T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEARALENON'UN TM3 LEYDİG HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ OKSİDATİF ETKİSİ

Gülnaz YILDIRIM

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

Danışman

Prof. Dr. Melike ERKAN

Mayıs, 2014

İSTANBUL

Bu çalışma 30/05/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:

Prof. Dr. Melike ERKAN (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Tuncay ORTA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Tülay İREZ
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Uğur AKSU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Meliha İNCELİ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 36285 ve 3884 numaralı projeler ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışma, zearalenonun TM3 Leydig hücreleri üzerinde oluşturduğu oksidatif hasarı belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca yetişmemde emeği geçen, engin bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarım boyunca bana yol gösteren çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Melike ERKAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında deneyimleriyle yol gösteren, fikir ve tavsiyelerinden yararlandığım sevgili hocam Araş. Gör. Dr. Yasemin TUNALI ve değerli arkadaşım Araş. Gör. Banu Orta YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım sırasında her zaman yan yana olduğum, zorlukları birlikte aştığımız ve her türlü destekleriyle yanımda olan çalışma arkadaşlarım Biyolog Mine CELEP, Biyolog Ezgi HAMZAOĞLU ve Biyolog Batuhan COŞKUN'a çok teşekkür ederim. Yine tez çalışmam boyunca manevi desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Biyolog Nebahat YILDIZBAYRAK ve Biyolog Sezen ERDOĞAN'a çok teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim sırasında, tez çalışmalarım boyunca engin fikirleri ve değerli düşünceleriyle yoluma ışık tutan, tüm manevi desteğiyle yanımda olan Sayın Dr. Reşit KÜKÜRT'e teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her evresinde sonsuz destekleriyle yanımda olan, anlayış ve sevgilerini esirgemeyen sevgili babam Kuddusi YILDIRIM, sevgili annem Munise YILDIRIM ve çok sevdiğim kardeşlerim Kübra, Büşra ve Mürvet YILDIRIM'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışmam boyunca en az benim kadar çalışan, bu zor yolda her adımda bana yardımcı olan ve varlığıyla bana her zaman destek olan sevgili Yusuf Yalçın KÖKEN'e çok teşekkür ederim.

Mayıs, 2014 Gülnaz YILDIRIM

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **i**
İÇİNDEKİLER ..... **ii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **v**
TABLO LİSTESİ ..... **vii**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **viii**
ÖZET ..... **x**
SUMMARY ..... **xii**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **4**
2.1. TESTİSİN GENEL YAPISI 4
2.2. LEYDİG HÜCRESİ 5
2.3. ZEARALENON 7
2.3.1. Zearalenonun Genel Özellikleri 8
2.3.2. Zearalenonun Etkileri 13
2.4. OKSİDATİF HASAR 16
2.5. APOPTOZ 20
2.5.1. Apoptoz Mekanizmaları 20
2.5.2. Apoptozun gösterilmesi 23
3. MALZEME VE YÖNTEM **25**
3.1. KULLANILAN HÜCRE SOYU VE HÜCRE KÜLTÜRÜ 25
3.2. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ 25
3.3. ZEARALENON DOZLARININ HESAPLANMASI VE HAZIRLANMASI 26
3.4. HÜCRE CANLILIĞI VE HÜCRE ÇOĞALMASI 27
3.4.1. MTT Hücre Canlılık Testi 27
3.4.2. Hemositometre ile Hücre Sayımı 28
3.4.3. Bromodeoksiuridin (BrdU) Yöntemi 29
3.5. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER 30
3.5.1. Membran Lipit Peroksidasyonunun Tayini 30

3.5.1.1. Kullanılan Çözeltiler 30
3.5.1.2.Uygulama 30
3.5.2. Total Protein Tayini 31
3.5.2.1.Kullanılan Çözeltiler 31
3.5.2.2.Uygulama 32
3.5.2.3.Hesaplama 32
3.5.3. Proteinlerdeki Oksidatif Hasarın Tespiti 32
3.5.4. Hidroksil Radikalinin Tayini 33
3.5.4.1. Kullanılan Çözeltiler 33
3.5.4.2. Uygulama 34
3.5.4.3. Hesaplama 34
3.5.5. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Tayini 35
3.5.5.1. Kullanılan Çözeltiler 35
3.5.5.2. Uygulama 35
3.5.5.3. Hesaplama 35
3.6. APOPTOZ/NEKROZ 37
3.6.1. Propidium İyodür/Hoechst Yöntemi 37
3.6.1.1. Kullanılan Çözeltiler 37
3.6.1.2. Uygulama 37
3.6.1.3. Hesaplama 38
3.7. İSTATİSTİK ANALİZ 38
4. BULGULAR 39
4.1. HÜCRE CANLILIĞI BULGULARI 39
4.1.1. MTT Bulguları 39
4.1.2. Tripan Mavisi Canlılık Testi Bulguları 40
4.1.3. BrdU Bulguları 41
4.2. OKSİDATİF HASAR BULGULARI 42
4.2.1. Lipit Peroksidasyonu 42
4.2.2. Total Protein Tayini 43
4.2.3. Proteinlerdeki Oksidatif Hasar 44
4.2.4. Hidroksil Radikali 45
4.2.5. Hidrojen Peroksit 46
4.3. APOPTOZ/NEKROZ BULGULARI 47
4.3.1. Propidium İyodür/Hoechst Bulguları 47

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 51
KAYNAKLAR 64
ÖZGEÇMİŞ 81

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.3.1.1: Zearalenonun kimyasal yapısı. 9

Şekil 2.3.1.2: Zearalenon metabolitlerinin kimyasal yapısı 10

Şekil 2.3.1.3: Zearalenonun üç temel metabolik yolağı 12

Şekil 2.3.2.1: Zearalenon metabolitleri aracılığı ile hücre ölümü sinyali. 14

Şekil 2.4.1: Reaktif oksijen türlerinin üretiminin ve antioksidatif sistemlerin dengesi 16

Şekil 2.4.2: Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve antioksidan savunma mekanizması. 19

Şekil 2.5.1.1: Apoptotik olayların şematik gösterimi. 21

Şekil 2.5.1.2: Apoptozda ekstrinsik ve intrinsik yolak. 22

Şekil 3.4.1.1: MTT Canlılık Testi 27

Şekil 4.1.1.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücrelerinde % canlılık üzerine etkileri. 39

Şekil 4.1.2.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücrelerinde % canlı hücre sayısı üzerine olan etkileri. 40

Şekil 4.1.3.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücrelerinde BrdU yöntemiyle belirlenen hücre çoğalması üzerine etkileri. 41

Şekil 4.2.1.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücreleri üzerindeki lipit peroksidasyonuna etkisi. 42

Şekil 4.2.2.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücreleri üzerindeki total protein miktarına etkileri. 43

Şekil 4.2.3.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücreleri üzerindeki tiol grubu (-SH) miktarına etkileri. 44

Şekil 4.2.4.1: Zearalenonun oksidatif hasara bağlı olarak TM3 Leydig hücrelerinde oluşturduğu hidroksil radikali seviyeleri. 45

Şekil 4.2.5.1: Zearalenonun oksidatif hasara bağlı olarak TM3 Leydig hücrelerinde oluşturduğu hidrojen peroksit değerleri. 46

Şekil 4.3.1.1: Zearalenonun 24 saat sonunda TM3 Leydig hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerindeki etkileri. Kontrol grubu. 48

Şekil 4.3.1.2: Zearalenonun 24 saat sonunda TM3 Leydig hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerindeki etkileri. 1,2 nM Zearalenon. 49

Şekil 4.3.1.3: Zearalenonun 24 saat sonunda TM3 Leydig hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerindeki etkileri.. 50

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.4.1: Oksidan kaynakları ve antioksidan savunma sistemleri. 18

Tablo 2.5.1.1: Apoptoz ve Nekrozun morfolojik özelliklerinin karşılaştırılması 23

Tablo 3.3.1: Kontrol, 1,2 nM Zearalenon ve 6 nM Zearalenon uygulanan deney grupları. 26

Tablo 4.1.2.1: TM3 Leydig hücrelerinin 24 saat süre sonundaki canlı ve toplam hücre sayıları. 40

Tablo 4.3.1.1: TM3 Leydig hücrelerinde 24 saat süre sonunda belirlenen % apoptoz/nekroz değerleri 47

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar

(•OH) : Hidroksil radikali
($O_2^{\cdot -}$) : Süperoksit radikali
17β-HSD : 17β hidroksisteroid dehidrogenaz
$^1O_2$: Tekli oksijen
3α-HSD : 3α hidroksisteroid dehidrogenaz
3β HSD-1 : 3β hidroksisteroid dehidrogenaz izomeraz
3β-HSD : 3β hidroksisteroid dehidrogenaz
4HNE : 4-hidroksi-2-nonenal
AIF : Apoptoz indükleyici faktör
Apaf-1 : Apoptotik proteaz aktive edici faktör
BrdU : Bromodeoksiuridin
cAMP : Siklik adenozin monofosfat
CAT : Katalaz
CSF : Koloni uyarıcı faktör
FADD : Fas ile ilişkili adaptör protein
GPx : Glutatyon peroksidaz
GR : Glutatyon
GSH : Glutatyon
GSSG : Glutatyon disülfit
GST : Glutatyon S-transferaz
H_2O_2 : Hidrojen peroksit
H_2O_2 : Hidrojen peroksit
IGF : İnsülin benzeri büyüme faktörü
JNK : c-Jun NH2-terminal kinaz
LDH : Laktat dehidrogenaz
LH : Luteinizan hormon
LOEL : En düşük etkinin gözlemlendiği değer
MAPK : Mitogen-activated protein kinaz
MDA : Melondialdehit
NGF : Nöron büyüme faktörü
$NO^{\bullet -}$: Nitrik oksit
NOAEL : Hiçbir yan etkinin gözlemlenmediği değer
P450 C17 : 17-hidroksilaz ve 17,20-liyaz
P450 scc : p450 yan-zincir kıran enzim
P450CYP11A1: kolesterol yan zincir kıran sitokrom P450
PBR : Periferal-tip benzodiazepin reseptör
PKA : Protein kinaz A
ROS : Reaktif oksijen türleri
SOD : Süperoksit dismutaz
StAR : Steroidogenik Akut Regülatör Protein

SULT **:** Sülfotransferaz
TNF-R1 **:** Tümör nekroz faktör reseptör-1
TRADD : TNFR1-ilişkili ölüm domain protein
TRAIL-R2 **:** TNF ile ilişkili apoptoz indükleyen ligand
UGT **:** Uridindifosfat-glukuronosil transferaz
α-zol : α- zearalenol
β-zol **:** β-zearalenol

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEARALENON'UN TM3 LEYDİG HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ OKSİDATİF ETKİSİ

Gülnaz YILDIRIM

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Melike ERKAN

Bu çalışmada, zearalenonun TM3 Leydig hücreleri üzerindeki oksidatif etkisi hücre canlılığı, hücre çoğalması, sitotoksisite, lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu, Bromodeoksiuridin (BrdU) aktivitesi, reaktif oksijen türlerinin miktarları ölçülerek ve apoptotik indeks hesaplanarak ortaya çıkarılması amaçlanmaktadır.

Mikotoksinler, belirli nem ve ısı koşullarında besin ve yemlerin üzerinde yetişen fungal metabolitlerdir. Ham ve işlenmemiş üründe çoğalarak, ürünün nitelik ve niceliğini değiştirip bozulmasına neden olur. Dünya'daki besin ürünlerinin neredeyse %25'i en az bir mikotoksin tarafından kontaminedir. Mikotoksinler insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere sahip olup toksik, karsinojenik, teratojenik ve mutajenik etki göstermektedir. Mikotoksinlerin aflatoksin, okratoksin ve zearalenon gibi türleri bulunmaktadır. Bu türler arasında bulunan zearalenon *Fusarium* türü küf mantarları tarafından üretilen steroid yapıda olmayan östrojenik bir mikotoksindir ve funguslar tarafından üretildiği bilinen tek östrojendir. Zearalenonun en çok görüldüğü besinler arasında mısır ve ürünleri, mısır gevreği gibi kahvaltılık ürünler, mısır birası, ekmek, ceviz ve hayvan yemleri bulunmaktadır. Yüksek miktarda zearalenon ile kontamine olmuş yemleri tüketen hayvanların sütüne geçtiğinden çiğ ve pastörize süt, süt tozu ve peynirde de bulunmaktadır.

Zearalenonun tüm canlılar üzerinde genotoksik, hepatotoksik, hematotoksik ve karsinojenik etkileri bulunmaktadır. Endokrin sistemi bozan etkilerinin yanı sıra üreme sistemini de etkileyerek infertiliteye sebep olmaktadır. Yapılan *in vivo* çalışmalarda zearalenona maruz kalan bireylerde testis ağırlığının ve serum testosteron miktarının azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca testiküler ve epididimal sperm sayısının azalmasına neden olmaktadır. Yapılan *in vitro* çalışmalara göre ise sperm canlılığının azalmasına ve kromatin yapısının bozulmasına neden olduğu tespit edilmiştir.

Zearalenon 24 saat süreyle 1,2 nM ve 6 nM dozlarında TM3 Leydig hücrelerine uygulanmıştır. Leydig hücrelerinde hücre canlılığı, hücre çoğalması, lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit miktarı ve apoptoz/nekroz oranları ölçülmüştür. Bulgular hücre canlılığı, lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit miktarı ve apoptoz/nekroz oranının arttığını, hücre çoğalmasının azaldığını göstermiştir. Bu bulgular zearalenonun TM3 Leydig hücrelerinde lipit peroksidasyonu ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna bağlı olarak apoptozu teşvik ettiğini göstermektedir.

Mayıs, 2014, 94.

Anahtar kelimeler: Zearalenon, Leydig hücresi, Oksidatif Hasar, Apoptoz, in vitro

SUMMARY

M. Sc. THESIS

THE OXIDATIVE EFFECT OF ZEARALENONE ON TM3 LEYDIG CELLS

Gülnaz YILDIRIM

İstanbul University

Graduate School of Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Melike ERKAN

The purpose of this study is to show the oxidative effect of zearalenone on TM3 Leydig cell line by determining cell viability, cell proliferation, cytotoxicity, lipid peroxidation, protein oxidation, Bromodeoxyuridine (BrdU) activity, amount of total reactive oxygen species and apoptotic index.

Mycotoxins are fungal metabolites that grow on food in optimal conditions which require an environment which must be wet and to a particular temperature. These metabolites cause deterioration of the product's quality and quantity via reproduction in raw and unprocessed materials. A total of 25% of world food production is contaminated with at least one mycotoxin. Mycotoxins have negative effects on human health and their toxicological effects are carcinogenic, teratogenic and mutagenic. There are a range of mycotoxin forms such as aflatoxin, ochratoxin and zearalenone. Zearalenone is a nonsteroidal estrogenic mycotoxin that is produced by mildew fungus species such as *Fusarium*. It is known to be the only estrogen that is produced by fungus. The most prevalent foods with zearalenone are maize, cornflakes, corn beer, bread, walnut and animal feedstuffs. It can pass through the milk of animals that have been feeding on contaminated with zearalenone, therefore, it is found in raw and pasteurized milk, milk powder and cheese.

Zearalenone has genotoxic, hepatotoxic, hematotoxic and carcinogenic effects on living organisms. Zearalenone causes infertility so it effects the system of reproduction, furthermore, it has as well as disrupting endocrine effects. *In vivo* studies have shown that zearalenone causes the reduction in testis weight and serum testosterone levels in animals exposed to zearalenone. Also, it can cause a decrease in the epididymal and

testicular sperm counts. According to *in vitro* studies, zearalenone causes a reduction in sperm viability and disrupts the chromatin structure.

Zearalenone was exposed to TM3 Leydig cells for 24 hours at 1,2 nM and 6 nM doses. Cell viability, cell proliferation, lipid peroxidation, protein oxidation, hydrogen peroxide, hydroxyl radical and apoptosis/necrosis rate were measured in Leydig cells. The results indicated that cell viability, lipit peroxidation, hydroxyl radical, amount of hydrogen peroxide and apoptosis/necrosis rate are increased, while cell proliferation is decreased. This findings indicate that zearalenone induced apoptosis depending on producing of reactive oxygen species (ROS) and lipit peroxidation.

May, 2014, 94.

Keywords: Zearalenone, Leydig Cell, Oxidative Damage, Apoptosis, in vitro

1. GİRİŞ

Dünya genelinde artan canlı populasyonu, besin kaynaklarına ve üretimine olan ihtiyacı da arttırmaktadır. Bu besin ihtiyacının çoğu stratejik önemi yüksek olan tahıllardan karşılanmaktadır. Yem ve besin olarak üretilen bu tahıllar üretim, işleme ve depolama aşamaları sırasında mantarların metabolitleri olan mikotoksinler ile kontamine olmaktadır. Ham ve işlenmemiş materyalde mantarların bulunması, üründe istenmeyen kokuların oluşması ve besin içeriğinin bozulması gibi sorunlara yol açarak ürünlerin düşük kaliteli olmasına sebep olmaktadır. Üstelik bazı mantarlar insan ve hayvan sağlığına zararlı olan mikotoksinleri üretme kapasitesine sahiptir. Bilinen 350 farklı mantar türünden 300'den fazla mikotoksin üretilmektedir (Gromadzka ve diğ., 2008). Mikotoksinlerin bu kadar yaygın bulunmasının sebebi ise mikotoksinleri üreten mantarların rüzgar ve hava akımlarıyla taşınabilmesidir (Steyn ve Stander, 1999; Concon, 1988). Tarım ürünlerindeki kayıplar dikkate alındığında küf mantarlarının verdiği ekonomik zararlar azımsanamayacak düzeydedir. Dünya genelinde mikotoksinlerle kontamine olmuş besinlerin artması ve bu besinlerle canlıların beslenmesi ciddi bir sorundur (Tsakmakidis, 2007). Günümüzde mikotoksinlerin etkilerine karşı insanların daha fazla bilinçlenmesine rağmen sürekli devam eden maruziyet ve bunun sonucunda oluşan sağlığı tehdit edici riskler azalmamıştır (D'Mello ve diğ., 1999)

Fusarium türleri tüm dünyada toprak, bitki, bitki artıkları, hava, su ve su biyofilm tabakasında bulunmaktadır. *Fusarium* türlerinin yayılmasında rüzgarın ve yağmurun oldukça etkili olduğu bilinmektedir. Zearalenon, *Fusarium* türü mantarların özellikle *F. graminearum, F. culmorum, F. equiseti, F.cerealis, F. crookwellence* ve *F. semitectum* türleri tarafından sentezlenen steroit yapıda olmayan bir mikotoksindir (Bennett ve Klich, 2003). Bunun yanı sıra, zearalenon tarımsal ürünlerde en sık rastlanılan mikotoksindir (Zourgui, 2008). Mısır, soya, buğday, arpa, yulaf ve silaj gibi insanların beslenmesinde ve hayvan yemlerinde yoğun olarak kullanılan besinlerde sağlığı tehdit edici boyutlarda zearalenon bulunmaktadır. Bir östrojen agonisti olarak görev yapan zearalenon, 17-β östradiol ile uterus, hipotalamus, meme bezi ve hipofiz bezinde

bulunan sitozolik östrojen reseptörlerine bağlanmak için yarışır (D'Mello ve diğ., 1999). İnsanlar tarafından oral yolla alınan zearalenon bağırsak mukoza hücreleri tarafından hızlıca absorbe edilir, karaciğere girişini takiben sistemik dolaşıma katılır (Biehl ve diğ., 1993). Zearalenon hücre içerisinde α-zearalenol, β-zearalenol, α-zearalanol ve β-zearalanol gibi metabolik ürünlere dönüşmektedir ve globulinlere bağlanmaktadır (Gajecki, 2002).

Yapılan birçok çalışma, zearalenonun hayvanlarda erkek üreme sisteminde pek çok hasara yol açtığını ve fertiliteyi olumsuz yönde etkilediğini göstermiştir (Ruzsas ve diğ., 1979; Young ve King, 1986). Buna rağmen, zearalenonun toksisitesinin mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (Gazzah ve diğ., 2013). Zearalenon, uzun süreli maruziyet sonucunda reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olarak hücreye zarar vermektedir. Bunun sonucunda apoptotik hücre ölümünün artması ile testiküler germ hücre sayısının azalmasına sebep olmaktadır (Kim ve diğ., 2003; Yang ve diğ., 2007a). Zearalenon testosteron biyosentezinde görevli olan Leydig hücrelerinin steroidogenik fonksiyonunu bozarak testosteron üretiminin azalmasına neden olmaktadır (Tsakmakidis ve diğ., 2006; Yang ve diğ., 2007a, 2007b). Ayrıca steroidogenik yolakta görevli olan enzimlerin mRNA seviyelerinin azalmasına neden olmaktadır (Yang ve diğ., 2007b). Zearalenon germ hücreleri arasındaki bağlantıların azalmasına, germ hücrelerinde vakuol oluşmasına, spermin karakteristik özelliklerinin (sperm hareketi, canlılığı ve akrozom reaksiyonu) bozulmasına, sperm kromatin yapısının denatüre olmasına yol açmaktadır (Tsakmakidis ve diğ., 2006, 2007; Yang ve diğ., 2007b; Benzoni ve diğ., 2008). Zearalenon membran bütünlüğünün bozulmasına neden olarak lipid peroksidasyonunun oluşmasına sebep olmaktadır (Yang ve diğ., 2007a; Banjerdpongchai ve diğ., 2010; Juan-Garcia, 2013).

Bu çalışmada, zearalenonun TM3 Leydig hücreleri üzerindeki oksidatif etkisi araştırılmıştır. Tezin "Genel Kısımlar" bölümünde Leydig hücreleri, zearalenon, oksidatif hasar ve apoptoz ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Tezin "Malzeme ve Yöntem" bölümünde laboratuarda uygulanan işlemler ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Yapılan işlemler sonucunda elde edilen sonuçlar tezin "Bulgular" bölümünde belirtilmiştir.

Tezin “Tartışma ve Sonuç” bölümünde ise, elde edilen veriler değerlendirilmiş ve bu veriler mevcut literatür bilgisi ile yorumlanarak sonuca varılmıştır.

Bu çalışma ile zearalenonun TM3 Leydig hücreleri üzerinde oluşturduğu oksidatif etki, lipit peroksidasyonu, Bromodeoksiuridin (BrdU), reaktif oksijen türlerinin miktarları ölçülerek ve nekrotik/apoptotik hücre indeksi hesaplanarak ortaya çıkarılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. TESTİSİN GENEL YAPISI

Erkek üreme sistemi, sperm üretimini sağlayan ve androjenleri salgılayan testislerden, erkek genital kanallarından, erkek yardımcı bezlerinden ve penisten oluşmaktadır. Testisler, eşey hücreleri olan spermatogonyumun üretimi ve beslenmesinden, eşey hormonlarının sentezi ve salgılanmasından sorumludur (Kaya ve diğ., 2006).

Testis, endokrin ve ekzokrin işlevi olan bir bezdir. Spermler testisin ekzokrin fonksiyonunun ürünü olup, Leydig hücrelerinde üretilen testosteron testisin endokrin fonksiyonunun bir ürünüdür (Netter ve diğ., 2009; Junqueira ve diğ., 2006; Ilgaz, 2009). Testisin iç salgılama fonksiyonu, Leydig hücrelerinin testosteron, dihidrotestosteron ve androstenedion gibi androjenleri salgılamasıdır (Costanzo, 2003). Testosteron en önemli testis hormonu olup, testislerde veya böbreküstü bezlerinde kolesterolden ya da doğrudan asetil koenzim A'dan sentezlenmektedir. Testosteronun daha aktif bir formu olan dihidrotestosteron, periferal ve hedef dokularda oluşmaktadır (Bozdoğan, 2004).

Spermatogenezin meydana geldiği seminifer tübüllerde germinal epitel iki hücre çeşidinden meydana gelmektedir. Bu hücreler spermatogenik hücreler (spermatogonyumlar, spermatositler, spermatidler) ve Sertoli hücreleridir. Spermatogenik hücreler, bazal lamina ve tübül lümeni arasında tabaka halinde düzenlenmiştir (Stevens ve Lowe, 1997). Sertoli hücreleri sıkı bağlantı kompleksleri ile birbirlerine bağlanmışlardır (Meng ve diğ., 2005). Sıkı bağlantılar sonucu oluşan kan-testis bariyeri, spermatogenezin ileri safhalarındaki germ hücrelerini kandan gelen zararlı maddelere karşı korur (Janqueira ve diğ., 2006).

Seminifer tübüllerin arasında bulunan alan, bağ dokusu ve kollajen liflerinin yanı sıra kan ve lenf damarları, sinir lifleri ve çeşitli hücreler içermektedir. Bu alanda testisin interstisyel veya Leydig hücrelerinin yanı sıra fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve farklılaşmamış mezenşimal hücreler de bulunmaktadır (Fawcett, 1966).

2.2. LEYDİG HÜCRESİ

Leydig hücreleri, ilk olarak 1850 yılında Franz Leydig tarafından keşfedilmiştir (Kuehnel, 2003). Memelilerde bu hücreler, interstisyel alanda seminifer tübüllerin etrafında düzensiz şekilde bulunurlar. Bu bölgede kan damarları, lenfatik ve makrofajlar da bulunur (Christensen, 1975). Leydig hücreleri interstisyel alanda kapiller damarlara yakın olarak bulunur. Bu hücreler erkekte testosteron biyosentezinden sorumlu hücrelerdir (Kuehnel, 2003).

Leydig hücreleri, poligonal ve düzensiz şekilli, yaklaşık olarak 15µm çapında olan hücrelerdir. Bu hücreler tek nukleusludur ve genelde 1-2 nukleolus içerirler (Gartner ve Hiatt, 2003). Steroit üreten diğer hücrelerde olduğu gibi, Leydig hücreleri de sitoplazma içerisinde bol miktarda lipit damlacıkları, mitokondri ve iyi gelişmiş düz yüzlü endoplazmik retikulum bulundurur (Christensen, 1975).

Belirlenmiş iki çeşit Leydig hücresi bulunmaktadır. 1) Fetal Leydig hücresi 2) Erişkin Leydig hücresi. Bu iki tip Leydig hücresi, biyokimyasal ve morfolojik olarak farklı özelliklere sahip olmalarına rağmen, androjen üretiminde aynı temel fonksiyonlara sahiptir. Fetal Leydig hücreleri, testosteron metabolizması ve biyosentezi ile ilgili steroidogenik enzimlerin yüksek derecede anlatımını yapmaktadır (ör: 5α-redüktaz, 3α-HSD) (Murono ve Washburrn, 1990). Fetal Leydig hücrelerinin en belirgin özelliği ise sitoplazmalarının bol miktarda lipit damlacıkları içermesidir (Shan ve Hardy, 1992). Fetal Leydig hücreleri, erişkin Leydig hücrelerine dönüşmeden önce bir kere bölünürler. Erişkin Leydig hücreleri, daha az miktarda lipit damlacıkları ve daha yüksek miktarda lüteinizan hormon (LH) reseptörü içermektedir (Shan ve Hardy, 1992).

Androjenler, normal erkek fenotipinin oluşmasında kritik rol oynamaktadır (Wang ve diğ., 2009). Androjen biyosentezindeki bozukluk ve çevresel endokrin bozucu bileşiklerin etkisi ile Leydig hücresinde gerçekleşen steroidogenezin hücresel kontrolü engellenmektedir (ör; kolesterolün mitokondri içerisine taşınması, steroidogenik enzim ekspresyonu veya aktivitesi). Endokrin sistemi bozan bileşikler, doğum öncesi gelişim sırasında androjen eksikliğine sebep olduğundan, erkek üreme organlarının gelişimde önemli fonksiyona sahip Wolf kanalının farklılaşmasında da kusurlara sebep olmaktadır. Birçok çevresel kirleticinin etkisi ile birlikte kriptorşidizm, hipospadias,

testis kanseri ve semen kalitesinin azalması gibi erkek üreme sistemi ile ilgili gelişimsel bozukluklarında sayısı artmaktadır (Svechnikov ve diğ., 2010).

Androjen üretiminin büyük bir kısmı testiste Leydig hücrelerinde yapılmaktadır. Androjen üretimi, Leydig hücrelerinin sitoplazmalarındaki lipit damlacıklarında bulunan kolesterol ile yapılmaktadır. Bu olay steroidogenez olarak tanımlanmaktadır (Hall, 1994). Steroidogenez genel olarak ön hipofiz bezinden sentezlenen bir glikoprotein olan LH tarafından düzenlenmektedir. LH'nın reseptörüne bağlanması, siklik adenozin monofosfat (cAMP) oluşumunu arttıran adenilat siklazın aktifleşmesini sağlar (Dufau, 1998). cAMP, belirli protein substratlarının serin ve treonin dizilerini fosforlayan cAMP-bağımlı protein kinaz A'yı (PKA) uyarır (Hansson ve diğ., 1999). Steroidogenezin en önemli adımı olarak kabul edilen aşama ise kolesterolün mitokondri iç membranına taşınmasıdır (Stocco ve Clark, 1996). Kolesterol taşıma mekanizması steroidogenik akut regülatör (StAR) protein ve periferal-tip benzodiazepin reseptör (PBR) arasındaki ilişkiyi içeren karmaşık bir süreçtir (Stocco, 2000; Papadopoulas, 2004). StAR ve PBR, kolesterolün mitokondri içerisine taşınmasında koordineli olarak çalışmaktadır. StAR, kolesterol taşınmasının başlatıcısı olarak fonksiyon görürken, PBR kolesterolün mitokondri içerisine girişinde bir kapı olarak görev yapmaktadır (Hauet ve diğ., 2005). Kolesterol, mitokondri iç membranına ulaştığında pregnenolona dönüştürülür. Bu reaksiyon mitokondri iç membranında yerleşmiş sitokrom p450 CYP11A1 tarafından gerçekleştirilir. Pregnenolon, mitokondriyi terk ederek 3β-HSD tarafından progesterona dönüştürüldüğü düz yüzlü endoplazmik retikuluma geçmektedir. Bu steroit, p450c17 tarafından metabolize edilerek androstenediona daha sonra 17β-HSD tarafından testosterona dönüştürülmektedir (Payne ve Hales, 2004).

2.3. ZEARALENON

Tahıllar, Dünya genelinde stratejik önemi yüksek olan ve artan canlı populasyonu ile birlikte besin ihtiyacını önemli ölçüde karşılayan besinlerdir. Fakat tahılların üretim, işleme ve depolama aşamaları sırasında mikotoksin olarak adlandırılan mantar metabolitleri ile kontamine olma riskleri vardır. Mikotoksinler; *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Alternia* ve *Claviceps* gibi mantar cinslerinin sekonder metabolizması sonucu oluşan, düşük molekül ağırlıklı, çok çeşitli kimyasal yapıya sahip doğal toksinlerdir (Steyn ve Stander, 1999). Oluşan bu toksinler, hayvan ve insan sağlığı üzerinde karsinojenik, teratojenik ve mutajenik etki göstermektedir (Steyn ve Stender, 1999; Hüssein ve Brasel, 2001). Mikotoksinlerin metabolize olması sonucu farklı doku ve organlarda birikimi gerçekleşmektedir. Beslenme, solunum ve deri aracılığıyla bulaşması sonucu birçok canlıya zarar vermektedir. (Marin ve diğ., 2013). Mikotoksin alımına bağlı olarak gelişen hastalığa mikotoksikoz denir ve bu hastalığın klinik olarak tanımlanması oldukça zordur. Belirtileri arasında ise bir veya birden fazla hastalığın semptomları bulunmaktadır. Mikotoksikozda görülen belirtilerin şiddeti, görülen hastalıkların tipi, genel olarak maruz kalınan mikotoksin türü, miktarı, birden fazla mikotoksin varlığının yanı sıra vücut ağırlığı, fiziksel durum ve beslenme gibi kişisel özelliklere göre farklılık gösterebilir (Steyn ve Stander, 1999).

Mikotoksinler, ekinlere küf mantarları ile bulaştığından dolayı ya insanlar tarafından direkt olarak tüketilmesinden ya da çiftlik hayvanları için besin maddesi olarak kullanılmasından dolayı besin zinciri içerisinde yer almaktadır. Et, süt ve yumurta aracılığı ile de besin zincirine dahil olmaktadır.

Mikotoksin oluşumu, tarımsal ürünlerin üretimi sırasında birçok noktada gerçekleşebilmektedir (hasat öncesinde, hasat sırasında, kurutma ve depolama evrelerinde). Yeterli olmayan tarımsal ve hasat koşulları, uygun olmayan kurutma, ambalajlama, dağıtım, depolama ve taşıma koşulları fungal ürünlerin büyümesine ve mikotoksin ürünlerinin riskinin artmasına neden olmaktadır (Diaz, 2006; Krska ve diğ., 2008; Marin ve diğ., 2013). Mikotoksinleri üreten mantarlar rüzgar ve hava akımlarıyla taşındığından dolayı her yerde bulunmaktadır (Steyn ve Stender, 1999; Concon, 1988). Mikotoksin kontaminasyon düzeyi iklim koşullarına, ürünün cinsine ve coğrafi

konumuna bağlı olarak mevsimden mevsime, yıldan yıla farklılık göstermektedir (Steyn ve Stender, 1999). Dünyadaki mahsüllerin dörtte birinin mikotoksin ile kontaminasyon riskinin olduğu bildirilmiştir (Rice ve Ross, 1994).

2.3.1. Zearalenonun Genel Özellikleri

Fusarium türleri ilk olarak iki yüzyıl önce tanımlanmış olup, araştırıcıların 50 yıl önce ilgilerini bu türlere yönlendirmesi sonucunda *Fusarium* türlerin meydana gelişi ve metabolitlerinin etkisi kanıtlanmıştır (Bottalica ve Perrone, 2002; Chelkowski, 1998; Parry ve diğ., 1995). 1920'lerin sonlarında küflenmiş mısırla beslenen domuzlarda hiperöstrojenik semptomların ve rahim iltihabının oluşması *Fusarium* türlerine olan ilgiyi arttırmıştır. Stob ve arkadaşları (1962) küflenmiş mısırdan, bileşenleri izole eden ilk çalışanlar iken, 1965 yılında Christensen ve arkadaşları *Fusarium* ile aşılanmış mısırdan F2 olarak adlandırılan bir bileşik izole etmişlerdir. 1966 yılında ise Urry ve çalışma arkadaşları kontamine olmuş mısırdan aynı bileşeni izole ederek bu bileşene zearalenon adını vermişlerdir. Zearalenon, tahıl kökenli bileşenlere belirli *Fusarium* türlerinin bulaşması sonucu besinlerde oluşan doğal bir kontaminanttır. Ayrıca tüm hava koşullarında oluşabilen ve önemli birçok tarımsal ekine zarar veren oldukça fazla türü içermektedir (Stepien, 2013). *F. graminearum, F. culmorum, F. crookwellense, F. equiseti* ve *F. semitectum* türlerini içeren *Fusarium*'ların mısır, pirinç ve buğday gibi tahıllara bulaşması sonucu zearalenonun biyosentezi gerçekleşmektedir (Betina, 1989).

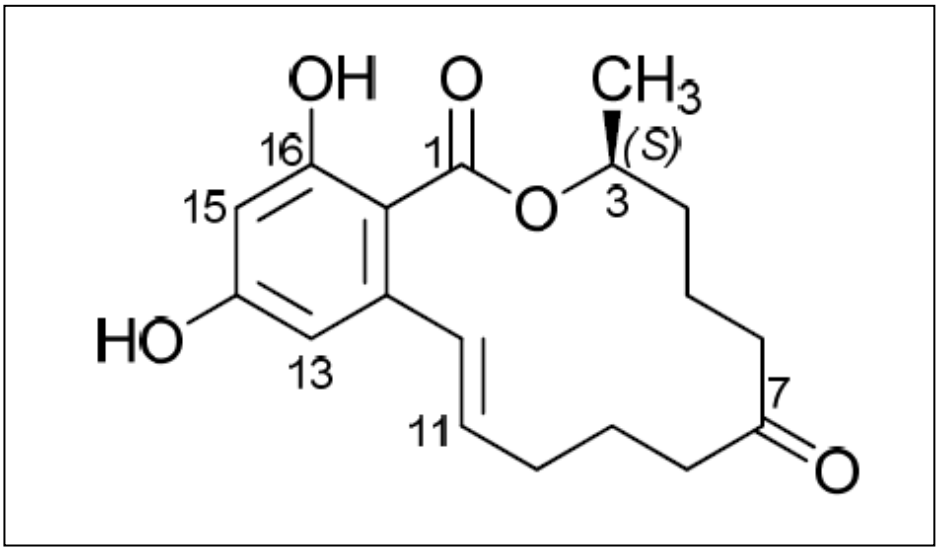
Ekonomik olarak önemli ekinlerin hemen hemen tümü her yıl mikotoksinlerle enfekte olmasına rağmen, tahıllar *Fusarium* cinsi mantarların kontaminasyonu ile en fazla hasara sahip ürünler arasındadır (Stepien ve Chelkowski, 2010). Üründe oluşan hastalığın ciddiyeti ve depo edilen mikotoksin miktarı hava koşuluna, kontamine olan konağın ve sentez edilen metabolitlerin miktarına bağlı olarak değişmektedir (Bottalica ve Perrone, 2002; Chelkowski, 1998; Logrieco ve Visconti, 2004; Lukanowski ve diğ., 2008; Perkowski ve diğ., 1997; Proctor ve diğ., 2006; Thrane ve diğ., 2004; Uhlig ve diğ., 2006; von Bargen ve diğ., 2009; Wisniewska ve diğ., 2004).

Fusarim türü mantarlar 1) toksik ürün; fumonisin, fusarik asit, trikoten, fusarin, zearalenon 2) toksik olmayan ürün; bikaverin üretmektedirler (Marin, 2013). Bu mikotoksin türleri çiçeklenme aşamasındaki ekinleri istila eder fakat mikotoksin üreten

mantarların gelişimi ve toksin üretimi hasat sonrasında yeterli olmayan depolama koşullarında meydana gelir (EFSA, 2011).

Tavşan, sıçan, domuz ve insanlarda zearalenonun emilimi oral olarak alımını takiben hızlıca ve kapsamlı bir şekilde gerçekleşmektedir (Kuiper-Goodman ve diğ., 1987). Total olarak emilimi ise %80-85 oranında gerçekleşmektedir (Biehl ve diğ., 1993). Zearalenonun gastrointestinal sistem dışında diğer organlardaki dağılımı böbrek, karaciğer, yağ doku, akciğer, kalp, dalak, kas, beyin ve testislerde olmaktadır (Shin ve diğ., 2009).

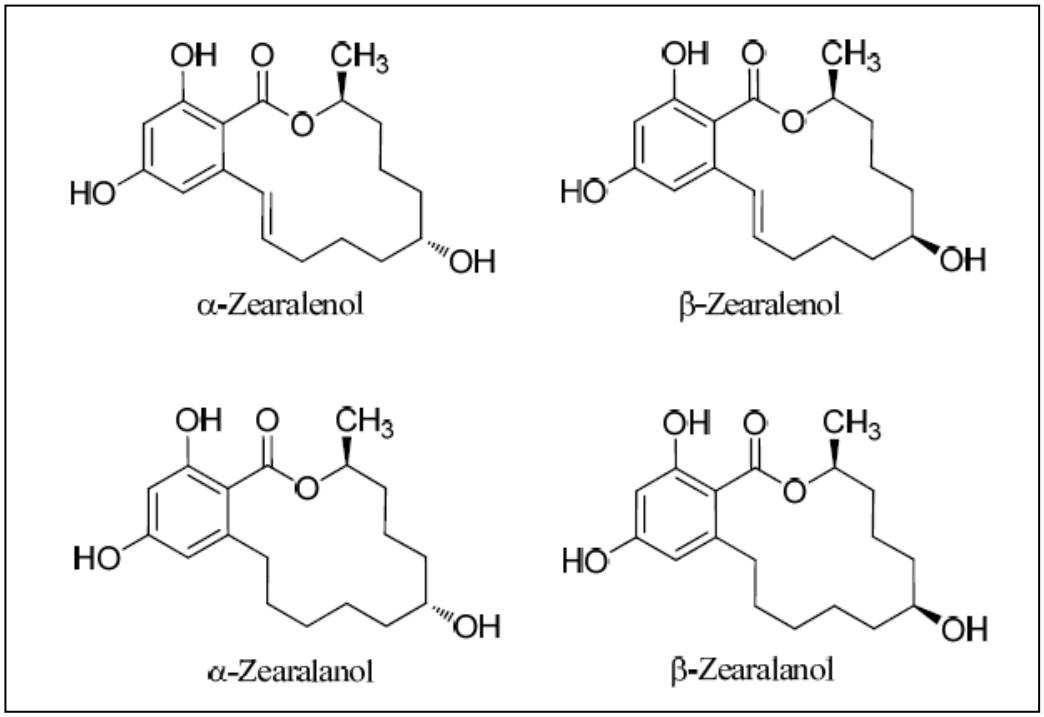
Mikotoksin çeşitlerinden olan zearalenon adını üzerinde ürediği Zea bitkisinden almıştır ve kimyasal formülü $C_{18}H_{22}O_5$'dir. Kimyasal açılımı ise 3,4,5,6,9,10-hekzahidro-14,16-dihidroksi-3-metil-1*H*-2-benzoksiasiklotetradesin-1,7(8*H*)-dion'dur. Beyaz ve kristal yapıda olan zearalenonun moleküler ağırlığı 318.36 g/mol olup, erime derecesi 164-165 C ve kaynama noktası 576-599°C'dir. Zearalenon, *Fusarium* türlerinden üretilen steroit yapıda olmayan, 6β rezorsiklik asit laktondur (Chelkowski, 1998; Kuiper-Goodman ve diğ., 1987). Urry ve diğ., (1966), Kuo ve diğ., (1967)'nın yaptıkları çalışmalarla zearalenonun kimyasal yapısı belirlenmiştir.



Şekil 2.3.1.1: Zearalenonun kimyasal yapısı (Urry ve diğ., 1962; Kuo ve diğ., 1967).

Zearalenon 150 °C'ye kadar ısıya dayanıklıdır. Yapısının bozulabilmesi için yalnızca yüksek sıcaklık veya alkalin ortam koşulları (eter, benzen, asetonitril, metil klorid,

kloroform, aseton ve alkol) gerekmektedir (Kuiper-Goodman ve diğ., 1987). Mantar kültürlerinde zearalenonun kendisinden farklı olarak oluşan metabolitleride bulunmaktadır. Bu metabolitler arasında α-zearalenol, β-zearalenol, α-zearalanol ve β-zearalanol bulunmaktadır. Zearalenon türevlerinin kimyasal yapıları Şekil 2.3.1.2.'de gösterilmiştir. Bu metabolitlerin besinler üzerinde oluştuğuna dair çok az kanıt bulunmaktadır (EFSA, 2011).



Şekil 2.3.1.2: Zearalenon metabolitlerinin kimyasal yapısı (EFSA, 2011).

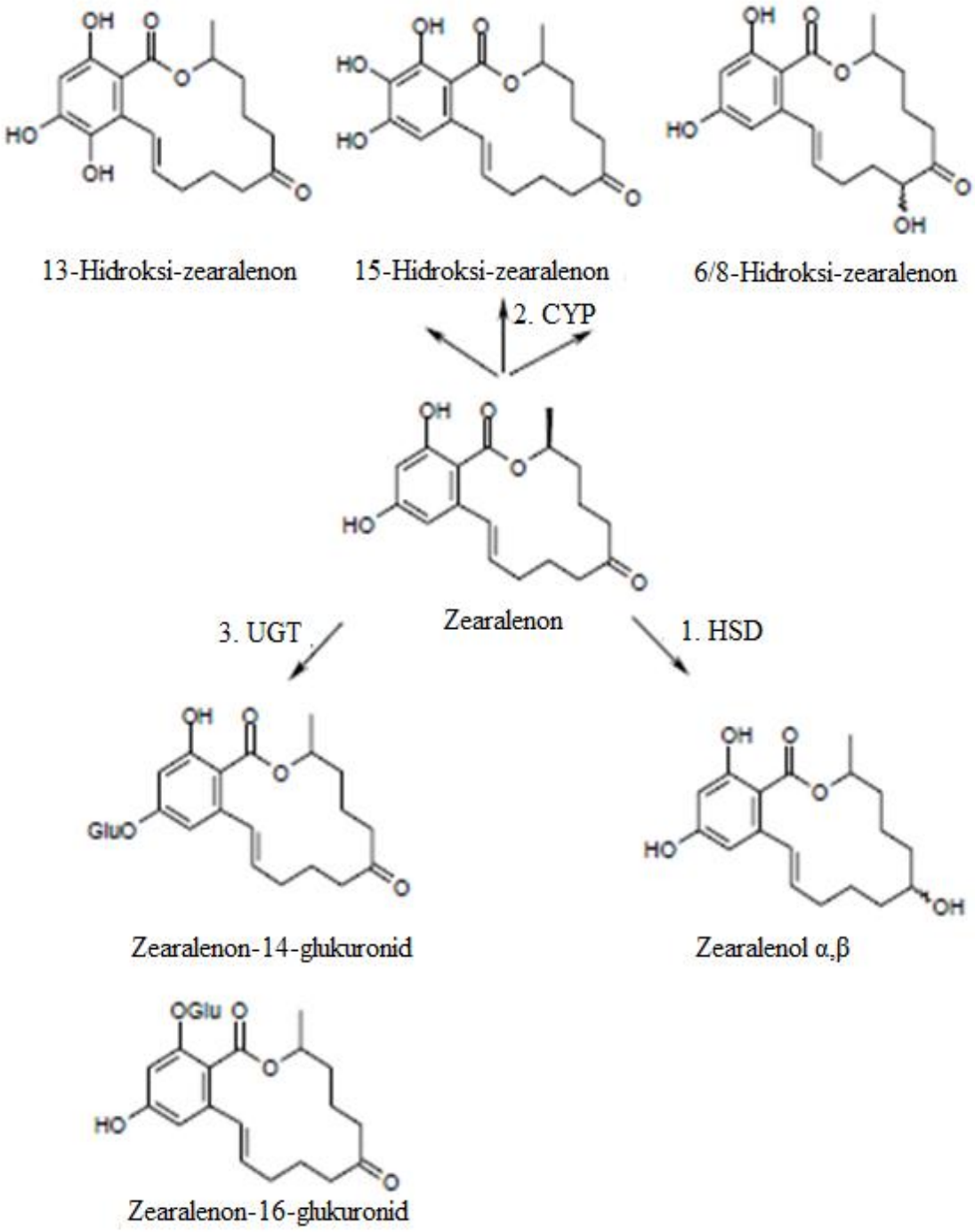
Zaearalenonun *in vivo* metabolizması insanlarda ve birçok hayvan türünde araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarla 3 önemli biyotransformasyon yolağı olduğu tespit edilmiştir. Bu yolaklar;

- Zearalenonun enzimatik redüksiyonu 3α-hidroksisteroid dehidrogenaz (3α-HSD) ve 3β-hidroksisteroid dehidrogenaz (3β-HSD) enzimleri tarafından katalizlenir. Bu tepkime sonucunda α- ve β-zearalenol ve daha az miktarda zearalanol üretilmektedir. Oluşan ürünlerde östrojenik aktivite açısından α-zearalenol>zearalenon>β-zearalenol ilişkisi bulunmaktadır. Bu ilişki uterus ve

ovidukt sitozolik östrojen reseptörlerine bağlanma afinitesine göre belirlenmektedir (Fitzpatrick ve diğ., 1989).

- Sitokrom P450 (CYPs) (Bravin ve diğ., 2009; Pfeiffer ve diğ., 2009) ve *in vitro* da insan karaciğer mikrozomları tarafından zearalenonun monohidroksilasyonu (Bravin ve diğ., 2009).

- Zearalenonun Faz2 konjugasyonu uridindifosfat-glukuronosiltransferaz (UGT) ve sülfotransferaz (SULT) tarafından katalizlenir. *In vitro* çalışmalara göre, zearalenon, α- ve β-zearalenol ve diğer metabolitler birçok hayvan türünde ve insanlarda karaciğer ve bağırsakta olduğu kadar diğer ekstra hepatik organlarda da glukuronidlenir. En yüksek UGT aktivitesi insan hepatik ve bağırsak mikrozomlarında gerçekleşmektedir (Pfeiffer ve diğ., 2009). Zearalenonun bu üç temel metabolik yolağı Şekil 2.3.1.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3.1.3: Zearalenonun üç temel metabolik yolağı (EFSA, 2011).

2.3.2. Zearalenonun Etkileri

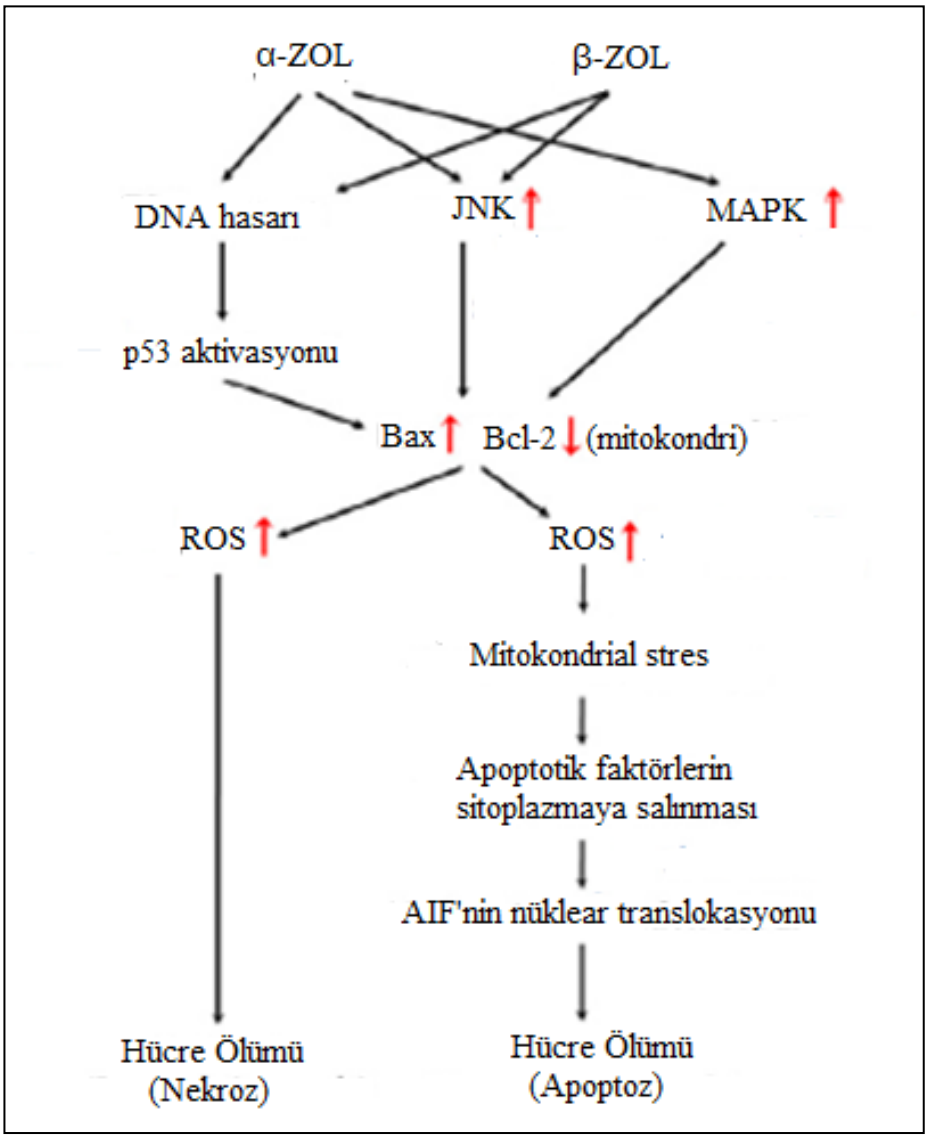
Zearalenon östrojenik bir bileşiktir ve metabolizması sonucunda oluşan metabolitleri arasında en çok östrojenik etkiye sahip olan ise α-zearalenol'dur. Zearalenon ve metabolitleri östrojen reseptörlerine çok yüksek affinite ile yarışmalı olarak bağlanmaktadır. Zearalenon ve metabolitlerinin östrojenik etkiye sahip olması bu maddenin toksisitesini birçok hayvan türünde ve insanda, üreme organları ve bu organlarla ilişkili yapılarda göstermesine sebep olmaktadır (Gromadzka ve diğ., 2009; Wood, 1992).

Zearalenona uzun süreli maruziyet sonucunda birçok toksik etkinin ortaya çıktığı bilinmektedir. Bu etkileri arasında genotoksik, hepatotoksik, hematotoksik, karsinojenik, endokrin ve immun sistemi bozucu etkileri bulunmaktadır. Zearalenonun etkilerine en duyarlı olan hayvanlar arasında yer alan domuzlarda, üreme sistemi üzerinde birçok olumsuz etkiye yol açtığı tespit edilmiştir. Zearalenon, hamilelik sırasında embriyonun yaşamını ve fetal ağırlığını etkilemektedir. Ayrıca vulvar açılma ve kızarıklık, vulvovaginitis, süt üretiminde eksiklik ve rahim sarkması gibi sorunlar gözlenmektedir. Erkek bireylerde ise, testosteron seviyesinin ve testis ağırlığının azalmasına, feminizasyonun uyarılmasına ve libidonun azalmasına neden olmaktadır (Zinedine ve diğ., 2007).

Zearalenon, insan meme bezlerinde östrojenik reseptörler aracılığı ile hücrelerin büyümesini uyarmaktadır (Minervini ve diğ., 2005). Epidemiyolojik çalışmalar ile zearalenonun insan meme kanseri oluşumunda önemli role sahip olduğu gösterilmiştir (Yu ve diğ., 2005).

Lioi ve diğ.(2004), zearalenonun sitogenetik ve sitotoksik etkilerini zearalenon uygulanarak kültür edilmiş lenfosit hücrelerinde yapısal kromozom aberasyonlarının ve kardeş kromatitlerin değişiminin artmasını tespit ederek göstermişlerdir. Zearalenon, uygulanan konsantrasyona bağlı olarak programlanmamış DNA sentezinin artmasına sebep olmaktadır (Ouanes Ben-Othmen ve diğ., 2008). Aida ve diğ., (2001)'in *in vivo* olarak yürüttükleri çalışmada yetişkin erkek farelere zearalenon uygulanması sonucunda spermatositlerde kromozom aberasyonlarının oluştuğu gözlemlenmiştir. Zearalenon, DNA'da yapı bozukluklarına yol açarak kromozom anomalilerinin oluşumuna yol

açmaktadır (Grosse ve diğ., 1997; Ayed-Boussema ve diğ., 2008; Abid-Essefi ve diğ., 2009). Zearalenon muamalesi DNA ve protein sentezinin inhibisyonuna, glutatyon miktarının azalmasına, stres proteinlerinin oluşumuna, hücre ölümüne aracı olan oksidatif stresin oluşmasına neden olmaktadır (Abid-Essefi ve diğ., 2003; Quanes ve diğ., 2005; Hassen ve diğ., 2007).



Şekil 2.3.2.1: Zearalenon metabolitleri aracılığı ile hücre ölümü sinyali (Lu ve diğ., 2013).

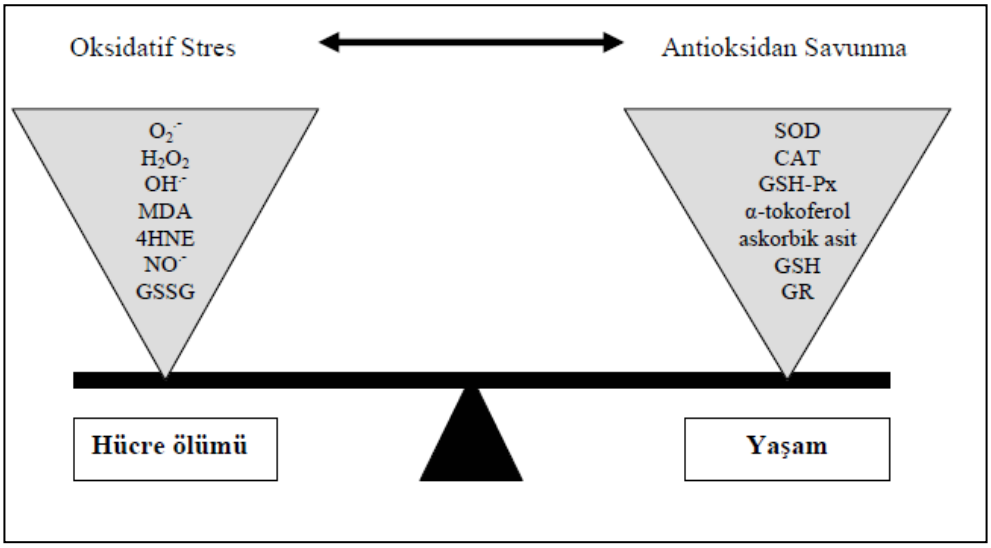
Zearalenonun laboratuvar hayvanlarında (fare, sıçan, tavşan, hamster) ve evcil hayvanlarda dişi üreme kanallarının yapısında değişikliğe sebep olduğu tespit edilmiştir.

Dişi hayvanlar üzerinde sahip olduğu etkiler arasında fertilitenin azalması, devamlı östrus, yavru sayısının azalması gibi etkileri bulunmaktadır. Ayrıca progesteron ve östradiolun serum seviyelerinde ve adrenal, tiroid ve hipofiz bezinin ağırlıklarında değişikliklerin oluşmasına neden olmaktadır (Kuiper-Goodman ve diğ., 1987; FAO/WHO, 2000). Tiemann ve arkadaşları (2003), α-zearalenol ve β-zearalenolun *in vitro* koşullarda, progesteron sentezi ile ilgili sitokrom P450 yan zincir kıran enzim (P450scc) ve 3β-hidroksisteroid dehidrogenaz (3β-HSD) enzimlerini etkilediğini göstermiştir. Jakimiuk ve diğ., (2010) *in vitro* çalışmalarda, granülosa ve teka hücreleri tarafından gerçekleşen steroit yapıdaki eşey hormonlarının üretimi ve salınmasında zearalenonun etkisini, ovaryum foliküler hücrelerinde gerçekleşen bazal steroidogenezin kültür çeşidine ve zearalenon konsantrasyonuna göre değiştiğini tespit etmiştir. Oositlerin olgunlaşması sırasında zearalenon ve metabolitlerinin varlığı konsantrasyona bağlı olarak oositlerin inhibisyonuna sebep olmaktadır (Chen ve diğ., 2009).

Zearalenon ve metabolitlerinin olgun fare Leydig hücrelerinde steroidogenezi etkilediği incelenmiştir. Testosteron salgılanması ve 3β-hidroksisteroid dehidrogenaz izomeraz (3β-HSD-1), P450scc ve steroidogenik akut regulatör protein (StAR) gibi steroidogenezin üç önemli enziminin transkripsiyon seviyelerini etkilemektedir (Yang ve diğ., 2007b).

2.4. OKSİDATİF HASAR

Oksidatif hasar, hücresel antioksidan düzeyinin, reaktif oksijen düzeylerine karşı yetersiz kalması sonucunda toksik bir etkinin başlaması olarak tanımlanmaktadır. Bu toksik etki antioksidan savunmaların yetersizliği ve reaktif oksijen türlerinin aşırı üretiminden dolayı oluşmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin üretiminin aşırı artması ya da antioksidan savunmanın azalmasından dolayı oksidatif hasar meydana gelmektedir (Abuja ve Albertini, 2001; Mayne, 2003).



Şekil 2.4.1: Reaktif oksijen türlerinin üretiminin ve antioksidatif sistemlerin dengesi (Mayne, 2003).

Oksidatif stresle oluşturulan reaktif türler, biyolojik sistemde radikaller olarak bilinmektedir. Radikaller, biyomoleküller için yüksek oranda reaktif olan bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren moleküllerdir (Abuja ve Albertini, 2001). Eşleşmemiş elektron stabil değildir ve yüksek oranda reaktiftir. Eşleşmemiş elektronun stabil duruma dönüşmesi için, bir diğer elektronla bağ kurması gerekir. Serbest radikaller, ihtiyaç duyulan elektronu yakalamak için girişimde bulunan diğer bileşiklerle hızlı bir şekilde reaksiyona girer. Serbest radikaller vücut dışından gelebileceği gibi canlı metabolizmasının doğal bir sonucu olarakta oluşabilir (Sahoo ve diğ., 2000).

Reaktif oksijen türleri, lipitlere, proteinlere, nükleik asitlere hasar verebilen ve insan karsinogenezinde rol oynayan oksidatif metabolizmanın bir yan ürünüdür (Mayne,

2003; Squier, 2001; Remmen ve Richardson, 2001; Voorhies, 2001). Ayrıca membran fonksiyonunun kaybına, membran akışkanlığının ve membran yapısının bozulmasına yol açan lipit peroksitlerinin oluşumuna neden olmaktadır (Naghii, 2002). Lipit peroksidasyonunun membranlarda oluşturduğu yıkıcı etki genellikle reaksiyon sırasında açığa çıkan ^{-}OH radikalinin membran yağ asidi yan zincirlerine saldırması sonucu gerçekleşir. Membranda gerçekleşen bu hasar geri dönüşümsüzdür (Akkuş, 1995; Davies ve Goldberg, 1987). Proteinler, lipitlere oranla serbest radikallerden daha az etkilenir. Serbest radikallerin oluşturduğu hasar sonucu proteinlerde fragmentasyon, çapraz bağlanmalar ve proteinlerin kümelenmesi gözlenmektedir. Bunun sonucunda hücrenin normal fonksiyonunda bozukluk ve enzim aktivitesinde aksaklıklar meydana gelmektedir (Akkuş,1995). Zararlı maddelerin hücrede meydana getirdiği bu hasarlar sonucunda biyolojik materyalin zarar görmesi yaşlanmayı teşvik etmektedir. Ayrıca kalp-damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, bağışıklık sisteminde zayıflama, sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok sağlık problemine neden olmaktadır (Diplock, 1998).

Canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması, çevre kirleticileri, radyasyon, pestisitler, çeşitli tıbbi tedavi yolları ve kontamine sular gibi birçok etken, kaçınılmaz bir şekilde oksijen türevi serbest radikallerin oluşumuna yol açmaktadır (Kaur ve Kaporr, 2001). Oksidanlar; radyasyon, UV ışığı, kimyasal reaksiyonlar aracılığı ile enzimatik olarak metal iyonlarının serbest geçişini kapsayan redoks katalizleriyle veya enzimlere metal iyonlarının bağlanması sonucu üretilmektedir. Serbest radikaller, reaktif oksijen radikalleri, reaktif nitrojen radikalleri ve sülfür merkezli radikalleri kapsamaktadır (Lam, 2000; Abuja ve Albertini, 2001). Aktif oksijen, çevresel veya kimyasal streslerin sebep olduğu metabolizmadaki karışık durumun sonucu olarak elektron taşıma sistemleri veya enzimlerin fonksiyonlarının bozulması ile mitokondri, endoplazmik retikulum, plazma membranı, kloroplast ve hücre duvarında meydana gelmektedir (McKersie, 1996). Serbest radikallerin oluşmasına sebep olan çevresel kaynaklar içerisinde kirleticiler, organik çözücüler, pestisitler, sigara dumanı, anestetikler ve belirli ilaçlar bulunmaktadır. Ayrıca aşırı egzersiz ve iskemi de serbest radikal üretimine neden olmaktadır (Naghii, 2002; Lam, 2000). Oksidan kaynakları ve antioksidan sistemde görevli enzimler tablo 2.4.1.'de gösterilmiştir.

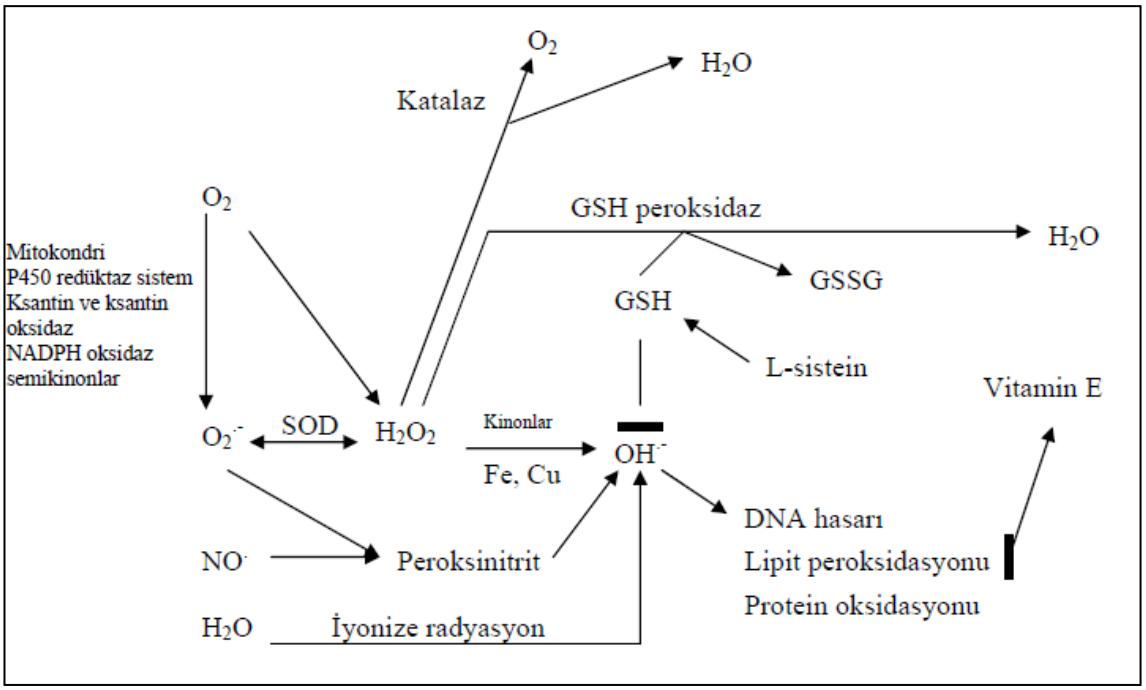
Tablo 2.4.1: Oksidan kaynakları ve antioksidan savunma sistemleri (Diplock 1998).

OKSİDAN	ANTİOKSİDAN SAVUNMA
Sigara dumanı Egzersiz Çevre kirleticileri Ateşli hastalık Radyasyon İskemi Karsinojenler Çoklu doymamış yağ asitleri ile zengin bir diyet	Süperoksit dismutaz Katalaz Glutatyon peroksidaz Glutatyon Ubikinon Selenyum Ürik asit E vitamini C vitamini β –karoten ve diğer karotenoidler

Biyolojik sistemlerdeki en büyük radikal kaynağı oksijendir. Çünkü oksijen atomu son yörüngesinde iki eşleşmemiş elektrona sahiptir. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlarken, radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girmesine neden olmaktadır. Oksijen atomu yörüngesindeki elektronların farklı dizilimi ile de süperoksit ($O_2•^-$), peroksit ve tekli oksijen ($^1O_2$) gibi radikallerin oluşumuna sebep olmaktadır. Ayrıca serbest oksijen radikali oluşumunun anahtar maddeleri arasında oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit (H_2O_2), geçiş metal iyonları ve hidroksil (•OH) radikalleri de yer almaktadır (Koç, 2007).

Canlılar serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek için hem hücre içerisinde hem de hücre membranında etki gösteren birçok mekanizma geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar gerek radikal üretimini engellemek gerekse oluşan radikallerin zararlı retkilerini ortadan kaldırmak amacıyla tasarlanmıştır. Canlı organizmaların oluşturduğu bu sistem, antioksidan savunma sistemi olarak bilinmektedir. Antioksidanlar endojen ve ekzojen kaynaklı olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Koç, 2007). Endojen kaynaklı antioksidan enzimleri arasında süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen süperoksit dismutaz (SOD), hidrojen peroksiti moleküler oksijen ve suya katalizleyen katalaz (CAT), hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rollere sahip olan ve detoksifikasyondan sorumlu olan enzim glutatyon S-transferaz (GST) ve hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan enzim glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimler bulunmaktadır. Ekzojen kaynaklı antioksidan sistemler ise vücut hücrelerinde serbest radikallerin oluşturduğu hasarı önleyerek hücrenin normal

işlevini sürdürmeleri ve zararlı maddelerin etkisini azaltmaya yardımcı olan vitaminleri (β-karoten, α-tokoferol, askorbik asit), ilaçları ve gıda antioksidanlarını içermektedir (Koç, 2007). Bazı reaktif oksijen türleri ve antioksidan savunma mekanizması şekil 2.4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4.2: Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve antioksidan savunma mekanizması (Jacobson, 1996).

2.5. APOPTOZ

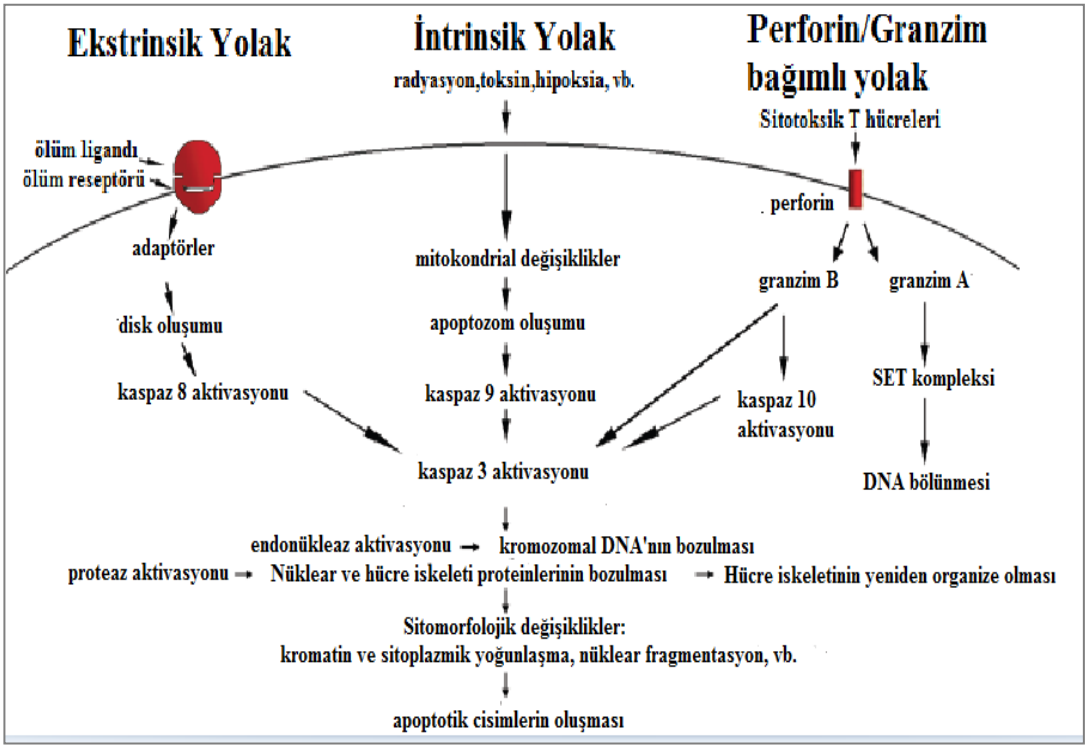
Apoptoz birçok gen ile ilişkili aktif bir sistem olup, Yunanca'da apo (ayrı) ve ptozis (düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan bir kelimedir (Özvaran 2004). Kerr ve arkadaşları; apoptotik bir hücrenin, plazma membranıyla çevrili parçalara bölünmesini bir ağacın yapraklarını dökmesine benzeterek *Apoptozis* terimini ilk kez kullanmışlardır (Kerr ve diğ., 1972).

Apoptoz, hücreler arası ilişkilerin gereği olarak organizmanın ihtiyaç duymadığı, fonksiyonları bozulan, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlı hücrelerin organizmaya zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan hücre ölümüdür (Öktem ve diğ., 2001; Hıkım ve diğ., 1995). Metabolik olayların devamlılığı için gerekli olan hücreler arası yaşamsal sinyaller yerine, ölüm sinyali aldığı ya da hasarın tamir edilemediği durumlarda uyarılmaktadır. Bu süreç genler tarafından düzenlenmektedir (Raff, 1992; Golstein ve diğ., 1991). Bu mekanizma sayesinde hücre topluluğu içerisinde istenmeyen hücreler uzaklaştırılır ve organizmanın yaşamsal faaliyetlerinin devamlılığı sağlanır (Kerr ve diğ., 1974; Gerschenson ve Rotello, 1992). Apoptoz ile hücre ölümü, enerji kullanılarak hücresel yaralanma ve enflamasyon olmadan gerçekleştirilir (Guimaraes ve Linden, 2004). Çok hücreli organizmalarda programlı hücre ölümünün, gelişimde ve homeostazisin sağlanmasındaki önemi büyüktür (Tomatır, 2003). Apoptoz mekanizmasındaki bozukluklar sonucunda kanser, otoimmun hastalıklar, AIDS, viral enfeksiyonlar gibi hastalıkların meydana geldiği bilinmektedir (Levine ve diğ., 1991; Mattson ve diğ., 1992).

2.5.1. Apoptoz Mekanizmaları

Yapılan çalışmalarla ekstrinsik (ölüm reseptörü ile uyarılan, hücre dışı) ve intrinsik (mitokondriyal, Bcl-2 ile düzenlenen, hücre içi) yolak olmak üzere iki temel mekanizma tarafından apoptoz sinyal yolağının düzenlendiği gösterilmiştir (Marsden ve Strusser, 2003). Hücre içi proteinlerin yıkımından sorumlu olan kaspazların iki yolakta da ortak etkili enzim olması sebebiyle bu iki yolak birbiri ile de kesişmektedir (Krammer, 2000).

Bu iki temel yolağa ek olarak T hücre aracılı sitotoksisite ve Perforin-granzim bağımlı hücre ölümünü içeren başka bir yolakta mevcuttur.

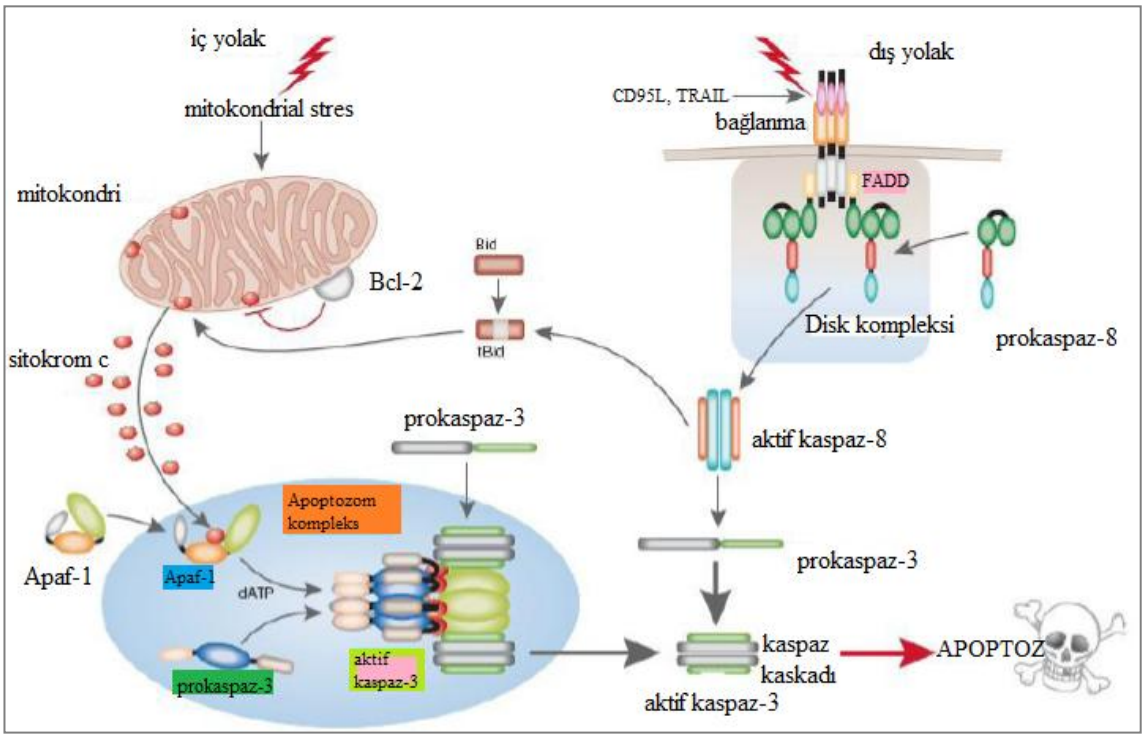


Şekil 2.5.1.1: Apoptotik olayların şematik gösterimi (Elmore, 2007).

Hücre dışı sinyal yolağı, Fas ve tümör nekroz faktör reseptör 1 (TNF-R1) gibi hücre içi ölüm bölgesi taşıyan TNF-R ailesi üyelerinin aktivite kazanması ile uyarılır (Krammer, 2000). Bunlardan farklı olarak koloni uyarıcı faktör (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)'nün azalması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar ve çeşitli antijenlerde hücre dışı yolağı uyaran faktörler arasındadır (Erdoğan, 2003; Akşit ve Bildik, 2008). TNF ile ilişkili apoptoz indükleyen ligand (TRAIL-R2) ve TNF-R1 gibi ölüm ligandları plazma membranında bulunan reseptörlerine bağlanarak ekstrinsik yolağı aktive eder. Bu aktivasyon sonucunda hücre içinde bulunan Fas ile ilişkili adaptör protein (FADD) aktivite kazanır ve apoptotik sinyal akışını başlatan kaspaz-8'i uyarır (Krammer, 2000). Aktifleşen kaspazlar DNaz ile birlikte DNA yıkımına neden olurlar (Krueger ve diğ., 2003).

Hücre içi sinyal yolağı, büyüme faktörleri, oksijen yetersizliği, çeşitli sitotoksik ajanlar, serbest radikaller, viral-bakteriyel enfeksiyonlar ve hücre içi kalsiyum artışı ile aktive

edilebilir (Elmore, 2007; Akşit ve Bildik, 2008; Green, 1998). İntrinsik yolakta mitokondri merkez rol oynar (Zou ve diğ., 1999). Bu yolakta FADD ve kaspaz-8'den bağımsız olarak sitokrom c'nin sitozole salınarak kaspaz akışını başlatan kaspaz-9'un apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) aracılığı ile uyarılması gerçekleşmektedir (Green, 1998). Mitokondri, apoptoz için gerekli enerjiyi üretir. Ayrıca sitokrom c, endonükleaz G ve apoptozu uyaran faktör (AIF) gibi proapoptototik faktörlerin salınmasını sağlar. Sitokrom c'nin mitokondriden salınmasıyla Apaf-1 aracılığı ile kaspaz-9 aktifleşir. Kaspaz-9 efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive eder ve hücre apoptoza gider (Zou ve diğ., 1999). Bu mekanizmaların gerçekleşmesi sonucu oluşan apoptoz, hücrenin büzülerek hacminin azalması ile morfolojik, nükleozomal parçalanma ile enzimatik, hücreler arası bağlantıların kaybolması ile biyokimyasal değişikliklere neden olmaktadır (Wyllie, 1980). Bu süreç sonucunda oluşan apoptotik keseler ya komşu hücreler ya da makrofajlar tarafından fagositoz ile ortamdan uzaklaştırılır (Huges ve Cildlowski, 1996).



Şekil 2.5.1.2: Apoptozda ekstrinsik ve intrinsik yolak (İşler, 2012).

Apoptotik yolaklarda belirleyici olan Bcl-2 protein ailesi yapı ve fonksiyonlarına göre üç gruba ayrılmaktadır. İlk grubu oluşturan antiapoptotik etki gösteren Bcl-2 ailesi etkisini mitokondri dış zarının geçirgenliğini engelleyerek sitokrom C ve diğer apoptotik moleküllerin sitoplazmaya geçmesini durdurarak göstermektedir. İkinci grup olan proapoptotik Bcl-2 proteinleri ve üçüncü grup BH3 proteinleri ise mitokondri dış zarının geçirgenliğini arttırır. Bu gruplar arasında normal şartlar altında denge bulunmaktadır (Huang ve Strasser, 2000).

Apoptozdan farklı olarak hücrelerin maruz kaldığı bir diğer ölüm şekli ise nekrozdur. Apoptoz fizyolojik ve patolojik şartlarda ortaya çıkan bir ölüm şekli iken nekroz sadece fizyolojik şartlar altında meydana gelmektedir (Brouckaert ve diğ., 2004). Nekrozda, hücre içerisine aşırı su girerek hücrenin ve organellerinin şişmesi ve bunun sonucunda plazma bütünlüğünün bozulması gerçekleşmektedir. Plazma zarının parçalanması sonucu hücre içeriği etrafa yayılır ve iltihap oluşumu riski artar. Apoptozda hücre içeriği apoptotik cisimlerin içerisine alındığından bu risk yoktur (Huges ve Cildlowski, 1996). Nekrozda kromatin materyali normal hücredeki görüntüye benzerdir fakat apoptotik hücrenin kromatini nukleus membranının çevresinde toplanır ve yoğunlaşır (Willingham, 1999). Nekrotik hücre bu aşamaların sonunda lizise uğramaktadır (Barisic ve diğ., 2003). Apoptoz ve nekrozun morfolojik özellikleri bakımından farklılıkları Tablo 2.5.1.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.5.1.1: Apoptoz ve Nekrozun morfolojik özelliklerinin karşılaştırılması (Elmore, 2007).

Apoptoz	Nekroz
Tek hücre veya küçük kümelenmiş hücreler	Genelde birleşik, komşu hücreler
Hücre büzüşmesi ve kıvrılması	Hücrenin şişmesi
Bozulmamış hücre membranı	Bozulmuş hücre membranı
Sitoplazma apoptotik cisimciklerde toplanır	Sitoplazma salınır
İnflamasyon yok	İnflamasyon var

2.5.2. Apoptozun gösterilmesi

Apoptozun gösterilmesinde birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında morfolojik görüntüleme, immunohistokimyasal, biyokimyasal, immunolojik ve

moleküler biyoloji yöntemleri bulunmaktadır. Son zamanlarda en çok tercih edilen apoptoz gösterilme yöntemleri arasında floresan mikroskopisi yer almaktadır. Floresan mikroskopisi floresan boyalarla yapılan bir boyama şeklidir (örn: Hoechst boyası, akridin orange, etidyum bromür, DAPI "4,6-diamidine-2´-phenylindole"). Bu boyalar DNA'ya bağlanarak nukleusu görünür hale getirirler. Hematoksilen ya da Giemsa boyaları gibi boyalarla sadece ölü hücreler boyanabildiğinden, hücre kültürü çalışmalarında canlı hücre ile ölü hücre ayırımını yapabilmek için floresan boyalar tercih edilmektedir. Bu boyama yöntemindeki prensip ise canlılığın belirleyicisi, hücrenin plazma membranının sağlam olup olmadığıdır. Hücre membranının sağlam olduğu hücreler, propidium iyodür gibi membran bütünlüğü bozulmuş hücreleri boyayan bir boya ile boyanmazken, Hoechst boyası gibi ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen boyalar ise ortamdaki tüm hücreleri boyayarak ölü ve canlı hücre arasındaki ayrımı yapmamıza olanak sağlar (Vermes ve diğ., 1995; Watkins ve diğ., 1996; Zhang ve Kiechle, 1997; Sara ve diğ., 2003; Siddighi ve diğ., 2004; Vairetti ve diğ., 2005).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada, zearalenon farklı dozlarda 24 saat süreyle TM3 Leydig hücre soyuna uygulanmıştır. Uygulama sonunda zearalenonun TM3 Leydig hücrelerindeki hücre canlılığına, lipit peroksidasyonuna ve oksidatif hasara etkisi spektrofotometrik olarak, apoptoz-nekroz oranı Propidium İyodür- Hoechst yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

3.1. KULLANILAN HÜCRE SOYU VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

Deneyde kullanılan TM3 hücre soyu 11-13 günlük farelerin Leydig hücrelerinden elde edilmiş tümorogenik olmayan bir hücre soyudur. Laboratuvarımıza ATCC (American Type Culture Collection): The Global Bioresource Center'dan getirilmiş olup *in vitro* koşullarda haftada iki-üç kez düzenli pasajları yapılarak yetiştirilmektedir. Hücreler %5 At Serumu, %2,5 Fetal Sığır Serumu, 2.5 mM L-Glutamin, 0.5 mM Sodyum Pirüvat, 1.2 g/L Sodyum Bikarbonat, 15 mM HEPES ve PSA (Penisilin-Streptomisin-Amfoterin) ilave edilmiş 50:50 DMEM/F12 kültür medyumunda, %5 CO_2 ve %95 hava içeren nemli ortamda, 37°C'de inkübe edilerek yetiştirilmektedir.

3.2. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ

Deneylerimizde kullanılan hücreler, yetiştirildikleri kültür kapları içinde yeterli yoğunluğa eriştiklerinde haftada iki-üç defa düzenli pasajları yapılmaktadır. Bu amaçla, hücreler tripsinle 37°C'de 3 dakika muamele edildikten sonra pipetaj yapılarak toplanır ve santrifüj tüpüne aktarılır. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant atılır. Dipte bulunan hücre çökeltisi üzerine uygun kültür medyumu ilave edilerek, her deney için gerekli sayıda hücre kültür kaplarına ekilir.

3.3. ZEARALENON DOZLARININ HESAPLANMASI VE HAZIRLANMASI

Zearalenonun TM3 Leydig hücre soyu üzerine uygulanan konsantrasyonları, toksikoloji çalışmalarında sıklıkla kullanılan NOAEL (hiçbir yan etkinin gözlenmediği seviye) ve LOEL (en düşük etkinin gözlemlendiği seviye) değerleri kullanılarak belirlenmiştir (Zwıerzchowskı ve diğ., 2006; Gajecka ve diğ., 2011).

$$\text{Doz} = \frac{\text{Plazma konsantrasyon miktarı (Cp)x Dağılım hacmi (Vd)}}{\text{Biyoyararlanım (F)}} \tag{3.3.1}$$

Canlının zearalenon ile kontamine olan besini oral olarak alımını takiben kan plazmasında bulunabilecek olan değer (Cp), zearalenonun sıçan vücudundaki dolaşım hacminin (Vd) biyoyararlanıma (F) oranı (Vd/F) kullanılarak 3.3.1'de verilen formüle göre bulunmuştur (Shin ve diğ., 2009). Bulunan Cp değerleri deney gruplarına uygulanırken kontrol gruplarına %0,1 DMSO içeren kültür medyumu uygulanmıştır. Zearalenon, %0,1 DMSO içeren kültür medyumunda uygun dozlarda Tablo 3.3.1.'deki gibi hazırlanmıştır.

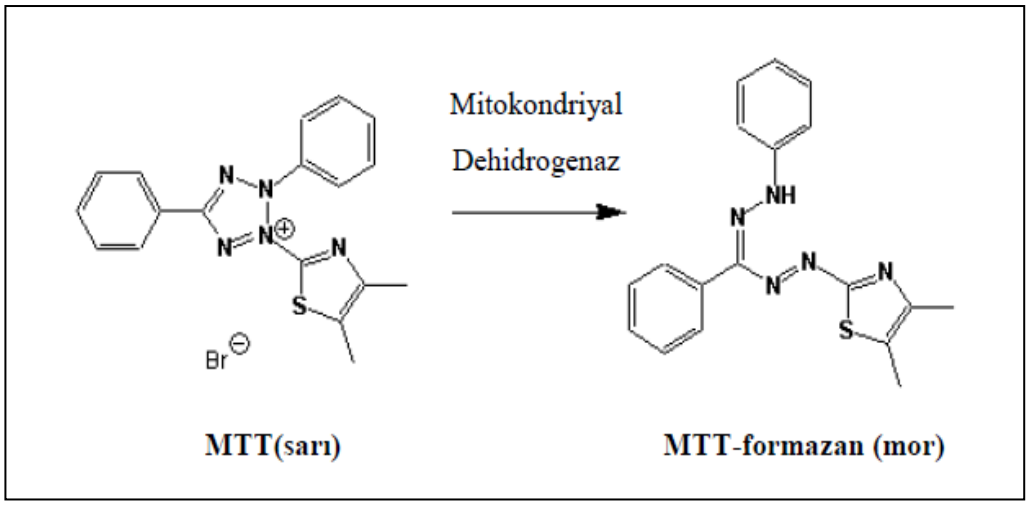
Tablo3.3.1: Kontrol, 1,2 nM Zearalenon ve 6nM Zearalenon uygulanan deney grupları.

Zearalenon Dozları		
Kontrol Grubu	**1,2 nM Zearalenon**	**6 nM Zearalenon**
% 0,1 DMSO içeren kültür medyumu	1,2 nM Zearalenon + % 0,1 DMSO içeren kültür medyumu	6 nM Zearalenon + % 0,1 DMSO içeren kültür medyumu

3.4. HÜCRE CANLILIĞI VE HÜCRE ÇOĞALMASI

3.4.1. MTT Hücre Canlılık Testi

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman Tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Trypan blue boyası ile boyanan hücreler, Thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak MTT hücre canlılık testi için 96 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde ekildi. % 0,1 DMSO içeren kültür medyumu ile hazırlanmış zearalenonun alçak ve yüksek dozları 24 saat uygulanarak 37°C CO_2 inkübatöründe inkübe edilmiştir. Deney sürelerinin tamamlanmasıyla, her bir kuyucuğa 10 µl MTT I solüsyonu eklenmiştir ve kültür kapları MTT boyasının suda çözünmeyen formazan kristalleri haline dönüştürülebilmesi için 4 saat 37°C'de CO_2 inkübatöründe inkübe edilmiştir. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan kristallerinin çözülmesi için her bir kuyucuğa 100 µl MTT II solüsyonu (SDS) eklenmiş ve bir gece boyunca CO_2 inkübatöründe bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerin optik yoğunlukları ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu test 3 kez tekrar edilmiştir (Mossman, 1983).



Şekil 3.4.1.1: MTT Canlılık Testi

3.4.2. Hemositometre ile Hücre Sayımı

Hemositometre, hücre kültüründe hücre sayımı ve hücre popülasyonu içindeki canlılık oranını kesin elde etmekte yardımcı olur. Kalın düz sayım odacıklı lamın üzerine lamel konması temeline dayanmaktadır. Temel olarak lam üzerinde çizgi ile kesin olarak kazınmış 1 mm kareler ve buna ilaveten daha küçük kareler içerir. Hücre süspansiyonlarının çember içine doldurulmasına izin verildiği zaman hücreler mikroskop altında gözlenebilir ve seçili kare çizgisi içindeki hücreler sayılır. Bu sayımdan süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısı hesaplanabilir.

Tripan mavisi hücre süspansiyonu içerisinde bulunan canlı hücrelerin sayısını belirlemek için kullanılan vital bir boyadır. Genel olarak ölü hücreleri boyamak için kullanılan bu yöntemde temel prensip, membran bütünlüğü bozulmamış canlı hücrelerin tripan mavisi ile boyanmaması, ölü hücrelerin bu boyaları sitoplazmalarına alarak boyanmasıdır. Canlı hücreler temiz bir sitoplazmaya sahipken, canlı olmayan hücreler mavi sitoplazmaya sahiptir. 6 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına $5x10^5$ hücre ekildi. % 0,1 DMSO içeren kültür medyumu ile hazırlanmış zearalenonun alçak ve yüksek dozu 24 saat uygulanarak 37°C CO_2 inkübatöründe inkübe edildi. Deney sürelerinin tamamlanmasıyla büyüyen hücreler Tripsin-EDTA ile muamele edilerek kuyu tabanından kaldırıldı. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilen hücreler serumsuz medyumla sulandırıldı. Hücre süspansiyonuna %0,4 Tripan mavisi 1:1 oranında uygulandı. Oda sıcaklığında 3 dakika inkübasyondan sonra Thoma lamı ile OLYMPUS IX71 marka mikroskopta canlı ve ölü hücreler sayıldı. Canlı hücre yüzdesi 3.4.2.1'de belirtilen formüle göre hesaplandı:

$$\%\ \text{Hücre canlılığı} = \frac{\text{Toplam canlı hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}}\ \text{x}\ 100$$

(3.4.2.1)

3.4.3. Bromodeoksiuridin (BrdU) Yöntemi

The Cell Proliferation ELISA, BrdU (5-bromo-2'-deoxy-uridine) DNA sentezini belirlemek için kullanılan testlerden biridir. Bu test çoğalan hücrelerin genomik DNA'larına eklenmiş olan BrdU'nun bulunması esasına dayanır. 96 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. % 0,1 DMSO içeren kültür medyumu ile hazırlanmış zearalenonun alçak ve yüksek dozu 24 saat uygulanarak 37°C CO_2 inkübatöründe inkübe edildi. Deney sürelerinin tamamlanmasıyla büyüyen hücreler 2-24 saatte BrdU'nun eklenmesi ile işaretlendi. Bu işaretleme süresinde BrdU, bölünen hücrelerin DNA'sında timidinin yerine geçerek yerleşir. İşaretleme medyumunu uzaklaştırdıktan sonra, hücreler sabitlendi ve DNA tek adımda FixDenat ilavesi ile denatüre edildi. FixDenat'ın uzaklaştırılmasından sonra anti BrdU-POD eklendi ve bu BrdU'yu yeni sentezlenen hücresel DNA'ya bağladı. Oluşan immün kompleks substrat reaksiyonu sonucu ile belirlendi. Reaksiyon ürünleri, spektrofotometrede absorbansın 450 nm dalga boyunda ölçülmesi ile hesaplandı. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol grubundaki hücre çoğalması %100 kabul edilerek, deney gruplarının çoğalma oranları yüzde olarak ifade edildi.

3.5. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

Deneysel uygulamalar sonunda 6 kuyulu kültür kaplarına ekilen hücreler ($5x10^5$) kaldırılarak, Tris-HCl tamponuna (pH:7,2) alındı. Daha sonra ultrasonikatör ile sonike edilerek hücrelerin membranlarının parçalanması sağlanmış ve elde edilen hücre süspansiyonu 14000 g'de Nüve marka soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant alındı. Alınan süpernatantlar, lipit peroksidasyonunun ölçülmesi için kullanıldı.

3.5.1. Membran Lipit Peroksidasyonunun Tayini

Lipit peroksidasyonunun miktarı Devasagayam ve Tarachand (1987)'ın yönteminde olduğu gibi örnekteki malondialdehit içeriğine göre ölçülmüştür. Deneyin prensibi poliansatüre yağ asidlerinin peroksidasyonu ile oluşan son ürünlerden biri olan malondealdehit (MDA)'in sıcak ortamda Tiyobarbütirik asit (TBA) ile oluşturduğu bileşiğin pembe-kırmızı renginin 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

3.5.1.1. Kullanılan Çözeltiler

-%10 Triklorasetik asit (TCA): 0.25 N HCl içinde hazırlanır.

-%0.375 Tiyobarbütirik asit (TBA): 0.25 N HCl içinde hazırlanır.

-0.25 N Hidroklorik asit

Deney Karışımı:

0,5 ml 0,15 M Tris-HCl tamponu (pH 7,4)

0,15 ml 10 mM KH_2PO_4

3.5.1.2.Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Hücre Ekstresi	**0,1 ml**	**—**
Tris Tamponu	**—**	**0,1 ml**
Deney karışımı	**0,65 ml**	**0,65 ml**
TCA	**0,5 ml**	**0,5 ml**
TBA	**0,75 ml**	**0,75 ml**

Örnek ve kör tüplerine deney karışımı konup 37ºC çalkalayıcı su banyosunda 20 dk inkübe edildi. Daha sonra reaksiyon TCA eklenerek durduruldu. Tüpler iyice çalkalanarak TBA eklendi ve 20 dk kaynar su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra soğutulan tüpler 10 dakika 2000 g'de santrifüj edilip, süpernatantın absorbansı 532 nm'de köre karşı okundu. TBARS (tiyobarbiturik asit reaktif türleri) miktarı (3.5.1.1)'e göre hesaplandı.

$$\text{TBARS (nmol/ml)} = \frac{V_{toplam} \times A_{örnek} \times 10^6 \times df}{V_{örnek} \times \varepsilon_{mM} \times LP} \qquad (3.5.1.1)$$

TBARS için molar ekstinksiyon katsayısı: $\varepsilon_{mM} = 1.56 \times 10^5\ M^{-1}cm^{-1}$

V_{toplam}: Toplam hacim

$V_{örnek}$: Kullanılan örnek hacmi

$A_{örnek}$: Örnek absorbansı

df: Sulandırma katsayısı

LP: Işık yolu

3.5.2. Total Protein Tayini

Total protein tayini Lowry ve diğ., (1951) yöntemine göre yapıldı. Deneyin prensibi fosfomolibdotungstik asit çözeltisinin (Folin-Ciocalteau belirteci) tirozin bakiyeleri ile reaksiyona girerek mavi bir renk oluşturma esasına dayanır. Bu mavi renk 660 nm dalga boyunda absorbans verir.

3.5.2.1.Kullanılan Çözeltiler

A Reaktifi: 0,1 N NaOH içinde %2 (w/v) Na_2CO_3

B Reaktifi: %1 (w/v) Na-K Tartarat içinde %5 (w/v) $CuSO_4.5H2O$

C Reaktifi: 50 ml A reaktifine 1 ml B reaktifi eklenerek C belirteci hazırlanır. Bu bileşik taze hazırlanır.

D Reaktifi: Folin belirteci 1:2 oranında sulandırılarak hazırlanır. Bu belirteç taze olarak hazırlanır ve ışıktan korunur.

3.5.2.2.Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Hücre Ekstresi	**0,1 ml**	**—**
Tris Tamponu	**—**	**0,1 ml**
C Reaktifi	**1 ml**	**1 ml**
D Reaktifi	**0,1 ml**	**0,1 ml**

Örnek ve kör tüplerine C Reaktifi konup 10 dk oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra karanlıkta karışımın homojen olarak karışması sağlanarak D reaktifi eklendi. Tüpler oda ısısı ve karanlıkta 30 dk inkübe edildi. Bu süre sonunda absorbanslar 660 nm'de spektrofotometrede köre karşı okundu.

3.5.2.3.Hesaplama

Total protein miktarını belirlemek için Sığır Serum Albümini (BSA) Standart grafik kullanılarak okunan absorbanslara denk düşen protein miktarı hesaplanmıştır.

3.5.3. Proteinlerdeki Oksidatif Hasarın Tespiti

Tiol grupları Sedlak ve arkadaşlarının (1968) metoduna göre tayin edildi. Bu metoda göre 5-5'-ditiobis-(-2-nitrobenzoik asit)'in tiol grupları tarafından indirgenmesi sonucunda 1 mol -SH grubu başına 1 mol 2-nitro-5 tiobenzoik asit oluşur. Oluşan bu sarı renkli ürünün absorbansı 412 nm dalga boyunda ölçülür.

Kullanılan çözeltiler

-0,01 M DTNB (5,'-ditio-bis(-2-nitrobenzoik asit) çözeltisi (19,8 mg DTNB 5 m'ye absolü metanol ile tamamlanır)

-Tris tamponu (0,2 M, pH 8,2): 12,1g Tris bir miktar saf suda çözüldükten sonra üzerine 3,362 g EDTA (0,2 M'a karşılık) ilave edilir 1 N HCl ile pH 8,2'ye ayarlanır, 50 ml'ye saf su ile tamamlanır.

Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Hücre Ekstresi	**250 µl**	**—**
PBS	**—**	**250 µl**
Tris Tamponu	**750 µl**	**750 µl**
DTNB	**50 µl**	**50 µl**
Metanol	**3950 µl**	**3950 µl**

Tüpler 15 dakika karanlıkta vortekslenerek inkübe edildi. İnkübasyonu takiben 3000g'de santrifüjlendi. Örneklerin absorbansı 412 nm'de okundu.

3.5.4. Hidroksil Radikalinin Tayini

Hidroksil radikali üretimi Puntarulo ve Cederbaum (1988)'un yöntemine göre yapıldı. Bu yöntem demir komplekslerinin varlığında üretilen hidroksil radikalinin NADPH ve DMSO varlığında formaldehit oluşturulması ve oluşan formaldehitin TCA ile reaksiyona girerek 570 nm dalga boyunda absorbans vermesi esasına dayanır.

3.5.4.1. Kullanılan Çözeltiler

1 M Sodyum Fosfat Tamponu (pH 7)

0,1 M $MgCl_2$

10 mM Sodyum azid

4 mM DMSO

4 mM NADPH

%10 Triklorasetik asit (TCA): 0.25 N HCl içinde hazırlanır.

3.5.4.2. Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Hücre Ekstresi	**0,25 ml**	**—**
Tris Tamponu	**—**	**0,25 ml**
Sodyum Fosfat Tamponu	**0,1 ml**	**0,1 ml**
Sodyum azid	**0,05 ml**	**0,05 ml**
DMSO	**0,05 ml**	**0,05 ml**
NADPH	**0,05 ml**	**0,05 ml**
$MgCl_2$	**0,05 ml**	**0,05 ml**
TCA	**0,15 ml**	**0,15 ml**

Örnek ve kör tüplerine sodyum fosfat tamponu, $MgCl_2$, sodyum azid, DMSO ve NADPH ve hücre süspansiyonu konduktan sonra tüpler hafifçe çalkalandı ve 10 dk 37ºC'de inkübe edildi. Daha sonra sonra reaksiyon TCA eklenerek durduruldu ve tüpler 30 dk kaynayan su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüpler soğutularak 570 nm dalga boyunda köre karşı okunur.

3.5.4.3. Hesaplama

$$\text{Dakikada oluşan } \mu\text{mol Hidroksil radikali} = \frac{\text{A (örnek)x df x V(toplam)}}{\varepsilon\text{mM x LP x V (örnek)}} \tag{3.5.1}$$

ε_{mM}= 6,22 $M^{-1}cm^{-1}$

V_{toplam}: Toplam hacim

$V_{örnek}$: Kullanılan örnek hacmi

$A_{örnek}$: Örnek absorbansı

df: Sulandırma katsayısı

LP: Işık yolu

3.5.5. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Tayini

Hidrojen Peroksit tayini Holland ve Storey (1981)'in yöntemine göre yapıldı. Bu yöntem asitlenmiş ferrositokrom c'nin oksidasyonu sonucu artan sapmanın 550 nm dalga boyunda absorbans vermesi esasına dayanır.

3.5.5.1. Kullanılan Çözeltiler

20 mM Tris-HCl

113 mM KCl

0,4 mM EDTA

15 mM KH_2PO_4

98 µM Ferrositokrom c

3.5.5.2. Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Hücre Ekstresi	**0,02 ml**	**—**
Tris Tamponu	**—**	**0,02 ml**
Deney karışımı	**0,1 ml**	**0,1 ml**

Örnek ve kör tüplerine Tris-HCl, KCl, EDTA, KH_2PO_4, Ferrositokrom c'den oluşan deney karışımı ve hücre süspansiyonu konduktan sonra hemen 550 nm dalga boyunda köre karşı okunur.

3.5.5.3. Hesaplama

$$\mu mol/ml\ H2O2 = \frac{A\ (örnek) x\ V\ (toplam) x\ df}{\varepsilon mM\ x\ V\ (örnek) x\ LP} \quad (3.5.1)$$

ε_{mM}= 19,1 $M^{-1}cm^{-1}$

V_{toplam}: Toplam hacim

$V_{örnek}$: Kullanılan örnek hacmi

$A_{örnek}$: Örnek absorbansı

df: Sulandırma katsayısı

LP: Işık yol

3.6. APOPTOZ/NEKROZ

3.6.1. Propidium İyodür/Hoechst Yöntemi

Hücrelerde apoptozun belirlenmesi için Hoechst 33342 (Ho342), nekrozun belirlenmesi için ise Propidium iyodür (PI) floresan işaretleme yöntemleri kullanıldı. Ho342 floresan boyası, parçalanmış DNA'da açığa çıkan Adenin-Timin'ce zengin bölgelere bağlanarak apoptotik hücreyi mavi renkte işaretler (Vermes ve diğ., 1995: Watkins ve diğ., 1996; Zhang ve Kiechle, 1997; Sara ve diğ., 2003). PI floresan boyası ise nekrotik hücrelerin zayıf hücre zarından geçerek hücreyi kırmızı renkte işaretler (Sara ve diğ., 2003; Siddighi ve diğ., 2004).

3.6.1.1. Kullanılan Çözeltiler

1 mg/ml Propidium İyodür

1 mg/ml Hoechst 33342

1M PBS (pH 7.4)

Deney karışımı: 20 µl PI

20 µl Ho342

3960 µl PBS

3.6.1.2. Uygulama

24 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. % 0,1 DMSO içeren kültür medyumunda hazırlanmış zearalenonun iki farklı dozu 24 saat uygulanarak 37°C CO_2 inkübatöründe inkübe edildi. Deney sürelerinin tamamlanmasıyla, PBS solüsyonuyla hücreler yıkandı. Her bir kuyuya 0,2 ml deney karışımı eklenerek 15-30 dk, 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler 1-2 kez PBS ile yıkanarak floresan mikroskop altında inceleme yapıldı. Olympus IX71 floresan ataçmanlı mikroskopta uygun filtre ile incelenerek Olympus DP72 video kamerada eşit aralıklarla seri olarak fotoğraflandı.

3.6.1.3. Hesaplama

Her bir grup için, floresan ışıma gösteren hücreler ayrı ayrı sayılarak ortalama yüzde değerleri hesaplandı. Her bir grup için 3 farklı deneyde toplam 12 kuyuda 10-15 alan ve 1000 hücre taranarak canlı, erken apoptotik, apoptotik ve nekrotik hücreler sayıldı. Her grup için apoptotik/nekrotik hücrelerin tüm hücrelere oranı hesaplanarak yüzde değerleri bulundu.

3.7. İSTATİSTİK ANALİZ

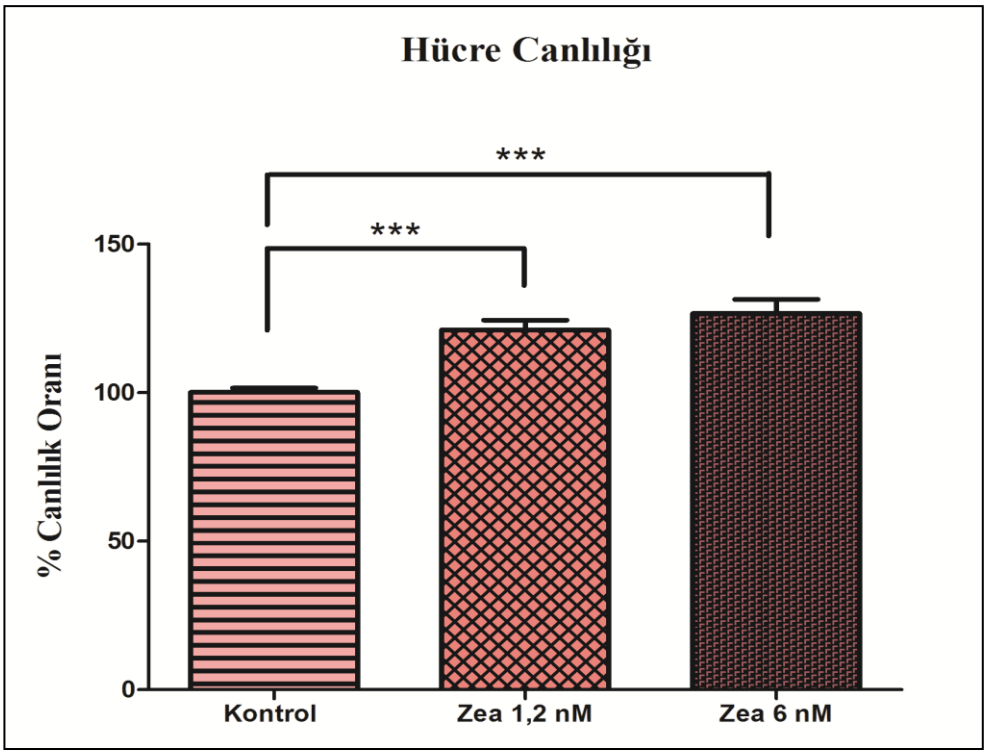
Deney gruplarında, uygulanan doz ve zamana bağlı olarak, hücre canlılık testi, BrdU yöntemi, TBARS miktarı, -SH grubu miktarı, reaktif oksijen türleri, total protein miktarı saptandı (±SEM). Daha sonra çoklu karşılaştırmalarda GraphPad istatistik programında ANOVA tek yönlü varyans analizinde posthoc test olarak Tukey testi uygulandı. Sonuçların değerlendirilmesinde ise $p<0.001$, $p<0.01$ ve $p<0.05$ anlamlılık seviyeleri temel alındı.

4. BULGULAR

4.1. HÜCRE CANLILIĞI BULGULARI

4.1.1. MTT Bulguları

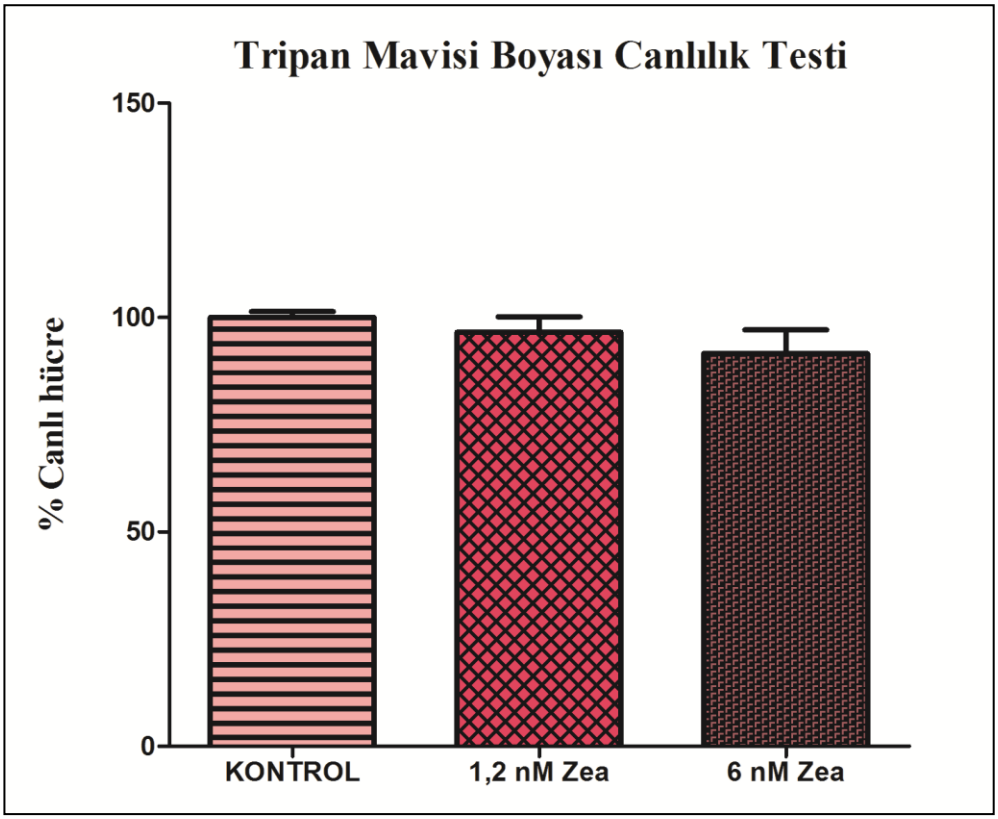
Zearalenonun iki farklı dozunun testis TM3 Leydig hücrelerinde 24. saatte hücre canlılığına etkisi MTT testi yapılarak tespit edildi. Kontrol ve deney gruplarındaki % canlılık oranları şekil 4.1.1.1'de verilmiştir. 24. saat sonunda kontrol grubu ve zearalenonun iki farklı dozu MTT değerleri bakımından karşılaştırıldığında 24 saat sonunda 1,2 nM zearalenon ve 6 nM zearalenon dozunda kontrole göre anlamlı bir artma gözlendi ($p<0,001$). 1,2 nM ve 6 nM dozları birbirleri ile kıyaslandığında ise anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 4.1.1.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücrelerinde % canlılık üzerine etkileri (***: $p<0,001$).

4.1.2. Tripan Mavisi Canlılık Testi Bulguları

TM3 Leydig hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında hemositometrik yöntem kullanılarak belirlenen canlı hücre sayılarının yüzde değerleri şekil 4.1.2.1'de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve zearalenonun iki farklı dozu canlı hücre sayılarının yüzde değerleri bakımından karşılaştırıldığında 1,2 nM zearalenon ve 6 nM zearalenon dozunda kontrole göre anlamlı bir fark bulunamamıştır.



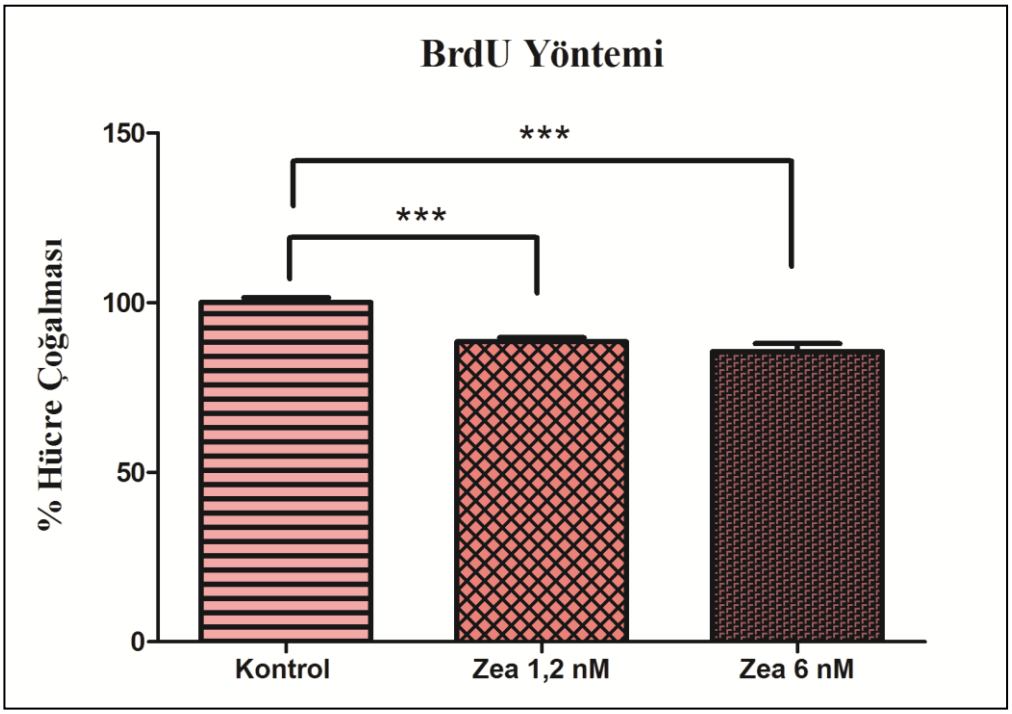
Şekil 4.1.2.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücrelerinde % canlı hücre sayısı üzerine olan etkileri.

Tablo 4.1.2.1: TM3 Leydig hücrelerinin 24 saat süre sonundaki canlı ve toplam hücre sayıları.

	Canlı Hücre	Toplam Hücre
KONTROL	560000 ± 38181	791000 ± 41431
1,2 nM Zea	463636 ± 48096	709167 ± 37808
6 nM Zea	542727 ± 47979	790000 ± 74508

4.1.3. BrdU Bulguları

TM3 Leydig hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak sentez fazındaki hücrelerin işaretlenmesi esasına dayanan Bromodeoksiuridin (BrdU) değerleri şekil 4.1.3.1'de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve zearalenonun iki farklı dozu BrdU değerleri bakımından karşılaştırıldığında 1,2 nM zearalenon ve 6 nM zearalenon dozunda kontrole göre anlamlı bir azalma saptanmıştır (p<0,001). 1,2 nM ve 6 nM dozları birbirleri ile kıyaslandığında ise anlamlı bir fark bulunamamıştır.

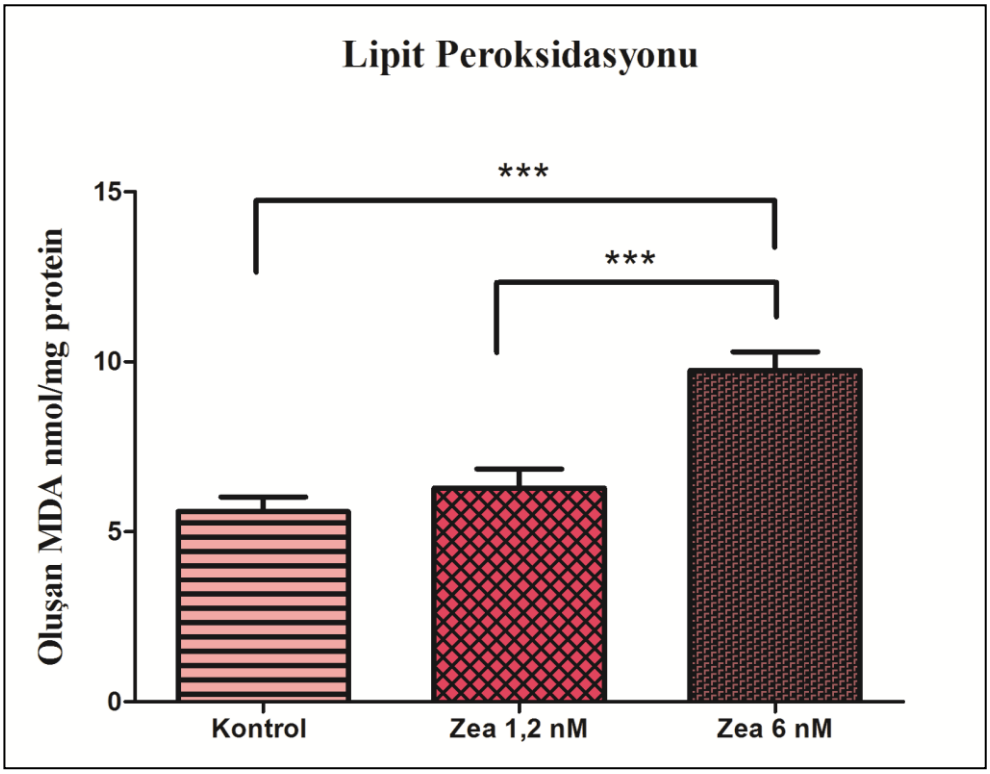


Şekil 4.1.3.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücrelerinde BrdU yöntemiyle belirlenen hücre çoğalması üzerine etkileri (***: p<0,001).

4.2. OKSİDATİF HASAR BULGULARI

4.2.1. Lipit Peroksidasyonu

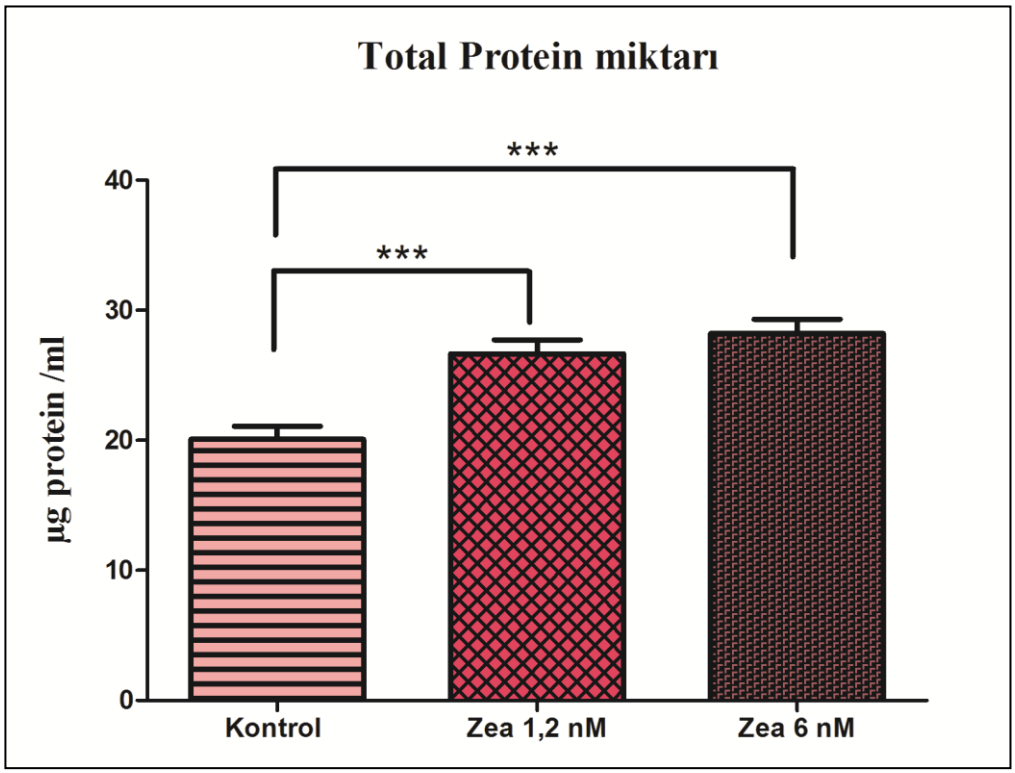
TM3 Leydig hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanan Tiyobarbütirik asit reaktif türlerinin (TBARS) değerleri şekil 4.2.1.1'de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve zearalenonun iki farklı dozu TBARS değerleri bakımından karşılaştırıldığında 1,2 nM zearalenon dozunda kontrole göre anlamlı bir fark gözlenmezken, 6 nM zearalenon dozunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artma gözlenmiştir ($p<0,001$). 1,2 nM zearalenon ve 6 nM zearalenon dozları birbirleri ile kıyaslandığında ise lipit peroksidasyonunda anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0,001$).



Şekil 4.2.1.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücreleri üzerindeki lipit peroksidasyonuna etkisi (***: $p<0,001$).

4.2.2. Total Protein Tayini

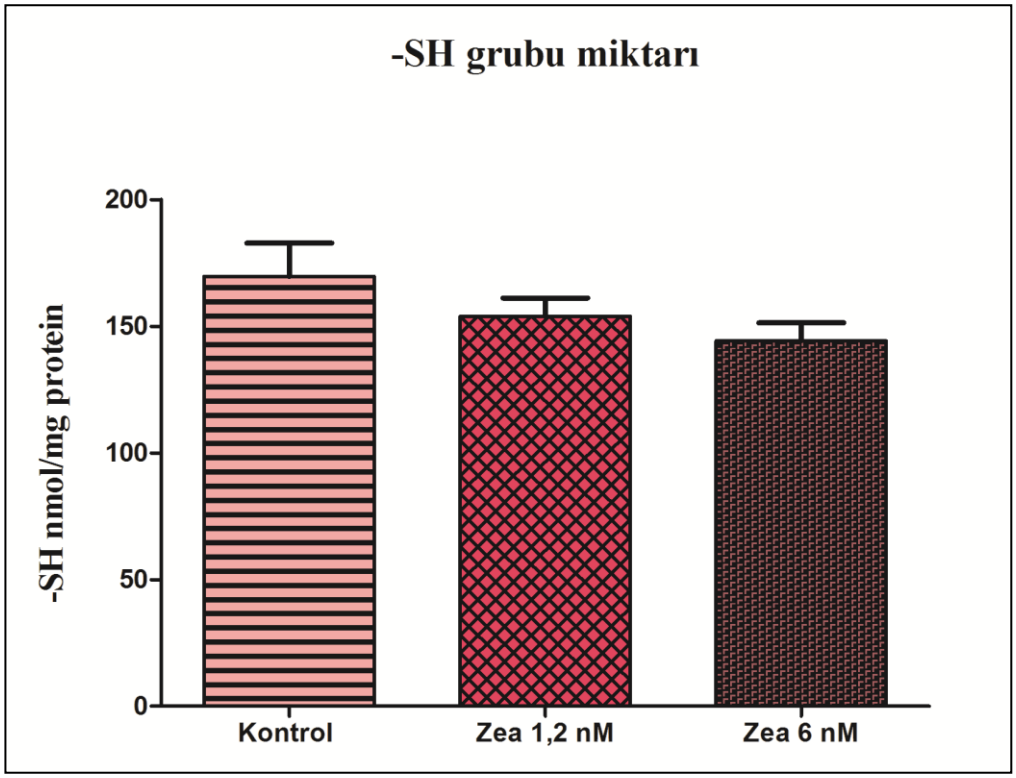
TM3 Leydig hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanan total protein miktarı şekil 4.2.2.1'de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve zearalenonun iki farklı dozu total protein miktarı bakımından karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre 1,2 nM zearalenon ve 6 nM zearalenon dozlarında anlamlı bir artma gözlendi ($p<0,001$). 1,2 nM ve 6 nM dozları birbirleri ile kıyaslandığında ise anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 4.2.2.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücreleri üzerindeki total protein miktarına etkileri (***: $p<0,001$).

4.2.3. Proteinlerdeki Oksidatif Hasar

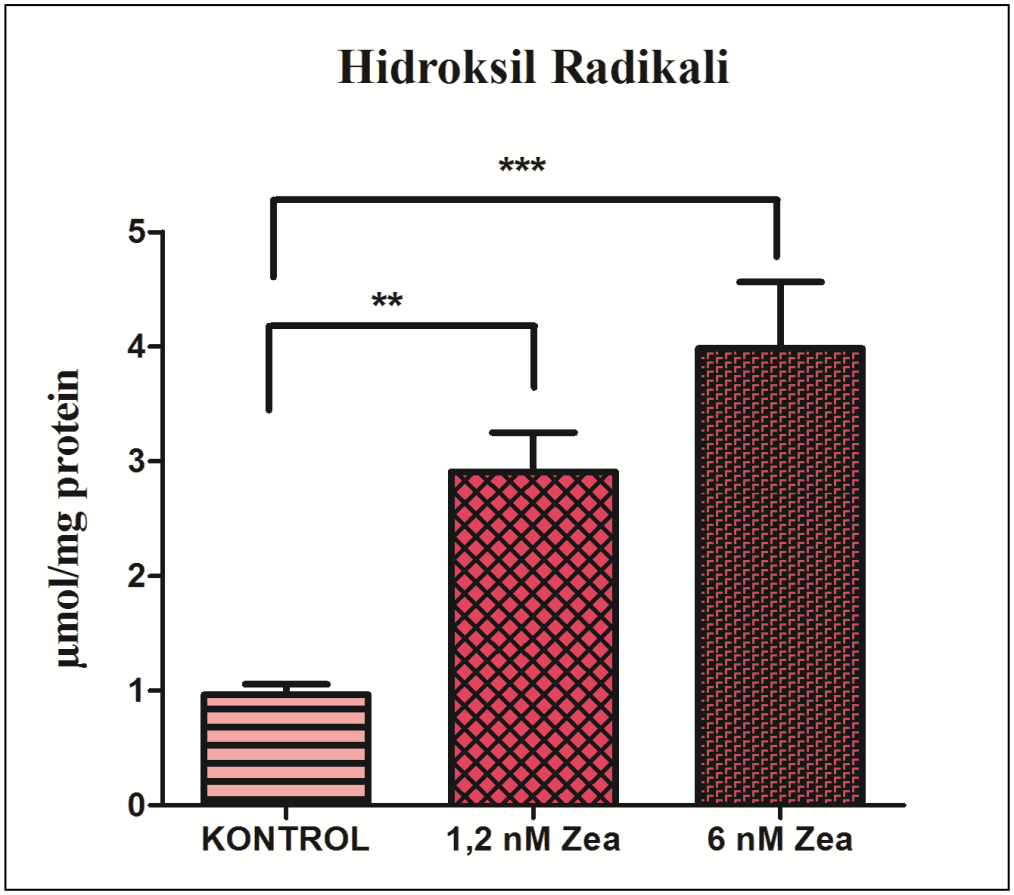
TM3 Leydig hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanan –SH gruplarının miktarı tablo 4.2.3.1.'de verilmiştir. 24. saat sonunda kontrol grubu ve zearalenonun iki farklı dozu –SH gruplarının miktarı bakımından karşılaştırıldığında 1,2 nM zearalenon ve 6 nM zearalenon dozlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 4.2.3.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücreleri üzerindeki tiol grubu (-SH) miktarına etkileri.

4.2.4. Hidroksil Radikali

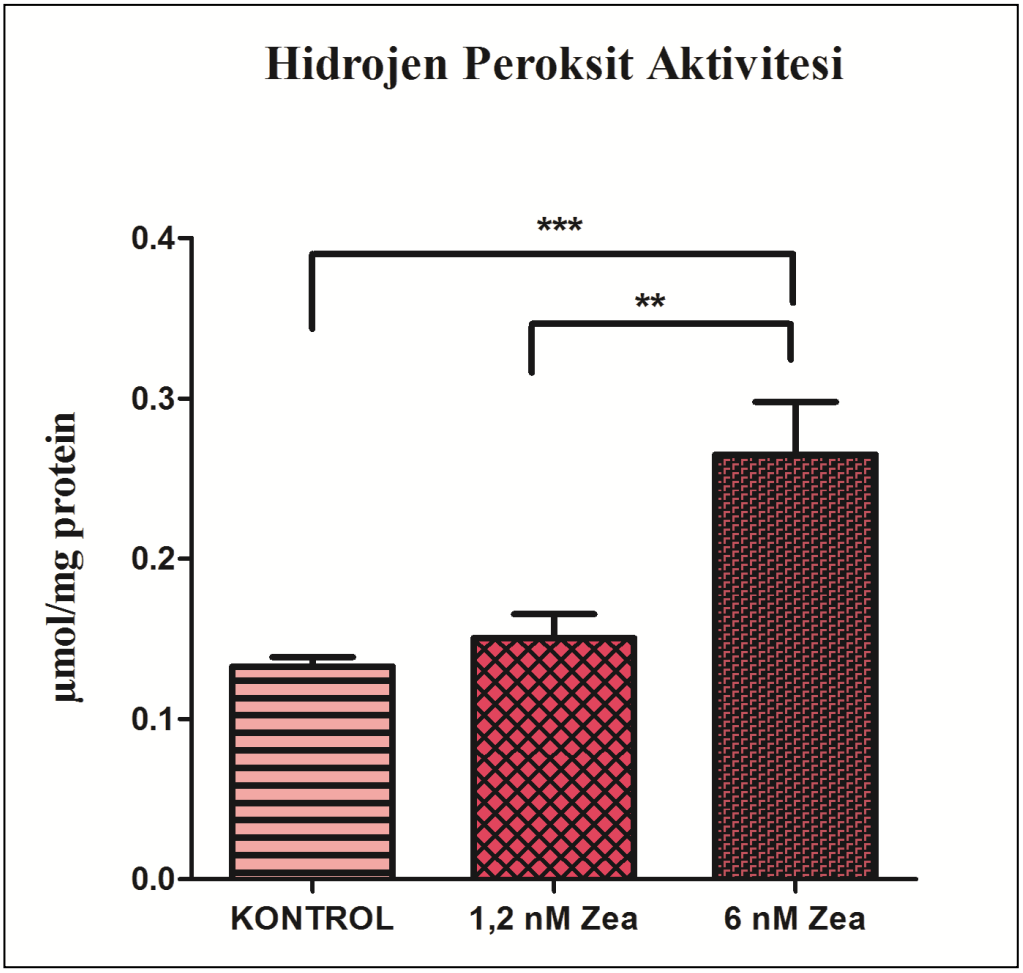
TM3 Leydig hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanan hidroksil radikali miktarı şekil 4.2.4.1'de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve zearalenonun iki farklı dozu hidroksil radikali miktarı bakımından karşılaştırıldığında 1,2 nM zearalenon ve 6 nM zearalenon dozlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0,01$; $p<0,001$). 1,2 nM zearalenon ve 6 nM dozları birbirleri ile kıyaslandığında ise anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 4.2.4.1: Zearalenonun oksidatif hasara bağlı olarak TM3 Leydig hücrelerinde oluşturduğu hidroksil radikali seviyeleri (**:$p<0,01$; ***:$p<0,001$).

4.2.5. Hidrojen Peroksit

TM3 Leydig hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanan hidrojen peroksit değerleri şekil 4.2.5.1'de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve zearalenonun iki farklı dozu hidrojen peroksit değerleri bakımından karşılaştırıldığında 1,2 nM zearalenon dozunda kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen, 6 nM zearalenon dozunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış belirlenmiştir ($p<0,001$). Ayrıca 1,2 nM zearalenon ve 6 nM zearalenon dozları birbirleri ile kıyaslandığında 6 nM zearalenon dozunda 1,2 nM zearalenon dozuna göre hidrojen peroksit değerlerinde anlamlı bir artma gözlendi ($p<0,01$).



Şekil 4.2.5.1: Zearalenonun oksidatif hasara bağlı olarak TM3 Leydig hücrelerinde oluşturduğu hidrojen peroksit değerleri (**:$p<0,01$; ***:$p<0,001$).

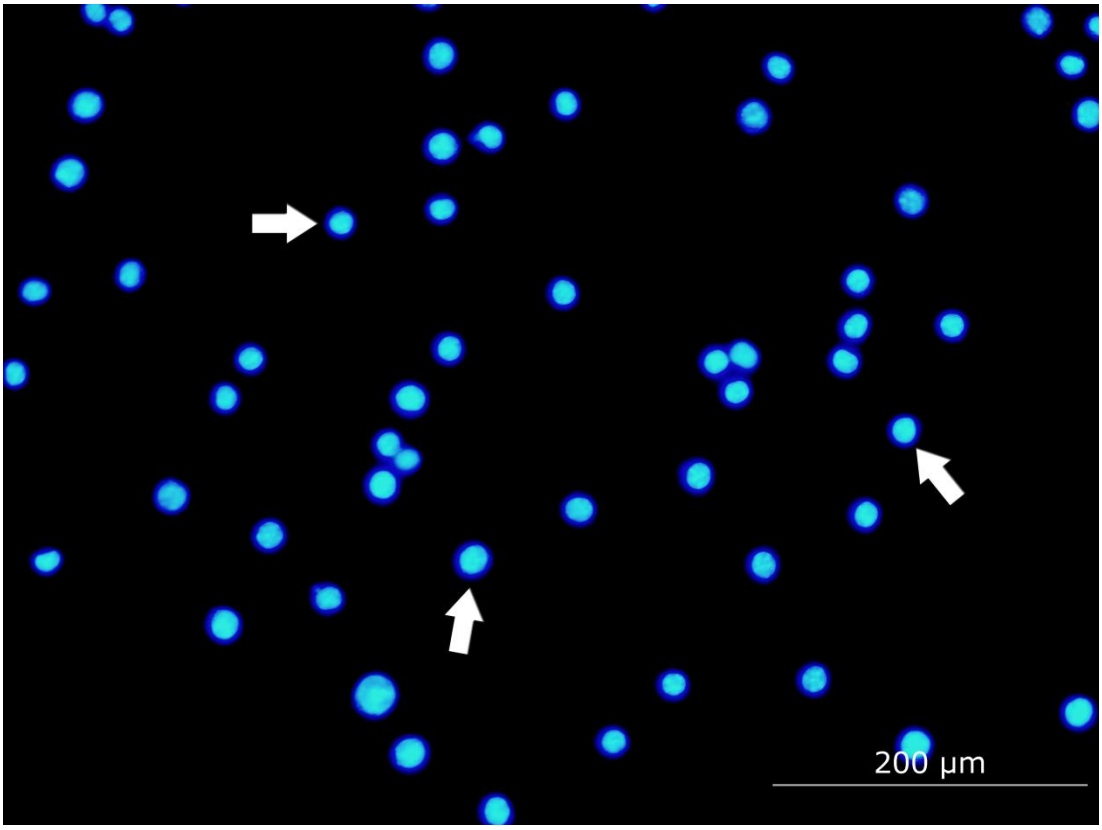
4.3. APOPTOZ/NEKROZ BULGULARI

4.3.1. Propidium İyodür/Hoechst Bulguları

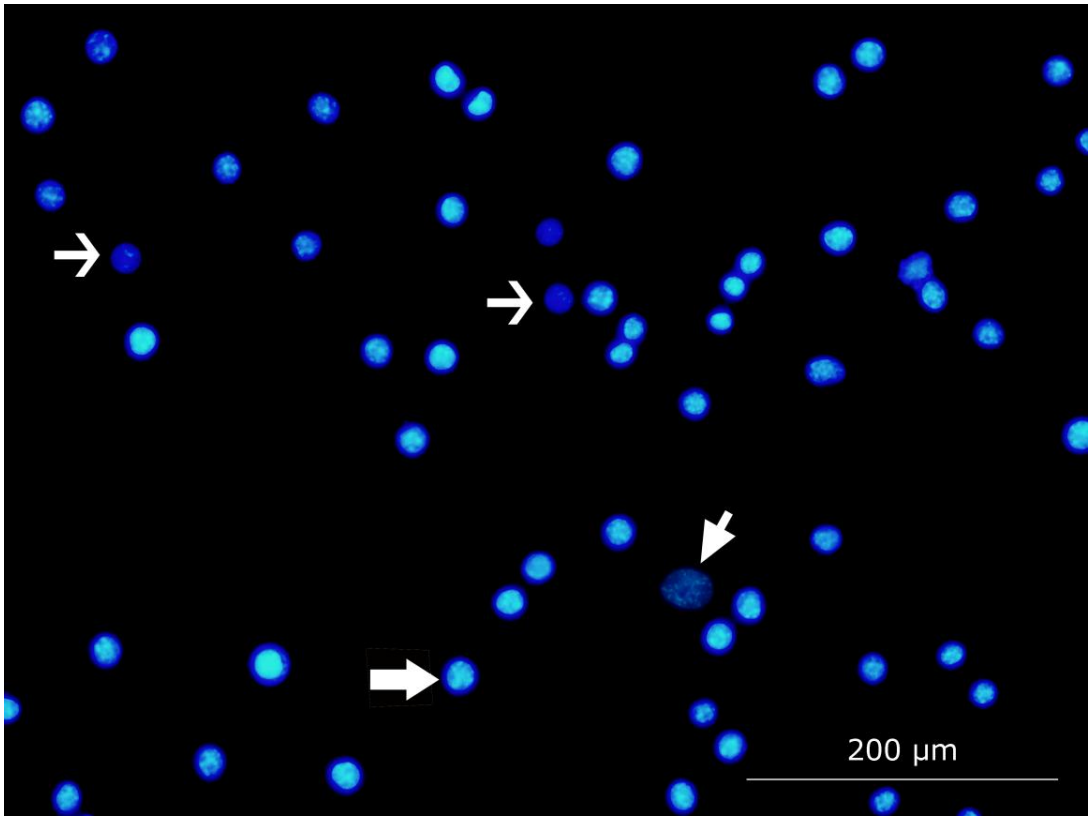
TM3 Leydig hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında floresan işaretleme yöntemi kullanılarak propidium iyodür ve Hoechst 33342 floresan boyaların hücreleri işaretlemeleri sonucunda oluşan renge göre yapılan sayım sonucu bulunan canlı hücre, erken apoptoz, apoptoz, nekroz yüzdeleri tablo 4.3.1.1.'de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve zearalenonun iki farklı dozu canlı hücre, apoptoz ve nekroz yüzdeleri bakımından karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre 1,2 nM zearalenon dozunda hiçbir grupta anlamlı bir fark gözlenmezken erken apoptoz yüzdelerinde kontrole göre anlamlı bir artış saptandı ($p<0,01$). 6 nM zearalenon dozu kontrol grubuna göre kıyaslandığında ise canlı hücre sayısında anlamlı bir azalma saptanırken ($p<0,05$), erken apoptotik ve apoptotik hücrelerin yüzdesinde anlamlı bir artış saptandı. ($p<0,01$; $p<0,001$). 1,2 nM ve 6 nM dozları birbirleri arasında kıyaslandığında ise apoptotik indeks bakımından anlamlı bir fark bulunamadı.

Tablo 4.3.1.1: TM3 Leydig hücrelerinde 24 saat süre sonunda belirlenen % apoptoz/nekroz değerleri (*: $p< 0,05$; **: $p< 0,01$; ***: $p<0,001$).

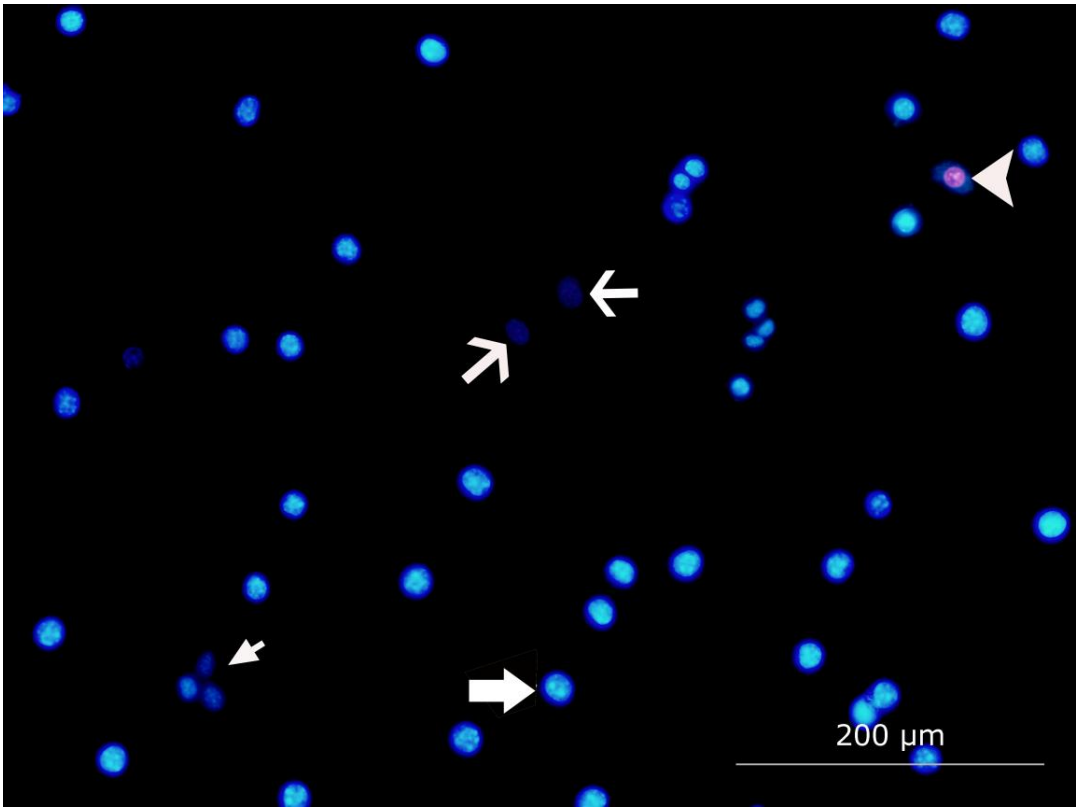
	Canlı Hücre (%)	Erken Apoptoz (%)	Apoptoz (%)	Nekroz (%)
KONTROL	95,37 ± 1,082	3,255 ± 0,258	0,3262 ± 0,113	0,0251 ± 0,02
1,2 nM Zea	90,32 ±1,183	11,07 ± 0,948**	1,442 ± 0,503	0,0472 ± 0,038
6 nM Zea	87,67 ± 2,668*	14,54 ± 2,525***	2,772 ± 0,58**	0,108±0,036



Şekil 4.3.1.1: Zearalenonun 24 saat sonunda TM3 Leydig hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerindeki etkileri. Kontrol grubu (⇨: canlı hücre).



Şekil 4.3.1.2: Zearalenonun 24 saat sonunda TM3 Leydig hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerindeki etkileri. 1,2 nM Zearalenon. (⇨:canlı hücre, ⇨:erken apoptoz, ⇨:apoptoz).



Şekil 4.3.1.3: Zearalenonun 24 saat sonunda TM3 Leydig hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerindeki etkileri. 6 nM Zearalenon. (⇨:canlı hücre, ⇨: erken apoptoz, ⇨:apoptoz, ◁ :nekroz).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Küf mantarlarının sekonder metabolitleri olarak adlandırılan mikotoksinler, gıda maddelerinde üreyebilmektedir. Yem ve besin maddeleri ile alındığından insan ve hayvanların sağlığını etkileyerek zehirlenmelere ve ölümlere yol açmaktadır. Bu toksinler günümüzde halk sağlığını tehdit etmenin yanı sıra ekonomide de ciddi kayıplara neden olmaktadır. Besinlerin ve havyan yemlerinin mikotoksinler ile kontamine olması insan ve hayvan sağlığı için büyük problem teşkil etmektedir (Stec ve diğ., 2009). İnsanlar, mantarların büyümesi ile direkt olarak kontamine olmuş besini tüketerek ya da mikotoksin ile kontamine olmuş besinleri tüketen hayvanlardan elde edilmiş besin maddeleri ile mikotoksinlere maruz kalmaktadır (Rodriguez, 1985; Schollenberger, 2006). Mikotoksinlerin besinler aracılığı ile vücuda alınması akut toksisiteye, uzun süreli veya kronik sağlık problemlerine (immun sistemin baskılanması, kanser) neden olmaktadır (Bennett ve Klich, 2003).

Mikotoksinler *Aspergillus, Fusarium* ve *Penicillium* türlerini içeren üç önemli mantar grubunun sekonder metabolitleridir (Bennett ve Klich, 2003). Zearalenon en yüksek dağılım oranına sahip *Fusarim* türü mikotoksin olup, insan ve hayvan tüketimine sunulan önemli tahıl ürünleri içerisinde yüksek oranlarda bulunmaktadır (Scudamore ve Patel, 2000; MacDonald ve diğ., 2005; Engelhardt ve diğ., 2006; Tabuc ve diğ., 2009). Yem ve besin olarak üretilen bu tahıllar üretim, işleme ve depolama aşamaları sırasında mantarların metabolitleri olan mikotoksinler ile kontamine olmaktadır. Ham ve işlenmemiş materyalde mantarların bulunması ürünün kalitesini düşürmektedir (Gromadzka ve diğ., 2008). Mikotoksinleri üreten mantarlar rüzgar ve hava akımlarıyla taşınabildiğinden dünya genelinde geniş dağılım göstermektedir (Steyn ve Stander, 1999; Concon, 1988).

Zearalenon, genel olarak *Fusarium graminearum* ve *Fusarium culmorum* türlerinden üretilen bir toksindir (Hestbjerg ve diğ., 2002; Glenn, 2007). Sıklıkla mısır ve arpa, buğday, mısır unu gibi küçük tahıllarda, pirinç ve soya fasulyesinde bulunmaktadır (Jimenez ve Mateo, 1997). Zearalenon ve metabolitleri (α ve β- zearalenol) steroid

yapıda olmayan ve oldukça yüksek östrojenik özelliğe sahip mikotoksinlerdir. İnsanlarda ve hayvanlarda uterus, meme bezi, kemik, karaciğer, beyin, prostat, ovaryum, akciğer, idrar kesesi, testis, göğüs üriner kanallar gibi östrojene yanıt veren dokularda yüksek östrojenik hormon aktiviteleri ile endokrin bozucu olarak görev yaparlar (Mike ve diğ., 2013). Östrojenler primer olarak ovaryumda ve yağ hücrelerinde kolesterolden sentezlenmektedir. Ontogeni sırasında, östrojen reseptörü (ER) aktivasyonu ile sekonder dişi eşey karakteristiği, spermin olgunlaşması, protein ve lipit sentezi gibi süreçlerde görev almaktadır. ER-östrojen kompleksi DNA'da hormona cevap veren elementlere bağlanarak ER ile ilişkili genlerin transkripsiyonunu aktive eder (Lin ve diğ., 2004). Zearalenon düşük akut toksisite göstermesine rağmen, hiperöstrojenizm, üreme sistemi bozuklukları, hepatonefrotoksisite, immunotoksisite, apoptotik ve lipit peroksidasyonunu arttırıcı etki göstermektedir (Abbes ve diğ., 2006; Ben Salah Abbes ve diğ., 2008; Ben Salah Abbes ve diğ., 2007; Abid-Essefi ve diğ., 2003; Ben Salah Abbes ve diğ., 2009). Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, zearalenon alımı insan ve hayvan kanserlerinin etiyolojisi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Tomaszewski ve diğ., 1998; IARC, 1993).

Zearalenonun insanlarda günlük tüketimi ile ilgili raporların az oluşu, tüketilen besinlerdeki zearalenon içerikleri ile ilgili kısıtlı dataların olması ve Dünya'nın farklı bölgelerindeki ülkelerde yapılan çalışmaların az olmasından kaynaklanmaktadır (Zinedine ve diğ., 2007). Yapılan bazı çalışmalarla zearalenonun ortalama günlük alımının Kanada, Norveç ve Danimarka için 20 ng/kg v.a/gün iken Amerika için 30 ng/kg v.a/gün olarak belirlenmiştir. Bazı ülkelerde tespit edilmiş ortalama zearalenon günlük maruziyet seviyeleri ise, Belçika'da 8.1 ng/kg/v.a; Kıbrıs'ta 8.6 ng/kg/v.a, Çek Cumhuriyeti'nde 14.7 ng/kg/v.a, Finlandiya'da 4.3 ng/kg/v.a, Fransa'da 8.3 ng/kg/v.a, Almanya'da 6.35 ng/kg/v.a, İtalya'da ise 9.93 ng/kg/v.a dır (EFSA, 2011). Ülkemizde gıdalarla alınan zearalenonun besinler içerisindeki maksimum limitleri belirlenmiştir. İşlenmemiş tahılda (mısır hariç) 100 µg/kg; işlenmemiş mısırda 350 µg/kg; doğrudan insan tüketimine sunulan tahıl, tahıl unları ve kepekte 75 µg/kg; ekmekte 50 µg/kg; doğrudan insan tüketimine sunulan mısır, mısır çerezleri ve mısır bazlı kahvaltılık tahıllarda 100 µg/kg zearalenon maksimum limiti tespit edilmiştir (Türk Gıda Kodeksi, 2008). Zearalenon için yapılan risk değerlendirmesi çalışmaları ile zearalenon ve metabolitlerinin östrojenik etkisi temel alınarak, geçici maksimum tolere edilebilen

günlük alım dozunun (PMTDI) 500 ng/kg v.a, domuzlarla yapılmış 15 günlük bir çalışmanın sonucunda 40 µg/kg v.a/gün NOAEL değeri kullanılarak JECFA tarafından elde edilmiştir (EFSA, 2004). Bu çalışmalar ile geçici tolere edilebilen günlük alımın (TDI) ise 200 ng/kg v.a olduğu belirlenmiştir (SCF, 2000).

Bu çalışmada belirlenen dozlar hiçbir yan etkinin gözlemlenmediği değer olan NOAEL değeri (Gajecka ve diğ., 2011) ve en düşük etkinin gözlemlendiği değer olan LOEL değeri (Zwierzchowski ve diğ., 2006) kullanılarak hesaplanmıştır. Düşük ve yüksek zearalenon dozları, mevcut farmakokinetik parametreler kullanılarak hesaplanmıştır (Dhillon ve Gill, 2006). Canlının zearalenon ile kontamine olan besini oral olarak alımını takiben kan plazmasında bulunabilecek olan değer (Cp), zearalenonun dağılım hacminin (Vd) biyoyararlanıma (F) oranı (Vd/F) kullanılarak bulunmuştur (Shin ve diğ., 2009). Bulunan Cp değeri *in vitro* koşullarda TM3 Leydig hücrelerine 24 saat süreyle uygulanmıştır.

Zearalenonun hücre canlılığına etkisi ile ilgili olarak birçok çalışma bulunmaktadır (Kouadio ve diğ., 2005; Minervini ve diğ., 2006; Zhu ve diğ., 2011; Ayed ve diğ., 2011; Prouillac ve diğ., 2012; Wan ve diğ., 2013; Bouaziz ve diğ., 2013; Kang ve diğ., 2013). Kouadio ve diğerlerinin 2005 yılında yaptıkları çalışmada, insan kolon kanser hücrelerine (Caco-2), 1-150 µM konsantrasyonları arasında zearalenonun 72 saat süreyle uygulanması sonucunda zearalenonun artan konsantrasyonlarında hücre canlılığı inhibisyonunun arttığı tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada at ovaryumundan izole edilmiş granüloza hücrelerine $1x10^{-7}$-0.1µM konsantrasyon aralığında zearalenonun 72 saat süreyle muamelesi sonucunda $1x10^{-4}$µM ve $1x10^{-3}$µM zearalenon dozunda granüloza hücrelerinin çoğalmasının kontrol gruplarına göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir (Minervini ve diğ., 2006).

Zhu ve diğerlerinin 2011 yılında yaptıkları *in vitro* çalışmada domuz granüloza hücrelerine 30, 60, 90 ve 120 µM zearalenon 24 saat süreyle uygulanmıştır. Çalışma sonucunda 60, 90 ve 120 µM zearalenon uygulanan gruplar kontrole göre kıyaslandığında hücre çoğalmasında anlamlı olarak azalma tespit edilmiştir. 2011 yılında Ayed ve diğerlerinin yaptığı çalışmaya göre 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 ve 180 µM zearalenonun 24 saat süreyle insan rahim servikal karsinoma (HeLa) hücre soyuna uygulanması sonucu, artan toksin konsantrasyonuna bağlı olarak hücre

canlılığının kontrole göre azaldığı belirlenmiştir. Prouillac ve diğ. (2012) nin yaptıkları çalışmada insan trofoblast hücre soyuna (The Bewo) 1, 20, 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda 48 saat süreyle zearalenon uygulanmıştır. 48 saatlik uygulamanın sonucunda 25, 50 ve 100 µM zearalenon dozlarında hücre canlılığının kontrole göre anlamlı bir şekilde azaldığı bildirilmiştir. 2013 yılında Bouaziz ve diğerlerinin (2013) yaptığı çalışmaya göre yeşil maymun böbreğinden izole edilmiş hücrelere (Vero) 5, 20, 40, 60, 80, 100 nM zearalenon 24 saat süreyle uygulanmıştır. 24 saat sonunda yapılan MTT deneyi ile zearalenonun artan konsantrasyonlarının doza bağlı olarak hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir. The Chang karaciğer hücre soyu (CCL 13) ile yapılan *in vitro* bir çalışmada, 0-200 µM konsantrasyon aralığında zearalenonun 24 saat süreyle uygulanması sonucunda, artan zearalenon konsantrasyonlarında hücre canlılığının azaldığı fakat kontrole göre anlamlı azalmanın 150 ve 200 µM zearalenon dozunda gerçekleştiği tespit edilmiştir (Kang ve diğ., 2013).

In vivo olarak yapılan bir çalışmada iki yaşındaki sağlıklı domuzlardan dört hafta aralıklarla alınan semenler seyreltilerek 125 µM (düşük), 187.5 µM (orta), 250 µM (yüksek) konsantrasyonlarda zearalenon ve α-zearalenon ile muamele edilmesi sonucunda artan doza ve artan zamana bağlı olarak sperm canlılığının azaldığı gözlemlenmiştir (Tsakmakidis ve diğ., 2006). Yang ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada intraperitonal yolla farelere yedi gün boyunca 25 µg/kg/ va, 50 µg/kg/ va ve 75 µg/kg/ va zearalenon ve α-zearalenol uygulanmıştır. Çalışma sonucunda hem zearalenon hem de α-zearalenol uygulanan gruplarda sperm canlılığının artan doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bildirilmiştir. Boeira ve diğerlerinin 2012 yılında yaptığı bir çalışmada albino sıçanlara oral olarak 40 mg/kg verilen zearalenonun 48 saat sonra yaptığı etkiler incelenmiştir. Çalışma sonucunda, 48 saat sonrasında canlı spermatozoa sayısında azalma meydana geldiği tespit edilmiştir.

Transforme edilmemiş intestinal hücreler (IPEC-J2) ile yapılan başka bir çalışmada 0, 5, 10, 20 ve 40 µM zearalenon 48 saat süreyle hücrelere uygulanmış ve deney sonucunda 10 µM zearalenon uygulanan grupta hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir artma gözlenirken, 40 µM zearalenonun uygulandığı gruplarda hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Wan ve diğ., 2013). Raghad ve diğerlerinin 2013 yılında yaptıkları bir çalışmada malignant olmayan fare fibroblast hücre soyuna (L20B)

0.039 ng/ml, 0.078 ng/ml, 0.156 ng/ml, 0.313 ng/ml, 0.625 ng/ml, 1.25 ng/ml ve 2.5 ng/ml zearalenon 24 saat süreyle uygulanmıştır. Deney sonucunda 2.5 ng/ml-0.625 ng/ml konsantrasyonlarında hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir artış saptanmıştır.

Yapılan bu *in vitro* çalışmada, TM3 Leydig hücrelerine zearalenonun 1,2 nM ve 6 nM dozları uygulanması sonucu hücre canlılığının anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Yukarıdaki çalışmalardan farklı olarak, Minervini ve diğerlerinin (2006) yapmış oldukları çalışmada $1x10^{-4}$µM ve $1x10^{-3}$µM zearalenon konsantrasyonlarının uygulanması ile hücre canlılığını arttırması ve Wan ve diğerlerinin (2013) yaptıkları çalışmada 10 µM konsantrasyonundaki zearalenonun hücre canlılığını anlamlı olarak arttırması, yapılan bu çalışmada 1,2 nM ($1,2x10^{-3}$µM) ve 6 nM ($6x10^{-3}$µM) dozlarında hücre canlılığını anlamlı olarak arttırması ile paralellik göstermektedir. Ayrıca Raghad ve diğerlerinin (2013) yaptıkları çalışmada 0.625 ng/ml- 2.5 ng/ml arasındaki tüm dozların hücre canlılığını arttırması yapılan bu çalışmada 1,2 nM (0.371 ng/ml) ve 6 nM (1.860 ng/ml) dozlarında da hücre canlılığını arttırması ile paralellik göstermektedir. Hücre canlılığının bu dozlarda artması, zearalenonun östrojenik etkiye sahip olmasından dolayı toksik olmayan konsantrasyonlarda uygulandığında gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Zearalenonun hücre canlılığı üzerindeki etkisini Tripan mavisi boyama yöntemiyle belirleyen çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Lioi ve diğerlerinin 2004 yılında yaptıkları çalışmada sığır lenfosit hücrelerine 0, 0.5, 1, 2 ve 4 µM konsantrasyonlarında zearalenon 24 saat uygulandığında deney sonunda artan zearalenon konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerine belirli bir etkisi olmadığını belirlemiştir. Zearalenon ile yapılan başka bir *in vitro* çalışmada *S. frugiperda* kelebek türünün pupal ovaryumdan izole edilen SF-9 hücreleri kullanılmıştır. Bu hücrelere 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 ve 1000 µM zearalenon uygulanarak SF-9 hücreleri için zaearalenonun hücre çoğalmasını %50 inhibe eden konsantrasyon (IC_{50}) ve %50 sitotoksik olan konsantrasyon (CC_{50}) değerlerinin belirlenmesi için yapılan MTT ve Tripan mavisi çalışmalarında, IC_{50} değerinin 17,5 µM ve CC_{50} değerinin ise 18,3 µM olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 48 saatlik uygulamanın sonucunda en yüksek zearalenon dozunda bile hücre canlılığının kontrol seviyelerine yakın olduğu ve anlamlı bir değişikliğin

gözlemlenmediği belirtilmiştir (Fornelli ve diğ, 2004). Tsakmakidis ve diğ., (2006)'nin yaptıkları bir çalışmada, iki yaşındaki yaban domuzundan izole edilmiş semen 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle 125 µM; 187,5 µM ve 250 µM zearalenon ve α-zearalenol dozlarıyla inkübe edilmiş ve deney süresi sonunda sperm canlılığı Tripan mavisi ile belirlenmiştir. Çalışma sonunda, sperm canlılığının inkübasyon zamanına ve artan konsantrasyona bağlı olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir.

Zearalenonun TM3 Leydig hücreleri üzerindeki oksidatif etkisini belirlemek için yapılan bu çalışmada, zearalenonun 1,2 nM ve 6 nM dozlarında hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir fark görülmemiştir. Tsakmakidis ve diğ., (2006)'nin yaptıkları çalışmada yaban domuzu semen örneklerinde artan doza ve zamana bağlı olarak sperm canlılığının azaldığını belirlemelerine rağmen, Lioi ve diğerlerinin 2004 yılında sığır lenfosit hücreleri ile yaptıkları çalışmada zearalenonun yüksek konsantrasyonlarında dahi kontrole göre bir farklılık görülmemesi, Fornelli ve diğerlerinin 2004 yılında SF-9 pulpal ovaryum hücreleri ile yaptıkları çalışmada 0,001 µM ve 0,01 µM zearalenon konsantrasyonlarındaki hücre canlılığı seviyesinin yanı sıra yüksek zearalenon konsantrasyonlarında da hücre canlılığının kontrol seviyesinde olması, yapılan bu çalışmada 1,2 nM (0,0012 µM) ve 6 nM (0,006 µM) zearalenon konsantrasyonlarının TM3 Leydig hücrelerinde hücre canlılığını anlamlı bir şekilde etkilememesi ile paralellik göstermektedir.

Zearalenon, sentez fazındaki hücrelerde DNA ve protein sentezini inhibe etmektedir (Abid-Essefi ve diğ., 2004). Abid-Essefi ve diğerlerinin 2004 yılında yaptıkları çalışmada yeşil maymun böbreğinden izole edilmiş Vero hücreleri ve insan kolon kanser hücre soyuna (Caco-2) 10, 20 ve 40 µM konsantrasyonlarında zearalenon 24 saat süreyle uygulanmıştır. Muamele sonucunda iki hücre soyunda da artan zearalenon konsantrasyonuna bağlı olarak DNA ve protein sentezinin anlamlı olarak azaldığı belirtilmiştir. Lioi ve diğerlerinin 2004 yılında yaptıkları çalışmada lenfosit hücrelerine 0.1, 0.5, 1, 2 ve 4 µM konsantrasyonlarında zearalenon 72 saat süreyle uygulanmıştır. Deney süresi sonunda mitotik indeks hesaplanarak belirlenen çoğalmanın 1 ve 2 µM zearalenon dozlarında kontrole göre anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada insan kolon kanser hücre soyuna (Caco-2) 24 saat süreyle 10, 20 ve 40 µM zearalenon uygulanarak DNA ve protein sentezinin inhibisyonu incelenmiştir. 10

µM dozda %50 DNA sentezi inhibisyonu görülürken 19 µM'da %50 protein sentezi inhibisyonu belirlenmiştir (Kouadio, 2007). Ayed ve diğ., (2007)'nin yeşil maymun böbrek hücre soyu (Vero) kullanılarak yaptıkları çalışmada 10, 20 ve 40 µM zearalenonu 24 saat süreyle uygulamıştır. Çalışma sonunda 10 µM'dan yüksek konsantrasyonlarda G0/G1 fazındaki hücrelerin yüzdesinin doza bağlı olarak kontrole göre azaldığı tespit edilmiştir. Zearalenonun DNA replikasyonunu ya da hücre çoğalmasını engelleyerek hücre döngüsünü etkilediğini belirtmişlerdir. Stec ve diğerlerinin 2009 yılında yaptıkları çalışmada 7 haftalık domuzları ticari yemlerle besleyerek haftada bir kan örnekleri alınarak periferal kan mononuklear hücreleri ile çalışılmıştır. Concanavalin A ile indüklenmiş hücre proliferasyonu üzerine zearalenonun etkisi H3-metil timidin ile DNA sentezine bakılarak belirlendiğinde 10 µg/ml zearalenonun hücre proliferasyonunun %50'sini inhibe ettiği bulunmuştur.

Yapılan bu çalışma, TM3 Leydig hücrelerine zearalenonun 1,2 nM ve 6 nM dozlarının uygulandığı gruplarda her iki gruptada DNA sentez fazındaki hücrelerin kontrole göre anlamlı olarak azalması, Abid-Essefi ve diğ., (2004) ve Lioi ve diğ., (2004)'nin zearalenonun tüm dozlarında sentez fazındaki hücreleri anlamlı olarak azalttığını belirledikleri çalışmalarla paralellik göstermektedir. Ayrıca %50 DNA ve protein sentezi inhibisyonunun belirlendiği Kouadio ve diğ., (2007) ve Stec ve diğ., (2009)'nin yaptıkları çalışmaların sonucunda zearalenonun tüm dozlarının DNA sentez fazındaki hücreleri kontrole göre azaltması, yapılan bu çalışmada 1,2 nM ve 6 nM zearalenon dozlarının da DNA sentez fazındaki hücreleri kontrole göre azaltması ile paralellik göstermektedir.

Oksidatif stres birçok biyolojik moleküle özellikle DNA'ya, proteinlere ve lipitlere zarar verebilir. Bu hasar hücrelerde reaktif oksijen türleri tarafından meydana getirilebilmektedir (Cai ve diğ., 1997). Reaktif oksijen türleri tarafından membrandaki lipitlerin okside edilmesiyle lipit peroksidasyon ürünleri oluşarak membran bütünlüğü bozulur (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Zearalenonun lipit peroksidasyonu üzerine etkisini araştıran bir çok çalışma bulunmaktadır (Abid-Essefi ve diğ., 2004; Kouadio ve diğ., 2005; Ferrer ve diğ., 2009; Salah-Abbes ve diğ., 2009; Salah-Abbes ve diğ., 2010; Jiang ve diğ., 2011; Boeira ve diğ., 2012).

2004 yılında Abid-Essefi ve diğerlerinin yaptığı çalışmada yeşil maymun böbreğinden izole edilmiş Vero hücrelerini ve insan kolon kanseri hücre soyunu (Caco-2) 10, 20 ve 40 µM zearalenon ile 24 saat boyunca muamele etmişlerdir. 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda belirlenen sonuçlara göre lipit peroksidasyonunun her iki hücre soyunda da artan zearalenon konsantrasyonuna bağlı olarak kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. Kouadio ve diğerlerinin 2005 yılında yaptıkları çalışmada insan kolon kanser (Caco-2) hücre soyuna 5, 10, 20 ve 40 µM zearalenon dozları 24 saat süreyle uygulanmıştır. Deney sonucunda malondialdehit üretiminin artan dozlar ile bağlantılı olarak kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Yapılan başka bir *in vitro* çalışmada insan kolon kanser hücre soyuna (Caco-2) 10 µM zearalenon, deoksinivalenol ve fumonisin B1 ayrı ayrı veya birlikte 24 saat süreyle uygulanmıştır. Deney süresi sonunda mikotoksinlerin ayrı ayrı uygulandığı gruplarda, zearalenonun 10 µM dozunun lipit peroksidasyonunu anlamlı olarak arttırdığı tespit edilmiştir (Kouadio ve diğ., 2007). Yetişkin erkek farelerin 28 gün boyunca 40 mg/kg v.a dozunda zearalenon ile oral olarak muamele edilmesi ile lipit peroksidasyonunun ölçülmesinin amaçlandığı başka bir çalışmada 28. günün sonunda alınan testis dokusunda lipit peroksidasyonunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir (Salah-Abbes ve diğ., 2009). Başka bir çalışmada farelerden izole edilmiş keratinosit hücre soyuna (C5-O) zearalenonun tek bir dozunun (40 µM) 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonucunda zamana bağlı olarak lipit peroksidasyonunun arttığı belirtilmiştir (Salah-Abbas, 2010). Jiang ve diğ. (2011) ise sütten yeni kesilmiş domuz yavrularını farklı konsantrasyonlarda zearalenon içeren (1, 2 ve 3 mg/kg) diyet ile 18 gün boyunca besleyerek, beslenme süresinin sonunda yavru domuzların serum ve karaciğerlerinde oksidatif hasar ve lipit peroksidasyonunu ölçmüşlerdir. Spektrofotometrik ölçümlere göre artan zearalenon içeren diyet grupları ile beslenen gruplarda doza bağlı olarak lipit peroksidasyonunun kontrole göre anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, 90 günlük Swiss albino farelere zearalenonun akut dozu (40 µg/kg) uygulandıktan 48 saat sonra karaciğer, böbrek ve testis dokuları kullanılarak oksidatif hasarın enzimatik olmayan belirteci TBARS ölçülmüştür. Çalışmanın sonucunda zearalenon muamelesi sonucunda TBARS seviyesinin değişmediği belirtilmiştir (Boeira ve diğ., 2012). Lee ve diğerlerinin 2013 yılında yaptıkları in vitro çalışmada Chang karaciğer hücre soyuna (CCL 13-HeLa) 25, 50, 100, 150 ve 200 µM zearalenon 6, 12 ve 24 saat süreyle uygulanmıştır. İnkübasyon

süresinin sonunda artan doza ve zamana bağlı olarak lipit peroksidasyonunun kontrole göre anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.

Zearalenonun TM3 Leydig hücrelerinde oluşturduğu lipit peroksidasyonunu ölçmek için yapılan deneyler sonucunda NOAEL olarak belirlenen dozun (40 µg/kg) *in vitro* koşullara uyarlanmış değeri olan 1,2 nM zearalenonun uygulandığı deney grubunda lipit peroksidasyonu bakımından anlamlı bir fark bulunamaması, Boeira ve diğerlerinin (2012) yaptıkları *in vivo* çalışmada lipit peroksidasyonunun belirteçlerinden TBARS miktarının 40 µg/kg uygulanan dozda değişmemesi ile paralellik göstermektedir. Ayrıca yapılan bu çalışmada 6 nM zearalenon dozunda lipit peroksidasyonunun kontrole göre anlamlı bir şekilde artması yukarıda belirtilmiş diğer çalışmalarla paralellik göstererek zearalenonun yüksek dozunun lipit peroksidasyonuna sebep olduğunu düşündürmektedir.

Proteinler serbest radikallere karşı lipidlerden daha az hassastır. Etkilenme dereceleri içerdikleri aminoasit bileşimine bağlıdır Protein oksidasyonunun yaşlanma, oksidatif stres ve birçok hastalık ile ilişkili olduğu iyi bilinmektedir (Linton ve diğ., 2001) ve proteinlerin organizmada çok miktarda bulunmasından dolayı önemli bir oksidatif modifikasyondur. Hücresel metabolizmanın yan ürünü olarak veya çevresel kaynaklardan üretilen reaktif türler, proteinlerdeki amino asitlerde modifikasyonlara sebep olur ve protein fonksiyonunda/enzimatik aktivitede kayıba neden olurlar (Grune ve diğ., 1997). Bir oksidanın neden olduğu protein oksidasyonunun derecesi protein türü, oksidan ve anitoksidanların değişen oranlarını içeren birçok faktöre bağlıdır. Ayrıca oksidatif protein hasarı, oksidatif DNA hasarına oranla daha komplekstir, çünkü DNA'daki 4 baz yerine proteinlerde 20'den fazla farklı oksidasyon ürünlerinin oluşumuna neden olabilecek amino asit vardır (Grune 2000).

Reaktif oksijen türleri proteinlerdeki tiol (-SH) gruplarının oksidasyonuna yol açmaktadır (Shacter E., 2000; Hu, 1994). Oksidatif protein hasarı protein tiol düzeylerindeki azalma ile karakterizedir (Hu, 1994). Rucinska ve diğ, (2008) yaptıkları çalışmada 5-90 µM 24 saat uygulama sonucunda düşük dozlarda bile genisteinin protein tiol gruplarında oksidasyona sebep olduğunu, yüksek dozlarda (90 µM) ise protein-tiol gruplarında meydana gelen oksidasyonun ise kontrole kıyasla yaklaşık % 50 arttığını göstermişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada farelere gavaj yoluyla 40 mg/kg

zearalenon verilmiş ve 48 saat sonunda karaciğer, böbrek ve testis dokuları alınmıştır. Alınan dokularla non-enzimatik ve enzimatik oksidatif stres belirteçlerinin tespit edilmesi sonucunda tiol (-SH) grubu miktarında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Boeira ve diğ., 2012). Sarkar ve diğerlerinin 2013 yılında yaptıkları çalışmada farelerden izole edilmiş eritrositler 1 mM asetat ile 9 saat muamele edilmiş ve eritrosit membran proteinlerinde tiol gruplarının miktarı araştırılmıştır. Çalışma sonunda asetat ile muamele edilmiş hücrelerde eritrosit membranındaki proteinlerin içerdiği tiol grubunun kontrole göre anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular sonucunda, Rucinska ve diğ., (2008) genistein ile yaptıkları çalışma sonucunda düşük dozlarda bile protein oksidasyonu gözlemlenmesi ve Sarkar ve diğerlerinin 2013 yılında yaptıkları çalışma sonucunda tiol miktarının azalmasına rağmen, yapılan bu çalışmada 1,2 nM ve 6 nM zearalenon dozlarının uygulandığı gruplarda anlamlı bir fark bulunamaması Boeira ve diğerlerinin 2012 yılında yaptıkları çalışma ile paralellik göstermektedir.

Hücrelerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) artması, birçok hastalığın patogenezinde ve bileşiklerin toksisitesinde rol alır (Hassan ve Yousef, 2009). Zearalenonun reaktif oksijen türleri üzerine olan etkisi ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır (Bennour ve diğ., 2008; Ferrer ve diğ., 2009; Banjerdpongchai ve diğ., 2010; Zhu ve diğ., 2011; Bouaziz ve diğ., 2013; Gao ve diğ., 2013; Mike ve diğ., 2013). Yapılan bir çalışmada, 100 µM zearalenon 0, 16, 20 ve 40 saat süreyle insan HepG2 hepatositlerine uygulanmıştır. Çalışmanın sonunda, reaktif oksijen türlerinin üretiminin 24 ve 40. saatlerde kontrol grubuna kıyasla 8 ve 17 kat arttığı bulunmuştur (Bennour ve diğ., 2008). Ferrer ve diğ. (2009)'nin çalışmasında kullanılan Chinese hamster ovaryum hücre soyuna (CHO-K1) 5, 10 ve 50 µM zearalenon 120 dakika boyunca uygulanmıştır. Konsantrasyon ve zamana bağlı olarak yapılan bu çalışma sonucunda, hücre içi oluşan ROS miktarının artan konsantrasyon ve ilerleyen muamele zamanlarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. 2010 yılında Banjerdpongchai ve diğerlerinin yaptığı çalışmada, kullanılan insan promiyelositik lösemi (HL-60) hücrelerine 4 saat boyunca 20 µg/ml (62 µM) zearalenon uygulandığında hücre içi ROS miktarının arttığı tespit edilmiştir. Zhu ve diğerlerinin 2011 yılında yaptıkları çalışmada domuz granülosa hücrelerine 0, 60, 90 ve 120 µM konsantrasyonlarında zearalenon

uygulandığında hücre içi reaktif oksijen türlerinin seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı belirtilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, maymun böbreğinden izole edilmiş hücre soyuna (Vero) 50-100 nM konsantrasyon aralığında zearalenon muamele edilmiştir. Çalışmanın sonunda zearalenonun artan konsantrasyonlarında ROS artışına bağlı olarak değişen floresanın kontrol seviyesini geçmediği tespit edilmiştir (Bouaziz ve diğ., 2013). Transforme edilmiş insan primer embriyonik böbrek hücrelerine (HEK293) 0, 2.5, 5, 10 ve 20 µM zearalenonun 1 ve 2 saat süre ile uygulandığı *in vitro* çalışmada hücre içi ROS üretimi ölçülmüştür. Deney sonucunda 1 saatlik muamelenin reaktif oksijen türlerinin seviyesini büyük oranda değiştirmediği ancak kontrole göre anlamlı artışın 2 saatlik muamele sonucunda gerçekleştiği bildirilmiştir (Gao ve diğ., 2013).

Zearalenonun TM3 Leydig hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin miktarını belirleyen deneyler sonucunda 1,2 nM ve 6 nM zearalenon dozlarında reaktif oksijen türlerinin üretiminin arttığı tespit edilmiştir. Bouaziz ve diğ., (2013)'nin Vero hücreleri ile yaptıkları çalışmada zearalenonun yüksek dozlarında bile ROS miktarının kontrol seviyesini geçmediğini belirlemelerine rağmen, yukarıda bahsedilen diğer çalışmalarda zearalenonun artan dozlarında ROS üretiminin arttığının belirlenmesi yapılan bu çalışmada 1,2 nM ve 6 nM zearalenon dozlarında TM3 Leydig hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin artması ile paralellik göstermektedir.

Apoptoz, gen ekspresyonu ve/veya protein aktivitesi ile sinyal proteinlerinin oldukça hassas düzenlenmesini içeren karmaşık bir olgudur (Barbier ve diğ., 2010). Genel olarak oksidatif stresin, özellikle reaktif oksijen türlerinin apoptozu tetiklediği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu etkiyi, oksidatif strese bağlı lipit peroksidasyonunu arttırarak ve mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olarak göstermektedir (Anuradha ve diğ., 2001; Matsui ve diğ., 2007; Karube ve diğ., 2009). Yapılan bir çalışmada 10 haftalık erkek sıçanlara tek bir zearalenon dozu (5mg/kg) intraperitonal olarak uygulanmış ve 3, 6, 12, 24 ve 48. saatlerde testis dokuları alınmıştır. Çalışma sonucunda, TUNEL etiketli germ hücrelerinin sayısı ilerleyen zamanlarda derece derece artmış, 12. saatte kontrole göre 4 kat artmış ve sonra 48 saat sonunda kontrol seviyesine inmiştir. TUNEL işaretli hücrelerin kontrol ve zearalenon uygulanmış gruplarda genelde spermatogonia ve spermatosit olması apoptozun zamana ve germ hücrelerinin evrelerine

göre değiştiğini vurgulamaktadır (Kim ve diğ., 2003). Abid-Essefi ve diğ., (2003)'nin yaptıkları çalışmada displasik oral keratinosit hücreleri (DOK), insan kolon kanser hücreleri (Caco-2) ve maymun böbrek hücrelerine (Vero) 10, 20 ve 40 µM zearalenon 24 saat süreyle uygulanmıştır. Artan konsantrasyona bağlı olarak DOK ve Caco-2 hücrelerinde apoptotik hücrelerin yüzdesinin kontrole göre arttığı tespit edilmiştir. Sığır lenfosit hücrelerinin kullanıldığı *in vitro* çalışmada 0, 0.5, 1, 2 ve 4 µM konsantrasyonlarında zearalenon 24 saat süreyle hücrelere uygulandıktan sonra tüm dozlarda apoptotik hücre sayısı bakımından anlamlı bir fark gözlenmezken, nekrotik hücre sayısı sadece en yüksek dozda anlamlı artış gözlenmiştir (Lioi ve diğ., 2004). Ayed-Boussema ve diğerlerinin 2004 yılında maymun böbrek hücreleri (Vero) ile yaptıkları çalışmada 10, 20 ve 40 µM zearalenon 24 saat süreyle uygulanmıştır. Deney sonucunda artan konsantrasyona bağlı olarak apoptotik hücre yüzdesinin kontrole göre arttığı tespit edilmiştir. İnsan hepatosellülar karsinoma (HepG2) hücreleri ile yapılan in vitro çalışmada bu hücrelere 120 µM zearalenon 48 saat süreyle uygulanmıştır. Deney sonucunda apoptotik ve nekrotik hücrelerin kontrole göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir (Bouaziz ve diğ., 2008). Yapılan başka bir çalışmada keratinosit hücre soyuna (C5-O) 40 µM zearalenon 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanmıştır. Çalışmanın sonunda hücrelerin apoptotik indeksinin ilerleyen saatlerde kontrole göre arttığı tespit edilmiştir (Salah-Abbes ve diğ., 2010). Zhu ve diğerlerinin 2011 yılında yaptıkları *in vitro* çalışmada domuz granüloza hücre soyuna 0, 60, 90 ve 120 µM zearalenon konsantrasyonlarını 24 saat süreyle uygulamışlardır. Ayrıca 20 µM kaspaz inhibitörü Z-VDD-FMK veya 10 µM kaspaz-9 inhibitörü Ac-LEHD-FMK 2 saat süreyle uygulandıktan sonra 90 ve 120 µM zearalenon konsantrasyonları 24 saat süreyle uygulanmıştır. TUNEL deneyi sonunda, zearalenon ile muamele edilmiş domuz granüloza hücrelerinde, TUNEL-pozitif hücre sayısının kontrol grubuna göre arttığı tespit edilmiştir. Önce kaspaz inhibitörleri ve arkasından zearalenon ile muamele edilmiş domuz granüloza hücrelerinde, TUNEL-pozitif hücrelerin azaldığı tespit edilmiştir. Bunun sonucunda, zearalenon muamele edilmiş domuz granüloza hücrelerinde apoptozun, kaspaz-9 yolağı aracılığı ile uyarıldığı tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada flow sitometri kullanılarak zearalenon uygulanan domuz granüloza hücrelerinde apoptoz yüzdesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Gazzah ve diğerlerinin (2013) yaptıkları çalışmada insan hepatosellular karsinoma hücresine (HepG2) 100 µM zearalenon 2, 4, 8, 24, 30, 48 ve 60 saat süreyle

uygulanmıştır. Çalışma sonunda 8 saatlik uygulamanın sonucunda hücrelerin %95'inin canlı olduğu belirtilirken 30. saatten sonra apoptotik hücrelerin yüzdesinin arttığı belirlenmiştir.

Yapılan bu çalışmada ise, zearalenonun apoptoz üzerindeki etkisi 24. saat sonunda TM3 Leydig hücrelerinde erken apoptotik hücrelerin sayısını arttırması ile gerçekleşmektedir. Yukarıda yapılan çalışmalardan farklı olarak Lioi ve diğ., (2004)'nin sığır lenfosit hücreleri ile yaptıkları çalışmada tüm dozlarda apoptotik hücre sayısı bakımından anlamlı bir fark görülmemesine rağmen, Kim ve diğ., (2003), Salah Abbes ve diğ., (2010), Zhu ve diğ., (2011) ve Gazzah ve diğ., (2013)'nin yaptıkları çalışmalarda olduğu gibi apoptotik hücre yüzdesinin artması yapılan bu çalışma ile paralellik göstermektedir. Gazzah ve diğerlerinin 2013 yılında HepG2 hücreleri ile yaptıkları çalışmada 100 µM dozunda 2, 4, ve 8. saatlerde hücrelerin %95'inin canlı olması ve apoptoz yüzdesinin 30. saatten sonra artması, yapılan bu çalışmada canlı hücrelerin yüzdesinin kontrol seviyelerine yakın ya da çok az miktarda düşük olması ve 24. saatte erken apoptotik ve apoptotik hücrelerin yüzdesinin anlamlı olarak artması ile paralellik göstermektedir.

Yapılan bu çalışmanın sonuçlarına göre, zearalenonun hücre metabolizmasının aktifliğini belirleyen hücre canlılığını, NOAEL ve LOEL dozlarında zearalenonun östrojenik etkisinden dolayı arttırdığı belirlenmiş ve sentez fazındaki hücre sayısını azalttığı tespit edilmiştir. Zearalenonun hücre membran fosfolipitlerinin doymamış yağ asitlerinde istenmeyen etkiler oluşturması sonucu lipit peroksidasyonunu oluşturması, oksijen türevi serbest radikallerden hidroksil radikali ve hidrojen peroksit miktarlarını arttırmasıyla TM3 Leydig hücrelerinde oksidatif hasara yol açtığı ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca zearalenonun lipit peroksidasyonunu arttırmasına ve mitokondri membran bütünlüğünü bozması sonucu reaktif oksijen türlerinin oluşumuna bağlı olarak apoptozu teşvik ettiği ortaya çıkarılmıştır.

KAYNAKLAR

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

Abid-Essefi, S., Bouaziz, C., Golli-Bennour, E.E., Ouanes, Z. and 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, 233-243.

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

Abuja, P.M. and Albertini, R., 2001, Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins, *Clinica Chimica Acta*, 306, 1-17.

Aida, E.M., Hassanane, M.S. and Alla, E.S.A.A., 2001, Genotoxic evaluation for the estrogenic mycotoxin zearalenone, *Reprod. Nutr. Dev*, 41, 79-89.

Akkuş T., 1995, Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, *Konya Mimoza Yayınları*, 1-80.

Akşit, H. and Bildik, A., 2008, Apoptozis, *YYÜ Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 19(1), 55-63.

Anuradha, C.D., Kanno, S. And Hirano, S., 2001, Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells, *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 367-373.

Assunção Guimarães, C. and Lınden, R., 2004, Programmed cell deaths, *European Journal of Biochemistry*, 271, 1638-1650.

Ayed, Y., Ayed-Boussema, I., Ouanes, Z. and 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, 42-46.

Ayed-Boussema, I., Bouaziz, C., Rjiba, K., Valenti, K., Laporte, F., Bacha, H. and Hassen, W., 2008, The mycotoxin Zearalenone induces apoptosis in human hepatocytes (HepG2) via p53-dependent mitochondrial signaling pathway, *Toxicology in Vitro*, 22, 1671-1680.

Ayed-Boussema, I., Ouanes, Z., Bacha, H. and Abıd, S., 2007, Toxicities induced in cultured cells exposed to zearalenone: apoptosis or mutagenesis?, *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 21(3), 136-144.

Banjerdpongchai, R., Kongtawelert, P., Khantamat, O., Srısomsap, C., Chokchaıchamnankıt, D., Subhasitanont, P. and Svasti, J., 2010, Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress pathways cooperate in zearalenone-induced apoptosis of human leukemic cells, *J Hematol Oncol*, 3, 50.

Barbier, O., Arreola-Mendoza, L. and Del Razo, L.M., 2010, Molecular mechanisms of fluoride toxicity, *Chemico-biological interactions*, 188, 319-333.

Bargen, S.V., Martinez, O., Schadock, I., Eisold, A.M., Gossmann, M. and Buttner, C., 2009, Genetic variability of phytopathogenic Fusarium proliferatum associated with crown rot in Asparagus officinalis, *Journal of Phytopathology*, 157, 446-456.

Barisic, K., Petrik, J. and Rumora, L., 2003, *Biochemistry of apoptotic cell death*, Acta Pharm., 53: 151-164.

Bennett, J.W. and Klich, M., 2003, Mycotoxins, *Clin. Microbiol. Rev*, 16, 497–516.

Bennour, E.G., Bouaziz, C., Ladjimi, M., Renaud, F. and Bacha, H., 2009, Comparative mechanisms of zearalenone and ochratoxin A toxicities on cultured HepG2 cells: Is oxidative stress a common process?, *Environmental toxicology*, 24, 538-548.

Benzoni, E., Minervini, F., Giannoccaro, A., Fornelli, F., Vigo, D. and Visconti, A., 2008, Influence of *in vitro* exposure to mycotoxin zearalenone and its derivates on swine sperm quality, *Reproductive Toxicology*, 25, 461-467.

Betina, V., 1989, *Mycotoxins. Chemical, Biological and Environmental Aspects*, Elsevier, Bratislava, ISBN: 0-444-98885-8.

Biehl, M., Prelusky, D., Koritz, G., Hartin, K., Buck, W. and Trenholm, H., 1993, Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs, *Toxicology and applied pharmacology*, 121, 152-159.

Boeira, S.P., Del'fabbro, L., Freire Royes, L.F., Jessé, C.R., Oliveira, M.S. and Furian, A.F., 2012, Possible role for glutathione-*S*-transferase in the oligozoospermia elicited by acute zearalenone administration in Swiss albino mice, *Toxicon*, 60, 358-366.

Bottalico, A. and Perrone, G., 2002, Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe, *European Journal of Plant Pathology*, 108, 611-624.

Bouaziz, C., Bouslimi, A., Kadri, R., Zaied, C., Bacha, H. and Abid-Essefi, S., 2013, The in vitro effects of zearalenone and T-2 toxins on Vero cells. *Experimental and Toxicological Pathology*, 65, 497-501.

Bouaziz, C., El Golli, E., Abid-Essefi,, S., Brenner, C., Lemaire, C. and Bacha, H., 2008, Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells, *Toxicology*, 254(1), 19-28.

Bozdoğan, Ö., 2004, *Fizyoloji.* 2, Basım. Ankara; Palme Yayıncılık, ISBN: 9799758522789.

Bravin, F., Duca, R.C., Balaguer, P. and Delaforge, M., 2009, In vitro cytochrome P450 formation of a mono-hydroxylated metabolite of zearalenone exhibiting estrogenic activities: possible occurrence of this metabolite in vivo, *International journal of molecular sciences*, 10, 1824-1837.

Brouckaert, G., Kalai, M., Krysko, D.V., Saelens, X., Vercammen, D., Ndlovu, M., Haegeman, G., D'herde, K. and Vandenabeele, P., 2004, Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production, *Molecular biology of the cell*, 15, 1089-1100.

Cai, Q., Rahn, R.O. and Zhang, R., 1997, Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals, *Cancer Letters.* 119(1), 99-107.

Chelkowski, J., 1998, Distribution of Fusarium species and their mycotoxins in cereal grains, *Mycotoxins in agriculture and food safety*, 15, 45-66.

Chen, J.C., Wiley, A.A., Kauffold, J., Wähner, M., Bartol, F.F. and Bagnell, C.A., 2009, Perinatal zearalenone exposure affects RXFP1, RXFP2, and morphoregulatory gene expression in the neonatal porcine uterus, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1160, 188-189.

Christensen, A.K., 1975, Leydig cells. In: Greep RO, Astwood EB, Hahninton DW, Geiger S (Eds). Handbook of Physiology. Washington; American Physiological Society, p.57-94.

Concon, J.M, 1988, *Food toxicology. Part A: Principles and concepts; Part B: Contaminants and additives*, Marcel Dekker Inc, ISBN: 0-8247-7736-0.

Costanzo, L.S., 2003, *Fizyoloji*, Özgünen KT, Özgünen T (Çev.). 3.Basım. Ankara. Güneş Kitabevi.

D'Mello, J.P.F., Placinta, C.M., MacDonald, A.M.C., 1999, Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity, *Anim. Feed Sci. Technol*., 80, 183–205.

Davies, K. and Goldberg, A., 1987, Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes, *Journal of Biological Chemistry,* 262, 8220-8226.

Devasagayam, T.P. and Tarachand, U., 1987, Decreased lipid peroxidation in the rat kidney during gestation, *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 198, 273-80.

Dhillon, S. and Gill, K., 2006, Basic pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics,* 1-44.

Diaz, D., 2006, Mycotoxin contamination in silages, *Western Dairy News,* 6, W175-W176.

Diplock, A., 1998, Healty lifestyles nutrition and physical activity, Antioxidant nutrients, *ILSI Europe concise monograph series*, 59 p, Belgium.

Dufau, M. L.,1998, The luteinizing hormone receptor 1, *Annual Review of Physiology,* 60, 461-496.

EFSA, 2004. Opinion on 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 J. 89 (1–35), www.efsa.europa.eu/en/science/contam/contam opinions/527.html.

EFSA (European Food Safety Authority), 2011, Evaluation of the FoodEx, the food classification system applied to the development of the EFSA Comprehensive European Food Consumption Database. The EFSA Journal, 1970, 27 pp.

Elmore, S., 2007, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicologic pathology,* 35, 495-516.

Engelhardt, G., Barthel, J. and Sparrer, D., 2006, Fusarium mycotoxins and ochratoxin A in cereals and cereal products, *Molecular nutrition & food research*, 50(4-5), 401-405.

Erdoğan, B.B. and Uzaslan, E.K., 2003, Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde Fas-FasL bağımlı apoptozis, *Türkiye Klinikleri Akciğer Arşivi,* 4, 165.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization - World Health Organization), 2000, Zearalenone. Prepared by the Fifty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). In: Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, WHO Food Additives Series 44. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva.

Fawcett, D. W., 1966, The cell: Its organelles and inclusions, *The American Journal of the Medical Sciences*, 252 (4), 499.

Ferrer, E., Juan-García, A., Font, G. and Ruiz, M., 2009, Reactive oxygen species induced by beauvericin, patulin and zearalenone in CHO-K1 cells, *Toxicology in Vitro*, 23, 1504-1509.

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

Fornelli, F., Minervini, F. and Logrıeco, A., 2004, Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9), *Journal of invertebrate pathology*, 85 (2), 74-79.

Gajęcka, M., Rybarczyk, L., Zwierzchowski, W., Jakimiuk, E., Zielonka, Ł., Obremski, K., Gajęcki, M., 2011, The effect of experimental, long-term exposure to low-dose zearalenone mycotoxicosis on the histological condition of ovaries in sexually immature gilts, *Theriogenology*, 75(6), 1085-1094.

Gajecki, M., 2002, Zearalenone--undesirable substances in feed, *Polish journal of veterinary sciences*, 5(2), 117-122.

Gao, F., Jiang, L.P., Chen, M., Geng, C.Y., Yang, G., Ji, F., Zhong, L.F. and Liu, X.F., 2013, Genotoxic effects induced by zearalenone in a human embryonic kidney cell line, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 755 (1), 6-10.

Gartner, L.P. and Hiatt J.L., 2003, *Color Text of Histology*, Second Edition, USA; WB Saunders Company, 496-9, ISBN: 9781451113433.

Gazzah, A.C., Camoin, L., Abid, S., Bouaziz, C., Ladjimi, M. and Bacha, H., 2013, Identification of proteins related to early changes observed in Human hepatocellular carcinoma cells after treatment with the mycotoxin Zearalenone, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65 (6), 809-816.

Gerald, J.P. and Albrecht, E,D., *Steroid endocrinology of pregnancy*, Chapter 38. Glob Libr Women's Med.

Gerschenson, L. and Rotello, R., 1992, Apoptosis: a different type of cell death, *The FASEB journal*, 6, 2450-2455.

Glenn, A.E., 2007, Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed, *Animal feed science and technology*, 137(3), 213-240.

Golstein, P., Ojcius, D.M. and Young, J.D.E., 1991, Cell death mechanisms and the immune system, *Immunological reviews*, 121, 29-65.

Green, D.R., 1998, Apoptotic pathways: the roads to ruin, *Cell*, 94, 695-698.

Gromadzka, K., Waśkiewicz, A., Goliński, P. and Świetlık, J., 2009, Occurrence of estrogenic mycotoxin–zearalenone in aqueous environmental samples with various NOM content, *Water research*, 43, 1051-1059.

Gromadzka, K., Waskiewicz, A., Chelkowski, J. and Golinski, P., 2008, Zearalenone and its metabolites: occurrrence, detection, toxicity and guidelines, *World Mycotoxin Journal*, 1 (2), 209-220.

Grosse, Y., Chekir-Ghedira, L., Huc, A., Obrecht-Pflumio, S., Dirheimer, G., Bacha, H. and Pfohl-Leszkowicz, A., 1997, Retinol, ascorbic acid and α-tocopherol prevent DNA adduct formation in mice treated with the mycotoxins ochratoxin A and zearalenone, *Cancer letters*, 114, 225-229.

Grune, T., 2000, Oxidative stress, aging and the proteasomal system, *Biogerontology*, 1, 31-40.

Grune, T., Reinheckel, T. and Davies, K., 1997, Degradation of oxidized proteins in mammalian cells, *The FASEB journal*, 11, 526-534.

Guimaraes, C.A. and Linden, R., 2004, Programmed cell death; apoptosis and alternative deathstyles, *Eur. J. Biochem*., 271, 1638–1650.

Hall, P.F., 1994, Testicular steroid synthesis: Organization and regulation, The Physiology of Reproduciton, Knobil, E., Neill, J.D. (Eds) Raven Press, New York, 1, 1335- 1362.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1990, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Methods in Enzymology*, 186, 1–85.

Hansson, V., Skålhegg, B.S. and Taskén, K., 2000, Cyclic-AMP-dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 73, 81-92.

Hassan, H.A. and Yousef, M.I., 2009, Mitigating effects of antioxidant properties of black berry juice on sodium fluoride induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2332-2337.

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

Hauet, T., Yao, Z.X., Bose, H.S., Wall, C.T., Han, Z., Li, W., Hales, D.B., Miller, W.L., Culty, M. and Papadopoulos, V., 2005, Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into Leydig cell mitochondria, *Molecular Endocrinology*, 19, 540-554.

Hestbjerg, H., Nielsen, K.F., Thrane, U. and Elmholt, S., 2002, Production of trichothecenes and other secondary metabolites by Fusarium culmorum and Fusarium equiseti on common laboratory media and a soil organic matter agar: an ecological interpretation, *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(26), 7593-7599.

Hıkım, A., Wang, C., Leung, A. and Swerdloff, R., 1995, Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment, *Endocrinology*, 136, 2770-2775.

Holland, M.K. and Storey, B.T., 1981, Oxygen metabolism of mammalian spermatozoa, *Biochemical Journal*, 198, 273-280.

Hu, M.L., 1994, Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma, *Methods in enzymology*, 233, 380-385.

Huang, D. and Strasser, A., 2000, BH3-only proteins—essential initiators of apoptotic cell death, *Cell*, 103, 839-842.

Huges, F. and Cidlowski, J., 1996, The enzymology of apoptosis, *Apoptosis in Normal Development and Cancer. Ed. Mels Sluyser. Taylor & Francis, London*, 21-38.

Hussein, H.S. and Brasel, J.M., 2001, Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals, *Toxicology*, 167, 101-134.

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.

Ilgaz, C., 2009, Genital Sistem Histolojisi Ders Notu. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı.

İşler, O., 2012, *Primer Prostat Kanserine Bağlı Kaspaz -2 Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi.

Jacobson, M.D., 1996, Reactive oxygen species and programmed cell death, *Trends in biochemical sciences*, 21, 83-86.

Jakimiuk, E., Gajęcka, M., Jana, B., Obremski, K. and Gajęcki, M., 2010, Effect of zearalenone on steroid secretion by porcine follicular cells in mono-and coculture, *Bull Vet Inst Pulawy*, 54, 419-423.

Jiang, S., Yang, Z., Yang, W., Gao, J., Liu, F., Broomhead, J. and Chi, F., 2011, Effects of purified zearalenone on growth performance, organ size, serum metabolites, and oxidative stress in postweaning gilts, *Journal of Animal Science*, 89, 3008-3015.

Jimenez, M. and Mateo, R., 1997, Determination of mycotoxins produced by *Fusarium* isolates from banana fruits by capillary gas chromatography and high-

performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 778(1), 363-372.

Juan-Garcia, A., Manyes, L., Ruiz, M.J. and Font, G., 2013, Applications of flow cytometry to toxicological mycotoxin effects in cultured mammalian cells: A review, 50, 40-59.

Junqueira, L.C. and Carneiro, J., 2006, (Çeviri: Aytekin Y, Solakoğlu S), *Temel Histoloji*, Nobel Tıp Kitabevi, 431-47.

Kang, C., Lee, H., Yoo, Y.S., Hah, D.Y., Kim, C.H., Kim, E. and Kim, J.S., 2013, Evaluation of Oxidative DNA Damage Using an Alkaline Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) Comet Assay, and the Protective Effects of N-Acetylcysteine Amide on Zearalenone-induced Cytotoxicity in Chang Liver Cells, *Toxicological Research*, 29, 43-52.

Karube, H., Nishitai, G., Inageda, K., Kurosu, H. and Matsuoka, M., 2009, NaF activates MAPKs and induces apoptosis in odontoblast-like cells, *Journal of Dental Biology*, 88(5), 461-465.

Kaur, C. and Kapoor, H.C., 2001, Antioxidants in fruits and vegetables–the millennium's health, *International Journal of Food Science & Technology*, 36, 703-725.

Kaya, M., Polat, S., Mete, U.Ö. and Tap, Ö., 2006, *Özel Histoloji Ders Notları*,. Adana, ÇÜ Tıp Fak Yayınları.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *British journal of cancer*, 26, 239.

Kerr, J., Harmon, B. and Searle, J., 1974, An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibres, *Journal of Cell Science*, 14, 571-585.

Kim, I.H., Son, H.Y., Cho, S.W., Ha, C.S. and Kang, B.H., 2003, Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats, *Toxicology letters*, 138, 185-192.

Koç, M., İmik, H., Danışman, Y. and Odabaşoğlu, F., Ratlarda indometazin ile oluşturulan gastrik hasar üzerine askorbik asit'in gastroprotektif etkilerinin ve bu etkilerin antioksidan sistem ile ilişkisinin belirlenmesi.

Kouadio, J.H., Dano, S.D., Moukha, S., Mobio, T.A. and Creppy, E.E., 2007, Effects of combinations of *Fusarium* mycotoxins on the inhibition of macromolecular synthesis, malondialdehyde levels, DNA methylation and fragmentation, and viability in Caco-2 cells, *Toxicon*, 49, 306-317.

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

Krammer, P.H., 2000, CD95's deadly mission in the immune system, *Nature,* 407, 789-795.

Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., Macdonald, S. and Crews, C., 2008, Mycotoxin analysis: an update, *Food additives and contaminants,* 25, 152-163.

Krueger, A., Fas, S.C., Baumann, S. and Krammer, P.H., 2003, The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis, *Immunological reviews,* 193, 58-69.

Kuhnel, W., 2003, *Color atlas of cytology, histology and microscopic anatomy*, Thieme, ISBN: 9781588901750.

Kuiper-Goodman, T., Scott, P. and Watanabe, H., 1987, Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory toxicology and pharmacology,* 7, 253-306.

Kuo, C.H., Taub, D., Hoffsommer, R.D. and Wendler, N.L., The resolution of α-zearalenon: determination of the absolute configuration of the natural enantiomorph. Chemical Communicants, 1967 (15), 761-762.

Lam, C.W., 2000, Free Radicals, Nutritional Anti-oxidants and Trace Elements, *Adapted from Dr Mano Arumanayagam's Lecture Notes*.

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

Levine, A.J., Monmand, J. and Finlay, C.A., 1991, Oncogene and cell death, *Nature,* 351, 453-456.

Lin, C.Y., Strom, A., Vega, V.B., Kong, S.L., Yeo, A.L., Thomsen, J.S., Chan, W.C., Doray, B., Bangarusamy, D.K., Ramasamy, A., Vergara, L.A., Tang, S., Chong, A., Bajıc, V.B., Mıller, L.D., Gustaffson, J., Liu, E.T., 2004, Discovery of estrogen receptor α target genes and response elements in breast tumor cells, *Genome biology,* 5(9), R66.

Linton, S., Davies, M.J. and Dean, R.T., 2001, Protein oxidation and ageing. *Experimental gerontology,* 36, 1503-1518.

Lioi, M., Santoro, A., Barbieri, R., Salzano, S. and Ursini, M., 2004, Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* 557, 19-27.

Logrieco, A. and Visconti, A., 2004, *An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe*, Springer, ISBN: 1402026455.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951, Protein measurement with folin phenol reagent, *Journal Of Biological Chemistry,* 193, 265–275.

Lukanowski, A., Lenc, L. and Sadowski, C., 2008, First report on the occurrence of Fusarium langsethiae isolated from wheat kernels in Poland, *Plant Disease,* 92, 488-488.

MacDonald, S.J., Anderson, S., Brereton, P., Wood, R. and Damant, A., 2005, Determination of zearalenone in barley, maize and wheat flour, polenta, and maize-based baby food by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: interlaboratory study, *Journal of AOAC International*, 88(6), 1733-1740.

Marin, S., Ramos, A., Cano-Sancho, G. and Sanchis, V., 2013, Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment, *Food and Chemical Toxicology,* 60, 218-237.

Marsden, V.S. and Strasser, A., 2003, Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more, *Annual review of immunology,* 21, 71-105.

Matsui, H., Morimoto, M., Horimoto, K. and Nishimura, Y., 2007, Some characteristics of fluoride-induced cell death in rat thymocytes: cytotoxicity of sodium fluoride, *Toxicology in Vitro,* 21, 1113-1120.

Mattson, M.P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I. and Rydel, R.E., 1992, beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity, *The journal of neuroscience,* 12, 376-389.

Mayne, S.T., 2003, Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research, *The Journal of nutrition,* 133(3), 933-940.

Mckenzie, S., Baker, M., Buffinton, G. and Doe, W., 1996, Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease, *Journal of Clinical Investigation,* 98**,** 136.

Meng, J., Holdcraft, R.W., Shima, J.E., Griswold, M.D.,and Braun, R.E., 2005, Androgens regulate the permeability of the blood–testis barrier, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(46), 16696-16700.

Mike, N., Papp, G., Čertik, M., Czibulya, Z., Kunsági-Máté, S., Ember, I., Vágvölgyi, C., Pesti, M. and Gazdağ, Z., 2013, Regulation of cytotoxic, non-estrogenic,

oxidative stress-induced processes of zearalenone in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Toxicon*, 73, 130-143.

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

Minervini, F., Giannoccaro, A., Fornelli, F., Dell'aquila, M.E., Minoia, P. and Visconti, A., 2006, Influence of mycotoxin zearalenone and its derivatives (alpha and beta zearalenol) on apoptosis and proliferation of cultured granulosa cells from equine ovaries, *Reprod. Biol. Endocrinol*, 4, 62-75.

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

Murono, E. and Washburn, A., 1990, Regulation of 5α-reductase activity in cultured immature Leydig cells by human chorionic gonadotropin, *Journal of steroid biochemistry*, 35, 715-721.

Naghii, M.R., 2002, Sulfur mustard intoxication, oxidative stress, and antioxidants, *Military medicine*, 167(7), 573-575.

Netter, F.H., Ovalle, W.K. and Nahirney, P.C., 2009, Temel Histoloji. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Çev.), Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri.

Ouanes, Z., Ayed-Boussema, I., Baati, T., Creppy, E. and Bacha, H., 2005, Zearalenone induces chromosome aberrations in mouse bone marrow: preventive effect of 17β-estradiol, progesterone and Vitamin E, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 565, 139-149.

Ouanes-Ben Othmen, Z., Essefı, S. and Bacha, H., 2008, Mutagenic and epigenetic mechanisms of zearalenone: prevention by Vitamin E, *World Mycotoxin Journal*, 1, 369-374.

Öktem, S., Özhan, M.H. and Özol, D., 2001, Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, 2, 91-95.

Özvaran, M.K., 2004, Malign mezotelyomada gen tedavisi, *Toraks Dergisi*, 5 (2), 110-115.

Papadopoulos, V., 2004, In search of the function of the peripheral-type benzodiazepine receptor, *Endocrine research*, 30, 677-684.

Parry, D., Jenkinson, P. and Mcleod, L., 1995, Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant pathology*, 44, 207-238.

Payne, A.H. and Hales, D.B., 2004, Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones, *Endocrine Reviews*, 25, 947-970.

Perkowski, J., Stachowiak, J., Kiecana, I., Golinski, P. and Chelkowski, J., 1997, Natural occurrence of Fusarium mycotoxins in Polish cereals, *Cereal Research Communications*, 25, 379-380.

Pfeiffer, E., Hildebrand, A., Mikula, H. and Metzler, M., 2009, Glucuronidation of zearalenone, zeranol and four metabolites in vitro: Formation of glucuronides by various microsomes and human UDP-glucuronosyltransferase isoforms, *Molecular nutrition & food research*, 54, 1468-1476.

Proctor, R.H., Plattner, R.D., Desjardins, A.E., Busman, M. and Butchko, R.A., 2006, Fumonisin production in the maize pathogen Fusarium verticillioides: genetic basis of naturally occurring chemical variation, *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, 2424-2430.

Prouillac, C., Koraichi, F., Videmann, B., Mazallon, M., Rodriguez, F., Baltas, M. and Lecoeur, S., 2012, In vitro toxicological effects of estrogenic mycotoxins on human placental cells, Structure activity relationships. *Toxicology and applied pharmacology*, 259, 366-375.

Puntarulo, S. and Cederbaum, A.I., 1988, Effects of oxygen concentration on microsomal oxidation of ethanol and generation of oxygen radicals, *Biochemical Journal*, 251, 787-794.

Raghad, D.H., Jalill, A., Shafiq, S.H., Hussein, H.Z., 2013, Comparison the cytotoxicity of aflatoxin B1 and zearalenone in L20B cells, World *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences*. 3 (1), 104-113.

Raff, M.C., 1992, Social controls on cell survival and cell death, *Nature*, 356, 397–400.

Remmen, H.V. and Richardson, A., 2001, Oxidative damage to mitochondria and aging, *Experimental gerontology*, 36(7), 957-968.

Rice, L.G. and Ross, P.F., 1994, Methods for detection and quantitation of fumonisins in corn, cereal products and animal excreta, *Journal of Food Protection*, 57, 536-540.

Rodriguez, S. and Carmen A., 1985, Alfred M. Bongiovanni, and Lillian Conde de Borrego, An epidemic of precocious development in Puerto Rican children, *The Journal of pediatrics*, 107(3), 393-396.

Rucinska, A., Roszczyk, M. and Gabryelak, T., 2008, Cytotoxicity of the isoflavone genistein in NIH 3T3 cells, *Cell biology international*, 32, 1019-1023.

Ruzsas, C., Biro-Gosztonyi, M., Woller, L. and Mess, B., 1979, Effect of the fungal toxin (zearalenone) on the reproductive system and fertility of male and female rats, *Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 30(4), 335-345.

Sahoo, A., Samanta, L. and Chainy, G.B.N., 2000, Mediation of oxidative stress in HCH-induced neurotoxicity in rat, *Archives of environmental contamination and toxicology*, 39(1), 7-12.

Salah-Abbès, J., Abbès, S., Abdel-Wahhab, M.A. and Oueslati, R., 2009, *Raphanus sativus* extract protects against Zearalenone induced reproductive toxicity, oxidative stress and mutagenic alterations in male Balb/c mice, *Toxicon*, 53, 525-533.

Salah-Abbès, J.B., Abbès, S., Abdel-Wahhab, M.A. and Oueslati R., 2010, In-vitro free radical scavenging, antiproliferative and anti-zearalenone cytotoxic effects of 4-(methylthio)-3-butenyl isothiocyanate from Tunisian Raphanus sativus, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62, 231-239.

Sara, C.R., Jacobson, J., Patton, W., King, A. and Chan, P.J., 2003, Dual fluorescence analysis of DNA apoptosis in sperm, *Journal of Obstetrics and Gynecology*, 188, 1156-7.

Sarkar, A., Sengupta, D., Mandal, S., Sen, G., Dutta Chowdhury, K. and Chandra Sadhukhan, G., 2013, Treatment with garlic restores membrane thiol content and ameliorates lead induced early death of erythrocytes in mice, *Environmental toxicology*.

SCF (SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD), 2000, Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins, Part 2: Zearalenone (ZEA), 12pp.

Schollenberger, M., Muller, H.M., Rufle, M., Suchy, S., Plank,S. and Drochner, W., 2006, Natural occurrence of 16 Fusarium toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany, *Mycopathologia*, 161(1), 43-52.

Scudamore, K.A. and Patel, S., 2000, Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom, *Food Additives & Contaminants*, 17(5), 407-416.

Sedlak, J. and Lindsay, R.H., 1968, Estimation of total protein-bound and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman‟s reagent, *Anal, Biochem*., 25, 192- 205.

Shacter, E., 2000, Protein oxidative damage, *Methods in enzymology*, 319, 428-436.

Shan, L. and Hardy, M., 1992, Developmental changes in levels of luteinizing hormone receptor and androgen receptor in rat Leydig cells, *Endocrinology*, 131, 1107-1114.

Shin, B.S., Hong, S.H., Bulitta, J.B., Hwang, S.W., Kim, H.J., Lee, J.B., Yang, S.D., Kim, J.E., Yoon, H.S. and Kim, D.J., 2009, Disposition, oral bioavailability, and tissue distribution of zearalenone in rats at various dose levels, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72, 1406-1411.

Siddighi, S., Patton, W., Jacobson, J., King, A. and Chan, P., 2004, Correlation of sperm parameters with apoptosis assessed by dual fluorescence DNA integrity assay, *Systems Biology in Reproductive Medicine,* 50, 311-314.

Squier, T.C., 2001, Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Experimental gerontology,* 36(9), 1539-1550.

Stec, J., Żmudzki, J., Rachubik, J. and Szczotka, M., 2009, Effects of aflatoxin b, ochratoxin a, patulin, citrinin, and zearalenone on the *in vitro* proliferation of pig blood lymphocytes. *Bull Vet Inst Pulawy,* 53, 129-134.

Stepien, L., 2013, The use of Fusarium secondary metabolite biosynthetic genes in chemotypic and phylogenetic studies, *Critical Reviews in Microbiology,* 1-10.

Stepien´ Ł, Chełkowski J., 2010, Fusarium head blight of wheat: pathogenic species and their mycotoxins, *World Mycotox* J., 3, 107–19.

Stevens, A., and Lowe, J.S., 1997, *Human histology* (pp. 117-258). London: Mosby, ISBN: 9780323036634.

Steyn, P. and Stander, M., 1999, Mycotoxins with special reference to the carcinogenic mycotoxins: aflatoxins, ochratoxins and fumonisins, *General and Applied Toxicology. 2nd Edition. United Kingdom: Macmillan Reference Ltd***,** 2145-76.

Stocco, D., 2000, The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future, *Journal of Endocrinology,* 164, 247-253.

Stocco, D.M. and Clark, B.J., 1996, Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells, *Endocrine Reviews,* 17, 221-244.

Svechnikov, K., Landreh, L., Weısser, J., Izzo, G., Colón, E., Svechnikova, I. and Söder, O., 2010, Origin, development and regulation of human Leydig cells, *Hormone research in paediatrics,* 73(2), 93-101

Tabuc, C., Marin, D., Guerre, P., Sesan, T. and Bailly, J., 2009, Molds and mycotoxin content of cereals in southeastern Romania, *Journal of Food Protection,* 72(3), 662-665.

Thrane, U., Adler, A., Clasen, P.E., Galvano, F., Langseth, W., Lew, H., Logrieco, A., Nielsen, K.F. and Ritieni, A., 2004, Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*, *International Journal of Food Microbiology,* 95, 257-266.

Tiemann, U., Tomek, W., Schnııder, F. and Vanselow, J., 2003, Effects of the mycotoxins α-and β-zearalenol on regulation of progesterone synthesis in cultured granulosa cells from porcine ovaries, *Reproductive Toxicology,* 17, 673-681.

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

Tomatır, A.G., 2003, Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 23, 499.

Tsakmakidis, I.A., Lymberopoulos, A.G., Alexopoulos, C., Boscos, C.M. and Kyriakis, S.C., 2006, *In vitro* effect of zearalenone and α-zearalenol on boar sperm characteristics and acrosome reaction, *Reprod. Dom. Anim.*, 41 394–401.

Tsakmakidis, I.A., Lymberopoulos, A.G., Vainas, E., Boscos, C.M., Kyriakis, S.C. and Alexopoulos, C., 2007, Study on the *in vitro* effect of zearalenone and α-zearalenol on boar sperm-zona pellucida interaction by hemizona assay application, *Journal of Applied Toxicology*, 27, 498-505.

Türk, F.M., Egesel, C.Ö., Gül, M.K. and Mermer, D., 2005, Fusarium türlerinin tahıl ürünlerinde oluşturduğu mikotoksinler, Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi 5-9 Eylül, Derleme Sunusu Cilt I, 447-450. Antalya.

Türk Gıda Kodeksi, 2008, Gıda maddelerindeki bulaşanların maksimum limitleri hakkında tebliğ (tebliğ no:26), *Resmi Gazete*.

Uhlig, S., Torp, M. and Heier, B.T., 2006, Beauvericin and enniatins A, A1, B and B1 in Norwegian grain: a survey, *Food Chemistry*, 94, 193-201.

Ulukaya, E., 2003, *Apoptozis ders notları*, Erisim: http://biyokimya.uludag.edu.tr /apoptozis_ders_notu.pdf.

Urry, W., Wehrmeister, H., Hodge, E. and Hidy, P., 1966, The structure of zearalenone, *Tetrahedron Letters*, 7, 3109-3114.

Vairetti, M., Ferrigno, A., Bertone, R., Richelmi, P., Bertè, F. and Freitas, I., 2005, Apoptosis vs. necrosis: glutathione-mediated cell death during rewarming of rat hepatocytes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1740, 367-374.

Voorhies, W.A.V., 2001, Metabolism and lifespan, *Experimental gerontology*, 36(1), 55-64.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutellingsperger, C., 1995, A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V, *Journal of immunological methods*, 184, 39-51.

Wan, L.Y.M., Turner, P.C. and El-Nezami, H., 2013, Individual and combined cytotoxic effects of Fusarium toxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and fumonisins B1) on swine jejunal epithelial cells, *Food and Chemical Toxicology*. 57, 276-283.

Wang, R.S., Yeh, S., Tzeng, C.R. and Chang, C., 2009, Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice, *Endocrine Reviews*, 30, 119-132.

Watkins, A.M., Chan, P.J., Kalugdan, T.H., Patton, W.C., Jacobson, J.D. and King, A., 1996, Analysis of the flow cytometer stain Hoechst 33342 on human spermatozoa, *Molecular Human Reproduction*, 2, 709-712.

Willingham, M.C., 1999, Cytochemical methods for the detection of apoptosis, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 47, 1101-1109.

Wiśniewska, H., Perkowski, J. and Kaczmarek, Z., 2004, Scab response and deoxynivalenol accumulation in spring wheat kernels of different geographical origins following inoculation with Fusarium culmorum, *Journal of Phytopathology*, 152, 613-621.

Wood, G., 1992, Mycotoxins in foods and feeds in the United States, *Journal of Animal Science*, 70, 3941-3949.

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

Yang, J., Zhang, Y., Wang, Y. and Cui, S., 2007a, Toxic effects of zearalenone and α-zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells, *Toxicology in Vitro*, 21, 558-565.

Yang, J.Y., Wang, G.X., Liu, J.L., Fan, J.J. and Cui, S., 2007b, Toxic effects of zearalenone and its derivates α-zearalenol on male reproductive system in mice, *Reproductive Toxicology*, 24 381-387.

Young, L.G. and King, G.J., 1986, Low concentrations of zearalenone in diets of mature gilts, *Journal of animal science*, 63(4), 1191-1196.

Yu, Z., Zhang, L., Wu, D. and Liu, F., 2005, Anti-apoptotic action of zearalenone in MCF-7 cells, *Ecotoxicology and environmental safety*, 62, 441-446.

Zhang, X. and Kiechle, F.L., 1997, Mechanism of Hoechst 33342-induced apoptosis in BC3H-1 myocytes, *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 27 (4), 260-275.

Zhu, L., Yuan, H., Guo, C., Lu, Y., Deng, S., Yang, Y., Wei, Q., Wen, L. and He, Z., 2012, Zearalenone induces apoptosis and necrosis in porcine granulosa cells via a caspase-3-and caspase-9-dependent mitochondrial signaling pathway. *Journal of cellular physiology*, 227, 1814-1820.

Zinedine, A., Soriano, J.M., Molto, J.C. and Manes, J., 2007, Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin, *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1-18.

Zou, H., Li, Y., Liu, X. and Wang, X., 1999, An APAF-1· cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 11549-11556.

Zourgui, L., Golli, E.E., Bouaziz, C., Bacha, H. and Hassen, W., 2008, Cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes prevent oxidative damage induced by the mycotoxin zearalenone in Balb/C mice, *Food and chemical toxicology*, 46(5), 1817-1824.

Zwierzchowski, W., Obremski, K., Zielonka, Ł., Skorska-Wyszyńska, E., Gajecka, M., Jakimiuk, E., Polak, M., Jana, B., Rybarczyk, L. and Gajecki, M., 2006, The impact of zearalenone on the level of the selected estrogens in blood serum of sexually immature gilts, *Polish journal of veterinary sciences*, 9, 247.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Gülnaz Yıldırım
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	27.12.1988/İstanbul
Telefon	0507 999 68 94
e-mail	gulnazyildirim88@gmail.com

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoloji/Zooloji	2014
Lisans	İ.Ü Fen Fakültesi/Biyoloji	2012
Lise	Davutpaşa Lisesi Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi	2007