

T.C.
YENİYÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

SİTRİNİNİN TM4 SERTOLİ HÜCRELERİ ÜZERİNE OKSİDATİF ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERVE ARABUL KURŞUN

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Tülay İrez

İSTANBUL

2017

T.C.
YENİYÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

SİTRİNİNİN TM4 SERTOLİ HÜCRELERİ ÜZERİNE OKSİDATİF ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERVE ARABUL KURŞUN

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Tülay İrez

İSTANBUL

2017

**TC.
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez savunma tarihi: 23.06.2017

Jüri Başkanı

Danışman

Prof. Dr. Tülay İrez

Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye

Prof. Dr. İmer OKAR

Yeni Yüzyıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Üye

Prof. Dr. Melike ERKAN

İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi

ÖNSÖZ

Bu çalışma, sitrininin TM4 Sertoli hücreleri üzerinde oluşturduğu oksidatif etkileri araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Lisansüstü öğrenimim süresince emeği geçen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Tülay İREZ'e, çalışmamın her aşamasında değerli fikirleri, bilgileri ve deneyimleri ile bana destek olan çok değerli hocam Prof. Dr. Melike ERKAN'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan, manevi desteğini esirgemeyen, bilgi ve tavsiyelerinden yararlandığım sevgili çalışma arkadaşlarım Arař. Gör. Dr. Yasemin AYDIN'a, Arař. Gör. Dr Banu ORTA YILMAZ'a ve Uzman Biyolog Nebahat YILDIZBAYRAK'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca sevgi ve desteklerini esirgemeyen, maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan en değerli varlığım babam Ahmet ARABUL'a ve canım aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Merve ARABUL KURŞUN

Haziran, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	vi
KISALTMALAR	vii
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Testisin Genel Yapısı	5
2.2. Sertoli Hücresi	7
2.3. Sitrinin	9
2.3.1. Sitrininin Genel Özellikleri	9
2.3.2. Sitrinine Maruz Kalma Yolları	10
2.3.3. Sitrininin Toksik Etkileri	11
2.4. Apoptoz	15
2.4.1 Apoptozun Mekanizmaları	15
2.4.2. Apoptozun Belirlenmesi	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Kullanılan Hücre Soyu ve Hücre Kültürü	19
3.2. Hücrenin Pasaj İşlemi	19
3.3. Sitrinin Konsantrasyonlarının Hazırlanması	20
3.4. MTT Hücre Canlılık Testi	22
3.5. Bromodeoksiuridin (BrdU) Yöntemi	22
3.6. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Yöntemi	23
3.7. Apoptoz/Nekroz	24
3.8. İstatistik Analiz	25
4. BULGULAR	26
4.1. Sitotoksisite Bulguları	26

4.1.1. MTT Bulguları	26
4.1.2. Laktat Dehidrogenaz Bulguları	32
4.1.3. BrdU Bulguları	33
4.2. Apoptoz/Nekroz Bulguları.....	34
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ	53
7. KAYNAKLAR	54
8. ÖZGEÇMİŞ.....	66



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1.1.: Testisin genel yapısı.....	6
Şekil 2.2.1.: Seminifer tübülün şematik gösterimi.....	8
Şekil 2.3.1.1.: Sitrininin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.4.1.1.: Apoptoz mekanizmasının ekstrinsik ve intrinsik yolları.....	16
Şekil 4.1.1.1.: Sitrininin TM4 sertoli hücrelerinde 6 saat maruziyet sonunda yüzde canlılık üzerine doza bağlı etkileri.....	26
Şekil 4.1.1.2.: Sitrininin TM4 sertoli hücrelerinde 12 saat maruziyet sonunda yüzde canlılık üzerine doza bağlı etkileri.....	27
Şekil 4.1.1.3.: Sitrininin TM4 sertoli hücrelerinde 24 saat maruziyet sonunda yüzde canlılık üzerine doza bağlı etkileri.....	28
Şekil 4.1.1.4.: Sitrininin TM4 sertoli hücrelerinde 48 saat maruziyet sonunda yüzde canlılık üzerine doza bağlı etkileri.....	29
Şekil 4.1.1.5.: Sitrininin TM4 sertoli hücrelerinde 72 saat maruziyet sonunda yüzde canlılık üzerine doza bağlı etkileri.....	30
Şekil 4.1.2.1.: Sitrininin TM4 sertoli hücreleri üzerinde laktat dehidrogenaz aktivitesinin doza bağlı etkileri.....	32
Şekil 4.1.3.1.: Sitrininin TM4 sertoli hücrelerinde BrdU yöntemiyle belirlenen hücre çoğalması üzerine doza bağlı etkileri.....	33
Şekil 4.2.1.: Sitrininin TM4 Sertoli hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerinde etkileri. (Kontrol grubu).....	35
Şekil 4.2.2.: Sitrininin TM4 Sertoli hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerinde etkileri. (25 µM sitrinin grubu).....	36

Şekil 4.2.3.: Sitrininin TM4 Sertoli hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerinde etkileri. (50 µM sitrinin grubu).....	37
Şekil 4.2.4.: Sitrininin TM4 Sertoli hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerinde etkileri. (75 µM sitrinin grubu)	38
Şekil 4.2.5.: Sitrininin TM4 Sertoli hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerinde etkileri.) (100 µM sitrinin grubu)	39
Şekil 4.2.6.: Sitrininin TM4 Sertoli hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerinde etkileri. (125 µM sitrinin grubu)	40
Şekil 4.2.7.: Sitrininin TM4 Sertoli hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerinde etkileri. (150 µM sitrinin grubu)	41
Şekil 4.2.8.: Sitrininin TM4 Sertoli hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerinde etkileri. (175 µM sitrinin grubu)	42
Şekil 4.2.9.: Sitrininin TM4 Sertoli hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerinde etkileri. (200 µM sitrinin grubu)	43

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.3.2.1.: Bazı genel gıda maddelerinde bulunan sitrinin konsantrasyonları.....	11
Tablo 3.3.1.: Kontrol ve sitrinin konsantrasyonları.....	21
Tablo 4.1.1.1.: Sitrinin maddesinin Leydig hücrelerinde zamana bağlı IC50 değerleri.....	31
Tablo 4.2.1.: TM4 Sertoli hücrelerinde sitrinin uygulanan gruplarda 24 saat süre sonunda belirlenen apoptoz/nekroz değerleri.....	34

KISALTMALAR

3 β -HSD: 3 β -hidroksisteroiddehidrogenaz

ABP: Androjen bağlayıcı protein

AIF: Apoptozu uyaran faktör

APAF-1: Apoptotik proteaz aktive edici faktör

ATP: Adenozin trifosfat

BrdU: Bromodeoksiuridin

CSF: Koloni uyarıcı faktör

DER: Düz yüzlü endoplazmik retikulum

FSH: Folikül stimule edici hormon

GSH: Glutasyon

GSSG: Okside glutasyon

IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü

LDH: Laktat dehidrogenaz

MN: Mikronükleus

MTT: 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromit

NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid

NGF: Nöron büyüme faktörü

PBM: Periferel kan mononükleer

SCE: Kardeş kromatik değişim

SİT C: Sitokrom c

StAR: Steroidogenik akut düzenleyici protein

TNF: Tümör nekroz faktör

TNFR: Tümör nekroz faktör reseptörü

P450scc: Kolesterol yan zincir kırıcı enzim

IC50: Yarı maksimal inhibisyon konsantrasyonu

LD50: Populasyonun yarısını öldüren doz

DAPI: 4',6-diamidin-2-fenilindol

FITC: Fluorescein isothiocyanate

ATCC: American Type Culture Collection

DMSO: Dimetil sülfoksit

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

SDS: Sodyum dodesil sülfat

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotit

PBS: Phosphate buffered saline

ÖZET

SİTRİNİNİN TM4 SERTOLİ HÜCRELERİ ÜZERİNE OKSİDATİF ETKİSİ

Bu çalışmada sitrininin testis TM4 Sertoli hücreleri üzerine oluşturduğu sitotoksisitenin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Mikotoksinler, insanlar ve hayvanlarda hastalıklara ve ölüme sebep olabilen, küf mantarları tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir. Günümüzde 300'den fazla mikotoksin türü tanımlanmış ve insan sağlığı için ciddi tehdit oluşturan bu mikotoksinler ile yapılan çalışmalar artmıştır Tarım ürünleri, toplanmadan önce ya da toplandıktan sonra depolanma ve işlem görme sırasında küflerle kontamine olabilirler. İnsanlar mikotoksinlere, kontamine olmuş bitki kökenli gıdalar ve kontamine olmuş yemlerle beslenen hayvanlar yoluyla maruz kalabildiği gibi hava ve temas yoluyla da maruz kalabilir. Sitrinin yaygın bulunan bir mikotoksindir ve bu mikotoksine maruz kalmak renal ve hepatik hastalıklara neden olmaktadır. Sitrininin hücrede oksidatif stresi artırarak, hücre fonksiyonlarını bozduğu ve apoptotik hücre ölümünü arttırdığı yapılan çalışmalarda belirtilmektedir. Sitrinin erkek üreme sistemi ve fonksiyonunu da olumsuz yönde etkiler. Hayvanlarla yapılan çalışmalarda sitrininin, testis ve yardımcı üreme organlarının ağırlığının artmasına, anormal sperm sayısının artmasına, canlı sperm sayısının azalmasına neden olur.

Sitrinin TM4 Sertoli hücrelerine 6, 12, 24, 48 ve 72 saat süreyle 25-200µM aralığında sekiz farklı konsantrasyonda uygulanmıştır. Sertoli hücrelerinde hücre canlılığı, hücre çoğalması, hücre sitotoksisitesi ve apoptoz/nekroz oranları belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, sitrininin hücre canlılığı ile sentez fazındaki hücre sayısını azalttığını ve laktat dehidrogenaz aktivitesini arttırdığını göstermektedir. Ayrıca sitrinin hücre sitotoksisitesine bağlı olarak apoptoza ve nekroza yol açtığı açığa çıkarılmıştır.

Anahtar kelimeler: Sitrinin, TM4 Sertoli hücresi, sitotoksisite, apoptoz/nekroz.

ABSTRACT

OXIDATIVE EFFECT OF CITRININE ON TM4 SERTOLI CELLS

In this study, it is aimed to determine the cytotoxicity that citrinine forms on the testis TM4 Sertoli cells.

Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungus that may cause diseases and death in humans and animals. Today, more than 300 mycotoxin species are defined and studies on these mycotoxins which are a significant threat on human health have increased. Agricultural products may be contaminated by molds before or after they are harvested during storing or processing. Humans may be exposed to mycotoxins through contaminated phyto-genetic foods and animals fed with contaminated feeds, and through air and contact. Citrinine is a common mycotoxin, and exposing to this mycotoxin causes to renal and hepatic diseases. It is indicated in studies that citrinine disrupts cell functions and increases apoptotic cell death. Citrinine affects male reproductive system and its function adversely. In studies conducted on animals, citrinine causes to increase of testis and assisted reproductive organ weight, abnormal sperms and decrease of alive sperms.

Citrinine is applied in TM4 Sertoli cells every 6, 12, 24, 48 and 72 between 25-200 μ M at eight different concentration. Cell viability, cell proliferation, cell cytotoxicity and apoptosis/necrosis rates in Sertoli cells are determined. Findings show that citrinine decreases the cell viability and number of cells at synthesis phase and increases lactate dehydrogenase activity. In addition, it is shown that citrinine causes to apoptosis and necrosis depending on the cell cytotoxicity.

Keywords: Citrinin, TM4 Sertoli cell, cytotoxicity, apoptosis/necrosis

1. GİRİŞ

Mikotoksinler, insanlar ve hayvanlarda hastalıklara ve ölüme sebep olabilen, küf mantarları tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir. Tarım ürünleri, toplanmadan önce ya da toplandıktan sonra depolanma ve işlem görme sırasında küflerle kontamine olabilirler (1). Yetiştirilen tarım ürünlerinin %25'inden fazlasının mikotoksinler ile kontamine olduğu bildirilmiştir. Mikotoksinler tahıllarda, yağlı tohumlarda, meyve ve sebzelerde bulunurlar. Ayrıca mikotoksinler, hayvanların kontamine olmuş yemler ile beslenmeleri nedeniyle süt, et ve diğer hayvansal ürünlerde de bulunmaktadır. Hayvanlar ve insanlar mikotoksinlere beslenme, soluma ve deri teması yoluyla maruz kalırlar (2). Çeşitli toksik etkileri nedeniyle mikotoksinler, ciddi sağlık sorunlarının yanında kontamine tahılların satılamaması ve hayvanların telef olması ile ekonomik kayıplara da neden olmaktadır. Mikotoksinler karsinojenik, teratojenik ve mutajenik etkilerinin yanı sıra hepatotoksisite, nefrotoksisite, immün sistemin bozulması ile hastalıklara yatkınlık, büyümenin yavaşlaması ve üreme fonksiyonlarının bozulması gibi pek çok toksik etkiye neden olabilirler (2).

Çeşitli çalışmalar sitrininin üreme organları üzerindeki etkilerini ortaya çıkarmıştır (3-5). Hayvanlarla yapılan bir çalışmada sitrinin testis ve yardımcı üreme organlarının ağırlığının azalmasına, anormal sperm sayısının artmasına, canlı sperm sayısının azalmasına neden olduğu, Leydig hücrelerinde testosteron üretimini azalttığı buna bağlı olarak infertiliteye neden olduğu belirtilmiştir (5). Yapılan *in vitro* çalışmalarda ise Leydig hücrelerinde testosteron sentezinde önemli rolleri olan P450_{scc}, 3 β -HSD ve StAR proteinlerinin ekspresyonunun azalması sonucu testosteron üretiminin azaldığı öne sürülmüştür (3, 4).

Bu çalışmada, sitrininin TM4 Sertoli hücreleri üzerine sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Tezin "Genel Kısımlar" bölümünde Sertoli hücreleri, sitrinin ve apoptoz ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Tezin “Gereç ve Yöntem” bölümünde laboratuvarında uygulanan işlemler ayrıntılı şekilde anlatılmıştır. Yapılan bu işlemler sonucunda elde edilen veriler tezin “Bulgular” bölümünde belirtilmiştir.

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

Yapılan bu çalışmanın sonuçlarına göre, sitrininin hücre sitotoksitesinin belirteçlerinden olan hücre canlılığı ile sentez fazındaki hücre sayısını azalttığı ve laktat dehidrogenaz aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra sitrininin 6-72 saat zaman aralığında IC50 konsantrasyonları belirlenmiştir. Ayrıca sitrininin hücre sitotoksitesine bağlı olarak apoptozu ve nekrozu teşvik ettiği de açığa çıkarılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testisin Genel Yapısı

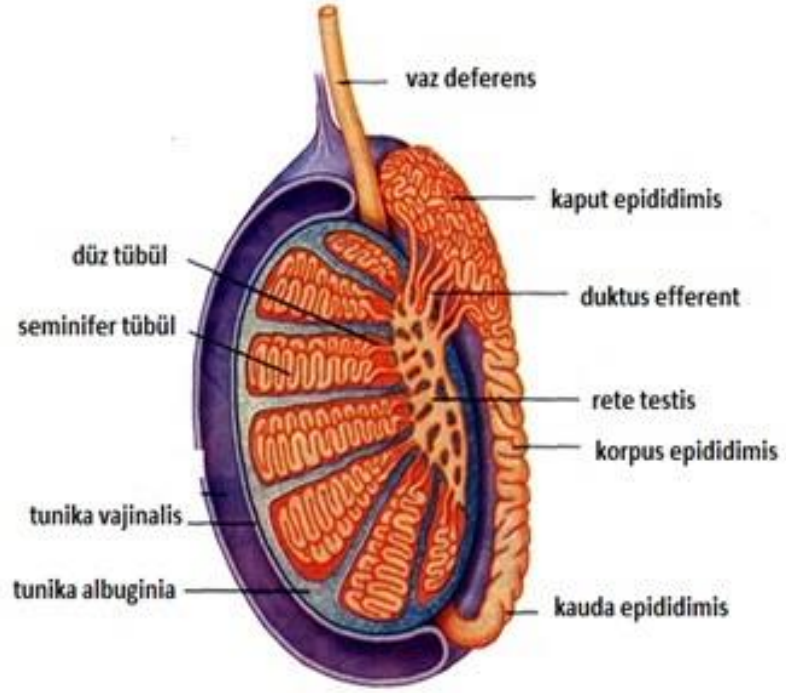
Erkek üreme sisteminin temel işlevi, spermi üretmek ve cinsiyet hormonlarını salgılamaktır. Erkek üreme sistemi testisler ve yardımcı yapılardan (epididimis, duktus deferens, ejakulatör kanal, vesikula seminalis, prostat bezi, bulboüretral bez, penis) oluşmaktadır. Testisler ise, sperm üretiminden sorumlu seminifer tübüllerden ve üreme hormonlarının çoğunun üretiminden sorumlu Leydig hücrelerinden oluşan interstisyel alandan meydana gelir. (6-8).

İnterstisyel alanda bulunan Leydig hücresi, üreme hormonlarının çoğunun üretiminden sorumludur. Ergin erkeklerde Leydig hücrelerinden salınan hormonlar spermatogenez, steroidogenez ve normal üreme fonksiyonlarının sürdürülebilmesini sağlar (7, 9).

Testisler karın boşluğunun dışında skrotumun içinde yer alan çift organlardır. Bu yerleşimleri testisin vücut sıcaklığından 2°C/3°C düşük bir sıcaklıkta olmalarını sağlar. Normal spermatogenez için 34°C/35°C sıcaklık gereklidir. Olgun testisin posteriyor yüzü epididimis ile ilişkidir. Hem testis hem de epididimis skrotal kese içerisinde vaz deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksusları içeren spermatik kordon ile asılıdır. Testis şekil 2.1.1'de görüldüğü gibi rete testisin yer aldığı yerde kalınlaşarak mediastiumu oluşturan tunika albuginia ile çevrelenir. Mediastiumdan testiküler kitleye doğru uzanan fibröz septumlar dokuyu 250-300 lopçuğa böler. Her bir lopçuk 1-4 seminifer tübülü içerir (8).

Seminifer tübüller, farklı evrelerde spermatogenik hücreleri ve Sertoli hücrelerini içerir, fakat kan damarları bulunmaz. Sertoli hücreleri spermatogenik hücrelerden farklı olarak çoğalma özelliği göstermezler. Destek hücreleri olarak da adlandırılan Sertoli hücreleri seminifer tübülün bazalinden lümeneye kadar uzanır ve bu konumuyla spermatogenik hücrelere mekanik desteklik sağlar. Bunun yanında spermatogenik hücrelerin

beslenmesine yardımcı olurken, Sertoli-Sertoli bağlantı kompleksi kan-testis bariyerini oluşturarak lümen altındaki bölgeyi interstisyel bağ dokusundan gelen zararlı etkilere karşı korur (10, 11).



Şekil 2.1.1.: Testisin genel yapısı (8).

2.2. Sertoli Hücresi

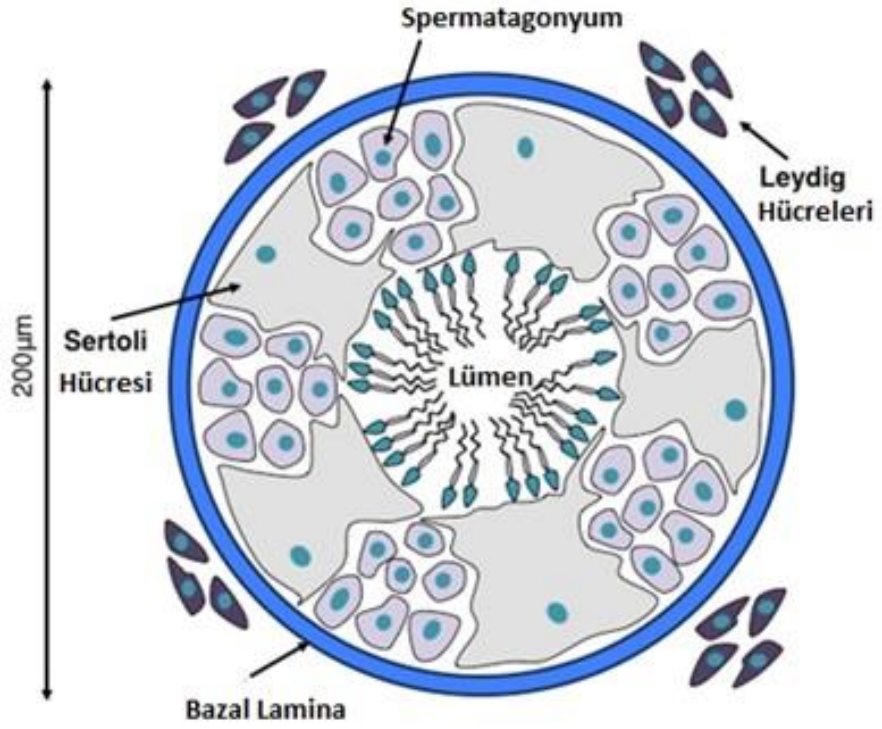
1865 yılında, İtalyan bilim adamı Enrico Sertoli tarafından keşfedilen, destek hücreleri olarak bilinen Sertoli hücreleri, seminifer epitelin bazalinden lümenine doğru uzayan, prizmatik hücrelerdir (12, 13). Sertoli hücresi, tübüller arası boşluk ve seminifer tübüller arasında köprü hücreler olarak görev yapar (8).

Sertoli hücresinde ökromatik iri bir nükleus, bir veya daha fazla belirgin nükleolus, bol miktarda düz yüzlü endoplazmik retikulum (DER), iyi gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda lizozom ve mitokondriler bulunur. Aynı zamanda glikojen, lipit damlacıkları ve albumin kristalleri de mevcuttur. Dayanıklı yapıda ki bu hücreler, vimentin, aktin ve mikrotübüllerden oluşan zengin bir hücre iskeletine sahiptir (13, 14).

Sertoli hücreleri puberteye kadar seminifer epitelyumun dominant hücre tipidir. Puberteden sonra, seminifer tübülleri döşeyen hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur. Daha ileri yaştaki erkeklerde spermatogenetik hücre popülasyonu düştüğü zaman, sertoli hücreleri tekrar epitelin ana elemanı haline gelir. Sertoli hücrelerinin fonksiyonları, gelişmekte olan spermatogenetik hücreleri desteklemek, korumak ve beslemektir. Ayrıca, spermatogenezin sonunda spermatidler tarafından atılan rezidual (artık) cisimcikler olarak adlandırılan fazla hücre kısımlarını fagosite etmek, olgun spermatidlerin aktin aracılı kasılmalarla, seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak ve seminifer tübül lümenine proteinler ve iyonlardan zengin bir sıvı yaymaktır (Şekil 2.2.1.).

Sertoli hücreleri folikül sitümüle hormon (FSH) uyarımına cevap verirler. FSH, androjen-bağlayıcı protein (ABP) sentezini ve sekresyonunu düzenler. ABP testosteron ve dihidrotestosteron androjenlerine yüksek bağlanma afinitesinde olan bir salgısal proteindir. Androjen-ABP kompleksinin fonksiyonu henüz bilinmemekle birlikte, bu kompleks epididimisin proksimal kısımlarına taşınır. Sertoli hücreleri inhibin ve aktivin alt ünitelerini (α ve β alt üniteleri) salgırlar. İnhibin ($\alpha\alpha$ heterodimeri) hipotalamus ve ön hipofizden

salınan gonadotropin salgılayıcı bir faktördür ve FSH üzerine negatif feedback (geri etki) bir etki gösterir. Aktivin ise ($\alpha\alpha$ veya $\beta\beta$ homodimer) FSH salınımı üzerinde pozitif bir etki gösterir. Sertoli hücreleri puberteden sonra postmitotiktir. Erişkin testisinde mitotik hücre bölünmesi gözlenmez (8).



Şekil 2.2.1.: Seminifer tübülün şematik gösterimi (8).

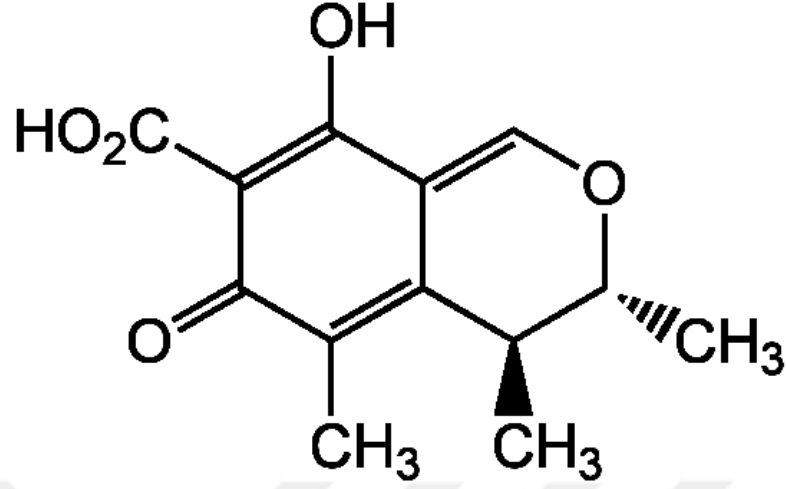
2.3. Sitrinin

Mikotoksinler, insanlar ve hayvanlarda hastalıklara ve ölüme sebep olabilen, küf mantarları tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir. Tarım ürünleri, toplanmadan önce ya da toplandıktan sonra depolanma ve işlem görme sırasında küflerle kontamine olabilirler (1).

Sitrinin, *Penicillium citrinum* kültüründen ilk olarak Hetherington ve Raistrick tarafından izole edilen mantar metabolizmasının ikinci bir ürünüdür. *Penicillium* (*P. expansum*, *P. verrucosum*), *Aspergillus* (*A. terreus*), ve *Monascus* (*M. ruber*) mantar türleri sitrinin mikotoksinini üretmektedir (15, 16).

2.3.1. Sitrininin Genel Özellikleri

Kimyasal formülü $C_{13}H_{14}O_5$ [IUPAC: (3R, 4S) -4, 6 dihidro - 8- hidroksi -3, 4, 5-trimetil -6 okso -3H -2- benzopiran -7- karboksilik asit] olan sitrinin molekül ağırlığı 250,25 g/mol olan bir mikotoksindir (Şekil 2.3.1.1). 250 nm ve 333 nm dalga boylarında maksimum ultraviyole absorpsiyonu ile asidik limon sarısı kristaller oluşturur ve erime sıcaklığı 172 °C'dir. Sitrinin suda çok az çözünürken, sodyum hidroksit, sodyum karbonat ya da sodyum asetat solüsyonlarında; metanol, asetonitril, etanol ve diğer birçok polar organik çözücülerde çözünebilir (17). Sitrininin bozunması kuru şartlarda 175 °C üstündeki sıcaklıklarda, su varlığında ise 100 °C üzerindeki sıcaklıklarda meydana gelir. Bilinen bozunma ürünleri, iki sitrinin molekülünden meydana gelen ve sitrinine göre daha fazla sitotoksisite gösteren sitrinin H₁ ve daha düşük sitotoksik etki gösteren sitrinin H₂'dir (18).



Şekil 2.3.1.1.: Sitrininin kimyasal yapısı.

2.3.2. Sitrinine Maruz Kalma Yolları

Sitrinin, *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Monascus*, *Occurs* gibi birçok mantar türlerinden üretilen bir mikotoksindir. Aynı zamanda saklanan tahıllarda bol miktarda oluşan sitrinin, fasulye meyve ve süt ürünlerinde de bulunabilir (Tablo 2.3.2.1) (18, 19).

Sitrinin süt ve hayvansal gıdalarda bulunmasının sebebi; yetiştirilen tarım ürünlerinin % 25'inden fazlasının mikotoksinlerle kontamine olur, hayvanlarda bu gıdalarla beslenmesi sonucunda mikotoksinler et ve süt ürünlerine de bulaşmış olur (2). Çoğu mikotoksin gibi sitrinin de besin zincirine girerek her canlıya taşınabilmektedir (20).

Detaylı olarak nelerde bulunduğu bahsedecek olursak; buğday, yulaf, arpa, mısır, soya fasulyesi, pirinç gibi tahıllarda, elma, armut, kavun, üzüm, şeftali ve domates gibi meyvelerde ve yağlı tohumlarda bulunur (21-25).

Tablo 2.3.2.1.: Bazı genel gıda maddelerinde bulunan sitrinin konsantrasyonları.

Gıda maddesi	Sitrinin PS kg ⁻¹ kütle fraksiyonu	Ülke	Referanslar
Arpa	160 ila 2000 arası	Danimarka	14
	30 ila 480 arası	İsveç	15
Elma	320 ila 920 arası	Portekiz	16
Pirinç	49 ila 92 arası	Hindistan	6
	700 ila 1130 arası	Japonya	
Mısır unu	27 ila 73 arası	Japonya	17
	10 ila 98 arası	Tayland	
	212	Burma	
Domates	70 ila 760 arası	Kanada	18
Mısır	12	Hindistan	19
Mayalanmış mısır	580	Gana	20

2.3.3. Sitrinin Toksik Etkileri

Yapılan çalışmalarda sitrininin nefrotoksik, hepatotoksik, mutajenik ve teratojenik özellikler gösterdiği belirtilmiştir (23, 26, 27). Sitrinin sitotoksitesi bir hücre kültüründen diğerine önemli derecede değişkenlik gösterir. Kültürlü hepatom hücreleri üzerinde 50 µmol/L⁻¹ ile 200 µmol/L⁻¹ arasındaki konsantrasyonlarda sitotoksik iken, 25 µmol/L⁻¹ dozlarında sitotoksik değildir (28). Sitrinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi, 0 µmol/L⁻¹'den 250 µmol/L⁻¹'e yükselen sitrinin konsantrasyonları ile tedavi edilen yeşil maymun böbreğinden alınan Vero hücreleri üzerindeki MTT tahlili ile test edildi. Hücre canlılığında 60 µmol/L⁻¹ konsantrasyonuna kadar önemli bir değişim gözlenmedi ve tahmin edilen sitrinin IC50'si, 48 saatlik maruziyetten sonra neredeyse 220 µmol/L⁻¹'idi. Aynı maruziyet süresi ile insan embriyonik hücresi için sitrinin IC50'si 120 µmol/L⁻¹'idi. 24 saatlik maruziyette, insan promiyelositik lösemi (HL-60) hücreleri ve domuz böbreği PK15 hücreleri için sitrinin IC50'si sırasıyla 50 µmol/L⁻¹ ve 68 µmol/L⁻¹ idi.

Sitrinin akut LD50'si, uygulama yolu, psikolojik koşullar ve hayvan türleri ile değişkenlik gösterir. Subkutan LD50 vücut ağırlığı 67 mg/kg⁻¹ iken sıçanlar için oral LD50, vücut ağırlığı 50 mg/kg⁻¹'dir (29). Hamile sıçanların hamileliğin 6, 9, ve 10 günlerinde 35 mg/kg⁻¹ ile subkutan tedavisi %50 veya daha

yüksek oranda annenin ölümüyle sonuçlandı (30). Hollanda Kemerli tavşanında oral LD50 134 mg/kg⁻¹'dir ve Yeni Zelanda Beyaz tavşanın da ise bu yaklaşık olarak 120 mg/kg⁻¹'dir (31, 32). Tavşanlara, kobay farelerine, sıçanlara ve domuzlara uygulanan akut öldürücü dozlar böbreklerin şişmesine ve akut tübüler nekroza neden oldu (33, 34).

Bir *Penicillium viridicatum* Westling türünden izole edilen su süspansiyonu ile sıçanların subkronik oral tedavisi büyümüş böbrek, hidropik dejenerasyon, fırçamsı kenar ve proksimal tübüllerde piknotik çekirdek kaybı ile karakterize olan sitrinin uyarılmış böbrek hasarlarına neden oldu (33). Altı hafta boyunca haftalık olarak sitrinin (20 mg/kg⁻¹) enjeksiyonları ile farelerin tedavisi kemik iliği hücrelerinin hepsinde, kırmızı kan hücresi prekürsörlerinde, beyaz kan hücresi prekürsörlerinde, megakaryositlerde önemli derecede azalmaya ve dalak hücrelerinin toplam sayısında azalmaya neden oldu (35).

Mevcut literatürdeki sitrinin karsinogenisitesi üzerindeki veriler oldukça nadirdir. Arai ve Hibino, erkek Fisher 344 sıçanlarının 60 ve 80 hafta boyunca sitrinin tedavisinden sonra böbreklerinde selim huylu tümör görüldüğünü rapor ederken, Kanisawa 70 haftalık bir diyet ile sitrinine (0 mg/kg⁻¹, 100 mg/kg⁻¹, ve 200 mg/kg⁻¹) maruz kalmış olan farelerde sitrininin tümöre neden olduğunu gözlememiştir (36, 37).

Sitrininin genotoksisitesi, çeşitli test sistemlerinin hem pozitif hem de negatif sonuçlar vermesinden dolayı kesin surette oluşturulmamıştır 24 saat boyunca sitrinine maruz kalmış Vero hücrelerinde (komet deneyi) tek hücre jel elektroforez kullanılarak DNA hasarında bir artış tespit edilmiştir (38). Ancak, aynı yöntem insandan türeyen karaciğer hücrelerinde (HepG2) ve insan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK293) Fpg'nin var olup olmadığı önem teşkil etmeksizin negatif sonuçlar vermiştir. Bu, sitrinin kaynaklı oksidatif stresin DNA'yı etkilemediğini ortaya koyar (39, 40).

Negatif sonuçların aksine, sitrinine maruz kalan çeşitli hücre kültürleri mikronükleus (MN) frekansında önemli derecede artış göstermiştir. PK15

hücrelerinin yirmi dört saat boyunca 30 $\mu\text{mol/L}^{-1}$ sitrinine maruz kalması MN frekansında (% 9.50) kontrol üzerinde (% 2.75) önemli bir artışa neden olmuştur (41). Bu artış HEPG2 hücrelerinde, insan lenfositlerinde ve Çin hamsteri V79 hücrelerinde de fark edilmiştir, ancak genotoksisite gösteren sitrinin konsantrasyonları hücre kültürleri arasında farklılık göstermiştir (39, 42).

Sitrinin mutajenisite testi de sonuçsuz kalmaktadır. Sitrinin, *Salmonella tifimurium*'un TA-98 ve TA-100 türlerinde S9-miks (HepG2'den türeyen enzim homojenat) yapılarak veya yapılmadan test edildiğinde mutajenik özellik göstermemiştir (39). Başka bir çalışmada sitrinin mutajenisitesini test etmek için *S. Tifimurium*'un üç ek türü (TA-1535, TA-1538 ve TA-97) kullanılmıştır (43), fakat herhangi bir mutajenik etki gözlenmemiştir. Ancak, birincil hepatosit kültürü eklendiğinde, TA-98 türü önemli derecede doza bağlı mutajenik yanıt göstermiş olup, TA-100 türü hafif derecede pozitif yanıt vermiştir.

Bu sonuçlar, sitrininin mutajenik hale gelebilmesi için karmaşık selüler biyotransformasyon gerektirdiğini göstermektedir. Birçok araştırma, çeşitli kromozomal sapmalar dâhil olmak üzere deney ortamında ve yaşayan organizmada klastojenik sitrinin aktivitesinin kardeş kromatik değişimi (SCE) için kaydettiğini göstermiştir. Çin hamsteri ovaryum hücreleri ve HEK293 üzerinde yapılan çalışmalarda, sitrinin SCE frekansında veya DNA boşluklarında ve kırılmalarında herhangi büyük bir farklılık oluşturmamıştır (40).

Thust ve Kneist S9-miks mevcudiyetinde Çin hamsteri V79-E hücrelerinde sitrinin kaynaklı SCEleri oluşturmuştur. Aynı zamanda sitrininin aneuploidi potansiyelini gözlemlemişlerdir. Sitrininin kuluçka dönemi dikkate alınmaksızın konsantrasyona bağlı mitotik areste neden olduğundan dolayı anöjenik olduğu bulunmuştur. Bu etki, sitrininin atılmasından sonra tersine dönebilir (44).

Jeswal, sitrinin kromozom anomalilerine neden olduğu ve genç sütün kesilmiş fare yavrularındaki kemik iliği hücrelerini kırıdığı görölmüştür (45). Bouslimi ve ark. tarafından yürütölen başka bir çalışmada, yetişkin farelerin kemik iliklerinde kırılmalar, sektrik füzyonlar, halkalar ve boşluklar dâhil olmak üzere en sık sitrinin kaynaklı kromozom sapmaları olduğu görölmüştür (38).



2.4. Apoptoz

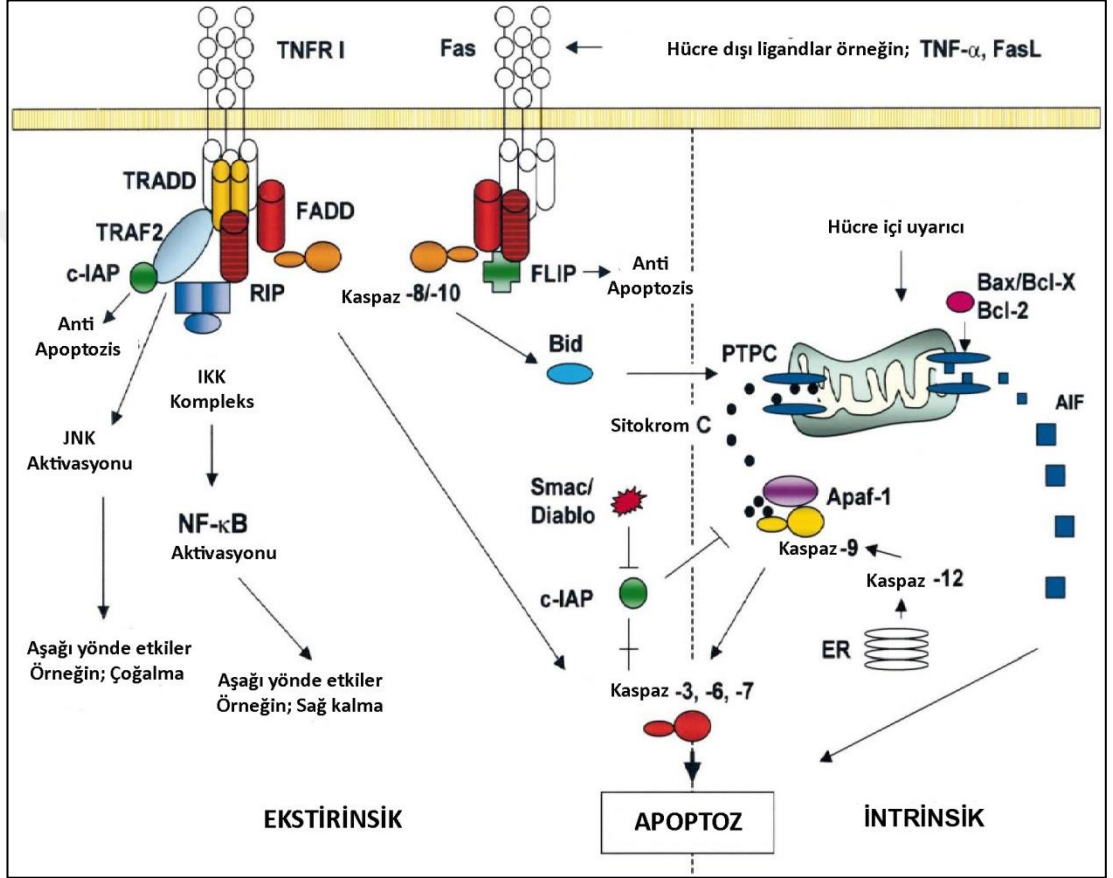
Apoptoz, yaşlanmış, fonksiyonlarını yitirmiş, biyolojik görevini tamamlamış veya hasar görmüş hücrelerin yok edilmesini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Apoptoz canlılarda embriyogenez, gelişme, homeostazis, yıkım ve tamir olayları, doku ve organlardaki hücre sayısının kontrol altında tutulması için en önemli sistemdir (46, 47). Apoptoz 1842 yılında Vogt tarafından normal gelişim sırasında hücrelerin ölümü olarak tanımlanırken, 1972 yılında İskoçyalı araştırmacılar Kerr, Wyllie ve Currie tarafından ilk kez terim olarak kullanılmıştır. Kerr ve diğ. (1972), apoptozu canlı dokulardaki hücre azalmasından sorumlu, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlamışlardır (48).

2.4.1 Apoptozun Mekanizmaları

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda apoptozun iki temel yolağı olduğu bildirilmiştir: ekstrinsik veya ölüm reseptör yolağı, intrinsik veya mitokondriyal yolak (Şekil 2.4.1.1). Bu iki temel yolağa ek olarak T hücre aracılı sitotoksisiteyi ve perforin-granzim bağımlı hücre ölümünü içeren başka bir yolakta mevcuttur. Bu üç mekanizma da kaspaz-3 yoluyla başlatılan, DNA parçalanması, hücre iskeletinin ve nükleus proteinlerinin yıkılması, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimlerin oluşması ve hücrenin fagositozu ile sonuçlanır (49, 50).

Hücre dışı sinyal yolağında yani ekstrinsik yolaktaki başlıca uyaranlar: tümör nekroz faktör (TNF), koloni uyarıcı faktör (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) gibi bileşenlerin ortamda azalması, Fas ve TNF reseptörlerinin uyarılması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar ve çeşitli antijenlerdir (51, 52). Ekstrinsik yolakta yer alan reseptörleri içinde en önemli grup tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) ailesidir (53). TNFR ailesi içinde apoptoz oluşturan reseptörlerden en önemlileri ise Fas ve TNFR1'dir. Bu reseptörlerin hücre dışında zengin sistein bağlanma bölgeleri, sitoplazmik tarafta ise 80 aminoasitten oluşan "ölüm bağlantı bölgesi" adı verilen bağlanma bölgeleri bulunur. Bu reseptörler

uyarıldıklarında, hücrenin sitoplazmasında bulunan adaptör proteinlere bağlanırlar. Bu proteinlerin de prokaspaz-8 ile birleşmesi sonucu ölüm başlatıcı sinyal kompleksi oluşur (50, 53).



Şekil 2.4.1.1.: Apoptoz mekanizmasının ekstrinsik ve intrinsik yolları (54).

Hücre içi sinyal yolağında yani intrinsik yolaktaki başlıca uyaranlar arasında ise, hücre içi kalsiyum artışı, DNA hasarı nedeniyle p53'ün aktive olması, TNF'nin, viral-bakteriyal enfeksiyonların, serbest radikallerin, sitokinlerin, hormon eksikliğinin, toksinlerin yer aldığı bilinmektedir (50, 52). İntrinsik yolakta sinyal iletiminde mitokondri önemli rol oynar. Sinyalin gelmesiyle sitokrom c (sit c) ve apoptozu uyaran faktör (AIF) aktive olur. Mitokondriyal hasara bağlı sit c'nin sitoplazmaya salınmasıyla apoptotik proteaz aktive edici faktör (APAF-1) ile bağlanır ve ATP ile prokaspaz-9'un eklenmesiyle apoptozom adlı kompleks oluşur. Daha sonra prokaspaz-9, aktif kaspaz-9'a dönüşerek efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive eder ve böylece hücre apoptoza gider.

Apoptoz pek çok gen tarafından kontrol edilmektedir. Bcl-2, hücreleri apoptozdan koruduğu belirlenen ilk genidir (55). Bu anti-apoptotik etkisini mitokondriden sitokrom-c salınmasını ve buna bağlı olarak efektör kaspazların aktivasyonunu önleyerek gösterir (56). Bcl-2 apoptozu inhibe edip hücrenin yaşamını uzatırken, Bax apoptoza neden olmaktadır. Her iki gen de normalde denge halindedir (57).

2.4.2. Apoptozun Belirlenmesi

Apoptozun belirlenmesi için birçok yöntem vardır. Bunlardan biri de floresan mikroskopisidir. Floresan mikroskopisi, floresan maddelerin (örn. Hoechst boyası, DAPI "4,6-diamidine-2'-phenylindole", propidium iyodür, akridin orange, etidyum bromür, FITC "fluorescein isothiocyanate") kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale getirirler. Hücre kültürü çalışmalarında, canlı hücre ile ölü hücrenin ayırımına olanak tanırırlar. Canlı ve ölü hücre ayırımını yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (Propidium iyodür) beraber kullanılır. Hücre zarı sağlam olan (canlı) hücreler, propidium iyodür gibi sadece zar bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri

boyayan bir madde ile boyanmazlarken, ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen Hoechst boyası ile boyanırlar (58-62).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, sitrinin farklı dozları TM4 Sertoli hücrelerine farklı sürelerde ve dozlarda uygulanmıştır. Deney süreleri tamamlandığında spektrofotometrik yöntem kullanılarak hücre canlılığı, hücre proliferasyonu ve hücre sitotoksitesi belirlenmiştir. Ayrıca apoptoz-nekroz oranı Propidium İyodür- Hoechst yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

3.1. Kullanılan Hücre Soyu ve Hücre Kültürü

Deneyde kullanılan TM4 hücre soyu 11-13 günlük farelerin Sertoli hücrelerinden elde edilmiş tümorogenik olmayan bir hücre soyudur. Laboratuvarda ATCC (American Type Culture Collection): The Global Bioresource Center'dan getirilmiş olup *in vitro* koşullarda haftada iki-üç kez düzenli pasajları yapılarak yetiştirilmektedir. Hücreler %5 At Serumu, %2,5 Fötal Sığır Serumu, 2.5 mM L-Glutamin, 0.5 mM Sodyum Pirüvat, 1.2 g/L Sodyum Bikarbonat, 15 mM HEPES ve PSA (Penisilin-Streptomisin-Amfoterin) ilave edilmiş 50:50 DMEM/F12 kültür medyumunda, %5CO₂ ve %95 hava içeren nemli ortamda, 37°C'de inkübe edilerek yetiştirilmektedir.

3.2. Hücrenin Pasaj İşlemi

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

3.3. Sitrinin Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Sitrininin TM4 Sertoli hücre soyu üzerine uygulanan dozları literatür çalışması ve doz denemeleri sonucunda elde edilen bilgiler doğrultusunda hesaplanmıştır (40, 63, 64). Sitrinin %100 DMSO'da çözülerek 80 mM'lık ana stok hazırlanmıştır. Belirlenen dozlar %0,2 DMSO içeren kültür medyumunda hazırlanmıştır. Kontrol grubuna ise %0,2 DMSO içeren kültür medyumunu verilmiştir. Deneylerde kullanılan Sitrinin dozları uygulamadan hemen önce hazırlanmıştır. Hazırlanan Sitrinin solusyonları 0.2µm milipor filtre ile steril edilerek TM4 Sertoli hücrelerine 6, 12, 24, 48 ve 72 saat uygulanmıştır (Tablo 3.3.1).

Tablo 3.3.1.: Kontrol ve sitrinin konsantrasyonları.

Kontrol	%0,2 DMSO içeren kültür medyumu
25 µM sitrinin	25µM sitrinin + %0,2 DMSO içeren kültür medyumu
50 µM sitrinin	50µM sitrinin + %0,2 DMSO içeren kültür medyumu
75 µM sitrinin	75µM sitrinin + %0,2 DMSO içeren kültür medyumu
100 µM sitrinin	100µM sitrinin + %0,2 DMSO içeren kültür medyumu
125 µM sitrinin	125µM sitrinin + %0,2 DMSO içeren kültür medyumu
150 µM sitrinin	150µM sitrinin + %0,2 DMSO içeren kültür medyumu
175 µM sitrinin	175µM sitrinin + %0,2 DMSO içeren kültür medyumu
200 µM sitrinin	200µM sitrinin + %0,2 DMSO içeren kültür medyumu

3.4. MTT Hücre Canlılık Testi

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman Trypsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Trypan blue boyası ile boyanan hücreler, Thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak MTT hücre canlılık testi için 96 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde ekildi. %1 HS serum içeren medyumda hazırlanmış Sitrininin sekiz farklı dozu (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 µM) 6, 12, 24, 48 ve 72 saat uygulanarak 37°C CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Deney sürelerinin tamamlanmasıyla, her bir kuyucuğa 10 µl MTT I solüsyonu eklenmiştir ve kültür kapları MTT boyasının suda çözünmeyen formazan kristalleri haline dönüştürülebilmesi için 4 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan kristallerinin çözülmesi için her bir kuyucuğa 100 µl MTT II solüsyonu (SDS) eklenmiş ve bir gece boyunca CO₂ inkübatöründe bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerin optik yoğunlukları ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu test 3 kez tekrar edilmiştir (65).

3.5. Bromodeoksiuridin (BrdU) Yöntemi

The Cell Proliferation ELISA, BrdU (5-bromo-2'-deoxy-uridine) DNA sentezini belirlemek için kullanılan testlerden biridir. Bu test çoğalan hücrelerin genomik DNA'larına eklenmiş olan BrdU'nun bulunması esasına dayanır. 96 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. %1 HS serum içeren medyumda hazırlanmış Sitrininin sekiz farklı dozu 24 saat uygulanarak 37°C CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Deney sürelerinin tamamlanmasıyla büyüyen hücreler 2-24 saatte BrdU'nun eklenmesi ile işaretlendi. Bu işaretleme süresinde BrdU, bölünen hücrelerin DNA'sında timidinin yerine geçerek yerleşir. İşaretleme medyumunu uzaklaştırdıktan sonra, hücreler sabitlendi ve DNA tek adımda FixDenat ilavesi ile denatüre edildi. FixDenat'ın uzaklaştırılmasından sonra anti BrdU-

POD eklendi ve bu BrdU'yu yeni sentezlenen hücresel DNA'ya bağladı. Oluşan immün kompleks substrat reaksiyonu sonucu ile belirlendi. Reaksiyon ürünleri, spektrofotometrede absorbansın 450nm dalga boyunda ölçülmesi ile hesaplandı. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol grubundaki hücre çoğalması %100 kabul edilerek, deney gruplarının çoğalma oranları yüzde olarak ifade edildi.

3.6. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Yöntemi

LDH hücre sitoplazmasında bulunan bir enzimdir. Hücre içi bir enzim olan LDH, hücre zarı parçalandığında hücre içinden dış ortama geçer. Kültürde hücrelerin ölümü yada plazma zarındaki hasar LDH enzim aktivitesinin artışına yol açmaktadır. İlk basamakta LDH laktatı piruvata çevirmektedir. Bu dönüşümle NAD⁺, NADH/H⁺ya indirgenmektedir. İkinci basamakta katalizör madde NADH/H⁺ dan H/H⁺ bir tetrazolyum tuzunun kırmızı renkli formazan ürününe dönüşümünü gerçekleştirir. Oluşan renk miktarı, hücre zarındaki hasarın derecesiyle orantılıdır. 96 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 10000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. %1 HS serum içeren medyumda hazırlanmış Sitrininin sekiz farklı dozu 24 saat uygulanarak 37°C CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Deney süresinin tamamlanmasıyla boya ve enzim solüsyonlarından oluşturulan kit karışımı her kuyuya 100 µl olmak üzere eklendi. 30 dakikalık inkübasyonun ardından oluşan sitotoksitesiye göre kırmızı formazan ürününün artan renginin 492 nm dalga boyunda spektrofotometrede verdiği absorbansın ölçülmesi ile sonuçlar elde edildi. Absorbans değerleri elde edildikten sonra oluşan toksisite yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Sitotoksite (\%)} = \frac{\text{Deney absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri (bazal LDH salınımı)}}{\text{Total LDH salınımına ait absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol}} \times 100$$

3.7. Apoptoz/Nekroz

Hücrelerde apoptozun belirlenmesi için Hoechst 33342 (Ho342), nekrozun belirlenmesi için ise Propidium iyodür (PI) floresan işaretleme yöntemleri kullanıldı. Ho342 floresan boyası, parçalanmış DNA'da açığa çıkan Adenin-Timin'ce zengin bölgelere bağlanarak apoptotik hücreyi mavi renkte işaretler (58-61). PI floresan boyası ise nekrotik hücrelerin zayıf hücre zarından geçerek hücreyi kırmızı renkte işaretler (61, 62).

3.7.1. Kullanılan Çözeltiler

1 mg/ml Propidium İyodür

1 mg/ml Hoechst 33342

1M PBS (pH 7.4)

Deney karışımı: 20 µl PI

20 µl Ho342

3960 µl PBS

3.7.2. Uygulama

24 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. %1 HS serum içeren medyumda hazırlanmış Sitrininin sekiz farklı dozu 24saat uygulanarak 37°C CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Deney sürelerinin tamamlanmasıyla, PBS solüsyonuyla hücreler yıkandı. Her bir kuyuya 0,2 ml deney karışımı eklenerek 15-30 dk, 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler 1-2 kez PBS ile yıkanarak floresan mikroskop altında inceleme yapıldı. Olympus IX71 floresan ataçmanlı mikroskopta uygun filtre ile incelenerek Olympus DP72 video kamerada eşit aralıklarla seri olarak fotoğraflandı.

3.7.3. Hesaplama

Her bir grup için, floresan ışığa gösteren hücreler ayrı ayrı sayılarak ortalama yüzde değerleri hesaplandı. Her bir grup için 3 farklı deneyde

toplam 12 kuyuda 10-15 alan ve 1000 hücre taranarak canlı, erken apoptotik, apoptotik ve nekrotik hücreler sayıldı. Her grup için apoptotik/nekrotik hücrelerin tüm hücrelere oranı hesaplanarak yüzde değerleri bulundu.

3.8. İstatistik Analiz

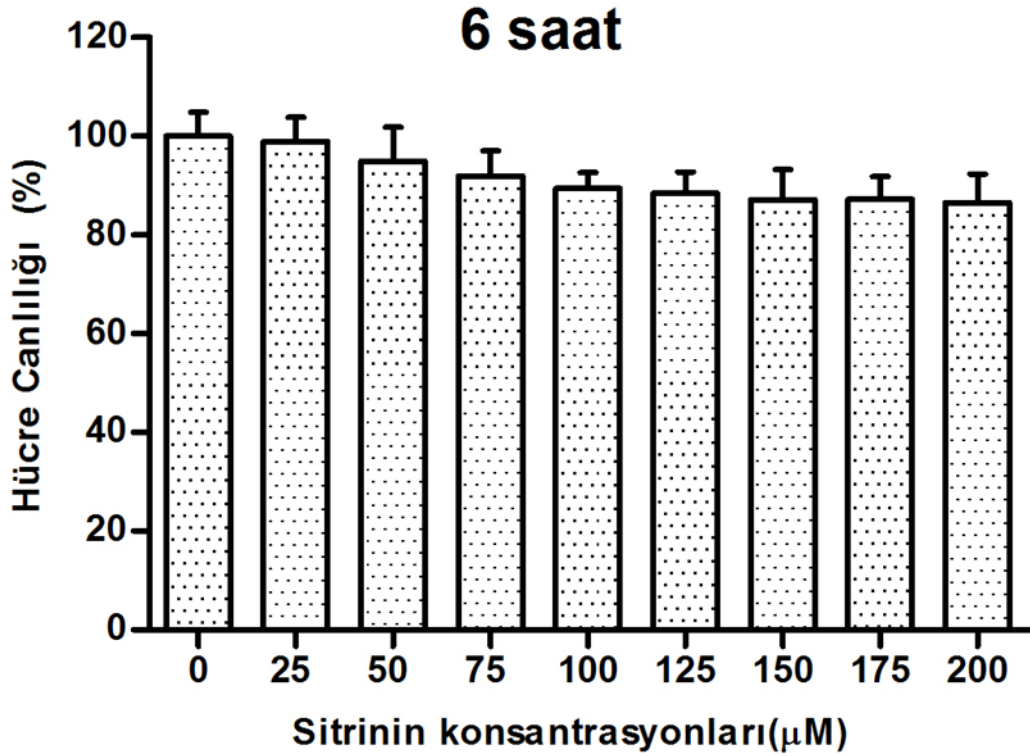
Deney gruplarında uygulanan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığı, hücre çoğalması, hücre sitotoksitesi ve apoptoz/nekroz oranlarının konsantrasyona bağlı değişen verilerinin istatistik değerlendirilmesinde Graphpad Prism 5. 0 programı kullanılmıştır. İstatistiksel analizler için One-Way ANOVA yöntemi ve Tukey's testi uygulanmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde $p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$ anlamlılık seviyesi temel alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Sitotoksosite Bulguları

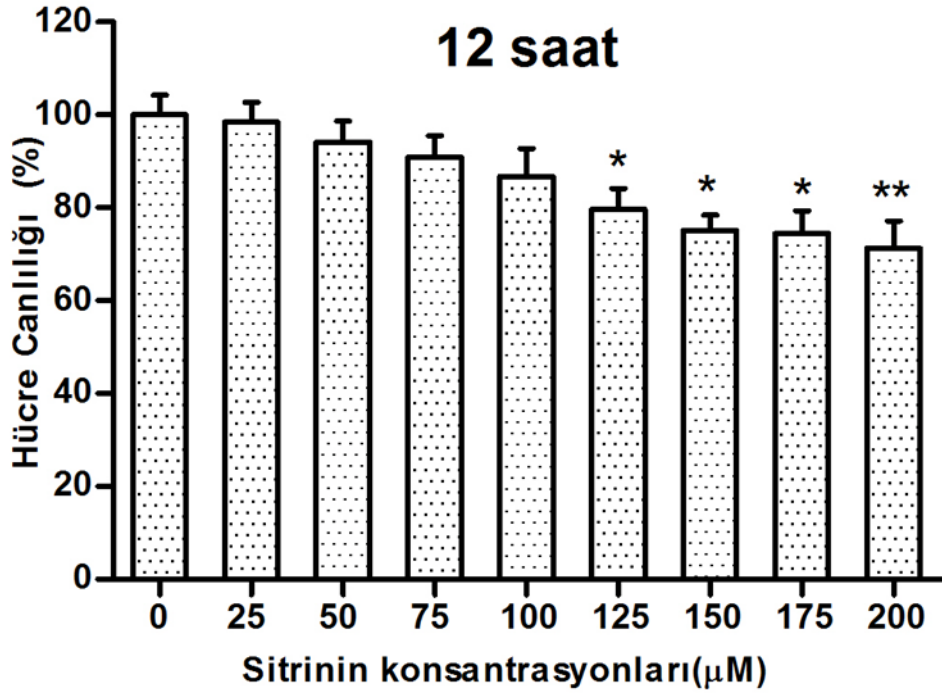
4.1.1. MTT Bulguları

Sitrinin sekiz farklı dozu testis TM4 Sertoli hücrelerinde 6, 12, 24, 48, 72 saatlerde hücre canlılığına etkisi MTT testi yapılarak tespit edildi. Kontrol ve deney gruplarındaki % canlılık oranları şekil 4.1.1.1'de verilmiştir. 6, 12, 24, 48 ve 72 saat sonunda kontrol grubu ve Sitrinin sekiz farklı dozu MTT değerleri bakımından karşılaştırıldığında 6 saatlik maruziyetin sonunda sitrininin farklı konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre herhangi anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.



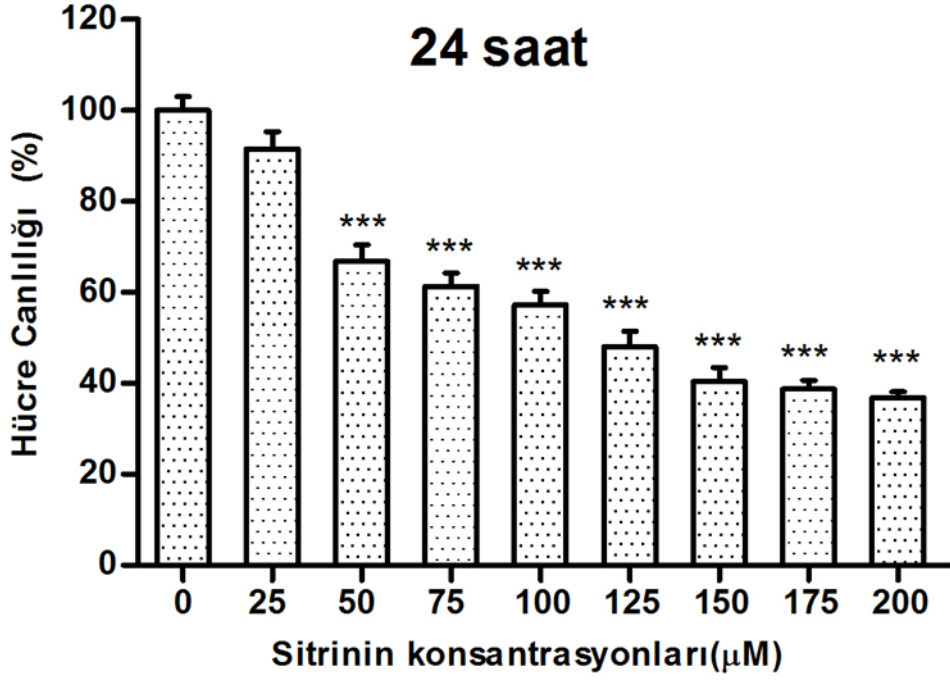
Şekil 4.1.1.1.: Sitrininin TM4 sertoli hücrelerinde 6 saat maruziyet sonunda yüzde canlılık üzerine doza bağlı etkileri.

Sitrininin sekiz farklı dozunun 12 saat boyunca Sertoli hücrelerine uygulanması sonucunda şekil: 4.1.1.2.'de görüldüğü gibi 125 μM grubundan itibaren anlamlı bir azalma gözlenirken 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM dozlarında anlamlı bir azalma gözlemlenmemiştir.



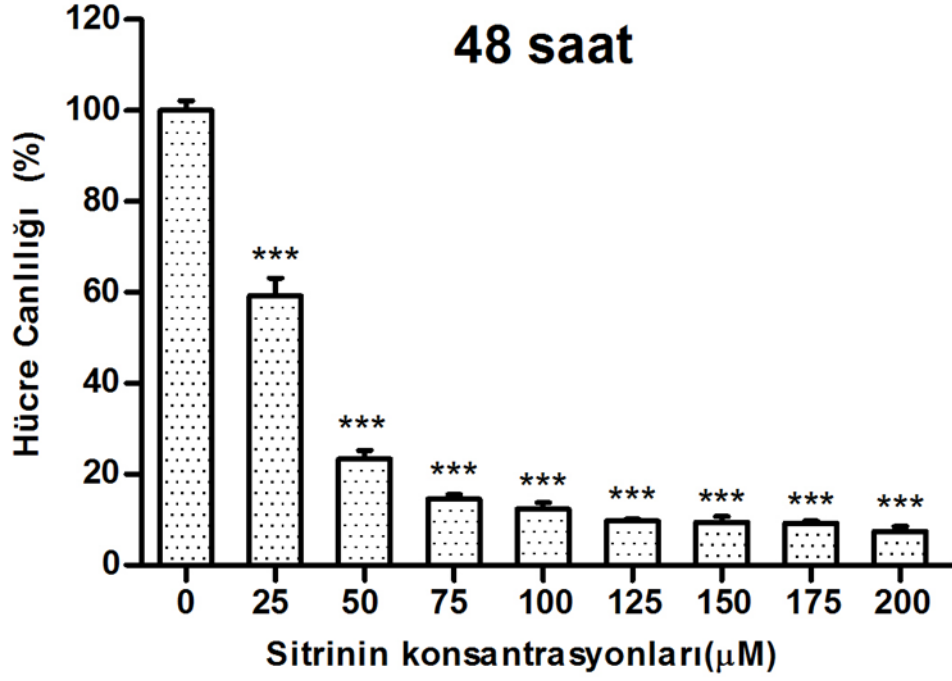
Şekil 4.1.1.2.: Sitrininin TM4 sertoli hücrelerinde 12 saat maruziyet sonunda yüzde canlılık üzerine doza bağlı etkileri.

Sertoli hücrelerine sitrininin 8 farklı dozunun uygulanması sonucunda şekil 4.1.1.3'de görüldüğü gibi 25 μM dozunda anlamlı bir değişiklik saptanmazken 50 μM dozundan itibaren anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir.



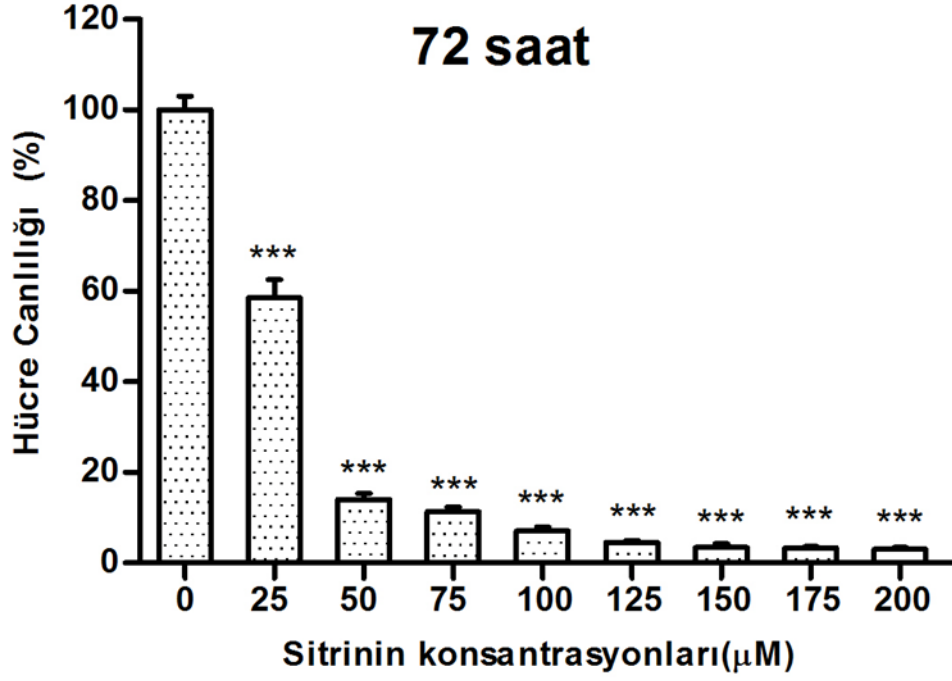
Şekil 4.1.1.3.: Sitrininin TM4 sertoli hücrelerinde 24 saat maruziyet sonunda yüzde canlılık üzerine doza bağlı etkileri.

Sertoli hücrelerine 48 saat süre ile sitrininin sekiz farklı dozu uygulandığında elde edilen sonuçlar şekil 4.1.1.4'te verilmiştir. Hücre canlılığında kontrol grubuna göre 25 μM 'dan itibaren anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1.1.4.: Sitrininin TM4 sertoli hücrelerinde 48 saat maruziyet sonunda yüzde canlılık üzerine doza bağlı etkileri.

Sertoli hücrelerine 72 saat süreyle sitrininin sekiz farklı dozunun uygulanması ile elde edilen bulgular şekil 4.1.1.5'te gösterilmiştir. Kontrol grubuna göre 25 μM 'dan itibaren anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1.1.5.: Sitrininin TM4 sertoli hücrelerinde 72 saat maruziyet sonunda yüzde canlılık üzerine doza bağlı etkileri.

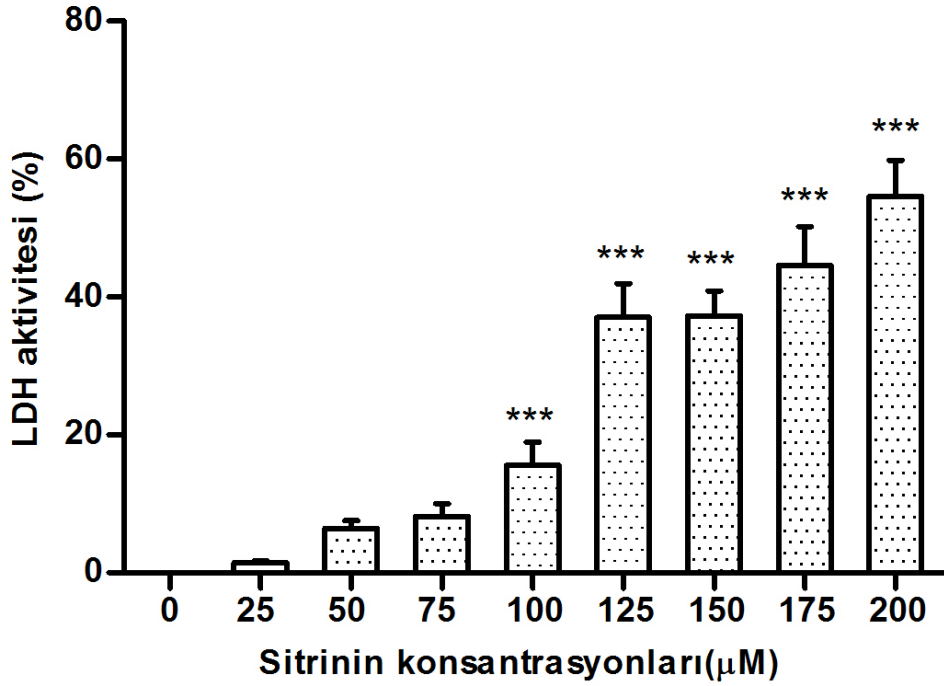
Sitrininin 25 µM ile 200 µM aralığındaki 8 farklı konsantrasyonuyla yapılan konsantrasyon denemeleri sonucunda, MTT sonuçlarına dayanılarak 6, 12, 24, 48 ve 72 saat için %50 inhibisyon konsantrasyonu (IC50) değerleri tablo 4.1.1.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1.1.1.: Sitrinin maddesinin Sertoli hücrelerinde zamana bağlı IC50 değerleri.

Sitrininin uygulanma süresi	IC50 değeri
6 saat	1213 µM
12 saat	1905 µM
24 saat	116,5 µM
48 saat	28,79 µM
72 saat	28 µM

4.1.2. Laktat Dehidrogenaz Bulguları

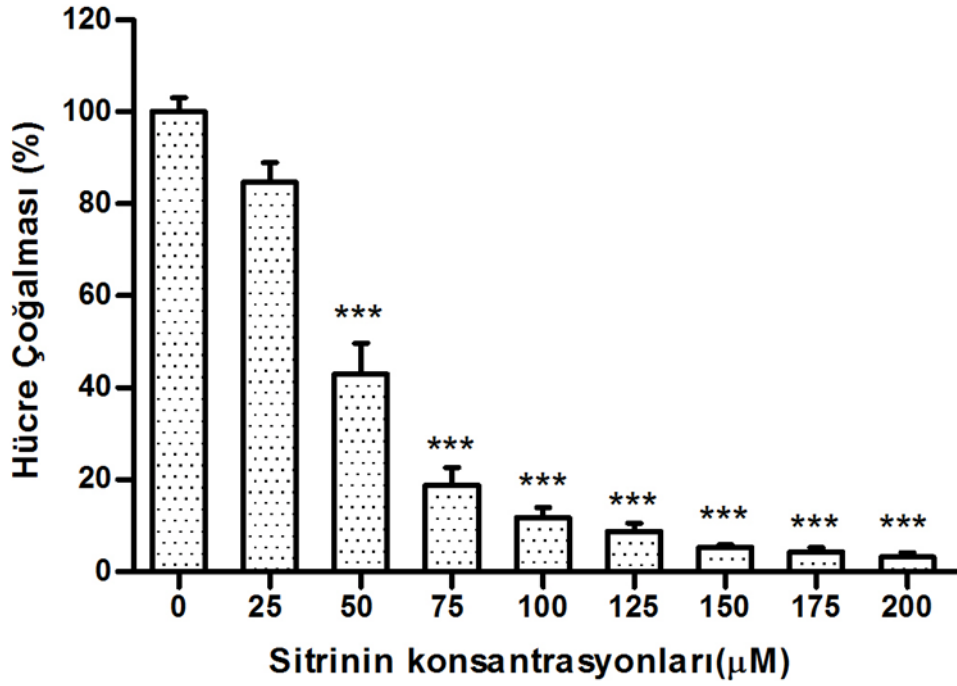
TM4 Sertoli hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak NAPH⁺'daki azalma hızı oranına bağlı olarak hesaplanan laktat dehidrogenaz (LDH) miktarı şekil 4.1.2.1'de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve sitrinin sekiz farklı dozu LDH miktarı bakımından karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre 100 µM, 125 µM, 150 µM, 175 µM ve 200 µM gruplarında anlamlı bir artış saptanırken, 25 µM, 50 µM ve 75 µM gruplarında anlamlı bir artış saptanmamıştır.



Şekil 4.1.2.1.: Sitrininin TM4 sertoli hücreleri üzerinde laktat dehidrogenaz aktivitesinin doza bağlı etkileri.

4.1.3. BrdU Bulguları

TM4 Sertoli hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak sentez fazındaki hücrelerin işaretlenmesi esasına dayanan Bromodeoksiuridin (BrdU) değerleri şekil 4.1.3.1'de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve sitrininin 8 farklı dozu ile BrdU değerleri bakımından karşılaştırıldığında 50 μM dozundan itibaren tüm dozlarda anlamlı bir azalma saptanırken, 25 μM grubunda anlamlı bir azalma gözlemlenmemiştir ($p < 0,05$).



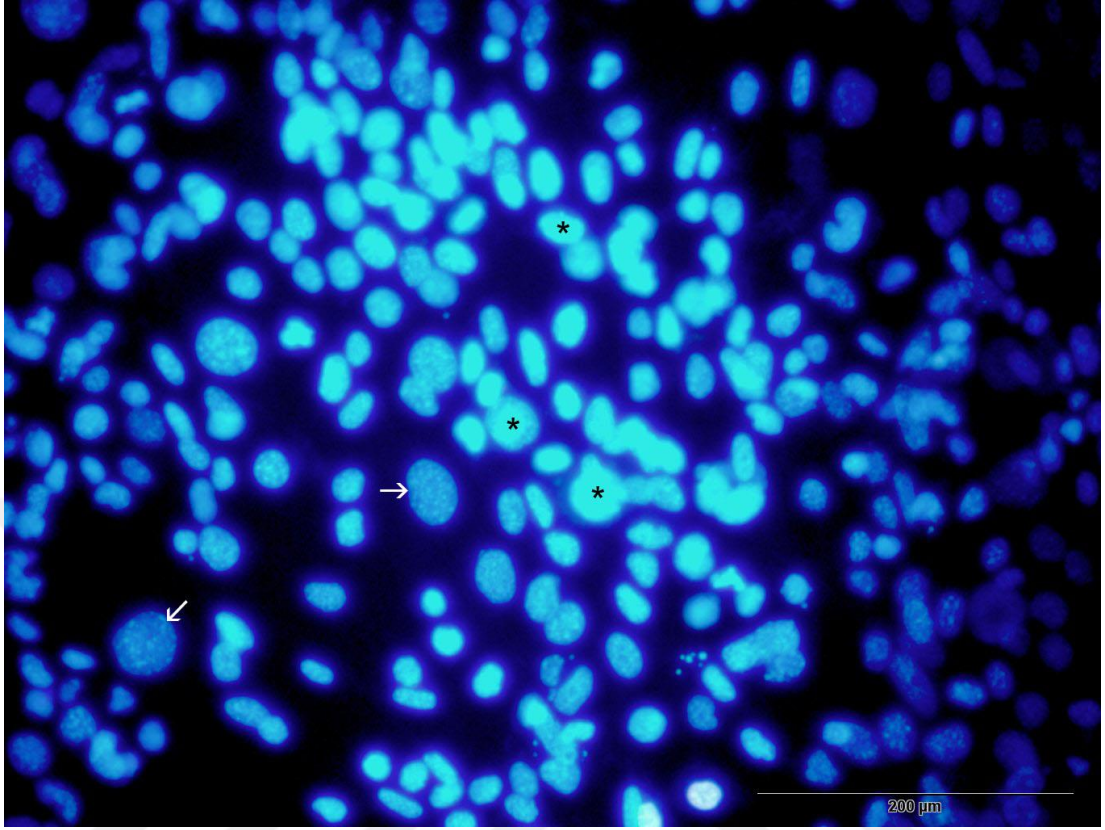
Şekil 4.1.3.1.: Sitrininin TM4 sertoli hücrelerinde BrdU yöntemiyle belirlenen hücre çoğalması üzerine doza bağlı etkileri.

4.2. Apoptoz/Nekroz Bulguları

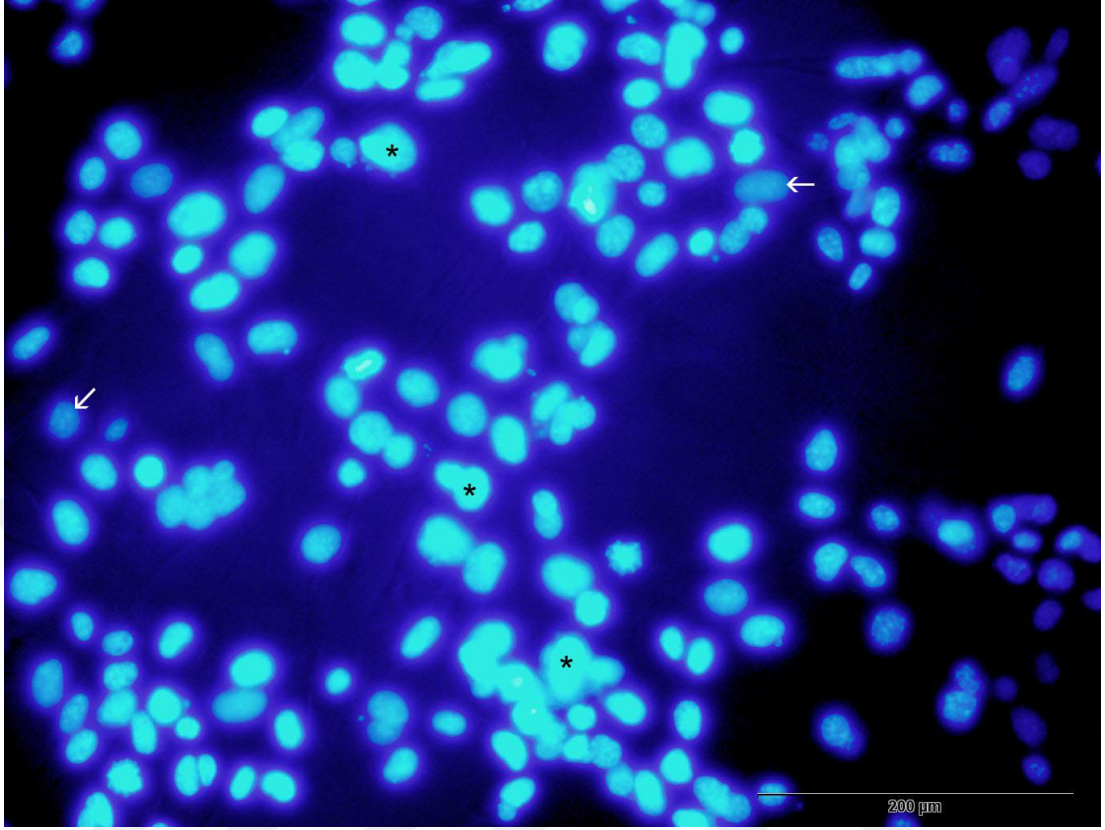
TM4 Sertoli hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında yöntem floresan işaretleme yöntemi kullanılarak propidium iyodür ve Hoechst 33342 floresan boyaların hücreleri işaretleme sonuçlarında oluşan renge göre yapılan sayım sonucu bulunan canlı hücre, erken apoptoz, apoptoz, nekroz yüzdeleri tablo 4.2.1.'de ve şekil 4.2.1-9'da verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve deney grupları karşılaştırıldığında 50 µM dozundan itibaren canlı hücre, 75 µM dozundan itibaren erken apoptoz, 50 µM dozundan itibaren apoptoz ve 100 µM dozundan itibaren nekroz yüzdelerinde anlamlı bir azalma görüldü ($p < 0,01$).

Tablo 4.2.1.: TM4 Sertoli hücrelerinde sitrinin uygulanan gruplarda 24 saat süre sonunda belirlenen apoptoz/nekroz değerleri (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$).**

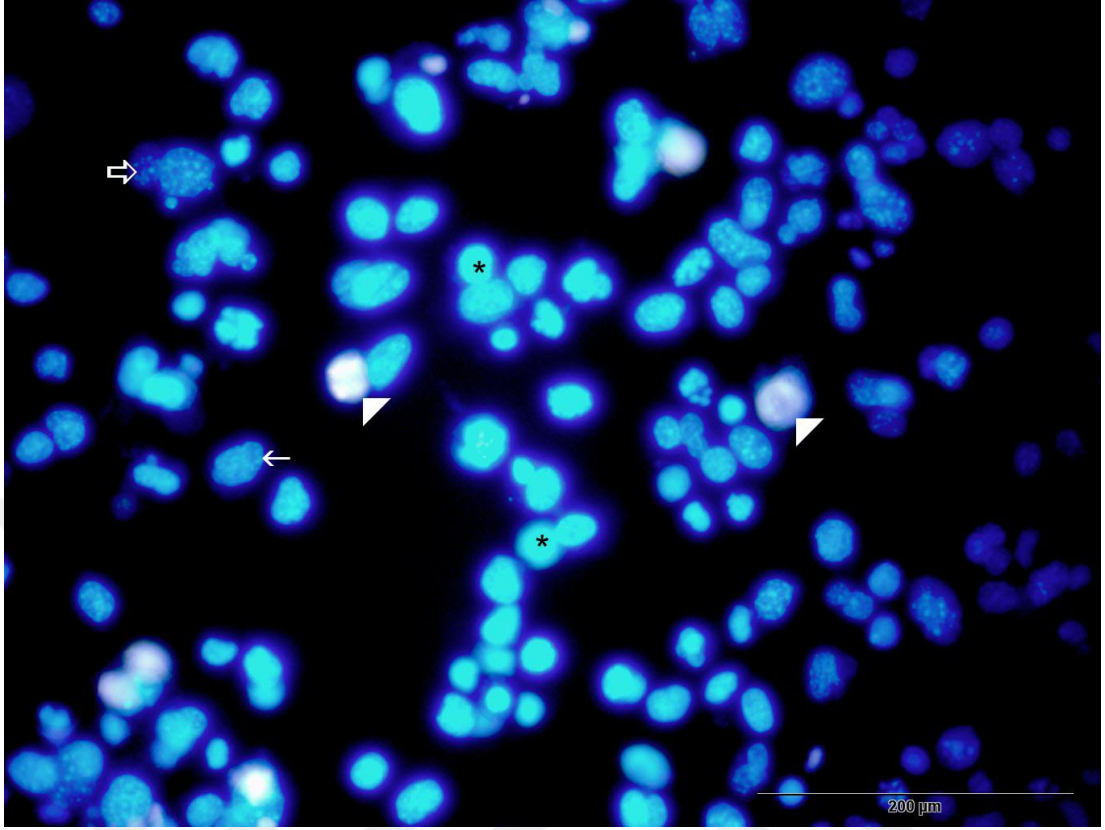
Sitrinin (µM)	Canlı Hücre	Erken Apoptoz	Apoptoz	Nekroz
Kontrol	78,94±4,61	17,64±4,01	3,31±2,94	0,11±0,18
25 µM	75,45±4,78	19,58±2,31	4,97±2,67	0,00±0,00
50 µM	59,00±8,42***	20,25±3,11	14,47±4,18**	6,27±2,47
75 µM	48,58±4,49***	33,77±2,06**	10,73±4,88*	6,93±2,58
100 µM	40,81±6,87***	34,38±7,94**	16,97±3,26***	7,84±2,98*
125 µM	38,72±7,99***	36,72±2,41***	11,75±3,05*	12,81±4,43**
150 µM	28,05±6,99***	41,35±2,09***	13,43±2,08***	17,17±0,93**
175 µM	25,24±4,55***	49,48±3,84***	17,47±1,82***	7,80±2,16*
200 µM	25,70±3,54***	33,59±6,68**	30,73±4,55***	9,98±2,96**



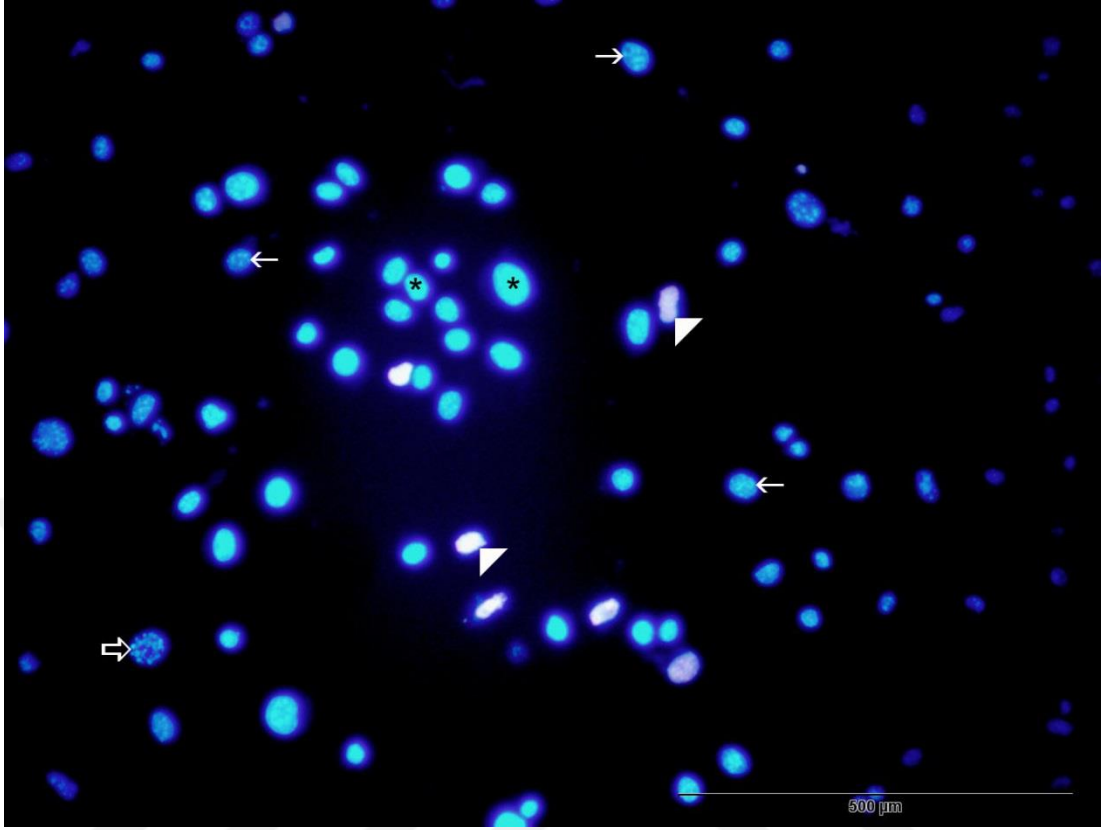
**Şekil 4.2.1.: Sitrininin TM4 Sertoli hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerinde etkileri.
(*: canlı hücre, →: erken apoptoz, ⇔: apoptoz, ▶: nekroz) (Kontrol grubu)**



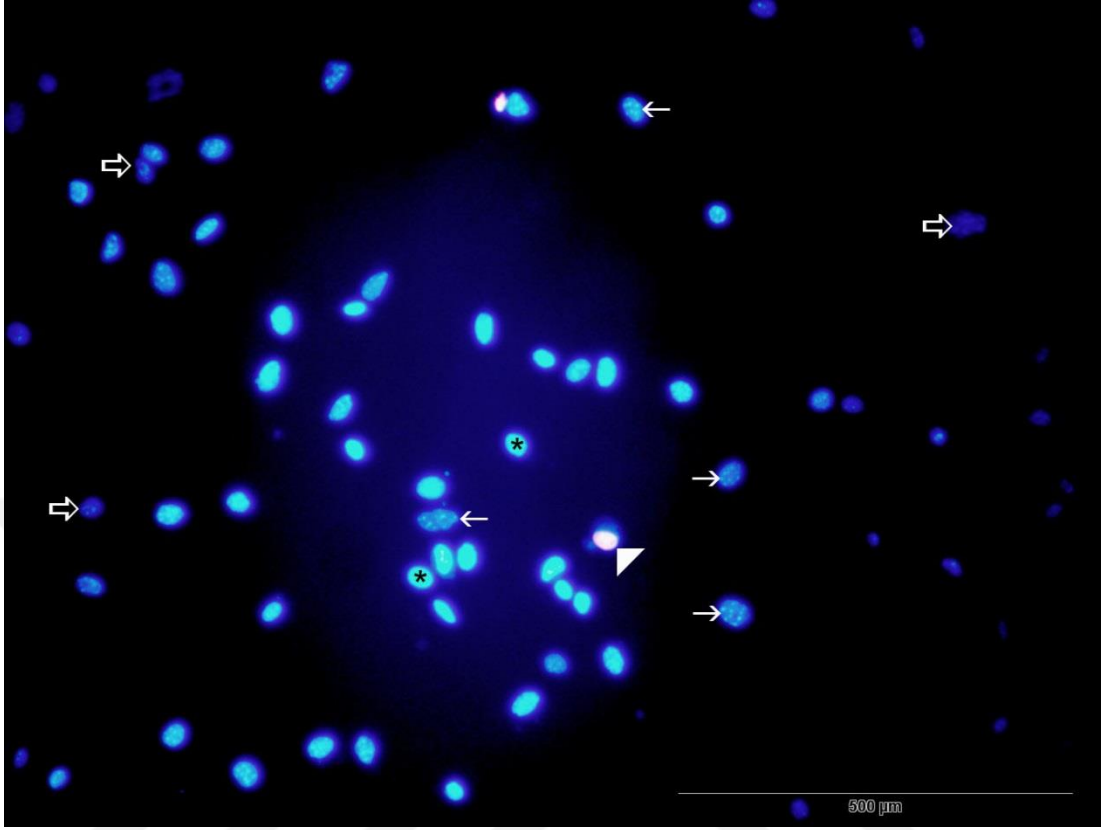
Şekil 4.2.2.: Sitrininin TM4 Sertoli hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerinde etkileri.
(*: canlı hücre, →: erken apoptoz, ⇨: apoptoz, ▶: nekroz) (25 µM sitrinin grubu)



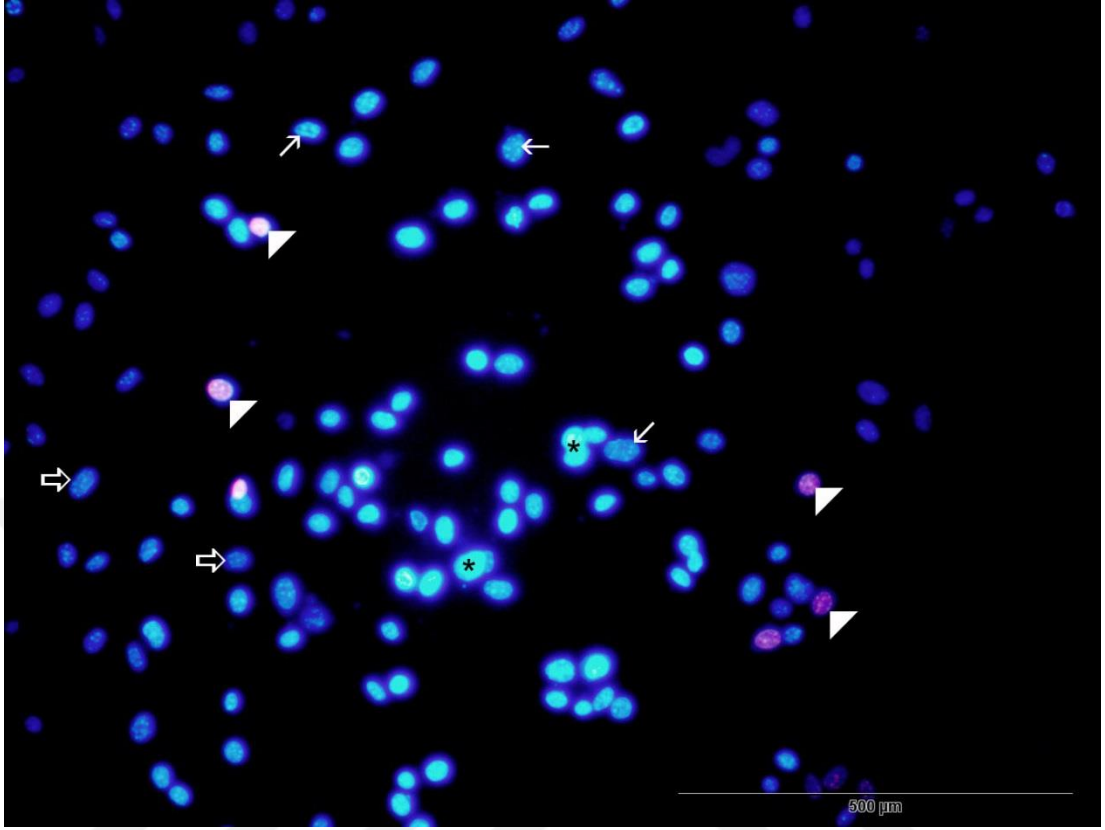
Şekil 4.2.3.: Sitrininin TM4 Sertoli hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerinde etkileri.
(*: canlı hücre, →: erken apoptoz, ⇨: apoptoz, ▶: nekroz) (50 µM sitrinin grubu)



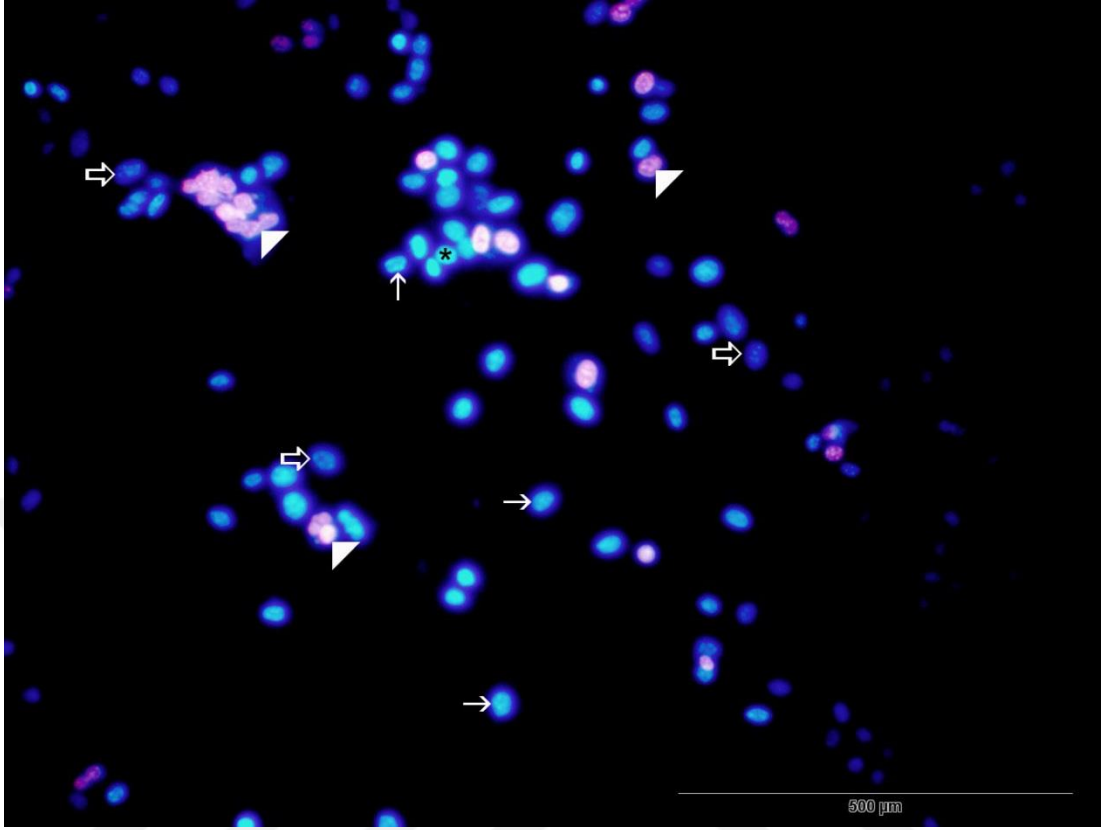
**Şekil 4.2.4.: Sitrininin TM4 Sertoli hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerinde etkileri.
(*: canlı hücre, →: erken apoptoz, ←: apoptoz, ▶: nekroz) (75 µM sitrinin grubu)**



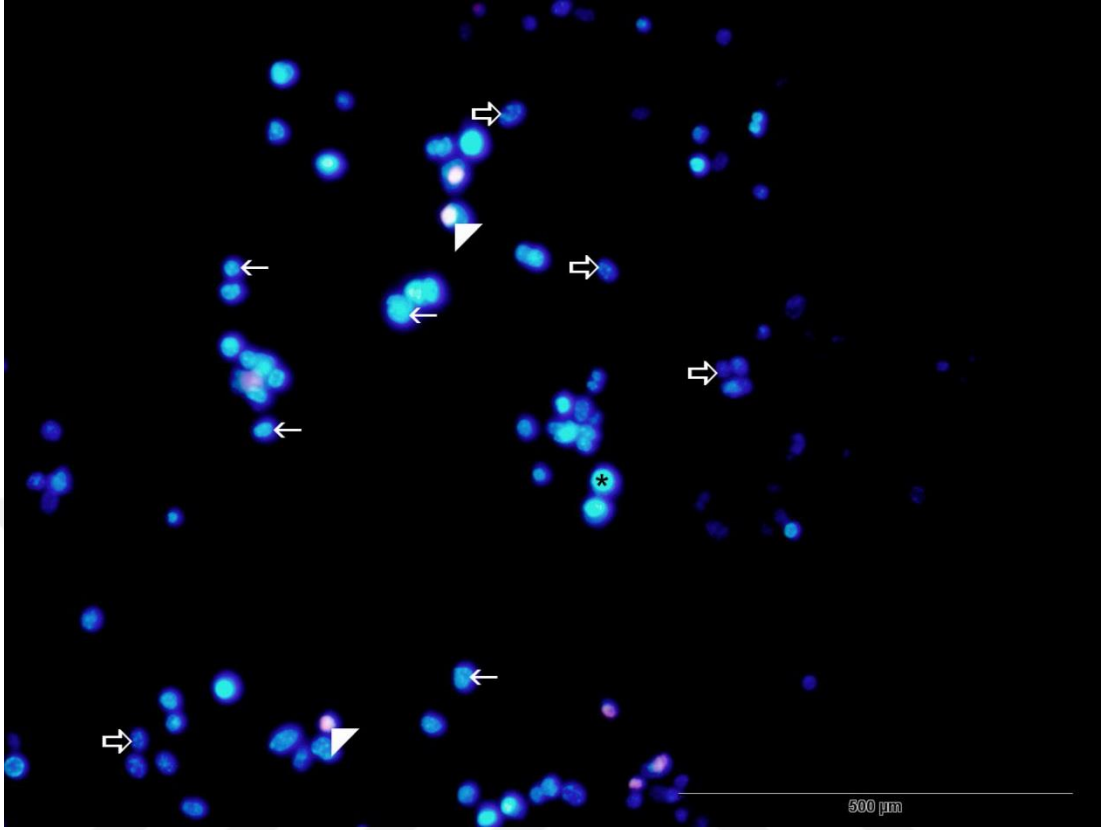
Şekil 4.2.5.: Sitrininin TM4 Sertoli hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerinde etkileri. (*: canlı hücre, →: erken apoptoz, ⇨: apoptoz, ▶: nekroz) (100 µM sitrinin grubu)



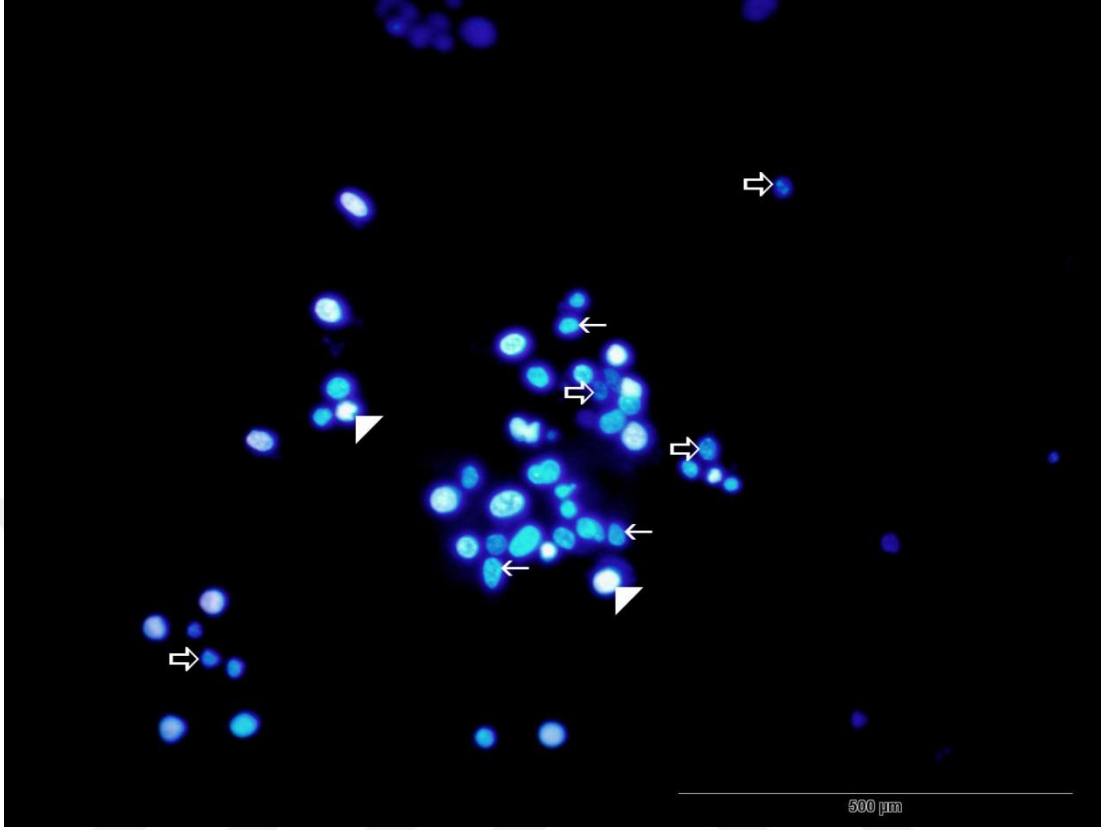
**Şekil 4.2.6.: Sitrininin TM4 Sertoli hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerinde etkileri.
(*: canlı hücre, →: erken apoptoz, ⇨: apoptoz, ▴: nekroz) (125 μM sitrinin grubu)**



**Şekil 4.2.7.: Sitrininin TM4 Sertoli hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerinde etkileri.
(*: canlı hücre, →: erken apoptoz, ⇨: apoptoz, ▶: nekroz) (150 µM sitrinin grubu)**



Şekil 4.2.8.: Sitrininin TM4 Sertoli hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerinde etkileri. (*: canlı hücre, →: erken apoptoz, ⇨: apoptoz, ►: nekroz) (175 µM sitrinin grubu)



**Şekil 4.2.9.: Sitrininin TM4 Sertoli hücrelerinde apoptoz/nekroz oranı üzerinde etkileri.
(*: canlı hücre, →: erken apoptoz, ⇨: apoptoz, ►: nekroz) (200 µM sitrinin grubu)**

5. TARTIŞMA

Mikotoksinler, insanlar ve hayvanlarda hastalıklara ve ölüme sebep olabilen, küf mantarları tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir (1). Günümüzde 300'den fazla mikotoksin türü tanımlanmış ve insan sağlığı için ciddi tehdit oluşturan bu mikotoksinler ile yapılan çalışmalar artmıştır (66). Tarım ürünleri, toplanmadan önce ya da toplandıktan sonra depolanma ve işlem görme sırasında küflerle kontamine olabilirler (1). İnsanlar mikotoksinlere, kontamine olmuş tüm bitki kökenli gıdalardan, kontamine olmuş yemlerle beslenen hayvanların ürünlerinden maruz kalabildiği gibi hava ve temas yoluyla da maruz kalabilir (66). Çeşitli toksik etkileri nedeniyle mikotoksinler, ciddi sağlık sorunlarının yanında kontamine tahılların satılmaması ve hayvanların telef olması ile ekonomik kayıplara da neden olmaktadır. Mikotoksinler karsinojenik, teratojenik ve mutajenik etkilerinin yanı sıra hepatotoksisite, nefrotoksisite, immün sistemin bozulması ile hastalıklara yatkınlık, büyümenin yavaşlaması ve üreme fonksiyonlarının bozulması gibi pek çok toksik etkiye neden olabilirler (23, 26, 27, 67).

Bir mikotoksin olan sitrinin ilk kez *Penicillium citrinum*'dan izole edilmiştir. Sitrinin ayrıca diğer bazı *Penicillium* türleri, *Aspergillus* ve *Monascus* türleri tarafından da üretilir (68-72). Yapılan çalışmalar, sitrininin nefrotoksik, hepatotoksik, mutajenik ve teratojenik olduğunu göstermektedir (23, 26, 27). Hedef organı böbrekler olan sitrinin, hayvanlarda böbrek proksimal tübüllerinde hasara, insanlarda ise okratoksin A ile birlikte Endemik Balkan Nefropatisi olarak adlandırılan öldürücü bir böbrek hastalığına neden olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (73-75). Aynı zamanda sitrininin fare embriyonik kök hücrelerinde ve blastosistlerinde apoptotik hücre ölümüne ve gelişimsel hasara neden olduğu belirtilmiştir (76). Sitrininin, kaspaz-3, -6, -7 ve -9'un aktivasyonunu artırarak apoptotik hücre ölümünü arttırdığı bildirilmiştir (77). Sitrininin toksisitesini mitokondride elektron transport sistemine zarar vererek ve reaktif oksijen türlerini artırarak gösterdiği belirtilmiştir (78, 79).

Sitrininin ile yapılan çalışmalarda, sitrininin çeşitli doku ve organlarda hasara yol açtığı gösterilmiştir (38, 40, 76, 77, 80-86). Sitrininin RNA ve DNA sentezini inhibe ettiği yapılan hücre ve hayvan deneylerinde görülmüştür (83, 84). Sitrininin oksidatif stresi indükleyerek sitotoksositeye neden olduğu düşünülmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalarda sitrininin lipid peroksidasyonunu arttırdığı, ısı şok proteinlerinden HSP70'in ekspresyonunu arttırdığı ve glutatyon (GSH) miktarını ciddi derecede azalttığı belirtilerek sitrininin hücrede oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir (38, 40, 82). Sitrininin hücresel adenosin trifosfat (ATP) eksikliğine bağlı olarak mitokondriyal solunuma zarar verdiği ve buna bağlı olarak mitokondri fonksiyonlarını bozduğu belirtilmiştir (81). Sitrininin, bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerini engelleyerek ve süperoksit anyonunun oluşumunu arttırarak oksidatif strese neden olduğu tespit edilmiştir (80). Aynı zamanda sitrinin hücrelerde apoptoza da neden olmaktadır. Yapılan çalışmalara göre sitrinin, reaktif oksijen türlerinin oluşması, mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması, sitokrom c salınımını arttırması ve kaspaz-3, -6, -7 ve -9'un aktivasyonu ile apoptozu tetiklediği belirtilmiştir (76, 77, 85, 86). Sitrininin erkek üreme sistemini ve fonksiyonlarını da olumsuz yönde etkilemektedir. Hayvanlarla yapılan bir çalışmada sitrinin testis ve yardımcı üreme organlarının ağırlığının, anormal sperm sayısının artmasına, canlı sperm sayısının azalmasına neden olduğu, Leydig hücrelerinde testosteron üretimini azalttığı buna bağlı olarak infertiliteye neden olduğu belirtilmiştir (5). Sitrininin erkek üreme sistemi üzerine etkilerinin araştırıldığı çok az sayıda *in vitro* çalışma bulunurken, sitrininin Sertoli hücreleri üzerindeki etkilerini gösteren *in vitro* bir çalışma bulunmamaktadır (3, 4).

Sitrininin hücre canlılığı üzerine etkisini araştıran çok sayıda çalışma vardır (86-88). Bondy ve Armstrong (1998) iki farklı böbrek hücre soyu ile yaptığı çalışmada 0-100 µg/ml doz aralığında uygulanan sitrininin doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı göstermiştir (63). İnsan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293) ile yapılmış diğer bir çalışmada ise doz ve saat bakımından hücre canlılığı çalışılmış ve 72 saat sitrinine maruz kalmış olan hücrelerde 40 µM

dozunda anlamlı bir azalma görülürken, 24 ve 48 saat 80 µM dozuna maruziyette anlamlı bir azalma gözlenmiştir (40). İnsan promiyelositik lösemi (HL-60) hücreleri ile yapılmış olan başka bir çalışmada ise 25 µM dozunda hücre canlılığında anlamlı bir azalma gözlenmezken, 50, 75 ve 100 µM dozlarında hücre canlılığının anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir (77). Chan (2007) embriyonik kök hücre (ESC-B5) ile yaptığı çalışmada 10, 20 ve 30 µM dozlarının hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığını belirtmiştir (76). Diğer bir çalışmada da Vero hücrelerine 0-275 µM aralığındaki dozlarda uygulanan sitrinin, 60µM dozundan daha yüksek dozlarda hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (38). Huang ve diğ. (2008) insan osteoblast hücreleri ile yaptığı çalışmada 5 µM dozu hücre canlılığında anlamlı bir azalma göstermezken, 10 ve 20 µM dozlarının hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (86). HeLa ve HEK293 hücrelerinde yapılan bir diğer çalışmada uygulanan 50, 75 ve 100 µM dozlarının HEK293 hücrelerinin hücre canlılığında anlamlı bir fark oluşturmazken, 100 µM dozunun HeLa hücrelerinin hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı belirtilmiştir (87,89). Stoev ve diğ. (2009) yaptığı çalışmada insan periferel kan mononükleer (PBM) hücrelerine uygulanan 0-500 mg/L aralığındaki dozların hücre canlılığı üzerine etkileri araştırılmıştır (88) Çalışmanın sonucunda 15,6 mg/L ve bundan daha yüksek dozlarda hücre canlılığında anlamlı bir azalma gözleendiği rapor edilmiştir.

Domuz böbrek hücreleri (PK15) ile yapılan bir çalışmada 0-130 µM aralığındaki dozların hücre canlılığı üzerine etkileri araştırılmış, 30 µM ve daha yüksek dozlarda sitrininin hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir (64). Qingqing ve diğ. (2012) yaptıkları çalışmada farelere 7 gün boyunca intraperitonal olarak 0,0625, 0,625 ve 6,25 mg/kg sitrinin uygulanmıştır. Deney sonucunda 0.625 ve 6.25 mg/kg sitrinin dozlarında canlı sperm sayısında anlamlı bir azalma gözlenmiştir (5). Chan ve Shiao (2007) yaptıkları bir çalışmada ise, fare embriyolarına (blastokist evresinde) 24 saat süreyle 15 ve 30 µM dozunda sitrinin verilmiş, deney sonunuda her iki dozda da hücre sayısının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı rapor

edilmiştir (85). 2009 yılında yapılan sitrininin 10, 20 ve 30 µM dozlarının 24 saat boyunca HepG2 hücre soyuna uygulandığı diğer bir çalışmada 24 saat sonunda hücre canlılığı test edilmiş, tüm dozlarda sitrininin doza bağlı olarak HepG2 hücre sayısını anlamlı olarak azalttığı tespit edilmiştir (90). Rumora ve diğ. 2014 yılında yaptığı çalışmaya göre, sitrininin 30 ve 50 µM dozlarında PK15 domuz böbrek hücrelerinde hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı sonucuna varılmıştır (91). Yine V79 akciğer fibroblast hücreleriyle yapılan bir çalışmada, 0,1, 1, 10 ve 100 µM konsantrasyonlarında sitrininin 24 ve 48 saat uygulanması sonucunda hücre canlılığını doz ve zamana bağlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, 24 ve 48 saat için sitrininin IC50 konsantrasyonu hesaplanmış ve V79 akciğer fibroblast hücrelerinde sitrininin IC50 değerlerinin 24 saat için 70 µM ve 48 saat için 62 µM olduğu bulunmuştur (92). 2015 yılında HepG2 insan hepatokarsinoma hücre soyu ile 24 saat süreyle yapılan bir *in vitro* çalışmada ise, 20, 100, 150, 200, 250 ve 300 µM konsantrasyonlarında sitrinin uygulanmış ve sonuçta tüm dozlarda 24 saat süreyle uygulandığı durumda hücre canlılığının anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada, sitrininin HepG2 hücrelerinde IC50 konsantrasyonu 155 µM olarak hesaplanmıştır (93).

Yapılan bu *in vitro* çalışmada, TM4 Sertoli hücrelerinde sitrininin 25-200 µM konsantrasyon aralığında uygulanması sonucunda, sitrininin sekiz farklı konsantrasyonunun da TM4 Sertoli hücrelerinin canlılığını azalttığı bulunmuştur. Sitrinin 6 saat uygulanması sonucunda herhangi anlamlı bir değişiklik görülmezken, 12 saat uygulanması sonucunda 125 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarda anlamlı azalma görülmüştür. Sitrininin 24 saat uygulanması sonunda 50 µM konsantrasyonu ve üzeri konsantrasyonlarda anlamlı bir azalma bulunmuştur. 48 ve 72 saat gibi uzun süreli maruziyetlerde ise 25 µM gibi düşük konsantrasyonlarda da hücre canlılığını %80'inin altına düşürdüğü görülmüştür. Yukarıda bahsedilen Yu ve diğ. (2006), Chang ve diğ. (2009), Liu ve diğ. (2003), Bouslimi ve diğ. (2008) ve Föllmann ve diğ. (2014) farklı hücre soyları ile yaptıkları çalışmalarda uygulanan benzer

sitrinin dozlarının hücre canlılığını azaltması, yapmış olduğumuz bu çalışmada bulunan sonuçlarla benzerlik göstermektedir (38, 40, 77, 87, 92).

Çeşitli mikotoksinlerin hücrelerin sentez fazına geçişini durdurarak hücre çoğalmasını engellediği bilinmesine rağmen (94, 95), sitrinin ile ilgili böyle bir çalışma bulunmamaktadır. Nöral krest hücreleri ile yapılan bir çalışmada aflatoksinin DNA sentezini 30 µM dozunda inhibe ettiği bildirilmiştir (94). İnsan K562 eritrolösemi hücreleriyle yapılan bir çalışmada, hücrelere 48 saat boyunca 100-280 µM konsantrasyon aralığında nivalenol, deoksinivalenol ve fumonisin B1 uygulanmıştır. Bu çalışma sonucunda nivalenolün 0,6 µM, deoksinivalenolün 1,6 µM ve fumonisin B1'in 70 µM uygulan konsantrasyonlarında sentez fazındaki hücreleri anlamlı olarak düşürdüğü tespit edilmiştir (96). Rached ve diğ., (2007) sıçan böbrek hücreleriyle yaptıkları çalışmada, sıçanlara 14, 28 ve 90 gün boyunca 21, 70 ve 210 µg/kg dozlarında okratoksin A vermişlerdir (97). Bu çalışma sonucunda 14 gün okratoksin A uygulaması sonucunda doz ve zamana bağlı olarak BrDU işaretli böbrek hücrelerinde anlamlı bir değişiklik görülmezken, 90 gün okratoksin A uygulaması sonucunda tüm dozlarda 210 µg/kg dozunda BrDU işaretli böbrek hücrelerinde anlamlı bir azalma görülmüştür. Diesing ve diğ. 2011 yılında iki farklı domuz barsak hücre soyuyla (IPEC-1 ve IPEC-J2) yaptıkları çalışmada 24, 48 ve 72 saat süreyle 100-4000 ng/mL doz aralığında deoksinivalenol uygulamışlardır (98). Bu çalışma sonucunda IPEC-1 hücre soyu tüm saatlerde 2000-4000 ng/mL doz aralığında sentez fazındaki hücre oranında anlamlı bir azalış gösterirken, 1000 ng/mL deoksinivalenol uygulanan dozda sadece 72 saatte anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. IPEC-J2 hücre soyunda ise sadece 72 saatte 2000 ng/mL ve üzeri deoksinivalenol konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma bulunmuştur. 2015 yılında 3T3 fare fibroblast hücre soyu ile 24 saat süreyle yapılan bir *in vitro* çalışmada ise, 0,01-5 µg/mL doz aralığında deoksinivalenol, 1-1000 µg/mL doz aralığında 3-epideoksinivalenol ve 0,01-10 µg/mL doz aralığında 3-ketodeoksinivalenol uygulanmış ve sonuçta uygulanan tüm doz ve maddelerde hücre çoğalmasında anlamlı bir azalma belirlenmiştir (99).

Yapılan bu çalışmada, TM4 Sertoli hücrelerine sitrininin 25 ile 200 µM arasında 8 farklı konsantrasyonunun 24 saat boyunca uygulandığı gruplarda, sitrininin 50 µM ve üzeri konsantrasyonlarda TM4 Sertoli hücrelerinde DNA sentez fazındaki hücreleri anlamlı derecede azalttığı bulunmuştur. Çalışılan farklı mikotoksin türlerinin çeşitli hücre soylarında DNA sentezini anlamlı olarak baskıladığı bilinmesine rağmen, yapılan bu çalışma ile sitrininin de hücre çoğalmasını engellediği sonucuna varılmıştır (96, 98, 99).

Laktat dehidrogenaz (LDH) hücre zarı parçalandığında hücre içinden dış ortama geçen ve hücre sitoplazmasında bulunan bir enzimdir. İn vitro çalışmalarda hücrelerin ölümü ya da plazma zarındaki hasar LDH enzim aktivitesinin artışına yol açmaktadır (100). Domuz böbrek hücre soyu olan PK15 hücreleri ile yapılan bir çalışmada, 24 saat süreyle 20-80 µM doz aralığında aflotoksin B1, 71-99 µM doz aralığında zearalenon, 0,6-22 µM doz aralığında deoksinivalenol ve 15-160 µM doz aralığında fumonisin B1 uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında aflotoksin B1'in 24,9 µM, zearalenonun 84,2 µM ve deoksinivalenolün 2,4 µM dozlarında laktat dehidrogenaz aktivitesinde %130'luk bir artış görülürken, fumonisin B1 uygulanan hücrelerde LDH salınımında anlamlı bir azalma olduğu bulunmuştur (101). Diesing ve diğ. (2011) yaptıkları çalışmada iki farklı domuz barsak hücre soyu olan IPEC-1 ve IPEC-J2 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca 200 ve 2000 ng/mL deoksinivalenol uygulamışlardır (98). Bu çalışma sonucunda IPEC-1 hücre soyunda 48 ve 72 saat maruziyet sonunda 2000 ng/mL dozunda ve IPEC-J2 hücre soyunda ise sadece 48 saat maruziyet sonunda 2000 ng/mL dozunda laktat dehidrogenaz aktivitesinde anlamlı bir artış saptanmıştır. Giromini ve diğ., (2016) tarafından sığır meme epitel hücresi ve köpek böbrek hücre soyu ile yapılan bir çalışmada 24 saat süreyle 0,3, 0,6 ve 1,2 µg/mL okratoksin A uygulanmış ve laktat dehidrogenaz aktivitesi ölçülmüştür (102). Çalışmanın sonuçlarına göre, meme epitel hücrelerinde okratoksin A uygulanan tüm gruplarda kontrole göre laktat dehidrogenaz aktivitesinde anlamlı bir artış

gözlenirken, böbrek hücrelerinde ise sadece 1,2 µg/mL okratoksin A uygulanmış grupta anlamlı bir artış görülmüştür.

Yapılan bu çalışmada, 24 saat süreyle 25-200 µM konsantrasyon aralığında sitrinin uygulanan TM4 Sertoli hücrelerindeki laktat dehidrogenaz aktivitesinin 100 µM ve üzeri konsantrasyonlarda artması, sitrininin diğer mikotoksin türlerinde (101, 102) olduğu gibi Sertoli hücrelerinde de sitotoksisiteye neden olduğunu düşündürmektedir.

Genel olarak oksidatif stresin, özellikle reaktif oksijen türlerinin apoptozu tetiklediği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu etkiyi, oksidatif strese bağlı lipit peroksidasyonunu arttırarak ve mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olarak göstermektedir (103-105). Sitrininin apoptoz üzerine etkisini araştırmış birçok çalışma bulunmaktadır, ancak sitrininin erkek üreme sisteminde apoptozu neden olduğunu gösteren çok az sayıda araştırma vardır. Kumar ve diğ (2011)'nin yaptığı *in vivo* bir çalışmada 50 µg sitrinin farelerin derisine topikal olarak uygulanmıştır (83). 12, 24, 48 ve 72 saat sonunda hayvanlar disekte edilerek sitrinin uygulanan deriden 2 cm² bir parça alınmıştır. Annexin V ve propidyum iyodit (PI) ikili boyama yöntemiyle gösterilen apoptozun, 24-72 saat uygulama sonucunda kontrole göre anlamlı bir artış gösterdiği belirtilmiştir. 2009 yılında yapılan sitrininin 10, 20 ve 30 µM dozlarının 24 saat boyunca HepG2 hücre soyuna uygulandığı diğer bir çalışmada 24 saat sonunda apoptoz nekroz oranlarına bakılmış, tüm dozlarda sitrininin doza bağlı olarak apoptotik hücre sayısını anlamlı olarak arttırdığı, nekrotik hücre sayısını etkilemediği tespit edilmiştir (90). Yapılan bir diğer çalışmada farelere oral yolla 1, 5 ve 10 mg/kg vücut ağırlığı dozları 14 gün boyunca uygulanmıştır. Deney sonunda farelerden alınan dalak ve mezenterik lenf düğümü kesitleri TUNEL boyama yöntemiyle boyanarak apoptoz gösterilmiştir. Yapılan bu çalışma TUNEL pozitif hücrelerin doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığını göstermektedir (106). Singh ve diğ. (2013)'nin yaptığı bir çalışmada F0 ve F1 jenerasyonu erkek sıçanlara 10 hafta boyunca 1, 3 ve 5 ppm dozlarında sitrinin uygulanmıştır. Deney süresi

sonunda alınan böbrek, karaciğer ve testisin kesitleri alınarak TUNEL yöntemi ile boyanmıştır (107). Çalışmanın sonucunda böbrekte 3 ppm ve 5 ppm dozları, apoptotik hücre sayısını artırırken karaciğer ve testiste sitrininin tüm dozlarında TUNEL pozitif hücrelere rastlanmadığı belirtilmiştir. Başka bir çalışmada ise tavşanlar 30 ve 60 gün boyunca 15 mg/kg besinde sitrinine maruz bırakılmıştır. Deney süresi sonunda diseksiyon ile alınan böbrek dokusu TUNEL yöntemi ile boyanarak apoptotik indeks hesaplanmıştır. 15 mg/kg besinde sitrinine 30 ve 60 gün maruz bırakılan her iki deney grubunda da apoptozda anlamlı bir artışa neden olduğu bildirilmiştir (108).

Yu ve diğ. (2006) HL-60 hücreleri ile yaptıkları çalışmada 25 µM dozunda DNA parçalanması gözlenmiş bunun apoptozun bir belirteci olduğu belirtilmiştir (77). Aynı çalışmada apoptozun başlamasında önemli bir rolü olan kaspaz-3 proteininin 50 µM dozunda anlamlı olarak arttığı, bununla birlikte kaspaz- 6, -7 ve -9'un da arttığı ancak kaspaz-8'in bir artış göstermediği bildirilmiştir. Kaspaz-8'in artmaması nedeniyle, sitrininin ölüm reseptörleri yoluyla değil, mitokondriyal yolakla apoptozu indüklediği ileri sürülmüştür. ESC-B5 hücreleri ile yapılan bir çalışmada hücrelere 10, 20 ve 30 µM dozlarında sitrinin uygulanarak 24 saat inkübe edilmiştir. Deney sonunda TUNEL yöntemi ile işaretlenen apoptotik hücrelerin tüm dozlarda anlamlı bir artış göstermiştir (76). Chan ve Shiao (2007)'nin yaptıkları çalışmada fare blastosistlerini *in vitro* ortamda 24 saat boyunca 15 ve 30 µM dozlarında sitrinine maruz bırakmışlardır (85). Deney süresi sonunda TUNEL yöntemi ile gösterilen apoptotik hücrelerin her iki dozda da anlamlı bir artış gösterdiği belirtilmiştir. İnsan osteoblast hücre soyu ile yapılmış olan bir çalışmada 24 saat boyunca 5, 10 ve 20 µM dozlarında sitrinin uygulanmıştır. TUNEL yöntemi ile işaretlenen apoptotik hücrelerin 5 µM dozunda anlamlı bir fark gözlenmezken, 10 ve 20 µM dozlarında anlamlı bir artış görüldüğü belirtilmiştir (86). Chan (2008), yaptığı çalışmada albino dişi farelerden alınan oositler, 2,5 ve 5 µM dozlarında sitrinine maruz bıraktıktan sonra *in vitro* fertilizasyon ile döllenmiş ve blastosistlerde apoptoz oluşumu gözlenmiştir. Deney sonucunda her iki dozda da apoptotik hücre sayısında anlamlı bir artış

gözlendiği bildirilmiştir. PK15 hücreleri ile yapılan bir diğer çalışmada hücrelere 30 ve 50 µM dozlarında sitrinin 12 ve 24 saat boyunca uygulanmıştır ve deney sonunda apoptotik indeks hesaplanmıştır. Elde edilen bulgulara göre her iki doz ve saatte de apoptotik hücre sayısında anlamlı bir artış gözlendiği bildirilmiştir (64). Liu ve diğ. (2012) yaptığı bir çalışmada sıçandan izole edilen Leydig hücreleri 25, 50 ve 100 µM dozlarına 36 saat boyunca maruz bırakılmış ve apoptoz sürecinde önemli rolleri olan kaspaz-3, kaspaz-9 ve p53 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri ve kaspaz-3 aktivitesi ölçülmüştür (4). Yapılan deneyler sonucunda p53, kaspaz-3, kaspaz-9 proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin ve kaspaz-3 aktivitesinin tüm dozlarda anlamlı bir artış gösterdiği rapor edilmiştir.

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda olduğu gibi, sitrininin apoptotik hücre sayısını anlamlı olarak arttırdığı görülmektedir. Yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar da sitrininin 50 µM ve üzeri konsantrasyonlarda TM4 Sertoli hücrelerinde erken apoptotik, apoptotik ve nekrotik indeksi anlamlı olarak arttırdığı gözlenmiştir. Chen ve Chan., 2009 çalışmasında sitrininin nekrotik hücrelere neden olmadığını bildirmesine rağmen, bu çalışmada sitrininin Sertoli hücrelerinde nekroza neden olduğu gösterilmiştir (90). Sitrininin Sertoli hücreleri üzerindeki bu apoptotik ve nekrotik etkilerinin hangi yolakla meydana geldiğinin anlaşılması için gen düzeyinde çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ

Yapılan bu *in vitro* çalışmada, TM4 Sertoli hücrelerinde sitrininin 25-200 µM konsantrasyon aralığında uygulanması sonucunda, sitrininin sekiz farklı konsantrasyonunun da TM4 Sertoli hücrelerinin canlılığını azalttığı bulunmuştur

TM4 Sertoli hücrelerine sitrininin 25 ile 200 µM arasında 8 farklı konsantrasyonunun 24 saat boyunca uygulandığı gruplarda, sitrininin 50 µM ve üzeri konsantrasyonlarda TM4 Sertoli hücrelerinde DNA sentez fazındaki hücreleri anlamlı derecede azalttığı bulunmuştur

Bu çalışmada, 24 saat süreyle 25-200 µM konsantrasyon aralığında sitrinin uygulanan TM4 Sertoli hücrelerindeki laktat dehidrogenaz aktivitesinin 100 µM ve üzeri konsantrasyonlarda artması, Sertoli hücrelerinde sitotoksositeye neden olduğunu düşündürmektedir.

Yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar da TM4 Sertoli hücrelerinde, sitrininin 50 µM ve üzeri konsantrasyonlarında erken apoptotik, apoptotik ve nekrotik indeksi anlamlı olarak arttırdığı gözlenmiştir.

Yapılan bu çalışmanın sonuçlarına göre, sitrininin hücre sitotoksitesinin belirteçlerinden olan hücre canlılığı ile sentez fazındaki hücre sayısını azalttığı ve laktat dehidrogenaz aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra sitrininin 6-72 saat zaman aralığında IC50 konsantrasyonları belirlenmiştir. Ayrıca sitrinin hücre sitotoksitesine bağlı olarak apoptozu ve nekrozu teşvik ettiği de açığa çıkarılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. CAST. Mycotoxin: risks in plant, animal, and human systems, Council of Agricultural Science and Technology, Task force rep. No.139, Ames, IA 2003; 37-41.
2. Adams M, Motarjemi Y, De La Santé, OM. Basic food safety for health workers, World Health Organization; 1999; 43-51.
3. Fenske M, Fink-Gremmels J. Effects of fungal metabolites on testosterone secretion in vitro, Arch Toxicol 1990; 64: 72-75.
4. Liu S, Wang D, Zhang J, Zhang D, Gong M, Wang C, et al. Citrinin reduces testosterone secretion by inducing apoptosis in rat Leydig cells. Toxicol In Vitro 2012; 26: 856-861.
5. Qingqing H, Linbo Y, Yunqian G, Shuqiang L. Toxic effects of citrinin on the male reproductive system in mice. Exp Toxicol Pathol 2012; 64: 465-469.
6. Erbençi T. Temel Histoloji. 2. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti; 1990.
7. Bloom W, Fawcett, DW. A Textbook of Histology. 12th ed. New York: Chapman & Hall; 1994.
8. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Ankara: Özkan Matbaacılık Gazetecilik San. Tic. Lts. Şti; 2006.
9. Junqueira L, Carneiro J. Basic histology: text and atlas. 10th ed. McGraw-Hill, New York: Lange International Edition; 2004.
10. Deneff C. Autocrine/paracrine intermediates in hormonal action and modulation of cellular responses to hormones. Compr Physiol 1998.
11. Jégou, B. The sertoli cell, Baillière's clinical endocrinology and metabolism 1992; 6: 273-311.

12. Johnson KE. Histology and Cell Biology. 2nd ed. USA: Harwal Publishing Company; 1991.
13. Hess RA, França LR. Sertoli Cell Biology. Edited by Skinner MK. and Griswold MD, Elsevier Academic Press, California, USA, 2005; 19-36.
14. Tanyolaç A. Özel Histoloji. 3. Baskı. Ankara: Yorum Basın Yayın; 1999.
15. Ciegler A, Vesonder RF, Jackson LK. Production and biological activity of patulin and citrinin from *Penicillium expansum*. Appl Environ Microbiol 1977; 33: 004-6.
16. Bragulat MR, Martinez E, Castella G, Cabanes FJ. Ochratoxin A and citrinin producing species of the genus *Penicillium* from feedstuffs. Int J Food Microbiol 2008; 126: 43-8.
17. Xu BJ, Jia, XQ, Gu LJ, Sung CK. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. Food Control 2006; 17: 271-285.
18. EFSA. Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. EFSA Journal 2012; 10(3): 2605.
19. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins, Clin Microbiol Rev 2003; 16: 497-516.
20. Abdelhamid AM, Dorra TM. Study on effects of feeding laying hens on separate mycotoxins (aflatoxins, patulin, or citrinin)-contaminated diets on the egg quality and tissue constituents. Arch of Anim Nutr 1990; 40(4): 305-316.
21. Pitt JI, Hocking AD. Fungi and food spoilage. 2nd ed. Cambridge, London: Blackie Academic and Professional; 1997.
22. Jackson LK, Ciegler A. Production and analysis of citrinin in corn. Mutat Res 1999; 444: 7-16.

23. Magan N, Olsen M. Mycotoxins in food: detection and control, Woodhead Publishing, 2004.
24. Molinie A, Faucet V, Castegnaro M, Pfohl-Leszkowicz A. Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B1: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. *Food Chem* 2005; 92(3): 391-400.
25. Nguyen MT, Mariana T, Tran TL, Annie PL. Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. *Food Chem* 2007; 105: 42-47.
26. Frank HK. Citrinin. *Z Ernährungswiss* 1992; 31: 164-177.
27. Tunail N. Funguslar ve Mikotoksinler, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Ankara: Sim Matbaası; 2000
28. Lorkowski G, Creppy EE, Beck G, Dirheimer G, Röschenthaler R. Inhibitory action of citrinin on cultured hepatoma cells. *Food Cosmet Toxicol* 1980; 18: 489-91.
29. Ambrose AM, DeEds F. Acute and subacute toxicity of pure citrinin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1945; 59: 289-91.
30. Reddy RV, Mayura K, Hayes AW, Berndt W. Embryocidal teratogenic and fetotoxic effects of citrinin in rats. *Toxicology* 1982; 25: 150-60.
31. Hanika C, Carltno WW, Tuite J. Citrinin mycotoxicosis in the rabbit. *Food Chem Toxicol* 1983; 21: 487-93.
32. Hanika C, Carlton WW, Boon GD, Tuite J. Citrinin mycotoxicosis in the rabbit: clinicopathological alterations. *Food Chem Toxicol* 1984; 22: 999-1008.

33. Friis P, Hasselager E, Krogh P. Isolation of citrinin and oxalic acid from *Penicillium viridicatum* Westling and their nephrotoxicity in rats and pigs. Acta Path Microbiol Scand 1969; 77: 559-60.
34. Krogh P, Hasselager E, Friis P. Studies on fungal nephrotoxicity. II Isolation of 2 nephrotoxic compounds from *Penicillium viridicatum* West: Citrinin and oxalic acid. Acta Pathol Microbiol Scand 1970; B78: 401-13.
35. Gupta M, Sasmal D, Bandyopadhyay S, Bagchi G, Chatterjee T, Dey S. Hematological changes produced in mice by ochratoxin A and citrinin. Toxicology 1983; 26: 55-62.
36. Arai M, Hibino T. Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats. Cancer Lett 1983; 17: 281-7.
37. Kanisawa M. Synergistic effect of citrinin on hepatorenal carcinogenesis of ochratoxin A in mice. Dev Food Sci 1984; 7: 245-54.
38. Bouslimi A, Bouaziz C, Ayed-Boussema I, Hassen W, Bacha H. Individual and combined effects of ochratoxin A and citrinin on viability and DNA fragmentation in cultured Vero cells and on chromosome aberrations in mice bone marrow cells. Toxicology 2008; 251: 1-7.
39. Knasmuller S, Cavin C, Chakraborty A, Darroudi F, Majer BJ, Huber WW, Ehrlich VA. Structurally related mycotoxins ochratoxin A, ochratoxin B, and citrinin differ in their genotoxic activities and in their mode of action in humanderived liver (HepG2) cells: implications for risk assessment. Nutr Cancer 2004; 50: 190-7.
40. Liu BH, Yu FY, Wu TS, Li SY, Su MC, Wang MC, Shih SM. Evaluation of genotoxic risk on oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. Toxicol Appl Pharmacol 2003; 191: 255-63.
41. Šegvić Klarić M, Želježić D, Domijan A-M, Peraica M, Pepeljnjak S. Citotoxicity, genotoxicity and apoptosis induced by ochratoxin A and citrinin

in porcine kidney PK15 cells: Effects of single and combined mycotoxins. *Toxicol Lett* 2007; 172(Suppl. 1):S56.

42. Pfeiffer E, Gross K, Metzler M. Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1313-8.

43. Sabater-Vilar M, Maas RFM, Fink-Gremmels J. Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. *Mutat Res* 1999; 444: 7-16.

44. Thust R, Kneist S. Activity of citrinin metabolized by rat and human microsome fractions in clastogenicity and SCE assay on Chinese hamster V79-E cells. *Mutat Res* 1979; 67: 321-30.

45. Jeswal P. Citrinin-induced chromosomal abnormalities in the bone marrow cells of *Mus musculus*. *Cytobios* 1996; 86: 29-33.

46. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol* 1997; 21: 88-101.

47. Cohen JJ. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract* 1993; 15: 35-43.

48. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Brit J Cancer* 1972; 26: 239-245.

49. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme a induces caspase in dependent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 2005; 22: 355–70.

50. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495–516.

51. Erdoğan BB. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fasfasl bağımlı apoptozis. *Akciger Ars* 2003; 4: 165-174.

52. Akşit H, Bildik, A. Apoptozis. Yuzuncu Yıl Univ Vet Fak Derg 2008; 19(1): 55-63.
53. Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. J Cell Sci 2005; 15: 265-7.
54. Zeiss CJ. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. Vet Pathol 2003; 40: 481–495.
55. García I, Martínou I, Tsujimoto Y, Martinou JC. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. Science 1992; 258(5080): 302-304.
56. Goldstein, JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. Nat Cell Biol 2000; 2: 156-162.
57. Lotem J, Sachs L. Regulation of *bcl-2*, *bcl-XL* and *bax* in the control of apoptosis by hematopoietic cytokines and dexamethasone, Cell Growth Differ 1995; 6: 647-653.
58. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. J Immunol Methods 1995; 184: 39-51.
59. Watkins AM, Chan PJ, Kalugdan TH, Patton WC, Jacobson JD, King A. Analysis of the flow cytometer stain Hoechst 33342 on human spermatozoa. Mol Hum Reprod 1996; 2(9): 709-712.
60. Zhang X, Kiechle FL. Mechanism of Hoechst 33342-induced apoptosis in BC3H-1 myocytes. Ann Clin Lab Sci 1997; 27(4): 260-275.
61. Sara CR, Jacobson J, Patton W, King A, Chan PJ. Dual fluorescence analysis of DNA apoptosis in sperm. J Obstet Gynaecol 2003; 188: 1156-7.

62. Siddighi S, Patton, WC, Jacobson JD, King A, Chan PJ. Correlation of sperm parameters with apoptosis assessed by dual fluorescence DNA integrity assay. *Arch Andrology* 2004; 50: 311-314.
63. Bondy G. Armstrong C. Cytotoxicity of nephrotoxic fungal toxins to kidney-derived LLC-PK1 and OK cell lines. *Cell Biol Toxicol* 1998; 14: 323-332.
64. Klarić MŠ. Želježić D, Rumora L, Peraica M, Pepeljnjak S, Domijan, AM. A potential role of calcium in apoptosis and aberrant chromatin forms in porcine kidney PK15 cells induced by individual and combined ochratoxin A and citrinin, *Arch Toxicol* 2012; 86: 97-107.
65. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55–63
66. Richard J, Payne G, Desjardins A, Maragos C, Norred W, Pestka J. *Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems*. Council of Food Protective 2003; 71.
67. Sabuncuoğlu SA, Baydar T, Giray B, Şahin G. Mikotoksinler: toksik etkileri, degradasyonları, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması. *Hacettepe Üniv Eczacı Fak Derg* 2008; 28(1): 63-92.
68. Hetherington AC, Raistrick H. *Studies in biochemistry of microorganism XI. On the production and chemical constitution of a new yellow coloring matter, citrinin, produced from glucose by Penicillium citrinum Thom.* *Philos T Roy Soc B* 1931; 220: 269-297.
69. Ei-Banna AA, Pitt JI, Leistner L. Production of mycotoxins by penicillium species. *Syst Appl Microbiol* 1987; 10: 42-46.

70. Kurata H. *Mycotoxins and mycotoxicoses*, Microbial toxins in foods and feeds. In: Pohland AE, Dowell VR, Richards JL. Editors. New York, USA: Plenum Press; 1990. 249- 259.
71. Blanc PJ, Loret MO, Goma G. Production of citrinin by various species of *Monascus*. *Biotechnol Lett* 1995; 17(3): 291.
72. Li F, Xu G, Li Y. Study on the production of sitrinin by *Monascus* strains used in food industry. *Wei Sheng Yan Jiu* 2003; 32(6): 602- 605.
73. Phillips RD, Hayes AW. Effect of the mycotoxin citrinin on composition of mouse liver and kidney. *Toxicol* 1978; 16(4): 351-359.
74. Comerio R, Fernandez Pinto VE, Vaamonde G. Influence of water activity on *penicillium citrinum* growth and kinetics of citrinin accumulation in wheat. *Int J Food Microbiol* 1998; 42: 219-223.
75. Singh ND, Sharma AK, Dwivedi P, Patil RD, Kumar M. 2008, Experimentally induced citrinin and endosulfan toxicity in pregnant Wistar rats: histopathological alterations in liver and kidneys of fetuses. *J Appl Toxicol* 2008; 28(7): 901–7.
76. Chan W. Citrinin induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway and inhibition of survival signals in embryonic stem cells, and causes developmental injury in blastocysts. *Biochem J* 2007; 404: 317-326.
77. Yu FY, Liao YC, Chang CH, Liu BH. Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway. *Toxicol Lett* 2006; 161: 143-51.
78. Chagas GM, Oliveria MBM, Campello AP, Kluppel MLW. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. III. Effects on renal cortical and liver mitochondria swelling. *J Appl Toxicol* 1995; 15: 91-95.

79. Kumar R, Dwivedi PD, Dhawan A, Das M, Ansari KM. Citrinin-generated reactive oxygen species cause cell cycle arrest leading to apoptosis via the intrinsic mitochondrial pathway in mouse skin. *Toxicol Sci* 2011; 122: 557-566.
80. Ribeiro SM, Chagas GM, Campello AP, Kluppel M, Lúcia W. 1997. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effect on the homeostasis of the reactive oxygen species. *Cell Biochem Funct* 1997; 15: 203-209.
81. Aleo MD, Wyatt RD, Schnellmann RG. The role of altered mitochondrial function in citrinin-induced toxicity to rat renal proximal tubule suspensions. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991; 109: 455-63.
82. Johannessen LN, Nilsen AM, Lovik M. Mycotoxin-induced depletion of intracellular glutathione and altered cytokine production in the human alveolar epithelial cell line A549. *Toxicol Lett* 2007; 168: 103-12.
83. Wasternack C, Weisser J. 1992, Inhibition of RNA-and DNA-synthesis by citrinin and its effects on DNA precursor-metabolism in V79-E cells, *Comp Biochem Phys B* 1992; 101: 225-230.
84. Yoneyama M, Sharma R. 1987, Biochemical alterations induced by citrinin in cultured kidney epithelial cell systems, *Arch of Environ Con Tox* 1987; 16: 765-770.
85. Chan WH, Shiao NH. Effect of citrinin on mouse embryonic development in vitro and in vivo. *Reprod Toxicol* 2007; 24: 120-125.
86. Huang YT, Lai CY, Lou SL, Yeh JM, Chan WH. Activation of JNK and PAK2 is essential for citrinin-induced apoptosis in a human osteoblast cell line. *Environ Toxicol* 2008; 24: 343-356.

87. Chang CH, Yu FY, Wang LT, Lin YS, Liu BH. Activation of ERK and JNK signaling pathways by mycotoxin citrinin in human cells. *Toxicol Appl Pharm* 2009; 237: 281-287.
88. Stoev SD, Denev S, Dutton M, Nkosi B. Cytotoxic effect of some mycotoxins and their combinations on human peripheral blood mononuclear cells as measured by MTT assay. *Open Toxinology J* 2009; 2: 1-8.
89. Chang CH, Yu FY, Wu TS, Wang LT, Liu BH. 2011, Mycotoxin citrinin induced cell cycle G2/M arrest and numerical chromosomal aberration associated with disruption of microtubule formation in human cells. *Toxicol Sci* 2011; 119: 84-92.
90. Chen CC, Chan WH. Inhibition of citrinin-induced apoptotic biochemical signaling in human hepatoma G2 cells by resveratrol. *Int J Mol Sci* 2009; 10(8): 3338-3357.
91. Rumora L, Domijan AM, Grubišić TŽ, Klarić MŠ. Differential activation of MAPKs by individual and combined ochratoxin A and citrinin treatments in porcine kidney PK15 cells. *Toxicon* 2014; 90: 174-183.
92. Föllmann W, Behm C, Degen GH. Toxicity of the mycotoxin citrinin and its metabolite dihydrocitrinone and of mixtures of citrinin and ochratoxin A in vitro. *Arc Toxicol* 2014; 88(5): 1097-1107.
93. Gayathri L, Dhivya R, Dhanasekaran D, Periasamy VS, Alshatwi AA, Akbarsha MA. Hepatotoxic effect of ochratoxin A and citrinin, alone and in combination, and protective effect of vitamin E: In vitro study in HepG2 cell. *Food Chem Toxicol* 2015; 83: 151-163.
94. Nones J, Nones J, Trentin AG. Flavonoid hesperidin protects neural crest cells from death caused by aflatoxin B1. *Cell Biol Int* 2013; 37(2): 181-186.
95. Riedel S, Abel S, Burger HM, van der Westhuizen L, Swanevelder S, Gelderblom WCA. Differential modulation of the lipid metabolism as a model for cellular resistance to fumonisin B 1–induced cytotoxic effects in vitro. *Prostag Leukotr Ess* 2016; 109: 39-51.

96. Minervini F, Fornelli F, Flynn, KM. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. *Toxicol In Vitro* 2004; 18(1): 21-28.
97. Rached E, Hard GC, Blumbach K, Weber K, Draheim R, Lutz WK, et al. Ochratoxin A: 13-week oral toxicity and cell proliferation in male F344/N rats. *Toxicolo Sci* 2007; 97(2): 288-298.
98. Diesing AK, Nossol C, Panther P, Walk N, Post A, Kluess, J, et al. Mycotoxin deoxynivalenol (DON) mediates biphasic cellular response in intestinal porcine epithelial cell lines IPEC-1 and IPEC-J2. *Toxicol Lett* 2011; 200(1): 8-18.
99. He JW, Bondy GS, Zhou T, Caldwell D, Boland GJ, Scott PM. Toxicology of 3-epi-deoxynivalenol, a deoxynivalenol-transformation product by *Devosia mutans* 17-2-E-8. *Food Chem Toxicol* 2015; 84: 250-259.
100. Hassan HA., Yousef MI. Mitigating effects of antioxidant properties of black berry juice on sodium fluoride induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 2332-2337.
101. Lei M, Zhang N, Qi D. In vitro investigation of individual and combined cytotoxic effects of aflatoxin B1 and other selected mycotoxins on the cell line porcine kidney 15. *Exp Toxicol Path* 2013; 65(7): 1149-1157.
102. Giromini C, Rebucci R, Fusi E, Rossi L, Saccone F, Baldi A. Cytotoxicity, apoptosis, DNA damage and methylation in mammary and kidney epithelial cell lines exposed to ochratoxin A. *Cell Bio Toxicol* 2016; 32(3): 249-258.
103. Anuradha CD, Kanno S, Hirano S. Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells. *Free Radical Bio Med* 2001; 31: 367-373.
104. Matsui H, Morimoto M, Horimoto K, Nishimura Y. Some characteristics of fluoride-induced cell death in rat thymocytes: cytotoxicity of sodium fluoride. *Toxicol In Vitro* 2007; 21: 1113–1120.

105. Karube H, Nishitai G, Inageda K, Kurosu H, Matsuoka M., NaF activates MAPKs and induces apoptosis in odontoblast-like cells. *J Dent Bio* 2009; 88(5): 461-465.
106. Islam MR, Roh YS, Cho A, Kim J, Kim JH, Eo SK, et al. Immune modulatory effects of the foodborne contaminant citrinin in mice. *Food Chem Toxicol* 2012; 50: 3537-3547.
107. Singh ND, Sharma AK, Dwivedi P, Leishangthem GD, Rahman S, Reddy J, et al. Effect of feeding graded doses of citrinin on apoptosis and oxidative stress in male Wistar rats through the F1 generation. *Toxicol Ind Health* 2016; 32(3): 385-397.
108. Kumar M, Dwivedi P, Sharma AK, Sankar M, Patil RD, Singh ND. Apoptosis and lipid peroxidation in ochratoxin A and citrinin-induced nephrotoxicity in rabbits. *Toxicol Ind Health* 2014; 30: 90-98.

8. ÖZGEÇMİŞ



Merve ARABUL KURŞUN

Hamidiye mah. Sevgi sk. İBB Konutları B blok No:27 Kağıthane/İstanbul

Cep: 0553 426 41 60

E-mail: mervearabul@gmail.com

KİŞİSEL BİLGİLER

Uyruğu: T.C

Doğum Yeri: İstanbul

Doğum Tarihi: 30/03/1992

Cinsiyet: Kadın

Medeni Durum: Evli

Ehliyet: B sınıfı

EĞİTİM BİLGİLERİ

Dikilitaş Mehmetçik İlköğretim Okulu	1999-2006
Özel Yıldız Koleji	2006-2010
Haliç Üniversitesi – Moleküler Biyoloji ve Genetik	2010-2015
Yeni yüzyıl üniversitesi – Klinik Embriyoloji etmekte)	2014-2016 (devam

STAJLAR

İstanbul genetik grubu
OTA Jinemed Beşiktaş
Özel Gaziosmanpaşa Hastanesi

SEMİNERLER

İstanbul Üniversitesi Genetik Kış Okulu, İstanbul Üniversitesi, 8-10 Mart 2013
Moleküler Biyoloji ve Genetik Haftasonu VI, Boğaziçi Üniversitesi, 9-10 Nisan 2011

YABANCI DİL

İngilizce:	OKUMA	YAZMA	KONUŞMA
	Orta	Orta	Orta

BİLGİSAYAR

-Microsoft Office

İlgi Alanları ve hobiler

Bilimsel alıřmalar, gezi, doęa yürüyüřleri, kitap okumak, resim, müzik, sinemaya gitmek.

