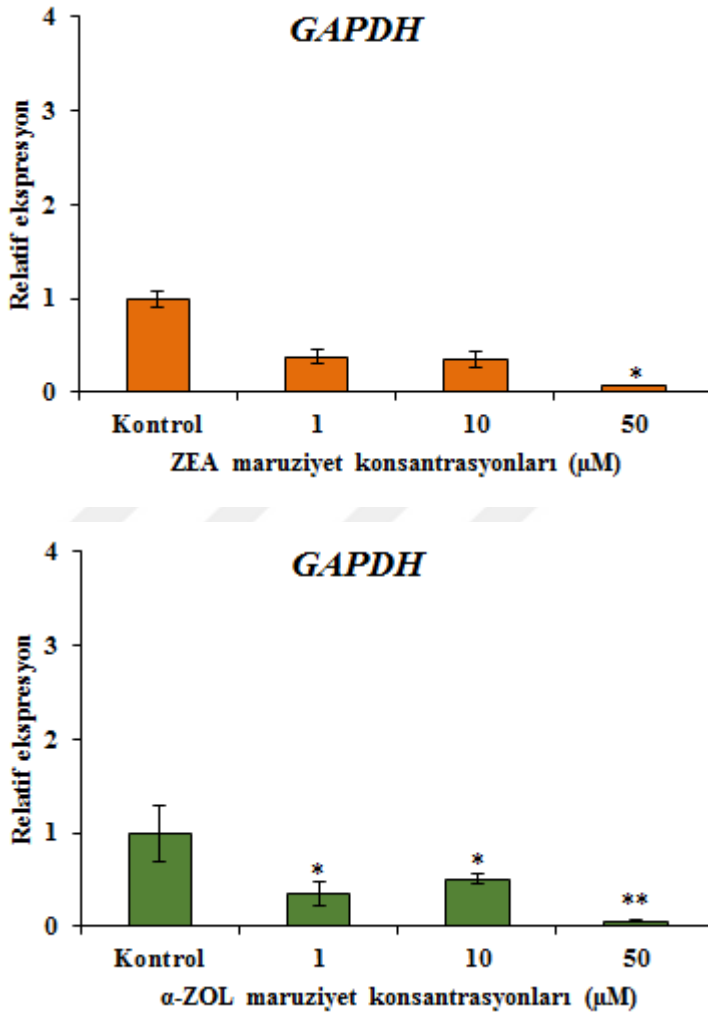
LDLR: 24 saat 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *LDLR* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 1 μM konsantrasyonda 3,75 kat ($p<0,05$), 10 μM konsantrasyonlarda 1,05 kat anlamlı olmayan artış, 50 μM konsantrasyonda 4,37 kat ($p<0,05$) anlamlı artış tespit edildi. Aynı konsantrasyonlarda α -ZOL maruziyetinde ise sırasıyla 4,17 kat ($p<0,05$), 4,13 kat ($p<0,05$) ve 5,71 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-17).



Şekil 4-17: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *LDLR* genine ait 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).

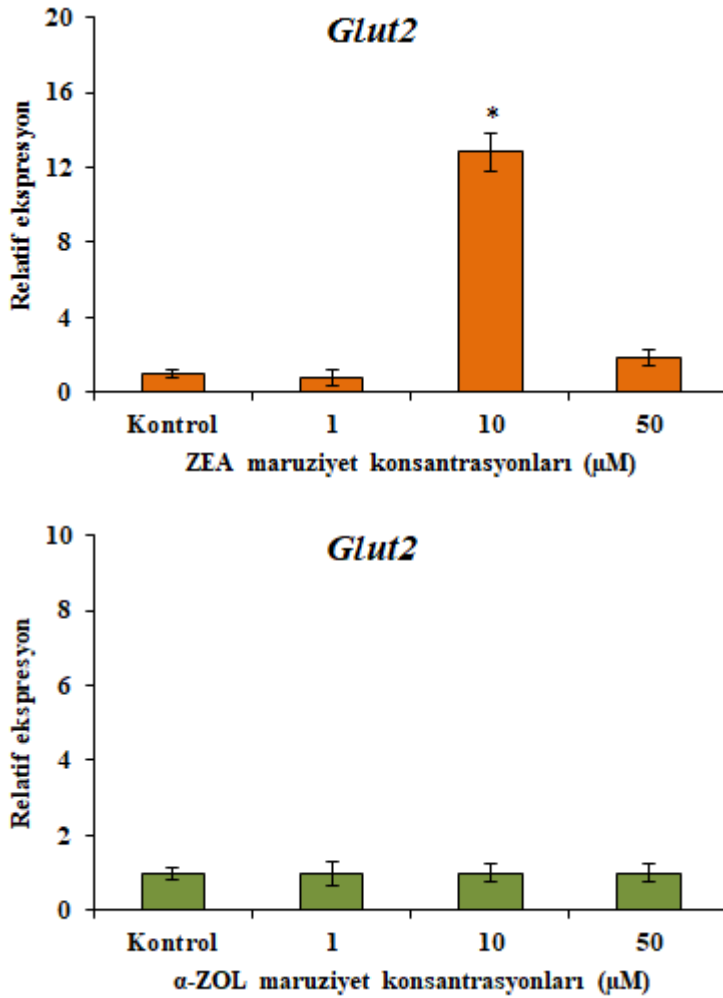
GAPDH: 24 saat 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *GAPDH* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 1 ve 10 μM konsantrasyonlarda sırasıyla 2,63 ve 2,94 kat anlamlı olmayan azalma, 50 μM konsantrasyonda 14,7 kat ($p<0,05$) anlamlı azalma tespit edildi. Aynı konsantrasyonlarda α -ZOL maruziyetinde ise sırasıyla 2,86 kat ($p<0,05$), 1,96 kat ($p<0,05$) ve 16,66 kat ($p<0,001$) anlamlı azalma tespit edildi (Şekil 4-18).



Şekil 4-18: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *GAPDH* genine ait 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).

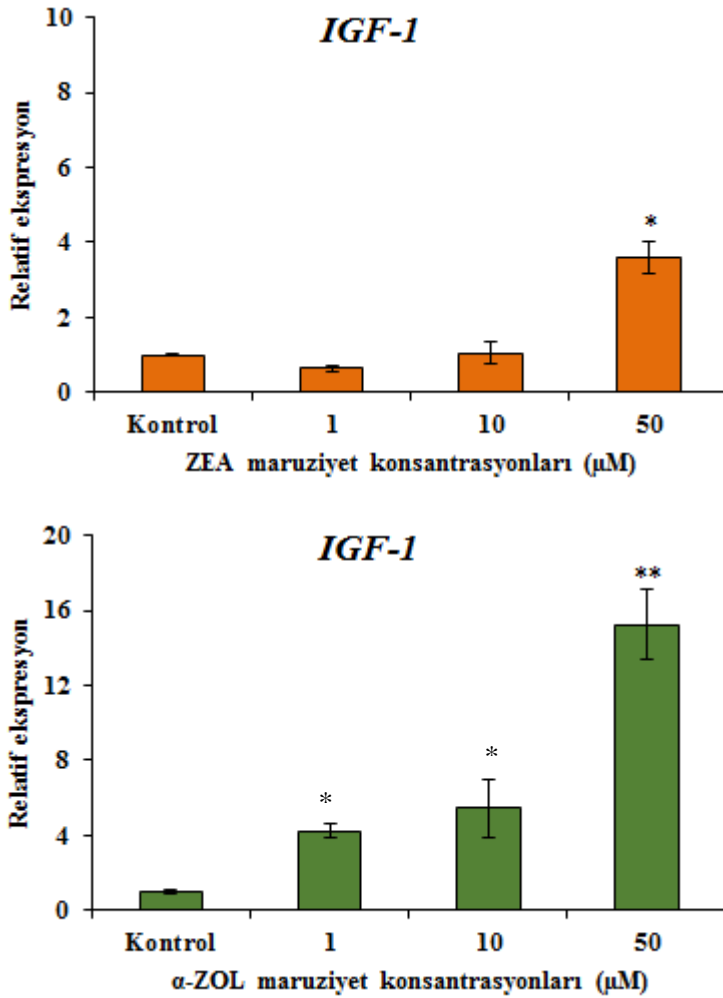
Glut2: 24 saat 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *Glut2* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 1 μM ve 50 μM konsantrasyonlarda sırasıyla, 1,28 kat anlamlı olmayan azalma ve 1,89 kat anlamlı olmayan artış, 10 μM konsantrasyonda 12,82 kat ($p<0,05$) anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-19). α -ZOL maruziyetinde ise tüm maruziyet gruplarında kontrole kıyasla ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlenmedi (Şekil 4-19).



Şekil 4-19: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *Glut2* genine ait 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).

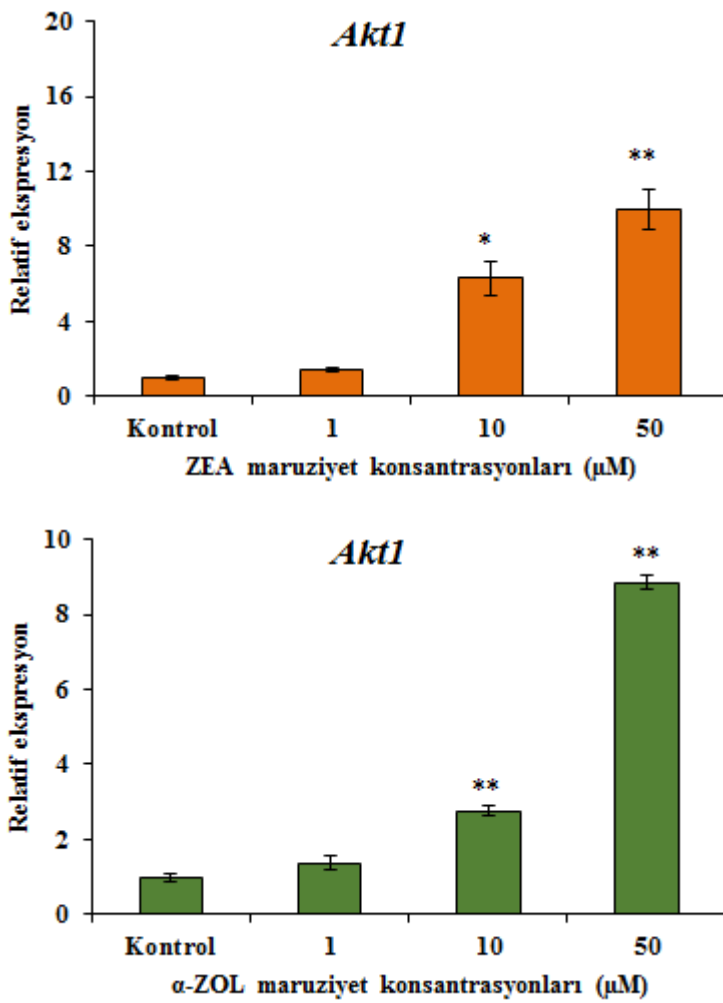
IGF-1: 24 saat 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *IGF-1* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 1 ve 10 μM konsantrasyonlarda sırasıyla 1,56 kat anlamlı olmayan azalma ve 1,05 kat anlamlı olmayan artış, 50 μM konsantrasyonda 3,61 kat ($p<0,05$) anlamlı artış tespit edildi. α -ZOL maruziyetinde ise sırasıyla 4,25 kat ($p<0,05$), 5,43 kat ($p<0,05$) ve 15,26 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-20).



Şekil 4-20: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *IGF-1* genine ait 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).

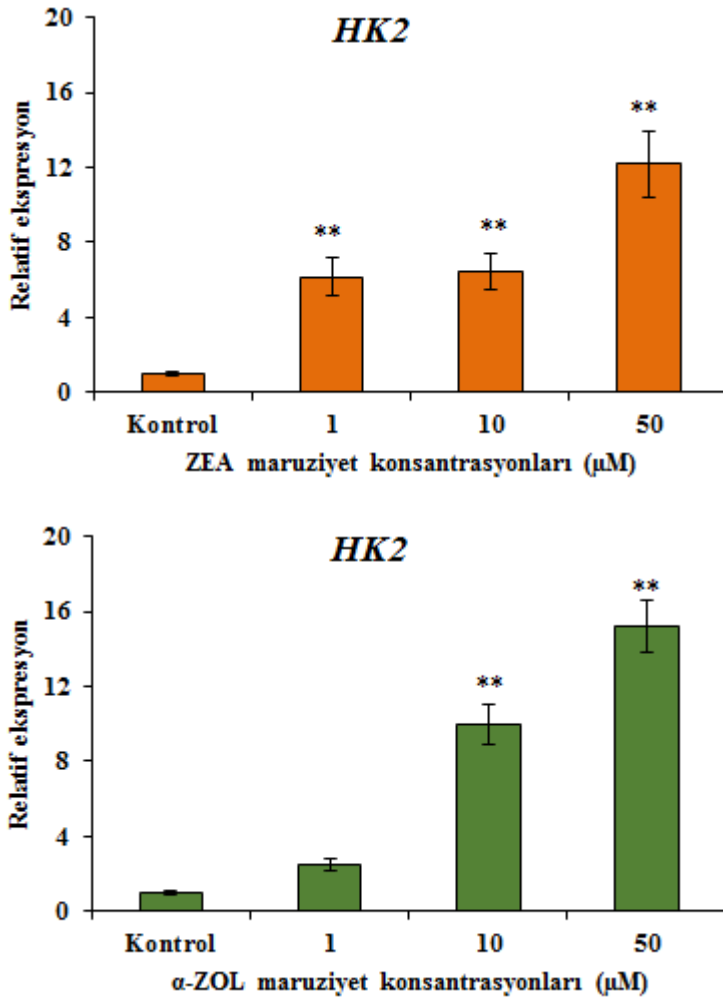
Akt1: 24 saat 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *Akt1* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 1 μM konsantrasyonda 1,44 kat anlamlı olmayan artış, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda sırasıyla 6,32 kat ($p<0,05$) ve 9,94 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi. α -ZOL maruziyetinde ise 1 μM konsantrasyonda 1,37 kat anlamlı olmayan artış, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda sırasıyla 2,76 kat ($p<0,001$) ve 8,83 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-21).



Şekil 4-21: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *Akt1* genine ait 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).

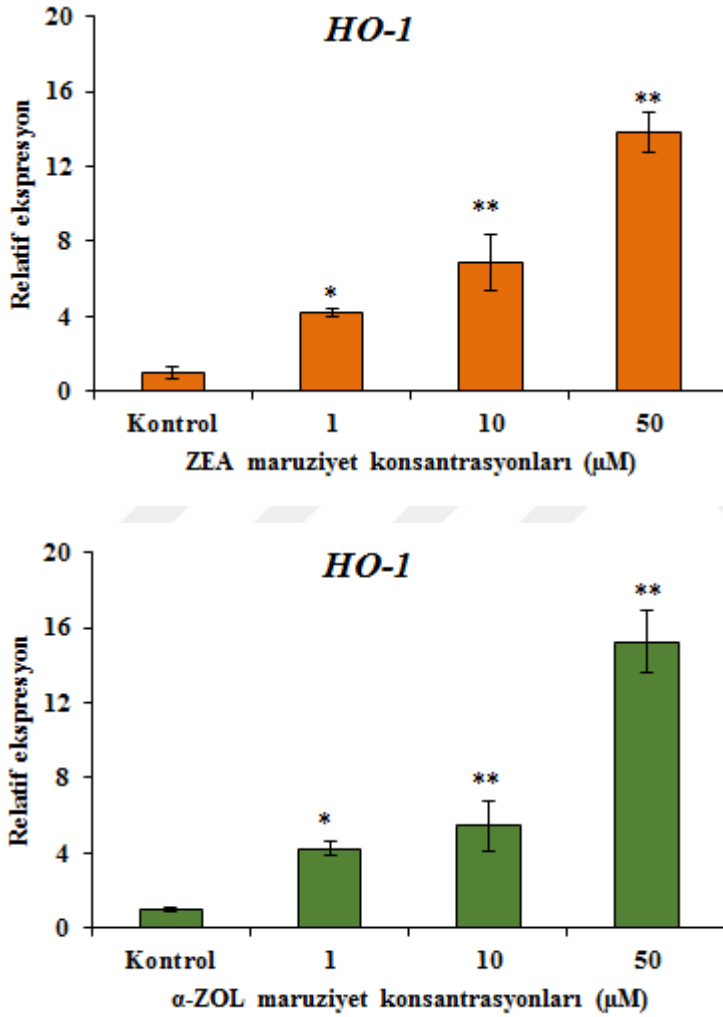
HK2: 24 saat 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *HK2* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; sırasıyla 6,15 kat ($p<0,001$), 6,44 kat ($p<0,001$) ve 12,18 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi. α -ZOL maruziyetinde ise 1 μM konsantrasyonda 2,51 kat anlamlı olmayan artış, 10 μM ve 50 μM konsantrasyonda sırasıyla 9,96 kat ($p<0,001$) ve 15,23 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-22).



Şekil 4-22: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *HK2* genine ait 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).

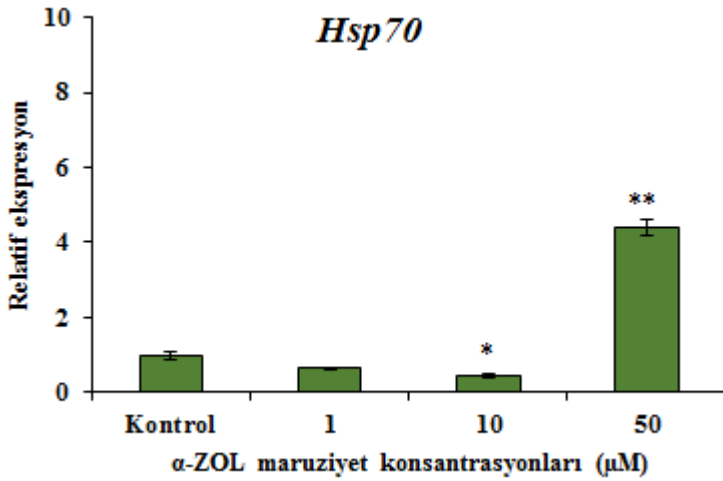
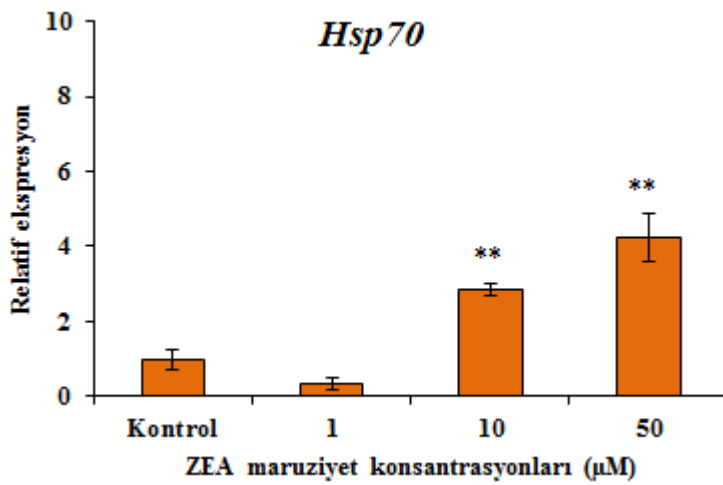
HO-1: 24 saat 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *HO-1* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; sırasıyla 4,19 kat ($p<0,05$), 6,86 kat ($p<0,001$) ve 13,85 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi. α -ZOL maruziyetinde ise 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda sırasıyla 4,25 kat ($p<0,05$), 5,43 kat ($p<0,001$) ve 15,26 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-23).



Şekil 4-23: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *HO-1* genine ait 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).

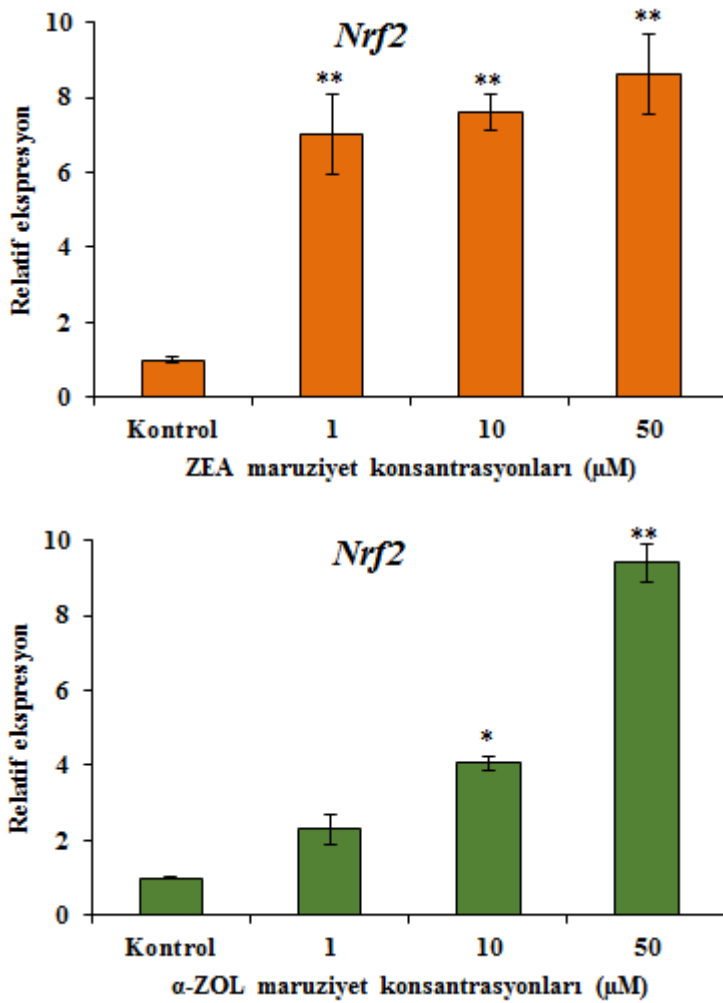
Hsp70: 24 saat 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *Hsp70* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 1 μM konsantrasyonda 3,03 kat anlamlı olmayan azalma, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda sırasıyla 2,84 kat ($p<0,001$) ve 4,23 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi. α -ZOL maruziyetinde ise 1 μM konsantrasyonda 1,54 kat anlamlı olmayan azalma, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda sırasıyla 2,13 kat ($p<0,05$) anlamlı azalma ve 4,41 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-24).



Şekil 4-24: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *Hsp70* genine ait 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).

Nrf2: 24 saat 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *Nrf2* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; sırasıyla 7,01 kat ($p<0,001$), 7,61 kat ($p<0,001$) ve 8,62 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi. α -ZOL maruziyetinde ise 1 μM konsantrasyonda 2,3 kat anlamlı olmayan artış, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda sırasıyla 4,06 kat ($p<0,05$) ve 9,4 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-25).

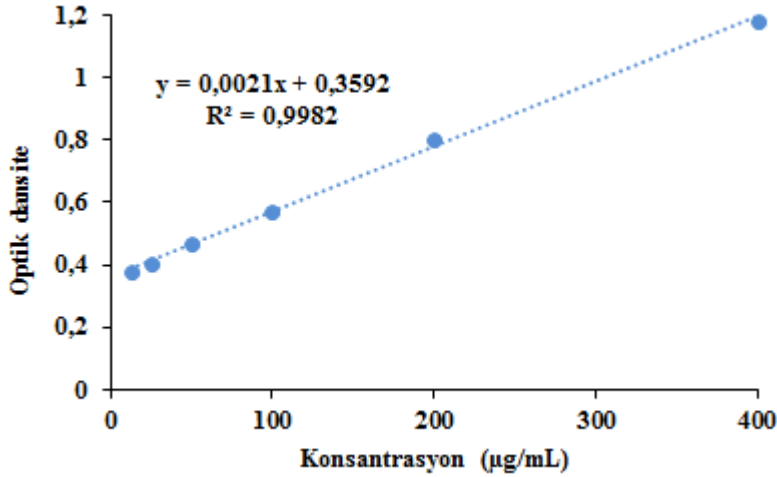


Şekil 4-25: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *Nrf2* genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.

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).

4.7. Protein Miktar Tayini Sonuçları

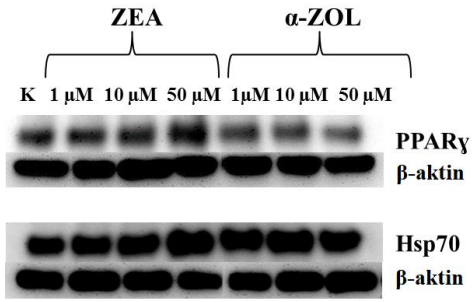
Protein ve histon proteinlerinin miktarı standart olarak BSA kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisi üzerinden hesaplandı. Bölüm 3.11.3'te anlatıldığı şekilde hazırlanan konsantrasyonları 8, 10, 20, 40, 80 µg/mL olan BSA standart çözeltileri ile çizilen standart ölçü eğrisi Şekil 4-26'da verilmiştir.



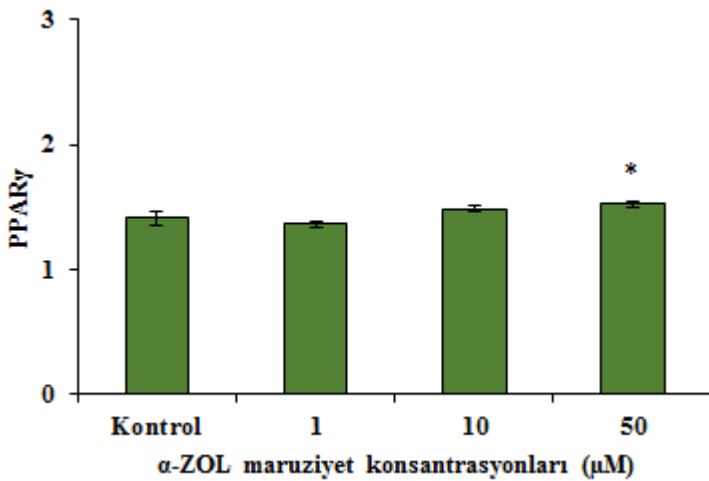
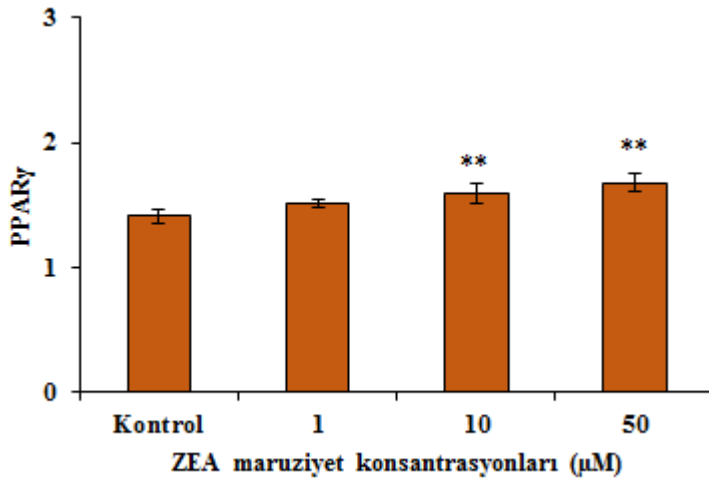
Şekil 4-26: Protein standart ölçü eğrisi.

4.8. Western Blot Tekniği ile PPAR γ ve Hsp70 Proteinlerinin Ekspresyon Sonuçları

ZEA ve α -ZOL maruziyeti sonucu PPAR γ ve Hsp70 için western blot yöntemiyle yapılan protein analizinden elde edilen membran görüntüleri Şekil 4-27'de verilmiştir. 24 saat 1, 10 ve 50 µM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde PPAR γ protein ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 1 µM konsantrasyonda 1,07 kat anlamlı olmayan artış, 10 ve 50 µM konsantrasyonlarda sırasıyla 1,14 kat ($p < 0,001$) ve 1,2 kat ($p < 0,001$) anlamlı artış tespit edildi. α -ZOL maruziyetinde ise 1 ve 10 µM konsantrasyonda sırasıyla, 1,03 kat anlamlı olmayan azalma ve 1,06 kat anlamlı olmayan artış, 50 µM konsantrasyonlarda 1,08 kat ($p < 0,05$) anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-28).



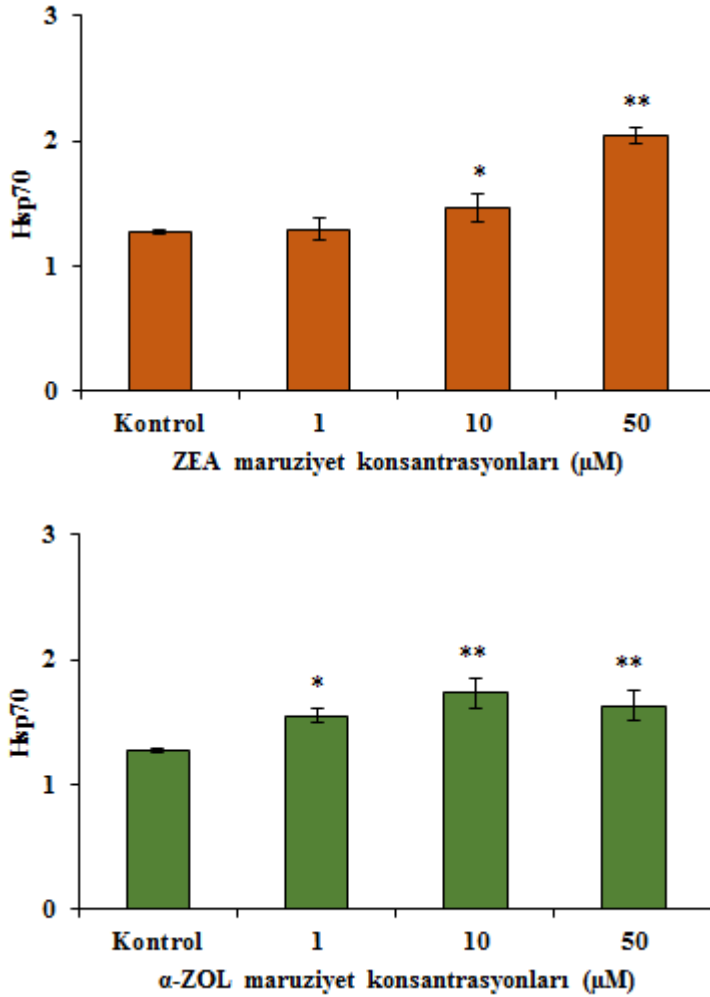
Şekil 4-27: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve $\alpha\text{-ZOL}$ maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde PPAR γ ve Hsp70 western blot membran görüntüleri.



Şekil 4-28: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve $\alpha\text{-ZOL}$ maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde PPAR γ protein ekspresyonuna ait 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).

24 saat 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde Hsp70 protein ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 1 μM konsantrasyonda 1,02 kat anlamlı olmayan artış, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda sırasıyla 1,16 kat ($p<0,05$) ve 1,62 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi. α -ZOL maruziyetinde ise 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda sırasıyla, 1,23 kat ($p<0,05$), 1,37 kat ($p<0,001$) ve 1,29 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-29).

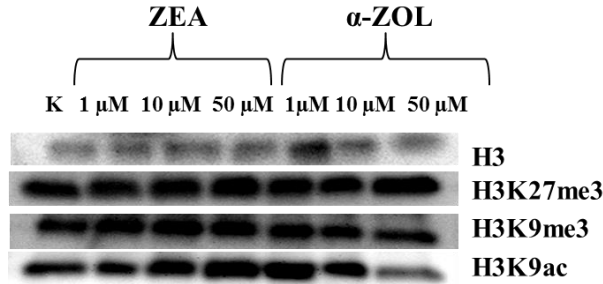


Şekil 4-29: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde Hsp70 protein ekspresyonuna ait relatif ekspresyon seviyeleri.

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).

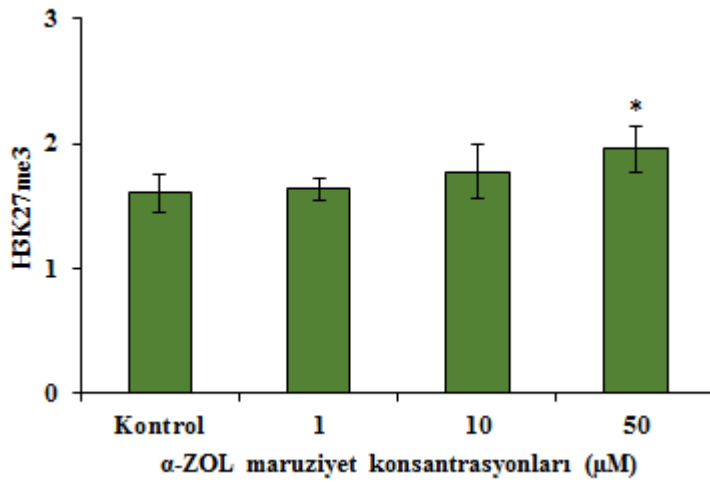
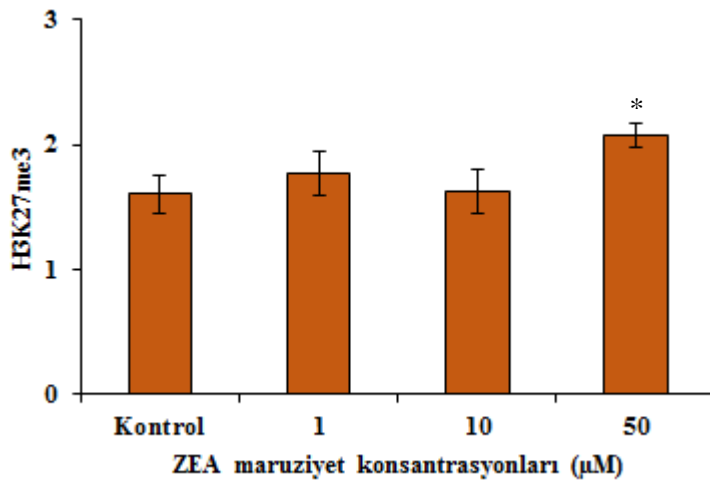
4.9. Western Blot Tekniği ile Global Histon Modifikasyonları Sonuçları

ZEA ve α -ZOL maruziyeti sonucu H3K27me3, H3K9me3 ve H3K9ac için western blot yöntemi ile yapılan protein analizinden elde edilen membran görüntüleri Şekil 4-30'da verilmiştir.



Şekil 4-30: 24 saat 0-50 μ M konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde global histon modifikasyonları için western blot membran görüntüleri.

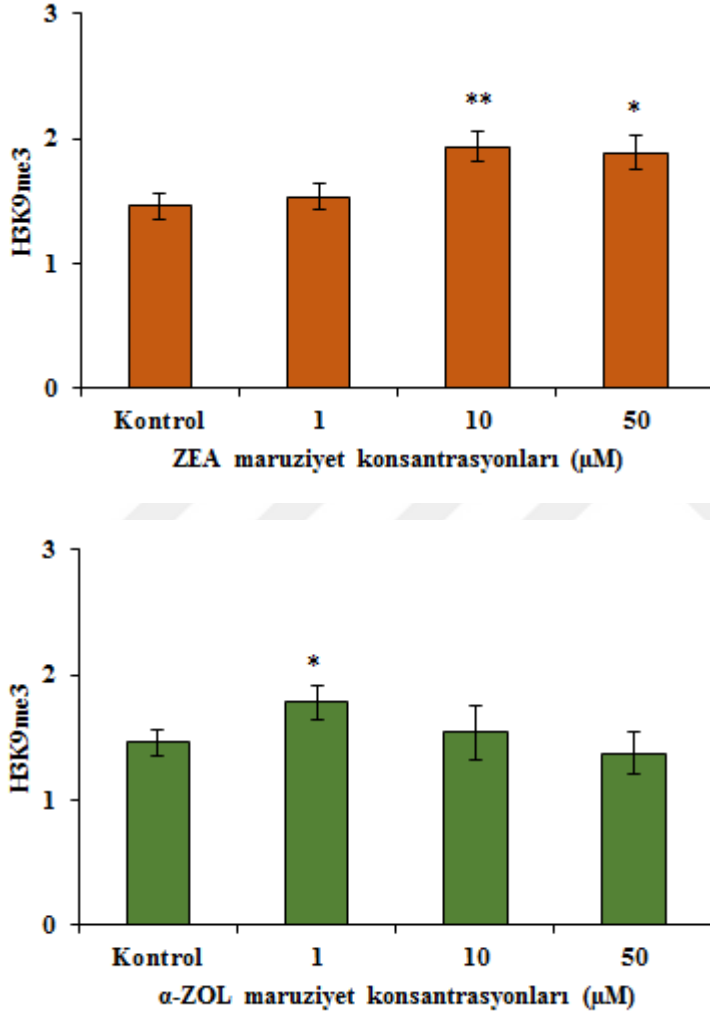
24 saat 1, 10 ve 50 μ M konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde H3K27me3 seviyesinde kontrol grubuna kıyasla; 1 ve 10 μ M konsantrasyonda sırasıyla, 1,07 kat ve 1,01 kat anlamlı olmayan artış, 50 μ M konsantrasyonda 1,13 kat ($p < 0,05$) anlamlı artış tespit edildi. α -ZOL maruziyetinde ise 1 ve 10 μ M konsantrasyonda sırasıyla, 1,02 kat ve 1,11 kat anlamlı olmayan artış, 50 μ M konsantrasyonda 1,23 kat ($p < 0,05$) anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-31).



Şekil 4-31: 24 saat 0-50 µM konsantrasyon aralığında ZEA ve α-ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde H3K27me3 global histon modifikasyonuna ait relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± 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).

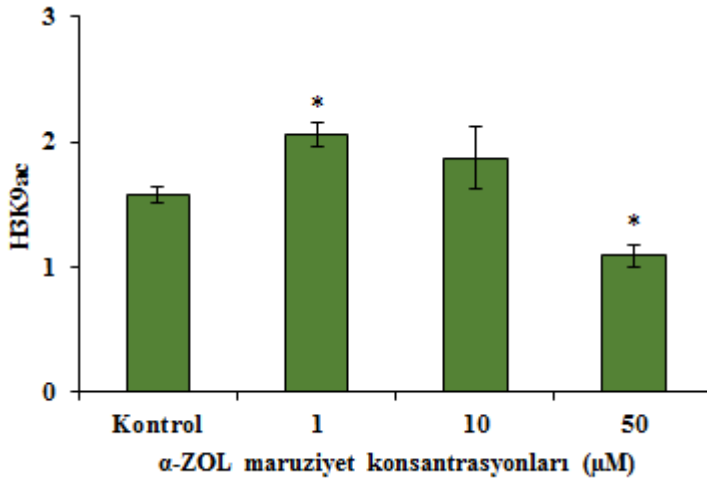
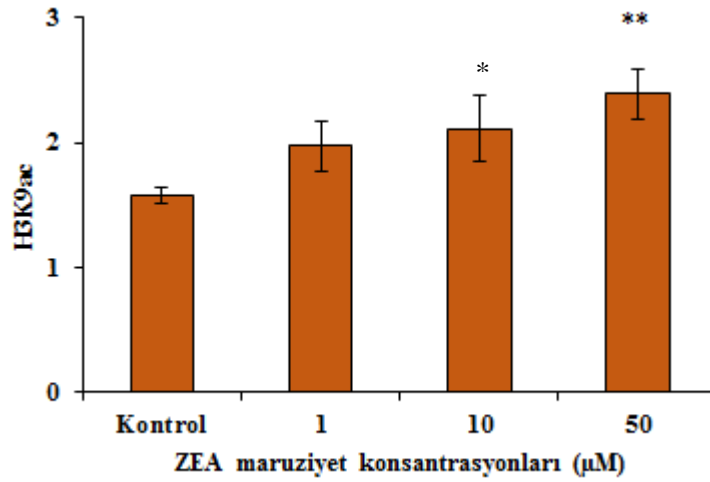
24 saat 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde H3K9me3 seviyesinde 1 μM konsantrasyonda 1,05 kat anlamlı olmayan artış, 10 ve 50 μM konsantrasyonda sırasıyla 1,32 kat ($p<0,001$) ve 1,29 kat ($p<0,05$) anlamlı artış tespit edildi. α -ZOL maruziyetinde ise 1 μM konsantrasyonda 1,22 kat ($p<0,05$) anlamlı artış, 10 μM konsantrasyonda 1,05 kat anlamlı olmayan artış ve 50 μM konsantrasyonda 1,06 kat anlamlı olmayan azalma tespit edildi (Şekil 4-32).



Şekil 4-32: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde H3K9me3 global histon modifikasyonuna ait 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).

24 saat 1, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde H3K9ac seviyesinde 1 μM konsantrasyonda 1,25 kat anlamlı olmayan artış, 10 ve 50 μM konsantrasyonda sırasıyla 1,33 kat ($p<0,05$) ve 1,51 kat ($p<0,001$) anlamlı artış tespit edildi. α -ZOL maruziyetinde ise 1 μM konsantrasyonda 1,3 kat ($p<0,05$) anlamlı artış, 10 μM konsantrasyonda 1,18 kat anlamlı olmayan artış ve 50 μM konsantrasyonda 1,45 kat ($p<0,05$) anlamlı azalma tespit edildi (Şekil 4-33).



Şekil 4-33: 24 saat 0-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde H3K9ac global histon modifikasyonuna ait 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

Organizmaya dışarıdan alınarak endokrin fonksiyonları ve homeostazı bozan, doğal ya da sentetik maddeler endokrin bozucu kimyasallar (EDC) olarak adlandırılır. EDC'ler hormon yapımını, taşınmasını, yıkımını ve atılımını değiştirebildikleri gibi hedef hücrelerdeki etkilerini de değiştirmektedir (Choi ve Jeung, 2003). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, endokrin etkiler gösteren çevresel kimyasalların gen ifadesindeki değişiklikler üzerindeki rolünün epigenetik mekanizmalar ile de ilişkili olabileceği ortaya çıkmaktadır (Fleisch ve ark., 2012; Grealley ve Jacobs, 2013).

Endokrin bozucu olduğu bilinen nonsteroidal östrojenik bir mikotoksin olan ZEA, *Fusarium* türleri tarafından üretilir. ZEA, mısır, buğday, arpa, sorgum, çavdar ve diğer tahıllarda yaygın olarak görülen bir mikotoksindir. İnsanlar için ZEA maruziyetinin ana kaynakları olarak; tahıllar, öğütülmüş tahıl ürünleri, kahvaltılık gevrekler, fırıncılık ürünleri ve atıştırılmalıklar, bebek mamaları, mısır tohumu yağı, buğday tohumu yağı, ekmek, rulolar ve makarna gibi tahıl bazlı ürünler kabul edilmektedir (EFSA, 2011). ZEA, çeşitli hayvan türlerinde özellikle domuzlarda, hiperöstrojenik aktivite sendromu ile sonuçlanan östrojen reseptörlerinin aktivasyonuna neden olur (Kuiper-Goodman ve ark., 1987). Bu etki ile fertilitede azalma, embriyoletal etkide artma ve yavru büyüklüğünde azalmanın yanı sıra adrenal ve hipofiz bezlerinin ağırlığında değişiklikler de gözlenmiştir (Katzenellenbogen ve ark., 1979; Etienne ve Jemali, 1982). ZEA'nın hepatik fonksiyonla ilişkili çeşitli enzimatik parametreleri etkilediği de bildirilmiştir (Conkova ve ark., 2001). Ayrıca, ZEA sıçanlarda hematolojik parametrelerin modifikasyonları ve kan pıhtılaşma sürecinin işlev bozukluğu gibi ciddi hematotoksik etkilere yol açtığı gösterilmiştir (Maaroufi ve ark., 1996). ZEA maruziyeti ile üreme ve gelişim fonksiyon bozukluklarına ek olarak, immünotoksik, nörotoksik ve nefrotoksik etkiler de görülebilmektedir (bkz. Bölüm 2.6). Bununla birlikte, ZEA'nın çeşitli test sistemlerinde ve *in vitro* çalışmalarda genotoksik ve oksidatif hasar indükleyici etkileri gösterilmiştir (Ghedira-Chekir ve ark., 1998; Abid-Essefi ve ark., 2009; El Golli Bennour ve ark., 2009; Ayed ve ark., 2011; Fleck ve ark., 2012; Liu ve ark., 2014; Qin ve ark., 2015; Fan ve ark., 2017).

Tez çalışmasında ZEA'nın toksik etkilerinde epigenetik mekanizmaların rolünün araştırılması amaçlanmıştır. ZEA'nın günümüzde önemli sağlık sorunlardan

biri olan metabolik hastalıklar üzerine olası etkilerinde epigenetik mekanizmaların rolünün araştırılması odak noktası olmuştur. Bu amaçla, tez çalışmasında HepG2 hücre dizisinde ZEA ve metaboliti olan α -ZOL'ün belirli konsantrasyonlarda hücelere maruziyeti sonucu; 1) sitotoksik etkileri, 2) global DNA metilasyonu, 3) metabolik yollarda rol oynayan genlerde mRNA seviyeleri, 4) *PPAR γ* promotör bölge DNA metilasyonu ve 5) global histon modifikasyonları üzerine etkileri araştırıldı. Böylelikle, belirlenen genler aracılığıyla ZEA ve metabolitinin metabolik yollar ile ilişkisi açıklanmaya çalışılmıştır.

Tez çalışmasında, 24 saat süre ile 0-250 μ M konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL'ün HepG2 hücre dizisinde hücre canlılığı üzerine etkilerini değerlendirmek için MTT ve NRU testleri yapılmıştır. 250 μ M'dan yüksek konsantrasyonlarda ZEA ve α -ZOL'ün oldukça sitotoksik olduğu ve hücrelerin büyük bir oranında ölüme neden olduğu gözlenmiştir. Bu sebeple daha düşük konsantrasyonlardaki etkilerini görmek amacıyla 250 μ M'dan düşük konsantrasyonlarda çalışıldı. HepG2 hücrelerinde MTT ve NRU testlerinde IC_{50} değerleri ZEA için sırasıyla 143,35 ve 60,45 μ M ve α -ZOL için ise 111,42 ve 35,73 μ M olarak belirlendi. Bu sonuçlara göre α -ZOL'ün ZEA'ya göre daha sitotoksik olduğu gözlemlendi. Benzer şekilde, 24 saat süre ile 0-200 μ M konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde IC_{50} değeri yaklaşık olarak 95 μ M bulunmuştur (Hassen ve ark., 2005). El Golli Bennour ve ark. (2008)'nin HepG2 hücrelerinde yaptığı bir çalışmada, 24 saat 0-120 μ M konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti sonucu IC_{50} değeri 110 μ M olarak tespit edilmiştir. Başka bir karaciğer hücre dizisi olan CCL13 hücrelerinde ise 24 saat süre ile 0-200 μ M konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti sonucu IC_{50} değeri 100 μ M olarak belirlenmiştir (Lee ve ark., 2013). Tatay ve ark. (2014) tarafından, Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinde (CHO-K1) 24, 48 ve 72 saat süre ile 0-100 μ M konsantrasyon aralığında ZEA ve metabolitlerinin sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada 24 saat maruziyet sonucu, ZEA için IC_{50} değeri >100 μ M, α -ZOL için 33 μ M olarak bildirilmiş olup, bu çalışmada tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ile uyumlu olarak α -ZOL'ün daha toksik olduğu bildirilmiştir. MA-10 fare Leydig tümör hücre dizisinde 48 saat süre ile 0,1-64 μ M konsantrasyon aralığında α -ZOL için IC_{50} değeri 28 μ M olarak belirlenmiş ve OTA'dan bile daha toksik olduğu gösterilmiştir (Eze ve ark., 2018). ZEA ve faz I metabolitleri, α -ZOL ve β -ZOL'ün sitotoksik etkilerini doğrulayan çok sayıda

çalışmaya rağmen sitotoksik etkilerinin hücre tipine ve maruziyet süresine bağlı olduğu gözlenmektedir (Bryła ve ark., 2018).

ZEA ve metaboliti α -ZOL'ün hücre proliferasyonu üzerine etkilerini incelemek amacıyla 24 saat 0, 1, 10, 50 μ M konsantrasyon aralığında maruziyet yapılarak BrdU testi gerçekleştirilmiştir. Kontrole kıyasla relatif hücre proliferasyonunda ZEA, sırasıyla %7,2, %20,59 ve %41,71 oranlarında; α -ZOL ise, sırasıyla %11,78, %26,18 ve %44,33 oranlarında anlamlı artışa neden oldu. ZEA'nın hücre proliferasyonunu tetikleyebileceği bildirilmiş olup, daha önce yapılmış çalışmalar ile tez çalışmasından elde edilen sonuçların uyumlu olduğu görülmektedir. İnsan kolon kolorektal karsinoma hücre dizisi HCT116 hücrelerinde, 24 ve 48 saat 1 nM - 1 μ M konsantrasyon aralığında ZEA maruziyetinin hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Abassi ve ark., 2016). İnsan meme kanseri hücre dizisi MCF-7 hücrelerinde 0,1 pM - 0,1 μ M konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyetinin hücre proliferasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Minervini ve ark., 2005). MCF-7 hücrelerinde gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise, 6,25-25 μ M konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyetinin hücre proliferasyonunun artmasına neden olduğu gösterilmiştir (Tatay ve ark., 2017a). Tez çalışması sonucuna benzer olarak her iki çalışmada da α -ZOL'ün hücre proliferasyonu üzerine etkisi ZEA'dan daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, α -ZOL'ün ER'lere daha yüksek afiniteyle bağlanması ve östrojenik aktivitesinin daha yüksek olmasına bağlanmaktadır (Minervini ve ark., 2005; Tatay ve ark., 2017a). Ayrıca, hücre proliferasyonundaki artışın NAFLD ve obezite gibi metabolik hastalıklar ile ilişkili olabileceği vurgulanmıştır. Örneğin, insan ve fare doku örneklerinde yapılan analizlerde, kontrollere kıyasla steatozun gelişiminde hepatosellüler proliferasyonda belirgin bir artış tespit edilmiş ve bu durumun NAFLD'nin ilerlemesinde ve komplikasyonlarında önemli rol oynayabileceği belirtilmiştir (Vansaun ve ark., 2013). İnsanlarda karaciğer kanserinin kısmen obezite ve ilgili metabolik hastalıklarla ilişkili olabileceği vurgulanmaktadır. Hepatik hücre proliferasyonunun artışının doğrudan kanser oluşumuna sebep olmasa bile karsinogenez duyarlılığını arttırabileceği öne sürülmüştür (Iatropoulos ve ark., 2013). Başka bir EDC olan bisfenol A (BPA)'nın T2DM'li veya T2DM'siz NAFLD'li hastaların idrar ve plazmalarında yüksek seviyede olduğu bulunmuş, aynı zamanda HepG2 hücrelerinde hücre proliferasyonunu tetiklediği görülmüştür. Bu çalışmada T2DM'li hastalarda NAFLD'nin gelişmesinde rol oynayan

çevresel bir faktör olarak BPA'nın olası rolünü ortaya koyulmuştur (Dallio ve ark., 2018).

Endojen östrojenler gibi, ZEA ve metaboliti α -ZOL belirgin bir östrojenik aktivite sergilemesi ve ikisinin de aromatik hidroksilasyonla katekol metabolitlerine dönüşmesi hücre içi oksidatif hasarı arttırmasının temel nedeni olarak görülmektedir. COMT ile katekollerin metilasyonu, genellikle detoksifiye edici bir yolak olarak kabul edilir. Ancak enzim aktivitesi ile ilgili aktivasyon ve inaktivasyon reaksiyonları arasındaki dengesizlikler, DNA'yı alkilleyebilen veya ROS üretebilen reaktif semikinonlar ve kinonların oluşumuna yol açabilmektedir (Fleck ve ark., 2012). Tez çalışmasında, 50 μ M konsantrasyonda ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde kontrole kıyasla ROS üretiminde sırasıyla %48,1 ve %49,6 oranında anlamlı artış tespit edildi. Benzer bir şekilde, Tatay ve ark. (2017b) DCF-DA boyama yöntemi ile 0-25 μ M konsantrasyon aralığında 2 saat süre ile ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde ROS üretiminin doza bağlı olarak arttığını göstermiştir. H9c2 kardiyomyoblast hücrelerinde 24 saat süre ile 50 μ M ZEA ve 75 μ M α -ZOL maruziyetinin hücre içi ROS üretimini önemli derecede tetiklediği gösterilmiştir (Ben Salem ve ark., 2016). ZEA (20 μ M)'nın domuz böbrek PK15 hücre dizisinde ve ZEA (7 ve 8 μ g/mL)'nin domuz ince bağırsak IPEC-J2 hücre dizisinde ROS ve MDA üretimini tetiklediği bildirilmiştir (Fan ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2018). Ayrıca, tez çalışmasında 1 μ M konsantrasyonda ZEA ve α -ZOL maruziyetinin ROS oluşumunda anlamlı olmayan azalmaya neden olması düşük dozlarda antioksidan savunma sistemlerinin etki göstermesinden kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir. ZEA'nın *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda ROS, MDA ve lipit peroksidasyonu seviyelerini arttırarak ve *Hsp70* gibi biyogöstergeleri indükleyerek oksidatif hasara neden olabileceği bildirilmiştir (Abid-Essefi ve ark., 2009; El Golli Bennour ve ark., 2009; Fleck ve ark., 2012; Liu ve ark., 2014; Qin ve ark., 2015; Fan ve ark., 2017).

Aşırı ROS oluşumu, enerji metabolizmasının bozulması, hücre siklusu kontrolü ve hücre sinyal yolaklarının değişmesi, genetik mutasyonlar ve inflamasyon dahil olmak üzere hücre fonksiyon bozukluğuna yol açarak hücre proteinlerin, lipitlerin ve nükleik asitlerin yapısının değişmesine neden olabilir. Ek olarak, yüksek yağlı ve karbonhidratlı diyetler, lipit peroksidasyon ürünleri, protein karbonilasyonu, antioksidan savunma sisteminin inaktive olması ve GSH seviyelerinin azalmasıyla oksidatif hasarı

da teşvik edebilmektedir (Rani ve ark., 2016). Tez çalışmasında, oksidatif hasar ile ilişkili genlerin ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla: *HO-1* geni için 1-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA 4,19-13,85 kat, 1-50 μM konsantrasyon aralığında α -ZOL ise 4,25-15,26 kat anlamlı artışa; *Hsp70* için 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda ZEA sırasıyla 2,84 ve 4,23 kat anlamlı artışa, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda α -ZOL maruziyetinde ise sırasıyla 2,13 kat anlamlı azalmaya ve 4,41 kat anlamlı artışa; *Nrf2* geni için ise, 1-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti 7,01-8,62 kat, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda α -ZOL maruziyetinde ise, sırasıyla 4,06 kat ve 9,4 kat anlamlı artışa neden olduğu gösterildi. *Hsp70* protein ekspresyonu da mRNA seviyesindeki artış ile tutarlı olarak 10 ve 50 μM konsantrasyon ZEA'da 1,17 ve 1,62 kat, 1-50 μM konsantrasyon aralığında 1,23-1,29 kat anlamlı olarak arttığı görüldü. 1-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA ve α -ZOL maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde ROS seviyelerindeki artış ile oksidatif hasar genlerinin mRNA seviyelerindeki artışın birbiriyle tutarlı olduğu görüldü. Ayrıca, 40 mg/kg vücut ağırlığı dozunda ZEA uygulanan Balb/c farelerinde lipid peroksidasyonu, MDA üretimi artarken *Hsp70* ekspresyonunun da indüklendiği görülmüştür (Ben Salem ve ark., 2015b). Başka bir karaciğer hücre dizisinde yapılan bir çalışmada, 24 saat süre ile 100 μM ZEA maruziyetinin *Hsp70* ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Lee ve ark., 2013). ROS üretiminin artmasıyla oluşan oksidatif hasarın karaciğerde yağ homeostazının bozulması, diyet kaynaklı obezite, insülin direnci ve hepatik lipid birikimi ile ilişkili olabileceği de öne sürülmektedir (Braud ve ark., 2017; Kanuri ve ark., 2018).

ZEA'nın östrojenik etkilerinin epigenetik modifikasyonlarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ancak epigenetik modifikasyonlar üzerine etkilerini gösteren çalışmalar oldukça sınırlıdır. Tez çalışmasında, global DNA metilasyonu seviyelerinde 10 ve 50 μM ZEA maruziyeti sırasıyla, %46 ve %154 kat; 1, 10 ve 50 μM α -ZOL maruziyeti ise sırasıyla, %58, %53 ve %58 kat anlamlı artışa neden olmuştur. Global DNA metilasyonu ile ilişkili olarak *DNMT1* ekspresyon seviyeleri de analiz edilmiş ve relatif ekspresyonda 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda ZEA maruziyetinde sırasıyla 3,02 ve 7,13 kat; 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda α -ZOL maruziyetinde ise sırasıyla 3,52 ve 5,05 kat anlamlı artış bulunmuştur. 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. Başka bir çalışmada, insan meme kanseri epitel hücrelerinde de *DNMT1* ekspresyon seviyesinin 24 saat süre ile 0-30 nM konsantrasyon aralığında Zeranol maruziyeti ile doza bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir (Ye ve ark., 2011).

Beslenme ve fiziksel aktivite de dahil olmak üzere çevresel ve yaşamsal faktörlerin epigenetik regülasyonun boyutunu değiştirebileceği yönünde bir çok araştırma bulunmaktadır. DNA metilasyonu ile metabolik değişiklikler arasında bir ilişki olabileceği ve bunun da kromatin yapısını etkileyebileceği vurgulanmaktadır. Erken yaştaki beslenme durumu ve T2DM gibi ileri yaşlardaki glukoz metabolizması bozuklukları arasındaki ilişki DNA metilasyon düzeylerindeki değişikliklerle de açıklanabilmektedir (Crujeiras ve Diaz-Lagares, 2016). Ayrıca, epigenetik modifikasyonların lipid metabolizması, mitokondriyal hasar, oksidatif stres ve inflamasyonda rol oynadığı ve bu durumun hepatik lipid birikimini ve sonuç olarak NAFLD'yi de indükleyebileceği bildirilmektedir (Sun ve ark., 2015). Global DNA metilasyonundaki değişikliklere ek olarak belirli hedef genlerin promotör bölgelerinde metilasyon seviyesinin değişmesi de oldukça önemlidir. *PPAR γ* , karaciğerde yağ asidi alımını, yağ asidi taşınmasını ve triaçilgliserol biyosentezini kontrol eden birçok genin ekspresyonunu uyarır, özellikle lipid ve glukoz homeostazı için oldukça önemlidir (Lee ve ark., 2012). Adipositler, hepatositler ve iskelet kası hücrelerinde insülin ile uyarılan glukoz alımını dolaylı olarak artırırlar (Tan, 2000). *PPAR γ* düzensizliği obezite, T2DM, ateroskleroz ve diğer metabolik hastalık durumlarının gelişimiyle bağlantılı olabilmektedir. *PPAR γ* ekspresyonunun artması, T2DM ve diğer kronik durumlardaki metabolik fonksiyon bozukluklarını arttırdığı, azalmasının ise antiobezite etkisi gösterdiği bildirilmiştir (Imam ve ark., 2013). Fare modellerinde de karaciğerdeki *PPAR γ* seviyeleri normal farelerde düşük iken, obeziteye sahip farelerde artış göstermiştir (Gavrilova ve ark., 2003). Bununla birlikte, *PPAR γ* promotör bölgesinin metilasyon durumu farklılık gösterebilmektedir. Fibrozisli hastalardan elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerinde *PPAR γ* promotör metilasyonu incelenmiş ve karaciğer inflamasyonu ve fibrozisin, *PPAR γ* promotörünün hipermetilasyonu ile ilişkili

olduğu bulunmuştur. Zeybel ve ark. (2012)'nin yaptığı bir çalışmada ise, NAFLD'li hastaların karaciğerinde *PPAR γ* promotör hipometilasyonunun hafif fibrotik lezyonlarla ilişkisi pirosekanslama yöntemiyle aydınlatılmaya çalışılmıştır. Tez çalışmasında, çalışılan tüm konsantrasyonlarda *PPAR γ* promotör bölgesinde üç CpG bölgesinin DNA metilasyonunda ZEA maruziyeti sonrası önemli derecede azalma görülürken; α -ZOL maruziyetinden sonra önemli derecede artış gözlemlendi. Bununla birlikte, *PPAR γ* mRNA seviyeleri 1-50 μ M konsantrasyonda ZEA'da 6,13-11,78 kat; 1-50 μ M konsantrasyon aralığında α -ZOL maruziyetinde ise sırasıyla 5,64-9,16 kat anlamlı artış bulundu. *PPAR γ* protein ekspresyonunda ise 10 ve 50 μ M ZEA maruziyetinden sonra 1,14 ve 1,2 kat; 50 μ M α -ZOL maruziyetinden sonra 1,09 kat anlamlı artış tespit edildi. α -ZOL maruziyeti sonucu; *PPAR γ* 'nin promotör bölge CpG adacıklarında gözlenen metilasyondaki değişikliklerin gen ekspresyonu ile ilişkili olmadığı görülmüş olup, ancak ZEA ve α -ZOL'ün HepG2 hücrelerinde *PPAR γ* geninde değişikliklere sebep olduğu sonucuna varılmıştır. Böylelikle, ZEA ve α -ZOL'ün metabolik yollar üzerinde önemli bir role sahip olan *PPAR γ* geninin üzerinde etkisinin olduğu gösterildi.

Bir diğer önemli epigenetik mekanizmalar olan global histon modifikasyonları için ZEA'nın olası etkilerini gösteren çalışmalar oldukça sınırlıdır. Han ve ark. (2015) tarafından domuz oositleri üzerinde 30 saat süre ile 10 ve 30 μ M konsantrasyonlarda ZEA maruziyeti yapılan çalışmada, ZEA'nın global histon modifikasyonları üzerine etkileri de incelenmiştir. 10 μ M konsantrasyonda ZEA, H3K4me2, H3K9me3 ve H3K27me3 seviyelerinde kontrole kıyasla önemli bir değişikliğe neden olmazken, 30 μ M ZEA maruziyeti sonrasında H3K4me2, H3K9me3 ve H3K27me3 seviyelerinde önemli derecede artış tespit edilmiştir (Han ve ark., 2015). Fare oositleri üzerinde yapılan bir çalışmada ise; 12 saat süre ile 10 ve 50 μ M konsantrasyonlarda ZEA'nın H3K4me2, H3K9me3 ve H4K20me1/me2/me3 seviyelerini azalttığı bildirilmiştir (Zhu ve ark., 2014). Tez çalışmasında ise, 24 saat 1, 10 ve 50 μ M konsantrasyonlarında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla H3K27me3 seviyesinde 50 μ M konsantrasyonda 1,13 kat, H3K9me3 seviyesinde 10 ve 50 μ M konsantrasyonda sırasıyla 1,32 kat ve 1,29 kat, H3K9ac seviyesinde ise 10 ve 50 μ M konsantrasyonda sırasıyla 1,33 kat ve 1,51 kat anlamlı artış tespit edildi. 24 saat 1, 10 ve 50 μ M konsantrasyonlarında α -ZOL maruziyetinde ise kontrol grubuna kıyasla H3K27me3 seviyesinde 50 μ M konsantrasyonda 1,23 kat anlamlı artış, H3K9me3 seviyesinde 1 μ M konsantrasyonda 1,22 kat anlamlı artış, H3K9ac seviyesinde ise 1 ve

50 μ M konsantrasyonda sırasıyla 1,3 kat anlamlı artış ve 1,45 kat anlamlı azalma tespit edildi. Tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre ZEA ve α -ZOL maruziyetinin karaciğer hücrelerinde global histon modifikasyonlara etkisinin olabileceği gösterilmiştir. Karaciğer ve adipositlerde global histon modifikasyonlarının ve kromatin yapısındaki değişikliklerin obezite ve diyabetle doğrudan ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Jufvas ve ark., 2013; Schones ve ark., 2015). Sağlıklı hepatositler ile karşılaştırıldığında, hepatik lipid birikiminin *PPAR α* ve hepatik lipid katabolizma yolağındaki genlerde anormal H3K9me3 ve H3K4me3 seviyelerine neden olabileceği gösterilmiş olup, hepatositlerde H3K9me3 ve H3K4me3'ün epigenetik regülasyonunun hepatik steatozda ve NAFLD'nin patogenezinde rol oynayabileceğini öne sürülmüştür (Jun ve ark., 2012).

Nükleer reseptörler, transkripsiyonel aktiviteleri ve epigenetik modifikasyonları doğrudan etkileyerek çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenleyen ligand ile aktive edilen transkripsiyon faktörleridir. Özellikle, nükleer reseptör (NR1) alt sınıfındaki nükleer reseptörler, karaciğer yağlanması patogenezinde önemli rol oynayan metabolik regülasyon ile ilişkilidir. Bu NR1 nükleer reseptörler, *PPAR $\alpha/\beta/\delta$* , *LXR α/β* , *FXR* ('Farnesoid X Receptor'), *PXR*, *CAR* ('Constitutive Adrostone Receptor')'dır (Tanaka ve ark., 2017). Tez çalışmasında relatif ekspresyon analizleri yapılan nükleer reseptör genlerin bir kısmı bu gruptan seçilmiştir. *AhR* geni ekspresyonunda ZEA maruziyetinde kontrol grubuna kıyasla 50 μ M konsantrasyonda 16,14 kat, α -ZOL maruziyetinde ise tüm konsantrasyonlarda sırasıyla 3,57-6,97 kat anlamlı artış bulunmuştur. Ayed-Boussema ve ark. (2011), insan primer hepatosit hücre kültüründe 0,1-50 μ M konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti sonrası *AhR* gen ekspresyonunun arttığını göstermiştir. *AhR* gen ekspresyonunda artışın ve reseptör aktivasyonunun yağ asidi alımının artmasına ve steatoza neden olabileceği bildirilmiştir (Lee ve ark., 2010). Bahsedilen çalışmada, *AhR* indüklü karaciğer yağlanması bir sonucu olarak yağ asidi oksidasyonunun baskılanması, periferik yağ mobilizasyonunda ve hepatik oksidatif hasarda artış olabileceği öne sürülmüştür (Lee ve ark., 2010). *LXR*'ler, yüksek sterol konsantrasyonlarına cevap veren kolesterol sensörleri gibi davranan ve kolesterol katabolizmasına aracılık eden bir nükleer reseptör grubudur, yağ asidi metabolizmasında yer alan bir takım genleri regüle eder (Benoit ve ark., 2006). *LXR*'ler glukoz için sensör görevi de görmektedir (Mitro ve ark., 2007). İnsanlarda hepatik *LXR α* ekspresyonunun artan NAFLD şiddetiyle doğru orantılı olabileceği bildirilmiştir

(Ahn ve ark., 2014). Aktivasyonu ile obezite ve steatoz gelişimini teşvik ederken, aynı zamanda inflamasyonu baskılayabilir ve hiperkolesterolemi gelişimine sebep olabilir. Tez çalışmasında, *LXRα* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 50 μ M konsantrasyonda ZEA maruziyeti sonrası 5,5 kat; 1-50 μ M konsantrasyonda α -ZOL maruziyeti sonrası ise 3,87-8,34 kat anlamlı artış bulunmuştur. Çalışılan diğer nükleer reseptör genlerinden *PPARα* ekspresyonu, 50 μ M konsantrasyonda ZEA maruziyeti sonrası 4,45 kat, α -ZOL maruziyeti sonrası ise tüm konsantrasyonlarda 4,97-9,53 kat anlamlı olarak artmıştır. *PPARα*, yüksek katabolik hızlara sahip, karaciğer, kalp, iskelet kasları, kahverengi yağ dokusu ve böbrek gibi dokularda yağ asidi β -oksidasyonunu gerçekleştiren hücrelerde yüksek oranda eksprese edilir. Yağ asidi oksidasyonunu düzenler ve kan trigliserit seviyesini düşüren ilaçlar için birincil hedeftir (Desvergne ve Wahli, 1999). NAFLD ve obezitede hepatik *PPARα* ekspresyonu düşüktür (Tailleux ve ark., 2012). Hepatik *PPARα* aktivasyonu ise, keton cisimciklerinin üretimi ve enerji yoksunluğu için vücutta başka bölgeler hazırlamada bir stres sinyali olarak görev yapan hepatokin üretimi ile sonuçlanır (Cave ve ark., 2016). Tez çalışmasında *PPARα* ekspresyonundaki artışın, karaciğerde glukoz ve lipit metabolizması homeostazının bozulması sonucu bir savunma mekanizması olabileceği düşünülmektedir. Diğer çalışmalarda da nükleer reseptörlerin bu alt sınıfının, lipit ve glukoz metabolizmasını sistematik olarak etkileyebileceği ve hem birbirleriyle etkileşime girerek hem de metabolik yollarda rol oynayan diğer genlerin ekspresyonunu düzenleyerek enerji homeostazını sağlayabildikleri öne sürülmüştür (Li ve Glass, 2004; Xu ve ark., 2018).

HepG2 hücrelerinde 50 μ M konsantrasyonda ZEA ve α -ZOL maruziyeti sonrası *L-fabp* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla sırasıyla, 13,99 kat ve 12,66 kat anlamlı artış bulunmuştur. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda *L-fabp* geninin sessizleştirilmesi ile hepatosit yağ asidi alımı azalmış, β -oksidasyonu bastırarak diyetsel steatoza karşı koruduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, *L-fabp* ekspresyonu, besinlerle alınan lipit dahil olmak üzere çeşitli diyet değişikliklerine cevap vermektedir (Bernlohr ve ark., 1997). Özellikle, yüksek yağlı diyetlerde karaciğer ve bağırsakta *L-fabp* mRNA ve/veya protein seviyelerinin arttırdığı gösterilmiştir (Gordon ve Lowe, 1985). Tez çalışmasında elde edilen sonuçlarda *L-fabp* ekspresyonunda artışın hücrelerde lipit homeostazında meydana gelen değişikliklere bir cevap olarak meydana geldiği düşünülmektedir. Tez çalışmasında, HepG2 hücrelerinde *LDLR* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla 1 ve 50 μ M ZEA maruziyeti sonrası 3,75 kat ve 4,37 kat; 1-50

μM konsantrasyon aralığında $\alpha\text{-ZOL}$ maruziyetinde ise 4,17-5,71 kat anlamlı artış bulunmuştur. Diyabetik insanlarda karaciğer yağlanması taklit etmek amacıyla kullanılan HFD/STZ sıçan modelinde, *LDLR* gen ekspresyon seviyesi kontrole kıyasla düşüktür; bunun yanı sıra, *LDLR* ekspresyonunun artışının hepatik lipit birikimine aracılık edebileceği de yapılan bir diğer çalışmada belirtilmiştir (Pozzo ve ark., 2016; Lee ve ark., 2017). Tez çalışmasındaki *LDLR* gen ekspresyonu artışının ZEA ve metabolitinin östrojenik aktivitesi ile ilgili olabileceği de düşünülmektedir. Çünkü, insan hepatoma hücrelerinde yapılan *in vitro* bir çalışmada, östradiolün hücre yüzey *LDLR* aktivitesini arttırdığı, sıçanlarda da farmasötik dozlarda östrojenin hepatik *LDLR* mRNA ve protein seviyelerini uyardığı bildirilmiştir (Kushwaha ve ark., 1977; Di Croce ve ark., 1996). *LDLR* gen ve protein ekspresyonunun östrojen ile de regüle edildiği rapor edilmiştir (Smith ve ark., 2004).

GAPDH geni ekspresyonunda ise kontrol grubuna kıyasla 50 μM konsantrasyon ZEA maruziyetinde 14,7 kat; 1-50 μM $\alpha\text{-ZOL}$ maruziyetinde ise 2,86-16,66 kat anlamlı azalma görülmüştür. Hastalardan alınan örneklerle yapılan bir çalışmada; steatozlu hastalarda *GAPDH* mRNA seviyesinin azaldığı bildirilmiştir (Boujedidi ve ark., 2012). Ayrıca, *GAPDH* geninin sessizleştirilmesinin antioksidan enzimlerin tükenmesine ve hepatositlerde ROS seviyesinin artmasına neden olduğu gösterilmiş olup, *GAPDH* geninin aşırı ekspresyonunun ise hepatositlerde ROS üretimini azalttığı bildirilmiştir (Snider ve ark., 2011). Hiperglisemik stresin nükleer *GAPDH*'nin translasyon sonrası modifikasyonu ve ardından sitosolik *GAPDH*'nin inhibisyonu ile sonuçlanan karmaşık bir sinyal yolağını harekete geçirdiği gösterilmiştir (Du ve ark., 2000). *Glut2*, hücreye glukozun alınmasını sağlayan taşıyıcıyı protein olarak görev yapmaktadır, protein ve gen ekspresyonunun artmasıyla glukoz alımının yanı sıra hücrede lipit birikimine de neden olabileceği bildirilmiştir (Tomaz ve ark., 2016). Tez çalışmasında, *Glut2* mRNA seviyeleri 10 μM konsantrasyon ZEA'da 12,82 kat anlamlı olarak artmış, $\alpha\text{-ZOL}$ maruziyetinde ise tüm maruziyet gruplarında kontrole kıyasla ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca, tez çalışmasında 50 μM konsantrasyonda ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *IGF-1* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla sırasıyla, 3,61 kat; 1-50 μM konsantrasyon aralığında $\alpha\text{-ZOL}$ maruziyetinde ise 4,25-15,26 kat anlamlı artış tespit edilmiştir. PI3K/Akt sinyal yolağı, büyüme ve glukoz homeostazı, lipit metabolizması, protein sentezi ve hücre proliferasyonu gibi kritik hücresel süreçler sırasında büyüme faktörü sinyallerine aracılık ederek hücresel

fizyolojide merkezi bir rol oynar (Abeyrathna ve Su, 2015). *Akt*, glukoz ve *SREBP-1c* dahil olmak üzere kolesterol ve yağ asidi birikimini arttıran proteinler yoluyla lipid metabolizmasını düzenler, *LXR*'yi uyarır (Li ve ark., 2010). Tez çalışmasında *Akt1* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda ZEA maruziyeti sonrası sırasıyla, 6,32 ve 9,94 kat; α -ZOL maruziyetinde ise 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda sırasıyla 2,76 ve 8,83 kat anlamlı artış tespit edildi. PI3K/*Akt* yolunun aktivasyonu obezite ve insülin direncini hafifletse de, aşırı ekspresyonu ile regülasyonu bozulduğunda obezite ve kanser gibi birçok hastalığa neden olabileceği de belirtilmiştir (Huang ve ark., 2018). 1-50 μM konsantrasyon aralığında ZEA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde *HK2* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 6,15-12,18 kat anlamlı artış tespit edildi. 10 ve 50 μM konsantrasyonda α -ZOL maruziyetinde ise sırasıyla 9,96 kat ve 15,23 kat anlamlı artış tespit edildi. *HK2* geninin aşırı eksprese olması hepatoselüler karsinoma hücre dizilerinde hücre proliferasyonunda önemli derecede artışa neden olduğu bildirilmiştir (Ahn ve ark., 2009). ZEA düşük konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu arttıran, yüksek konsantrasyonlarda ise sitotoksik ve apoptoza neden olan bir mikotoksindir (Abassi ve ark., 2016). Tez çalışmasında ZEA ve α -ZOL'ün neden olduğu hücre proliferasyonundaki artışın *HK2* gen ekspresyonundaki artış nedeniyle de olabileceği düşünülmektedir.

ER'lerin, insülin sinyalleşmesi, glukoz ve lipid metabolizmasında rol oynayan temel transkripsiyon faktörlerinin regülasyonunda rol oynadığı ve bu proteinlerin gen ekspresyonunu değiştirerek çeşitli hedef organlarda glukoz taşınmasını uyardığı belirtilmiştir (Shinkarenko ve ark., 1994; Foryst-Ludwig ve ark., 2008). Bu bağlamda östrojenin karaciğerde glukoz homeostazını sağlamada oldukça önemli olduğu görülmektedir. Özellikle ER α 'nın glukoz toleransı ve insülin hassasiyeti için esansiyel olduğu ve ER α aracılığıyla, endojen östrojenin antidiyabetojenik olduğu bildirilmiştir (Lundholm ve ark., 2008). ER'lere bağlanarak etki gösteren ZEA'nın indirgenmiş metabolitlerinden Zeranol'ün hayvancılıkta kilo alımını arttırdığı ve sığır, koyun ve domuzlarda büyüme hızlandırıcı olarak kullanıldığı bilinmektedir (Hidy ve ark., 1977; Willemart ve Bouffault, 1983; Bories ve ark., 1992). 14 gün boyunca, 200 μg ZEA ile beslenen dişi sıçanlarda ZEA'nın karbonhidrat ve lipid metabolizması üzerine etkileri incelenmiş ve elde edilen sonuçlara göre; ZEA hayvanların vücut ağırlığı artışını değiştirmezken, kandaki insülin seviyelerinde önemli derecede artış, glukagon seviyelerinde ise hafif azalmaya neden olmuştur. Hem karaciğer hem de kas glukojen

içeriği ve serum ve karaciğer trigliserit konsantrasyonlarında maruziyet sonrası önemli derecede artış görülmüştür. Çalışmada ZEA'nın karbonhidrat ve lipit metabolizması üzerinde etkili olabileceği öne sürülmüştür (Nogowski, 1996). Ek olarak, ZEA'nın sıçan metabolizması üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, 2 hafta boyunca haftada 2 kere olmak üzere 3 mg/kg v.a. dozları sıçanlara uygulanmış olup, plazma ve idrar örnekleri ile NMR temelli metabolomik çalışması gerçekleştirilmiştir (Liu ve ark., 2013). Bu çalışmada, ZEA maruziyetinin oksidatif hasara neden olabileceği ve hücre membran fonksiyonları, protein biyosentezi, glikoliz ve bağırsak mikrobiyota metabolizması gibi yaygın sistemik metabolik süreçleri değiştirebileceği öne sürülmüştür (Liu ve ark., 2013).

Sonuç olarak, tez çalışmasından elde edilen veriler de göz önüne alındığında ZEA'nın hücre proliferasyonunu ve ROS oluşumunu tetiklediği, oksidatif hasarda rol oynayan genlerin (*HO-1*, *Hsp70*, *Nrf2*) ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir. Karbonhidrat ve lipit metabolizmasında rol oynayan genlerden *L-fabp*, *Akt1*, *HK2*'nin ZEA'nın oluşturabileceği metabolik fonksiyonlar üzerine etkilerinin olabileceği öne sürülmektedir. Ayrıca, nükleer reseptör genlerinden özellikle *AhR* ve *PPAR γ* genlerinin ekspresyonlarında önemli değişiklikler gösterilmiş olup, özellikle promotör bölge DNA metilasyonu ve aynı zamanda protein ekspresyon seviyelerinde değişiklik gözlenen *PPAR γ* 'nın ZEA'nın ve diğer endokrin bozucu özellikte olan kimyasalların toksisitesinde önemli bir biyogösterge olabileceği sonucuna varılmaktadır. Bunun yanında, ZEA'nın metabolik değişikliklerde epigenetik etkilerin rolünün incelenmesinde ise; global DNA metilasyonunda ve global histon modifikasyonlarında değişikliklerin gözlenmesi; ayrıca metabolik fonksiyonlarda önemli rolü olan *PPAR γ* promotör bölge metilasyonu da önemli göstergeler olarak ortaya çıkmaktadır. Bunlara ek olarak; ZEA ile birlikte metaboliti α -ZOL'ün de metabolik fonksiyonlar üzerine etkileri değerlendirilmiş olup, α -ZOL'ün ZEA'ya göre daha etkili olmasının α -ZOL'ün östrojenik aktivitesinin daha yüksek olması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Tez çalışmasından elde edilen sonuçların, risk değerlendirme sürecinde ZEA yanında diğer endokrin bozucu kimyasalların toksisitesinde ortaya çıkan anahtar moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

Aatsinki, S. M., Buler, M., Salomäki, H., Koulu, M., Pavek, P., & Hakkola, J. (2014). Metformin induces PGC-1 α expression and selectively affects hepatic PGC-1 α functions. *British Journal of Pharmacology*, *171*(9), 2351-2363.

Abassi, H., Ayed-Boussema, I., Shirley, S., Abid, S., Bacha, H., & Micheau, O. (2016). The mycotoxin zearalenone enhances cell proliferation, colony formation and promotes cell migration in the human colon carcinoma cell line HCT116. *Toxicology Letters*, *254*, 1-7.

Abbes, S., Salah-Abbès, J. B., Ouanes, Z., Houas, Z., Othman, O., Bacha, H., Abdel-Wahab, M. A., & Oueslati, R. (2006). Preventive role of phyllosilicate clay on the Immunological and Biochemical toxicity of zearalenone in Balb/c mice. *International Immunopharmacology*, *6*(8), 1251–1258.

Abeyrathna, P., & Su, Y. (2015). The critical role of Akt in cardiovascular function. *Vascular Pharmacology*, *74*, 38-48.

Abid-Essefi, S., Baudrimont, I., Hassen, W., Ouanes, Z., Mobio, T. A., Anane, R., Creppy, E. E., & Bacha, H. (2004). DNA fragmentation, apoptosis and cell cycle arrest induced by zearalenone in cultured DOK, Vero and Caco-2 cells: prevention by Vitamin E. *Toxicology*, *192*(2-3), 237-248.

Abid-Essefi, S., Bouaziz, C., Golli-Bennour, E. E., Ouanes, Z., & Bacha, H. (2009). Comparative study of toxic effects of zearalenone and its two major metabolites α -zearalenol and β -zearalenol on cultured human Caco-2 cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *23*(4), 233-243.

Adamek, A., & Kasprzak, A. (2018). Insulin-Like Growth Factor (IGF) System in Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(5), 1308.

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.

Ahn, K. J., Hwang, H. S., Park, J. H., Bang, S. H., Kang, W. J., Yun, M., & Lee, J. D. (2009). Evaluation of the role of hexokinase type II in cellular proliferation and apoptosis using human hepatocellular carcinoma cell lines. *Journal of Nuclear Medicine*, *50*(9), 1525.

Ahn, S. B., Jang, K., Jun, D. W., Lee, B. H., & Shin, K. J. (2014). Expression of liver X receptor correlates with intrahepatic inflammation and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive Diseases and Sciences*, **59**(12), 2975-2982.

Allen, N. K., Mirocha, C. J., Aakhus-Allen, S., Bitgood, J. J., Weaver, G., & Bates, F. (1981). Effect of dietary zearalenone on reproduction of chickens. *Poultry Science*, **60**(6), 1165-1174.

Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H., & Boyd, M. R. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*, **48**(3), 589-601.

Arora, R. G., Frolen, H. & Nilsson, A. (1981). Interference of mycotoxins with prenatal development of the mouse. I. Influence of aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenone. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **22**, 524-534.

Arora, R. G., Frolen, H. & Fellner-Feldegg, H. (1983). Inhibition of ochratoxin and teratogenesis by zearalenone and diethylstilboestrol. *Food and Chemical Toxicology*, **21**, 779-783.

Arts, J., Kuiper, G. G., Janssen, J. M., Gustafsson, J. A., Löwik, C. W., Pols, H. A., & Van Leeuwen, J. P. (1997). Differential expression of estrogen receptors α and β mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cells. *Endocrinology*, **138**(11), 5067-5070.

Avrupa Birliği Komisyonu (European Commission). (2000). Health & Consumer Protection Directorate-General. 22 June 2000 OPINION OF THE SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD ON FUSARIUM TOXINS PART 2: ZEARELENONE (ZEA). *SCF/CS/CNTM/MYC/22 Rev 3 Final*.

Avrupa Birliği Komisyonu (European Commission). (2006). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L364, 5.

Ayed, Y., Ayed-Boussema, I., Ouanes, Z., & Bacha, H. (2011). In vitro and in vivo induction of chromosome aberrations by alpha-and beta-zearalenols: Comparison with zearalenone. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **726**(1), 42-46.

Ayed-Boussema, I., Pascussi, J. M., Maurel, P., Bacha, H., & Hassen, W. (2011). Zearalenone activates pregnane X receptor, constitutive androstane receptor and

aryl hydrocarbon receptor and corresponding phase I target genes mRNA in primary cultures of human hepatocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **31**(1), 79-87.

Baillie-Hamilton, P. F. (2002). Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, **8**(2), 185–192.

Bandera, E. V., Chandran, U., Buckley, B., Lin, Y., Isukapalli, S., Marshall, I., King, M., & Zarbl, H. (2011). Urinary mycoestrogens, body size and breast development in New Jersey girls. *Science of the Total Environment*, **409**(24), 5221-5227.

Banjerdpongchai, R., Kongtawelert, P., Khantamat, O., Srisomsap, C., Chokchaichamnankit, D., Subhasitanont, P., & Svasti, J. (2010). Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress pathways cooperate in zearalenone-induced apoptosis of human leukemic cells. *Journal of Hematology & Oncology*, **3**(1), 50.

Bartholomew, R. M., & Ryan, D. S. (1980). Lack of mutagenicity of some phytoestrogens in the salmonella/mammalian microsome assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, **78**(4), 317-321.

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. *Journal of Applied Toxicology*, **2**(5), 247-254.

Becci, P. J., Johnson, W. D., Hess, F. G., Gallo, M. A., Parent, R. A., & Taylor, J. M. (1982). Combined two-generation reproduction-teratogenesis study of zearalenone in the rat. *Journal of Applied Toxicology*, **2**(4), 201-206.

Belhassen, H., Jiménez-Díaz, I., Arrebola, J. P., Ghali, R., Ghorbel, H., Olea, N., & Hedili, A. (2015). Zearalenone and its metabolites in urine and breast cancer risk: A case-control study in Tunisia. *Chemosphere*, **128**, 1-6.

Ben Salem, I., Boussabbeh, M., Helali, S., Abid-Essefi, S., & Bacha, H. (2015b). Protective effect of Crocin against zearalenone-induced oxidative stress in liver and kidney of Balb/c mice. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**(23), 19069-19076.

Ben Salem, I., Prola, A., Boussabbeh, M., Guilbert, A., Bacha, H., Abid-Essefi, S., & Lemaire, C. (2015a). Crocin and Quercetin protect HCT116 and HEK293 cells

from Zearalenone-induced apoptosis by reducing endoplasmic reticulum stress. *Cell Stress and Chaperones*, **20**(6), 927-938.

Ben Salem, I., Boussabeh, M., Da Silva, J. P., Guilbert, A., Bacha, H., Abid-Essefi, S., & Lemaire, C. (2016). SIRT1 protects cardiac cells against apoptosis induced by zearalenone or its metabolites α - and β -zearalenol through an autophagy-dependent pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **314**, 82-90.

Bennett, J., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, **16**(3), 497-516.

Benoit, G., Cooney, A., Giguere, V., Ingraham, H., Lazar, M., Muscat, G., Perlmann, T., Renaud, J. P., Schwabe, J., Sladek, F., Tsai, M. J., & Laudet, V. (2006). International Union of Pharmacology. LXVI. Orphan nuclear receptors. *Pharmacological Reviews*. **58**(4), 798–836.

Bernlohr, D. A., Simpson, M. A., Hertzler, A. V., & Banaszak, L. J. (1997). Intracellular lipid-binding proteins and their genes. *Annual Review of Nutrition*, **17**(1), 277-303.

Berthiller, F., Crews, C., Dall'Asta, C., De Saeger, S., Haesaert, G., Karlovsky, P., Oswald, I. P., Seefelder, W., Speijers, G., & Stroka, J. (2013). Masked mycotoxins: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, **57**, 165–186.

Bolton, J. L., & Thatcher, G. R. J. (2008). Potential mechanisms of estrogen quinone carcinogenesis. *Chemical Research in Toxicology*, **21**, 93–101.

Bories, G. F., Sutra, J. F. P., & Tulliez, J. E. (1992). Metabolism and disposition of [3H] zeranone implanted in the pig. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**(2), 284-288.

Boujedidi, H., Bouchet-Delbos, L., Cassard-Doulicier, A. M., Njiké-Nakseu, M., Maitre, S., Prévot, S., Dagher, I., Agostini, H., Voican, C. S., Emilie, D., Perlemuter, G., Naveau, S. (2012). Housekeeping gene variability in the liver of alcoholic patients. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, **36**(2), 258-266.

Bozoğlu, F. (2009). Different mycotoxin inactivation applications and their inactivation mechanisms. *Proceeding for Natural Science Matica Srpska Novi Sad*, (117), 27-35.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**(1-2), 248-254.

Braud, L., Battault, S., Meyer, G., Nascimento, A., Gaillard, S., de Sousa, G., Rahmani, R., Riva, C., Armand, M., Maixent, J. M., & Reboul, C. (2017). Antioxidant properties of tea blunt ROS-dependent lipogenesis: beneficial effect on hepatic steatosis in a high fat-high sucrose diet NAFLD obese rat model. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **40**, 95-104.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., & Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, **96**(6), 857-868.

Bryła, M., Waśkiewicz, A., Ksieniewicz-Woźniak, E., Szymczyk, K., & Jędrzejczak, R. (2018). Modified *Fusarium* Mycotoxins in Cereals and Their Products—Metabolism, Occurrence, and Toxicity: An Updated Review. *Molecules*, **23**(4), 963.

Brzuzan, P., Woźny, M., Wolińska-Nizioł, L., Piasecka, A., Florczyk, M., Jakimiuk, E., Jakimiuk, E., Gora, M., Luczynski, M. K., & Gajęcki, M. (2015). MicroRNA expression profiles in liver and colon of sexually immature gilts after exposure to *Fusarium* mycotoxins. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, **18**(1), 29-38.

Canas, N., Valero, T., Villarroya, M., Montell, E., Verges, J., García, A. G., & Lopez, M. G. (2007). Chondroitin sulfate protects SH-SY5Y cells from oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **323**(3), 946-953.

Cave, M. C., Clair, H. B., Hardesty, J. E., Falkner, K. C., Feng, W., Clark, B. J., Sidey, J., Shi, H., Aqel, B. A., McClain, C. J., & Prough, R. A. (2016). Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, **1859**(9), 1083-1099.

Chang, W. M., & Lin, J. K. (1984). Transformation of zearalenone and zearalenol by rat erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*, **22**, 887-891.

Chen, X. X., Yang, C. W., Huang, L. B., Niu, Q. S., Jiang, S. Z., & Chi, F. (2015). Zearalenone altered the serum hormones, morphologic and apoptotic measurements of genital organs in post-weaning gilts. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **28**(2), 171.

Chen, Y., Jiang, X. Y., Xu, L., Li, X., Cao, F. F., Li, L., Lu, M., Jin, L., & Wang, X. F. (2009). Association of ER-Alpha Gene Polymorphism with Metabolic Phenotypes in Chinese Hans. *Lipids*, **44**(8), 719-723.

Chi, M. S., Mirocha, C. J., Kurtz, H. J., Weaver, G. A., Bates, F., Robison, T., & Shimoda, W. (1980). Effect of dietary zearalenone on growing broiler chicks. *Poultry Science*, **59**(3), 531-536.

Choi, K. C., & Jeung, E. B. (2003). The biomarker and endocrine disruptors in mammals. *Journal of Reproduction and Development*, **49**(5), 337-345.

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.

Chiang, Y. C., Pai, W. Y., Chen, C. Y., & Tsen, H. Y. (2008). Use of primers based on the heat shock protein genes hsp70, hsp40, and hsp10, for the detection of bovine mastitis pathogens *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus bovis*. *Molecular and Cellular Probes*, **22**(4), 262-266.

Čonková, E., Laciaková, A., Pástorová, B., Seidel, H., & Kováč, G. (2001). The effect of zearalenone on some enzymatic parameters in rabbits. *Toxicology Letters*, **121**(3), 145-149.

Conley, B. A., Wright, J. J., & Kummar, S. (2006). Targeting epigenetic abnormalities with histone deacetylase inhibitors. *Cancer*, **107**(4), 832-40.

Cortinovis, C., Caloni, F., Schreiber, N. B., & Spicer, L. J. (2014). Effects of fumonisin B1 alone and combined with deoxynivalenol or zearalenone on porcine granulosa cell proliferation and steroid production. *Theriogenology*, **81**(8), 1042-1049.

Creppy, E. E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, **127**(1), 19-28.

Dacasto, M., Rolando, P., Nachtmann, C., Ceppa, L., & Nebbia, C. (1995). Zearalenone mycotoxicosis in piglets suckling sows fed contaminated grain. *Veterinary and Human Toxicology*, **37**, 359-361.

Dallio, M., Masarone, M., Errico, S., Gravina, A. G., Nicolucci, C., Di Sarno, R., Gionti, L., Tuccillo, C., Persico, M., Stiuso, P., Diano, N., Loguercio, C., Federico, A. (2018). Role of bisphenol A as environmental factor in the promotion of non-alcoholic fatty liver disease: in vitro and clinical study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, **47**(6), 826-837.

Danicke, S., Keese, C., Meyer, U., Starke, A., Kinoshita, A., & Rehage, J. (2014). Zearalenone (ZEN) metabolism and residue concentrations in physiological

specimens of dairy cows exposed long-term to ZEN-contaminated diets differing in concentrate feed proportions. *Archives of Animal Nutrition*, **68**, 492–506.

Danicke, S., Matth aus, K., Valenta, H., & Halle, I. (2004). Effects of *Fusarium*-toxin contaminated wheat grains and non-starch-polysaccharide (NSP) hydrolyzing enzyme preparation on Pekin duck performance. *Archiv für Geflügelkunde*, **68**, 199–205.

Danicke, S., & Winkler, J. (2015). Invited review: Diagnosis of zearalenone (ZEN) exposure of farm animals and transfer of its residues into edible tissues (carry over). *Food and Chemical Toxicology*, **84**, 225–249.

Darbre, P. D., Byford, J. R., Shaw, L. E., Horton, R. A., Pope, G. S., & Sauer, M. J. (2002). Oestrogenic activity of isobutylparaben in vitro and in vivo. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, **22**(4), 219-226.

Decker, T., & Lohmann-Matthes, M. L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, **115**(1), 61-69.

Delaney, C., Garg, S. K., & Yung, R. (2015). Analysis of DNA methylation by pyrosequencing. In *Immunosenescence* (pp. 249-264). Humana Press, New York, NY.

Desvergne, B., & Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocrine Reviews*, **20**, 649–688.

Di Croce, L., Bruscalupi, G., & Trentalance, A. (1996). Independent behavior of rat liver LDL receptor and HMGCoA reductase under estrogen treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **224**(2), 345-350.

Ding, X., Lichti, K., & Staudinger, J. L. (2006). The Mycoestrogen Zearalenone Induces CYP3A through Activation of the Pregnane X Receptor. *Toxicological Sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, **91**, 448–455.

Doyle, M. P., Applebaum, R. S., Brackett, R. E., & Marth, E. H. (1982). Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural commodities. *Journal of Food Protection*, **45**(10), 964-971.

Döll, S., Dänicke, S., Ueberschär, K. H., Valenta, H., Schnurrbusch, U., Ganter, M., Klobasa, F., & Flachowsky, G. (2003). Effects of graded levels of *Fusarium* toxin contaminated maize in diets for female weaned piglets. *Archives of Animal Nutrition*, **57**(5), 311-334.

Du, X. L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I. G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J., & Brownlee, M. (2000). Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**(22), 12222-12226.

EFSA (European Food Safety Authority). (2004). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Zearalenone as undesirable substance in animal feed. *EFSA Journal*, **2**(7), 89, 34 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2004.89>

EFSA (European Food Safety Authority). (2011). Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA Journal*, **9**, 2197.

EFSA (European Food Safety Authority). (2017). Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. *The EFSA Journal*, **15**(7), 4851.

EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). (2011). Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA Journal*, **9**(6), 2197, 124 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2197>

EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). (2016). Scientific Opinion on the appropriateness to set a group health-based guidance value for zearalenone and its modified forms. *EFSA Journal 2016*, **14**(1), 4425–46 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4425>

Elbirt, K. K., & Bonkovsky, H. L. (1999). Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proceedings of the Association of American Physicians*, **III**(5), 438-447.

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.

Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics*, **8**, 286–298.

Etienne, M., & Jemmali, M. (1982). Effects of Zearalenone (F2) on Estrous Activity and Reproduction in Gilts 1, 2. *Journal of Animal Science*, **55**(1), 1-10.

Eze, U. A., Huntriss, J., Routledge, M. N., & Gong, Y. Y. (2018). Toxicological effects of regulated mycotoxins and persistent organochloride pesticides: In vitro cytotoxic assessment of single and defined mixtures on MA-10 murine Leydig cell line. *Toxicology In Vitro*, **48**, 93-103.

Fan, W., Shen, T., Ding, Q., Lv, Y., Li, L., Huang, K., Yan, L., & Song, S. (2017). Zearalenone induces ROS-mediated mitochondrial damage in porcine IPEC-J2 cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **31**(10), e21944.

Farnworth, E. R., & Trenholm, H. L. (1981). The effect of acute administration of the mycotoxin zearalenone to female pigs. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, **16**(3), 239-252.

Ferre, P., & Fougelle, F. (2010). Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **12**, 83-92.

Fink-Gremmels, J. (1999). Mycotoxins: their implications for human and animal health. *Veterinary Quarterly*, **21**(4), 115-120.

Fink-Gremmels, J. (2008). Biological effects of zearalenone. *Mycotoxins in farm animals*, 197-218.

Fink-Gremmels, J., & Malekinejad, H. (2007). Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology*, **137**, 326-341.

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.

Fleisch, A. F., Robert, O. W., Baccarelli, A. A. (2012). Environmental epigenetics: a role in endocrine disease. *Journal of Molecular Endocrinology*, **49**, R61-R67.

Flores-Flores, M. E., Lizarraga, E., de Cerain, A. L., & Gonzalez-Penas, E. (2015). Presence of mycotoxins in animal milk: A review. *Food Control*, **53**, 163-176.

Forsell, J. H., Witt, M. F., Tai, J. H., Jensen, R., & Pestka, J. J. (1986). Effects of 8-week exposure of the B6C3F1 mouse to dietary deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. *Food and Chemical Toxicology*, **24**(3), 213-219.

Foryst-Ludwig, A., Clemenz, M., Hohmann, S., Hartge, M., Sprang, C., Frost, N., Krikov, M., Bhanot, S., Barros, R., Morani, A., Gustafsson, J. A., Unger, T., &

Kintscher, U. (2008). Metabolic actions of estrogen receptor beta (ERbeta) are mediated by a negative cross-talk with PPARgamma. *PLoS Genetics*, **4**, e1000108.

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**(2), 171-177.

Frizzell, C., Ndossi, D., Verhaegen, S., Dahl, E., Eriksen, G., Sørli, M., Ropstad, E., Muller, M., Elliott, C. T., & Connolly, L. (2011). Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha-and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. *Toxicology Letters*, **206**(2), 210-217.

Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., & Grigg, G.W. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**(5), 1827-1831.

Fuke, C., Shimabukuro, M., Petronis, A., Sugimoto, J., Oda, T., & Miura K. (2005). Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. *Annals of Human Genetics*, **69**(Pt 1), 134.

Gajeczka, M., Jakimiuk, E., Polak, M., Zielonka, Ł., Obremski, K., & Gajeczki, M. (2007). Metabolic changes in bitches after experimental zearalenone mycotoxicosis. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, **51**, 667–671.

Gajeczka, M., Obremski, K., Jakimiuk, E., Skorska-Wyszynska, E., Zielonka, Ł., & Gajeczki, M. (2008a). Histopathological examination of ovaries in bitches after experimental zearalenone mycotoxicosis. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, **11**, 363–366.

Gajeczka, M., Janowski, T., Jakimiuk, E., Zielonka, Ł., Podhalicz-Dziegielewska, M., Obremski, K., & Gajeczki, M. (2008b). Influence of long-term zearalenone intoxication on the concentration of progesterone and 17beta-oestradiol in blood plasma in bitches. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, **52**, 405–409.

Gajęcka, M., Tarasiuk, M., Zielonka, Ł., Dąbrowski, M., & Gajęcki, M. (2016). Risk assessment for changes in the metabolic profile and body weights of pre-pubertal gilts during long-term monotonic exposure to low doses of zearalenone (ZEN). *Research in Veterinary Science*, **109**, 169-180.

Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, B. H., Resnik, M. A., Anderson, B. & Zeiger, E. (1987). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: evaluations of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **10**(S10), 1-35.

Galluzzi, L., Aaronson, S. A., Abrams, J., Alnemri, E. S., Andrews, D. W., Baehrecke, E. H., Bazan, N. G., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D. E., Brenner, C., Castedo, M., Cidlowski, J. A., Ciechanover, A., Cohen, G. M., De Laurenzi, V., De Maria, R., Deshmukh, M., Dynlacht, B. D., El-Deiry, W. S., Flavell, R. A., Fulda, S., Garrido, C., Golstein, P., Gougeon, M. L., Green, D. R., Gronemeyer, H., Hajnóczky, G., Hardwick, J. M., Hengartner, M. O., Ichijo, H., Jäättelä, M., Kepp, O., Kimchi, A., Klionsky, D. J., Knight, R. A., Kornbluth, S., Kumar, S., Levine, B., Lipton, S. A., Lugli, E., Madeo, F., Malomi, W., Marine, J. C., Martin, S. J., Medema, J. P., Mehlen, P., Melino, G., Moll, U. M., Morselli, E., Nagata, S., Nicholson, D. W., Nicotera, P., Nuñez, G., Oren, M., Penninger, J., Pervaiz, S., Peter, M. E., Piacentini, M., Prehn, J. H., Puthalakath, H., Rabinovich, G. A., Rizzuto, R., Rodrigues, C. M., Rubinsztein, D. C., Rudel, T., Scorrano, L., Simon, H. U., Steller, H., Tschopp, J., Tsujimoto, Y., Vandenabeele, P., Vitale, I., Vousden, K. H., Youle, R. J., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Kroemer, G. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death and Differentiation*, **16**(8), 1093.

Gao, F., Jiang, L. P., Chen, M., Geng, C. Y., Yang, G., Ji, F., Zhong, L. F., & Liu, X. F. (2013). Genotoxic effects induced by zearalenone in a human embryonic kidney cell line. *Mutation Research*, **755**, 6–10.

Gao, X., Sun, L., Zhang, N., Li, C., Zhang, J., Xiao, Z., & Qi, D. (2017). Gestational zearalenone exposure causes reproductive and developmental toxicity in pregnant rats and female offspring. *Toxins*, **9**(1), 21.

Gavrilova, O., Haluzik, M., Matsusue, K., Cutson, J. J., Johnson, L., Dietz, K. R., Nicol, C. J., Vinson, C., Gonzalez, F. J., & Reitman, M. L. (2003). Liver peroxisome proliferator-activated receptor γ contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(36), 34268-34276.

Golob, P. (2007). On-farm mycotoxin control in food and feed grain (Vol. 1). *Food & Agriculture Org.*

Gordon, J. I., & Lowe, J. B. (1985). Analyzing the structures, functions and evolution of two abundant gastrointestinal fatty acid binding proteins with recombinant DNA and computational techniques. *Chemistry and Physics of Lipids*, **38**(1-2), 137-158.

Gould, G. W., Thomas, H. M., Jess, T. J., & Bell, G. I. (1991). Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. *Biochemistry*, **30**(21), 5139-5145.

Greally, J. M., & Jacobs, M. N. (2013). State of the Science on in vitro and in vivo testing methods of epigenomic endpoints for evaluating endocrine disruptors. *ALTEX Online*, S1868696X1302211X.

Ghedira-Chekir, L., Maaroufi, K., Zakhama, A., Ellouz, F., Dhouib, S., Creppy, E. E., & Bacha, H. (1998). Induction of a SOS repair system in lysogenic bacteria by zearalenone and its prevention by vitamin E. *Chemico-Biological Interactions*, **113**(1), 15-25.

Gromadzka, K., Waśkiewicz, A., Świetlik, J., Bocianowski, J., & Goliński, P. (2015). The role of wastewater treatment in reducing pollution of surface waters with zearalenone/Uloga pročišćavanja otpadnih voda u smanjenju onečišćenja površinskih voda zearalenonom. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, **66**(2), 159-164.

Guha, S., Chaurasia, S., Ramachandran, C., & Roy, S. (2017). SLC4A11 depletion impairs NRF2 mediated antioxidant signaling and increases reactive oxygen species in human corneal endothelial cells during oxidative stress. *Scientific Reports*, **7**(1), 4074.

Guo, N. L., Tan, J. H., Wu, J. P., & Xu, Y. H. (2017). Isoflurane promotes glucose metabolism through upregulation of miR-21 and suppresses mitochondrial oxidative phosphorylation of ovarian cancer cells. *Bioscience Reports*, BSR20170818.

Hagler Jr, W. M., Towers, N. R., Mirocha, C. J., Eppley, R. M., & Bryden, W. L. (2001). Zearalenone: mycotoxin or mycoestrogen. In *Fursarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*. APS Press, St Paul, Minnesota (pp. 321-331).

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.

Hao, Q., Li, T., Zhang, X., Gao, P., Qiao, P., Li, S., & Geng, Z. (2014). Expression and roles of fatty acid synthase in hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*, **32**(6), 2471-2476.

Harada, K., Isse, K., Kamihira, T., Shimoda, S., & Nakanuma, Y. (2005). Th1 cytokine-induced downregulation of PPAR γ in human biliary cells relates to cholangitis in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, **41**(6), 1329-1338.

Harrington, C. T., Lin, E. I., Olson, M. T., & Eshleman, J. R. (2013). Fundamentals of pyrosequencing. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, **137**(9), 1296-1303.

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.

Herman, J. G., & Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *The New England Journal of Medicine*, **349**(21), 2042-2054.

Hidy, P. H., Baldwin, R. S., Greasham, R. L., Keith, C. L., & McMullen, J. R. (1977). Zearalenone and some derivatives: production and biological activities. *In Advances in Applied Microbiology*, **22**, 59-82.

Hilakivi-Clarke, L., Cho, E., & Clarke, R. (1998). Maternal genistein exposure mimics the effects of estrogen on mammary gland development in female mouse offspring. *Oncology Reports*, **5**(3), 609-625.

Huang, X., Liu, G., Guo, J., & Su, Z. (2018). The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *International Journal of Biological Sciences*, **14**(11), 1483.

Hueza, I. M., Raspantini, P. C. F., Raspantini, L. E. R., Latorre, A. O., & Górnaiak, S. L. (2014). Zearalenone, an estrogenic mycotoxin, is an immunotoxic compound. *Toxins*, **6**(3), 1080-1095.

Huffman, J., Gerber, R., & Du, L. (2010). Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers*, **93**, 764-776.

Hughes Jr, C. L., Kaldas, R. S., Weisinger, A. S., McCants, C. E., & Basham, K. B. (1991). Acute and subacute effects of naturally occurring estrogens on luteinizing

hormone secretion in the ovariectomized rat: Part 1. *Reproductive Toxicology*, **5**(2), 127-132.

Iatropoulos, M. J., Duan, J. D., Jeffrey, A. M., Leach, M. W., Hayes, A. N., Stedman, N. L., & Williams, G. M. (2013). Hepatocellular proliferation and hepatocarcinogen bioactivation in mice with diet-induced fatty liver and obesity. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **65**(4), 451-456.

Ingerowski, G. H., Scheutwinkel-Reich, M., & Stan, H. J. (1981). Mutagenicity studies on veterinary anabolic drugs with the Salmonella/microsome test. *Mutation Research Letters*, **91**(2), 93-98.

International Agency for Research on Cancer (IARC). (1993). Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Cas No: 303-47-9, vol 56.

Ito, Y., & Ohtsubo, K. I. (1994). Effects of neonatal administration of zearalenone on the reproductive physiology of female mice. *Journal of Veterinary Medical Science*, **56**(6), 1155-1159.

Jang, E. H., Jang, S. Y., Cho, I. H., Hong, D., Jung, B., Park, M. J., & Kim, J. H. (2015). Hispolon inhibits the growth of estrogen receptor positive human breast cancer cells through modulation of estrogen receptor alpha. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **463**(4), 917-922.

Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h, A., Andre, F., Delaforge, M., & Lebrihi, A. (2010). Transformation of zearalenone to zearalenone-sulfate by *Aspergillus* spp. *World Mycotoxin Journal*, **3**, 183-191.

Jia, R., Ma, Q., Fan, Y., Ji, C., Zhang, J., Liu, T., & Zhao, L. (2016). The toxic effects of combined aflatoxins and zearalenone in naturally contaminated diets on laying performance, egg quality and mycotoxins residues in eggs of layers and the protective effect of *Bacillus subtilis* biodegradation product. *Food and Chemical Toxicology*, **90**, 142-150.

Jin, W., Chen, F., Wang, K., Song, Y., Fei, X., & Wu, B. (2018). miR-15a/miR-16 cluster inhibits invasion of prostate cancer cells by suppressing TGF- β signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **104**, 637-644.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Meeting, & World Health Organization. (2000). *Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants*. (Vol. 44).

Jones, P. A., & Takai, D. (2001). The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, **293**, 1068-70.

Jones, J. R., Barrick, C., Kim, K. A., Lindner, J., Blondeau, B., Fujimoto, Y., Shiota, M., Kesterson, R. A., Kahn, B. B., & Magnuson, M. A. (2005). Deletion of PPAR γ in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**(17), 6207-6212.

Jufvas, Å., Sjödin, S., Lundqvist, K., Amin, R., Vener, A. V., & Strålfors, P. (2013). Global differences in specific histone H3 methylation are associated with overweight and type 2 diabetes. *Clinical Epigenetics*, **5**(1), 15.

Jun, H. J., Kim, J., Hoang, M. H., & Lee, S. J. (2012). Hepatic lipid accumulation alters global histone h3 lysine 9 and 4 trimethylation in the peroxisome proliferator-activated receptor alpha network. *PLoS One*, **7**(9), e44345.

Imam, M. U., Ismail, M., Ithnin, H., Tubesha, Z., & Omar, A. R. (2013). Effects of germinated brown rice and its bioactive compounds on the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene. *Nutrients*, **5**(2), 468-477.

ISO 10993. (1999). International Standard 10993. Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for cytotoxicity: In-vitro methods. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Kanuri, B. N., Rebello, S. C., Pathak, P., Agarwal, H., Kanshana, J. S., Awasthi, D., Gupta, A. P., Gayen, J. R., Jagavelu, K., & Dikshit, M. (2018). Glucose and lipid metabolism alterations in liver and adipose tissue pre-dispose p47phox knockout mice to systemic insulin resistance. *Free Radical Research*, **52**(5), 568-582.

Kasamaki, A. & Urasawa, S. (1993) The effect of food chemicals on cell aging of human diploid cells in in vitro culture. *The Journal of Toxicological Sciences*, **18**, 143-153.

Katzenellenbogen, B. S., Katzenellenbogen, J. A., & Mordecai, D. (1979). Zearalenones: characterization of the estrogenic potencies and receptor interactions of a series of fungal β -resorcylic acid lactones. *Endocrinology*, **105**(1), 33-40.

Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Desvergne, B., & Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *The Journal of Clinical Investigation*, **103**(11), 1489-1498.

Khosrokhavar, R., Rahimifard, N., Shoeibi, S., Hamedani, M. P., & Hosseini, M. J. (2009). Effects of zearalenone and α -Zearalenol in comparison with Raloxifene on T47D cells. *Toxicology Mechanisms and Methods*, **19**(3), 246-250.

Knapen, M. F., Zusterzeel, P. L., Peters, W. H., & Steegers, E. A. (1999). Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction: a review. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **82**(2), 171-184.

Korf, H., Vander Beken, S., Romano, M., Steffensen, K. R., Stijlemans, B., Gustafsson, J. Å., Grooten, J., & Huygen, K. (2009). Liver X receptors contribute to the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. *The Journal of clinical investigation*, **119**(6), 1626-1637.

Korzeniewski, C., & Callewaert, D. M. (1983). An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, **64**(3), 313-320.

Kovalsky Paris, M. P., Schweiger, W., Hametner, C., Stuckler, R., Muehlbauer, G. J., Varga, E., Krska, R., Berthiller, F., & Adam, G. (2014). Zearalenone-16-O-glucoside: a new masked mycotoxin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**, 1181-1189.

Kovats, S. (2015). Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cellular Immunology*, **294**(2), 63-69.

Kowalska, K., Habrowska-Górczyńska, D. E., Domińska, K., & Piastowska-Ciesielska, A. W. (2017). The dose-dependent effect of zearalenone on mitochondrial metabolism, plasma membrane permeabilization and cell cycle in human prostate cancer cell lines. *Chemosphere*, **180**, 455-466.

Kowalska, K., Habrowska-Górczyńska, D. E., & Piastowska-Ciesielska, A. W. (2016). Zearalenone as an endocrine disruptor in humans. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **48**, 141-149.

Köppen, R., Riedel, J., Proske, M., Drzymala, S., Rasenko, T., Durmaz, V., Weber, M., & Koch, M. (2012). Photochemical trans-/cis-Isomerization and Quantitation of Zearalenone in Edible Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**, 11733-11740.

Kriszt, R., Winkler, Z., Polyák, Á., Kuti, D., Molnár, C., Hrabovszky, E., Kalló, I., Szóke, Z., Ferenczi, S., & Kovács, K. J. (2015). Xenoestrogens ethinyl estradiol and zearalenone cause precocious puberty in female rats via central kisspeptin signaling. *Endocrinology*, **156**(11), 3996-4007.

Krivobok, S., Olivier, P., Marzin, D. R., Seigle-Murandi, F., & Steiman, R. (1987). Study of the genotoxic potential of 17 mycotoxins with the SOS Chromotest. *Mutagenesis*, **2**(6), 433-439.

Kuczuk, M. H., Benson, P. M., Heath, H., & Hayes, A. W. (1978). Evaluation of the mutagenic potential of mycotoxins using *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, **53**(1), 11-20.

Kuiper, G. G., Carlsson, B. O., Grandien, K. A. J., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S., & Gustafsson, J. A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology*, **138**(3), 863-870.

Kuiper-Goodman, T., Scott, P. M., & Watanabe, H. (1987). Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **7**, 253-306.

Kushwaha, R. S., Hazzard, W. R., Gagne, C., Chait, A., & Albers, J. J. (1977). Type III hyperlipoproteinemia: paradoxical hypolipidemic response to estrogen. *Annals of Internal Medicine*, **87**(5), 517-525.

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.

Lappalainen, K., Jääskeläinen, I., Syrjänen, K., Urtti, A., & Syrjänen, S. (1994). Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes. *Pharmaceutical Research*, **11**(8), 1127-1131.

Lee, J. H., Wada, T., Febbraio, M., He, J., Matsubara, T., Lee, M. J., Gonzalez, F. J., & Xie, W. (2010). A novel role for the dioxin receptor in fatty acid metabolism and hepatic steatosis. *Gastroenterology*, **139**(2), 653-663.

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. S., Chun, S. Y., Kwon, Y. S., Kim, S., & Nam, K. S. (2017). Deep sea water improves hypercholesterolemia and hepatic lipid accumulation through the regulation of hepatic lipid metabolic gene expression. *Molecular Medicine Reports*, **15**(5), 2814-2822.

Lee, Y. J., Ko, E. H., Kim, J. E., Kim, E., Lee, H., Choi, H., Yu, J. H., Kim, H. J., Seong, J. K., Kim, K. S., & Kim, J. W. (2012). Nuclear receptor PPAR γ -regulated monoacylglycerol O-acyltransferase 1 (MGAT1) expression is responsible for the lipid accumulation in diet-induced hepatic steatosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**(34), 13656-13661.

Leren, T. P. (2014). Sorting an LDL receptor with bound PCSK9 to intracellular degradation. *Atherosclerosis*, **237**(1), 76-81.

Li, A. C., & Glass, C. K. (2004). PPAR-and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*, **45**(12), 2161-2173.

Li, S., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2010). Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**(8), 3441-3446.

Liang, H., & Ward, W. F. (2006). PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Advances in Physiology Education*, **30**(4), 145-151.

Liu, G., Yan, T., Wang, J., Huang, Z., Chen, X., Jia, G., Wu, C., Zhao, H., Xue, B., Xiao, L., & Tang, J. (2013). Biological system responses to zearalenone mycotoxin exposure by integrated metabolomic studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**(46), 11212-11221.

Liu, G. F., Ma, J., Guan, C. Y., Li, X. C., Qin, Q. D., & Li, G. B. (2008). Study on adsorption of bisphenol A from aqueous solution on modified activated Carbons. *Huan jing ke xue= Huanjing kexue/[bian ji, Zhongguo ke xue yuan huan jing ke xue wei yuan hui" Huan jing ke xue" bian ji wei yuan hui.]*, **29**(2), 349-355.

Liu, K. H., Sun, X. F., Feng, Y. Z., Cheng, S. F., Li, B., Li, Y. P., Shen, W., & Li, L. (2017). The impact of Zearalenone on the meiotic progression and primordial follicle assembly during early oogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **329**, 9-17.

Liu, M., Gao, R., Meng, Q., Zhang, Y., Bi, C., & Shan, A. (2014). Toxic effects of maternal zearalenone exposure on intestinal oxidative stress, barrier function, immunological and morphological changes in rats. *PloS One*, **9**(9), e106412.

Lundholm, L., Bryzgalova, G., Gao, H., Portwood, N., Falt, S., Berndt, K. D., Dicker, A., Galuska, D., Zierath, J. R., Gustafsson, J. A., Efendic, S., Dahlman-Wright, K., & Khan, A. (2008). The estrogen receptor alpha-selective agonist propyl pyrazole triol improves glucose tolerance in ob/ob mice; potential molecular mechanisms. *Journal of Endocrinology*, **199**, 275–286.

Maaroufi, K., Chekir, L., Creppy, E. E., Ellouz, F., & Bacha, H. (1996). Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats. *Toxicol*, **34**(5), 535-540.

Maeda, S., Nakatsuka, I., Hayashi, Y., Higuchi, H., Shimada, M., & Miyawaki, T. (2008). Heme oxygenase-1 induction in the brain during lipopolysaccharide-induced acute inflammation. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, **4**(3), 663.

Malekinejad, H. (2013). Zearalenone is converted to a potent oestrogenic metabolite by the equine hepatic subcellular fractions and hepatocytes. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, **16**, 260–270.

Maragos, C. M. (2012). Zearalenone occurrence in surface waters in central Illinois, USA. *Food Additives and Contaminants: Part B*, **5**(1), 55-64.

McGregor, D. B., Brown, A., Cattanach, P., Edwards, I., McBride, D., Riach, C., & Caspary, W. J. (1988). Responses of the L5178Y tk⁺/tk⁻ mouse lymphoma cell forward mutation assay: III. 72 coded chemicals. *Environmental Mutagenesis*, **12**(1), 85-154.

Mesnil, M., Crespin, S., Avanzo, J. L., & Zaidan-Dagli, M. L. (2005). Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1719**(1), 125-145.

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

Mi, S., Da-Ke, Z., Qin, Q., Lei, L., Jun-Ling, W., Guan-Hua, C., Tao, L., Zhi-Wei, Z. (2015). Identification of Glutathione S-Transferase (GST) Genes from a Dark Septate Endophytic Fungus (*Exophiala pisciphila*) and Their Expression Patterns under Varied Metals Stress. *PLoS One*, **10**(4).

Milano, G. D., Becu-Villalobos, D., & Tapia, M. O. (1995). Effects of long-term zearalenone administration on spermatogenesis and serum luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and prolactin values in male rats. *American Journal of Veterinary Research*, **56**(7), 954-958.

Minervini, F., Giannoccaro, A., Cavallini, A., & Visconti, A. (2005). Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters. *Toxicology Letters*, **159**(3), 272-283.

Mitro, N., Mak, P. A., Vargas, L., Godio, C., Hampton, E., Molteni, V., Kreusch, A., & Saez, E. (2007). The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature*, **445**(7124), 219.

Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., & Kan, Y. W. (1994). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**(21), 9926-9930.

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

Mortelmans, K., Haworth, S., Lawlor, T., Speck, W., Tainer, B. & Zeiger, E. (1986) Salmonella mutagenicity tests. 2. Results from the testing of 270 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **8**, 1-119.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**(1), 55-63.

Mukherjee, D., Royce, S. G., Alexander, J. A., Buckley, B., Isukapalli, S. S., Bandera, E. V., Zarbl, H., & Georgopoulos, P. G. (2014). Physiologically-based toxicokinetic modeling of zearalenone and its metabolites: Application to the Jersey girl study. *PloS One*, **9**(12), e113632.

Muthulakshmi, S., Maharajan, K., Habibi, H. R., Kadirvelu, K., & Venkataramana, M. (2018). Zearalenone induced embryo and neurotoxicity in zebrafish model (*Danio rerio*): Role of oxidative stress revealed by a multi biomarker study. *Chemosphere*, **198**, 111-121.

Naaz, A., Zakroczymski, M., Heine, P., Taylor, J., Saunders, P., Lubahn, D., & Cooke, P. S. (2002). Effect of ovariectomy on adipose tissue of mice in the absence of estrogen receptor alpha (ER α): a potential role for estrogen receptor beta (ER β). *Hormone and Metabolic Research*, **34**(11/12), 758-763.

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.

Newbold, R. R., Padilla-Banks, E., & Jefferson, W. N. (2006). Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations. *Endocrinology*, **147**(6), 11–17.

Nguyen, A., Ricolfi, F., Lemogne, B., Aho, S., Lemaire, S., Bouillet, B., Duvillard, L., Denimal, D., Fourmont, C., Loffroy, R., Cercueil, J. P., Verges, B., Petit, J. M. (2018). Liver Fat Content in People with Pituitary Diseases: Influence of Serum IGF1 Levels. *Hormone and Metabolic Research*, **50**(04), 303-307.

Nogowski, L. (1996). Effect of the myco-oestrogen zearalenone on carbohydrate and lipid metabolism indices in ovariectomized female rats. Possible role of insulin and its receptor. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, **75**(1-5), 156-163.

Omurtag, G.Z. (2002). Mikotoksinli besinlerin oluşturacağı tehlikeler. *Clinic*, **1**, 34-37.

Ostry, V., Malir, F., Toman, J., & Grosse, Y. (2017). Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Research*, **33**(1), 65-73.

Othmen, Z. O. B., El Golli, E., Abid-Essefi, S., & Bacha, H. (2008). Cytotoxicity effects induced by Zearalenone metabolites, α Zearalenol and β Zearalenol, on cultured Vero cells. *Toxicology*, **252**(1-3), 72-77.

Penning, T. M., Jin, Y., Steckelbroeck, S., Lanisnik Rizner, T., & Lewis, M. (2004). Structure–function of human 3 α hydroxysteroid dehydrogenases: genes and proteins. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **215**, 63–72.

Pestka, J. J., Tai, J. H., Witt, M. F., Dixon, D. E., & Forsell, J. H. (1987). Suppression of immune response in the B6C3F1 mouse after dietary exposure to the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. *Food and Chemical Toxicology*, **25**(4), 297-304.

Pfeiffer, E., Hildebrand, A., Damm, G., Rapp, A., Cramer, B., Humpf, H-U., & 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. *Molecular Nutrition & Food Research*, **55**, 560–567.

Pistol, G. C., Braicu, C., Motiu, M., Gras, M. A., Marin, D. E., Stancu, M., Calin, L., Israel-Roming, F., Berindan-Neagoe, I., & Taranu, I. (2015). Zearalenone mycotoxin affects immune mediators, MAPK signalling molecules, nuclear receptors and genome-wide gene expression in pig spleen. *PLoS One*, **10**(5), e0127503.

Pistol, G. C., Gras, M. A., Marin, D. E., Israel-Roming, F., Stancu, M., & Taranu, I. (2014). Natural feed contaminant zearalenone decreases the expressions of important pro-and anti-inflammatory mediators and mitogen-activated protein kinase/NF- κ B signalling molecules in pigs. *British Journal of Nutrition*, **111**(3), 452-464.

Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*, **28**(10), 1057.

Pozzo, L., Vornoli, A., Coppola, I., Della Croce, C. M., Giorgetti, L., Gervasi, P. G., & Longo, V. (2016). Effect of HFD/STZ on expression of genes involved in lipid, cholesterol and glucose metabolism in rats. *Life Sciences*, **166**, 149-156.

Prins, G. S., Marmer, M., Woodham, C., Chang, W., Kuiper, G., Gustafsson, J. A., & Birch, L. (1998). Estrogen receptor- β messenger ribonucleic acid ontogeny in the prostate of normal and neonatally estrogenized rats. *Endocrinology*, **139**(3), 874-883.

Prouillac, C., Koraichi, F., Videmann, B., Mazallon, M., Rodriguez, F., Baltas, M., & Lecoecur, S. (2012). In vitro toxicological effects of estrogenic mycotoxins on human placental cells: Structure activity relationships. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **259**(3), 366-375.

Pung, O. J., Luster, M. I., Hayes, H. T., & Rader, J. (1984). Influence of steroidal and nonsteroidal sex hormones on host resistance in mice: increased susceptibility to *Listeria monocytogenes* after exposure to estrogenic hormones. *Infection and Immunity*, **46**(2), 301-307.

Qin, X., Cao, M., Lai, F., Yang, F., Ge, W., Zhang, X., Cheng, S., Sun, X., Qin, G., Shen, W., & Li, L. (2015). Oxidative stress induced by zearalenone in porcine granulosa cells and its rescue by curcumin in vitro. *PloS One*, *10*(6), e0127551.

Ramsahoye, B.H. (2002). Measurement of genome wide DNA methylation by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Methods*, *27*(2), 156-161.

Reddy, K. E., Song, J., Lee, H. J., Kim, M., Kim, D. W., Jung, H. J., Kim, B., Lee, Y., Yu, D., Kim, D. W., Oh, Y. K., & Lee, S. D. (2018). Effects of High Levels of Deoxynivalenol and Zearalenone on Growth Performance, and Hematological and Immunological Parameters in Pigs. *Toxins*, *10*(3), 114.

Reimer, R. A., Leone-Vautravers, P., Zbinden, I., Harris, C. C., Pfeifer, A. M., & Macé, K. (2004). Dysregulation of fatty acid synthase mRNA in immortalized human hepatocyte cell lines in response to high glucose and the absence of GLUT2. *Nutrition Research*, *24*(5), 321-336.

Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J.L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, *3*(7), 1125-1131.

Riss, T. L., & Moravec, R. A. (2006). Cell proliferation assays: improved homogeneous methods used to measure the number of cells in culture. *In Cell Biology* (Third Edition) (pp. 25-31).

Ritossa, F. (1996). Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones*, *1*, 97-98.

Rogue, A., Lambert, C., Jossé, R., Antherieu, S., Spire, C., Claude, N., & Guillouzo, A. (2011). Comparative gene expression profiles induced by PPAR γ and PPAR α/γ agonists in human hepatocytes. *PLoS One*, *6*(4), e18816.

Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M., & Nyrén, P. (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical Biochemistry*, *242*(1), 84-89.

Ropero, A. B., Alonso-Magdalena, P., Garcia-Garcia, E., Ripoll, C., Fuentes, E., & Nadal, A. (2008). Bisphenol-A disruption of the endocrine pancreas and blood glucose homeostasis. *International Journal of Andrology*, *31*(2), 194-200.

Rosa, S. C., Gonçalves, J., Judas, F., Mobasher, 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.

Rose, D. P., Komninou, D., & Stephenson, G. D. (2004). Obesity, adipocytokines, and insulin resistance in breast cancer. *Obesity Reviews*, *5*(3), 153-165.

Ruddick, J. A., Scott, P. M., & Harwig, J. (1976). Teratological evaluation of zearalenone administered orally to the rat. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *15*(6), 678-681.

Russmann, E., Sieber, K., Doppler, C. and 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.

Salah-Abbès, J. B., Abbès, S., Abdel-Wahhab, M. A., & Oueslati, R. (2010). Immunotoxicity of zearalenone in Balb/c mice in a high subchronic dosing study counteracted by *Raphanus sativus* extract. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, *32*(4), 628-636.

Sangkitikomol, W., Tencomnao, T., & Rocejanasaroj, A. (2010). Effects of Thai black sticky rice extract on oxidative stress and lipid metabolism gene expression in HepG 2 cells. *Genetics and Molecular Research*, *9*(4), 2086-2095.

Sargis, R. M., Johnson, D. N., Choudhury, R. A., & Brady, M. J. (2010). Environmental endocrine disruptors promote adipogenesis in the 3T3-L1 cell line through glucocorticoid receptor activation. *Obesity*, *18*(7), 1283-1288.

Sawan, C., Vaissie`re, T., Murr, R. & Herceg, Z. (2008). Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutation Research*, *642*, 1-13.

Schones, D. E., Leung, A., & Natarajan, R. (2015). Chromatin modifications associated with diabetes and obesity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *35*(7), 1557-1561.

el-Sharkaway, S. H., Selim, M. I., Afifi, M. S., & Halaweish, F. T. (1991). Microbial transformation of zearalenone to a zearalenone sulfate. *Applied and Environmental Microbiology*, *57*, 549-552.

Shinkarenko, L., Kaye, A. M., & Degani, H. (1994). ¹³C NMR kinetic studies of the rapid stimulation of glucose metabolism by estrogen in immature rat uterus. *NMR in Biomedicine*, *7*, 209-217.

Shughrue, P. J., Komm, B., & Merchenthaler, I. (1996). The distribution of estrogen receptor- β mRNA in the rat hypothalamus. *Steroids*, *61*(12), 678-681.

Sigma-Aldrich. (16 Ekim 2015). Sigma-Aldrich Ürün Güvenlik Bilgi Formu. <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=TR&language=tr&productNumber=Z2125&brand=SIGMA&PageToGoToURL=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2Fz2125%3Flang%3Den>.

Sirover, M. A. (2012). Subcellular dynamics of multifunctional protein regulation: mechanisms of GAPDH intracellular translocation. *Journal of Cellular Biochemistry*, **113**(7), 2193-2200.

Smathers, R. L., & Petersen, D. R. (2011). The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions. *Human Genomics*, **5**(3), 170.

Smith, J. F., Di Menna, M. E., & McGowan, L. T. (1990). Reproductive performance of Coopworth ewes following oral doses of zearalenone before and after mating. *Journal of Reproduction and Fertility*, **89**(1), 99-106.

Smith, P. M., Cowan, A., & White, B. A. (2004). The low-density lipoprotein receptor is regulated by estrogen and forms a functional complex with the estrogen-regulated protein ezrin in pituitary GH3 somatolactotropes. *Endocrinology*, **145**(7), 3075-3083.

Snider, N. T., Weerasinghe, S. V., Singla, A., Leonard, J. M., Hanada, S., Andrews, P. C., Lok, A. S., & Omary, M. B. (2011). Energy determinants GAPDH and NDPK act as genetic modifiers for hepatocyte inclusion formation. *The Journal of Cell Biology*, **195**(2), 217-229.

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.

Sookoian, S., Castaño, G. O., Burgueño, A. L., Gianotti, T. F., Rosselli, M. S., & Pirola, C. J. (2010). The nuclear receptor PXR gene variants are associated with liver injury in nonalcoholic fatty liver disease. *Pharmacogenetics and Genomics*, **20**(1), 1-8.

Srinivasa, S., Suresh, C., Mottla, J., Hamarneh, S. R., Irazoqui, J. E., Frontera, W., Torriani, M., Stanley, T., & Makimura, H. (2016). FNDC5 relates to skeletal muscle IGF-I and mitochondrial function and gene expression in obese men with reduced growth hormone. *Growth Hormone & IGF Research*, **26**, 36-41.

Stanley, S., Wynne, K., McGowan, B., & Bloom, S. (2005). Hormonal regulation of food intake. *Physiological Reviews*, **85**(4), 1131-1158.

Stark, A. A. (1980). Mutagenicity and carcinogenicity of mycotoxins: DNA binding as a possible mode of action. *Annual Reviews in Microbiology*, **34**(1), 235-262.

Stob, M., Baldwin, R. S., Tuite, J., Andrews, F. N., & Gillette, K. G. (1962). Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. *Nature*, **196**, 1318.

Sun, C., Fan, J. G., & Qiao, L. (2015). Potential epigenetic mechanism in non-alcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**(3), 5161-5179.

Szabó, A., Szabó-Fodor, J., Fébel, H., Mézes, M., Balogh, K., Bázár, G., Kocsó, D., Ali, O., & Kovács, M. (2018). Individual and combined effects of fumonisin b1, deoxynivalenol and zearalenone on the hepatic and renal membrane lipid integrity of rats. *Toxins*, **10**(1), 4.

T.C. Resmi Gazete, 16 Kasım 1997. Sayı: 23172. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. Mikrobiyal Toksinler. s.124.

T.C. Resmi Gazete, 23 Eylül 2002. Sayı: 24885. Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ. Tebliğ No: 2002/63.

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

Tailleux, A., Wouters, K., & Staels, B. (2012). Roles of PPARs in NAFLD: potential therapeutic targets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1821**(5), 809-818.

Tan, M. H. (2000). Current treatment of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Clinical Practice. Supplement*, (113), 54-62.

Tanaka, N., Aoyama, T., Kimura, S., & Gonzalez, F. J. (2017). Targeting nuclear receptors for the treatment of fatty liver disease. *Pharmacology & Therapeutics*, **179**, 142-157.

Tatay, E., Espín, S., García-Fernández, A. J., & Ruiz, M. J. (2017a). Estrogenic activity of zearalenone, α -zearalenol and β -zearalenol assessed using the E-screen assay in MCF-7 cells. *Toxicology Mechanisms and Methods*, **28**(4), 239-242.

Tatay, E., Espín, S., García-Fernández, A. J., & Ruiz, M. J. (2017b). Oxidative damage and disturbance of antioxidant capacity by zearalenone and its metabolites in human cells. *Toxicology in Vitro*, **45**, 334-339.

Tatay, E., Meca, G., Font, G., & Ruiz, M. J. (2014). Interactive effects of zearalenone and its metabolites on cytotoxicity and metabolization in ovarian CHO-K1 cells. *Toxicology in Vitro*, **28**(1), 95-103.

Tennant, R. W., Margolin, B. H., Shelby, M. D., Zeiger, E., Haseman, J. K., Spalding, J., Caspary, W., Resnik, M.A., Stasiewicz, S., Anderson, B. & Minor, R. (1987). Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays. *Science*, **236**(4804), 933-941.

Thust, R., Kneist, S., & Hühne, V. (1983). Genotoxicity of Fusarium mycotoxins (nivalenol, fusarenon-X, T-2 toxin, and zearalenone) in Chinese hamster V79-E cells in vitro. *Archiv fur Geschwulstforschung*, **53**(1), 9-15.

Tomaszewski, J., Miturski, R., Semczuk, A., Kotarski, J., & Jakowicki, J. (1998). Tissue zearalenone concentration in normal, hyperplastic and neoplastic human endometrium. *Ginekologia Polska*, **69**(5), 363-366.

Tomaz, L. M., Barbosa, M. R., Farahnak, Z., Lagoeiro, C. G., Magosso, N. S., Lavoie, J. M., & Perez, S. E. (2016). GLUT2 proteins and PPAR γ transcripts levels are increased in liver of ovariectomized rats: reversal effects of resistance training. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*, **20**(2), 51.

Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A., & Nestler, E. J. (2007). Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, **8**(5), 355-67.

Tsuchida, A., Yamauchi, T., Ito, Y., Hada, Y., Maki, T., Takekawa, S., Kamon, J., Kobayashi, M., Suzuki, R., Hara, K., Kubota, N., Terauchi, Y., Froguel, P., Nakae, J., Kasuga, M., Accili, D., Tobe, K., Ueki, K., Nagai, R., & Kadowaki, T. (2004). Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(29), 30817-30822.

Tunail, N. (2000). Funguslar ve Mikotoksinler. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Genişletilmiş 2. Baskı, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Muhendisliği Bölümü yayını, s:522, 03.Bolum, 13.kısım, Sim Matbaası, Ankara.

Ueno, Y., & Kubota, K. (1976). DNA-attacking ability of carcinogenic mycotoxins in recombination-deficient mutant cells of *Bacillus subtilis*. *Cancer Research*, **36**(2 Part 1), 445-451.

Van Meerloo, J., Kaspers, G.J., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. In *Cancer Cell Culture* (pp. 237-245). *Humana Press*.

VanSaun, M. N., Mendonsa, A. M., & Gorden, D. L. (2013). Hepatocellular proliferation correlates with inflammatory cell and cytokine changes in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease. *PLoS One*, *8*(9), e73054.

Venkataramana, M., Nayaka, S. C., Anand, T., Rajesh, R., Aiyaz, M., Divakara, S. T., Murali, H. S., Prakash, H. S., & Lakshmana Rao, P. V. (2014). Zearalenone induced toxicity in SHSY-5Y cells: the role of oxidative stress evidenced by N-acetyl cysteine. *Food and Chemical Toxicology*, *65*, 335-342.

Videmann, B., Mazallon, M., Prouillac, C., Delaforge, M., & Lecoecur, S. (2009). ABCC1, ABCC2 and ABCC3 are implicated in the transepithelial transport of the myco-estrogen zearalenone and its major metabolites. *Toxicology Letters*, *190*, 215–223.

Viegas, S., Viegas, C., Ramos, C., Silva, M., Sabino, R., Veríssimo, C., & Rosado, L. (2011). Risk assessment of exposure to multiple mycotoxins in food. *Food and Environment: The Quest for a Sustainable Future*, *152*, 81-87.

Wagner, J., & Lehmann, L. (2006). Estrogens modulate the gene expression of Wnt-7a in cultured endometrial adenocarcinoma cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, *50*(4-5), 368-372.

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.

Wang, Y., Chai, T., Lu, G., Quan, C., Duan, H., Yao, M., Zucker, B.-A., & Schlenker, G. (2008). Simultaneous detection of airborne Aflatoxin, Ochratoxin and Zearalenone in a poultry house by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography. *Environmental Research*, *107*, 139-144.

Wang, Y. L., Zhu, B. J., Qi, Z. Z., Wang, H. J., & Zhou, X. D. (2013). Akt1 enhances CA916798 expression through mTOR pathway. *PloS one*, *8*(5), e62327.

Wang, Y., Zheng, W., Bian, X., Yuan, Y., Gu, J., Liu, X., Liu, Z., & Bian, J. (2014). Zearalenone induces apoptosis and cytoprotective autophagy in primary Leydig cells. *Toxicology Letters*, *226*(2), 182-191.

Waśkiewicz, A., Gromadzka, K., Bocianowski, J., Pluta, P., & Goliński, P. (2012). Zearalenone contamination of the aquatic environment as a result of its presence in crops. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, **63**(4), 429-434.

Wehner, F. C., Marasas, W., & Thiel, P. G. (1978). Lack of mutagenicity to *Salmonella typhimurium* of some *Fusarium* mycotoxins. *Applied and Environmental Microbiology*, **35**(4), 659-662.

Willemart, J. P., & Bouffault, J. C. (1983). A RAL compound as an anabolic in cattle. *Veterinary Research Communications*, **7**(1), 35-44.

Williams, B. A., Mills, K. T., Burroughs, C. D., & Bern, H. A. (1989a). Reproductive alterations in female C57BL/6 mice exposed neonatally to zearalenone, an estrogenic mycotoxin. *Cancer Letters*, **46**(3), 225-230.

Williams, G. M., Mori, H., & McQueen, C. A. (1989b). Structure-activity relationships in the rat hepatocyte DNA-repair test for 300 chemicals. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, **221**(3), 263-286.

Wyatt, E., Wu, R., Rabeh, W., Park, H. W., Ghanefar, M., & Ardehali, H. (2010). Regulation and cytoprotective role of hexokinase III. *PLoS One*, **5**(11), e13823.

Xu, M. L., Hu, J., Guo, B. P., Niu, Y. R., Xiao, C., & Xu, Y. X. (2016). Exploration of intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in zearalenone-treated rat sertoli cells. *Environmental Toxicology*, **31**(12), 1731-1739.

Xu, P., Ye, W., Li, H., Lin, S. H., Kuo, C. T., Feng, E., & Lin, Y. C. (2010). Zearalenone enhances leptin-induced proliferation in primary cultured human breast cancer epithelial cells. *Molecular Medicine Reports*, **3**(5), 795-800.

Xu, P., Zhai, Y., & Wang, J. (2018). The Role of PPAR and Its Cross-Talk with CAR and LXR in Obesity and Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**(4), 1260.

Yakar, S., Rosen, C. J., Beamer, W. G., Ackert-Bicknell, C. L., Wu, Y., Liu, J. L., Ooi, G. T., Setser, J., Frystyk, J., Boisclair, Y. R., & LeRoith, D. (2002). Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *The Journal of Clinical Investigation*, **110**(6), 771-781.

Yang, D., Jiang, T., Lin, P., Chen, H., Wang, L., Wang, N., Zhao, F., Tang, K., Zhou, D., Wang, A., & Jin, Y. (2017). Apoptosis inducing factor gene depletion inhibits zearalenone-induced cell death in a goat Leydig cell line. *Reproductive Toxicology*, **67**, 129-139.

Ye, W., Xu, P., Jen, R., Feng, E., Zhong, S., Li, H., Lin, S. H., Liu, J. Y., & Lin, Y. C. (2011). Zearanol down-regulates p53 expression in primary cultured human breast cancer epithelial cells through epigenetic modification. *International Journal of Molecular Sciences*, **12**(3), 1519-1532.

Yu, Z., Zhang, L., Wu, D., & Liu, F. (2005). Anti-apoptotic action of zearalenone in MCF-7 cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **62**(3), 441-446.

Zeybel, M., Hardy, T., Wong, Y. K., Mathers, J. C., Fox, C. R., Gackowska, A., Oakley, F., Burt, A. D., Wilson, C. L., Anstee, Q. M., Barter, M. J., Masson, S., Elsharkawy, A. M., Mann, D. A., & Mann, J. (2012). Multigenerational epigenetic adaptation of the hepatic wound-healing response. *Nature Medicine*, **18**(9), 1369.

Zhang, W., Zhang, S., Zhang, M., Yang, L., Cheng, B., Li, J., & Shan, A. (2018). Individual and combined effects of *Fusarium* toxins on apoptosis in PK15 cells and the protective role of N-acetylcysteine. *Food and Chemical Toxicology*, **111**, 27-43.

Zheng, W., Huang, Q., Pan, S., Fan, W., Wang, G., Yuan, Y., Gu, J., Liu, X., Liu, Z., & Bian, J. (2017). Regulation of oncogenes and gap junction intercellular communication during the proliferative response of zearalenone in TM3 cells. *Human & Experimental Toxicology*, **36**(7), 701-708.

Zheng, W., Wang, B., Li, X., Wang, T., Zou, H., Gu, J., Yuan, Y., Liu, X., Bai, J., Bian, J., & Liu, Z. (2018). Zearalenone Promotes Cell Proliferation or Causes Cell Death?. *Toxins*, **10**(5), 184.

Zhong, S., Liu, S., Chen, S., Lin, H., Wang, W., & Qin, X. (2016). Zearanol stimulates proliferation and aromatase activation in human breast preadipocytes. *Molecular Medicine Reports*, **14**(1), 1014-1018.

Zhou, S., Wang, Y., Ma, L., Chen, X., Lü, Y., Ge, F., Chen, Y., Chen, X., Lian, Q., Jin, X. D., & Ge, R. S. (2018). Zearalenone Delays Rat Leydig Cell Regeneration. *Toxicological Sciences*, **164**(1), 60-71.

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.

Zhu, L., Zhang, B., Dai, Y., Li, H., & Xu, W. (2017). A review: epigenetic mechanism in ochratoxin a toxicity studies. *Toxins*, **9**(4), 113.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ZEARALENON VE METABOLİTLERİNİN ENERJİ METABOLİZMASINDA ROL OYNAYAN GENLER ÜZERİNE ETKİLERİNDE EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN IN VITRO İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%6 BENZERLİK ENDEKSİ	%4 İNTERNET KAYNAKLARI	%3 YAYINLAR	%2 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	-------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Yeditepe University Öğrenci Ödevi	%1
2	PELEN, Kadriye and GÜNAY, Osman. "İlköğretim okulu öğrencilerine verilen sağlık eğitiminin öğrencilerin bilgi, tutum ve davranışlarına etkisi", Fırat Üniversitesi, 2013. Yayın	<%1
3	vskn.tarim.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	www.mikrobiyolbul.org İnternet Kaynağı	<%1
5	ZİK, Berrin, AKKOÇ, Cansel G. Özgüden and TÜTÜNCÜ, Şerife. "Sıçan ovaryumunda düşük doz capsaicinin NF-kB ve XIAP proteininin sentezlenmesi üzerine etkisi", Ankara Üniversitesi, 2010. Yayın	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ecem Fatma	Soyadı	Karaman
Doğ.Yeri	Samsun	Doğ.Tar.	01.08.1988
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	33532532916
Email	ecemfatmakaraman@gmail.com	Tel	05362712297

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji A.B.D.	2018
Yük.Lis.	İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Kozmetoloji Bilim Dalı	2013
Lisans	İ.Ü. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2010
Lise	Samsun Tülay Başaran Anadolu Lisesi	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	İyi	55	YÖKDİL: 83,75

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	75	-	-
(Diğer) Puanı	-	-	-

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

ULUSLARARASI YAYIN VE ETKİNLİKLER

Uluslararası dergilerde yayınlanmış özgün araştırma

Uner, M., **Karaman, E. F.** (2013) Preliminary studies on solid lipid microparticles of loratadine for the treatment of allergic reactions via the nasal route, Trop. J. Pharm. Res., 12(3), 287-293.

Uner, M., **Karaman, E. F.**, Aydoğmuş Z. (2014) Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers of loratadine for topical application: Physicochemical stability and drug penetration through rat skin, Trop. J. Pharm. Res., 13(5), 653-660.

Uner, M, Yener, G., Ergüven, M., **Karaman, E. F.**, Utku E.G. (2014) Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers of celecoxib for topical application -

Preparation, characterization and drug penetration through rat skin, *Curr. Nanosci.*, 10(4), 532-542.

Gönüllü Ü., Uner M., Yener F.G., **Karaman E. F.**, Aydoğmuş Z. (2015) Formulation And Characterization Of Solid Lipid Nanoparticles, Nanostructured Lipid Carriers And Nanoemulsion Of Lornoxicam For Transdermal Delivery, *ACTA PHARMACEUTICA*, 65, 1-13.

Jannuzzi A.T., **Karaman E.**, Oztaş E., Ozhan G. (2015) Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) Gene Variations and Susceptibility of Colorectal Cancer, *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 1, 1-1.

Senyıldız, M., **Karaman, E. F.**, Baş, S. S., Piriñçi, P. A., Ozden, S. (2017) Effects of BPA on Global DNA Methylation and Global Histone 3 Lysine Modifications in SH-SY5Y Cells: An Epigenetic Mechanism Linking the Regulation of Chromatin Modifying Genes. *Toxicol. In Vitro*, 44, 313-21.

Karaman E. F., Ozden S. Effects of Zearalenone on DNA methylation in MCF7 and MCF 10F cells: linking the regulation of metabolism related genes. (yayın için gönderilmek üzere hazır).

Ozden, S., **Karaman, E. F.**, Senyıldız, M., Baş, S. S., Piriñçi, P. A. Effects of Bisphenol A on DNA Methylation and Histone Modifications in Human Prostate Cancer Cells. (yayın için gönderilmek üzere hazır).

Uluslararası bilimsel toplantılarda sözlü sunulan bildiri

Senyıldız M., **Karaman E. F.**, Sancar-Baş S., Arda-Piriñçi P., Ozden S. Effects of BPA on Global DNA Methylation and Global Histone 3 Lysine Modifications in SH-SY5Y Cells: An Epigenetic Mechanism Linking the Regulation of Chromatin Modifying Genes. 10th Congress of Toxicology in Developing Countries. April 18-21, 2018. Belgrade, Serbia.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan poster

Uner, M., **Karaman, E. F.** Topical delivery of loratadine from various vehicles and solid lipid microparticles (SLM), 8th World Meeting on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 19-22 Mart 2012, İstanbul, Türkiye.

Karaman, E. F., Ozden S. Epigenetic Alterations of Endocrine Disruptors On Leptin Signaling Pathways and Alzheimer's Disease. International Symposium on Advances in Predictive & Personalized Medicine, 2-3 Nisan 2015, İstanbul, Türkiye.

Oztaş E., Ozhan G., Jannuzzi A.T., **Karaman E. F.**, Yanar F., "Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) Gene Variations and Susceptibility of Colorectal Cancer", International Symposium on Advances in Predictive & Personalized Medicine, 2-3 Nisan 2015, İstanbul, Türkiye.

Jannuzzi A. T., **Karaman E. F.**, Oztaş E., Ozhan G., "Association of Genetic Variants of Telomerase Reverse Transcriptase Gene with Colorectal Cancer", International Symposium on Advances in Predictive & Personalized Medicine, 2-3 Nisan 2015, İstanbul.

Uner, M., Yener, G., Ergüven, M., Utku, G., **Karaman, E. F.** Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers of celecoxib for cancer treatment. Skin Forum 14th Meeting, Percutaneous Penetration - Measurement, Modulation and Modelling, 4-5 Eylül 2015, Prag, Çek Cumhuriyeti.

Senyıldız, M., **Karaman, E. F.**, Ozden, S. Global and gene-specific promoter DNA methylation profiles of bisphenol A in HepG2 cells. 9th Congress of Turkish Society of Toxicology with participation of the Hellenic Society of Toxicology, 21-24 Ekim 2015, Çeşme, İzmir, Türkiye. (*Poster sunumu 1. lik ödülü*)

Karaman E. F., Şenyıldız M., Ozden S. Alteration on DNA Methylation of Rassf1, Cyclin D2

and P16 Genes and Global DNA Methylation and Histone Modifications in Human Hepatocarcinoma Cells in Response to BPA. 52th Congress of the European Societies of Toxicology, 4-7 Eylül 2016, Sevilla, İspanya.

Senyıldız M., **Karaman E. F.**, Sancar Bas S., Ozal C., Arda-Pirincci P., Ozden S. Global and Region-Specific Post-Transcriptional and Post-Translational Modifications of Bisphenol A in Human Prostate Cancer Cells. 52th Congress of the European Societies of Toxicology, 4-7 Eylül 2016, Sevilla, İspanya.

Senyıldız M., **Karaman E. F.**, Ozden S. Global and Region-Specific Post-Transcriptional and Post-Translational Modifications of Bisphenol A in Human Prostate Cancer Cells. 52th Congress of the European Societies of Toxicology, 4-7 Eylül 2016, Sevilla, İspanya.

Karaman E. F., Senyıldız M., Zeybel M., Ozden S. Effects of Zearalenone on the Metabolic Pathways and its relation to the Epigenetic Mechanisms in HepG2 Cells. 53th Congress of the European Societies of Toxicology, Bratislava, Slovakya, 10-13 Eylül 2017, pp.1-1.

Karaman E. F., Senyıldız M., Ozden S. Effects of Zearalenone on Metabolism related Pathways and its Association with the Epigenetic Mechanisms in MCF-7 and MCF-10F Cells. 53th Congress of the European Societies of Toxicology, Bratislava, Slovakya, 10-13 Eylül 2017, pp.1-1.

Omerustaoğlu Bayoğlu S., **Karaman E. F.**, Senyıldız M., Ozden S. Effects of Fumonisin B1 on Global DNA Methylation in HK-2 Cells. 53th Congress of the European Societies of Toxicology, Bratislava, Slovakya, 10-13 Eylül 2017, pp.1-1.

Ulusal dergilerde yayınlanmış özgün araştırma

Senyıldız M., **Karaman E. F.**, Sancar-Bas S., Arda-Pirincci P., Ozden S. 2016. Alteration on global and gene-specific DNA Methylation and global Histone Modifications in HepG2 Cells in Response to BPA. Journal of Faculty of Pharmacy, Istanbul University. 46(2), 97-114.

Ulusal bilimsel toplantılarda sözlü sunulan bildiri

Özden S., Şenyıldız M., **Karaman E. F.**, Sancar-Baş S., Arda-Pirinççi P. Toksikolojide Epigenetik Mekanizmalar: Endokrin Bozucu Kimyasallardan Bisfenol A. IV. Toksikoloji Sempozyumu. 21-22 Ocak 2017. Eskişehir, Türkiye.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan poster

Üner M., Gönüllü Ü., Yener F.G., **Karaman E. F.**, Aydoğmuş Z. Topikal Kullanım İçin Lornoksikam Katı Lipit Nanopartikülleri Ve Nanoyapılı Lipit Taşıyıcıların Hazırlanması Ve Karakterizasyonu. 2. Kimya Ar-Ge Proje Pazarı, 18-19 Eylül 2012, İstanbul.

Üner M., **Karaman E. F.** Alerji Tedavisinde Kullanılmak Üzere Loratadinin Katı Lipit Nanopartiküller Ve Nanoyapılı Lipit Taşıyıcılara Yüklenmesi. 2. Kimya Ar-Ge Proje Pazarı, 18-19 Eylül 2012. İstanbul.

Karaman E. F., Ozden S. Kara Yılanotu (*Actaea racemosa*) Hormonal Tedavideki Rolü ve Toksikitesi XXII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı. 31 Ağustos - 5 Eylül 2016. Trabzon, Türkiye.

Xianmuxinuer A., **Karaman E. F.**, Senyıldız M., Ozden S. Sentetik Kannabinoidlerin Hücre Kültüründe DNA Metilasyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması. Yarışmalı Eczacılık Mezuniyet Projeleri Sempozyumu-YEMPS, 27 Mayıs 2017. Eskişehir.

Görev Aldığı Projeler

Seçici Siklooksijenaz-2 (Cox-2) İnhibitörü Nonsteroidal Antiinflatuvar İlaç Selekoksibin Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Antikanser Etkisinin Araştırılması. TÜBİTAK 1001 Projesi-Bursiyer Öğrenci (Proje No: 110S435), 2011-2012.

Endokrin Sistem Üzerine Etkili Kimyasalların Toksisitelerinde Histon Modifikasyonlarının Rolü. İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği (NP-49518), Yardımcı Araştırmacı, 2014-2016.

Nöroblastoma ve Prostat Kanseri Hücrelerinde Gen Spesifik DNA Metilasyonu ve Histon Modifikasyonu Üzerine Bisfenol A'nın Etkileri. TÜBİTAK Proje No: 115S357, 2015-. (BİDEP Bursiyer).

Zearalenonun Kromatin Modifiye Eden Genler Üzerine Epigenetik Etkilerinin İncelenmesi. İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği (ONAP-20307), Yardımcı Araştırmacı, 2016-2017.

Fumonisin B1'in İnsan Böbrek Hücrelerinde Kansere İlişkili Genlerde Histon Modifikasyonları Üzerine Etkisi. İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği (DKEP- 23293), Yardımcı Araştırmacı, 2017-.

Ödüller

Ozden S., Senyildiz M., **Karaman E. F.** Global and gene-specific promoter DNA methylation profiles of bisphenol A in HepG2 cells. 9th Congress of the Turkish Society of Toxicology with the participation of the Hellenic Society of Toxicology, TurkHelTox (TurkHeltox). 21-24 Ekim 2015. İzmir-Türkiye. Poster 1. lik ödülü.

Burslar

Seçici siklooksijenaz-2 (Cox-2) inhibitörü nonsteroidal antiinflamatuar ilaç selekoksibin nanopartiküllerinin hazırlanması ve antikanser etkisinin araştırılması. TÜBİTAK 1001 Projesi (110S435), 2011-2012.

Zearalenon ve metabolitlerinin enerji metabolizmasında rol oynayan genler üzerine etkilerinde epigenetik değişikliklerin in vitro incelenmesi. TÜBİTAK BİDEB-2211-C/Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Lisans Burs Programı.

Katıldığı Seminer ve Eğitimler

Specialised Toxicology Course Genotoxicity and Carcinogenicity (Belgrade/Serbia), 19-23 Ekim 2015.

International Symposium on Advances in Predictive&Personalized Medicine, 2-3 Nisan 2015.

İstanbul Üniversitesi 11. Uluslararası Katılımlı Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu, 7-9 Mart 2014.

Kozmetik Ürünlerde Güvenlik Değerlendirmesi Eğitim Günleri, 7 Aralık 2012.

ITU BIOTECH 12 Biyoteknoloji Kongresi, 9-10 Nisan 2012.

İstanbul Üniversitesi 8. Kış Okulu, 4-6 Mart 2011.

Antalya 1. Kozmetik Kimyası, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, 18-20 Şubat 2011.

İstanbul Üniversitesi 7. Kış Okulu, 19-21 Şubat 2010.

İTÜ Sektör Günleri, 24 Aralık 2008.

Ulusal Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar Sempozyumu, 20 Aralık 2008.

İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Kariyer Günü, 5 Haziran 2008.

Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji-Genetik Hafta Sonu III, 10-11 Mayıs 2008.

İstanbul Üniversitesi, Programlı Hücre Ölümü Sempozyumu, 9 Nisan 2008.