

**T-2 TOKSİNİNİN KAN-TESTİS BARIYERİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN SERW3 HÜCRE HATTINDA ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF T-2 TOXIN ON
BLOOD-TESTIS BARRIER IN SERW3 CELL LINE**

ELİF KARACAOĞLU

PROF. DR. GÜLDENİZ SELMANOĞLU
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2015

ELİF KARACAOĞLU'nun hazırladığı “**T-2 Toksininin Kan-Testis Bariyeri Üzerine Etkisinin SerW3 Hücre Hattında Araştırılması**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr.

Başkan

.....

Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU

Danışman

.....

Prof. Dr.

Üye

.....

Prof. Dr.

Üye

.....

Prof. Dr.

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DEĞERLİ EŞİME VE CANIM AİLEME

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

11/06/2015

ELİF KARACAOĞLU

ÖZET

T-2 TOKSİNİNİN KAN-TESTİS BARIYERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN SERW3 HÜCRE HATTINDA ARAŞTIRILMASI

Elif KARACAOĞLU

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU

Haziran 2015, 117 sayfa

Temel besin kaynağı olarak tüketilen tahıllarda çoğalan funguslar tarafından üretilen mikotoksinler insan sağlığını tehdit etmektedirler. *Fusarium* türü funguslar tarafından tahıl ve tahıl ürünlerinde oluşan bir mikotoksin olan T-2 toksini de insan sağlığı için potansiyel tehlike oluşturmaktadır. T-2 toksininin erkek üreme sistemini olumsuz etkilediği ve sperm sayısında azalmaya neden olduğu bilinmekle birlikte toksisite mekanizması bilinmemektedir. Bu çalışmada testiste sperm hücrelerinin gelişimi sırasında germ hücrelerine mekanik olarak destek sağlayan, aynı zamanda kan-testis bariyerinin oluşmasında önemli işlevlere sahip Sertoli hücrelerinde T-2 toksininin potansiyel etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında, sıçan Sertoli hücre hattı olan SerW3 hücreleri 12, 120 ve 1200 ng/ml dozlarında T-2 toksini ile 24 ve 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrasında, SerW3 hücreleri hücre canlılığı testi (MTT), laktat dehidrogenaz (LDH) sitotoksisite testi ve tripan mavisi hücre canlılığı testi ile sitotoksisite açısından değerlendirilmiştir. Sitotoksisite testlerinin yanı sıra, SerW3 hücrelerinde Sertoli hücre bariyerinde yer alan proteinlerden okludin, ZO-1,

N-kaderin ve β -katenin proteinleri hücresel lokalizasyonlarının belirlenmesi amacıyla immünfloresan olarak boyanmış, okludin ve N-kaderin proteinlerinin ifadesinde meydana gelebilecek değişiklikler Western blotlama yöntemi ile gösterilmiştir. Ayrıca Sertoli hücre bariyerinin bütünlüğünün toksin maruziyeti sonrasında değerlendirilmesi için transepitelial elektriksel direnç (TEER) ölçümü yapılmıştır.

Sitotoksisite testlerinden MTT, LDH ve tripan mavisi sonuçlarına göre, T-2 toksini doz ve inkübasyon süresine bağlı olarak SerW3 hücrelerinde sitotoksisite artışına neden olmuştur. 120 ve 1200 ng/ml dozlarında hücreler LDH ve tripan mavisi testine daha çok hassasiyet göstermişlerdir. İmmünfloresan boyama sonuçları T-2 toksininin artan doz ve inkübasyon süresine bağlı olarak okludin, ZO-1, N-kaderin ve β -katenin ifadelerinde azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca toksin ile inkübasyon sonucunda N-kaderinin SerW3 hücrelerinde sitoplazmada konumlandığı gösterilmiştir. Western blotlama sonuçları, okludin ve N-kaderin protein ifadelerinde doza ve inkübasyon süresine bağlı olarak azalma olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda, toksin uygulanan gruplarda TEER değerlerinde meydana gelen azalma immünfloresan boyama ve Western blotlamadan elde edilen sonuçları desteklemektedir.

Bu sonuçlar, T-2 toksininin SerW3 hücrelerinde yüksek dozlarda sitotoksisiteye neden olduğunu, ayrıca Sertoli hücreleri arasında bulunan hücreler arası bağlantı proteinlerinin ifadelerinde değişikliklere neden olarak kan-testis bariyeri geçirgenliğinin olumsuz olarak etkilediğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: SerW3 hücreleri, T-2 toksini, sitotoksisite, kan-testis bariyeri, immünfloresan boyama, Western blotlama, TEER ölçümü.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF T-2 TOXIN ON BLOOD- TESTIS BARRIER IN SERW3 CELL LINE

Elif KARACAOĞLU

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU

June 2015, 117 pages

Mycotoxins which are produced in grains by fungi and consumed as main food source threaten human health. T-2 toxin, which is one of the mycotoxins produced in grain and grain products as a secondary metabolite by *Fusarium* species, has also potential danger for human health. It was known that T-2 toxin caused decreases in sperm count, however toxicity mechanism of it remained unclear. Our aim is to reveal potential effects of T-2 toxin on Sertoli cells which mechanically support germ cells in testis and have also crucial functions in constitution of blood-testis barrier.

Within the scope of this dissertation, SerW3 cells which are Sertoli cell line were exposed to T-2 toxin at 12, 120 and 1200 ng/ml doses for 24 and 48 hours. At the end of the incubation time, several cytotoxicity tests including cell viability (MTT), lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity test and trypan blue dye exclusion assay were performed for evaluating cytotoxicity. In addition to cytotoxicity test, immunostaining of essential proteins for constitution of blood-testis barrier such as occludin, ZO-1, N-cadherin and β -catenin were performed for detecting

immunolocalization in SerW3 cells. Expressions of occludin and N-cadherin were also shown by Western blotting as a result of T-2 toxin exposure. Furthermore, integrity of blood-testis barrier in response to T-2 toxin exposure were interpreted for SerW3 cells by TEER measurement.

According to the Cytotoxicity test results T-2 toxin caused increases in cytotoxicity in a dose and incubation time dependent. SerW3 cells were more sensitive to T-2 toxin according to LDH and trypan blue exclusion tests at the doses of 120 and 1200 ng/ml. Immunofluorescence staining results revealed that T-2 toxin decreased in expression of occludin, ZO-1, N-cadherin and β -catenin in SerW3 cells in a dose and incubation time dependent manner. In response to T-2 toxin, occludin and N-cadherin expression by western blotting were also decreased in SerW3 cells. Additionally, results of TEER measurement decreased in dose and time dependent manner after T-2 toxin exposure and also these results were consistent with immunofluorescence and Western blotting results.

These results pointed out that T-2 toxin caused cytotoxicity at higher doses in SerW3 cells, caused alterations in expression of junctional proteins in Sertoli cell and had adverse affects on blood-testis barrier integrity.

Keywords: SerW3 cells, T-2 toxin, cytotoxicity, blood-testis barrier, immunofluorescence staining, Western blotting, TEER measurement.

TEŞEKKÜR

Doktora sürecinde çalışmalarımın her aşamasında bana destek olan, emek harcayan ve bilgisini paylaşarak her zaman yol gösteren danışman hocam sayın Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU' na çok teşekkür ederim.

Çalışmamın projelendirilmesinden deneysel sürecine kadar her zaman yanımda olarak bilgisini ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli çalışma arkadaşım Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU' na çok teşekkür ederim. Her zaman desteğini gördüğüm ve tez çalışmamın başlangıç aşamasında laboratuvarını açarak yardımlarını esirgemeyen TC Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Şap Enstitüsü Müdürlüğü Hücre Bankası Bölüm Şefi Bil. Uzm. Şükran YILMAZ' a katkılarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca her zaman bana destek ve yardımcı olan Zooloji Anabilim Dalı' nın bütün elemanlarına teşekkür ederim.

Çalışmamızın gerçekleşmesi için finansal destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi' ne (Proje No: 012D08601003, FDK-2015-5978) ve TÜBİTAK Kimya, Biyoloji Araştırma Destek Grubu' na (Proje No: 212T238) katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tüm akademik hayatım boyunca bana güvenip çalışmalarım için beni teşvik eden, beni her zaman anlayışla karşılayan en değerli varlıklarım eşim Dr. Çağaçan KARACAOĞLU' na, anneme, babama ve ağabeyime beni destekledikleri için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mikotoksinler.....	3
2.1.1. T-2 Toksininin Yapısı.....	5
2.1.2. T-2 Toksininin Etki Mekanizması.....	5
2.1.3 T-2 Toksininin Toksisitesi	6
2.2. Kan-Testis Bariyeri	9
2.3. Seminifer Tübüller	11
2.3.1. Sertoli Hücreleri.....	12
2.3.2. Sertoli Hücrelerinin Fonksiyonları.....	13
2.3.3. Sertoli Hücre Bağlantıları	14
2.3.4. Sıkı Bağlantılar	17
2.3.5. Kenetleyici Bağlantılar.....	19
2.4. SerW3 Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri	22
2.5. Hücre Karakterizasyon Testleri.....	25
2.5.1. Sterilite Testleri	25
2.5.2. Üreme Eğrisi	25
2.6. Sitotoksisite Testleri.....	27
2.6.1. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Hücre Canlılık Testi.....	28
2.6.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Sitotoksisite Testi.....	28
2.6.3. Tripan Mavisı Hücre Canlılığı Testi.....	29
2.7. Western Blotlama Yöntemi	29
2.7.1. Örnek Hazırlanması	30

2.7.2.	Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	30
2.7.3.	Jel Elektroforezi.....	30
2.7.4.	Proteinlerin Transfer Edilmesi	31
2.7.5.	Membranın Bloklanması ve Proteinlerin Antikorla İşaretlenmesi.....	31
2.8.	Trans Epitelial Elektriksel Direnç (TEER) Ölçümü	32
3.	MATERYAL VE YÖNTEM	34
3.1.	Hücre Kültürü.....	34
3.2.	SerW3 Hücrelerinin Üreme Karakterinin Belirlenmesi	34
3.3.	Sterilite Testleri.....	34
3.3.1.	Mikoplazma Testi	34
3.4.	T-2 Toksin Stok Çözeltisinin Hazırlanması	35
3.5.	Hücre Canlılık Testi	35
3.6.	Laktat Dehidrogenaz (LDH) Sitotoksosite Testi	35
3.7.	Canlı Hücre Sayımı	36
3.8.	İmmünfloresan Boyama.....	36
3.9.	Western Blotlama	37
3.9.1.	Hücre lizatlarının hazırlanması.....	37
3.9.2.	Total protein miktarının ölçümü	38
3.9.3.	Sodyum dodezil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi	38
3.9.4.	Protein Transferi.....	39
3.9.5.	Okludin ve N-kaderin proteinlerinin tespit edilmesi.....	39
3.10.	Trans Epitelial Elektriksel Direnç Ölçümü.....	40
3.11.	T-2 Toksininin dekontaminasyonu.....	40
3.12.	İstatistiksel Yöntemler	40
4.	SONUÇLAR.....	41
4.1.	Sterilite Testleri.....	41
4.2.	Üreme Eğrisi.....	41
4.3.	Hücre Canlılık Testi Sonuçları	41
4.4.	LDH Sitotoksosite Testi Sonuçları	43
4.5.	Tripan Mavis Hücre Canlılığı Testi Sonuçları.....	44
4.6.	İmmünfloresan Boyama Sonuçları.....	46
4.6.1.	Okludin İmmünfloresan Boyama Sonuçları	46
4.6.2.	ZO-1 İmmünfloresan Boyama Sonuçları	50
4.6.3.	N-Kaderin İmmünfloresan Boyama Sonuçları	55

4.6.4. β -katenin İmmünfloresan Boyama Sonuçları.....	60
4.7. Western Blotlama Sonuçları	65
4.7.1. Okludin Western Blotlama Sonuçları.....	65
4.7.2. N-kaderin Western Blotlama Sonuçları	66
4.8. TEER Ölçüm Sonuçları	67
5. TARTIŞMA.....	69
KAYNAKLAR.....	84
ÖZGEÇMİŞ	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Testiste bulunan hücre bağlantılarının fonksiyonel sınıflandırması ve bağlantı proteinlerinin yapısına katılan proteinler. Altı çizili ve koyu olarak yazılan proteinler testiste pozitif olarak tanımlanmışlardır [6].	16
Çizelge 3.1. İmmunfloresan ve western blotlama yöntemlerinde kullanılan antikorlar	37
Çizelge 3.2. Okludin proteini için hazırlanan RIPA liziz tamponu içeriği (Santa Cruz, sc-24948).....	38
Çizelge 3.3. N-kaderin proteini için hazırlanan RIPA liziz tamponu içeriği (Pierce Biotechnology 89901).....	38
Çizelge 3.4. Okludin proteini için hazırlanan % 12,5 SDS poliakriamid jel içerikleri	39
Çizelge 3.5. N-kaderin proteini için hazırlanan % 8 SDS poliakrilamid jel içerikleri	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. T-2 toksininin kimyasal yapısı [21].	5
Şekil 2.2. Sıkı bağlantı (SB) ve kenetleyici bağlantıların (KB) epitel hücreleri ve yetişkin memeli testisindeki seminifer tübüller arasındaki yerleşimleri A) Epitel hücresi, B)Sıçan Sertoli hücresi [54].	10
Şekil 2.3. Okludin, klaudin ve ZO proteinlerinin KTB'deki yerleşimi [90].	19
Şekil 2.4. Testiste bulunan farklı tipteki bağlantıların yerleşimleri [77].	21
Şekil 2.5. Kültür ortamında üreyen hücrelerin üreme eğrisi [112].	27
Şekil 2.6. MTT sitotoksisite testi çalışma prensibi [120].	28
Şekil 2.7. LDH sitotoksisite testinin çalışma prensibi.	29
Şekil 2.8. Volt-ohm metre ile bariyer bütünlüğü testi (TEER ölçümü)	33
Şekil 4.1. SerW3 hücrelerine ait üreme eğrisi.	41
Şekil 4.2. SerW3 hücrelerinde 24 ve 48 saat T-2 toksini inkübasyon süresi sonrası hücre canlılık yüzde değişim grafiği.	42
Şekil 4.3. SerW3 hücrelerinde 24 ve 48 saat T-2 toksini inkübasyon süresi sonrası sitotoksisite yüzde değişim grafiği.	44
Şekil 4.4. SerW3 hücrelerinde 24 ve 48 saat T-2 toksini inkübasyon süresi sonrası tripan mavisi hücre canlılığı yüzde değişim grafiği.	45
Şekil 4.5. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 24 saat inkübasyon sonrası okludin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol grubu, B. 12 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.	47
Şekil 4.6. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 24 saat inkübasyon sonrası okludin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A.120 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu, B. 1200 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.	48
Şekil 4.7. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 48 saat inkübasyon sonrası okludin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A.Kontrol grubu, B. 12 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.	49

Şekil 4.8. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 24 saat inkübasyon sonrası ZO-1 immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol grubu, B. 12 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.	51
Şekil 4.9. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 24 saat inkübasyon sonrası ZO-1 immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. 12 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu, B. 1200 ng/ml T-2 toksin grubu.....	52
Şekil 4.10. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 48 saat inkübasyon sonrası ZO-1 immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol grubu, B. 12 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.	53
Şekil 4.11. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 48 saat inkübasyon sonrası ZO-1 immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. 120 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu, B. 1200 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.....	54
Şekil 4.12. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 24 saat inkübasyon sonrası N-kaderin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol grubu, B. 12 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.....	56
Şekil 4.13. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 24 saat inkübasyon sonrası N-kaderin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. 120 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu, B. 1200 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.....	57
Şekil 4.14. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 48 saat inkübasyon sonrası N-kaderin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol grubu, B. 12 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.....	58
Şekil 4.15. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 48 saat inkübasyon sonrası N-kaderin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. 120 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.	59
Şekil 4.16. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 24 saat inkübasyon sonrası β -katenin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol grubu, B. 12 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.....	61
Şekil 4.17. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 24 saat inkübasyon sonrası β -katenin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. 120 ng/ml T-2 toksini uygulama grubu, B. 1200 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.....	62

Şekil 4.18 SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 48 saat inkübasyon sonrası β -katenin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol grubu, B. 12 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.	63
Şekil 4.19. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 48 saat inkübasyon sonrası β -katenin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. 120 ng/ml T-2 toksini uygulama grubu.	64
Şekil 4.20. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonrası okludin protein seviyesinin Western blotlama ile gösterilmesi. A. Okludin western blot sonucu 24 saat için; a) Kontrol grubu, b) 12 ng/ml, c) 120 ng/ml, d) 1200 ng/ml, 48 saat için; e) Kontrol grubu, f) 12 ng/ml, g) 120 ng/ml, h) 1200 ng/ml B. β -aktin western blot sonucu.	65
Şekil 4.21. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonrası N-kaderin protein seviyesinin Western blotlama ile gösterilmesi. A. N-kaderin western blot sonucu, 24 saat için; a) Kontrol grubu, b) 12 ng/ml, c) 120 ng/ml, d) 1200 ng/ml, 48 saat için; e) Kontrol grubu, f) 12 ng/ml, g) 120 ng/ml, h) 1200 ng/ml B. β -aktin western blot sonucu.....	66
Şekil 4.22. SerW3 hücrelerine T-2 toksini uygulaması sonrası TEER değişim grafiği	68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

kDa	Kilo Dalton
LD ₅₀	Letal doz 50
°C	Santigrat derece
Ω	Ohm

Kısaltmalar

ATA	Alimentar Toksik Alöki
BSA	Bovine serum albumin, sığır serum albümin
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DAS	Diasetoksirpenol
DMSO	Dimetil sülfoksit
DON	Deoksinivanenol
EDTA	Etilendiaminotetraasetik asit
JEFCA	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü Ortak Uzmanlar Komitesi [Joint of Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Health Organization (WHO)]
KB	Kemer bağlantı
KTB	Kan-testis bariyeri
LDH	Laktat dehidrogenaz
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NIV	Nivalenol
OD	Optik dansite (Absorbans)
PBS	Fosfat tamponu (Phosphate buffered saline)
PVDF	Poliviniliden florid
ROS	Reaktif oksijen türleri (Reaktif oxygen species)
SB	Sıkı bağlantı
SDS	Sodyum dodezil sülfat
SerW3	Sıçan Sertoli hücre hattı

TCT	Trikotesen
TDI	Tolere edilebilir günlük doz (Tolerable daily intake)
TEER	Transepitelyel Elektriksel Direnç
ZEN	Zearalenon
ZO-1	Zonula okludens-1

1. GİRİŞ

Kimyasal maddelerin günlük hayatta çok fazla yaygınlaşmasıyla birlikte, bilim insanları kanser, astım, üreme fonksiyonunun bozulması gibi ciddi sağlık sorunlarıyla toksik kimyasalların bağlantısının araştırılması yönünde çalışmalarını arttırmışlardır. Besin yoluyla ya da diğer yollarla alınan kimyasal maddelerin üreme sistemi üzerinde olumsuz etkiler oluşturabileceği düşünülmektedir. Son yıllarda erkek üreme sistemi ile ilgili bozukluklarda artmış görülmektedir. Bu durumla ilgili olarak infertilitenin dünya çapında 50 ile 80 milyon arasında insanı etkilediği düşünülmektedir. Erkeklerde sperm sayısının azaldığını ve erkek üreme sistemine ait bozukluk oranlarında artış olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır [1-5]. Bölünmekte olan hücrelerin kimyasal maddelere karşı daha hassas olduğu bilinmektedir. Erkek üreme sistemi göz önünde bulundurulduğunda bu konu önem kazanmaktadır. Testiste spermatogenezin gerçekleştiği seminifer tübüllerde bulunan Sertoli hücreleri, dolaşımdan seminifer tübüle su ve suda çözülmüş maddelerin ve immün hücrelerin taşınmasını kontrol ederek kan-testis bariyeri olarak adlandırılan bir bariyer oluşturur. Sertoli hücreleri spermatogenezin devamlılığının sağlanması açısından çok önemlidir [6, 7] ve bu bariyerin bozulması ile spermatogenez olumsuz yönde etkilenir. Toksik bir kimyasala maruziyet sonucunda, Sertoli hücrelerinin fonksiyonunun değişmesi spermatogenezin bozulmasına, germ hücrelerinin kaybına ve dolayısıyla infertiliteye neden olur.

Dünyadaki ekinlerin % 25'inin fungal üreme sonucu enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Ekinlerin funguslar tarafından hasar görmesi ülke ekonomisinde ciddi ekonomik kayıplara sebep olmakla birlikte, ürünlerin fungusların toksik ikincil metabolitleri olan mikotoksinlerle bulaşması da insan sağlığının etkilenmesine yol açmaktadır. İnsanların mikotoksinlere maruziyeti toksinlerle enfekte olmuş bitki kökenli besinlerin tüketilmesi sonucu, mikotoksinlerin ve metabolitlerinin süt, et, yumurta gibi hayvansal ürünlere aktarılmasıyla ya da toksin içeren hava ya da toza maruziyet ile olabilmektedir. Besinler besin zincirinde mikotoksik etkilere sahip *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium* cinsine ait funguslar tarafından enfekte edilebilir. Bu fungusların oluşturdukları en önemli mikotoksinler ise aflatoksinler (*Aspergillus*), okratoksinler (*Aspergillus* ve *Penicillium*), trikotesenler ve fumonisinlerdir (*Fusarium*). Trikotesen mikotoksinlerin moleküler etki mekanizmalarının anlaşılması, insan sağlığı için zararlı etkilerinin tahmin edilmesi

açısından önem taşımaktadır [8]. Dünya Sağlık Örgütü tarafından 1990 yılında yayınlanan bir raporda mikotoksinlerin mısır, buğday ve yulaf gibi temel besin maddelerinde bulunan kaçınılmaz kirleticiler oldukları bildirilmiştir [8]. Bu nedenle temasın kaçınılmaz olduğu mikotoksinlerin infertiliteye yol açabileceği göz ardı edilmemelidir.

Yapılan bu çalışmada, bir trikotesen mikotoksin olan T-2 toksininin sıçan Sertoli hücre hattı olan SerW3 hücrelerinde kan-testis bariyerinin oluşumunda ve hücrelerin birbirleriyle bağlantı kurmasında rol oynayan proteinler üzerindeki olası etkileri araştırılarak toksinin infertilite ile ilişkisinin mekanizmasının açıklanması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinler

Mikotoksinler funguslar tarafından üretilen ve doğal olarak oluşan düşük moleküler ağırlıklı ikincil metabolitlerdir. Bu metabolitlerin fungusların büyümeleri ve hayatta kalmaları ile ilgili fonksiyonlarının olmadığı belirtilmiştir. 300'den fazla sayıda mikotoksin izole edilmiştir ve bu mikotoksinlerden aflatoksinler, okratoksinler, trikotesenler, tremogenik toksinler ve ergot alkaloidlerini de içeren bir kısmı insan ve hayvanlarda olumsuz etkilere neden olduklarından, özellikle ilgi konusu olmuşlardır. Bu toksinlerin oluşumunda çevresel faktörlerin ya da saklama koşullarının rol oynadığı belirtilmektedir [9].

Trikotesenler (TCT); *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Cylindrocarpon* ve *Stachybotrys* cinsleri tarafından üretilirler [10]. *Fusarium* cinsine ait funguslar trikotesenler, T-2 toksini, HT-2 toksini, deoksinivanenol (DON), nivalenol (NIV), zearalenon (ZEN), fumonisinler dahil 25'ten fazla sayıda trikotesen üretmektedirler. Bütün trikotesenler C9 ve C10'da olefinik bağ ve C12 ve C13'te epoksi halkası içerir ve bu nedenle 12, 13-epoksitrikotesenler olarak karakterize edilmektedirler [11]. Ayrıca, A, B, C ve D olarak dört gruba ayrılırlar, T-2 ve HT-2 toksini grup A kategorisine dahil edilmektedir [12].

Trikotesenler ürünlerin depolanması, öğütülmesi hem de işlenmesi sırasında ya da besinlerin pişirilmesi sırasında kararlı kalırlar ve yüksek sıcaklıklarda nitelikleri bozulmaz. Ayrıca nötral ve asidik pH'da stabilitelerini korudukları ve sindirimden sonra midede hidrolize olmadıkları rapor edilmiştir [10]. Bu toksinler havada ve ışıktaki haftalarca stabil kalabilir ve ısıya dayanabilir. Örneğin; T-2 toksininin yok edilebilmesi için 500°F (260 °C) sıcaklık gerekli olduğu rapor edilmiştir [13]. Bu nedenle, işlem görmüş tahıl ürünlerinde (bebek mamaları, paketlenmiş tahıl temelli ürünler vs.) dahi stabilitesini koruyan toksine besin yoluyla maruziyet kaçınılmazdır. T-2 toksin ($C_{24}H_{34}O_9$) trikotesenler grubu mikotoksinlere dahil edilmektedir. Bu grup toksinler yan gruplarına göre çeşitlilik göstermektedir ve T-2, HT-2, NIV, DON, anguidin, diasetioksisipenol, ve krotosinleri içerirler. T-2 toksininin Afganistan'da ve Laos'ta biyolojik/kimyasal savaşta kullanıldığına dair bilgiler de bulunmaktadır [14].

T-2 toksin ve HT-2 toksin genellikle çeşitli tahıl ürünlerinde (buğday, mısır, arpa, yulaf ve çavdar) ve işlem görmüş tahıllarda (malt, bira ve ekmek) bulunan *Fusarium* cinsine ait funguslar (*F. acuminatum*, *F. poae* ve *F. sporotrichioides*) tarafından üretilen mikotoksinlerdir. *Fusarium* türü funguslar büyük olasılıkla kuzeydeki ılıman bölgelerde bulunan en yaygın funguslardır ve ılıman bölge olan Asya, Avrupa ve Amerika'da yaygın olarak üretilen tahıllarda bulunmaktadır [15]. T-2 ve HT-2 toksinleri çoğunlukla funguslar tarafından enfekte olmuş tahıllar üzerinde oluşturulurlar. Bir saprofit olan *F. sporotrichioides* en önemli T-2 toksin üreticisidir ve -2 ile 35°C'de T-2 toksini üretimi en fazladır. Bu funguslar tarladaki tahılları etkiler ve toksin üretiminin serin saklama koşullarında daha da arttığı belirtilmektedir. Bu nedenle doğal zehirlenme serin iklimlerdeki bölgelerde daha sık görülmektedir. *Fusarium* ve *Stachybothrys* çok farklı sıcaklıklarda üremesine rağmen, toksin üretimi (<20°C) soğukta ve nemli koşullarda en fazladır. Trikotesenler bu nedenle soğuk iklimlerde, özellikle tahıl hasatının kış aylarına ertelenmesiyle ya da soğuk koşullarda saklanan enfekte olmuş tahıllarda ortaya çıkmaktadır [10].

T-2 ve HT-2 toksininin günlük alımı Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ortak Uzmanlar Komitesi (Joint of Food and Agriculture Organization of United Nations and World Health Organization, JECFA) tarafından 7,6 ve 8,7 ng/kg olarak tahmin edilmektedir. Buna rağmen, T-2 toksin için geçici maksimum tolere edilebilir günlük doz (TDI) 0,06 µg/kg olarak bildirilmiştir ancak, eldeki mevcut verilerde yetersiz olduğu için bu değer geçici bir değer olarak kabul edilmektedir [14].

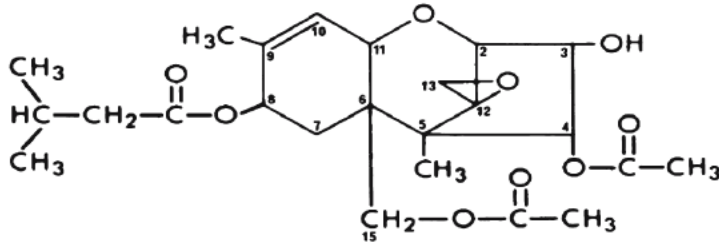
Türkiye'de Karadeniz Bölgesi'nden alınan mısır örneklerinde *Fusarium* toksinlerinin varlığı ve mısır ekmeği yapımı sırasındaki toksinlerin durumuyla ilgili yapılan bir çalışmada, mısırlarda <50 µg/kg miktarında T-2 ve HT-2 toksin tespit edilmiştir [16]. Avrupa Birliği kapsamında T-2 toksini limitleri işlenmemiş tahıllarda 100 µg/kg, işlenmemiş yulaf 500 µg/kg, yulaf ürünlerinde 200 µg/kg ve tahıl temelli yenidoğan ve bebek mamalarında 50 µg/kg olarak önerilmektedir [17].

Hayvanların T-2 toksinine maruz kalmalarının, kilo kaybı, mide bulantısı, kusma, farinkste tahriş, abdominal ağrı ve şişme, diyare, kanlı gaita, baş dönmesi, titreme, inflamasyon, kemik iliğinin yıkımı, infertilite ve lipid peroksidasyonu ile sonuçlanabildiği rapor edilmiştir [15, 18, 19]. Diyetle veya diyet dışı yollarla alınan

trikotesenlerin insan sağlığı üzerindeki etkilerinin anlaşılması için başka çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu bildirilmiştir [20].

2.1.1. T-2 Toksininin Yapısı

T-2 toksini [3 α -hidroksi-4,15-diasetoksi-8 α -(3-metilbutiriloksi)-12,13-epoksitrikotek-9-en] trikotesen ailesinin bir üyesidir. Bu ailede bulunan diğer toksinler diasetoksirpenol (DAS), DON ya da vomitoksin ve NIV'dır. Bu toksinler C-9 ve C10'da çift bağ ve epoksi haklasının C-12 ve C13 karbonunda seskuiterpen halkasının varlığı ile karakterize edilirler (Şekil 2.1) [9]. Fakat bu toksinler 3., 4., 7., 8. ve 15. karbonlarında farklı bileşenler içermektedirler. Bu toksinler arasında T-2 toksini ve DAS en kuvvetli toksinlerdir ve polar çözücülerde çözündükleri bilinmektedir [9, 19].



Şekil 2.1. T-2 toksininin kimyasal yapısı [21].

2.1.2. T-2 Toksininin Etki Mekanizması

T-2 toksininin sitotoksitesi doğrudan ya da dolaylı olarak protein, RNA ve DNA sentezinin inhibisyon potansiyeline sahip olması ile lenfoid, hematopoietik dokularda ve gastrointestinal sistemdeki lezyonlara neden olan hücresel DNA'nın kırılmasına dayandırılmaktadır [22]. Bu etkinin büyük olasılıkla 12 ve 13-epoksitrikotesen yapısıyla bağlantılı olduğu düşünölmektedir. Ökaryotik hücrelerde T-2 toksini ribozomların aktif bölgesi olan peptidil transferazla etkileşime girer ve protein sentezinin başlaması, proteinlerin uzaması ve sonlanmasını inhibe eder [23]. Polizomal yıkımdan elde edilen verilerden, trikotesenler Tip I protein sentezinin başlangıç aşamasında inhibisyonu (T tip) ve Tip II amino asitlerin uzama aşamasında inhibisyon (ET tip) olarak sınıflandırılmıştır [24]. Ayrıca, T-2 toksininin ribozoma bağlanması ribozomda konformasyonel değişikliklere yol açtığı ve degradasyona hassasiyeti arttırabileceği rapor edilmiştir [11]. T-2 toksininin protein sentezini inhibe etmesinin dolaylı yoldan DNA sentezini de inhibe edebileceği öne sürölmüştür [25]. Bu sonuçlar T-2 toksininin hücre bölünmesini

inhibe ederek sitotoksositeye neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca T-2 toksininin yüksek dozlarda sitoplazmik protein sentezini inhibe ettiği ve 70S ribozoma bağlanarak mitokondriyal proteinlerin sentezini inhibe ettiği bildirilmiştir [26].

T-2 toksininin olası etki mekanizmaları arasında hücre içi iletişimin değişmesi ve kalsiyum metabolizmasının bozulması olabileceği de rapor edilmiştir [27, 28]. T-2 toksininin hücre zarı bileşenlerinden lipid ve proteinlerle etkileşime girdiği, bunun sonucu olarak zar taşınmasını ve hücrenin fonksiyonlarının değişmesine neden olabilen zar akışkanlığını değiştirdiği gösterilmiştir [29, 30].

T-2 toksininin süksinat dehidrogenaz aktivitesini baskılayarak mitokondriyal elektron taşınmasını inhibe ettiği gösterilmiştir [31]. Sıçan karaciğerinde lipid peroksidasyona neden olan serbest radikallerin oluşumuna neden olduğu ya da lenfoid dokularda ve organlarda apoptozu indüklediği gösterilmiştir [30, 32].

2.1.3 T-2 Toksininin Toksisitesi

Mikotoksikoz ile ilgili tanımlanmış ilk vaka 1960 yılında rapor edilmiş ve mikotoksinlerin çok sayıda hastalıktan sorumlu olduğu belirtilmiştir. T-2 toksininin ZEN ile birlikte Etrüsk uygarlığının çöküşüne neden olduğuna inanılmaktadır [25, 28]. Ayrıca son iki yüzyılda gerçekleşen eski Mısır mezarlarının okratoksin A içerdiği ve bu mikotoksinlerin de bazı arkeologların gizemli ölümlerinden sorumlu oldukları düşünülmektedir [33]. T-2 toksininin dünya çapında çeşitli mikotoksikoz salgınlarından sorumlu olduğuna inanılmaktadır. 1919 ile 1947 yılları arasında Sovyetler Birliği'nde binlerce kişinin ölümüyle sonuçlanan bir hastalık olan Alimantar Toksik Alökia (ATA)' ya neden olan ajanın T-2 toksin olduğu düşünülmektedir [34]. Sibiryaya sınırına yakın bir yerde bulunan Orenburg'taki salgında, sınırdaki popülasyonun % 10'u zamanında hasat edilmeyen ve küf oluşumuna dolayısıyla T-2 toksini ve diğer trikotesenlerin oluşumuna olanak verecek şekilde uzun süre üzerine yağmur yağın tahılların tüketilmesi sonucu etkilenmiştir [34]. Başlıca ciddi belirtiler arasında, immün hücrelerin azalmasına bağlı olarak lökopeni, kemik iliği aplazisi, inflamatuvar lezyonlar ve sindirim sisteminde hemoraji görülmüştür [35]. Oral kavitede, özefagus ve midede nekrotik lezyonlar rapor edilmiştir. 1946 ve 1963 yılları arasında Japonya ve Kore'de T-2 toksini kaynaklı kabuklu tahıl zehirlenmesi olarak adlandırılan bir hastalık, hem insanları hem de hayvanları etkilemiştir. Fakat ölümcül vakalar rapor edilmemiştir [36]. Benzer bir vaka 1987 yılında Kaşmir'de küflü unla yapılan ekmeğin

tüketilmesiyle ortaya çıkmıştır. 97 kişide abdominal ağrı, boğazda tahriş, diyare, kanlı gaita veya kusma gözlenmiştir. Küflü unda 0,55 ve 0,8 mg/kg arasında T-2 toksini tespit edilmiştir [30, 36].

T-2 toksini insanlarda, diğer memelilerde (evcil hayvanlarda ve deney hayvanlarında), kuşlarda, omurgasızlarda, bitkilerde ve ökaryotik hücreler üzerinde toksik etkiler göstermektedir. T-2 toksin zehirlenmesinde erken belirtiler ve semptomlar doza ve alım yoluna göre değişiklik gösterebilmektedir. T-2 toksini birçok hayvan türünde ağız yoluyla alındıktan sonra hızlı bir şekilde absorbe edilir ve organizmada herhangi bir organda birikim yapmaz. Sıçanlarda maksimum plazma konsantrasyonu 30 dk sonra görülmüştür. Domuzlara intravenöz yolla radyoaktif işaretli T-2 toksini verildikten 4 saat sonra radyoaktivitenin % 15-24'ü sindirim sisteminde ve % 4,7-5,2 diğer dokularda, büyük oranda kas ve karaciğerde saptanmıştır. Plazma yarılanma ömrü 20 dakikadan azdır [21].

Ortanca letal doz (LD₅₀) değeri hayvan türlerine, maruz kalma yoluna ve hayvanların hassasiyetine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Örnek olarak; T-2 toksini farelere solunum yoluyla verildiğinde toksinin etkisinin sistemik uygulamadan en az 10 kat ve topikal uygulamaya göre ise 20 kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir [37].

T-2 toksini funguslar tarafından üretilen en güçlü toksinlerden biri olarak bilinmektedir. Örneğin; çok yaygın olarak çalışılan ve geniş bir alanda dağılım gösteren DON'a göre 421 kat daha toksik olduğu bilinmektedir [32]. İmmün sistemin baskılanması, sitotoksisite, teratojenik etkiler ve embriyotoksik etkilere, sindirim sistemi ve sinir sistemi üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [21].

T-2 toksininin toksik etkilerini gösteren *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Çeşitli primer hücreler ve hücre hatları üzerinde farklı etkilerini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. T-2 toksininin 10 nM'dan daha yüksek dozlarında insan monositik lösemi hücre hattı olan U937 hücrelerinde kaspaz-2, -3, -8 ve -9 aktivasyonuna neden olarak apoptozun indüklediği gösterilmiştir [38]. Toksinin 0,02 ng/ml dozunda gerbil testiküler interstisyel hücrelerinde *in vitro* koşullarda testosteron salgılanmasının inhibe edildiği rapor edilmiştir [39]. Domuz granulosa hücrelerinde steroid üretimini ve proliferasyonu etkilediği belirtilmiştir [40]. Ayrıca, granulosa

hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROS) aracılı mitokondriyal yol aracılığıyla apoptotik sinyal yolağını indüklediği bildirilmiştir [41]. HeLa hücrelerinde sitotoksositeye neden olduğu ve kaspaz ve mitokondri bağımlı apoptoza neden olan DNA hasarını indüklediği gösterilmiştir [42, 43]. Bunların yanı sıra, T-2 toksininin sitotoksitesi melanoma hücre hattında, keratinositlerde, HepG2 karaciğer hücre hattında, renal karsinoma hücre hattı olan NHEK hücrelerinde ve fibroblast hücrelerinde çalışılmış ve hücrelerin T-2 toksinine hassasiyetleri belirtilmiştir [44]. Toksinin HepG2 hücrelerinde apoptoza neden olduğu ve apoptotik sürecin p53 geninden bağımsız olduğu gösterilmiştir [45]. Gelişen fare fetüslerinde T-2 toksininin apoptozu indüklediği ve T-2 toksininin plasentadan kolayca geçerek doğrudan fetüsleri etkilediği rapor edilmiştir [46]. Çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, T-2 toksininin farklı hücrelerde farklı etkiler gösterdiği anlaşılmaktadır. Sertoli hücrelerinde T-2 toksininin etkilerini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

Trikotesenlerin oral, parental, dermal ya da solunum yoluyla maruziyeti çok çeşitli olumsuz etkilere neden olmaktadır. Kilo kaybı, beslenmeyi reddetme, dermatit, kusma, diyare, hemoraji, mide ve bağırsak epitelinde, kemik iliği, dalak, testis ve ovaryumda nekroz spesifik olmayan etkilere [21].

T-2 toksinine kronik maruziyet insanlarda ATA ve evcil hayvanlarda mikotoksikoza neden olmaktadır. Rusya'da II. Dünya Savaşı öncesinde ve savaş süresince çiftçilerin trikotesen mikotoksinlerle enfekte olmuş tahılları tüketmesiyle ATA ortaya çıkmıştır [13]. Trikotesenlerin kronik toksisitesi gastrointestinal sistem mukozasının inflamasyonu, kusma, diyare, karın ağrısı, tükrük salgısında artış, baş ağrısı, baş dönmesi, zayıflık, yorgunluk, ikincil enfeksiyonların oluşumu ve pnömoni ile karakterize edilir [21].

T-2 toksini çeşitli organ sistemleri üzerinde istenmeyen etkilere neden olmaktadır. *In vitro* koşullarda memelilerden sıçan, fare ve insan kan hücrelerinde sitotoksositeye neden olduğu ve *in vivo* koşullarda oral maruziyet sonucunda bazı kan değerlerinin düştüğü belirtilmiştir [36, 47]. Trikotesenlerin lökositler ve diğer hızlı bölünen hücreler üzerinde oldukça toksik olduğu bildirilmiştir [48]. Karaciğerin T-2 toksininin ilk hedeflerinden biri olduğu, protein sentezinin inhibe olmasıyla toksik maddelerin metabolizasyonu için gerekli olan enzim aktivitelerinin azaldığı,

lipid peroksidasyonunu indüklediği ve glutatyon redüktaz aktivitesini arttırdığı rapor edilmiştir [49].

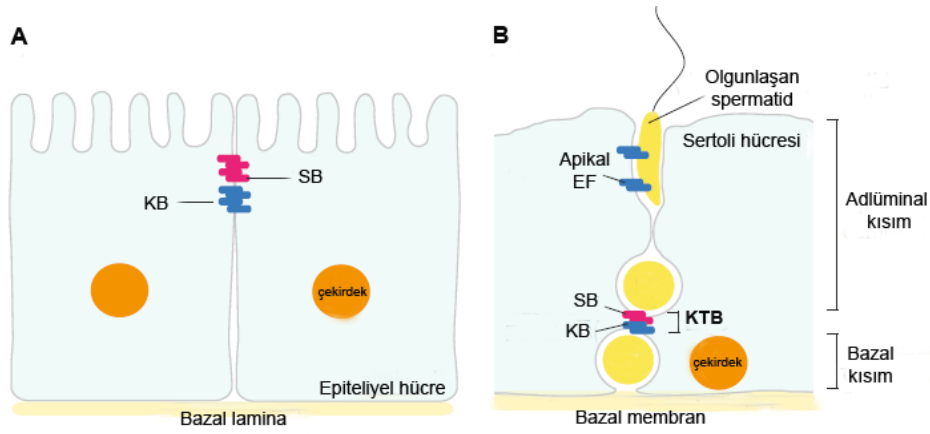
Toksinin sinir sistemi üzerinde de olumsuz etkiler gösterdiğini belirten çalışmalar bulunmaktadır. Sıçanların diyet ile 2-21 mg/kg/vücut ağırlığı dozlarında T-2 toksini maruziyeti sonucu beyinlerindeki nörotransmitter madde seviyelerinde değişimler görüldüğü rapor edilmiştir [50]. Ravindran ve arkadaşları, T-2 toksininin kan-beyin bariyeri geçirgenliğini oksidatif stres, MMP-9 aktivasyonu ve beyindeki sitokinler aracılığıyla değiştirdiğini rapor etmişlerdir [51].

Toksinin üreme sistemi üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Erkek farelere 7 gün boyunca intraperitoneal yolla 5, 10 ve 15 mg/kg vücut ağırlığı dozlarında uygulanan T-2 toksini farelerin semen kalitesini, fertilitelerini ve serum testosteron konsantrasyonlarını doz artışına bağlı olarak olumsuz yönde etkilemiştir. Canlı sperm sayısında azalma olduğu kaydedilmiştir [52]. T-2 toksininin spermatogenez ve sperm kalitesi üzerindeki etki mekanizmasının açıklanması için çalışmaların yapılması gerektiği rapor edilmiştir [52].

2.2. Kan-Testis Bariyeri

Kan-doku bariyerleri vücuttaki otoimmünojenik ya da yabancı antijenlerin zararlı immün cevapları indüklemeden tolere edilmesini sağlamaktadır. Bu bariyerlere örnek olarak, kan-beyin bariyeri, kan-oküler bariyeri, kan-timus bariyeri, gastrointestinal bariyer, kan-testis ve kan-epididimis bariyeri verilebilir [53].

Testisin immünolojik olarak ayrıcalıklı olmasının nedeninin, olgunlaşan germ hücrelerini korumak olduğu düşünülmektedir. Çünkü olgunlaşan germ hücreleri yeni oluşan yüzey antijenlerine sahiptir ve bu hücreler immün sistem tarafından saptandıkları takdirde immün sistem tarafından yok edilebilirler. Kan-testis bariyeri (KTB) seminifer tübüllerde immünolojik olarak ayrıcalıklı bir ortamın oluşmasına katkıda bulunur. Bu bariyeri yalnızca epiteliyel sıkı bağlantı komplekslerinin oluşturduğu bilinmektedir. Epididimis gibi testiküler olmayan kutuplaşmış epitel hücrelerinde sıkı bağlantılar apikal yüzeye yakın plazmalemma kısmında çevresel bir kuşak şeklinde oluşurlar. Fakat sıkı bağlantılar seminifer tübül epitelinde Sertoli hücreleri arasında bazal membrana yakın çevresel bir kuşak şeklinde oluşmaktadır (Şekil 2.2) [54].



Şekil 2.2. Sıkı bağlantı (SB) ve kenetleyici bağlantıların (KB) epitel hücreleri ve yetişkin memeli testisindeki seminifer tübülleri arasındaki yerleşimleri A) Epitel hücresi, B) Sıçan Sertoli hücresi [54].

Sertoli hücreleri daha önceden bilinmesine rağmen, erkek üreme sistemindeki fizyolojik bariyerden ilk olarak Setchell ve arkadaşları tarafından 1969 yılında sözü edilmiştir [51] ve bu çalışmada kan kaynaklı moleküllerin seminifer tübüle ve lümenine geçemeyeceği gösterilmiştir. KTB ilk olarak son yüzyılda yapılan öncül çalışmalarla tanımlanmıştır. Bu çalışmalarda bariyerin varlığı testise enjekte edilen boyaların seminifer tübülleri içerisinde görülmemesiyle tespit edilmiştir [53]. Sıkı bağlantılar daha önceden bilinmesine rağmen, Dym ve Fawcett (1970) Sertoli hücrelerindeki bağlantı komplekslerinin geçirgen olmadığını göstermişlerdir [55].

Elektron mikroskopu kullanılarak elde edilen veriler, komşu Sertoli hücreleri arasındaki yoğun sıkı bağlantı komplekslerinin, KTB'nin morfolojik temelini oluşturduğunu göstermiştir [55-58]. Ayrıca, seminifer tübüle giriş için ilk bariyerin peritübüler miyoid hücreleri tarafından oluşturulduğu gösterilmiştir [59]. Peritübüler hücrelerin oluşturduğu ilk bariyer bozulduğunda, seminifer epitelde özelleşmiş Sertoli-Sertoli hücre bağlantılarının oluşturduğu ikincil bir bariyer, maddelerin testiküler sıvıya geçişini sağlar. Bu nedenle, kan ile seminifer tübül arasında bir bariyer söz konusu değildir. Kan-testis bariyeri terimi kolay akılda kaldığı için uzun yıllardan beri sıklıkla kullanılmaktadır. Fakat kan-beyin bariyeri terimi ile karıştırılabildiğinden "erkek germ hücresi bariyeri" ya da "erkek germ hücre koruyucu bariyeri" terimlerinin kullanılması önerilmiştir [60].

KTB oluşumundan sorumlu olan hücre Sertoli hücresi olduğu için “Sertoli hücre bariyeri” teriminin kullanılması da önerilmiştir [61]. Sertoli hücreleri seminifer tübülde iki adet kalıcı (bazal ve adlüminal) ve bir adet kısa süreli (orta) bölge oluştururlar. Bazal kısımdaki hücreler spermatogonyumları ve genç spermatozoidlerden mayozun erken leptoten fazındaki spermatozoidlere kadar olan hücreleri içermektedir ve yalnızca bu hücreler kan-kaynaklı maddelerle doğrudan temas halindedirler [55, 62]. Sertoli hücrelerinin arasında bazolateral yüzeylerinde bulunan sıkı bağlantılar, bazal kısım ile adlüminal kısım arasında bir sınır oluştururlar. Sertoli hücreleri de leptoten aşamasındaki germ hücrelerinin bazal kısımdan adlüminal kısma geçişine bariyer bozulmadan (kısa süreli bölge sayesinde) olanak sağlarlar [63]. Daha sonra, KTB'nin yalnızca sıkı bağlantılardan oluşmadığı, aynı zamanda testiste bulunan atipik bir kenetleyici bağlantı şekli bazal ektositoplazmik farklılaşmalar olarak adlandırılan bağlantıların da bariyer yapısına katıldığı gösterilmiştir [54].

Toksik maddeleri de içeren çeşitli maddelerin adlüminal kısımdaki germ hücrelerini doğrudan etkileyebilmeleri için bariyeri bozmaları ya da Sertoli hücrelerinin içinden geçmeleri gerekmektedir. Fakat Sertoli hücrelerinin seminifer tübülü bölümlere ayırmasının dışında, Sertoli hücreleri fonksiyonel immünolojik bariyer oluşumuna da katkıda bulunurlar. Daha geniş anlamda, KTB üç fonksiyonel öge olarak ele alınmaktadır [64].

- 1) Devamlı kapillerleri, seminifer tübül içinde bulunan birbirlerine sıkı bağlantılar ile bağlanan Sertoli hücreleri ve seminifer tübül çevresinde bulunan peritübüler miyoid hücre tabakası,
- 2) Lüminal kapiller endotelinde ve peritübüler miyoid hücrelerinin üzerinde bulunan P-glikoprotein içeren efflux-pompası bariyeri ve Sertoli hücreleri üzerinde bazolateral olarak yerleşim gösteren protein (multidrug-resistance associated protein 1),
- 3) Sertoli hücre bariyeri ve immünomodülatör faktörlerden oluşan immünolojik bariyer.

2.3. Seminifer Tübüller

Testis günlük olarak milyonlarca germ hücresinin üretildiği bir organdır. İnsanlarda yaklaşık 150×10^6 spermin günlük olarak üretildiği bilinmektedir. Memelilerde

spermatogenez testiste bulunan seminifer tübüllerde gerekleŒir. Spermatogenez boyunca, seminifer tübülde, tek bir tip A1 spermatogonyum (2n, diploid) bölünür ve 256 adet olgun spermatide (1n, haploid) farklılaŒır. Buna rağmen spermatogenez çoğunlukla hipofiz bezinden salgılanan FSH; LH ve intersitisyumda Leydig hücrelerinde üretilen testosteron ile düzenlenmektedir [65].

2.3.1. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri seminifer tübüllerde bazalden apikale doğru uzanan, spermatogenez boyunca geliŒen germ hücreleri ile doğrudan etkileŒimde olan somatik hücrelerdir.

1800'l  yılların sonunda keŒfedildiėinden beri, seminifer epitel döngüsünün 14 basamağı boyunca germ hücreleriyle üç boyutlu olarak bağ kurmasından dolayı sürekli deėiŒen Sertoli hücreleri ile morfolojik olarak alıŒmakta zorlanılmıŒtır. Sertoli hücreleri halen seminifer tübülde en çok alıŒılan hücrelerden biri olmaya devam etmektedir. Düzensiz bir Œekli olan silindirik hücreler bazalden adlüminal kısma kadar uzanırlar ve ergin sıçanlarda seminifer epitelin % 17-19'u kadar yer kapladıkları bilinmektedir [66]. Bu hücreler testiste h crediŒi maddenin deėiŒmiŒ hali olan bazal membran ile doğrudan bağlantı halindedir. Hücreler birçok geliŒen germ hücresinin, tutunabilmesine imkan sağlayacak geniŒ bir yüzey alanına sahiptir, ki ergin sıçan testisinde yaklaŒık sertoli: germ hücresi oranı 1:50'dir [67]. Bu nedenle, Sertoli hücreleri yalnızca spermatogenez için değil, aynı zamanda germ hücrelerinin seminifer tübüller içindeki hareketi için de önem taŒımaktadır [68].

Sertoli hücrelerinin morfolojik açıdan tip A Sertoli hücreleri ve tip B Sertoli hücreleri olmak üzere iki farklı tipi bulunmaktadır. Tübül lümenine verilmeye hazır olan olgun spermatidler tip A Sertoli hücrelerinin sitoplazmik kriptaları arasında bulunurken, tip B Sertoli hücrelerinin sitoplazmik kriptaları çok nadiren görünür haldedir ya da bu hücrelerde hiç kriptaları bulunmaz. Bu nedenle, seminifer epitel döngüsünün 14 basamağı süresince, tip A hücreleri kendilerini germ hücresi geliŒimi ve hücrelerin hareketi sırasındaki hücresel deėiŒikliklere adapte olmak için tip B Sertoli hücrelerine d n Œt rmeleri gerekmektedir.

Memeli Sertoli hücrelerinin seksüel olarak olgunlaŒmamıŒ testiste mitoz bölünme ile çoğaldığı d Œ n lmektedir. Sertoli hücrelerinin sayısının testisin toksik

maddelerle maruziyeti ya da artan yaşla birlikte azalabileceği gösterilmiştir [65]. *In vitro* koşullarda olgunlaşmamış Sertoli hücrelerinin sınırlı bir süre zarfında bölünebileceği gösterilmiştir [69, 70].

Sertoli hücrelerinin morfolojik görüntüsü doğum ile erişkin dönemde değişiklik göstermektedir [69]. Sertoli hücrelerinin arasındaki bağlantı komplekslerinin kurulmasıyla, kan-testis bariyerinin oluşumu seminifer tübüllerde bazale yakın kısımda gerçekleşir ve bu Sertoli hücrelerinin kademeli olarak erişkinlik dönemine girdiğinin işaretidir. Bu bağlantıların gelişimiyle birlikte tübüllerde lümen oluşur ve Sertoli hücreleri tipik olarak erişkin hücre karakteristiği gösterirler: hacimli bir sitoplazma, sitoplazmik bileşenlerin kutuplaşmış olarak dağılması, organeller ve inklüzyonlar bazalde daha fazla ve apikal kısımda daha azken mitokondri ve düz endoplazmik retikulum apikalde bulunur [69].

2.3.2. Sertoli Hücrelerinin Fonksiyonları

Sertoli hücreleri önemli fonksiyonlara sahiptir; seminifer tübül epiteline yapısal destek sağlama, germ hücrelerinin yer değiştirmesi ve spermlerin lümenine salınması, kan-testis bariyerinin oluşumu, çeşitli ürünlerin salgılanması ve germ hücrelerinin beslenmesi, dejenere olan germ hücrelerinin ve olgunlaşan spermatidlerdeki fazla sitoplazmanın fagositozundan sorumludur.

Seminifer epitele destek sağlama, germ hücrelerinin yer değiştirmesi ve spermlerin lümenine salınması: Sertoli hücreleri, tübüllerdeki farklı gelişim aşamalarındaki germ hücreleri ile bağlantılar kurarak destek işlevini gerçekleştirir. Hücre iskeleti bu fonksiyon için yapısal destek sağlamaktadır. Ayrıca Sertoli hücre iskeletinin epitelde bulunan spermlerin tübül lümenine salınmasından sorumlu olduğu gösterilmiştir [71].

Kan-testis bariyeri: Bütün omurgalı hayvanlarda Sertoli hücreleri arasında özelleşmiş bağlantı kompleksleri kan-testis bariyerini oluştururlar [69].

Salgılama fonksiyonu: Sertoli hücrelerinden büyüme faktörleri, hormonlar ve çeşitli düzenleyici faktörler salgılanmaktadır [69]. Bu hücreler gelişmekte olan germ hücrelerinin mikroçevresini oluştururlar ve doğrudan erkek üreme sistemi endokrinolojisini düzenlerler. Sertoli hücrelerinin salgı ürünleri, germ hücrelerine besin desteği sağlayan taşıyıcı proteinleri, ekstraselüler matriks ve uygun hücre-hücre etkileşimlerini oluşturan hücre adezyon moleküllerini ve spermatogenez

sırasında dokunun yeniden şeklinin kazanılabilmesi için proteazları içermektedir [72, 73].

Büyüme Faktörleri: Testis gelişimi ve spermatogenezin devamlılık göstermesi belirli bir büyüme düzenlenmesine gereksinim göstermektedir. Embriyonik testis gelişiminde ve erken postnatal dönemde bütün hücre popülasyonları proliferasyon göstermektedir. Sertoli hücreleri spermatogenez başladığında erken pubertal dönem boyunca farklılaşır ve postmitotik olurlar [74]. Testisteki diğer somatik hücreler erişkin dönemde yavaş fakat sürekli bir büyüme hızına sahiptir. Spermatojenik hücrelerin ergenlik döneminin başında başlayan ve tüm erişkin dönemi boyunca devam eden hızlı mitoz ve mayoz bölünmelere gereksinimleri vardır. Spermatojenik hücre proliferasyonu dalgası Sertoli hücrelerinin kontrolü altındadır. Sertoli hücreleri tarafından salgılanan büyüme faktörleri gelişen ve erişkin testisinde hücre büyüme düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir.

Hormonlar: Sertoli hücreleri hormonlara cevap veren (FSH ve androjenlere) ve hormon üreten endokrin hücrelerdir. Bu hücrelerden salgılanan büyüme faktörleri kadar hormonların da düzenleyici fonksiyonları bulunmaktadır. Sertoli hücrelerinin salgıladığı hormonlar, inhibin/aktivin, müller inhibe edici faktör ve östrojendir.

Diğer düzenleyici faktörler: Karakterize edilmemiş faktörler ve lipidlerdir. Çeşitli düzenleyici faktörlerin Sertoli hücrelerinin diğer hücre tipleriyle etkileşiminde özgül roller oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca, protein düzenleyici ajanlara ek olarak lipidlerin de biyolojik aktivitelere sahip oldukları gösterilmiştir. Bu lipidlerin testis fonksiyonu ve spermatogenezde önemli düzenleyiciler olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [73, 75].

2.3.3. Sertoli Hücre Bağlantıları

1970 ve 1980'li yıllarda yapılan morfolojik çalışmalarda hücrelerde çok fazla sayıda bağlantı tipi tanımlanmıştır. Testiste bulunan bağlantı tipleri, kaynaştırıcı bağlantı (occluding junction), kenetleyici bağlantı (anchoring junction) ve hücrelerin iletişim kurmasını sağlayan delik geçit (gap junction) bölgeleridir. Kenetleyici bağlantıların diğer yapısal değişimleri olan ektositooplazmik farklılaşmalar ve tubulobulbar kompleksler testise özgü olup bağlantı bölgeleri olarak aktin filamentlerini kullanırlar. Genelde, bu bağlantıların farklı epitellerdeki yerleşimleri aynıdır, sıkı bağlantılar hücrenin en apikalinde yer alır ve apikalden bazale doğru

inildikçe hücrelerin yanal yüzeylerinde kemer bağlantılar ve bunlara paralel dizide yer alan desmozomlar yer alır. Bu yapıların hepsi bağlantı kompleksini oluşturur. Bununla birlikte, delik geçit bölgeleri ve desmozomlar, sıkı bağlantı ve kemer bağlantılar gibi sıkı sıkıya bütünleşik değildirler ve epitel hücrelerini ekstraselüler matrikse bağladıkları için epitel çevresinde dağılmış durumda olabilirler. Sıkı bağlantılar ekstraselüler matriksten oldukça uzaktır. Fakat testiste, sıkı bağlantıların, kemer bağlantılar ve delik geçit bölgeleri ile olan konumu diğer epitel hücrelerinden farklılık gösterir. Çünkü kan-testis bariyerini oluşturan Sertoli hücrelerinin sıkı bağlantıları seminifer epitelde bazal kısımda yer almaktadır [6]. Memeli dokularındaki üç bağlantı tipinin sınıflandırılması ve yapılarına katılan proteinler Çizelge 2.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Testiste bulunan hücre bağlantılarının fonksiyonel sınıflandırması ve bağlantı proteinlerinin yapısına katılan proteinler. Altı çizili ve koyu olarak yazılan proteinler testiste pozitif olarak tanımlanmışlardır [6].

Bağlantı Tipi	Proteinler
<p>Kaynaştırma (Occluding) Bağlantıları:</p> <p>Sıkı bağlantılar</p>	<p>Sıkı bağlantı integral proteinler: <u>okludin</u>, <u>okludin-1B</u>, <u>klaudin-1, -3, -4, -5, -7, -8 ve -11</u> (diğer epitellerde transmembran protein olarak en az 24 klaudin tanımlanmıştır) ve bağlantı adezyon molekülleri (JAM)</p> <p>Sıkı bağlantı-bağlantılı proteinler: <u>ZO-1</u>, <u>ZO-2</u>, ZO-3, 7H6 antijen, <u>cingulin</u>, BG9.1, <u>simplekin</u>, <u>aktin</u>, ZA-1 TJ, ZAK, AF-6, fodrin, Src, Gα, PKC, Sec 6/8, 19B1, Rab3B, <u>Rab8</u>, <u>Rab13</u>, c-yes, VAP-33.</p>
<p>Kenetleyici bağlantılar ya da yapıştırıcı bağlantılar:</p> <p>Aktin filamentleri bağlanan bölgeleri</p> <p>Hücre-hücre yapıştırma bağlantılar ya da adezyon kemerleri</p> <p>Testise özgün iki özelleşmiş yapıştırma bağlantıları bulunur:</p> <p>1) Ektoplazmik farklılaşmalar (Sertoli hücreleri ve germ hücreleri arasında bulunabilir, özellikle spermatidlerde)</p> <p>2) Tübülobulbar kompleksler (Sertoli hücreleri ve olgunlaşan spermatidler arasında bulunurlar)</p> <p>Hücre matriks yapışması (fokal bağlantılar vs, testiküler hücrelerde ve bazal laminadaki ekstraselüler matrikste bulunurlar)</p> <p>Ara filamentlerle bağlanma bölgeleri:</p> <p>Hücre-hücre (desmozomlar Sertoli hücreleri arasında olduğu kadar Sertoli ve germ hücreleri arasında bulunurlar)</p> <p>Hücre-matriks (hemidesmozomlar bazal laminada bulunurlar)</p>	<p><u>N-kaderin</u>, <u>E- kaderin</u>, <u>α-</u> ve <u>F-aktin</u>, tensin, <u>α-aktinin</u>, <u>α-</u>, <u>β-</u> ve <u>γ-katenin</u>, <u>vinkulin</u>, <u>gelsolin</u>, <u>Src</u>, <u>p120^{ctn}</u>, <u>FAK</u>, <u>Csk</u>, <u>paksillin</u>, <u>CK-2</u>, <u>Fer kinaz</u>, <u>GSK-3β</u>, <u>ILK</u>, <u>ponsin</u>, <u>fimbrin</u>, <u>espin</u>, <u>nektin</u>, <u>afadin</u>, <u>testin</u>, <u>miyozin VIIa</u>, <u>Fyn</u>, <u>keap 1</u>, plakogloblin, radiksin.</p> <p>İntegrinler (bilinen en az 20 farklı integrin vardır, fakat yalnızca <u>α1-</u>, <u>α3-</u>, <u>α5-</u>, <u>α6-</u>, <u>α9-</u>, <u>β1-</u> ve <u>β4-</u> altünitelerinin testiste varlığı tanımlanmıştır), <u>aktin</u>, <u>α-katinin</u>, <u>vinkulin</u>, <u>FAK</u>, <u>neksilin</u>, <u>Ras</u>, talin, , <u>paksillin</u>, ziksin, tensin, <u>p130cas</u>, Src kinaz, Grb2, SOS, <u>kollajen</u>, <u>fibronektin</u>, <u>laminin α1</u>, <u>β1</u>, <u>γ1</u>, <u>γ3</u>.</p> <p>Desmokollin, desmoglein, desmoplakin, <u>plakogloblin</u>, plakofilin, <u>p120^{ctn}</u>,</p> <p><u>İntegrin</u>, desmoplakin-benzeri protein, <u>paksilin</u></p>
<p>İletişim bağlantıları:</p> <p>Delik geçit bölgeleri (Sertoli hücreleri arasında, Leydig hücreleri arasında ve Sertoli ile germ hücreleri arasında bulunur)</p>	<p><u>Konneksin 26</u>, 30.3, <u>31</u>, <u>31.1</u>, <u>32</u>, <u>33</u>, <u>36</u>, <u>37</u>, <u>40</u>, <u>43</u>, <u>45</u>, <u>46</u>, <u>50</u>, <u>57</u></p>

2.3.4. Sıkı Bağlantılar

Testisteki bağlantılar testisteki yerleşimlerine ve hücre iskeletine bağlanma bölgelerine göre çeşitli tiplere ayrılmaktadırlar. Bunlar arasında okludin temelli sıkı bağlantılar ve kaderin temelli kemer bağlantılar testiste en çok çalışılan iki bağlantı tiplerindedir [76].

Sıkı bağlantılar tıkayıcı bağlantılar olarak bilinir. Testiste, sıkı bağlantı alanı, fibrillerden oluşan komşu hücrelerin plazma membranları arasındaki bağlantıların olduğu kısımdır. Sertoli hücrelerini seminifer tübülleri bazal ve adlüminal kısma ayırır. Paraselüler boşlukta düzenli ve sıkı bir şekilde düzenlenmiş okludin, klaudin gibi transmembran proteinlerden oluşmaktadır [74].

Sıkı bağlantıların iki temel fonksiyonu vardır; 1) Bariyer oluşturmak, 2) Sınır oluşturmak. Sıkı bağlantılar moleküllerin geçişini sınırlandıran yarı geçirgen bir bariyer oluştururlar. Bu sıkı bağlantıların bariyer fonksiyonu olarak bilinmektedir. Buna rağmen, moleküllerin geçişi moleküler ağırlıklarına ve kimyasal özelliklerine göre değişiklik göstermektedir. Aslında sıkı bağlantıların geçirgenliği dokuların ve farklı organların fonksiyonlarına göre ve fizyolojik ihtiyaçlara göre dokudan dokuya farklılık göstermektedir [77].

Testisteki sıkı bağlantıların diğer fonksiyonu, Sertoli hücrelerini birbirinden farklı olan bazal ve apikal kısımlara ayırarak bir sınır oluşturmasıdır. Bu ise sıkı bağlantıların koruma fonksiyonu olarak bilinmektedir. Bu özellik epitel hücrelerinde hücre kutuplaşmasına neden olur. Temel olarak sıkı bağlantıların koruma fonksiyonu, proteinler ve lipidler gibi moleküllerin birbirine karışmasını engeller. Bu özellik Sertoli hücrelerinin önemli bir fonksiyonudur, çünkü bu hücreler androjen bağlayıcı protein, testin ve transferrin gibi çeşitli salgılarını adlüminal kısma salgırlar [77].

Membran ilişkili guanilat kinaz homolog protein ailesi; ZO-1, ZO-2 ve ZO-3'ü de içeren çeşitli proteinlerden oluşmaktadır. Bunlar,

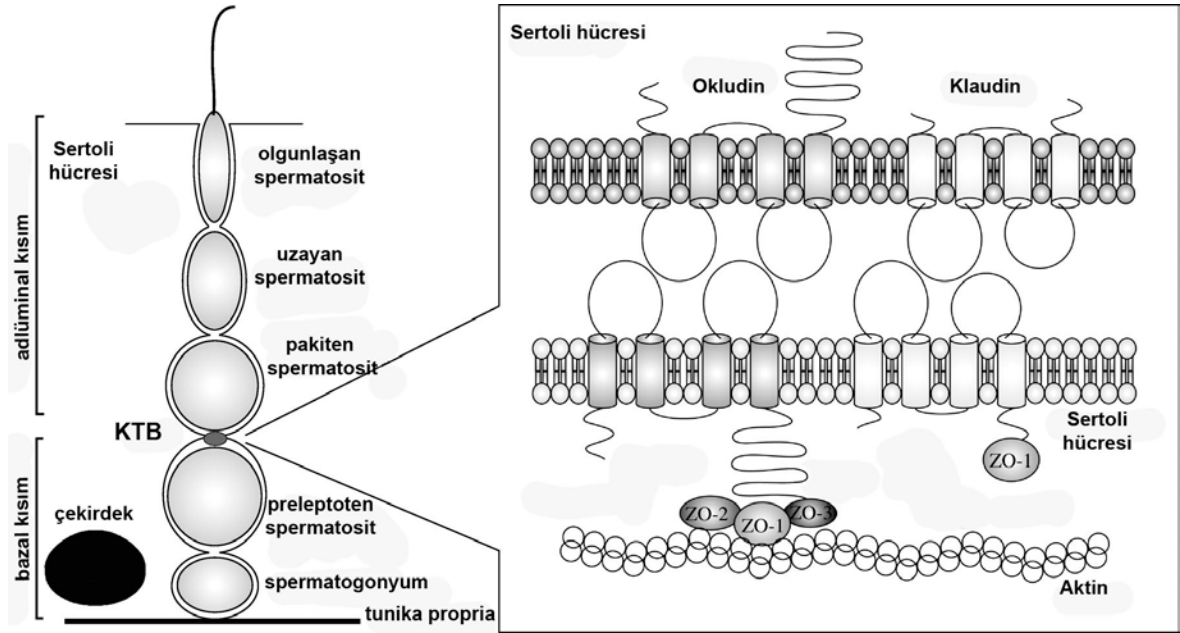
- 1) Hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenlerler,
- 2) Membran organizasyonunu kontrol ederler,
- 3) Sinyal iletim yollarını yönetirler,
- 4) Hücre kutuplaşmasını düzenlerler [78, 79].

i) Zonula Okludens-1 (ZO-1): Epitel ve endotel hücrelerinde sıkı bağlantılarla ilişkili 210-225 kDa'luk periferel bir proteindir, yapısal ve sinyal fonksiyonları olduğu bilinmektedir [78]. Bu protein doğrudan okludin proteinin C terminali ile etkileşime geçer. Ayrıca, ZO-1 epitel hücrelerinde aktin ve α -katenin ile bağlantılıdır. Testiste ZO-1, Sertoli hücrelerinin sıkı bağlantıları ile ilişkili kan-testis bariyeri bölgesinde yerleşim göstermektedir. Okludine bağlanmasının yanı sıra, ZO-2, ZO-3, ZO-1 ilişkili protein kinaz ve konneksin 43 (CX43) gibi çeşitli proteinlerle de bağlantı kurmaktadır [80].

ii) Okludin: 60-65 kDa'luk en fazla çalışılan transmembran proteinlerden biridir. 4 transmembran domain, 2 hücre dışı loop ve 1 hücre içi ilmek içermektedir. Proteinin N ve C terminali sitoplazmada yer alır. Okludinin ilk ekstraselüler ilmeği yaklaşık % 60 tirozin ve glisin residularından oluşur ve hücre-hücre adezyonuna katılır [81]. Diğer yandan ikinci ekstraselüler ilmeği paraselüler bariyer oluşumuna katılır [82]. Okludin proteini spermatogenez ve germ hücrelerinin hareketi için gereklidir [77]. Erişkin testiste, okludin mRNA seviyeleri oldukça yüksek bulunmuştur, okludin proteini fare testisinde immünohistokimyasal olarak boyandığında kan-testis bariyerinin olduğu bölgede toplanmış şekilde yerleşim gösterirler [83].

iii) Klaudinler: 2-24 kDa'dan oluşan sıkı bağlantı proteinlerinden klaudin süperailisine ait en az 24 üyeden oluşurlar [84, 85]. Klaudinler sıkı bağlantı bölgesinde yerleşim gösterirler. Testiste klaudin 1, 3, 4, 5, 7, 8 ve 11 olmak üzere 7 farklı klaudin tanımlanmıştır [86, 87]. Yalnızca Klaudin 11 testiste çok ayrıntılı olarak çalışılmıştır ve Sertoli hücrelerinde kan-testis bariyeri bölgesiyle sınırlıdır [88]. Klaudin 11 geni susturulmuş farelerle yapılan çalışmalarla bu farelerin kısır olduğu gösterilmiştir [89]. Bunun bir sonucu olarak normal spermatogenez için kan-testis bariyerinin bütünlüğünün önemi ortaya konulmuştur.

Bu proteinler haricinde bağlantı adezyon molekülleri olarak adlandırılan Ig süperailisine ait proteinler, Coxsackievirus ve adenovirus reseptörü gibi çeşitli integral membran proteinlerin yanı sıra sıkı bağlantılarla ilişkili cingulin, sympekin gibi sitoplazmik proteinler de bulunmaktadır [77]. Şekil 2.3' te okludin, klaudin, ZO-1, ZO-2 ve ZO-3 proteinlerinin KTB' de yerleşimini göstermektedir [90].



Şekil 2.3. Occludin, kladin ve ZO proteinlerinin KTB'deki yerleşimi [90].

2.3.5. Kenetleyici Bağlantılar

Testiste dört çeşit kenetleyici bağlantı tipi bulunmaktadır:

- 1) Kemer (adheren) bağlantılar (zonula adherens olarak bilinir), (aktin filamentlere bağlanır)
- 2) Fokal bağlantılar ya da adezyonlar, (aktin filamentlerine bağlanır)
- 3) Desmozomlar, (ara filamentlere bağlanır)
- 4) Hemidesmozomlar, (ara filamentlere bağlanır)

Her bir bağlantı yapısal ve biyokimyasal olarak birbirlerinden farklıdır. Dört bağlantı tipi arasındaki en büyük farklılık, kemer ve fokal bağlantıların bağlanma bölgesi olarak aktin filamentlerini kullanması; desmozomlar ve hemidesmozomların ise arafilamentlere bağlanmasıdır. Testiste, iki farklı kenetleyici bağlantı tipi bulunmaktadır, bunlar ekstrasitoplazmik farklılaşmalar ve tübülobulbar komplekstir [77].

Kenetleyici bağlantılar birbirinden farklı olmalarına rağmen hepsinin tek bir işlevi bulunmaktadır. Bu bağlantılar doku bütünlüğünü sağlayarak bir ağ oluşturur ve hücrenin iç kısmını ya da iskeletini diğer hücreye ya da ekstraselüler matrikse bağlar. Kenetleyici bağlantıların hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hareketi gibi

temel hücre sel süreçleri düzenleyen proteinlerle sinyal transdüksiyon olaylarında da önemli rol oynadıkları gösterilmiştir [91-93].

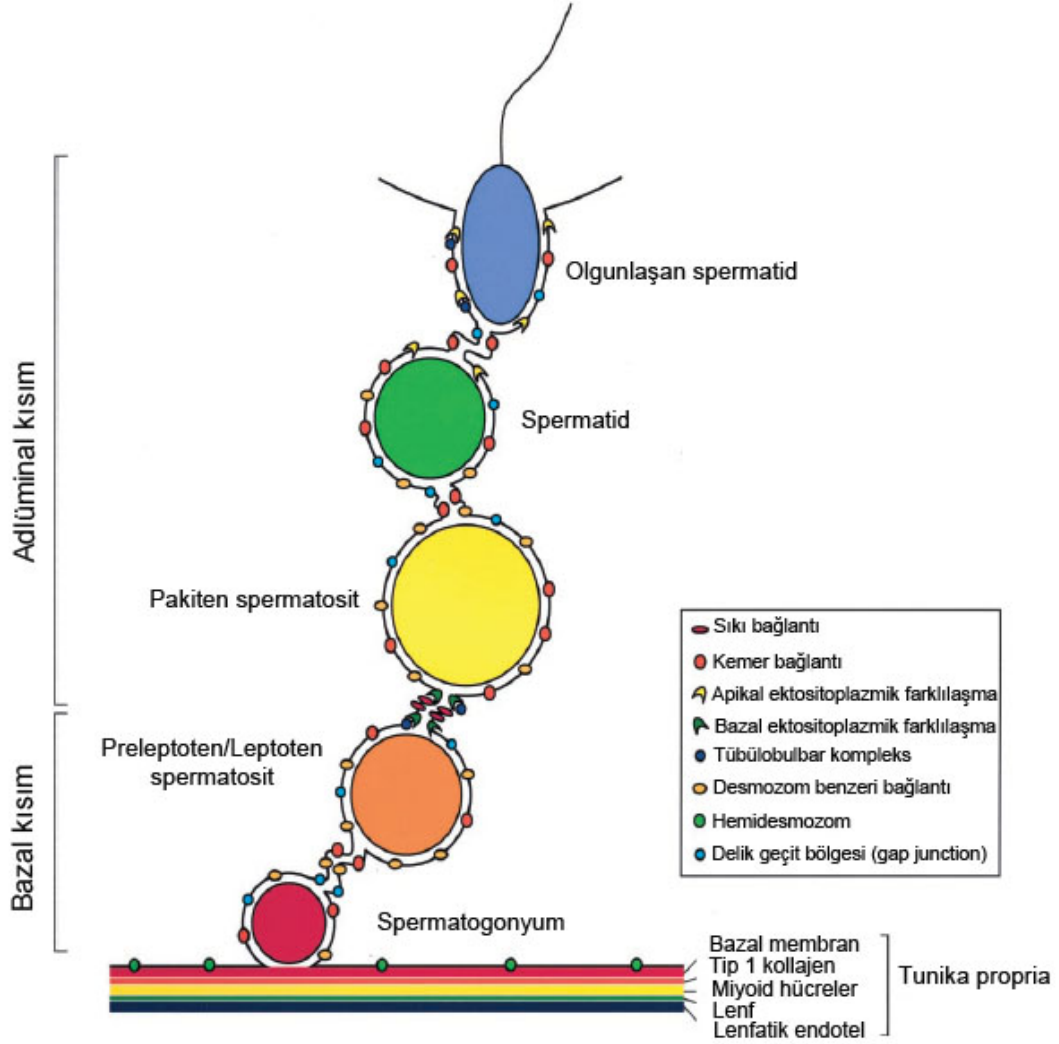
Aktin temelli hücre adezyonunda dört adet kenetleyici bağlantı fonksiyonel birimi tanımlanmıştır. Bunlar; 1) kaderin-katenin, 2) nektin-afadin-ponsin, 3) integrin-laminin ve 4) vezatin-miyozin hücre adezyon birimleridir [94]. Testiste tanımlanan kaderin-katenin ve integrin-laminin birimi bulunmaktadır, vezatinin testiste olup olmadığı henüz bilinmemektedir.

i) Kaderin-katenin: Kaderinler 115-140 kDa'luk kalsiyum bağımlı hücre adezyon molekülleri ailesine ait transmembran proteinleridir ve bu proteinlerin hücre yapısını, morfolojisini ve fonksiyonlarını düzenledikleri bilinmektedir [95, 96]. Bugüne kadar altı düzineden fazla kaderin ailesine ait protein tanımlanmıştır. Birçok kaderin çeşitli domainlere sahip olan glikoproteinlerdir: 1) iki sitoplazmik, 2) bir transmembran ve 3) beş kalsiyum bağlama domaini. Kaderinler ile yapılan bağlantılar kalsiyum bağımlıdır, (kalsiyumun kaderinlerin multidomain yapısını katılaştırdığı bilinmektedir), kaderinlerle oluşan homotipik etkileşimler komşu hücre membranında bulunmaktadır. Kalsiyum yokluğunda kaderinler inaktiftir ve proteolizize duyarlıdır [97]. Diğer yandan, kaderinlerin sitoplazmik domainlerinin önemi intraselüler proteinlerle olan etkileşime dayanmaktadır. Bu proteinler, fonksiyonel kemer bağlantı oluşturmak için olduğu kadar hücre yüzeyinden çekirdeğe bilgi gönderilmesi, epitel bütünlüğünün sağlanabilmesi için spesifik genlerin aktive edilmesi için bir araya gelen kaderinlere katılırlar.

Kaderinlerin fonksiyonu ayrıca bağlandığı sitoplazmik domainin β - ya da γ - katenine bağlanmasına göre de değişiklik göstermektedir [96, 98]. γ - katenin, β - katenine çok yakın olarak bulunur, plakoglobin olarak da bilinmektedir [99, 100]. β - katenin ayrıca Wnt sinyal transdüksiyon yolu ile uyarıldığında transkripsiyon kofaktörü olarak da işlev görmektedir [101, 102]. Kaderin-katenin kompleksi dolaylı yoldan α - katenin aracılığıyla aktin hücre iskeletine bağlayarak kateninin molekülleri kemer bağlantı bölgesindeki aktin dinamiklerine katılarak bağlantıları kuvvetlendirmektedir [103].

Testiste, iki düzineden fazla kaderin varlığı bilinmektedir. N-kaderin olgunlaşan spermatidlerle ilişkilidir, germ hücre hareketinde rol oynar. Fakat N-kaderin daha çok seminifer epitelde bazal kısımda bulunmaktadır [104, 105]. N-kaderin ve

okludin proteinlerinin birlikte yerleşim göstermeleri kan-testis bariyerinin varlığının bir kanıtıdır ve bu iki proteinin periferik membran adaptörleri katenin ve ZO-1 ile bağlantılı oldukları gösterilmiştir [106]. Şekil 2.4’ te testiste yer alan çeşitli bağlantı tiplerinin yerleşimleri gösterilmektedir [77].



Şekil 2.4. Testiste bulunan farklı tipteki bağlantıların yerleşimleri [77].

2.4. SerW3 Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri

In vitro primer Sertoli hücreleri kültüre edildiklerinde yassılaşıma eğilimi gösterirler ve endositik kapasiteleri kadar salgılama aktivitelerini de kaybedebilirler. Buna rağmen, bazı araştırmacılar peritübüler hücrelerle ya da germ hücreleri ile birlikte kültüre edildiklerinde veya ekstraselüler protein matrikste yeniden yapılandırıldığında Sertoli hücrelerinin yeniden morfolojik özelliklerini ve fagositoz dahil fonksiyonel özelliklerini geri kazandığını göstermişlerdir [107]. Bu nedenle, primer Sertoli hücre kültürleri *in vivo* yaklaşımlara bir alternatif olmakla birlikte kısa ömürlü olup sürekli olarak hayvanlardan izole edilmeleri gerekmektedir. Primer hücre kültürünün aksine, bir hücre hattının kurulması ile hayvan kullanımı gereksinimi ortadan kalkmaktadır. Oluşturulan hücreler temel hücrenin fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerini korumaktadır.

Sertoli hücreleri *in vivo* koşullarda toksik maddelerin hedefi olduğu için primer sıçan Sertoli hücreleri mekanistik ve toksikolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir model olarak tercih edilmektedir. Bu nedenle *in vitro* koşullarda sınırsız olarak bölünebilen ve temel hücreye çok benzer özelliklerde hücre hatlarının kurulması yoğun bir ilgi konusu olmuştur. Bu amaçla, Wistar sıçan Sertoli hücreleri (SerW3) yeni izole edilmiş primer Sertoli hücrelerinin Simirian Virüs (SV40)'ün T antijenleri ile ölümsüzleştirilmişlerdir. Bu hücre hattı epiteliyal şekillidir ve ekstraselüler matriks üzerinde sıkı bağlantılar yapmaktadır [108]. Bu özelliklerinden dolayı kan-testis bariyerinin *in vitro* koşullarda test edilmesi için uygun bir hücre modeli olarak tercih edilmektedir.

In vitro toksikoloji çalışmalarında, insan hücreleri kullanılmakla birlikte (bu hücreler genellikle hücre hatlarıdır) yaygın olarak kullanılan hücreler arasında hızlı, kolay üreyebilen memeli hayvanlar olan sıçan ve fare gibi kemirgenlerin hücreleri kullanılmaktadır. Özellikle, Sertoli hücreleri gibi üreme sistemine ait hücrelerin insandan izole edilmesi etik sorunlar başta olmak üzere çeşitli sorunları ortaya çıkarmaktadır (insandan izole edilen Sertoli hücreleri, ölü bireylerden ölümden sonra 36 saat içinde izole edilmelidir) ve primer olarak izole edebilmek için ulaşılması zor hücrelerdir. Ayrıca, bu amaçla üretilmiş yaygın olarak kullanılan bir insan hücre hattına da rastlanmamıştır. Memeli Sertoli hücrelerinin postpubertal dönemde bölünmediğine dair çeşitli kanıtlar vardır [109]. Yapılan çalışmada, prepubertal dönemdeki 17 günlük sıçanlardan elde edilen SerW3 hücre hattı

model olarak kullanılmıştır. Prepubertal dönemdeki hücreler mitotik olarak aktif durumdadırlar, bu nedenle bu dönemdeki hücreler fonksiyonel ve toksikolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [110]. Çalışmada model olarak kullanılan SerW3 hücreleri aşağıda belirtilen nedenlerden dolayı seçilmiştir:

- Kan-testis bariyerini oluşturan hücrelerarası bağlantı proteinlerinin iyi gözlemlendiği hücrelerdir.
- Hücreler prepubertal dönemde izole edildiği için aktif mitotik aktiviteye sahiptirler.
- Bu hücreler, üreme toksisitesi çalışmalarında kullanılmaktadır.
- *In vivo* koşullardaki Sertoli hücrelerini ve primer Sertoli hücrelerini birebir yansıtmaktadır.

Birçok toksik maddenin testiküler fonksiyonları Sertoli hücreleri üzerinden olumsuz etkilediği bilinmektedir [111]. Erkeklerin çeşitli çevresel toksik maddelerle maruziyeti ile sperm sayısında azalma, semen kalitesinin düşmesi, infertilite, kanser ve diğer patolojik durumlara neden olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Toksik maddeler etkilerini Sertoli-Sertoli ve/veya Sertoli-germ hücresi arayüzünde çeşitli etki mekanizmaları aracılığıyla gösterebilirler. Bu mekanizmaların anlaşılabilmesi spermatogenez sırasında hücrelerin arayüz bağlantılarının yeniden yapılandırılmasından elde edilen veriler doğrultusunda önem taşımaktadır. Hücresel olaylar hücre-hücre ara yüzündeki iletişimler aracılığıyla eşgüdümlü bir şekilde düzenlendiği için, toksik maddelerin hücre bağlantıları üzerinde infertiliteye neden olabilecek etkiler oluşturması beklenen bir durumdur [111].

Yapılan literatür araştırmalarında T-2 toksininin Sertoli hücrelerine etkileriyle ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca, T-2 toksininin üreme sistemi üzerine olumsuz etkileri bilinirken, spermatogenez üzerindeki etki mekanizması bilinmemektedir. Sertoli hücrelerinin spermatogenezde önemli işlevlere sahip olması nedeniyle bu hücrelerde oluşabilecek bir değişiklik spermatogenezin bozulmasına ve dolayısıyla da infertiliteye neden olabileceği düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında bir mikotoksin olan T-2 toksininin SerW3 hücrelerindeki kan-testis bariyerinin oluşması ve hücreler arası bağlantıların kurulmasından sorumlu

proteinler üzerindeki olası etkileri değerlendirilerek infertilite ile ilişkili olup olmadığı mekanistik olarak araştırılmıştır.

2.5. Hücre Karakterizasyon Testleri

2.5.1. Sterilite Testleri

Kültür ortamında üretilen hücreler bakteri, fungus, maya ve mikoplazma gibi çeşitli organizmalar tarafından kontaminasyona açık haldedir. Hücre kültürü kontaminasyonu kültür ortamında kullanılan hücre hatlarından, reaktiflerden, pipet ve flasklardan, laminar kabin ve inkübatörden veya çalışan personelden kaynaklı olabilmektedir. Potansiyel kontaminasyon değişmezken, kontaminasyon riski çeşitli önlemler alınarak azaltılabilir veya ortadan kaldırılabilir. Örneğin, yalnızca sterilitesi ve kalitesi bilinen ürünlerin kullanılması, yeni hücre hatlarının kontaminasyon olmadığına dair testler yapılan kadar karantina altında tutulması, kullanılan bütün ekipmanların temizliğinin devamlılığının sağlanmasına dikkat edilmesi riski azaltacak önlemler arasındadır [112].

Mikrobiyal kontaminasyon besiyerindeki ani pH değişiklikleriyle, besiyerinin bulanıklaşmasıyla ya da kültürün mikroskop altında incelenmesiye tespit edilebilmektedir. Bunun haricinde örneğin ya da hücre besiyerinin Nutrient Agar besiyerine ekimiyle kontaminasyon belirlenebilmektedir [112].

Mikoplazmalar 0,3-0,8 µm boyutlarında olup memeli hücrelerinin endozomlarında bulunan çok küçük basit prokaryotik hücrelerdir ve hücre kültürlerinde bulunan yaygın kontaminant unsurlarındandır [113]. Mikoplazma temel amino asitlerden biri olan arjinini enerji kaynağı olarak kullandığı için konak hücreyi arjininden yoksun bırakabilir ve konak hücredeki nükleik asit öncüllerinin birleşmesinde değişikliklere neden olabilmektedir [113]. Bu nedenle mikoplazma kontaminasyonu hücreler ve çalışmalar için bir risk oluşturmaktadır. Yapılacak çalışmalarda hücrelerin mikoplazma ile enfekte olmadığına tespit edilmesi önem taşımaktadır. Hücrelerde mikoplazma kontaminasyonunun belirlenebilmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Mikoplazma kontaminasyonu, agaroz ve broth kültürü yöntemiyle, floresan olarak DNA'yı boyayan 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) boyama yöntemiyle, immünofloresan boyama yöntemleriyle ve polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenebilmektedir.

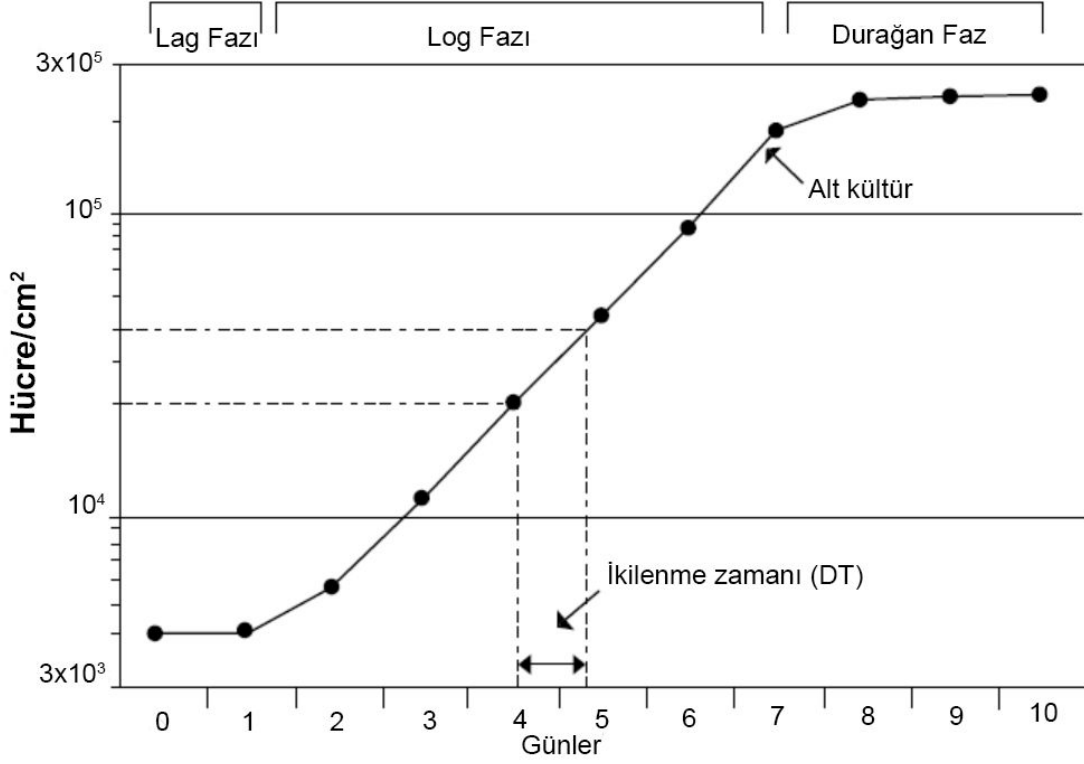
2.5.2. Üreme Eğrisi

Hücre hattı üreme eğrisi hücresel üremenin karakteristiklerini belirlemek amacıyla uygulanmaktadır. Hücreler flasklara ilk ekildiğinde lag fazındadırlar. Lag fazı, birkaç saat ile 48 saat arasında sürebilen, hücrelerin tripsinizasyondan sonra

iyileşmesi, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ve hücreler arasındaki bağlantının oluşmasına olanak sağlayan ekstraselüler matriksin salgılanması için gerekli olan süreçtir. Bu süreç hücrelerin yeni bir döngüye girmesine olanak sağlar.

Lag fazından sonra hücreler üssel büyüme olarak bilinen log fazına girmektedir. Bu fazda hücre popülasyonu her hücre için karakteristik olan hızda iki katına çıkar ve bu ikileme zamanı (DT) olarak adlandırılmaktadır. Log fazında, hücre üremesini indükleyen ya da inhibe eden ilaçların ve kimyasal ajanların etkileri olduğu kadar bu maddelerin immünomodülatör ve serbest radikal temizleme aktiviteleri de çalışılabilir. Son olarak, hücre popülasyonu çok yoğun olduğunda ve substratlar tamamen metabolize olduğunda hücreler durgun faza geçerler ve bu evrede hücre üreme hızı sıfıra kadar düşmektedir [114, 115]. Düşüş fazında eğer besiyeri değiştirilmezse ve hücre sayısı azaltılmazsa hücreler canlılıklarını kaybeder ve hücre sayısı azalır.

Hücrelerin canlılığının, genetik ve fenotipik stabilitesinin sağlanması için hücrelerin üssel fazda devamlılığının sağlanması gerekmektedir. Bu durum, hücrelerin durgun faza geçmeden (önerilen maksimum hücre yoğunluğuna gelmeden) önce düzenli aralıklarla pasajlanması gerektiği anlamına gelmektedir (Şekil 2.5). Her hücre hattı için üreme eğrisinin oluşturulması hücre hattının üreme karakteristiğinin belirlenmesi için kullanılan bir yöntemdir.



Şekil 2.5. Kültür ortamında üreyen hücrelerin üreme eğrisi [112].

İkilenme zamanı ya da bir kültürün sayıca iki katına çıkması için gerekli olan süre aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmaktadır:

$$DT = T \ln 2 / \ln \left(\frac{X_e}{X_b} \right)$$

T: İnkübasyon süresi

X_b: İnkübasyon süresi başlangıcındaki hücre sayısı

X_e: İnkübasyon süresi sonundaki hücre sayısı

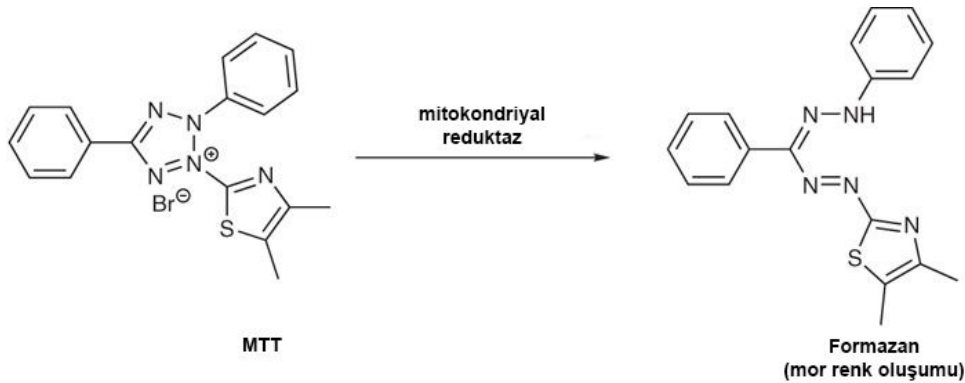
2.6. Sitotoksisite Testleri

Hücrelerin hayatta kalmaları ya da ölmeleri, normal gelişimin sürdürülmesi ve doku homeostazisinin düzenlenmesi fizyolojik koşullara karşı oluşturulan hücresel cevaplar tarafından belirlenmektedir [116]. Sitokinler ve besinler gibi hücresel çevredeki değişikliklerin hücre döngüsünün durması, kontrollü apoptoz ve kontrollü olmayan nekrozu da kapsayan çeşitli hücresel olayları indüklediği gösterilmiştir [117]. Bu olaylar hücre döngüsünün durmasından hücre ölümüne kadar olan çok geniş bir aralıkta hücre hasarını oluşturmaktadır [116].

Sitotoksosite testleri hücre kültürü modellerinde temel olarak kullanılan testlerdendir. Bu testler hücrelerin çeşitli kimyasal maddelere cevap olarak hücre büyümesi inhibisyonununun hızlı ve bütün olarak ölçülmesini sağlamaktadırlar. Sitotoksosite testleri genellikle araştırmaların başında test edilen bileşiğin daha sonraki deneyler için uygun dozun seçilmesi için yapılır. Günümüzde çok fazla sayıda sitotoksosite testi bulunmaktadır. Bunlar hücre zarı hasarı, mitokondriyal hasar, lizozomal aktivitenin bozulması ya da hücre protein içeriğinin azalması gibi çeşitli sitotoksosite belirteçlerinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır [118].

2.6.1. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Hücre Canlılık Testi

MTT testi hücrelerin canlılığını, proliferasyonunu ve aktivasyonunu ölçen hassas, kantitatif ve güvenilir kolorimetrik bir yöntemdir. Canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerinin aktivitesi ile sarı renkli suda çözünebilir MTT substratını suda çözünmeyen koyu mavi formazan tuzlarına dönüştürmesi prensibine dayanmaktadır. Oluşan formazan kristali miktarı doğrudan hücre sayısı ile ilişkilidir. Bu yöntem çok fazla sayıda örneğin mikro-plak okuyuculu spektrofotometre ile okunmasına olanak sağlamaktadır [119]. Şekil 2.6' da MTT sitotoksosite testinin çalışma prensibi görülmektedir.

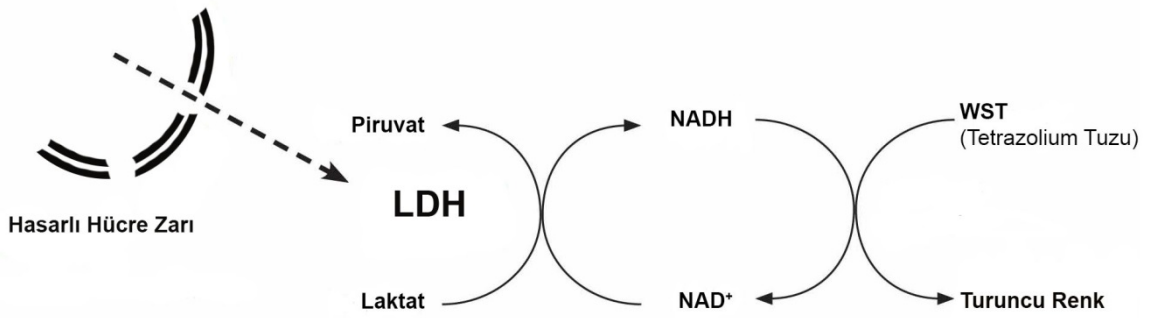


Şekil 2.6. MTT sitotoksosite testi çalışma prensibi [120].

2.6.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Sitotoksosite Testi

Laktat dehidrogenaz (LDH) bütün hücrelerin sitoplazmasında bulunan bir enzimdir. Bu enzim hücre zarı hasar gördüğünde hızlı bir şekilde kana ya da kültür ortamına salınmaktadır. Bu nedenle LDH testi, çeşitli kimyasal maddelerin ve ilaçların toksisitesini belirlemede nicel bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Her hücre tipinin karakteristik LDH havuzu bulunmaktadır ve hücrelerin pasaj sayısı ve yaşı hücre

içerisindeki LDH miktarını etkileyebilmektedir. Bu nedenle genellikle test LDH standardı kullanılarak yapılır ve daha sonra titrasyon eğrisi oluşturulur [121]. LDH sitotoksisite yöntemi spektrofotometrik temelli kolay, hızlı, güvenilir bir yöntemdir. Bu test enzimatik kenetlenme reaksiyonunu kullanır: LDH, laktatı NADH oluşturmak üzere okside eder. Daha sonra NADH tetrazolium tuzu substratı ile reaksiyona girerek sarı-turuncu bir renk oluşturur (Şekil 2.7). Oluşan rengin yoğunluğu doğrudan hücre zarı hasar görmüş hücre sayısı ile ilişkilidir. Optik dansite spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda ölçülür ve LDH aktivitesi belirlenir.



Şekil 2.7. LDH sitotoksisite testinin çalışma prensibi.

2.6.3. Tripan Mavisi Hücre Canlılığı Testi

Tripan mavisi hücre canlılığı testi hücre süspansiyonundaki canlı hücrelerin sayısını belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntem hücre zarı bozulmamış olan canlı hücrelerin tripan mavisi solüsyonunu hücre içine almaması esasına dayanmaktadır. Bu durumun aksine, hücre zarı bozulmuş olan hücreler ise boya solüsyonunu hücre içine alırlar. Bu testte hücre süspansiyonu boya ile karıştırılır ve hücrelerin boyayı alıp almadıkları belirlenerek canlı hücre oranları hesaplanır. Canlı hücreler berrak bir sitoplazmaya sahipken canlı olmayan hücreler mavi sitoplazmaya sahiptir [122].

2.7. Western Blotlama Yöntemi

Western blotlama yöntemi genellikle belirli proteinlerin tanımlanması, miktarının ve boyutunun belirlenmesi için kullanılan bir yöntemdir. Western blotlama, jel elektroforeziyle ayrılan DNA fragmentleri arasındaki belirli DNA dizilerinin belirlenmesinde kullanılan Southern blotlama yöntemi ile RNA'nın saptanması, miktarının belirlenmesi, boyutunun belirlenmesi ve RNA'nın ayrıştırılmasında

kullanılan Northern blotlama yönteminden geliştirilmiş bir yöntemdir [123]. 1970'lerin sonunda, proteinler poliakrilamid-üre jeller kullanılarak elektroforetik yöntemle ayrıştırılmış ve nitroselüloz membrana aktarılmıştır [124]. Sonrasında daha yaygın olarak kullanılan sodyum dodezil sülfat-poliakrilamid jeller (SDS-PAGE) kullanılarak bu yöntem western blotlama olarak adlandırılmıştır. Ayrıca bu yöntem protein blotlama ya da immütblotlama olarak da bilinmektedir. Western blotlama protein çalışmalarında etkili bir yöntem haline gelmiştir. Temel olarak, jel elektroforezi doğal ya da denature proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırmak için kullanılır. Proteinler daha sonra membrana aktararak hedef proteine özgü antikorlar kullanılarak belirlenirler.

2.7.1. Örnek Hazırlanması

Western blotlama yönteminde öncelikle proteinlerin doku ya da hücrelerden lizis tamponları kullanılarak elde edilmeleri gereklidir. Hücreleri lizis ederek protein çözeltisi elde etmek için çeşitli deterjanlar, tuzlar ve tamponlar kullanılır. İlgili protein temel alınarak seçilebilecek çok çeşitli lizis tamponu bulunmaktadır. Proteinlerin degradasyonunun engellenmesi amacıyla (proteazlar ve fosfatazlar lizis sırasında ortama salınabileceğinden) lizis tamponuna proteaz ve fosfataz inhibitörleri eklenebilmektedir [123].

2.7.2. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

SDS-PAGE jelle yüklenecek olan örneklerin protein konsantrasyonlarının belirlenmesi gerekmektedir. Total protein miktarının belirlenmesi örneklerin spektrofotometrik yöntemler kullanılarak ölçülebilmektedir. Bu amaçla, Bradford yöntemi veya Commasie yöntemi kullanılarak standart eğri oluşturulur ve konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin protein konsantrasyonu bu şekilde belirlenebilmektedir [125].

2.7.3. Jel Elektroforezi

Jel elektroforezinde optimal ayrıştırmanın yapılabilmesi için ideal bisakrilamid: akrilamid oranının elektroforezden önce belirlenmesi önem taşımaktadır. Proteinler daha sonra jel elektroforezi kullanılarak ayrıştırılabilirler. Proteinler izoelektrik noktalarına, moleküler ağırlıklarına, elektrik yüklerine göre ya da bunların kombinasyonlarına göre ayrıştırılabilirler. En yaygın kullanılan elektroforez çeşidinde poliakrilamid jeller ve sodyum dodezil sülfat (SDS) ile yüklenen tamponlar kullanılır. SDS-PAGE yöntemi güçlü bir anyonik deterjan olan SDS'in

özelliklerini temel almaktadır. Bütün proteinler aynı elektriksel yüke sahip olmadığı için protein çözeltisi SDS ile muamele edilir ve sonuçta proteinler denatüre olur ve negatif yüklenirler. Bunun bir sonucu olarak, proteinler moleküler ağırlıklarına göre ayrılırlar. İndirgeyici bir madde ile muamele etmek proteinlerin disülfid bağlarını koparır ve örneklerin yüksek sıcaklığa maruz bırakılması denatürasyon aşamasını kolaylaştırır. Jele voltaj uygulanması ile proteinler farklı hızlarda hareket eder ve bu farklı hız sonucu proteinler bantlar şeklinde ayrılır.

Denatüre edilmiş olan örnekler ile birlikte hedef proteinin moleküler ağırlığının belirlenebilmesi için moleküler ağırlık markırı da jele yüklenir [123].

2.7.4. Proteinlerin Transfer Edilmesi

Elektroforez tamamlandıktan sonra moleküler ağırlıklarına göre ayrılmış proteinler jelden western blotlama için kullanılan nitroselüloz, poliviniliden diflorid, aktif kağıt ya da aktif naylondan elde edilmiş membranlara transfer edilir [124]. En yaygın kullanılan membran nitroselüloz membrandır. Elektroblotlama proteinlerin jelden membrana transfer edilmesinde kullanılan en yaygın yöntemlerden birisidir. Bu yöntemin esas amacı hızlı ve eksiksiz bir transfer sağlamasıdır. Bu yöntemde proteinlerin jelden membrana aktarılması için elektrik akımı kullanılır. Bu süreç ıslak veya yarı-kuru olarak gerçekleştirilebilmektedir. Islak transferde jel ve membran bir tampon içerisinde batırılırken, yarı-kuru transferde jel ve membran transfer tamponuna emdirilmiş filtre yağlıları arasına sıkıştırılır. Protein transferinin etkinliği kullanılan jelin çeşidine, proteinin moleküler ağırlığına ve membranın çeşidine göre değişiklik göstermektedir [123].

2.7.5. Membranın Bloklanması ve Proteinlerin Antikorla İşaretlenmesi

Hedef proteinin işaretlenmesinde membran ile antikor arasındaki etkileşimlerin engellenmesi önemlidir. Özgül olmayan bağlanmanın engellenebilmesi için membran sığır serum albümin (BSA), yağsız süt tozu gibi dilüe edilmiş protein solüsyonları veya membran çeşidine uygun özgül bloklama tamponları ile muamale edilirler. Bloklama membrandaki herhangi bir potansiyel özgül olmayan bağlanma bölgesininin maskelenmesine yardımcı olur, blotlamanın zeminindeki kirliliğin azaltılmasını sağlayarak yanlış pozitif sonuçları elimine eder ve net bir sonuç elde edilmesini sağlar.

Bloklama aşamasından sonraki aşamada membran primer antikor ile inkübe edilir, tamponla yıkanır, sekonder antikorla inkübe edilir ve tekrar yıkanır. Bu aşamadan sonra ilgili proteinlerin western blot üzerinde belirlenmesi gerekmektedir. Belirleme yöntemleri olarak kolorimetrik, radyoaktif ve floresan yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Geliştirilmiş kemilüminisen (ECL) yöntemi ilgili proteinin relatif miktar tayininde kullanılan hassas bir yöntemdir [126]. Primer antikora bağlanan sekonder antikor genellikle horseradish peroksidaz enzimi ile işaretlidir ve bu enzim kemilüminisen ajanı parçalamak için kullanılır. Bu reaksiyon ürünü olarak protein miktarıyla ilişkili olan lüminisens oluşur. Bu ışımaya fotoradyografik filme aktarılır ya da bu amaç için üretilmiş yüksek çözünürlüklü kameralar ile görüntü elde edilebilir. Protein bantlarının görüntüsü elde edildikten sonra ilgili proteinin relatif miktarı kontrol örnekleriyle karşılaştırılabilir. Bu şekilde proteinin kontrol gruplarına göre miktar değişimi belirlenebilmektedir.

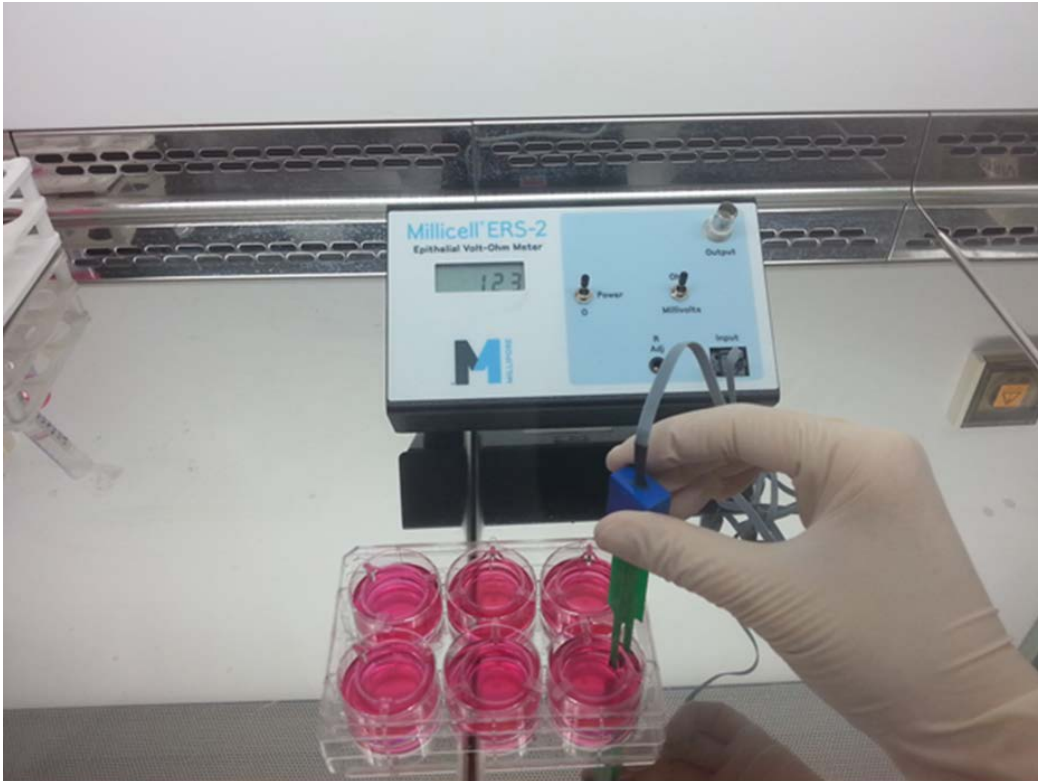
2.8. Transepitelial Elektriksel Direnç (TEER) Ölçümü

Trans epitelial elektriksel direnç ölçümü epitel bariyerinin özelliklerini gösteren ve doku bütünlüğünün ölçülmesini sağlayan bir yöntemdir. Doku modelindeki iyonların ve elektronların geçirgenliğini ölçer ve doku modeli boyunca küçük moleküllerin akışı ile bağlantılıdır [127]. Özellikle komşu epitel hücreleri arasında yerleşim gösteren sıkı bağlantılar hakkında bilgi sağlamaktadır. Çeşitli çalışmalarda, TEER doku modellerinin farklılaşmasında ve fonksiyonunun değerlendirilmesinde ve fizyolojik değişikliklerin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmıştır. Bunun yanı sıra hücreden daha ziyade doku bütünlüğünün gösterilmesini sağlamasından dolayı, çeşitli maddelerin hasar verici etkilerini belirlemek için kullanılan hassas bir yöntemdir. TEER ölçümü, çeşitli maddelere maruz bırakılan MCDK hücrelerinde ve Sertoli hücrelerinde bu maddelerin toksik etkilerini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Ölçülen değerdeki azalma, doku tabakası hasarının erken bir belirteci olup, hücre morfolojisindeki değişikliklerden daha hassas olduğu gösterilmiştir [127].

Bariyer oluşturan hücreler maddelerin paraselüler olarak taşınmasının çalışılabilmesi için yaygın olarak kullanılan *in vitro* modellerdendir. Bu amaçla endotel ya da epitel hücrelerin öncelikle geçirgen membran destekler üzerinde kültüre edilmesi gerekmektedir. Porlu membranlar üzerinde kültüre edilen hücreler bütün bir dokuda olduğu gibi kendine özgü özelliklerini geliştirirler, hücre-hücre

bağlantılarıyla yoğun tabakalar oluştururlar ve hücresel polariteyi kurarlar. Epitel ya da endotelde yeniden kurulmuş bariyer fonksiyonunun değerlendirilmesi için TEER ölçümü yaygın kullanılan bir yöntemdir. TEER ölçümü canlı hücre kültüründe işaretleme gereksiz yapılabilmektedir.

TEER ölçümü elektrofizyolojik yöntemler kullanılarak hücrelerin oluşturduğu fonksiyonel bariyerin belirlenmesi temeline dayanmaktadır. TEER cihazı hem bazal hem de luminal kültür besiyeri ile temas halinde olan iki elektroda sahiptir [128]. Fizyolojik bariyerin oluşumu, uygun filtre materyallerine ve besiyerinde kullanılan seruma bağlı olarak kültür koşullarına göre değişiklik gösterebilmektedir. Bu nedenle, sıkı epitel hücre tabakaları yüksek elektriksel direnç gösterirken, düşük elektriksel direnç yüksek geçirgenlikle doğrudan ilişkilidir. Sonuç olarak elde edilen veri bariyeri oluşturan hücre-hücre bağlantılarının kurulmasını gözlemlemek ya da karşılaştırmak amacıyla kullanılabilir [128]. Kültürde luminal ve bazal kısımlara elektrodların yerleştirilmesi ve zayıf voltaj uygulanmasıyla epitel hücre tabakasının alternatif akım direnci belirlenebilmektedir. Bu değer, epitel hücre tabakası özelliklerini yansıtmaktadır. Şekil 2.8' de volt-ohm metre ile bariyer bütünlüğü testinin yapılışı gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Volt-ohm metre ile bariyer bütünlüğü testi (TEER ölçümü)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

SerW3 hücreleri Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürü Koleksiyonu'ndan (DSMZ, Almanya) temin edilmiştir. -196°C sıvı azottan çıkarılan hücreler 37°C su banyosuna koyularak çözdürüldükten sonra 800 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pelet kısmında kalan hücreler Dulbecco's MEM besiyeri (%10 fetal sığır serum, 3,7 g/l NaHCO₃, 4,5 g/l glukoz, stabil glutamin içeren) 25 cm²'lik hücre kültürü flasklarına konularak %5 CO₂ 37°C ortamında inkübe edilmişlerdir. Besiyeri 2-3 günde bir değiştirilmiştir. Yeterli yoğunluğa gelen hücreler %0,05 tripsin/%0,02 Etilendiaminotetraasetik asit (EDTA) (Biochrom, Almanya) kullanılarak tutundukları yüzeyden kaldırılmış ve pasajlanmıştır. Aynı işlemler yeterli sayıda stok elde edinceye kadar tekrarlanmıştır.

3.2. SerW3 Hücrelerinin Üreme Karakterinin Belirlenmesi

Hücrelerin üreme karakterinin belirlenebilmesi için üreme eğrisi yapılmıştır. Üreme eğrisinin yapılması için; 5x10⁴ hücre/ml hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 2 ml/petri olacak şekilde 20 adet 9 cm² hücre kültürü petrilere konulmuştur (10 gün boyunca iki tekrar). Petriler 37°C % 5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. Hücrelerin petrilere koyulmasından 3 saat sonra ilk gün için ayrılmış 2 petri kabındaki besiyerleri boşaltılarak 1 ml tripsin/EDTA konulmasıyla hücreler yüzeyden kaldırılmış, 2 ml hücre süspansiyonuna 100 µl tripan mavisini eklenerek hücre sayımı yapılmıştır. İki petride sayılan hücrelerin ortalaması kaydedilerek 0. gündeki (t₀) hücre sayısı olarak kabul edilmiştir. 10 gün boyunca her gün aynı saatte 2 petri alınarak aynı işlemler tekrarlanmıştır.

3.3. Sterilite Testleri

3.3.1. Mikoplazma Testi

Mikoplazmanın test edilmesi için SerW3 hücreleri en az 3 pasaj antibiyotiksiz ortamda üretilmiştir. Daha sonra başlangıç sayısı 2x10³ hücre/kuyucuk olacak şekilde 24 gözlü hücre kültürü plaklarına konmuştur. 24 saat sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri çekilmiştir ve kuyucuk başına 2 ml Carnoy's fiksatif (metanol/asetik asit; 3/1) kullanılarak hücreler 3 dk fikse edilmiştir. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra 1 µg/ml DAPI olacak şekilde 15 dk karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrasında boya dökülerek PBS ile yıkama yapılmış ve gliserol/PBS (1/1) kapatma ortamı ile preparatlar kapanarak örnekler floresan

mikroskopta incelenmiştir. Hücre çekirdeğinin yanında ve hücreler arası alanda floresan ışımaya tespit edilmesi mikoplazma kontaminasyonu olduğunu göstermektedir [129].

3.4. T-2 Toksin Stok Çözeltisinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılmak üzere 5 mg T-2 Toksini (Cayman, Amerika) 2 ml dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülerek ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Yapılan ön çalışmalar sonucunda T-2 toksininin 24 ve 48 saat uygulamaları için seçilen dozlar stok çözeltiden besiyeri ile dilüe edilerek hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılacak dozlar için ön çalışmalar yapılmıştır. Bu sonuçlara göre, uygulamada kullanılacak dozlar 12, 120 ve 1200 ng/ml (0,025, 0,25 ve 2,5 nM) olarak seçilmiştir. Çözücü olarak kullanılan DMSO besiyerindeki son konsantrasyonu en fazla % 0,1 olacak şekilde dilüe edilmiştir.

3.5. Hücre Canlılık Testi

SerW3 hücreleri ile 3×10^5 hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. 96 gözlü hücre kültürü plaklarına 100 µl/kuyucuk olacak şekilde hücre süspansiyonu dağıtılmıştır. Hücreler % 5 CO₂'li etüvde 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda besiyeri dökülerek, T-2 toksini dozları koyulmuştur. 24 ve 48 saat inkübasyon süresinden sonra toksinli besiyerleri dökülerek her göze 100 µl DMEM besiyeri ve 13 µl MTT (Sigma, Amerika) konulmuş ve % 5 CO₂'li etüvde 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bittiğinde formazan kristallerinin oluşup oluşmadığı mikroskop altında incelenmiştir. Formazan kristallerinin çözünmesi için 96 gözlü plaklara 100 µl/kuyucuk olacak şekilde izopropil alkol konulmuştur. Örneklerin absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda mikropalak okuyuculu spektrofotometre ile ölçülmüştür (BIO-TEK µQuant, BIO-TEK Instruments, Inc, Amerika). Her gruba ait MTT absorbans değerlerinin (OD) ortalamaları alınmıştır ve % canlılık aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ canlılık} = \frac{\text{uygulama grubu OD}}{\text{kontrol grubu OD}} \times 100$$

3.6. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Sitotoksisite Testi

LDH sitotoksisite testi kullanılan ticari kitin protokolü doğrultusunda yapılmıştır (Biovision, Amerika). SerW3 hücreleri 2×10^5 hücre/ml süspansiyon hazırlanarak 96

gözlü plaklara 100 µl/kuyucuk olacak şekilde dağıtılmıştır. Hücreler % 5 CO₂'li etüvde 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda besiyeri dökülerek, T-2 toksini dozları koyulmuştur. Yüksek kontrol grubu değerleri toksin ile muamele edilmemiş kontrol grubu hücreleri üzerinde % 1 Triton-X 100 ilave edilmesiyle elde edilmiştir. 24 ve 48 saat inkübasyon süresinden sonra tüm gruplara ait besiyerleri toplanarak 600 g'de 10 dk santifüj edilmiştir. Süpernatandan 10 µl konulduktan sonra 100 µl LDH reaksiyon tamponu eklenerek 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Absorbanslar 450 nm dalga boyunda 650 nm referans dalga boyunda mikropalak okuyuculu spektrofotometrede ölçülmüştür (BIO-TEK µQuant, BIO-TEK Instruments, Inc, Amerika). % sitotoksosite aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ sitotoksosite} = \frac{\text{uygulama grubu OD} - \text{kontrol grubu OD}}{\text{yüksek kontrol grubu OD} - \text{kontrol grubu OD}} \times 100$$

3.7. Canlı Hücre Sayımı

SerW3 hücreleri 3x10⁵ hücre/ml süspansiyon hazırlanarak 6 gözlü hücre kültürü plaklarına koyulmuştur. Hücreler 24 saat % 5 CO₂ içeren 37°C etüvde inkübe edildikten sonra T-2 toksin dozları uygulanmıştır. 24 ve 48 saat uygulama süreleri sonunda yüzen hücrelerin sayılabilmesi için besiyeri toplanarak, tutunan hücreler sayılabilmesi için ise tripsin/EDTA ile yüzeyden ayrılması sağlanarak % 0,5 tripan mavisini solüsyonu ile boyanmıştır. Daha sonra hemisitometre (Bürker lamı) kullanılarak canlı hücreler (boyayı almayan) ile ölü hücreler (boyayı alan) ışık mikroskobu altında (Olympus CX21, Amerika) sayılmıştır.

$$\% \text{ canlılık} = \frac{\text{canlı hücre sayısı}}{\text{toplam hücre sayısı}} \times 100$$

3.8. İmmünfloresan Boyama

İmmünfloresan boyamalar için hücreler 15x10⁴ hücre/ml olacak şekilde 8 kuyucuklu hücre kültürü plaklarında (Millipore, EZ Slide, Almanya) üretilmiştir. Hücrelerin T-2 toksini ile inkübasyonundan 24 ve 48 saat sonra okludin, N-kadherin, ZO-1 ve β-katenin proteinleri immünfloresan olarak boyanmıştır.

Hücreler -20°C metanolde 15 dk fikse edildikten sonra 2'şer dakika 2 kez fosfat tamponu (PBS) ile yıkanmıştır. Özgül olmayan avidin ve biotin bağlanmasını engellemek için avidin/biotin blokajı (Avidin/Biotin Blocking Kit, SP-2001, Vector Laboratories, Amerika) yapılmıştır. Hücrelerdeki özgül olmayan bağlanmanın engellenebilmesi için hücreler % 5 keçi serumu ile 20 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Primer antikolar % 5 keçi serumunda dilüe edilerek +4°C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Çizelge 3.1' de kullanılan primer antikoların dilüsyonları belirtilmiştir. 2'şer kez 2 dk PBS yıkamasından sonra keçide tavşana karşı geliştirilmiş biyotinli sekonder antikor (Thermo Scientific, TP-015-BN, Amerika) ile 45 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 2'şer kez 2 dk PBS ile yıkanmış ve fluorescein avidin D (Vector Laboratories, Amerika) ile işaretlenmiştir. DAPI içeren kapatma ortamı (Santa Cruz Biotechnology, Sc-24941, CA, Amerika) kullanılarak lamel ile kapatılan preparatlar Olympus IX70 (Amerika) floresan ataçmanlı ışık mikroskobunda uygun filtreler kullanılarak incelenmiştir.

Çizelge 3.1. İmmüno floresan ve western blotlama yöntemlerinde kullanılan antikolar

Antikor	Katalog Numarası	Yöntem	Dilüsyon
Anti-Okludin	Thermo Scientific PA5-20755	İmmüno floresan, Western Blotlama	20 µg/ml, 1 µg/ml
Anti-N-Kaderin	Thermo Scientific PA5-19486	İmmüno floresan, Western Blotlama	5 µg/ml, 1 µg/ml
Anti-ZO-1	Invitrogen, 40-2200	İmmüno floresan	3 µg/ml
Anti-β-katenin	Thermo Scientific, PA5-19469	İmmüno floresan	1 µg/ml

3.9. Western Blotlama

3.9.1. Hücre lizatlarının hazırlanması

SerW3 hücreleri kontrol ve T-2 toksin uygulama grupları için başlangıç hücre sayısı 145×10^4 olacak şekilde 75 cm^2 lik flasklarda üretilmiştir. İnkübasyon sürelerinin sonunda hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkanmıştır. Hücreler liziz edilmiştir. Liziz tamponu okludin proteini için Çizelge 3.2' deki gibi, N-kaderin proteini için Çizelge 3.3' teki gibi hazırlanmıştır. Hücreler lizatları hazırlanırken flasklara 1ml liziz tamponu konularak 5 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra hücre sıyırıcı kullanılarak flastaki tutunan hücrelerin liziz olması sağlanmıştır. Hücre lizatları 15000 rpm'de 30 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantlar analizler yapılana kadar -80°C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.2. Okludin proteini için hazırlanan RIPA liziz tamponu içeriği (Santa Cruz, sc-24948).

TrisHCl pH 7,6	25 mM
NaCl	150 mM
Nonidet P-40	% 1
Sodyum deoksikolat	% 0,5
SDS	% 0,1
PMSF	10 µl/ml
Sodyum ortovanadat	10 µl/ml
Proteaz inhibitör kokteyli	20 µl/ml

Çizelge 3.3. N-kaderin proteini için hazırlanan RIPA liziz tamponu içeriği (Pierce Biotechnology 89901).

TrisHCl pH 7,6	25 mM
NaCl	150 nM
Sodyum deoksikolat	%1
SDS	% 0,1
Proteaz inhibitör kokteyli, 50 ml tampon için (Roche 1187358001, Almanya)	1 tablet

3.9.2. Total protein miktarının ölçümü

Hücre lizatlarında total protein miktar tayini BCA protein analiz kiti (Pierce Biotechnology 23227, Amerika) kullanılarak 562 nm dalga boyunda mikroplak okuyuculu spektrofotometrede ölçülmüştür (BIO-TEK µQuant, BIO-TEK Instruments, Inc, Amerika). Her örnekten 60 µg olacak şekilde dilüsyon yapılmış ve 6x bromfenol mavisi yükleme boyası (New England Biolabs B7021S, MA) eklenerek, 95°C'de 5 dk inkübe edilmiş ve buza alınarak hızlıca soğutularak örnekler denatüre edilmiştir.

3.9.3. Sodyum dodezil sülfat (SDS) poliakrilamid jel elektroforezi

%12,5 ve % 8'lik SDS poliakrilamid jel, ayırıcı ve sıkıştırıcı jel olarak iki kısımda hazırlanmıştır. SDS poliakrilamid jeller Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5.' te belirtilen oranlarda hazırlanmıştır. Önceden boyanmış protein moleküler belirteç (Pierce Biotechnology 26691, Amerika) ve denatüre edilmiş örnekler hazırlanan SDS

poliakrilamid jellere yüklenmiş ve Mini-Protean Tetra Cell dikey elektroforez sistemi (BIO-RAD 165-8000, Hercules, CA) kullanılarak 140 voltta yaklaşık 2 saat yürütülmüştür.

Çizelge 3.4. Okludin proteini için hazırlanan % 12,5 SDS poliakrilamid jel içerikleri

Ayrıştırıcı Jel (% 12,5)		Sıkıştırıcı Jel	
Akrilamid/Bisakrilamid % 40	3,15 ml	Akrilamid/Bisakrilamid % 40	0,525 ml
1,5 M Tris HCl pH 8,8	4 ml	0,5 M Tris HCl pH 6,8	0,6 ml
% 1 SDS	1 ml	% 1 SDS	0,5 ml
Tri-Distile su	1,85 ml	Tri-Distile su	3,375 ml
Amonyum Persülfat (APS)	0,1 ml	APS	0,05 ml
Tetra etilen diamin (TEMED)	0,01 ml	TEMED	0,005 ml

Çizelge 3.5. N-kaderin proteini için hazırlanan % 8 SDS poliakrilamid jel içerikleri

Ayrıştırıcı Jel (% 8)		Sıkıştırıcı Jel	
Akrilamid/Bisakrilamid % 30	2,65 ml	Akrilamid/Bisakrilamid % 30	0,83 ml
1,5 M Tris HCl pH 8,8	2,5 ml	0,5 M Tris HCl pH 6,8	0,63 ml
% 1 SDS	1 ml	% 1 SDS	0,5 ml
Tri-Distile su	3,75 ml	Tri-Distile su	2,95 ml
APS	0,1 ml	APS	0,05 ml
TEMED	0,01 ml	TEMED	0,005 ml

3.9.4. Protein Transferi

SDS poliakrilamid jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler polyviniliden florid (PVDF) membrana (0,45 µm, Amersham Hybond-P, GE Healthcare, İngiltere) yarı kuru transfer sistemi (Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell, BIO-RAD 170-3940, Hercules, CA) kullanılarak 25 voltta 1,5 saat transfer edilmiştir. Transfer sonrasında proteinlerin membrana aktarımlarının doğrulanması için membran Ponceus ile boyanmıştır.

3.9.5. Okludin ve N-kaderin proteinlerinin tespit edilmesi

Protein ifadelerinin gösterilebilmesi için proteinlerin aktarıldığı PVDF membran Çizelge 3.1' de belirtilen primer antikorlar ile +4°C'de gece boyu inkübe edilmiştir.

HRP işaretli anti-rabbit sekonder antikoru (Amersham, NA934, GE Healthcare, İngiltere) ile inkübe edildikten sonra ECL western blotlama substratı (Pierce, 32209, Rockford, Amerika) ile muamele edilmiştir. Membran karanlık odada radyografik filme aktarılmıştır (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, İngiltere). Kontrol ve uygulama gruplarına ait protein bantları karşılaştırılmıştır.

3.10. Trans Epiteliyel Elektriksel Direnç Ölçümü

SerW3 hücreleri başlangıç hücre sayısı 2×10^5 olacak şekilde 6 gözlü hücre kültürü plakları içerisine yerleştirilmiş PET 0,4 μm por çapındaki transparan membranlar üzerinde kültüre edilmiştir (Greiner Bio-One, ThinCertTM 657641, Amerika). Hücreler insertlere konulduktan sonra TEER günlük olarak ölçülmüş ve TEER değerinin sabitlendiği gün T-2 toksin uygulaması yapılmıştır. Uygulama sonrasında belirli aralıklarla TEER ölçümleri volt-ohm metre kullanılarak yapılmış (Millicell ERS-2, Milipore, Almanya) ve ölçüm sonuçları $\text{Ohm} \times \text{cm}^2$ olacak şekilde hesaplanmıştır.

3.11. T-2 Toksininin dekontaminasyonu

Çok güçlü bir toksin olan T-2 toksininin doğal yollardan parçalanması mümkün olmadığı için, deney aşamalarında kullanılan her türlü tek kullanımlık malzeme detoksifiye edildikten sonra atılmıştır. Detoksifikasyon için malzemeler yaklaşık 4 saat % 2,5 NaOCl ve 0,25 N NaOH solüsyonunda bekletilmiştir [130].

3.12. İstatistiksel Yöntemler

Deneylerden elde edilen veriler STATISTICA 8.0 istatistik programı kullanılarak, $p \leq 0,05$ önem kontrolü düzeyinde analiz edilmiştir. Tüm deneyler en az üç kez tekrarlanmıştır. Deneysel verilerde 24 ve 48 saat inkübasyon süresi ve T-2 toksin dozu olarak iki farklı değişken olduğu için çok yönlü varyans analizi (Factorial ANOVA) yapılmıştır. Çok yönlü varyans analizleri sonucunda, istatistiksel açıdan anlamlı P-değerleri veren parametreler için post hoc testlerinden Tukey testi uygulanmıştır.

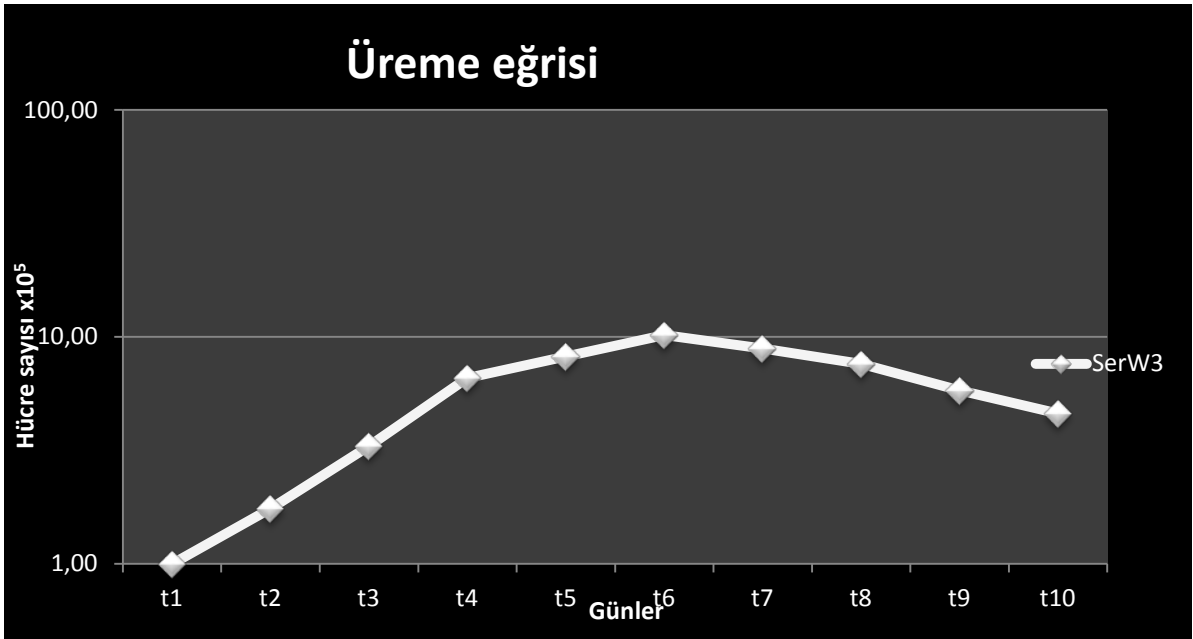
4. SONUÇLAR

4.1. Sterilite Testleri

SerW3 hücreleri mikoplazma kontaminasyonu açısından DAPI ile boyanarak test edilmiştir. Yapılan test sonuçlarına göre hücrelerde mikoplazmaya rastlanmamıştır.

4.2. Üreme Eğrisi

SerW3 hücrelerinin karakterinin belirlenebilmesi için yapılan 10 günlük hücre sayım sonuçları Şekil 4.1' de verilmiştir. En yüksek hücre sayısının t6 zamanına ait $10,2 \times 10^5$ hücre olduğu görülmektedir. Hücre sayımlarından elde edilen logaritmik hücre üreme eğrisine göre hücrelerin ikilenme zamanı PDT=40-50 saat olarak hesaplanmıştır.

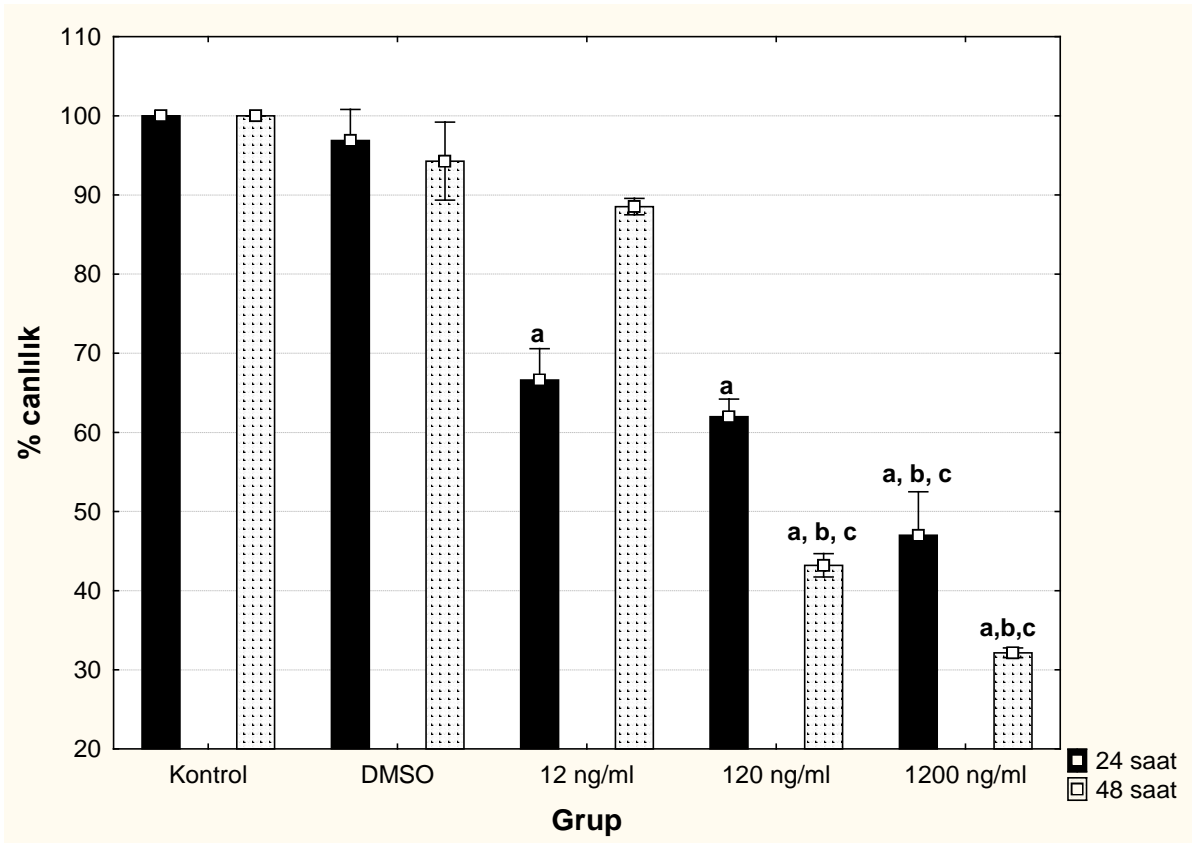


Şekil 4.1. SerW3 hücrelerine ait üreme eğrisi.

4.3. Hücre Canlılık Testi Sonuçları

T-2 toksininin hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT hücre canlılık testi ile değerlendirilmiştir. MTT testi sonuçları Şekil 4.2' deki grafikte gösterilmiştir. 24 ve 48 saat T-2 toksini ile inkübasyondan sonra SerW3 hücrelerindeki canlılık, inkübasyon süresine ve artan toksin dozuna bağlı olarak azalma göstermiştir. 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonrasında kontrol ve DMSO kontrol grupları hücre canlılığı açısından arasında istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır. 24 saat inkübasyon süresi sonunda 12 ng/ml ve 120 ng/ml T-2 toksini uygulanan

hücrelerde canlılık yüzdesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($P=0,0002$; $P=0,0002$) (Şekil 4.2). 1200 ng/ml T-2 toksini uygulanan hücrelerde ise canlılık yüzdesi kontrol, DMSO kontrol ve 12 ng/ml T-2 toksini grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($P=0,0002$; $P=0,0002$; $P=0,006$). 48 saat inkübasyon süresi sonunda 12 ng/ml T-2 toksini doz grubunda kontrol ve DMSO kontrol grubuna göre azalma olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir. 120 ng/ml ve 1200 ng/ml doz gruplarındaki canlılık yüzdeleri kontrol ($P=0,0002$; $P=0,0002$), DMSO kontrol ($P=0,0002$; $P=0,0002$) ve 12 ng/ml T-2 toksini uygulama grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir ($P=0,002$; $P=0,0002$).



^a Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$)

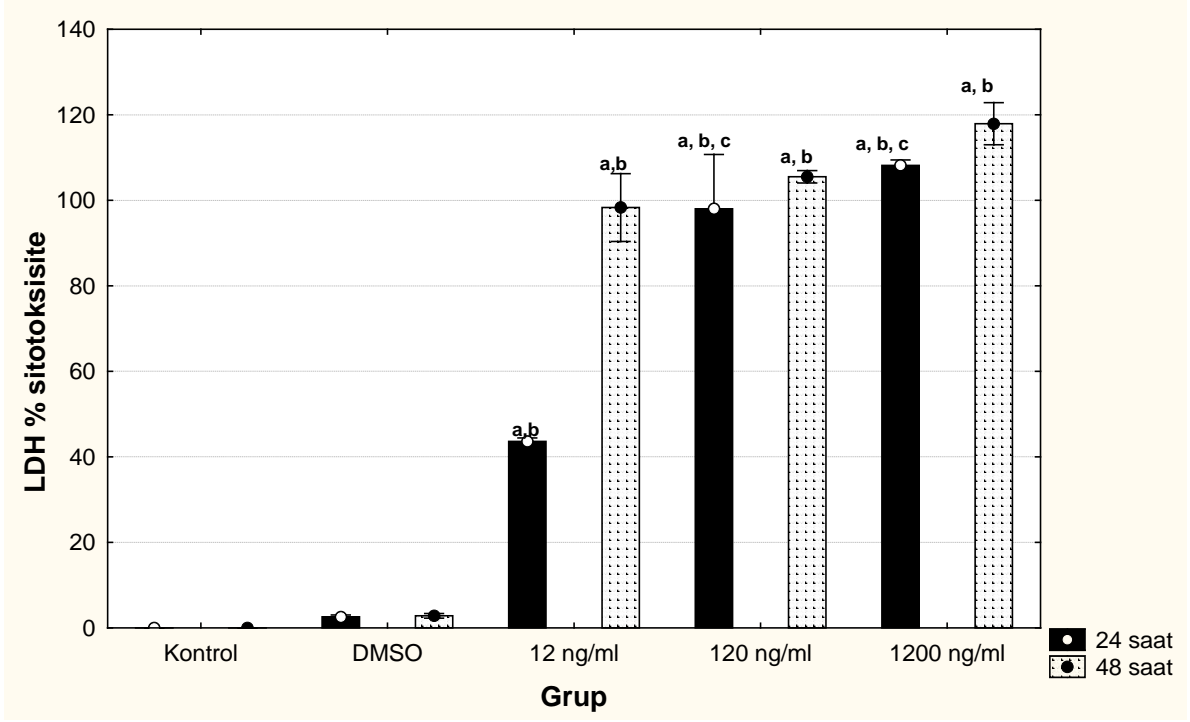
^b DMSO grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$)

^c 12 ng/ml T-2 toksin grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$)

Şekil 4.2. SerW3 hücrelerinde 24 ve 48 saat T-2 toksini inkübasyon süresi sonrası hücre canlılık yüzde değişim grafiği.

4.4. LDH Sitotoksisite Testi Sonuçları

T-2 toksininin SerW3 hücrelerinde sitotoksisitelerinin belirlenebilmesi için LDH kiti kullanılarak sitotoksisite yüzdeleri hesaplanmıştır. Hücrelerin sitotoksisite yüzdeleri Şekil 4.3' teki grafikte verilmiştir. LDH sitotoksisite testi sonuçlarına göre, 24 ve 48 saat T-2 toksini inkübasyonundan sonra sitotoksisite yüzdeleri inkübasyon süresine ve artan toksin dozuna bağlı olarak artış göstermiştir. Buna göre, kontrol ve DMSO kontrol gruplarında 24 ve 48 saat toksin inkübasyonu sonucu sitotoksisitede istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir. 24 saat T-2 toksin inkübasyonundan sonra SerW3 hücrelerinde 12 ng/ml doz grubunda sitotoksisite artışı kontrol ve DMSO kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklılık göstermiştir ($P=0,0003$; $P=0,0005$). 120 ng/ml ve 1200 ng/ml doz gruplarında ise sitotoksisite artışı kontrol ($P=0,0002$; $P=0,0002$), DMSO kontrol ($P=0,0002$, $P=0,0002$) ve 12 ng/ml T-2 toksini grubuna göre ($P=0,0002$; $P=0,0002$) istatistiksel olarak anlamlıdır. 48 saat inkübasyonundan sonra, SerW3 hücrelerinde 12 ng/ml, 120 ng/ml ve 1200 ng/ml doz gruplarında, kontrol ($P=0,0002$; $P=0,0002$; $P=0,0002$) ve DMSO kontrol grubuyla karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak sitotoksisite artışı gözlenmiştir ($P= 0,0002$, $P=0,0002$; $P=0,0002$).



^a Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$)

^b DMSO grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$)

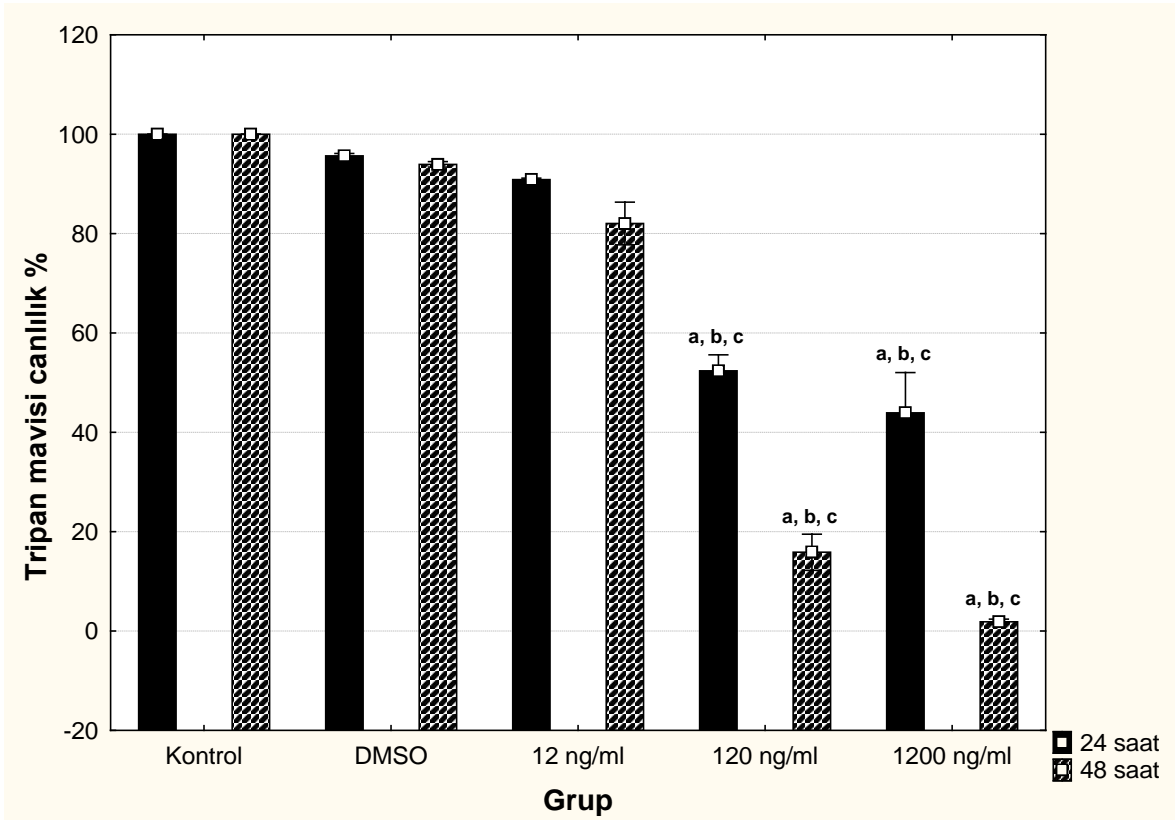
^c 12 ng/ml T-2 toksin grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$)

Şekil 4.3. SerW3 hücrelerinde 24 ve 48 saat T-2 toksini inkübasyon süresi sonrası sitotoksosite yüzde değişim grafiği.

4.5. Tripan Mavisi Hücre Canlılığı Testi Sonuçları

T-2 toksininin SerW3 hücrelerinde hücre canlılığının tespit edilebilmesi için tripan mavisi hücre canlılığı testi yapılarak canlı hücre yüzdesi hesaplanmıştır. Hücre canlılık yüzdeleri Şekil 4.4' de verilmiştir. 24 ve 48 saat T-2 toksini ile inkübasyonun sonunda T-2 toksininin artan dozuna ve inkübasyon süresine bağlı olarak azalma tespit edilmiştir. Test sonuçlarına göre, 24 saat ve 48 saat T-2 toksini ile inkübasyon sonrasında kontrol ve DMSO kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. 24 saat inkübasyon sonrasında 12 ng/ml doz grubunda kontrol ve DMSO kontrol grubuna göre azalma olmasına rağmen, azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. 120 ng/ml ve 1200 ng/ml doz gruplarında ise, kontrol ($P=0,0002$; $P=0,0002$), DMSO kontrol ($P=0,0002$; $P=0,0002$) ve 12 ng/ml doz grubu ($P=0,0002$; $P=0,0002$) ile karşılaştırıldığında hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. 48 saat inkübasyon süresi sonrasında 12 ng/ml doz grubundaki azalma

istatistiksel olarak anlamlı değildir. Fakat 120 ng/ml doz grubundaki canlılık yüzdesi % 20' lere kadar düşüş göstermiştir ve istatistiksel olarak kontrol, DMSO kontrol ve 12 ng/ml doz grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($P=0,0002$; $P=0,0002$; $P=0,0002$). Bunun yanı sıra 1200 ng/ml doz grubundaki canlılık yüzdesi yaklaşık % 2'ye kadar düşüş göstermiş ve kontrol, DMSO kontrol ve 12 ng/ml doz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir ($P=0,0002$; $P=0,0002$; $P=0,0002$).



^a Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$)

^b DMSO grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$)

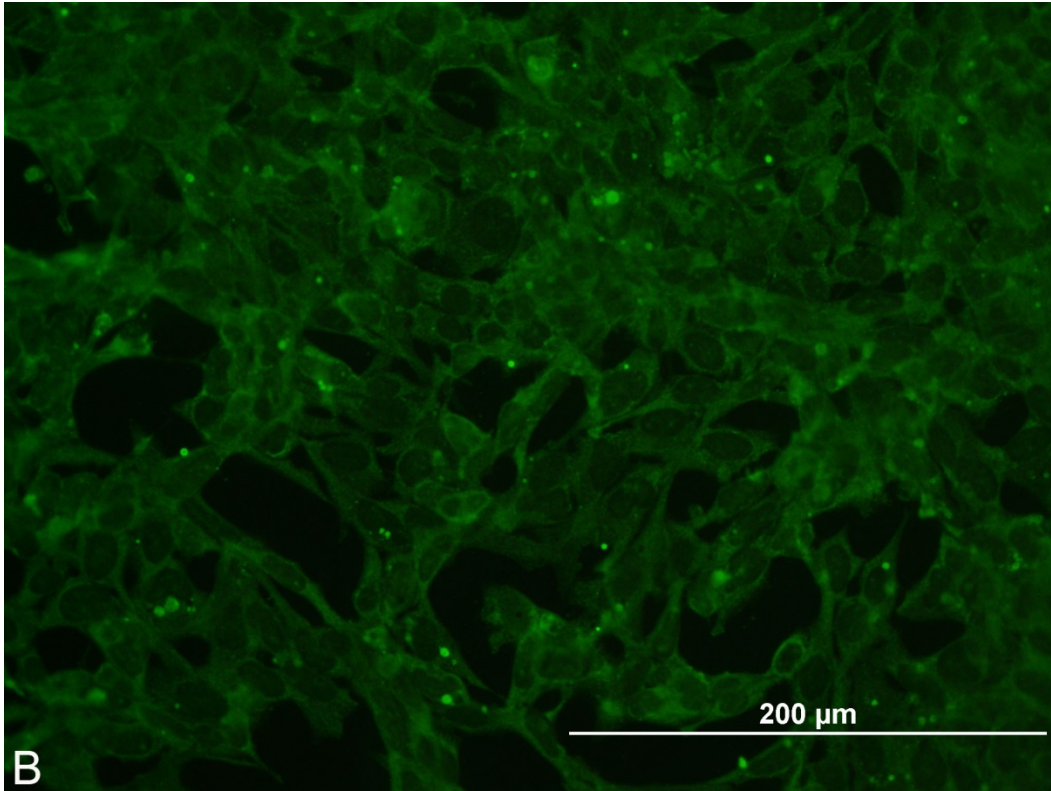
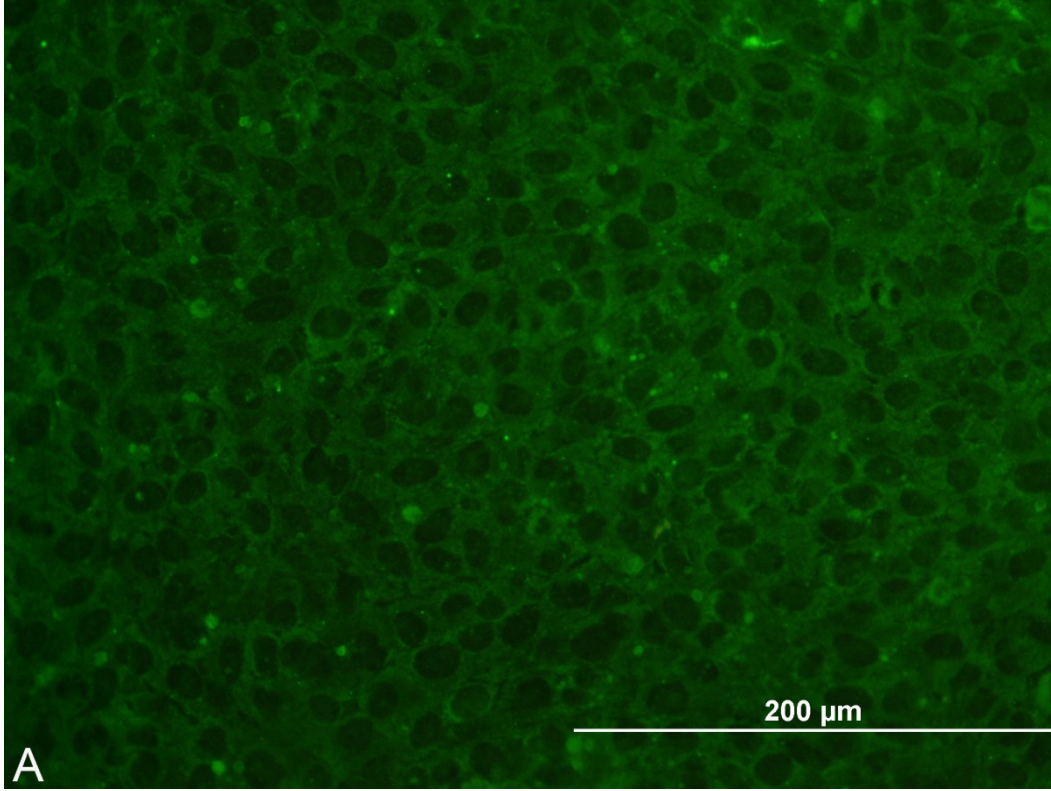
^c 12 ng/ml T-2 toksin grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$)

Şekil 4.4. SerW3 hücrelerinde 24 ve 48 saat T-2 toksini inkübasyon süresi sonrası tripan mavisi hücre canlılığı yüzde değişim grafiği.

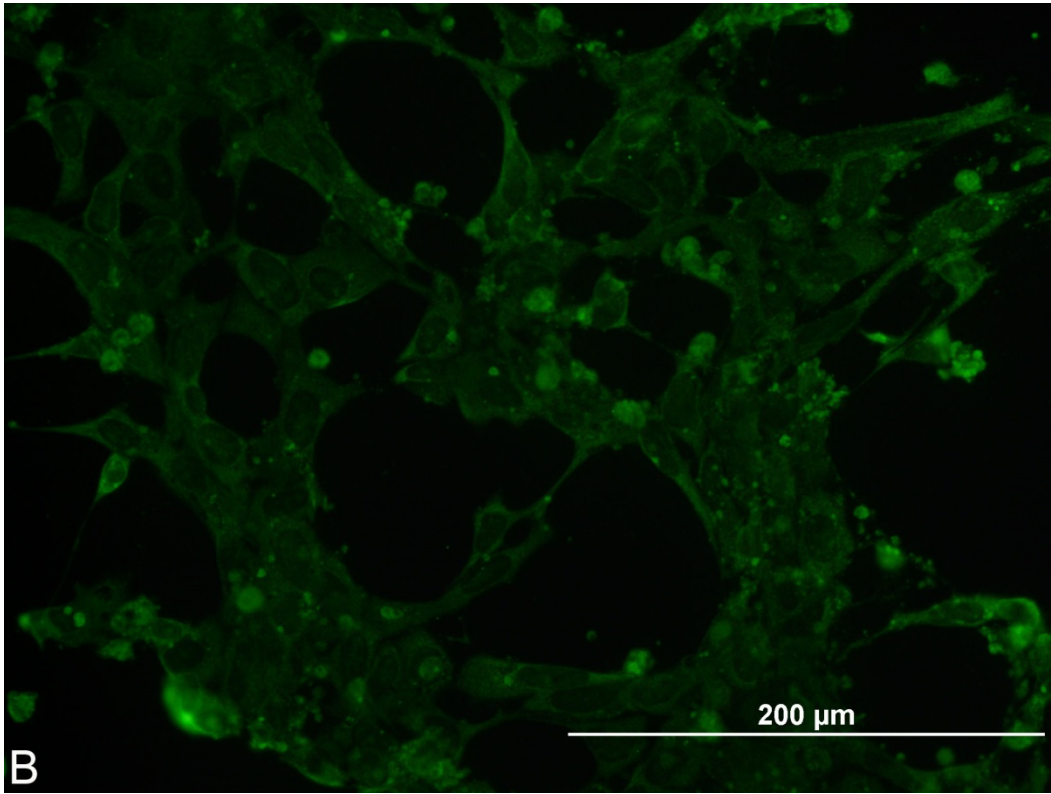
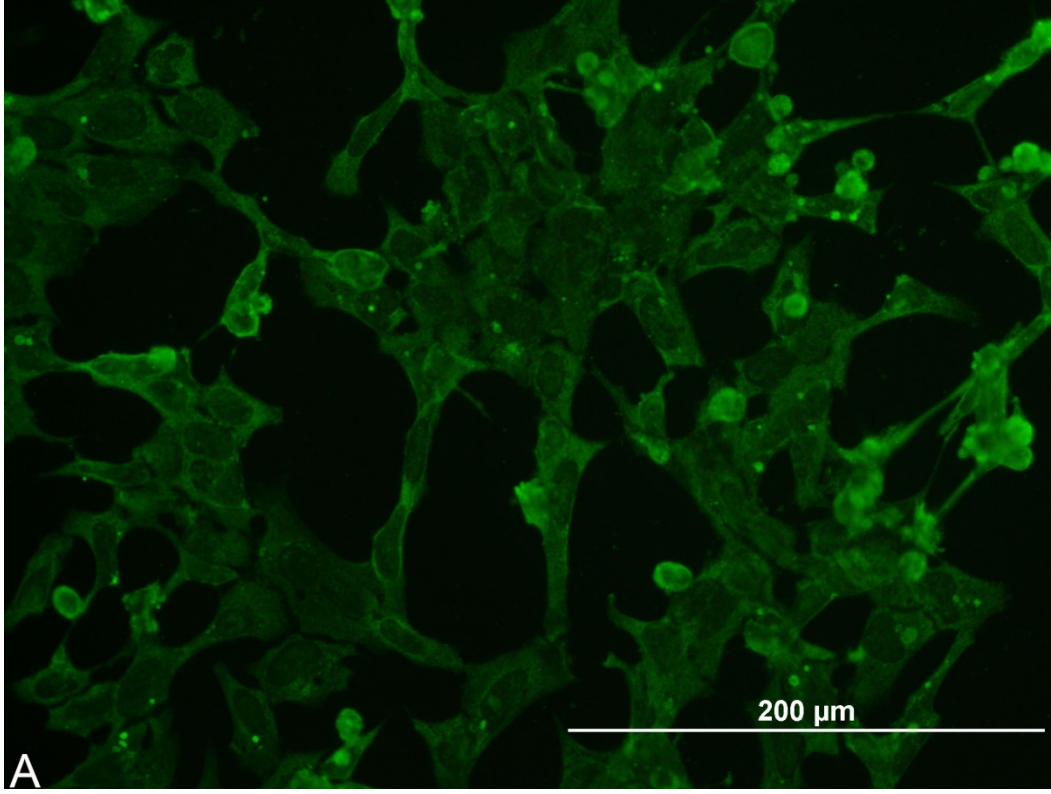
4.6. İmmunfloresan Boyama Sonuçları

4.6.1. Okludin İmmunfloresan Boyama Sonuçları

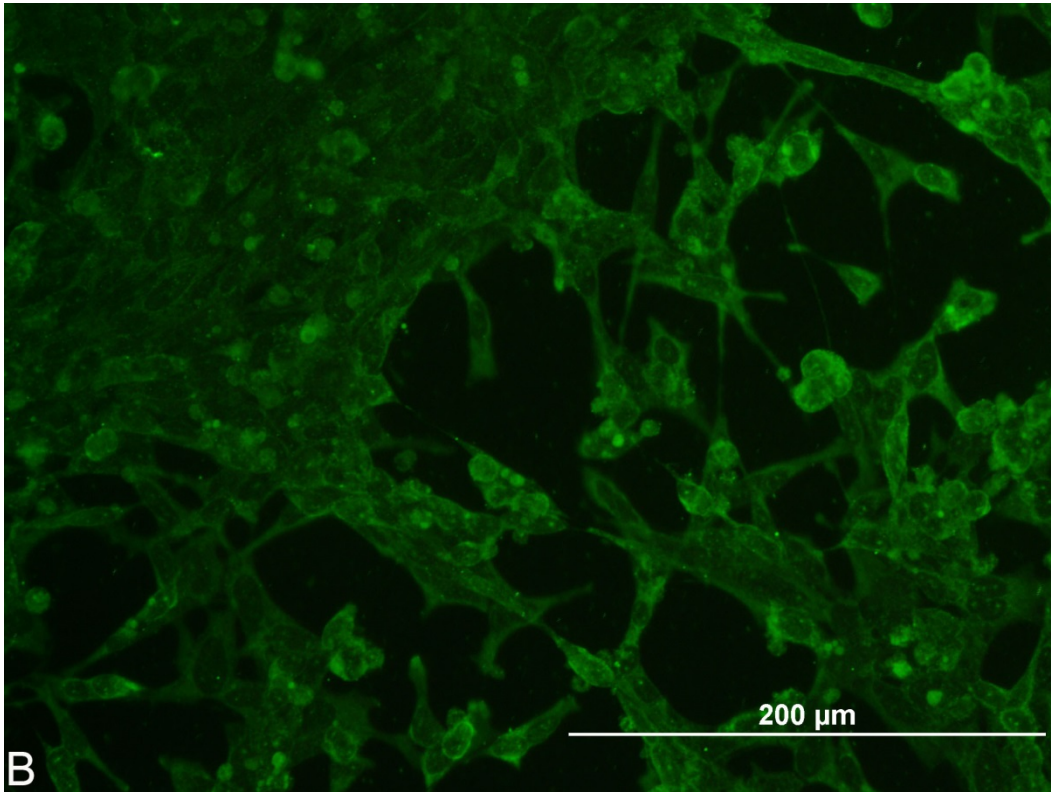
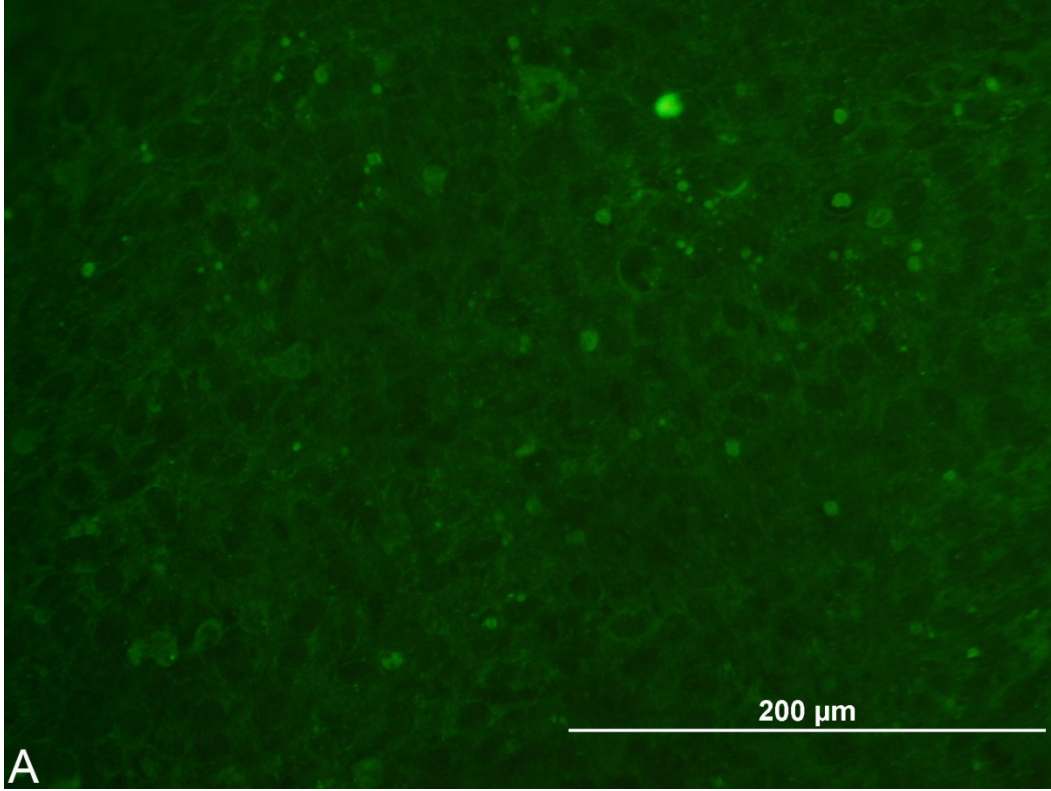
T-2 toksininin 24 ve 48 saat inkübasyonundan sonra SerW3 hücreleri okludin ifadesi için immünfloresan olarak boyanmış ve protein immünlokalizasyonları floresan mikroskopta incelenmiştir. T-2 toksini ile 24 saat inkübasyon süresi sonrasında, kontrol grubuna ait hücrelerde okludin proteininin hücre zarında yerleşim gösterdiği görülmüştür. 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonrasında kontrol grubu ile DMSO kontrol grubu arasında okludin boyaması açısından bir farklılık görülmediği için yalnızca kontrol grubuna ait görüntüler verilmiştir. T-2 toksini ile 24 saat inkübasyon sonrasında 12 ng/ml, 120 ng/ml ve 1200 ng/ml T-2 toksini uygulaması sonrasında hücrelerin okludin ifadeleri doza bağlı olarak azalmıştır (Şekil 4.5, Şekil 4.6). 48 saat inkübasyon sonrasında, okludin kontrol grubundaki hücrelerin zarında yerleşim gösterirken, 12 ng/ml T-2 toksini uygulanan hücrelerde okludin ifadesi azalmıştır (Şekil 4.7). 120 ng/ml ve 1200 ng/ml T-2 toksini uygulanan hücrelerde sitotoksite artışına bağlı olarak boyanma görülemediği düşünülmektedir.



Şekil 4.5. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 24 saat inkübasyon sonrası okludin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol grubu, B. 12 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.



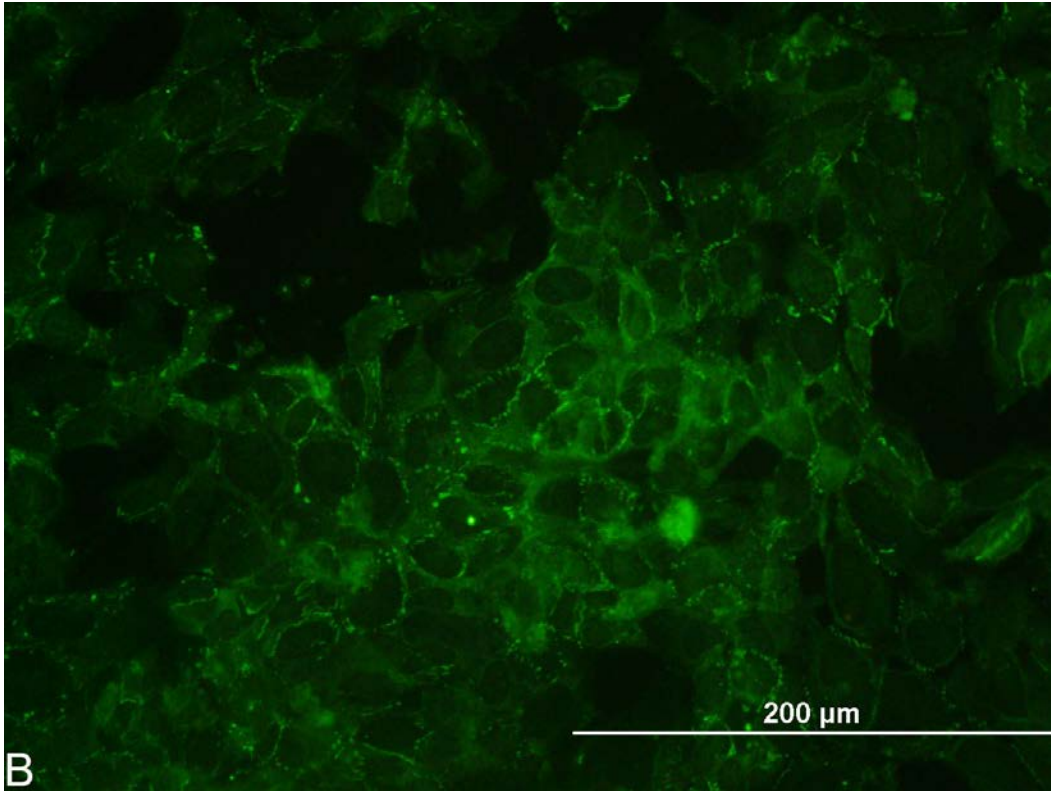
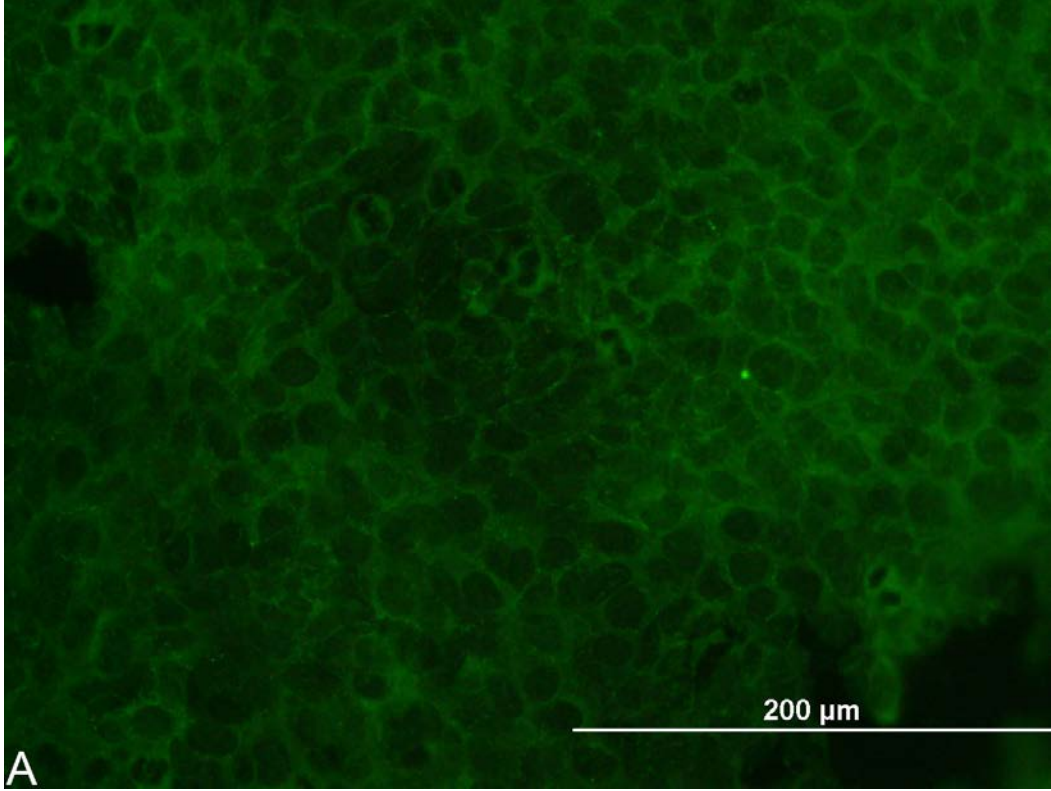
Şekil 4.6. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 24 saat inkübasyon sonrası okludin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. 120 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu, B. 1200 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.



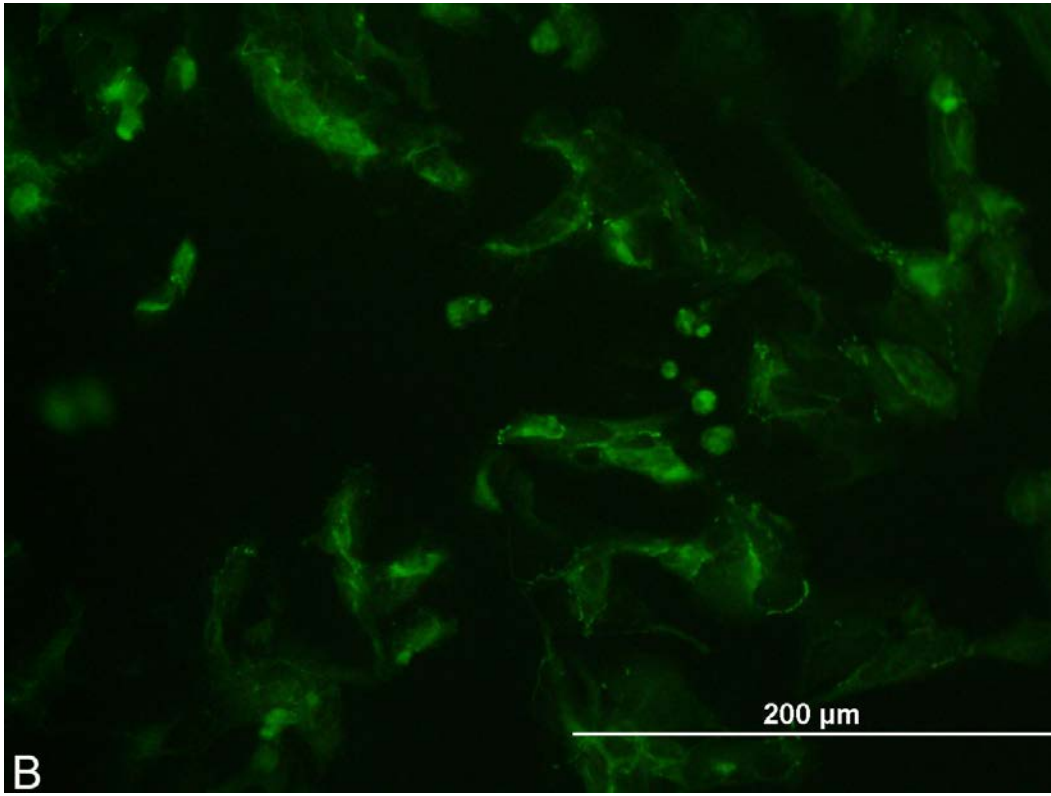
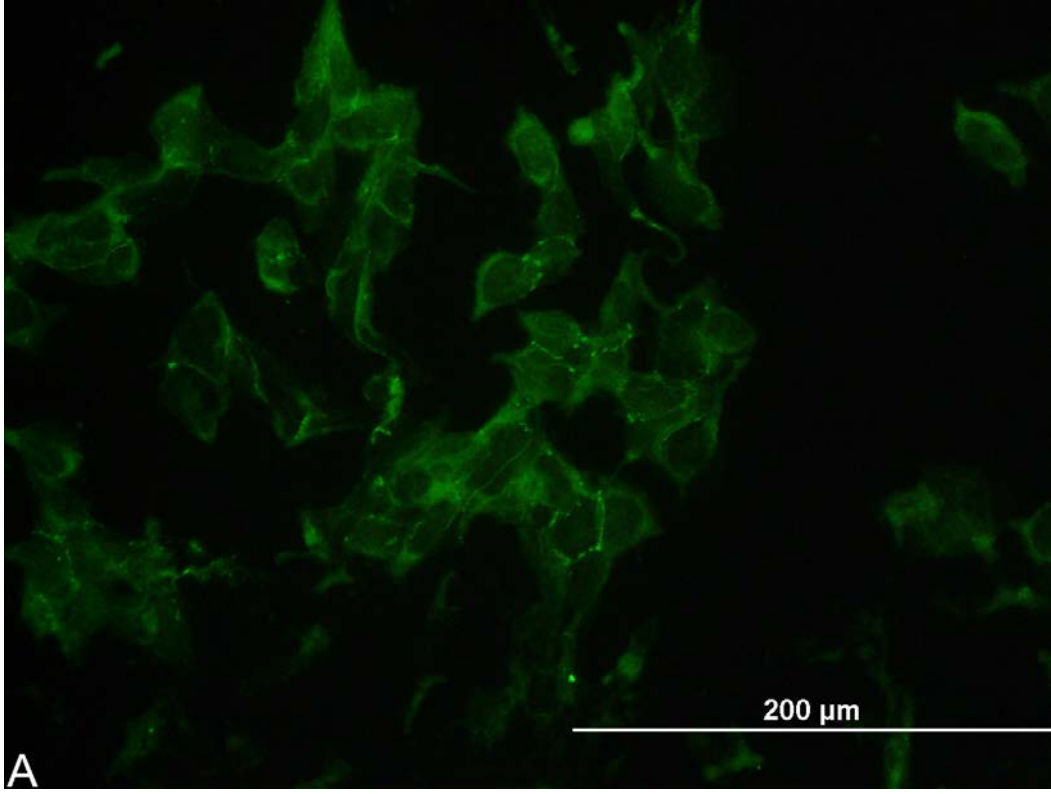
Şekil 4.7. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 48 saat inkübasyon sonrası okludin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A.Kontrol grubu, B. 12 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.

4.6.2. ZO-1 İmmunfloresan Boyama Sonuçları

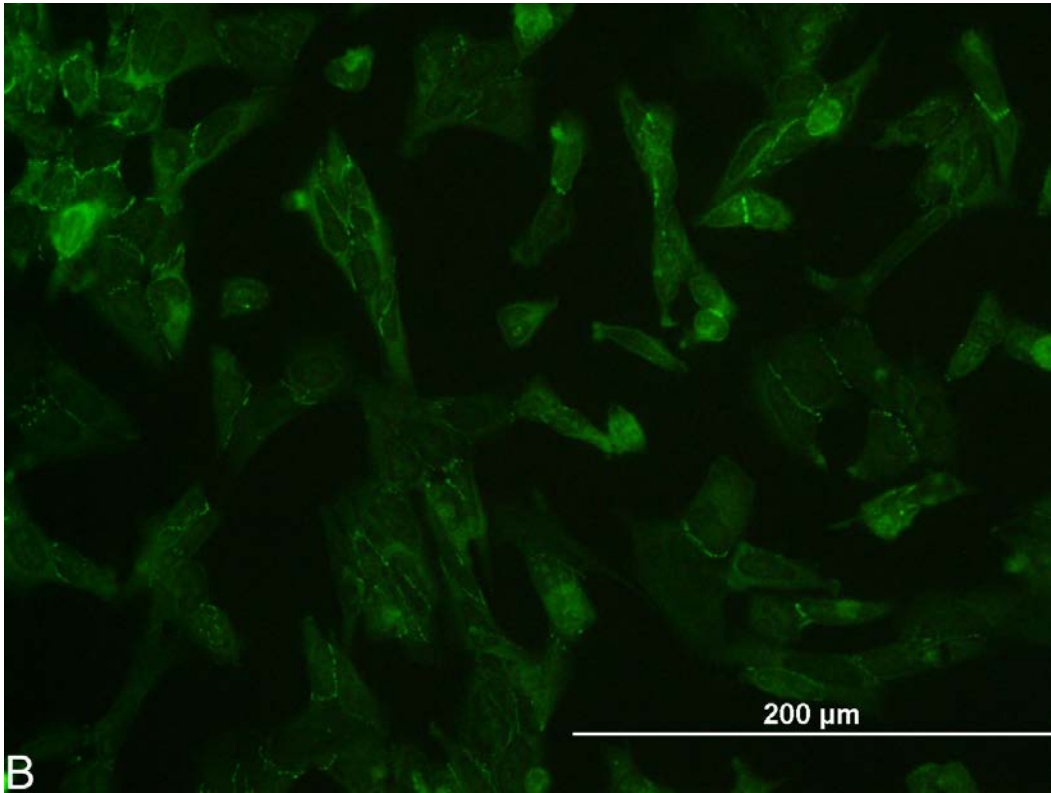
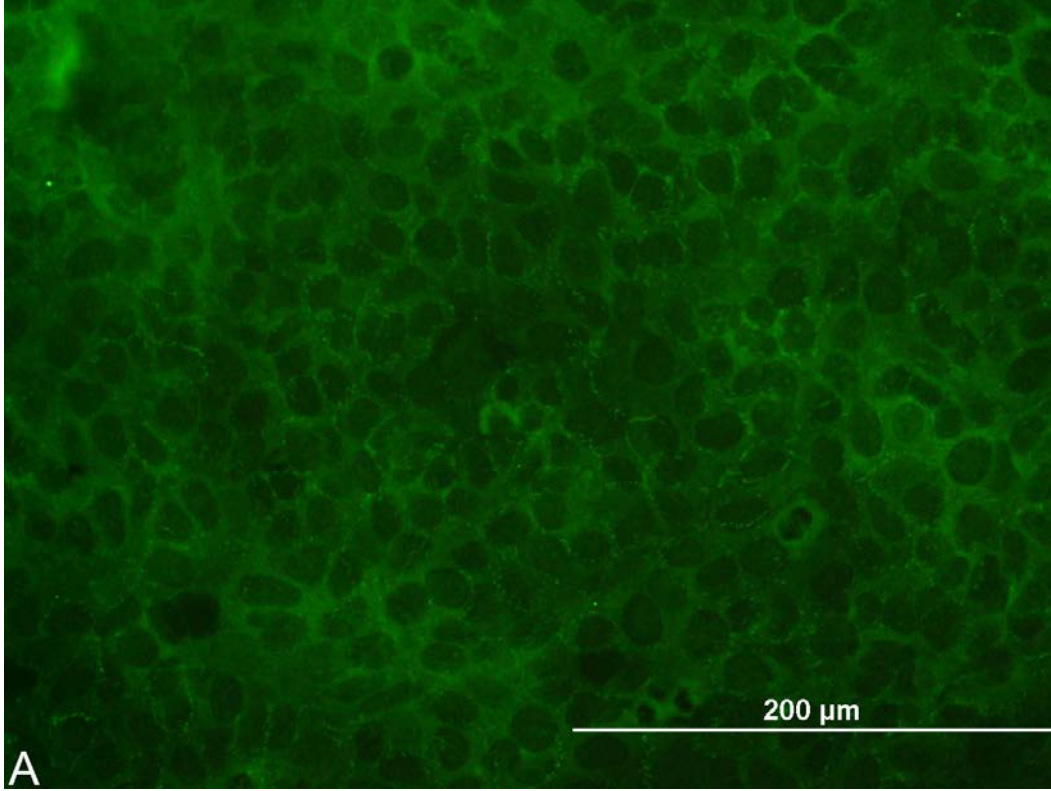
Okludin transmembran proteinine bağlanan bir protein olan ZO-1, SerW3 hücrelerinde immünfloresan olarak boyanmış ve protein immünlokalizasyonları floresan mikroskopta incelenmiştir. T-2 toksini ile 24 saat inkübasyon sonrasında, kontrol grubuna ait hücrelerde ZO-1 proteininin hücre zarında yerleşim gösterdiği görülmüştür. 24 ve 48 saat inkübasyon sonrasında kontrol grubu ile DMSO kontrol grubu arasında ZO-1 boyaması açısından bir farklılık görülmediği için yalnızca kontrol grubuna ait görüntüler verilmiştir. T-2 toksini ile 24 saat inkübasyon sonrasında, kontrol grubuna ait hücrelerde ZO-1 proteini hücre zarı yakınında yerleşim göstermiştir. 12, 120 ve 1200 ng/ml T-2 toksin uygulama gruplarında ZO-1 proteinin ifadesi doza bağlı olarak azalmıştır (Şekil 4.8, Şekil 4.9). SerW3 hücrelerine 48 saat T-2 toksini uygulamasından sonra, kontrol grubuna ait hücrelerde ZO-1 proteini hücre zarı yakınında yerleşim göstermiştir. 12 ng/ml T-2 toksini uygulama grubunda protein ifadesi azalmıştır (Şekil 4.10). Daha yüksek dozlar olan 120 ng/ml ve 1200 ng/ml T-2 toksini uygulanan hücrelerde sitotoksosite artışından dolayı hücre sayısı azalmış ve hücre zarları hasar gördüğü için hücre bütünlüğü bozulmuştur (Şekil 4.11). Aynı zamanda protein ifadelerinde de azalma tespit edilmiştir.



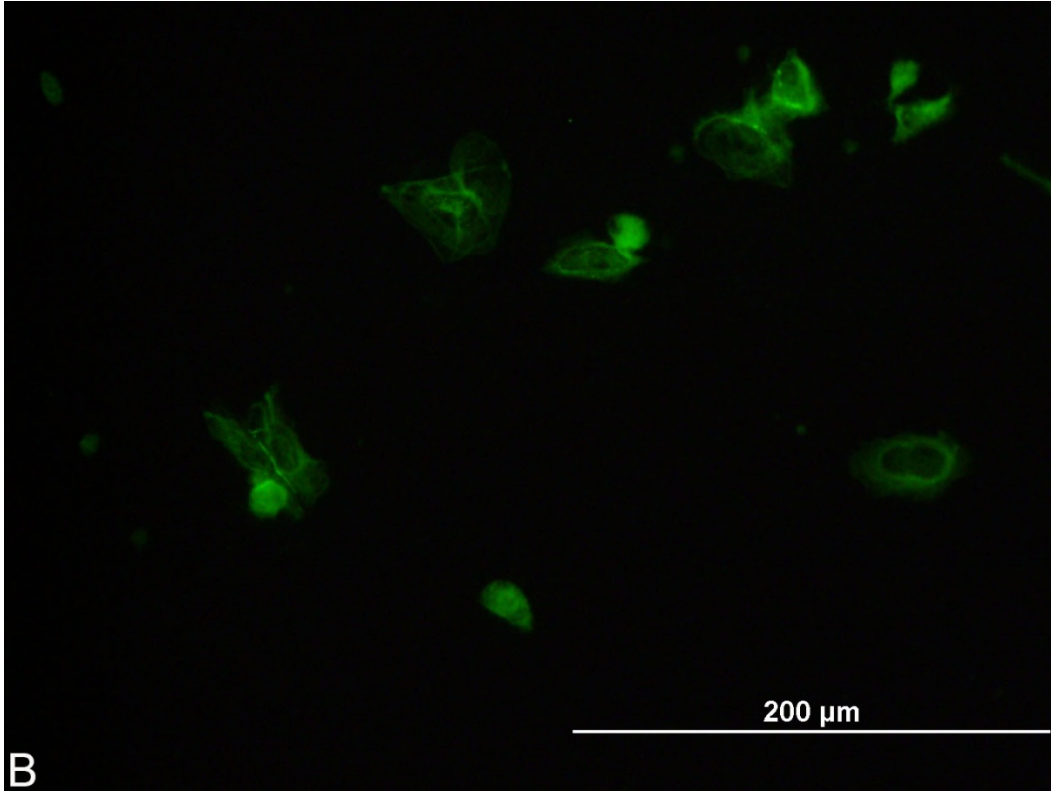
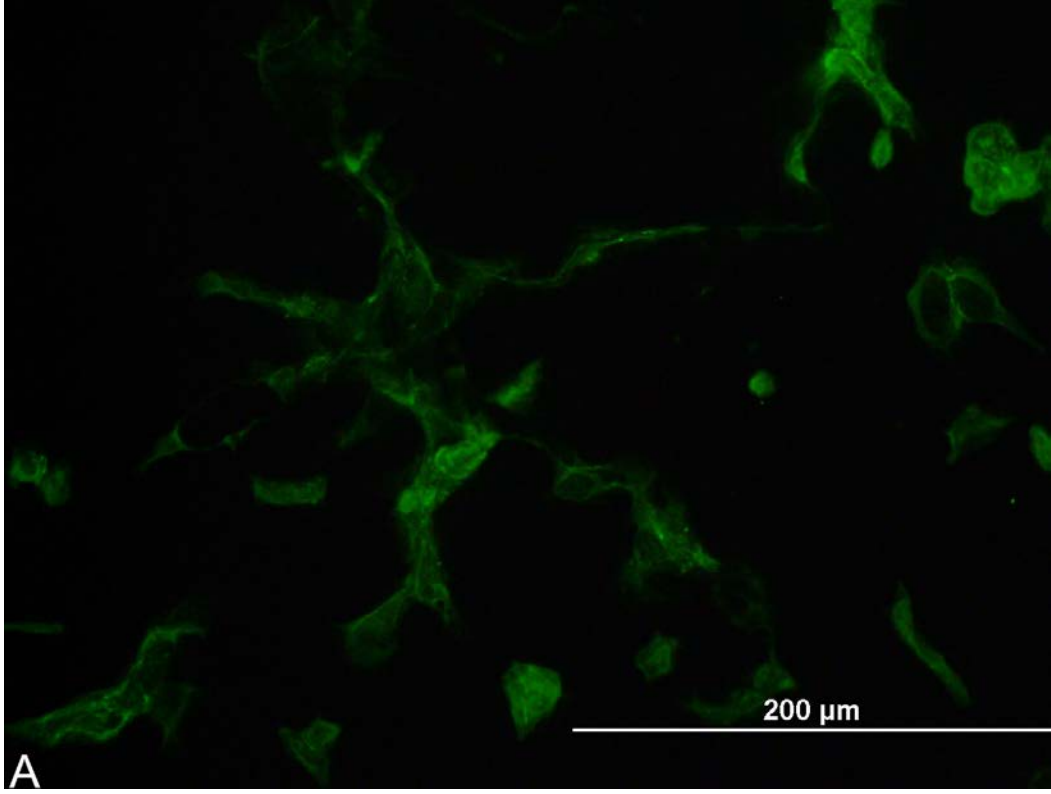
Şekil 4.8. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 24 saat inkübasyon sonrası ZO-1 immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol grubu, B. 12 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.



Şekil 4.9. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 24 saat inkübasyon sonrası ZO-1 immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. 12 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu, B. 1200 ng/ml T-2 toksin grubu.



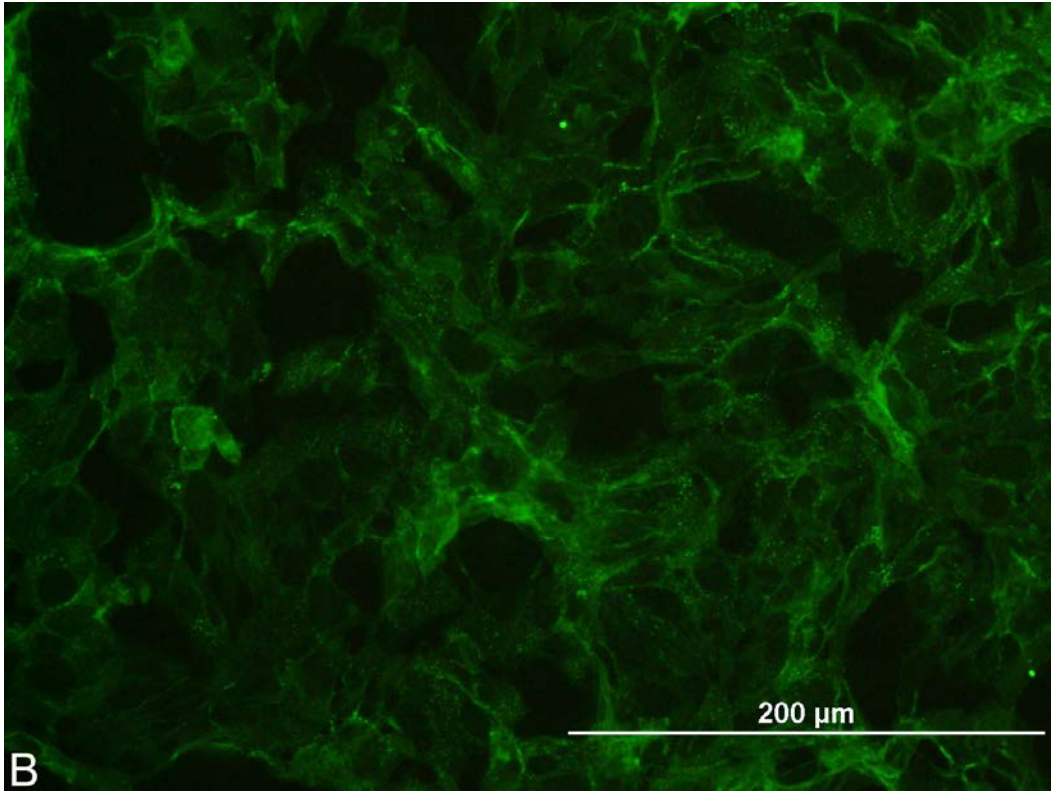
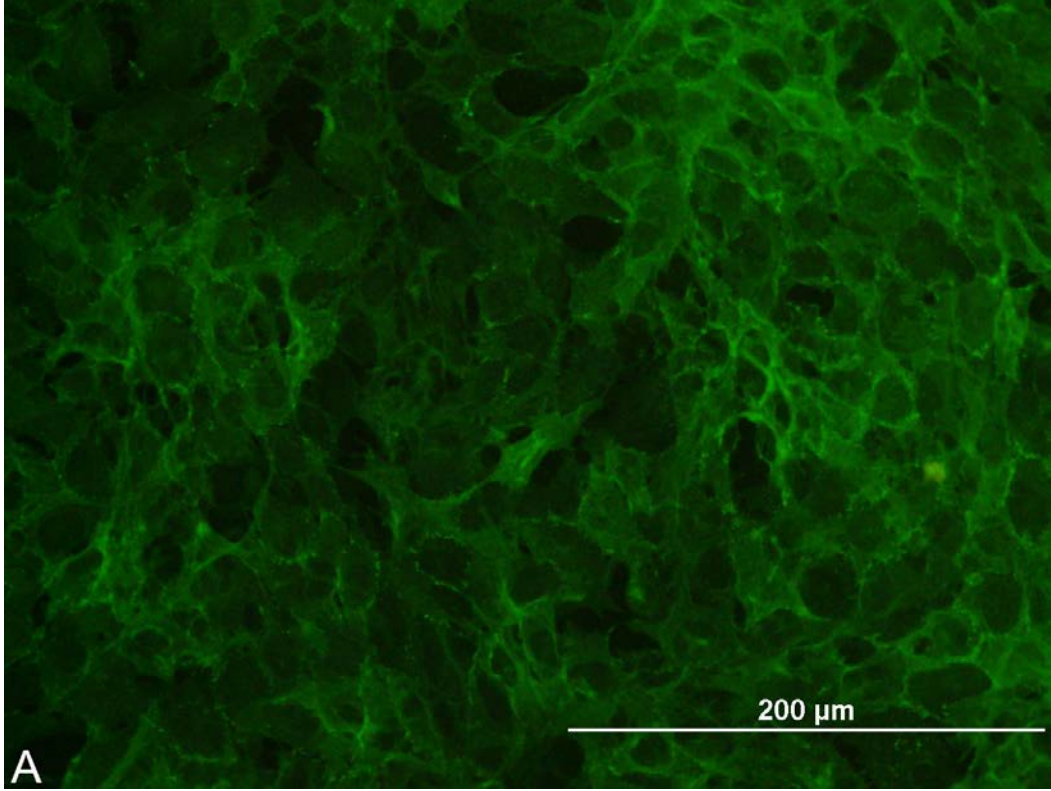
Şekil 4.10. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 48 saat inkübasyon sonrası ZO-1 immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol grubu, B. 12 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.



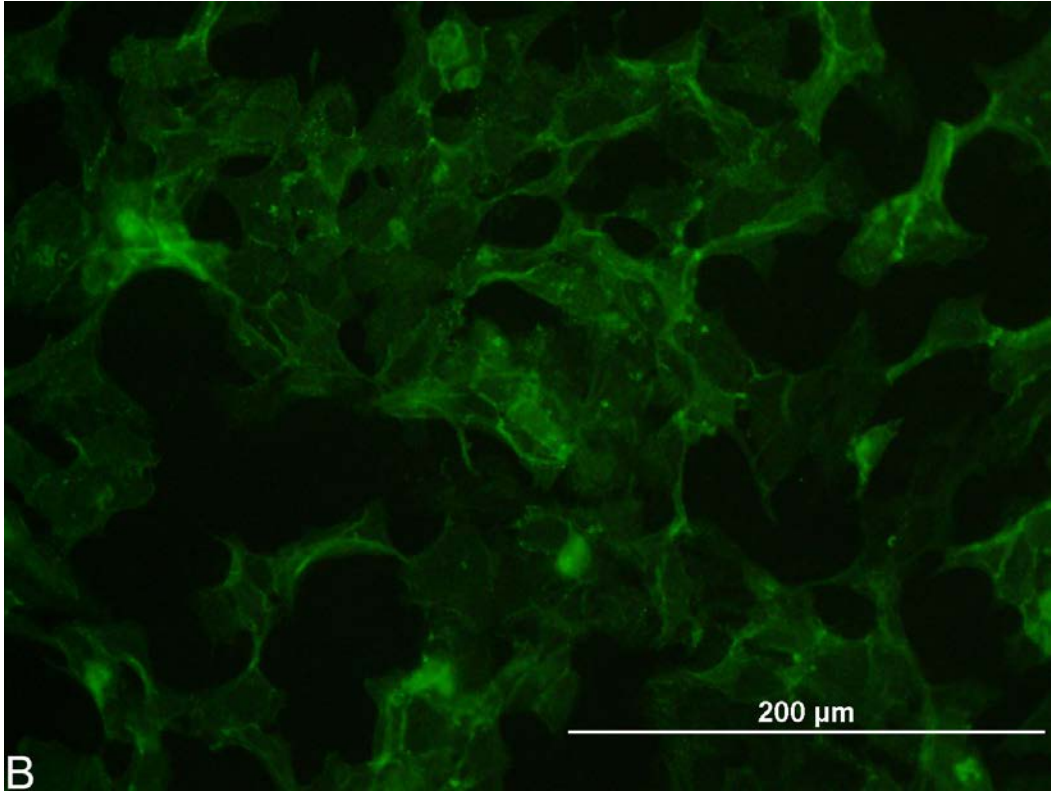
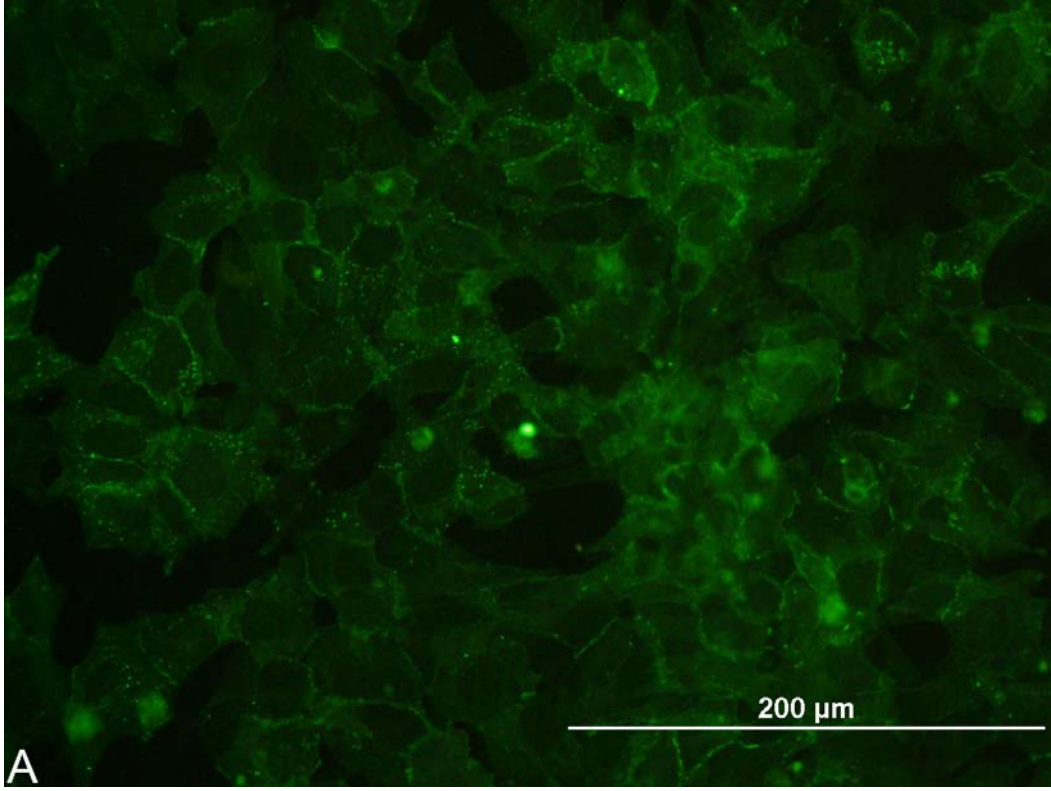
Şekil 4.11. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 48 saat inkübasyon sonrası ZO-1 immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. 120 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu, B. 1200 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.

4.6.3. N-Kaderin İmmü Floresan Boyama Sonuçları

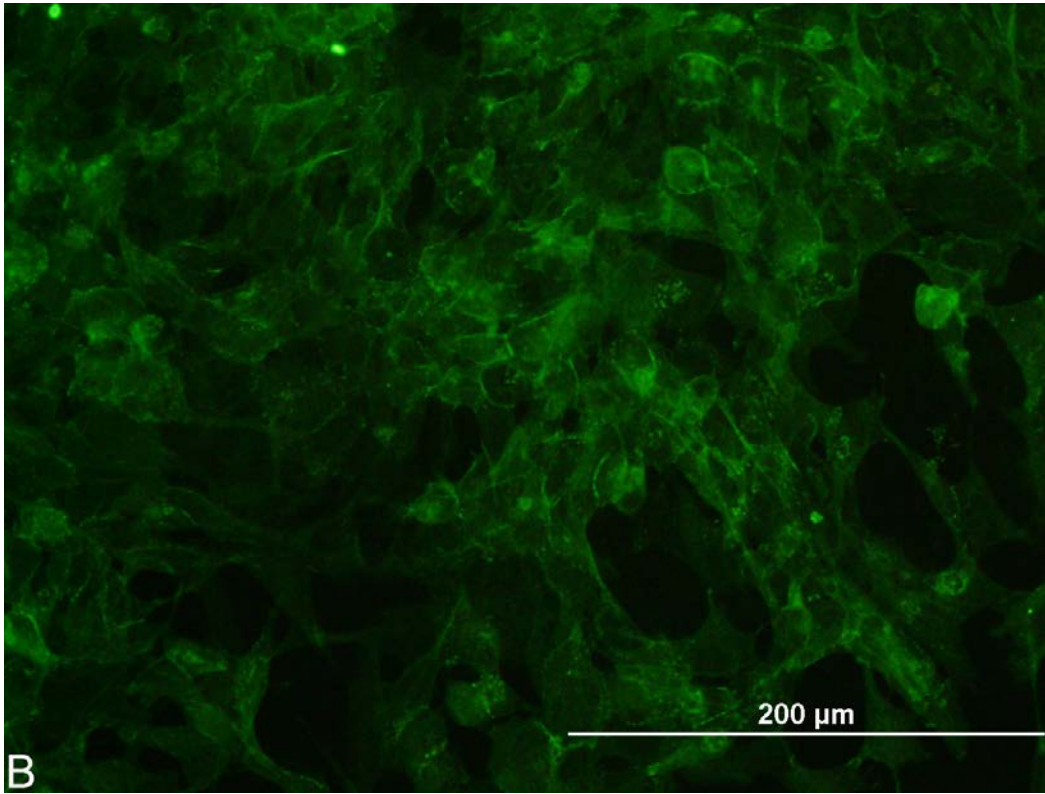
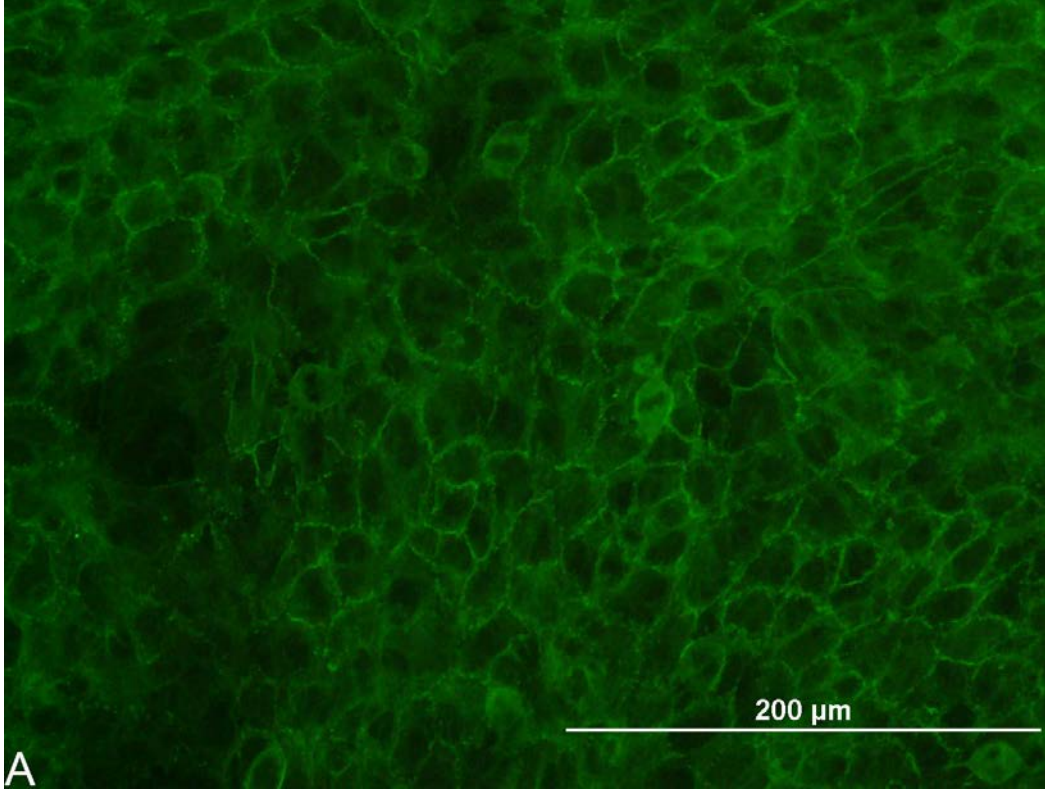
T-2 toksininin 24 ve 48 saat inkübasyonundan sonra, SerW3 hücrelerindeki N-kaderin ifadesi için immü floresan olarak boyanmış ve protein immü lokalizasyonları floresan mikroskopta incelenmiştir. T-2 toksini ile 24 saat inkübasyon sonrasında, kontrol grubuna ait hücrelerde N-kaderin proteini hücre zarında yerleşim göstermiştir. 24 ve 48 saat inkübasyon sonrasında kontrol grubu ile DMSO kontrol grubu arasında N-kaderin boyaması açısından bir farklılık görülmediği için yalnızca kontrol grubuna ait görüntüler verilmiştir. 12 ng/ml T-2 toksini uygulama grubunda protein ifadesi sitoplazmik olarak görülmektedir. 120 ng/ml ve 1200 ng/ml T-2 toksini uygulama gruplarında N-kaderin protein ifadesi azalmıştır ve boyanma sitoplazmada görülmüştür. Şekil 4.12 ve Şekil 4.13' te T-2 toksini ile 24 saat inkübasyon sonrası SerW3 hücrelerine ait N-kaderin immü floresan boyama sonuçları verilmiştir. T-2 toksini ile 48 saat inkübasyon sonrasında, kontrol grubuna ait hücrelerde N-kaderin proteini hücre zarında yerleşim göstermektedir. 12 ng/ml ve 120 ng/ml T-2 toksini uygulama gruplarında protein ifadeleri azalmış ve boyamalar sitoplazmik olarak görülmüştür. Ayrıca 120 ng/ml doz grubunda sitotoksiteden dolayı hücre bütünlüğü bozulmuştur. 1200 ng/ml T-2 toksin uygulama grubunda 48 saat inkübasyonda yüksek sitotoksiteden dolayı boyanmış hücre görülememiştir. Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te T-2 toksini ile 48 saat inkübasyon sonrası SerW3 hücrelerine ait N-kaderin immü floresan boyama sonuçları verilmiştir.



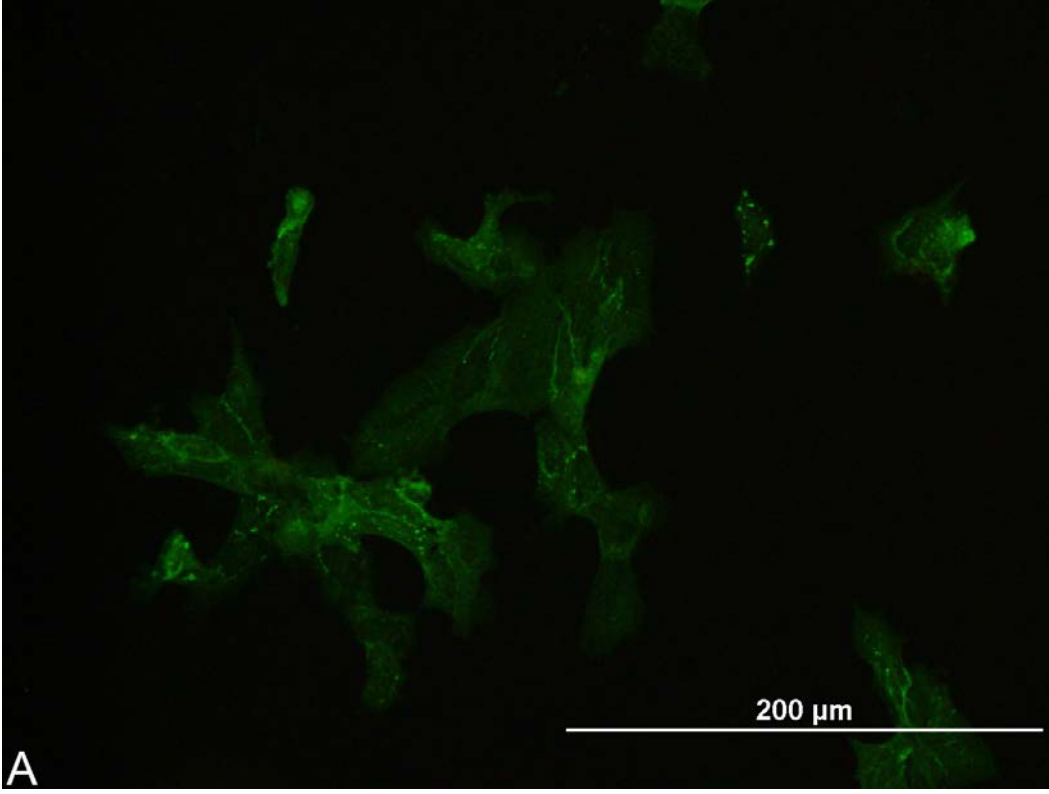
Şekil 4.12. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 24 saat inkübasyon sonrası N-kaderin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol grubu, B. 12 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.



Şekil 4.13. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 24 saat inkübasyon sonrası N-kaderin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. 120 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu, B. 1200 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.



Şekil 4.14. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 48 saat inkübasyon sonrası N-kaderin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol grubu, B. 12 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.

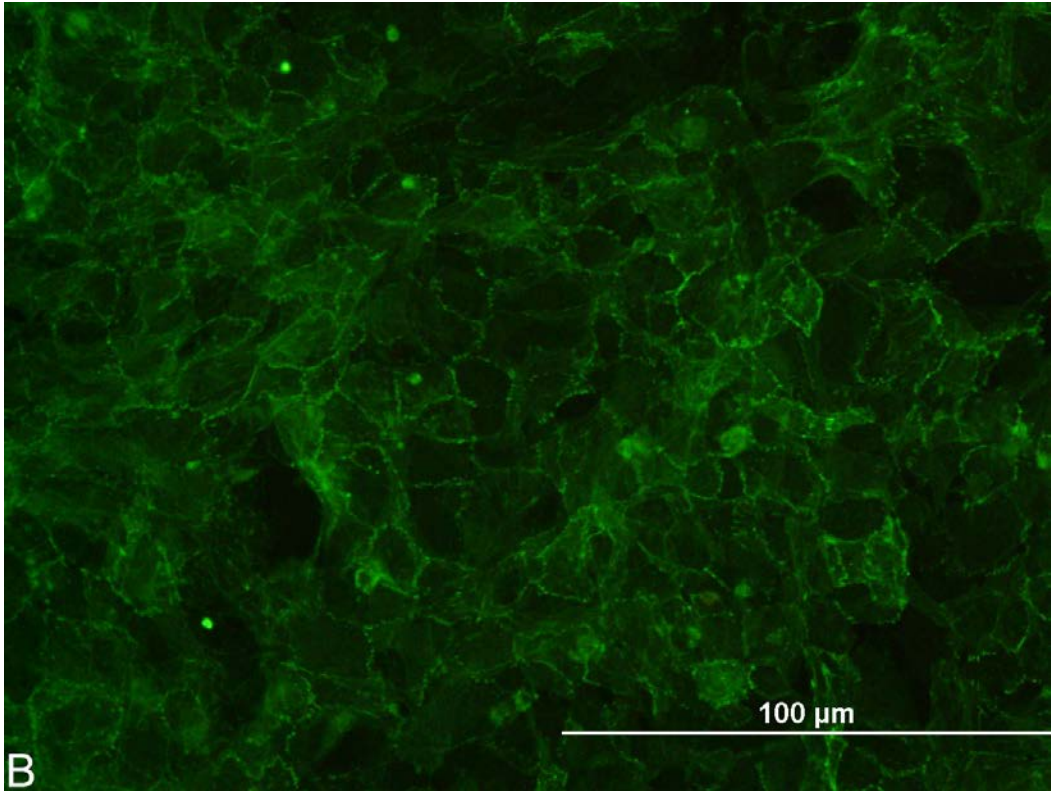
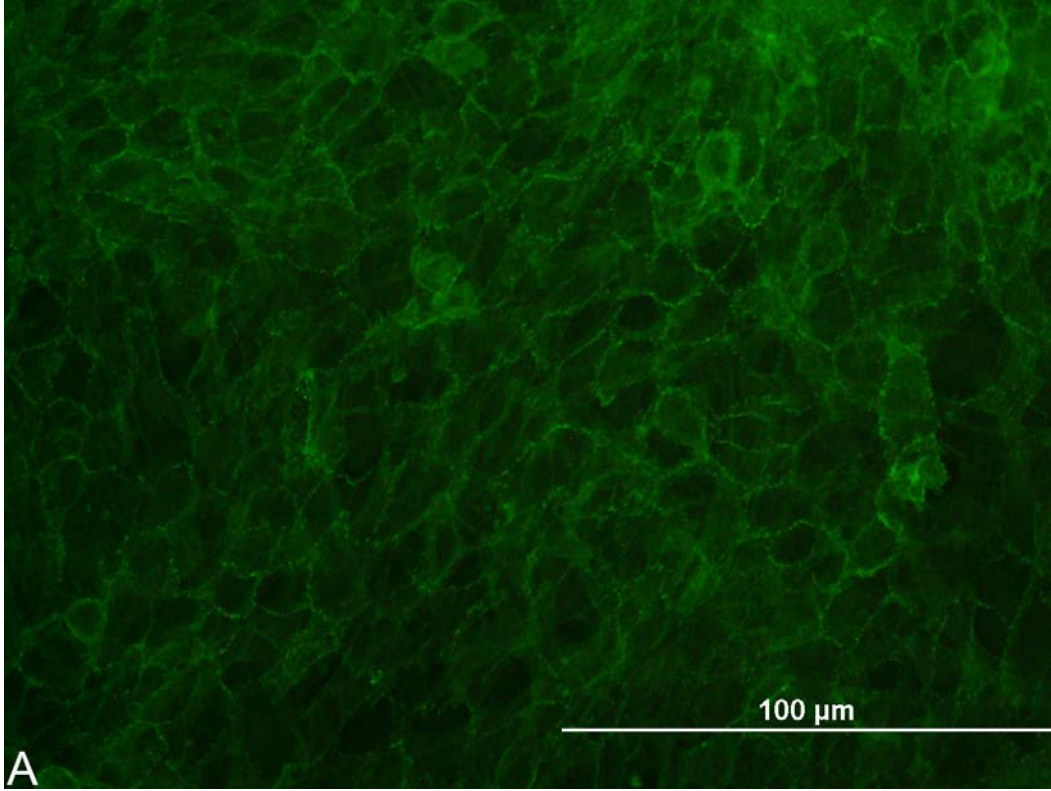


Şekil 4.15. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 48 saat inkübasyon sonrası N-kaderin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. 120 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.

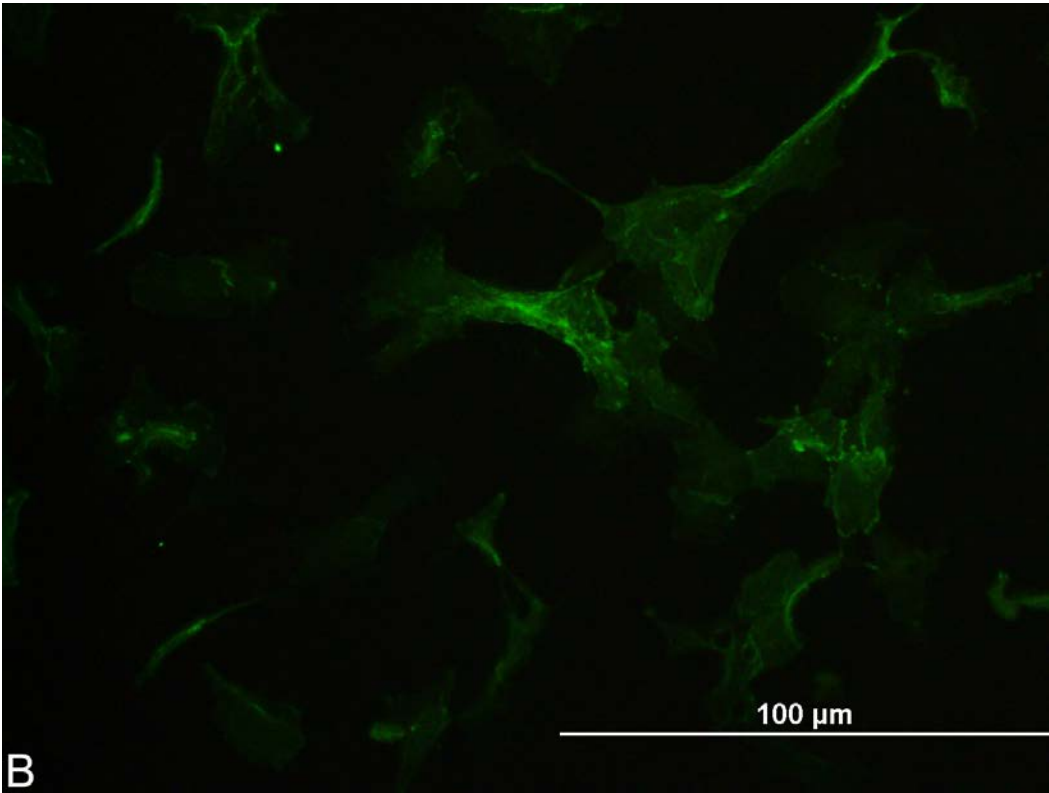
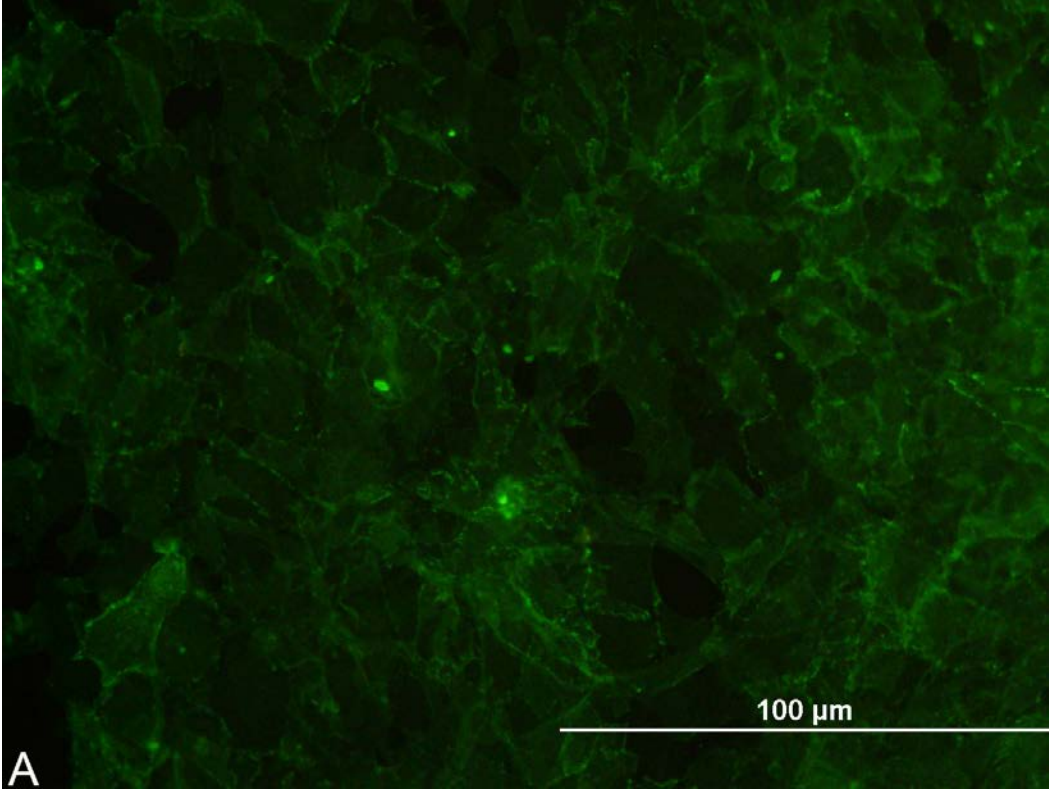
4.6.4. β -katenin İmmü Floresan Boyama Sonuçları

N-kaderin transmembran proteinine bağlanan bir protein olan β -katenin, SerW3 hücrelerinde immü floresan olarak boyanmış ve proteinin hücredeki immü lokalizasyonu gösterilmiştir. 24 ve 48 saat inkübasyon sonrasında kontrol grubu ile DMSO kontrol grubu arasında β -katenin boyaması açısından bir farklılık görülmediği için yalnızca kontrol grubuna ait görüntüler verilmiştir. T-2 toksini ile 24 saat inkübasyon süresi sonrasında, kontrol grubuna ait hücrelerde β -katenin proteini hücre zarı yakınında yerleşim göstermiştir. 12, 120 ve 1200 ng/ml T-2 toksin uygulama gruplarında β -katenin proteinin ifadesi doza bağlı olarak azalmıştır ve hücre zarına yakın bölgelerde kısmi olarak boyandığı tespit edilmiştir. Şekil 4.16 ve Şekil 4.17' de SerW3 hücrelerine 24 saat T-2 toksini uygulaması sonrasında β -katenin immü floresan sonuçları verilmiştir.

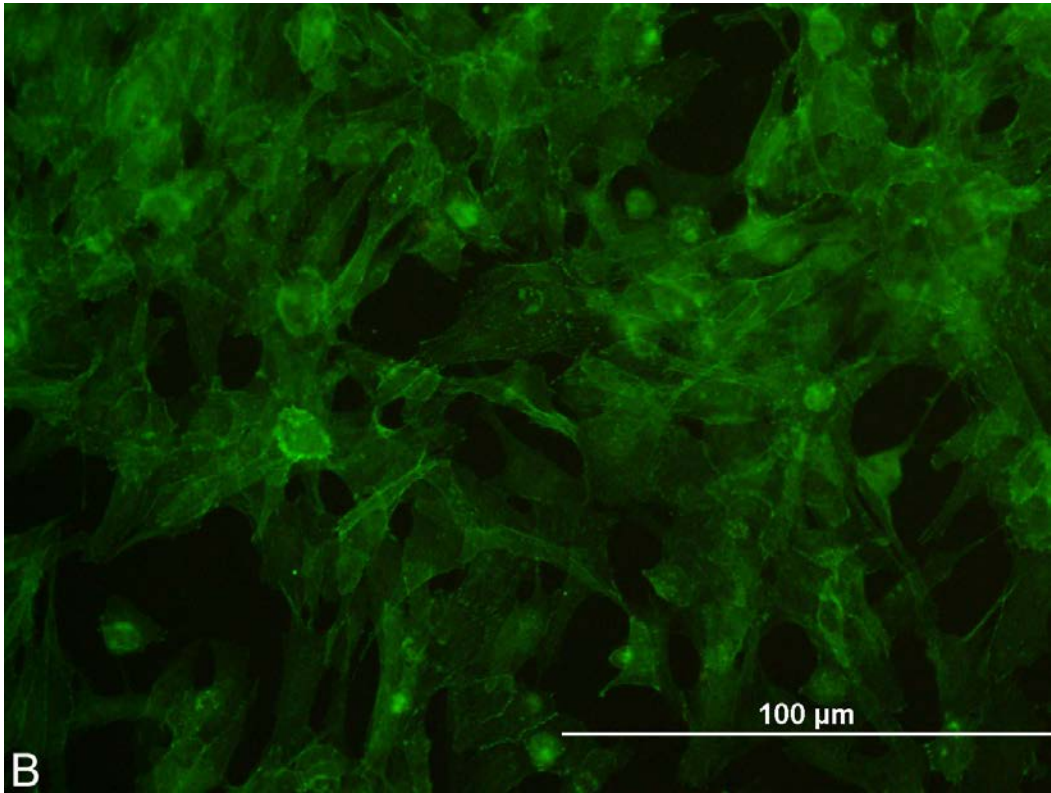
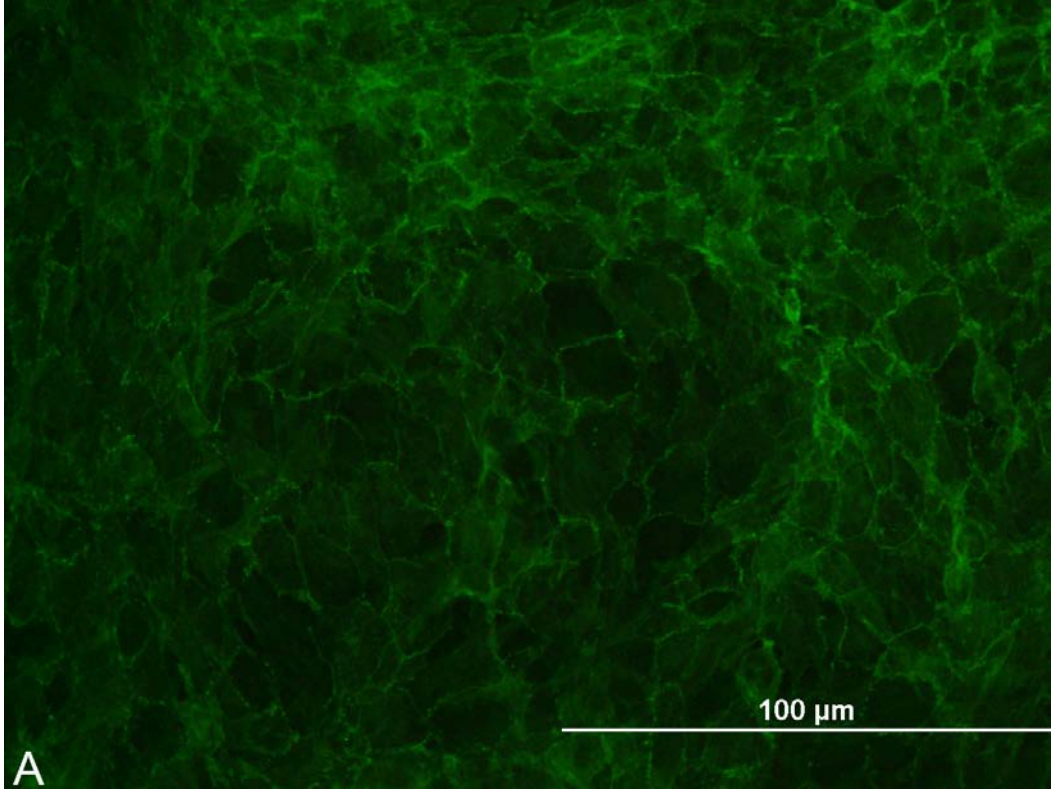
T-2 toksini ile 48 saat inkübasyon süresi sonrasında, kontrol grubuna ait hücrelerde β -katenin proteini hücre zarı yakınında yerleşim göstermektedir. 12 ng/ml ve 120 ng/ml T-2 toksini uygulama gruplarında protein ifadeleri azalmıştır. 1200 ng/ml T-2 toksin uygulama grubunda 48 saat inkübasyonda yüksek sitotoksiteden dolayı boyanmış hücre görülememiştir. Şekil 4.18 ve Şekil 4.19' da SerW3 hücrelerine 48 saat T-2 toksini uygulamasından sonra β -katenin immü floresan boyama sonuçları verilmiştir.



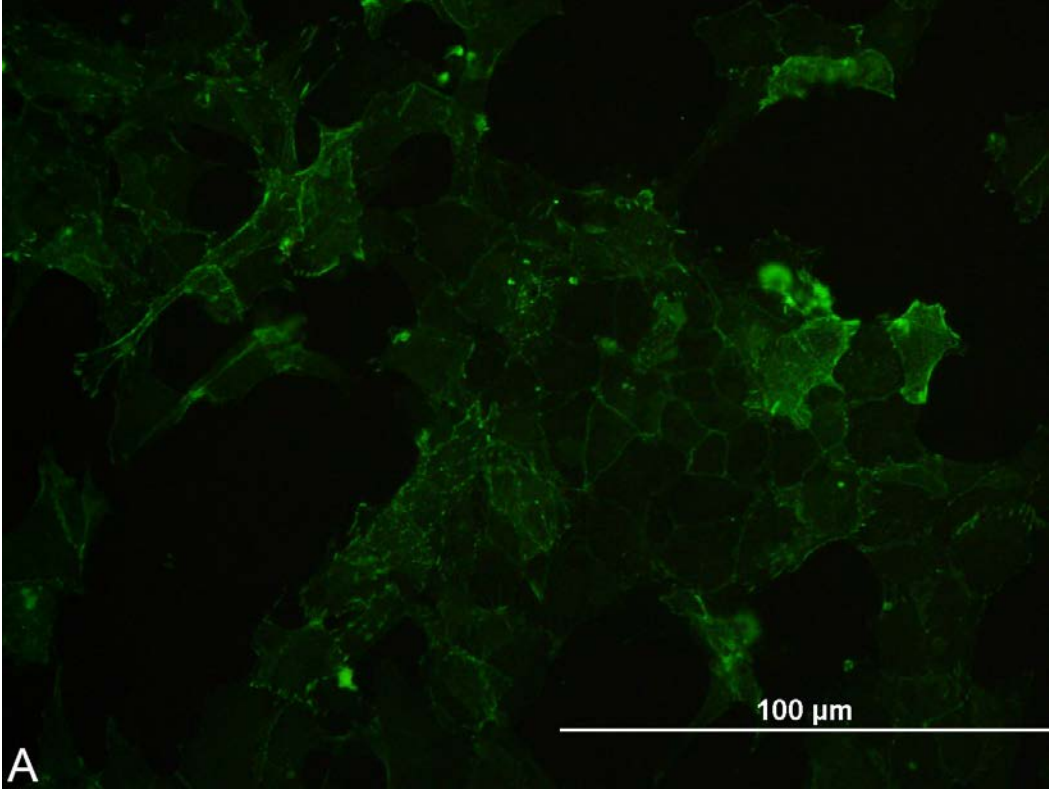
Şekil 4.16. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 24 saat inkübasyon sonrası β -katenin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol grubu, B. 12 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.



Şekil 4.17. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 24 saat inkübasyon sonrası β -katenin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. 120 ng/ml T-2 toksini uygulama grubu, B. 1200 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.



Şekil 4.18 SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 48 saat inkübasyon sonrası β -katenin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol grubu, B. 12 ng/ml T-2 toksin uygulama grubu.

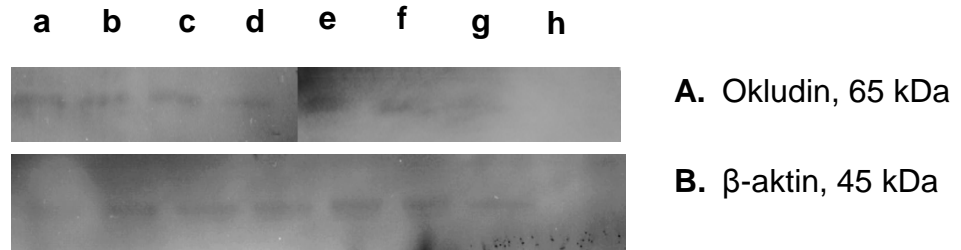


Şekil 4.19. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 48 saat inkübasyon sonrası β -katenin immünfloresan boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. 120 ng/ml T-2 toksini uygulama grubu.

4.7. Western Blotlama Sonuçları

4.7.1. Okludin Western Blotlama Sonuçları

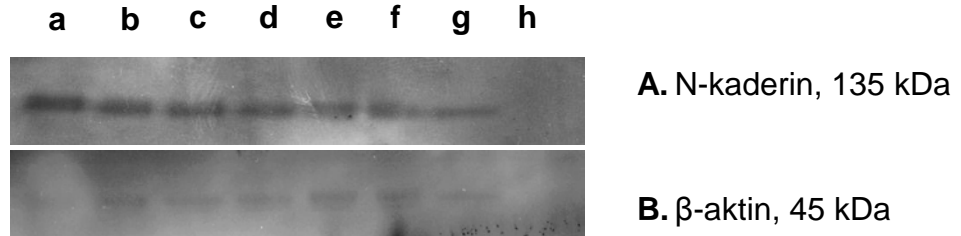
SerW3 hücrelerine 12 ng/ml, 120 ng/ml ve 1200 ng/ml dozlarında 24 ve 48 saat süresince T-2 toksini uygulandıktan sonra okludin protein seviyesinin belirlenebilmesi için western blotlama analizi yapılmıştır. β -aktin protein yükleme kontrolü için yapılmıştır. Okludin western blotlama sonuçlarına göre, kontrol ve DMSO kontrol grubu arasında protein ifadeleri açısından fark görülmediği için yalnızca kontrol grubuna ait sonuçlar verilmiştir. Yapılan western blot analizi sonuçlarına göre, 24 saat inkübasyon süresi sonunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 12 ng/ml ve 120 ng/ml T-2 toksini dozlarında okludin miktarında azalma tespit edilmiştir. 1200 ng/ml T-2 toksini uygulamasından sonra ise SerW3 hücrelerindeki okludin miktarında azalmanın daha belirgin olduğu görülmektedir. 48 saat inkübasyon süresi sonunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 12 ng/ml ve 120 ng/ml T-2 toksini dozlarında okludin protein seviyesinde azalma tespit edilmiştir. 1200 ng/ml T-2 toksini uygulamasından sonra SerW3 hücrelerindeki okludin protein ifadesine rastlanmamıştır. Şekil 4.20' de 24 ve 48 saat T-2 toksini uygulamasından sonra SerW3 hücrelerinde okludin proteininin western blotlama sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.20. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonrası okludin protein seviyesinin Western blotlama ile gösterilmesi. A. Okludin western blot sonucu 24 saat için; a) Kontrol grubu, b) 12 ng/ml, c) 120 ng/ml, d) 1200 ng/ml, 48 saat için; e) Kontrol grubu, f) 12 ng/ml, g) 120 ng/ml, h) 1200 ng/ml B. β -aktin western blot sonucu.

4.7.2. N-kaderin Western Blotlama Sonuçları

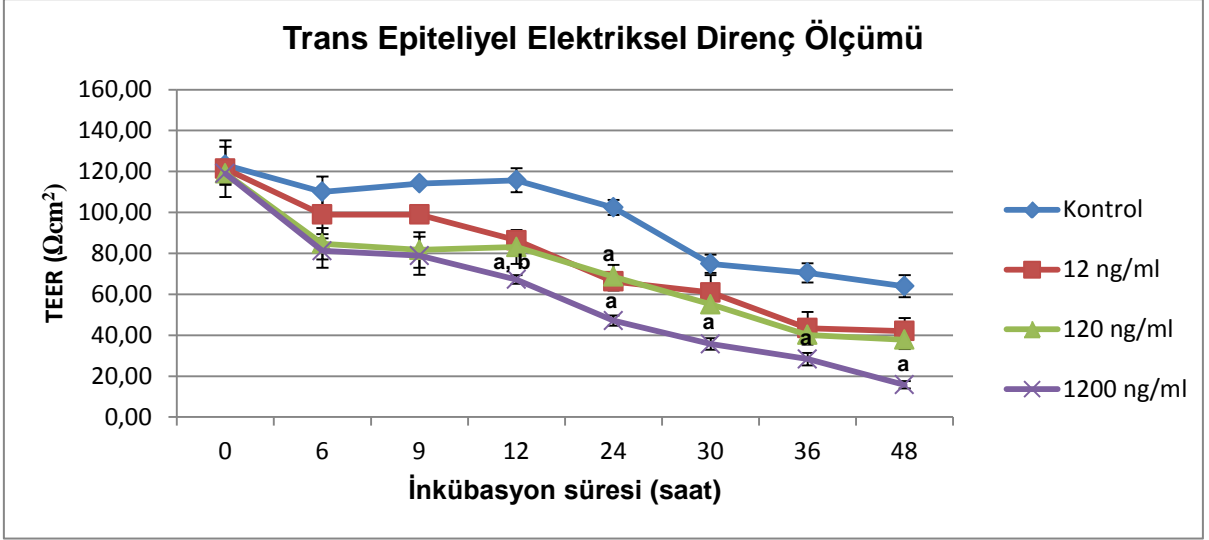
SerW3 hücrelerine 12 ng/ml, 120 ng/ml ve 1200 ng/ml dozlarında 24 ve 48 saat süresince T-2 toksini uygulandıktan sonra N-kaderin protein seviyesinin belirlenebilmesi için western blotlama analizi yapılmıştır. β -aktin protein yükleme kontrolü için yapılmıştır. Western blotlama sonuçlarına göre, kontrol ve DMSO kontrol grubu arasına protein ifadeleri açısından fark görülmediği için yalnızca kontrol grubu sonuçları verilmiştir. Western blotlama sonuçlarına göre, 24 saat inkübasyon süresi sonunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 12 ng/ml ve 120 ng/ml T-2 toksini dozlarında N-kaderin miktarında azalma tespit edilmiştir. 1200 ng/ml T-2 toksini uygulamasından sonra ise SerW3 hücrelerindeki N-kaderin miktarında azalmanın daha belirgin olduğu görülmektedir. 48 saat inkübasyon süresi sonunda, 12 ng/ml T-2 toksini dozunda N-kaderin miktarında azalma tespit edilmiştir. 120 ng/ml T-2 toksini uygulamasından sonra SerW3 hücrelerindeki N-kaderin miktarında belirgin şekilde azaldığı görülmektedir. 1200 ng/ml doz grubunda ise protein ifadesine rastlanmamıştır. Şekil 4.21' de 24 ve 48 saat T-2 toksini uygulamasından sonra SerW3 hücrelerinde N-kaderin proteininin western blotlama sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.21. SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonrası N-kaderin protein seviyesinin Western blotlama ile gösterilmesi. A. N-kaderin western blot sonucu, 24 saat için; a) Kontrol grubu, b) 12 ng/ml, c) 120 ng/ml, d) 1200 ng/ml, 48 saat için; e) Kontrol grubu, f) 12 ng/ml, g) 120 ng/ml, h) 1200 ng/ml B. β -aktin western blot sonucu.

4.8. TEER Ölçüm Sonuçları

SerW3 hücrelerinde TEER değerleri T-2 toksin dozları konulmadan önce günlük olarak ölçülmüş ve direncin sabitlendiği gün (hücre ekiminden 48 saat sonra) toksin uygulaması yapılmıştır. SerW3 hücrelerine 12 ng/ml, 120 ng/ml ve 1200 ng/ml T-2 toksini uygulandıktan sonra 0., 6., 9., 12., 24., 30., 36. ve 48. saatlerde direnç ölçümleri yapılmıştır. Şekil 4.22' de SerW3 hücrelerine T-2 toksini uygulamasından sonraki 48 saat içindeki direnç ölçümleri verilmiştir. Ölçüm sonuçlarına göre, T-2 toksininin ilk uygulandığı anda direnç bütün gruplarda yaklaşık 120 Ωcm^2 olarak ölçülmüştür. Kontrol grubu ile doz uygulama gruplarının TEER değerleri karşılaştırıldığında, toksin uygulama gruplarının kontrol grubuna göre daha düşük TEER değerleri gösterdikleri tespit edilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda toksin konulduğu andan (0. saat) itibaren ilk 6 saat içinde TEER değeri 120 ng/ml ve 1200 ng/ml T-2 toksin dozlarında belirgin bir şekilde düşmeye başlamıştır. 9. saatte düşük doz grubunda 100 Ωcm^2 iken, 120 ng/ml ve 1200 ng/ml T-2 toksini doz gruplarında 80 Ωcm^2 olarak ölçülmüştür. 12. saatte en yüksek doz grubunda ölçülen değer hızlı bir şekilde düşmeye başlamıştır ve 12. saatte 1200 ng/ml doz grubu kontrol grubuna ve 120 ng/ml doz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. 12. saatten 48. saate kadar 12 ng/ml ve 120 ng/ml uygulama gruplarındaki düşüş birbirine yakın değerlerde ölçülmüştür. 24. saatte 12 ng/ml ve 1200 ng/ml uygulama grupları kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. 30., 36. ve 48. saatte 1200 ng/ml doz grubuna ait TEER değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. Toksin uygulamasından 48. saat sonra kontrol grubuna ait TEER değeri 64 Ωcm^2 iken, 12 ng/ml doz grubunda 42 Ωcm^2 , 120 ng/ml doz grubunda 37 Ωcm^2 ve 1200 ng/ml doz grubundan 15 Ωcm^2 e kadar düşüş göstermiştir.



^a Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$)

^b 120 ng/ml T-2 toksin grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$)

Şekil 4.22. SerW3 hücrelerine T-2 toksini uygulaması sonrası TEER değişim grafiği

5. TARTIŞMA

Son yıllardaki veriler, sperm kalitesinin bozulduğunu, erkek üreme sistemindeki anomalilerin ve genç erkeklerdeki testiküler kanser vakalarının arttığını vurgular niteliktedir ve hemen hemen hepsi günümüzde çevrede bulunan kimyasal maddelerin ve çeşitli kirleticilerin erkek üreme sağlığını etkilediğini göstermektedir [131]. Ksenobiyotiklerin üreme ve gelişimsel toksikoloji açısından test edildiği çok fazla sayıda *in vivo* çalışma bulunmaktadır. Erkek üreme sistemi üzerinde toksik etkiler gösteren çeşitli kimyasal maddelere Bisfenol A gibi hormon homeostazisini bozan endüstriyel maddeler, Sertoli hücrelerinde vakuolizasyona neden olan besinlerin ısı ile maruziyeti sonucu oluşan furan gibi maddeler örnek verilebilir [132, 133]. Ayrıca sperm kalitesini etkileyen ve Sertoli hücreleri üzerinde toksik etkilere sahip siyanobakterler tarafından oluşturulan mikrosistin yanı sıra patulin, zeralenon gibi mikotoksinler sayılabilir [134-136]. Fakat son zamanlarda toksikoloji çalışmalarında kullanılan deney hayvanlarının sayısının azaltılması ve üreme sisteminin değerlendirilebilmesi için alternatif yaklaşımlar geliştirilmektedir [137]. Hedefe yönelik deneylerin yapılabilmesi amacıyla, üreme toksikolojisi çalışmalarında kullanılan hayvan deneylerinin yerini *in vitro* yöntemler almaktadır. Bununla birlikte, *in vitro* yöntemlerin hiçbirinin tamamiyle üreme sisteminin ve fonksiyonunun karmaşıklığını yansıtamayacağı belirtilmiştir [138]. Geliştirilen çeşitli *in vitro* yöntemlerin tamamen erkek üreme sistemi üzerindeki etkiyi yansıtmaları da, toksikolojik mekanizmanın ortaya çıkarılması amacıyla SerW3 gibi Sertoli hücre hatları ve Leydig hücre hatları geliştirilmiştir [108, 139]. Bu tez çalışmasında üreme sisteminin *in vitro* koşullarda modeli olan SerW3 hücreleri kullanılmıştır.

Çevresel ksenobiyotiklerden mikotoksinler, fungusların ikincil metabolitleridir [34]. *Fusarium* türü funguslar soğuk hava koşullarında tahıllar üzerinde bulunarak trikotesen, ZEN ve fumonisin gibi diğer toksinleri üretirler. Bazı *Fusarium* cinsi fungusların toksikolojik etkileri, trikotesen yapısının geniş dağılımından dolayı, her birinin ayrı etki mekanizmasının olması ve memeli hücre hatlarında ve organlarında akut toksisite göstermesinden dolayı iyi tanımlanmıştır [140]. T-2 toksini *Fusarium* cinsi funguslar tarafından üretilen bir mikotoksin olup, özellikle tahıllar gibi önemli tarımsal hammaddelerde yaygın olarak rastlanan doğal kirleticilerdendir [8]. T-2 toksini insanların besin yoluyla maruz kalabileceği potansiyel sağlık riski oluşturan en güçlü mikotoksinlerden biridir ve bu toksinin

etkilerinin araştırılması önem taşımaktadır [141]. Daha önceki çalışmalar mikotoksinlerin hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve hücre ölümünü çeşitli bilinmeyen moleküler metabolik yollarla değiştirdiğini göstermiştir [45]. Bu nedenle, mikotoksinlerin toksisitesinin moleküler mekanizmasını aydınlatmak insan sağlığı üzerindeki etkilerin öngörülmesi ve zararlı etkilerinin önlenmesi için önem taşımaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda tez çalışmasında T-2 toksininin SerW3 hücreleri üzerindeki etkilerinin ortaya çıkarılması ve toksisite mekanizmasının aydınlatılması hedeflenmiştir.

Testis toksik etkilere sahip olan birçok maddenin hedef organlarından biridir. Sertoli ve Leydig hücreleri de testiste önemli fonksiyonlara sahip hücrelerdir. Bu hücrelerin fonksiyonlarında meydana gelen bir değişiklik, spermatogenezin hasar görmesine neden olmakta ve bunun sonucunda erkek üreme sisteminin olumsuz etkilenmesine neden olur [142]. Sertoli hücreleri erken seksüel olgunlaşma süresince, sitoplazmanın bazolateral kısmında kan-testis bariyerinin temel yapısını oluşturan sıkı bağlantıları oluşturarak seminifer tübülleri adlüminal ve bazal kısımlara ayırmaktadır. Bu kısımlar spermilerin proliferasyonunun devamlılığının sağlanması ve farklılaşmaları için önemlidir ve kimyasal hasarlara karşı koruma sağlamaktadırlar [143]. Bu bağlantı komplekslerindeki değişiklikler spermatogenezde anomalilere, infertiliteye ve hatta kansere neden olabilmektedir [142]. T-2 toksininin SerW3 hücreleri üzerindeki etkileriyle ilgili bir çalışma bulunmamasına rağmen, testisler üzerinde çeşitli etkileri olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir.

Testislerde spermatojenik hücrelerin gelişimi için yapısal ve fizyolojik çevre oluşturan Sertoli hücreleri, toksik maddelerin germ hücrelerinden sonraki diğer hedefidir ve toksikoloji çalışmalarında erkek üreme sisteminin *in vitro* koşullarda çalışılması için uygun model oluşturmaktadırlar [131, 142, 144, 145]. Ayrıca testiküler toksik maddelerin bariyer fonksiyonuna katılan proteinler üzerindeki etkileri, sıçan primer Sertoli hücreleri ve SerW3 Sertoli hücre hattı kullanılarak yapılmaktadır [146]. SerW3 hücreleri, 17 günlük Wistar sıçanların Sertoli hücrelerinden köken alan, Sertoli hücrelerinin morfolojik ve fonksiyonel özelliklerini birebir yansıtan hücrelerdir. Sıçanlarda fetal/erken neonatal gelişimin 15,5.-17,5. günlerinde, (insanlar için 8-14. haftada) özellikle üreme sistemine toksik olan maddeler için hassas bir dönem olduğu bildirilmiştir [139, 147]. Bu nedenle, SerW3

hücreleri prepubertal dönemdeki sıçanlardan elde edilen hücreler olduğu için üreme sistemine toksik olan maddelerin çalışılması için çok uygun hücre modelini oluşturmaktadırlar [139]. SerW3 hücreleri olgunlaşmamış Sertoli hücrelerinden köken aldığı için, yapılan analizlerin özellikle bu dönemdeki testislerin erişkinlere oranla üreme sistemine toksik olan maddelere daha hassas olduğu dikkate alınarak değerlendirilmesi önem taşımaktadır. Bu nedenle yapılan çalışmada SerW3 hücreleri, *in vivo* da çocukluk dönemindeki T-2 toksini maruziyeti ile oluşabilecek toksisiteyi göstermek için uygun bir model oluşturmaktadır.

T-2 toksininin dişi üreme sistemi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı primer domuz granuloza hücreleri ile yapılan bir çalışmada, toksinin dozuna bağlı olarak hücre proliferasyonunun ve steroidogenezin etkilendiği gösterilmiştir [40]. Dişi üreme sistemine ait çalışmaların yanı sıra T-2 toksininin erkek üreme sistemi üzerindeki etkisiyle ilgili yapılmış *in vivo* çalışmalarda, T-2 toksininin memelilerde sperm sayısında azalmaya neden olduğu bildirilmiş, fakat toksisite mekanizması açıklanmamıştır [52]. Bunun yanı sıra, T-2 toksininin toksisitesinin belirlenebilmesi için destekleyici çalışmalara ihtiyaç olduğu vurgulanmıştır. Sertoli hücreleri, dişi üreme sistemindeki granuloza hücreleri gibi erkek üreme sisteminde germ hücrelerini destekleyici fonksiyonlara sahip hücreler olduklarından T-2 toksininin hedefi olabileceği düşünülmektedir. Sertoli hücrelerinin testisteki önemli fonksiyonlarından dolayı, bu hücrelerin canlılığını ya da fonksiyonunu bozan herhangi bir ajan, spermatogenez üzerinde olumsuz etkilere sebep olabilmektedir. Ayrıca T-2 toksininin Sertoli hücrelerindeki sıkı bağlantı proteinleri ve hücrelerarası kenetleyici bağlantı proteinleri üzerindeki etkileriyle ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle yapılan çalışmada, kan-testis bariyerinin spermatogenezdeki önemi ve toksik maddelere karşı hassasiyeti göz önünde bulundurularak, T-2 toksininin SerW3 hücrelerinde bariyeri oluşturan sıkı ve kenetleyici bağlantı molekülleri üzerindeki potansiyel etkilerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. T-2 toksininin infertilite mekanizmasının açıklanması, tahıl tüketen toplumlarda ortaya çıkabilecek infertilitenin mekanizmasının anlaşılması bakımından önem taşımaktadır.

Yapılan çalışmada, T-2 toksininin sıçan Sertoli hücre hattı olan SerW3 hücrelerindeki sitotoksitesi belirli sitotoksite testleri yapılarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, toksinin hücreler arası bağlantı proteinleri üzerindeki potansiyel etkileri

immünfloresan boyama yöntemi, western blotlama yöntemi ve bariyer bütünlüğü testleri kullanılarak araştırılmıştır.

In vitro hücre kültürü testleri mikotoksinlerin fizyolojik ve biyokimyasal etki mekanizmasını ortaya çıkarmak için destekleyici bilgiler sağlamaktadır [148]. Bu testler temel sitotoksisteyi belirlemek için önemlidir. Sitotoksiste testleri ayrıca, daha sonraki çalışmalarda ve genotoksiste ya da programlı hücre ölümü gibi anlamlı parametrelerin daha ayrıntılı test edilmesi için konsantrasyon/doz belirlenmesi açısından gerekli olduğu belirtilmiştir [149]. Sitotoksiste testleri yeni ilaç keşiflerinde, ilaç geliştirilmesinde ve ayrıca hücresel sitotoksistenin ortaya çıkarılmasında en çok kullanılan testler olduğu için, değişen hücresel şartlara uygun olarak doğru testin seçilmesi önem taşımaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda; (1) tripan mavis testi hücre zarı hasarı olan/olmayan hücre sayısını belirlemek için uygunken, hücre bütünlüğü bozulmayan hücrelerdeki sitotoksistenin belirlenmesi için uygun olmadığı belirtilmiştir. (2) LDH sitotoksiste testinin zar hasarı yoluyla ortaya çıkan sitotoksistenin belirlenmesi için uygunken, zar hasarı olmaksızın hücre döngüsündeki değişikliklerden dolayı değişen hücre sayısının belirlenmesi için uygun olmadığı belirtilmiştir. (3) MTT testinin mitokondri fonksiyonlarının belirlenmesi için relatif hücre sayısını belirlemek için uygunken, indirgenme kapasitesi ve/veya oksidasyon savunması yüksek olan hücrelerde sitotoksistenin belirlenmesi için uygun olmadığı rapor edilmiştir [116]. Ayrıca kimyasal maddenin indüklediği hücresel bozukluğun temelini oluşturan mekanizmalar belirgin değilse, sitotoksistenin en az iki farklı yöntem kullanılarak belirlenebileceği rapor edilmiştir [116]. Yapılan çalışmada SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin 12, 120 ve 1200 ng/ml dozlarındaki sitotoksistesi MTT, LDH ve tripan mavis testi kullanılarak belirlenmiştir. Üç farklı sitotoksiste yöntemi kullanılarak, SerW3 hücrelerinde T-2 toksin aracılı toksistenin temelindeki mekanizmaların ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.

Çalışmadan elde edilen MTT testi sonuçlarına göre, toksinin artan dozlarına ve artan inkübasyon süresine bağlı olarak SerW3 hücrelerindeki sitotoksiste yüzdesinde artış görülmüştür. Trikotesen mikotoksinlerin hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin görülebilmesi için minimum 24 ve 48 saat gerekli olduğu rapor edilmiştir [13]. Çalışmamızda 48 saat toksin inkübasyonu sonrasında toksik etkilerde belirgin şekilde artış olduğu tespit edilmiştir. Vero hücrelerinin (maymun böbrek hücre

hattı) 24 saat T-2 toksini ile inkübe edildiği bir çalışmada hücre canlılığının 0-100 nM konsantrasyonlarında artan doza bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir [148]. T-2 toksininin çeşitli insan epitelial hücre hatlarındaki (Caco-2, HEp-2 ve HeLa hücreleri) etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, MTT testi sonucunda 48 saat inkübasyon boyunca 100 ng/ml T-2 toksini ile inkübe edildiklerinde sitotoksositeye en çok hassasiyet gösteren hücrenin HeLa hücreleri olduğu rapor edilmiştir [140]. Bir siyanobakter toksini olan miktosistin primer Sertoli hücreleri ile 0-10.000 nM dozlarında 24 saat inkübe edildikleri bir çalışmada mikrosistin 500 nM ve daha yüksek dozlarda hücre canlılığının azaldığı rapor edilmiştir [134]. Diğer bir çalışmada, insan renal proksimal tübül ve normal insan fibroblast primer hücreleri 0,1-10 µM T-2 toksin ile 48 saat süresince inkübe edildiklerinde hücre canlılıklarında konsantrasyon artışına bağlı olarak azalma olduğu rapor edilmiştir [141]. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, daha önce yapılan sitotoksosite çalışmalarıyla benzerlik göstermektedir. Pace ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, T-2 toksininin sitoplazmik protein sentezinin yanı sıra mitokondriyal protein sentezini ihhabe ettiğini ve mitokondrinin T-2 toksininin potansiyel hedefi olabileceği gösterilmiştir [26]. Tez çalışmasındaki MTT sitotoksosite sonuçları değerlendirildiğinde 12 ng/ml T-2 toksini uygulama grubunda 48 saat inkübasyon süresi sonrasında sitotoksitenin 24 saat uygulama grubuna göre daha az olduğu görülmektedir. Bu durum, 12 ng/ml T-2 toksini uygulanan SerW3 hücrelerinin mitokondrilerinde hasara neden olmakla birlikte hasarın çok şiddetli olmadığı, 48 saat inkübasyon süresinde hücrelerin yeniden proliferemeye başlamış olabileceği şeklinde açıklanabilir. Bu çalışmadaki MTT testi bulgularına göre de T-2 toksininin 12, 120 ve 1200 ng/ml dozlarında SerW3 hücrelerinin mitokondri enzimlerinin sentezini ihhabe ederek sitotoksositeye neden olabileceği söylenebilir.

T-2 toksininin nekrotik aktivitesini belirlemek amacıyla SerW3 hücrelerinden hücre kültürü ortamına salınan LDH miktarı ölçülmüştür. LDH salınımına bağlı olarak yapılan sitotoksosite testinde, toksinin artan dozlarına ve inkübasyon süresine bağlı olarak SerW3 hücrelerinin sitotoksosite yüzdesinde artış görülmüştür. LDH analizi sonucundaki sitotoksosite yüzdesindeki artışın, metabolik aktivite ölçümü esasına dayanan MTT testine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, aynı dozlarda T-2 toksinin hücre zararını daha fazla etkilediğini göstermektedir. Vero hücrelerinde T-2 toksininin sitotoksitesini (0, 20, 40, 60, 80, 100 ve 120 nM toksin

dozlarında) MTT ve lizozomal aktiviteye bağılı nötral kırmızı testleriyle belirlenmiş ve sonuçta hücre zararının daha çok etkilendiğı rapor edilmiştir [8]. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar Vero hücreleriyle yapılan araştırmayla benzerlik göstermektedir. T-2 toksininin hücre zarı üzerindeki etkilerini araştıran 3T3 fare fibroblast hücreleriyle yapılan diğere bir çalışmada, 24 saat inkübasyondan sonra LDH salınımının anlamlı derecede arttığı rapor edilmiştir [150]. Bu durumun aksini gösteren diğere bir çalışmada ise, insan renal proksimal tübül ve normal insan fibroblast primer hücreleri 0,1-10 µM T-2 toksin ile 48 saat süresince inkübe edildiklerinde LDH aktivitelerinde bir farklılık olmadığı, sitotoksik etkinin apoptozdan kaynaklı olduğu rapor edilmiştir [141]. Çalışmanın LDH sitotoksosite testi sonuçları doğrultusunda, SerW3 hücrelerinde T-2 toksininin hücre zarı üzerinde daha etkili olduğu gösterilmiştir. T-2 toksininin neden olduğu hücre ölüm yollarının temelindeki mekanizmaların farklı olmasının sebebi, sunulan bu tez çalışmasında farklı hücre kullanılmasından kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, farklı orjinli hücrelerin kullanılmasının da bu farklılıkta rol oynayabileceğı öne sürülmüştür [141]. Çünkü farklı hücrelerin toksisiteye verdikleri cevaplar ve hücrelerin hassasiyetleri değişiklik gösterir.

Farklı sitotoksosite testlerinin, test edilen maddeye ve yapılan sitotoksosite testine göre değişiklik gösterdiği daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir [151]. MTT ve LDH yöntemleri karşılaştırıldığında, elde edilen sonuçlardaki farklılıkların yöntem farklılıklarının yanı sıra hücre hatlarının hassasiyetine göre de değişim gösterdiği belirtilmiştir [152]. Hücre içi bir enzim olan LDH, hücre zarı hasarı sonucu olarak hücre toksisitesini gösteren bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Zar geçirgenliğindeki değişimler hücre ölümünden önceki ağır hasarı gösteren bir belirteçtir ve ekstraselüler ortamda LDH enziminin ölçülmesiyle test edilebilir. MTT testi ise mitokondride MTT'nin enzimatik olarak dönüşümünü temel alan bir analizdir [153]. Ayrıca, mitokondriyal solunum inhibisyonunun aktif oksijen ilişkili hücre ölümünü indüklediğı düşünülmektedir. Mitokondri içinde oluşabilen reaktif oksijen türleri, ayrıca mitokondriyal bileşenlere de zarar verebilmektedir [154] ve bu nedenle mitokondriyal solunum aktivitesi temeline dayanan sitotoksosite testleri mitokondride etkili olan toksik madde maruziyeti sonrasında erken toksisite belirtilerini verebilir [155]. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, SerW3 hücrelerinin

yüksek dozlarında LDH analizine daha fazla hassasiyet gösterdiğini hücre zarı üzerinde morfolojik değişikliğe neden olduğunu göstermektedir.

Çalışmada yapılan tripan mavisi hücre canlılığı testi sonucunda, SerW3 hücrelerinin sitotoksisite yüzdesinde, T-2 toksininin artan dozuna ve inkübasyon süresine bağlı olarak artış görülmüştür. Bu testin sonuçlarında sitotoksisite yüzdesi MTT ve LDH testlerine göre daha fazla artış göstermiştir. Tripan mavisi testi tripan mavisi boyasının negatif yüklü olması esasına dayanmaktadır ve zar hasarı olmadan hücre ile etkileşime geçmemektedir. Bu nedenle, hücre zarı hasar görmemiş hücreler boyayı almazlar ve boyayı içine almayan hücreler canlı olarak değerlendirilirler. Bunun aksine, zarı hasar görmüş hücreler mavi renk ile belirgin hale gelmektedir. Tripan mavisi boyası canlı ve ölü hücre olarak değerlendirilen hücre zarı hasar görmüş hücrelerin ayırt edilmesinde kullanılan canlı bir boyama yöntemidir [156]. Çalışmanın sonuçları doğrultusunda, SerW3 hücrelerinin T-2 toksini ile inkübe edildikten sonra hücre zarında hasara neden olduğu ve bu bulgunun LDH testi sonuçları ile tutarlı olduğu görülmektedir. T-2 toksininin immünotoksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, T ve B lenfosit hücre hatları 2-48 saat T-2 toksini ile inkübe edildiklerinde, 1µg/ml T-2 toksini uygulanan gruptaki hücrelerin 12 saatten sonra hücre zarlarının hasar gördüğü ve hücre canlılığının azaldığı tripan mavisi yöntemi ile gösterilmiştir [157]. İmmün sistemine ait hücrelerden elde edilen sonuçlar çalışmamızdan elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Toksinin yüksek dozlarında tripan mavisi testi sonuçları, MTT ve LDH sonuçlarına göre sitotoksisite yüzdesindeki artışın çok daha fazla olduğunu göstermektedir. Canlı hücre sayımı esasına dayanan tripan mavisi testi uzun süren hücre sayım aşamasında canlı hücreleri de boyayabilmesi nedeniyle testin hassasiyetini sınırlandırmaktadır [158]. Bu nedenle, MTT ve LDH testlerindeki sonuçlarla karşılaştırıldığında tripan mavisi testinin hassasiyetinin düşük olduğu fakat diğer sitotoksisite test sonuçlarıyla tutarlı olduğu söylenebilir.

Sertoli hücrelerinin toksik madde maruziyetine cevap olarak, testiküler sıvı oluşumunun inhibe olması, metabolik inhibisyon ve hücrelerin endokrin ya da parakrin salgılama fonksiyonlarının bozulması gibi fonksiyonlarında değişiklikler oluşabilmektedir [159]. Sertoli hücrelerinin önemli fonksiyonlarından birisi, seminifer tübül epiteline farklı moleküllerin giriş-çıkışını düzenleyen ve germ hücrelerinin hareketi, gelişimi ve farklılaşması için mikro çevre oluşturan

immünolojik bir bariyer olarak görev yapan kan-testis bariyerini oluşturmasıdır [68]. Kan-testis bariyerinin, sıkı ve kenetleyici bağlantıların bir arada bulunması ile oluştuğu bilinmektedir [61]. SerW3 hücrelerinin bağlantısal etkileşim gösterdiği, hücre tutunmasından (N-kaderin) ve sıkı bağlantı oluşumundan sorumlu (okludin ve ZO-1), iletişimden sorumlu olan delik geçit bölgeleri (CX43) gibi proteinleri ve ara filament proteini olan vimentini ifade ettikleri gösterilmiştir [160]. Özelleşmiş hücrelerarası bağlantı proteinlerinin spermatogenezin gelişiminde ve devamlılığının sağlanmasında önemli olduğu ve Sertoli-Sertoli hücre etkileşimlerindeki değişimlerin erkeklerde steriliteye neden olabileceği rapor edilmiştir [161].

Sertoli hücrelerinin zarında yerleşim gösteren okludin, N-kaderin, ZO-1 proteinleri gibi bağlantı proteinlerinin testiküler toksik maddelerin ilk hedefleri olabileceği ve toksik maddelerin etkilerinin belirlenebilmesi için uygun belirteçler olabileceği rapor edilmiştir [160]. Bu nedenle yapılan çalışmada, SerW3 hücrelerinde sıkı bağlantıların oluşmasından sorumlu transmembran proteini okludin ve adaptör protein olan ZO-1'in yanı sıra kenetleyici bağlantıların oluşumundan sorumlu N-kaderin ve adaptör proteini olan β -katenin proteinleri immünfloresan olarak boyanarak, bu proteinlerin hücrelerdeki yerleşimleri gösterilmiştir. Aynı zamanda, SerW3 hücrelerindeki okludin ve N-kaderin proteinlerinin ifadeleri western blotlama yöntemi kullanılarak semi-kantitatif olarak gösterilmiştir.

Okludin ve ZO-1 proteinlerinin immünfloresan boyaması sonucu T-2 toksini artan doz ve inkübasyon süresine bağlı olarak protein ifadelerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Bir antibiyotik olan gentamisin SerW3 hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, gentamisin artan dozuna bağlı olarak okludin protein miktarında azalma olduğu gösterilmiştir [162]. Çalışmamızda da T-2 toksini ile muamele edilen SerW3 hücrelerindeki sitotoksisite artışına paralel olarak okludin ifadesinde azalma olduğu gösterilmiştir. Okludin ve kladin proteinlerinin sitoplazmada yer alan adaptör proteinlerden ZO-1, ZO-2 ve ZO-3'e bağlandıkları; ZO-1 proteininin okludini güçlendirerek sıkı bağlantı oluşumunu desteklediği bilinmektedir [163, 164]. Erkek üreme sistemi üzerinde olumsuz etkileri olduğu bilinen bir toksin olan mikrosistin primer fare Sertoli hücrelerinde MAPK11 aracılığıyla okludin ifadesinde azalmaya neden olarak sıkı bağlantıların geçirgenliğini arttırdığı gösterilmiştir [134]. Ayrıca mikrosistin maruziyet sonucu

Sertoli-Sertoli hücre bağlantı yolağında yer alan ZO-1 proteininin miR-374b gibi miRNA ifadelerinde azalmaya neden olarak ZO-1 protein ifadesinde azalma olduğu gösterilmiştir [134]. Karsinojenik ve üreme sistemi üzerinde toksik etkiler gösteren bir pestisit olan lindanın 42GPA9 Sertoli hücrelerinde ZO-1 ve CX43 proteininin hücre zarında değil sitoplazmada konumlanmasına neden olduğu, fakat okludin proteini üzerinde bir değişikliğe neden olmadığı rapor edilmiştir [165]. Çalışmamızda T-2 toksini ile inkübasyon sonrasında SerW3 hücrelerindeki ZO-1 proteininin ifadesinde azalma olmasına rağmen, hücrelerin sitoplazmasında ZO-1 pozitif boyanmaya rastlanmamıştır. Bu durumda, T-2 toksininin lindandan farklı bir toksisite mekanizması ile Sertoli hücrelerini etkilediği söylenebilir. Sıkı bağlantı proteinleri ve sinyal molekülleri arasındaki fiziksel etkileşimin olması, sıkı bağlantıların sinyal iletimi için bir altyapı oluşturduğunu ve bu yapının bozulması ile Sertoli hücre fonksiyonunun bozulabileceği belirtilmiştir [6]. Membran ilişkili guanilat siklaz homolog ailesine ait ZO-1 proteininin Ras substrat AF-6, heterotrimerik G-proteinleri, serin kinaz ve CX43 gibi sinyal proteinleriyle etkileşimde olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [166]. T-2 toksininin SerW3 hücrelerinde sinyal iletim yollarındaki proteinlere yapısal destek sağlayan ZO-1 protein ifadesinde azalmaya neden olarak sinyal iletim yollarını da dolaylı yoldan olumsuz yönde etkileyebileceği söylenebilir.

T-2 toksini ile inkübe edilen SerW3 hücrelerinde, N-kaderin ve β -katenin proteinlerinin immünfloresan boyama ile gösterilen ifadelerinde azalmaya neden olduğu görülmüştür. Aynı zamanda, N-kaderin proteini T-2 toksin uygulanan hücrelerin sitoplazmasında yerleşim gösterdiği gözlenmiştir. Çalışmamızın sonucuna benzer şekilde, SerW3 hücrelerine gossypol, CdCl₂, cisplatin, dieldrin, zardaverin uygulaması sonucunda N-kaderinin yanı sıra ZO-1 ve CX43 proteinlerinin de sitoplazmik olarak yerleşim gösterdikleri rapor edilmiştir [160]. Bu maddelerin bağlantı proteinleri üzerindeki sitoplazmik konumlanmalarının geri dönüşümlü olduğu, maddeler uzaklaştırıldıktan 24 saat sonra proteinlerin hücre zarında yerleşim gösterdiği belirtilmiştir [160]. Testiste, Sertoli hücreleri arasında bulunan bağlantı komplekslerinin oldukça dinamik ve sürekli değişikliğe uğrayan bir yapı olduğu bilinmektedir. Bu bağlantıların ve ilgili proteinlerin germ hücrelerinin bazal kısımdan adlüminal kısma yer değiştirmesi esnasında endositozla Sertoli hücrelerinin sitoplazmasına geçtiği gösterilmiştir [167]. Fakat bağlantı

komplekslerinin aşırı şekilde hücre içine alınmasının patolojik bir durumun indüklemesi sonucunda olabileceği de belirtilmiştir [168]. Tez çalışmasında T-2 toksininin indüklediği N-kaderinin sitoplazmik yerleşiminin geri dönüşümlü olup olmadığını gösteren bir çalışma yapılmamıştır. Fakat 12 ve 120 ng/ml T-2 toksin uygulanan hücrelerde N-kaderinin sitoplazmik olarak konumlanması, daha önce yapılan çalışmalarda belirtildiği gibi testisteki histopatolojik değişikliklerden önce oluşan Sertoli hücre hasarının erken bir göstergesi olabilir [169]. Çalışmamızda sitotoksisite testleri ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda, T-2 toksini ile inkübe olan SerW3 hücrelerinde 24 saatten sonra sitotoksisite yüzdesinde, özellikle 1200 ng/ml T-2 toksini grubundaki hücrelerde sitotoksisitenin belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir. İmmünfloresan boyama sonuçlarında, T-2 toksini ile 48 saat inkübasyon süresi sonrasında 1200 ng/ml doz grubunda immünfloresan olarak işaretlenmiş hücrenin bulunmaması, yüksek dozlarda artan sitotoksisiteyle ilişkilendirilebilir. Aynı zamanda okludin, ZO-1, N-kaderin ve β -katenin protein ifadelerindeki ve immünlökalisasyonlarındaki farklılıkların daha düşük dozlarda gözlenmesi, bu proteinlerin T-2 toksininin etki mekanizmasını gösteren toksisitenin erken belirteci olduğunu desteklemektedir. Ayrıca, T-2 toksininin ribozoma bağlanarak ribozomda konformasyonel değişikliklere neden olduğu ve bu şekilde protein sentezini inhibe ettiği Rosenstein ve Lafarge-Frayssinet tarafından rapor edilmiştir [11]. T-2 toksini uygulama gruplarındaki hücrelerde okludin, N-kaderin, ZO-1 ve β -katenin proteinlerinin ifadelerinde meydana gelen azalmanın, toksinin protein sentezini inhibe etmesinden dolayı olabileceğini desteklemektedir.

Fusarium cinsine funguslar tarafından üretilen zeralenonun östrojen reseptörleriyle etkileşime geçerek fertilitiyi olumsuz etkilediği bilinmektedir [170]. Bir mikotoksin olan T-2 toksininin de *in vitro* koşullarda testosteron salgısını etkilediği ve 17 β -estradiol gibi östrojen benzeri etkiler gösterebileceği rapor edilmiştir [52, 171]. SerW3 hücrelerine östrojen benzeri etki gösteren oktilfenol ve bisfenol A ile inkübe edilmesi sonucunda N-kaderin ve okludin seviyelerinin azaldığı, fakat ZO-1 ifadesinin değişmediği rapor edilmiştir [160]. Tez çalışmasından elde edilen sonuçların SerW3 hücrelerinde östrojenik etki gösteren maddelerin hücreler üzerindeki etkileri ile benzerlik göstermesi, T-2 toksininin östrojen benzeri etkiler yapabileceği görüşünü desteklemektedir. Çalışmanın bulgularını destekleyen bir çalışmada, granulosa hücrelerinin T-2 toksini ile inkübe edilmesi sonucu T-2

toksininin steroidogenezi inhibe ettiği ve 1 ng/ml dozunda antisteroidogenez etkileri olduğu ve toksinin endokrin bozucu etkisi olduğu gösterilmiştir [172]. Buna rağmen T-2 toksininin Sertoli hücrelerinde endokrin bozucu etkilerinin olup olmadığının anlaşılabilmesi için destekleyici çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

İmmünfloresan boyamaların haricinde, T-2 toksininin etkileri SerW3 hücrelerinde Sertoli hücre bariyerinin oluşumunda önemli fonksiyonlara sahip proteinlerden okludin ve N-kaderin proteinlerinin ifadeleri western blotlama yöntemi ile gösterilmiştir.

Okludin sıkı bağlantı oluşumunda önemli fonksiyonlara sahip bir transmembran proteindir. Sıkı bağlantıların kurulması ve bağlantılarının birbirinden ayrılması bu proteinin fosforile ve defosforile olmasıyla ilişkilendirilmektedir. Okludin intraselüler olarak N- ve C-terminalinden oluşan sitoplazmik kuyruklar içeren bir proteindir [173]. Uzun C-terminal domaini serin, treonin ve tirozin reziduları açısından zengindir. Çeşitli kinazlar ve fosfatazlar sıkı bağlantı proteinleriyle etkileşime girerler ve sıkı bağlantı proteinlerinin fosforilasyon durumlarını düzenlerler [174]. Yapılan çalışmada, western blot analizi sonucunda 24 ve 48 saat T-2 toksini uygulamasından sonra T-2 toksininin artan dozuna bağlı olarak SerW3 hücrelerinde ifade olan okludin protein miktarının azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar immünfloresan sonuçlarını desteklemektedir. Western blotlama yöntemi hedef proteinin ifadesinde meydana gelen değişiklikleri ortaya çıkarır; immünfloresan boyaması ise proteinin hücredeki yerini gösteren bir yöntemdir. Bu durumda, her iki yöntemden elde edilen sonuçlar doğrultusunda, T-2 toksini SerW3 hücrelerinin zarında ifade olan okludin proteininin ifadesinde azalmaya neden olduğunu söyleyebiliriz. Okludin proteininde meydana gelen azalmanın T-2 toksininin protein sentezini inhibe etmesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde, SerW3 hücrelerinde bisfenol A'nın *in vitro* kan-testis bariyer bütünlüğünün araştırıldığı bir çalışmada bisfenol A'nın artan dozlarında okludin miktarının azaldığı rapor edilmiştir [160, 175]. Okludin proteini Sertoli hücrelerinde kan-testis bariyerinin kurulmasında kritik bir rol oynayarak dolaşımdan seminifer tübülün adlünimal kısmında yer alan olgunlaşan spermilere karşı koruyucu bir görev üstlenmektedir. Bu protein ifadesinde meydana gelen azalma ile olgunlaşma aşamasındaki spermiler dışarıdan gelebilecek her türlü kimyasal madde ve antikor saldırısı gibi tehditlere

açık olabilmektedir. T-2 toksininin farelere uygulanması sonucu artan T-2 toksin dozuna bağlı olarak erkek farelerin anormal sperm sayılarında artış olduğu ve sperm sayısında azalma olduğu rapor edilmiştir [52]. Kan-testis bariyerini oluşturan sıkı bağlantı ve kenetleyici bağlantı proteinlerinin ifadelerinin azalmasının, ksenobiyotiklerle indüklenen kan-testis bariyerinin bozulmasını açıklayan önemli bir moleküler mekanizma olduğu belirtilmiştir [139, 176]. Yapılan bu çalışma ile T-2 toksininin kan-testis bariyeri proteinlerinin ifadelerinde azalmaya neden olarak kan-testis bariyer bütünlüğünü bozduğu ve fertilitiyi etkilediği söylenebilir.

Sertoli hücrelerinde toksisitenin erken belirteçlerinden biri olan N-kaderin proteininin ifadesi, SerW3 hücreleri T-2 toksini ile inkübe edildikten sonra western blotlama yöntemi ile kantitatif olarak gösterilmiştir. Western blot analiz sonuçları, N-kaderin protein miktarının T-2 toksini ile 24 saat inkübasyonundan sonra 12 ng/ml ve 120 ng/ml dozlarında azaldığını, 1200 ng/ml doz grubunda ise çok daha belirgin bir şekilde azaldığını göstermiştir. Western blotlamadan elde edilen sonuçlar, N-kaderinin immünfloresan sonuçları ile benzer sonuçlar göstermiştir ve immünfloresan boyama sonuçlarını desteklemektedir. Fiorini ve arkadaşları, SerW3 hücrelerinin dieldrin adlı kimyasal ile maruziyeti sonrasında N-kaderin ifadesinin western blotlama analizi sonucunda azaldığını ifade etmişlerdir [160]. Bunun aksini gösteren bir çalışmada ise, di-(2-etilhekzil) fitalata maruz bırakılan prepubertal dönemdeki sıçanların testislerinde N-kaderin ifadesinin maruziyete bağlı olarak arttığı bildirilmiştir [177]. Ayrıca bu maddenin testisler üzerindeki etkilerinin seminifer tübüllerden germ hücrelerinin atılmaksızın farklı bir mekanizma üzerinden olabileceği rapor edilmiştir [177]. Çalışmamızın sonuçları bunun tam tersini göstermektedir. T-2 toksininin Sertoli hücreleri arasındaki bağlantı komplekslerinde bulunan proteinlerin ifadelerinde azalmaya neden olması *in vivo* koşullarda germ hücrelerinin seminifer tübüllerden atılmasına neden olabilir. Çünkü N-kaderin proteininin Sertoli hücrelerinin haricinde spermatojenik hücrelerin yüzeyinde de bulunduğu ve bu şekilde Sertoli hücreleri ile spermatojenik hücrelerin birbirine tutunmasını sağladığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır [178]. Bu nedenle, N-kaderin miktarında meydana gelen bir değişiklik sonucu germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasındaki bağlantı da doğrudan etkilenecek şekilde germ hücrelerinin olgunlaşmadan seminifer tübülden

atılmasına sebep olabilecektir. Sertoli hücrelerine tutunarak besinsel ve fiziksel destek alan germ hücreleri Sertoli hücrelerinden ayrıldıktan sonra çok fazla yaşayamadıkları için hücrelerin apoptoza gitmeleri kaçınılmaz olmaktadır [179]. Yang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, her ne kadar testis histolojik olarak incelenmese de, T-2 toksininin farelerde sperm sayısında azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir [52]. Sperm sayısında meydana gelen bu azalma, T-2 toksininin N-kaderin protein ifadesinde azalmaya neden olması dolayısıyla germ hücrelerinin yeterli destek alamayıp apoptoza gitmeleri ile açıklanabilir. Bunun yanı sıra, N-kaderinin hepatik ve vasküler düz kas hücreleri gibi çeşitli hücrelerde anti-apoptotik etkiler gösterdiğini ifade eden çalışmalar bulunmaktadır [139, 180, 181]. Çalışmamızda SerW3 hücrelerinde N-kaderin protein ifadesinde meydana gelen azalma sonucu, SerW3 hücrelerindeki anti-apoptotik faktör gibi davranarak düşük dozlarda apoptoza neden olabilir. Fiorini ve arkadaşları okludin, ZO-1, N-kaderin gibi hücreler arası bağlantıların kaybının Sertoli hücrelerinde fonksiyon bozukluklarına, germ hücrelerin apoptozuna kadar çeşitli süreçlerde bozukluklara neden olabileceğini göstermişlerdir [160]. T-2 toksininin apoptozu indüklediğini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. T-2 toksininin HL-60 lösemi hücrelerinde kaspaz-9, 3 ve sitokrom c'nin sitozolik salınımı yoluyla, kondrositlerde (1-20 ng/ml dozlarında) Fas, p53 ve proapoptotik faktör Bax proteinlerinde artışa, anti-apoptotik faktör Bcl-xL faktöründe ise azalmaya neden olarak apoptoza neden olduğu rapor edilmiştir [182-184]. Ayrıca, hematopoietik, lenfoid, gastrointestinal dokularda ve fare ve sıçanların fetal dokularında farklı yollarla apoptozun indüklendiği rapor edilmiştir [46, 185]. Fakat çalışmamızda hücreler apoptoz açısından değerlendirilmemiştir. Apoptozun varlığını belirlemek amacıyla apoptotik yolda yer alan proteinler üzerinde mekanizmayı aydınlatıcı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Transepitelyal elektriksel direnç (TEER) dokuyu taklit eden hücre modelinin iyonlar ve elektronlar açısından geçirgenliğini ölçer ve hücre modeli boyunca küçük moleküllerin akışı ile ilişkilendirilmektedir [186]. Ayrıca, TEER iki komşu hücre arasında yer alan sıkı bağlantıların durumunu belirlemesi için destekleyici bilgi sağlamaktadır. Bu ölçüm farklı çalışmalarda Sertoli hücreleri ya da alveolar epitelyal hücreleri gibi hücre modellerinde hücrelerin fonksiyonunu değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır [186, 187]. Bunun yanı sıra, TEER

ölçümünün farklı epiteliyel bariyerlerin bütünlüğündeki fizyolojik değişiklikleri değerlendirmek için kullanıldığı rapor edilmiştir [186]. TEER ölçümü hücre bütünlüğünden daha çok doku bütünlüğünü gösteren bir test olduğu için canlı bir doku ile temas halinde olan kimyasal bileşiklerden kaynaklı değişikliklerin değerlendirilebilmesi için hassas bir yöntem olarak gösterilmektedir [188, 189]. Yapılan çalışmada SerW3 hücrelerine T-2 toksini uygulaması ile Sertoli hücre bariyerinin fonksiyonu üzerindeki potansiyel etkilerini belirlemek amacıyla, TEER ölçümü yapılmış ve toksinin artan dozuna ve inkübasyon süresine bağlı olarak TEER ölçüm değerlerinin azaldığı görülmüştür. TEER ölçüm değerinin düşmesi, doku hasarının erken belirteci olarak gösterilmektedir. Ayrıca hücre morfolojisinde meydana gelen değişikliklerden daha hassas bir veri oluşturduğu vurgulanmaktadır [127]. TEER ölçüm değerinin artan T-2 toksin dozlarında azalması, çalışmamızdaki immünfloresan boyama ve western blotlama sonuçları ile tutarlı bir durum sergileyerek diğer sonuçları desteklemektedir. Azalan TEER değerleri kan-testis bariyerini oluşturan proteinlerin miktarlarındaki azalmayla ilişkili bir şekilde bariyer bütünlüğünün bozulduğunu göstermektedir. Çevresel endokrin bozucu olan fitalatlardan monobütil fitalat ve mono-2-etilhekzil fitalat uygulanan Sertoli hücrelerinde ZO-1, F-aktin ve okludin proteinlerinin ifadelerinde azalmayla bağlantılı olarak TEER değerlerinde azalma tespit edilmiştir [190]. Benzer şekilde, T-2 toksininin kan-beyin bariyeri modeli olarak seçilen primer domuz beyin kapiller endotelial hücrelerinde (PBCEC) 25 nM konsantrasyonunda okludin ifadesinde azalmayla birlikte bariyer geçirgenliğini bozduğu rapor edilmiş ve okludin ifadesindeki azalmanın kan-beyin bariyeri bütünlüğündeki azalma ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür [191]. Bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmadan elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir. T-2 toksininin plasentadan geçiş mekanizmasının açıklanması için yapılan diğer bir çalışmada, plasenta modeli olarak seçilen BeWo hücrelerinde doza bağlı olarak proliferasyonun etkilendiği, fakat bunun doğrudan sitotoksitesiteyle ilişkili olmadığı ve toksinin plasenta bariyer bütünlüğünü bozmadığı gösterilmiştir [192]. Wang ve arkadaşları bu durumu T-2 toksininin absorpsiyon yolunun doğrudan paraselüler yol olmadığı, toksinin hücre zarından geçerek embriyotoksitesiteye ve teratojeniteye neden olabileceği şeklinde yorumlamışlardır [192]. Çalışmalar arasındaki bu farklılıklar, hücrelerin farklı olmasından kaynaklı olabileceği gibi uygulama dozları ile de ilişkili olabilir.

Tez çalışmasının sonucunda, T-2 toksininin SerW3 hücrelerinde proliferasyonu inhibe ederek 12, 120 ve 1200 ng/ml konsantrasyonlarında doz artışına ve inkübasyon süresine bağlı olarak sitotoksik olduğu ve Sertoli hücrelerinin T-2 toksinine hassasiyet gösterdiği söylenebilir. T-2 toksininin SerW3 hücrelerinde bulunan sıkı ve kenetleyici bağlantı proteinlerinin ifadelerinde azalmaya neden olarak Sertoli hücre bariyer bütünlüğünü bozduğu ve bu şekilde toksinin Sertoli hücre bariyerinde geçirgenliğini arttırdığı gösterilmiştir. Çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar, T-2 toksininin kan-testis bariyer fonksiyonunu değiştirdiğini ve bu şekilde infertiliteye neden olabileceği görüşünü desteklemektedir. Ancak, toksisite mekanizmasının daha fazla aydınlatılabilmesi amacıyla daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmakla birlikte sonuçların moleküler verilerle desteklenmesi gerekmektedir.

Bu tez çalışması, T-2 toksininin SerW3 hücrelerindeki sitotoksitesinin gösterildiği, kan-testis bariyeri üzerindeki etkilerinin ve toksisite mekanizmasının açıklanmasına yönelik olarak yapılan ve aynı zamanda transepitelyal elektriksel direnç ölçümüyle SerW3 hücrelerinde bariyer bütünlüğünün değerlendirildiği ilk çalışma olması nedeniyle önem taşımaktadır. Ayrıca, T-2 toksini ile infertilite arasındaki ilişkinin aydınlatılmasına öncülük eden bir çalışmadır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların T-2 toksininin spermilerin oluşumunda önemli işlevlere sahip olan Sertoli hücreleri üzerindeki toksisite mekanizmasındaki bilimsel boşluğun doldurulmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Al-Hiyasat, A.S., Darmani, H., Elbetieha, A.M., Effects of bisphenol a on adult male mouse fertility, *European Journal of Oral Sciences*, 110(2): p. 163-167, **2002**.
- [2] Oishi, S., Effects of propyl paraben on the male reproductive system, *Food and Chemical Toxicology*, 40(12): p. 1807-1813, **2002**.
- [3] Zhou, Y., Xiang, Z., Li, D., Han, X., Regulation of microcystin-Ir-induced toxicity in mouse spermatogonia by mir-96, *Environmental Science & Technology*, 48(11): p. 6383-6390, **2014**.
- [4] Zhou, D.-R., Zhou, Y.-C., et al., Gossypol repressed the gap junctional intercellular communication between sertoli cells by decreasing the expression of connexin43, *Toxicology in Vitro*, 22(7): p. 1719-1725, **2008**.
- [5] Qingqing, H., Linbo, Y., Yunqian, G., Shuqiang, L., Toxic effects of citrinin on the male reproductive system in mice, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(5): p. 465-469, **2012**.
- [6] Cheng, C.Y., Mruk, D.D., Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development, *Physiological Reviews*, 82(4): p. 825-874, **2002**.
- [7] Gye, M., Changes in the expression of claudins and transepithelial electrical resistance of mouse sertoli cells by leydig cell coculture, *International Journal of Andrology*, 26(5): p. 271-278, **2003**.
- [8] Bouaziz, C., Abid-Essefi, S., et al., Cytotoxicity and related effects of t-2 toxin on cultured vero cells, *Toxicon*, 48(3): p. 343-352, **2006**.
- [9] Hussein, H.S., Brasel, J.M., Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals, *Toxicology*, 167(2): p. 101-134, **2001**.
- [10] Agag, B., Mycotoxins in foods and feeds 5-trichothecenes a T-2 toxin, *Ass. Univ. Bull. Environ. Res*, 8(2): p. 641-645, **2005**.
- [11] Rosenstein, Y., Lafarge-Frayssinet, C., Inhibitory effect of fusarium t2-toxin on lymphoid DNA and protein synthesis, *Toxicology and Applied pharmacology*, 70(2): p. 283-288, **1983**.
- [12] Bondy, G.S., Pestka, J.J., Immunomodulation by fungal toxins, *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*, 3(2): p. 109-143, **2000**.
- [13] Wannemacher, R.W., Wiener, S.L., *Trichothecene mycotoxins*, in *Medical aspects of chemical and biological warfare*. p. 655-676, **1997**.
- [14] Sudakin, D., Trichothecenes in the environment: Relevance to human health, *Toxicology Letters*, 143(2): p. 97-107, **2003**.
- [15] Creppy, E.E., Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in europe, *Toxicology Letters*, 127(1): p. 19-28, **2002**.

- [16] Numanoglu, E., Uygun, U., Koksel, H., Solfrizzo, M., Stability of fusarium toxins during traditional turkish maize bread production, *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 2(2): p. 84-92, **2010**.
- [17] Edwards, S., Barrier-Guillot, B., et al., Emerging issues of ht-2 and t-2 toxins in european cereal production, *World Mycotoxin Journal*, 2(2): p. 173-179, **2009**.
- [18] Tsuchida, M., Miura, T., Shimizu, T., Aibara, K., Elevation of thiobarbituric acid values in the rat liver intoxicated by T-2 toxin, *Biochemical medicine*, 31(2): p. 147-166, **1984**.
- [19] Atroshi, F., Rizzo, A., et al., T-2 toxin-induced DNA damage in mouse livers: The effect of pretreatment with coenzyme q 10 and α -tocopherol, *Molecular Aspects of Medicine*, 18: p. 255-258, **1997**.
- [20] Richard, J., Payne, G., eds, et al., Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems, *CAST Task Force Report*, 139: p. 101-103, **2003**.
- [21] Kalantari, H., Moosavi, M., Review on t-2 toxin, *Judishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 5(1): p. 26-38, **2010**.
- [22] Corrier, D.E., Ziprin, R.L., Mollenhauer, H.H., Modulation of cell-mediated resistance to listeriosis in mice given T-2 toxin, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 89(3): p. 323-331, **1987**.
- [23] Corrier, D.E., Mycotoxicosis: Mechanisms of immunosuppression, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 30(1): p. 73-87, **1991**.
- [24] Rocha, O., Ansari, K., Doohan, F., Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review, *Food Additives and Contaminants*, 22(4): p. 369-378, **2005**.
- [25] Thompson, W.L., Wannemacher Jr, R.W., In vivo effects of t-2 mycotoxin on synthesis of proteins and DNA in rat tissues, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 105(3): p. 483-491, **1990**.
- [26] Pace, J., Watts, M., Canterbury, W., T-2 mycotoxin inhibits mitochondrial protein synthesis, *Toxicon*, 26(1): p. 77-85, **1988**.
- [27] Jone, C., Erickson, L., Trosko, J.E., Chang, C.C., Effect of biological toxins on gap-junctional intercellular communication in chinese hamster v79 cells, *Cell Biology and Toxicology*, 3(1): p. 1-15, **1987**.
- [28] Yoshino, N., Takizawa, M., et al., Transient elevation of intracellular calcium ion levels as an early event in T-2 toxin-induced apoptosis in human promyelotic cell line HL-60, *Natural Toxins*, 4(5): p. 234-241, **1996**.
- [29] Bunner, D.L., Morris, E.R., Alteration of multiple cell membrane functions in l-6 myoblasts by T-2 toxin: An important mechanism of action, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 92(1): p. 113-121, **1988**.
- [30] Preedy, V.R., Watson, R.R., Reviews in food and nutrition toxicity, Taylor & Francis, pp. 317, **2005**.

- [31] Khachatourians, G.G., Metabolic effects of trichothecene t-2 toxin, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 68(7): p. 1004-1008, **1990**.
- [32] Vila, B., Jaradat, Z., Marquardt, R., Frohlich, A., Effect of t-2 toxin on in vivo lipid peroxidation and vitamin e status in mice, *Food and Chemical Toxicology*, 40(4): p. 479-486, **2002**.
- [33] Yiannikouris, A., Jouany, J.-P., Mycotoxins in feeds and their fate in animals: A review, *Animal Research*, 51(2): p. 81-100, **2002**.
- [34] Steyn, P.S., Mycotoxins, general view, chemistry and structure, *Toxicology Letters*, 82: p. 843-851, **1995**.
- [35] Yang, G.-H., Jarvis, B.B., Chung, Y.-J., Pestka, J.J., Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: Relationship to erk, p38 mapk, and sapk/jnk activation, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 164(2): p. 149-160, **2000**.
- [36] WHO, Selected mycotoxins: Ochratoxins, trichothecenes, ergot/published under the joint sponsorship of the united nations environment programme, the international labour organisation and the world health organization, **1990**.
- [37] Sorenson, W., Fungal spores: Hazardous to health?, *Environmental Health Perspectives*, 107(Suppl 3): p. 469, **1999**.
- [38] Huang, P., Akagawa, K., et al., T-2 toxin initially activates caspase-2 and induces apoptosis in U937 cells, *Toxicology Letters*, 170(1): p. 1-10, **2007**.
- [39] WHO, *Safety evaluation of certain mycotoxins in food*. Vol. 74. Food & Agriculture Org., **2001**.
- [40] Caloni, F., Ranzenigo, G., Cremonesi, F., Spicer, L.J., Effects of a trichothecene, T-2 toxin, on proliferation and steroid production by porcine granulosa cells, *Toxicon*, 54(3): p. 337-344, **2009**.
- [41] Wu, J., Jing, L., Yuan, H., Peng, S.Q., T-2 toxin induces apoptosis in ovarian granulosa cells of rats through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway, *Toxicology Letters*, 202(3): p. 168-177, **2011**.
- [42] Chaudhari, M., Jayaraj, R., Bhaskar, A., Lakshmana Rao, P., Oxidative stress induction by T-2 toxin causes DNA damage and triggers apoptosis via caspase pathway in human cervical cancer cells, *Toxicology*, 262(2): p. 153-161, **2009**.
- [43] Bouaziz, C., Martel, C., et al., Fusarial toxin-induced toxicity in cultured cells and in isolated mitochondria involves ptpc-dependent activation of the mitochondrial pathway of apoptosis, *Toxicological Sciences*, 110(2): p. 363-375, **2009**.
- [44] Babich, H., Borenfreund, E., Cytotoxicity of t-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay, *Applied and Environmental Microbiology*, 57(7): p. 2101-2103, **1991**.

- [45] Bouaziz, C., Sharaf El Dein, O., et al., Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin a in human hepatoma cells, *Toxicology*, 254(1-2): p. 19-28, **2008**.
- [46] Ishigami, N., Shinozuka, J., et al., Apoptosis in mouse fetuses from dams exposed to T-2 toxin at different days of gestation, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 52(6): p. 493-501, **2001**.
- [47] Pande, V., Kurkure, N., Bhandarkar, A., Effect of T-2 toxin on growth, performance and haematobiochemical alterations in broilers, *Indian Journal of Experimental Biology*, 44(1): p. 86, **2006**.
- [48] Larsen, J.C., Hunt, J., Perrin, I., Ruckenbauer, P., Workshop on trichothecenes with a focus on don: Summary report, *Toxicology Letters*, 153(1): p. 1-22, **2004**.
- [49] Karppanen, E., Rizzo, A., et al., Investigation on trichothecene-stimulated lipid peroxidation and toxic effects of trichothecenes in animals, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 30(4): p. 391-399, **1988**.
- [50] Wang, J., Fitzpatrick, D., Wilson, J., Effect of dietary T-2 toxin on biogenic monoamines in discrete areas of the rat brain, *Food and Chemical Toxicology*, 31(3): p. 191-197, **1993**.
- [51] Ravindran, J., Agrawal, M., Gupta, N., Lakshmana Rao, P., Alteration of blood brain barrier permeability by t-2 toxin: Role of mmp-9 and inflammatory cytokines, *Toxicology*, 280(1): p. 44-52, **2011**.
- [52] Yang, J.Y., Zhang, Y.F., et al., Toxic effects of t-2 toxin on reproductive system in male mice, *Toxicology and Industrial Health*, 26(1): p. 25-31, **2010**.
- [53] França, L.R., Auharek, S.A., Hess, R.A., *Biology and regulation of blood-tissue barriers*, in *Advances in experimental medicine and biology*, Cheng, Y.C., Editor. p. 361, **2012**.
- [54] Wong, E.W., Cheng, C.Y., Polarity proteins and cell-cell interactions in the testis, *International Review of Cell and Molecular Biology*, 278: p. 309-353, **2009**.
- [55] Dym, M., Fawcett, D.W., The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium, *Biology of Reproduction*, 3(3): p. 308-326, **1970**.
- [56] Setchell, B., Voglmayr, J., Waites, G., A blood-testis barrier restricting passage from blood into rete testis fluid but not into lymph, *The Journal of Physiology*, 200(1): p. 73-85, **1969**.
- [57] Nicander, L., An electron microscopical study of cell contacts in the seminiferous tubules of some mammals, *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 83(3): p. 375-397, **1967**.
- [58] Dym, M., The fine structure of the monkey (macaca) sertoli cell and its role in maintaining the blood-testis barrier, *The Anatomical Record*, 175(4): p. 639-656, **1973**.
- [59] Fawcett, D., Leak, L., Heidger Jr, P., Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier,

- Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 10: p. 105-122, **1969**.
- [60] Abraham, M., The male germ cell protective barrier along phylogenesis, *International Review of Cytology*, 130: p. 111-190, **1991**.
- [61] Russell, L.D., Peterson, R., Sertoli cell junctions: Morphological and functional correlates, *International Review of Cytology*, 94: p. 177-211, **1985**.
- [62] Flickinger, C., Fawcett, D.W., The junctional specializations of sertoli cells in the seminiferous epithelium, *The Anatomical Record*, 158(2): p. 207-221, **1967**.
- [63] Russell, L., Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis, *American Journal of Anatomy*, 148(3): p. 313-328, **1977**.
- [64] Bart, J., Groen, H.J., et al., An oncological view on the blood–testis barrier, *The Lancet Oncology*, 3(6): p. 357-363, **2002**.
- [65] Lee, N.P., Cheng, C.Y., Ectoplasmic specialization, a testis-specific cell–cell actin-based adherens junction type: Is this a potential target for male contraceptive development?, *Human Reproduction Update*, 10(4): p. 349-369, **2004**.
- [66] Russell, L.D., Ren, H.P., et al., A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the sertoli cell, *American Journal of Anatomy*, 188(1): p. 21-30, **1990**.
- [67] Weber, J.E., Russell, L.D., Wong, V., Peterson, R.N., Three-dimensional reconstruction of a rat stage v sertoli cell: li. Morphometry of sertoli–sertoli and sertoli–germ-cell relationships, *American Journal of Anatomy*, 167(2): p. 163-179, **1983**.
- [68] Mruk, D.D., Cheng, C.Y., Sertoli–sertoli and sertoli–germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis, *Endocrine Reviews*, 25(5): p. 747-806, **2004**.
- [69] Jegou, B., The sertoli cell *in vivo* and *in vitro*, *Cell Biology and Toxicology*, 8(3): p. 49-54, **1992**.
- [70] Griswold, M.D., Solari, A., Tung, P.S., Fritz, I.B., Stimulation by follicle-stimulating hormone of DNA synthesis and of mitosis in cultured sertoli cells prepared from testes of immature rats, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 7(2): p. 151-165, **1977**.
- [71] Vogl, A.W., Pfeiffer, D.C., Redenbach, D.M., Ectoplasmic (“junctional”) specializations in mammalian sertoli cells: Influence on spermatogenic cells, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 637(1): p. 175-202, **1991**.
- [72] Skinner, M.K., Cell-cell interactions in the testis*, *Endocrine Reviews*, 12(1): p. 45-77, **1991**.

- [73] Skinner, M.K., *Chapter 8 - Sertoli cell secreted regulatory factors*, in *Sertoli cell biology*, Skinner, M.K., Griswold, M.D., Editors, Academic Press: San Diego. p. 107-120, **2005**.
- [74] Skinner, M.K., Griswold, M.D., *Sertoli cell biology*, Elsevier, pp. 494, **2005**.
- [75] Kranenburg, O., Moolenaar, W.H., Ras-map kinase signaling by lysophosphatidic acid and other g protein-coupled receptor agonists, *Oncogene*, 20(13), **2001**.
- [76] Lee, N.P., Cheng, C.Y., Adaptors, junction dynamics, and spermatogenesis, *Biology of Reproduction*, 71(2): p. 392-404, **2004**.
- [77] Mruk, D.D., Cheng, C.Y., Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis, *Endocrine Reviews*, 25(5): p. 747-806, **2004**.
- [78] Stevenson, B.R., Keon, B.H., The tight junction: Morphology to molecules, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14(1): p. 89-109, **1998**.
- [79] Citi, S., Cordenonsi, M., Tight junction proteins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1448(1): p. 1-11, **1998**.
- [80] Wittchen, E.S., Haskins, J., Stevenson, B.R., Protein interactions at the tight junction actin has multiple binding partners, and zo-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3 *Journal of Biological Chemistry*, 274(49): p. 35179-35185, **1999**.
- [81] Lacaz-Vieira, F., Jaeger, M., Farshori, P., Kachar, B., Small synthetic peptides homologous to segments of the first external loop of occludin impair tight junction resealing, *The Journal of Membrane Biology*, 168(3): p. 289-297, **1999**.
- [82] Wong, V., Gumbiner, B.M., A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier, *The Journal of Cell Biology*, 136(2): p. 399-409, **1997**.
- [83] Cyr, D.G., Hermo, L., et al., Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis, *Endocrinology*, 140(8): p. 3815-3825, **1999**.
- [84] Fanning, A.S., Mitic, L.L., Anderson, J.M., Transmembrane proteins in the tight junction barrier, *Journal of the American Society of Nephrology*, 10(6): p. 1337-1345, **1999**.
- [85] Tsukita, S., Furuse, M., Occludin and claudins in tight-junction strands: Leading or supporting players?, *Trends in Cell Biology*, 9(7): p. 268-273, **1999**.
- [86] Mitic, L.L., Van Itallie, C.M., Anderson, J.M., Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions i. Tight junction structure and function: Lessons from mutant animals and proteins, *American Journal*

- of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(2): p. G250-G254, **2000**.
- [87] Heiskala, M., Peterson, P.A., Yang, Y., The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport, *Traffic*, 2(2): p. 92-98, **2001**.
- [88] Hellani, A., Ji, J., et al., Developmental and hormonal regulation of the expression of oligodendrocyte-specific protein/claudin 11 in mouse testis 1, *Endocrinology*, 141(8): p. 3012-3019, **2000**.
- [89] Gow, A., Southwood, C.M., et al., Cns myelin and Sertoli cell tight junction strands are absent in osp/claudin-11 null mice, *Cell*, 99(6): p. 649-659, **1999**.
- [90] Morrow, C.M., Mruk, D., Cheng, C.Y., Hess, R.A., Claudin and occludin expression and function in the seminiferous epithelium, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1546): p. 1679-1696, **2010**.
- [91] Suzuki, S.T., Structural and functional diversity of cadherin superfamily: Are new members of cadherin superfamily involved in signal transduction pathway?, *Journal of Cellular Biochemistry*, 61(4): p. 531-542, **1996**.
- [92] Yap, A.S., Briehar, W.M., Gumbiner, B.M., Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13(1): p. 119-146, **1997**.
- [93] Vleminckx, K., Kemler, R., Cadherins and tissue formation: Integrating adhesion and signaling, *Bioessays*, 21(3): p. 211-220, **1999**.
- [94] Blaschuk, O.W., Rowlands, T.M., Plasma membrane components of adherens junctions (review), *Molecular Membrane Biology*, 19(2): p. 75-80, **2002**.
- [95] Aberle, H., Schwartz, H., Kemler, R., Cadherin-catenin complex: Protein interactions and their implications for cadherin function, *Journal of Cellular Biochemistry*, 61(4): p. 514-523, **1996**.
- [96] Huber, O., Bierkamp, C., Kemler, R., Cadherins and catenins in development, *Current Opinion in Cell Biology*, 8(5): p. 685-691, **1996**.
- [97] Hyafil, F., Babinet, C., Jacob, F., Cell-cell interactions in early embryogenesis: A molecular approach to the role of calcium, *Cell*, 26(3): p. 447-454, **1981**.
- [98] Gumbiner, B.M., Regulation of cadherin adhesive activity, *The Journal of Cell Biology*, 148(3): p. 399-404, **2000**.
- [99] Knudsen, K.A., Wheelock, M.J., Plakoglobin, or an 83-kd homologue distinct from beta-catenin, interacts with e-cadherin and n-cadherin, *The Journal of Cell Biology*, 118(3): p. 671-679, **1992**.
- [100] Piepenhagen, P.A., Nelson, W.J., Defining e-cadherin-associated protein complexes in epithelial cells: Plakoglobin, beta-and gamma-catenin are distinct components, *Journal of Cell Science*, 104(3): p. 751-762, **1993**.

- [101] Polakis, P., The oncogenic activation of [beta]-catenin, *Current Opinion in Genetics & Development*, 9(1): p. 15-21, **1999**.
- [102] Rowlands, T.M., Symonds, J.M., Farookhi, R., Blaschuk, O.W., Cadherins: Crucial regulators of structure and function in reproductive tissues, *Reviews of Reproduction*, 5(1): p. 53-61, **2000**.
- [103] Vasioukhin, V., Fuchs, E., Actin dynamics and cell–cell adhesion in epithelia, *Current Opinion in Cell Biology*, 13(1): p. 76-84, **2001**.
- [104] Lau, A.S., Mruk, D.D., Rab8b gtpase and junction dynamics in the testis, *Endocrinology*, 144(4): p. 1549-1563, **2003**.
- [105] Wine, R.N., Chapin , R.E., Adhesion and signaling proteins spatiotemporally associated with spermiation in the rat, *Journal of Andrology*, 20(2): p. 198-213, **1999**.
- [106] Yang, S., Han, X., et al., The toxic effects of pentachlorophenol on rat sertoli cells in vitro, *Environmental Toxicology of Pharmacology*, 20(1): p. 182-187, **2005**.
- [107] Hadley, M.A., Byers, S.W., et al., Extracellular matrix regulates sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development *in vitro*, *The Journal of Cell Biology*, 101: p. 1511-1522, **1985**.
- [108] Pognan, F., Masson, M.-T., Lagelle, F., Charuel, C., Establishment of a rat sertoli cell line that displays the morphological and some of the functional characteristics of the native cell, *Cell Biology and Toxicology*, 13(6): p. 453-463, **1997**.
- [109] Sharpe, R.M., McKinnell, C., Kivlin, C., Fisher, J.S., Proliferation and functional maturation of sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood, *Reproduction*, 125(6): p. 769-784, **2003**.
- [110] Jiang, C., Hall, S.J., Boekelheide, K., Development and characterization of a prepubertal rat sertoli cell line, 93RS2, *Journal of andrology*, 18(4): p. 393-399, **1997**.
- [111] Wong, E.W.P., Yan, H.H.N., et al., *Cell junctions in the testis as targets for toxicants*, in *Comprehensive Toxicology*. p. 167-188, **2010**.
- [112] Freshney, R.I., *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications*, (2010). New Jersey: John Wiley & Sons Inc, **2010**.
- [113] Jung, H., Wang, S.-Y., et al., Detection and treatment of mycoplasma contamination in cultured cells, *Chang Gung Medical Journal*, 26(4): p. 250-258, **2003**.
- [114] Vunjak-Novakovic, G., Freshney, R.I., *Culture of cells for tissue engineering*. Vol. 7. John Wiley & Sons, **2006**.
- [115] Assanga, I., Lujan, L., Cell growth curves for different cell lines and their relationship with biological activities, *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*, 4(4): p. 60-70, **2013**.

- [116] Kim, H., Yoon, S.C., Lee, T.Y., Jeong, D., Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages, *Toxicology Letters*, 184(1): p. 13-17, **2009**.
- [117] Han, S.I., Kim, Y.-S., Kim, T.-H., Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions, *BMB Rep*, 41(1): p. 1-10, **2008**.
- [118] Zwolak, I., Comparison of five different in vitro assays for assessment of sodium metavanadate cytotoxicity in chinese hamster ovary cells (cho-k1 line), *Toxicology and Industrial Health*: p. 0748233713483199, **2013**.
- [119] Doyle, A., Griffiths, J.B., *Cell and tissue culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. Wiley New York, **1998**.
- [120] Ebada, S.S., Edrada, R.A., Lin, W., Proksch, P., Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates, *Nature Protocols*, 3(12): p. 1820-1831, **2008**.
- [121] Wang, G., Zhang, J., et al., Understanding and correcting for carbon nanotube interferences with a commercial Ldh cytotoxicity assay, *Toxicology*, 299(2–3): p. 99-111, **2012**.
- [122] Strober, W., Trypan blue exclusion test of cell viability, *Current Protocols in Immunology*. p. A. 3B. 1-A. 3B. 2, **2001**.
- [123] Jensen, E.C., The basics of western blotting, *The Anatomical Record*, 295(3): p. 369-371, **2012**.
- [124] Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9): p. 4350-4354, **1979**.
- [125] Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72(1): p. 248-254, **1976**.
- [126] Kurien, B.T., Scofield, R.H., Western blotting, *Methods*, 38(4): p. 283-293, **2006**.
- [127] Pasternak, A.S., Miller, W.M., Measurement of trans-epithelial electrical resistance in perfusion: Potential application for in vitro ocular toxicity testing, *Biotechnology and Bioengineering*, 50(5): p. 568-579, **1996**.
- [128] Minuth, W.W., Denk, L., *Advanced culture experiments with adherent cells: From single cells to specialized tissues in perfusion culture*. 414, **2011**.
- [129] Kılıç, A., *Ht-29 ve caco-2 hücrelerinde hiperisin ile fotoaktivasyona bağlı değişikliklerin moleküler, akış sitometrisi, immünfloresan ve spektrofotometrik yöntemler ile araştırılması*, PhD, Biyoloji Bölümü, **2012**.

- [130] Health, U.D.o., Services, H., Appendix i: Guidelines for work with toxins of biological origin, *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Washington, DC, US Government Printing Office, 2007*.
- [131] Hughes, P., McLellan, H., et al., Estrogenic alkylphenols induce cell death by inhibiting testis endoplasmic reticulum Ca^{2+} pumps, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277(3): p. 568-574, **2000**.
- [132] Kim, J.Y., Han, E.H., et al., Bisphenol A-induced aromatase activation is mediated by cyclooxygenase-2 up-regulation in rat testicular leydig cells, *Toxicology Letters*, 193(2): p. 200-208, **2010**.
- [133] Karacaoğlu, E., Selmanoğlu, G., Effects of heat-induced food contaminant furan on reproductive system of male rats from weaning through postpuberty, *Food and Chemical Toxicology*, 48(5): p. 1293-1301, **2010**.
- [134] Zhou, Y., Wang, H., et al., Roles of mirnas in microcystin-Lr-induced sertoli cell toxicity, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 287(1): p. 1-8, **2015**.
- [135] Selmanoğlu, G., Evaluation of the reproductive toxicity of patulin in growing male rats, *Food and Chemical Toxicology*, 44(12): p. 2019-2024, **2006**.
- [136] Zinedine, A., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J., Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin, *Food and Chemical Toxicology*, 45(1): p. 1-18, **2007**.
- [137] Piersma, A.H., Bosgra, S., et al., Evaluation of an alternative in vitro test battery for detecting reproductive toxicants, *Reproductive Toxicology*, 38(0): p. 53-64, **2013**.
- [138] Mantovani, A., Maranghi, F., Risk assessment of chemicals potentially affecting male fertility, *Contraception*, 72(4): p. 308-313, **2005**.
- [139] Qui, R., *Effects of nucleoside analogues on protein expression in cells of the Serw3 cell line*, Doctor of Philosophy, Faculty of Medicine, **2014**.
- [140] Calvert, T., Aidoo, K., Candlish, A., Fuat, A.M., Comparison of in vitro cytotoxicity of fusarium mycotoxins, deoxynivalenol, t-2 toxin and zearalenone on selected human epithelial cell lines, *Mycopathologia*, 159(3): p. 413-419, **2005**.
- [141] Königs, M., Mulac, D., et al., Metabolism and cytotoxic effects of t-2 toxin and its metabolites on human cells in primary culture, *Toxicology*, 258(2): p. 106-115, **2009**.
- [142] Liu, X., Nie, S., Huang, D., Xie, M., Effects of nonylphenol exposure on expression of cell receptors and secretory function in mouse sertoli tm4 cells, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(2): p. 608-616, **2014**.

- [143] Hew, K., Heath, G.L., Jiwa, A.H., Welsh, M.J., Cadmium in vivo causes disruption of tight junction-associated microfilaments in rat sertoli cells, *Biology of Reproduction*, 49(4): p. 840-849, **1993**.
- [144] Boekelheide, K., Lee, J.-W., et al., A tumorigenic murine sertoli cell line that is temperature-sensitive for differentiation, *The American Journal of Pathology*, 143(4): p. 1159, **1993**.
- [145] Adler, S., Basketter, D., et al., Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: Current status and future prospects-2010, *Archives of Toxicology*, 85(5): p. 367-485, **2011**.
- [146] Hareng, L., Pellizzer, C., et al., The integrated project reprotect: A novel approach in reproductive toxicity hazard assessment, *Reproductive Toxicology*, 20(3): p. 441-452, **2005**.
- [147] Pointis, G., Gilleron, J., Carette, D., Segretain, D., Testicular connexin 43, a precocious molecular target for the effect of environmental toxicants on male fertility, *Spermatogenesis*, 1(4): p. 303-317, **2011**.
- [148] Bouaziz, C., Bouslimi, A., et al., The in vitro effects of zearalenone and t-2 toxins on vero cells, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65(5): p. 497-501, **2013**.
- [149] Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., et al., Methods of in vitro toxicology, *Food and Chemical Toxicology*, 40(2): p. 193-236, **2002**.
- [150] Widestrand, J., Lundh, T., Pettersson, H., Lindberg, J.E., Cytotoxicity of four trichothecenes evaluated by three colorimetric bioassays, *Mycopathologia*, 147(3): p. 149-155, **1999**.
- [151] Weyermann, J., Lochmann, D., Zimmer, A., A practical note on the use of cytotoxicity assays, *International Journal of Pharmaceutics*, 288(2): p. 369-376, **2005**.
- [152] Grant, R.L., Yao, C., Gabaldon, D., Acosta, D., Evaluation of surfactant cytotoxicity potential by primary cultures of ocular tissues: I. Characterization of rabbit corneal epithelial cells and initial injury and delayed toxicity studies, *Toxicology*, 76(2): p. 153-176, **1992**.
- [153] Ujhelyi, Z., Fenyvesi, F., et al., Evaluation of cytotoxicity of surfactants used in self-micro emulsifying drug delivery systems and their effects on paracellular transport in caco-2 cell monolayer, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(3): p. 564-573, **2012**.
- [154] Koizumi, T., Shirakura, H., et al., Mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes: Cadmium-induced active oxygen-related permeability changes of the plasma membrane, *Toxicology*, 114(2): p. 125-134, **1996**.
- [155] Fotakis, G., Timbrell, J.A., In vitro cytotoxicity assays: Comparison of ldh, neutral red, mtt and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology Letters*, 160(2): p. 171-177, **2006**.

- [156] Tran, S.-L., Puhar, A., Ngo-Camus, M., Ramarao, N., Trypan blue dye enters viable cells incubated with the pore-forming toxin hlyII of *Bacillus cereus*, *PLoS One*, 6(9): p. e22876, **2011**.
- [157] Minervini, F., Fornelli, F., et al., T-2 toxin immunotoxicity on human B and T lymphoid cell lines, *Toxicology*, 210(1): p. 81-91, **2005**.
- [158] Heidari, M., Ghazi-Khansari, M., Khoshnoodi, J., Shokri, F., Comparative measurement of in vitro T-2 toxin cytotoxicity using three different cytotoxicity assays, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 13(2): p. 153-157, **2003**.
- [159] Boekelheide, K., Neely, M.D., Sioussat, T.M., The Sertoli cell cytoskeleton: A target for toxicant-induced germ cell loss, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 101(3): p. 373-389, **1989**.
- [160] Fiorini, C., Tilloy-Ellul, A., et al., Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants, *Reproductive Toxicology*, 18(3): p. 413-421, **2004**.
- [161] Batias, C., Siffroi, J.-P., et al., Connexin43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 48(6): p. 793-805, **2000**.
- [162] Bekheet, S.H., Stahlmann, R., Disruption of gap junctional intercellular communication by antibiotic gentamicin is associated with aberrant localization of occludin, n-cadherin, connexin 43, and vimentin in Serw3 Sertoli cells in vitro, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(2): p. 155-160, **2009**.
- [163] Fink, C., Weigel, R., et al., Altered expression of ZO-1 and ZO-2 in Sertoli cells and loss of blood-testis barrier integrity in testicular carcinoma in situ, *Neoplasia (New York, NY)*, 8(12): p. 1019, **2006**.
- [164] Mitic, L.L., Schneeberger, E.E., Fanning, A.S., Anderson, J.M., Connexin-occludin chimeras containing the ZO-binding domain of occludin localize at MDCK tight junctions and NRK cell contacts, *The Journal of Cell Biology*, 146(3): p. 683-693, **1999**.
- [165] Defamie, N., Mograbi, B., et al., Disruption of gap junctional intercellular communication by lindane is associated with aberrant localization of connexin43 and zonula occludens-1 in 42GPA9 Sertoli cells, *Carcinogenesis*, 22(9): p. 1537-1542, **2001**.
- [166] Fanning, A.S., Jameson, B.J., Jesaitis, L.A., Anderson, J.M., The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton, *Journal of Biological Chemistry*, 273(45): p. 29745-29753, **1998**.
- [167] Lui, W.-Y., Lee, W.M., Regulation of junction dynamics in the testis—transcriptional and post-translational regulations of cell junction proteins, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 250(1): p. 25-35, **2006**.
- [168] Ivanov, A.I., Nusrat, A., Parkos, C.A., Endocytosis of the apical junctional complex: Mechanisms and possible roles in regulation of epithelial barriers, *Bioessays*, 27(4): p. 356-365, **2005**.

- [169] Boekelheide, K., Fleming, S.L., et al., Role of sertoli cells in injury-associated testicular germ cell apoptosis, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 225(2): p. 105-115, **2000**.
- [170] Koraïchi, F., Inoubli, L., et al., Neonatal exposure to zearalenone induces long term modulation of abc transporter expression in testis, *Toxicology*, 310: p. 29-38, **2013**.
- [171] Fenske, M., Fink-Gremmels, J., Effects of fungal metabolites on testosterone secretion in vitro, *Archives of Toxicology*, 64(1): p. 72-75, **1990**.
- [172] Wu, J., Tu, D., et al., T-2 toxin regulates steroid hormone secretion of rat ovarian granulosa cells through camp-pka pathway, *Toxicology Letters*, 232(3): p. 573-579, **2015**.
- [173] Furuse, M., Hirase, T., et al., Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions, *The Journal of Cell Biology*, 123(6): p. 1777-1788, **1993**.
- [174] Seth, A., Sheth, P., Elias, B.C., Rao, R., Protein phosphatases 2a and 1 interact with occludin and negatively regulate the assembly of tight junctions in the caco-2 cell monolayer, *Journal of Biological Chemistry*, 282(15): p. 11487-11498, **2007**.
- [175] Li, M.W., Mruk, D.D., Lee, W.M., Cheng, C.Y., Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol a in vitro: Is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics?, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(11): p. 2302-2314, **2009**.
- [176] Siu, E.R., Mruk, D.D., Porto, C.S., Cheng, C.Y., Cadmium-induced testicular injury, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3): p. 240-249, **2009**.
- [177] Sobarzo, C.M., Lustig, L., Ponzio, R., Denduchis, B., Effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate on n-cadherin and catenin protein expression in rat testis, *Reproductive Toxicology*, 22(1): p. 77-86, **2006**.
- [178] Newton, S.C., Blaschuk, O.W., Millette, C.F., N-cadherin mediates sertoli cell-spermatogenic cell adhesion, *Developmental Dynamics*, 197(1): p. 1-13, **1993**.
- [179] Bekheet, S.H., Cadmium chloride rapidly alters both btb tight junction proteins and germ cells in young rat testes, *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, 2: p. 59-74, **2010**.
- [180] Murphy, F., Waung, J., et al., N-cadherin cleavage during activated hepatic stellate cell apoptosis is inhibited by tissue inhibitor of metalloproteinase-1, *Comparative Hepatology*, 3(Suppl 1): p. S8, **2004**.
- [181] Koutsouki, E., Beeching, C.A., et al., N-cadherin-dependent cell-cell contacts promote human saphenous vein smooth muscle cell survival, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(5): p. 982-988, **2005**.

- [182] Nagase, M., Alam, M.M., et al., Apoptosis induction by t-2 toxin: Activation of caspase-9, caspase-3, and dff-40/cad through cytosolic release of cytochrome c in hl-60 cells, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(8): p. 1741-1747, **2001**.
- [183] Chen, J., Chu, Y., et al., T-2 toxin induces apoptosis, and selenium partly blocks, t-2 toxin induced apoptosis in chondrocytes through modulation of the bax/bcl-2 ratio, *Food and Chemical Toxicology*, 44(4): p. 567-573, **2006**.
- [184] Chen, J.-h., Cao, J.-l., et al., T-2 toxin-induced apoptosis involving fas, p53, bcl-xl, bcl-2, bax and caspase-3 signaling pathways in human chondrocytes, *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(6): p. 455-463, **2008**.
- [185] Doi, K., Shinozuka, J., Sehata, S., T-2 toxin and apoptosis, *Journal of Toxicologic Pathology*, 19(1): p. 15-27, **2006**.
- [186] Matheieu, F., Galmier, M.-J., Pognat, J.F., Lartigue, C., Influence of different calcic antagonists on the caco-2 cell monolayer integrity or "teer, a measuement of toxicity?, *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 30(1-2): p. 85-90, **2005**.
- [187] Janecki, A., Jakubowiak, A., Steinberger, A., Regulation of transepithelial electrical resistance in two-compartment sertoli cell cultures: In vitro model of the blood-testis barrier, *Endocrinology*, 129(3): p. 1489-1496, **1991**.
- [188] Velarde, G., Ait-Aissa, S., et al., Use of transepithelial electrical resistance in the study of pentachlorophenol toxicity, *Toxicology in Vitro*, 13(4): p. 723-727, **1999**.
- [189] Okada, T., Narai, A., et al., Assessment of the marine toxins by monitoring the integrity of human intestinal caco-2 cell monolayers, *Toxicology in Vitro*, 14(3): p. 219-226, **2000**.
- [190] Zhang, Y.H., Lin, L., et al., Disruption effects of monophthalate exposures on inter-sertoli tight junction in a two-compartment culture model, *Environmental Toxicology*, 23(3): p. 302-308, **2008**.
- [191] Weidner, M., Hüwel, S., et al., Influence of T-2 and HT-2 toxin on the blood-brain barrier in vitro: New experimental hints for neurotoxic effects, *PloS One*, 8(3): p. e60484, **2013**.
- [192] Wang, X., Wang, W., et al., High risk of embryo-fetal toxicity: Placental transfer of T-2 toxin and its major metabolite HT-2 toxin in BeWo cells, *Toxicological Sciences*, 137(1): p. 168-178, **2014**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Elif KARACAOĞLU

Doğum Yeri : Bursa

Medeni Hali : Evli

E-posta : elifkush@hacettepe.edu.tr

Adresi : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Zooloji ABD

Eğitim

Lise : Bursa Süleyman Çelebi Lisesi, 2002

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 2006

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Zooloji ABD, 2009

Doktora : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Zooloji ABD, 2015

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce, İyi Derecede

İş Deneyimi

2007- Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Zooloji ABD' de Araştırma Görevlisi

Deneyim Alanları

Üreme Toksikolojisi (*in vitro*, *in vivo*), Gıda Toksikolojisi

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

SerW3 Hücrelerinde T-2 Toksininin Sitotoksitesinin Belirlenmesi, (HÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi) Proje No: 012D08601003, Bütçe: 11.381 TL.

T-2 Toksininin Kan-Testis Bariyeri Üzerine Etkisinin SerW3 Hücre Hattında Araştırılması, (TÜBİTAK Kimya, Biyoloji Araştırma Destek Grubu) Proje No: 212T238, Bütçe: 30.000 TL.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

In vitro Cytotoxicity Assessment of a Trichotecene Mycotoxin T-2 Toxin on SerW3 Cells, 9th World Congress on Alternatives to Animal Testing in the Life Sciences, Prag, Çek Cumhuriyeti, Ağustos 2014, (Poster Sunumu).