



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ZEARALENON'UN TM3 LEYDİĞ HÜCRELERİNDEKİ
ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİNE ETKİLERİ**

Mine CELEP

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

Danışman

Prof. Dr. Melike ERKAN

Mayıs, 2014

İSTANBUL

Bu çalışma 29/05/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



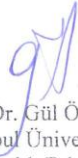
Danışman
Prof. Dr. Melike ERKAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Tuncay ORTA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Tülay İREZ
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Tıp Fakültesi



Doç. Dr. Gül ÖZHAN
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Doç. Dr. Meliha İNCELİ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterlięinin 36277 ve 3884 numaralı projeler ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışma, zearalenonun TM3 Leydig hücrelerinin antioksidan enzim aktivitesi üzerinde yapmış olduğu etkilerin açığa çıkarılması amacıyla yapılmıştır.

Tüm lisans ve lisansüstü öğrenimim süresince emeği geçen, değerli fikir ve tecrübesiyle verdiğim kararlarda yol göstericim olan sevgili Prof. Dr. Melike ERKAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın her aşamasında değerli bilgi ve tavsiyelerinden yararlandığım Araş. Gör. Dr. Yasemin TUNALI-AYUN'a ve Araş. Gör. Uzman Biyolog Banu ORTA-YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tüm çalışmam boyunca beni yalnız bırakmayan her türlü destekleriyle yanımda olan ve çalışmalarımızı hep beraber yürüttüğümüz çalışma arkadaşlarım Biyolog Gülnaz YILDIRIM, Biyolog Ezgi HAMZAOĞLU ve Biyolog Batuhan COŞKUN'a teşekkür ederim.

Beni bugünlere getirip hayatım boyunca ve tezim sırasında her türlü güçlüğü beraber aştığımız, daima sevgi ve destekleriye yanımda olan çok değerli annem ve bababım Ayşenur ve Bahri CELEP'e, sevgili kardeşim Emircan CELEP'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans tezimin ilk dakikasından sonuna kadar hür türlü güçlüğün üstesinden gelmem için yanımda olup manevi desteğiyle her zaman bana güç veren Samet AYDIN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Haziran, 2014

Mine CELEP

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	v
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	vi
ÖZET.....	vii
SUMMARY	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. TESTİSİN GENEL YAPISI.....	3
2.2. LEYDİĞ HÜCRESİ	5
2.3. ZEARALENON	8
2.3.1. Zearalenonun genel özellikleri	8
2.3.2. Zearalenonun Etkileri	12
2.4. OKSİDATİF HASAR VE ANTİOKSİDAN SİSTEM	14
3. MALZEME VE YÖNTEM	17
3.1. KULLANILAN HÜCRE SOYU VE HÜCRE KÜLTÜRÜ.....	17
3.2. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ.....	17
3.3. ZEARALENON KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI.....	18
3.4. HÜCRE ÇOĞALMA HIZI.....	19
3.4.1. MTT Hücre Canlılık Testi	19
3.5. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER.....	19
3.5.1. Total Protein Tayini.....	19
3.5.1.1. Kullanılan Çözeltiler.....	20
3.5.1.2. Uygulama	20
3.5.1.3. Hesaplama	20
3.5.2. Süperoksit dismutaz (SOD) Tayini	21
3.5.2.1. Kullanılan Çözeltiler.....	21

3.5.2.2. Uygulama	21
3.5.2.3. Hesaplama	21
3.5.3. Katalaz Tayini.....	22
3.5.3.1. Kullanılan Çözeltiler.....	22
3.5.3.2. Uygulama	22
3.5.3.3. Hesaplama	22
3.5.4. Glutasyon peroksidaz (GPx) Tayini.....	23
3.5.4.1. Kullanılan Çözeltiler.....	23
3.5.4.2. Uygulama	23
3.5.4.3. Hesaplama	24
3.5.5. Glutasyon-S-Transferaz (GST) Tayini.....	24
3.5.5.1. Kullanılan Çözeltiler.....	25
3.5.5.2. Uygulama	25
3.5.5.3. Hesaplama	25
3.5.6. Glutasyon (GSH) Tayini	26
3.5.6.1. Kullanılan Çözeltiler.....	26
3.5.6.2. Uygulama	26
3.5.6.3. Hesaplama	26
3.6. İSTATİSTİK ANALİZ	27
4. BULGULAR	28
4.1. HÜCRE ÇOĞALMA HIZI BULGULARI	28
4.1.1. MTT Bulguları.....	28
4.2. OKSİDATİF HASAR BULGULARI	29
4.2.1. Total Protein Miktarı	29
4.2.2. SOD Enzim Aktivitesi	30
4.2.3. Katalaz Enzim Aktivitesi.....	31
4.2.4. GPx Enzim Aktivitesi	32
4.2.5. GST Enzim Aktivitesi	33
4.2.6. Glutasyon Aktivitesi	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	35
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ.....	56

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.2.1: Leydig hücrelerinde steroidogenez. LH, Lüteinizan Hormon; cAMP, siklik AMP veya 3'-5'-siklik adenosin monofosfat; StAR, Steriodogenik akut regülatör protein; PBR, Periferik Tip Benzodiazepine reseptör; P450 _{sc} , P450 yan zincir kıran enzim sistemi.....	7
Şekil 2.3.1.1: Zearalenon ve türevleri.....	11
Şekil 2.3.2.1: Fusarium toksinleriyle beslenen hayvanlarda meydana gelen değişiklikler	12
Şekil 2.4.1: Antioksidan gruplar ve özellikleri.....	15
Şekil 2.4.2: Antioksidan sistemde yer alan bazı enzimler	16
Şekil 4.1.1.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücrelerinde % canlılık üzerine (doza bağlı) etkileri.....	28
Şekil 4.2.1.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücreleri üzerindeki total protein miktarına (doza bağlı) etkileri.....	29
Şekil 4.2.2.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücreleri üzerindeki süperoksit dismutaz aktivitesine (doza bağlı) etkileri	30
Şekil 4.2.3.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücrelerinde tüketilen H ₂ O ₂ miktarına bağlı olarak değişen katalaz enzimi aktivitesine (doza bağlı) etkileri	31
Şekil 4.2.4.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücreleri üzerindeki glutatyon peroksidaz aktivitesine (doza bağlı) etkileri.	32
Şekil 4.2.5.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücreleri üzerindeki glutatyon S-transferaz aktivitesine (doza bağlı) etkileri	33
Şekil 4.2.6.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücrelerinde glutatyon aktivitesi üzerine (doza bağlı) etkileri.....	34

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.3.1.1: Zearalenonun oluşabilmesi için gereken optimal sıcaklık değerleri.....9

Tablo 2.3.1.2: Zearalenonun Türk Gıda Kodeksi tarafından belirlenmiş maksimum sınır değerleri (2008).10

Tablo 3.3.1: Kontrol, 1,2 nM ve 6 nM uygulanan deney grupları.18

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar

17β-HSD	: 17 β -hidroksisteroiddehidrogenaz
3β-HSD	: 3 β -hidroksisteroiddehidrogenaz
AF	: Aflatoksin
ATP	: Adenozin trifosfat
cAMP	: Siklik AMP veya 3'-5'-siklik adenozin monofosfat
CAT	: Katalaz
DER	: Düz yüzlü endoplazmik retikulum
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DON	: Deoksinivalenol
GPx	: Glutatyon peroksidaz
GR	: Glutatyon redüktaz
GSH	: Glutatyon
GSSG	: Glutatyon
GST	: Glutatyon-S-transferaz
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HSD	: Hidroksisteroit dehidrogenaz
LH	: Lüteinizan hormon
LOEL	: En düşük etkinin gözlemlendiği değer
NOEL	: Hiçbir etkinin gözlemlenmediği değer
OC	: Okratoksin
P450_{scc}	: P450 yan zincir kıran enzim
PBR	: Periferel Tip Benzodiazepine reseptör
PKA	: Protein Kinaz A
RNA	: Ribonükleik asit
sit O	: Sitokrom oksidaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
StAR	: Steroidogenik akut düzenleyici protein

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEARALENON'UN TM3 LEYDIG HÜCRELERİNDEKİ ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİNE ETKİLERİ

Mine CELEP

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Melike ERKAN

Bu çalışmada, zearalenonun testis TM3 Leydig hücrelerindeki antioksidan enzim aktivitelerine etkileri hücre canlılığı, hücre çoğalması, sitotoksikite, glutatyon miktarı ve antioksidan enzimler (katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz)'in aktiviteleri belirlenerek araştırılması amaçlanmaktadır.

Mikotoksinler besin ve yemlerin üzerinde yetişen mantarların metabolitleridir. Mantarlar uygun koşulların olduğu her ortamda doğal olarak üreyebilmektedir. Bu yüzden tüm insanlar ve hayvanlar mikotoksinlere maruz kalırlar. Tahılların hasatı ve depolanması sırasında üreyen mantarlar tarafından metabolik olarak üretilen bir mikotoksin çeşidi de zearalenondur. Zearalenon birçok tahılda bulunmakla birlikte, kontaminasyonu en çok buğday, arpa, yulaf, çavdar, darı ve pirinçte görülür. Yüksek miktarda zearalenon ile kontamine olmuş yemlerle beslenen hayvanların sütüne geçerek süt ve süt ürünleri ve peynirlerde bulunur. Böylece zearalenon insan ve hayvan sağlığını tehdit eden bir problem olarak karşımıza çıkar.

Zearalenona maruz kalınması sonucunda mutajenik, karsinojenik, teratojenik, genotoksik, hepatotoksik ve hematotoksik etkiler görülmektedir. Zearalenon hücrede oksidatif strese bağlı olarak hücre fonksiyonlarında bozulmaya neden olmaktadır. Ayrıca üreme sistemi ve fonksiyonlarını da olumsuz yönde etkilemektedir. Zearalenon testis ağırlığının azalmasına, testikular ve epididimal sperm sayısının azalmasına, sperm hareketliliğinin azalmasına, sperm morfolojisinin değişmesine ve germ hücrelerinin apoptozuna neden olmaktadır. Bunlara ek olarak Leydig hücrelerinde testosteron

sentezinin azalmasına ve sayılan bu nedenlerden dolayı zearalenon infertiliteye neden olmaktadır.

Zearalenonun 24 saat süreyle 1,2 n M ve 6 n M dozlarında TM3 Leydig hücrelerine uygulanmıştır. Leydig hücrelerinde hücre canlılığı, glutatyon miktarı, katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz gibi antioksidan enzimlerin miktarı ölçülmüştür. Bulgular hücre canlılığının arttığını, katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz gibi antioksidan enzimlerin ve non enzimatik bir antioksidan olan glutatyonun miktarını düşürdüğünü göstermiştir. Bu bulgular zearalenonun reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna bağlı olarak hücre içi antioksidanları inhibe ettiğini göstermektedir.

Mayıs, 2014, 66.

Anahtar kelimeler: Zearalenon, TM3, Leydig hücresi, Antioksidan Enzim Aktivitesi.

SUMMARY

M. Sc. THESIS

EFFECTS OF ZEARALENONE ON ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITY IN TM3 LEYDIG CELLS

Mine CELEP

İstanbul University

Graduate School of Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Melike ERKAN

In this study, zearalenone induced oxidative damage on TM3 Leydig cells were purposed to research by determination of cell viability, amount of glutathione, antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase) activity which is a marker for Leydig cell function.

Mycotoxins are metabolised produced by fungi that grows on food and feedstuff. Molds can grows naturally in optimal curcimstances so all human and animal are exposed to zearalenone. Zearalenone are metabolites produced by fungus that occurs susceptible crops during harvesting or storage process. Zearalenone have been found in a variety of agricultural commodities, but the most pronounced contamination has been encountered in wheat, barley, oat, rye, corn and rice. Furthermore this toxin could be found in milk so dairy products contain zearalenone. Thus zearalenone is a serious problem that threat to human and animal health.

Acute toxicological effects of zearalenone are mutagenicity, teratogenicity, genotoxicity, hepatotoxicity and hematotoxicity. Zearalenone also causes oxidative stress in cell function and conclusion of this has been deterioration of cell function. Also zearalenone can effects negatively male reproductive system and its function. Furthermore reduced weight of testes, reduced testicular and epididimal sperm count, decreased sperm mortality, changed of sperm morphology and increased apoptosis of germ cell. In addition to decrease of testosterone synthesis in the Leydig cell and due to these reasons zearalenone induce fertility.

Zearalenone was exposed to Leydig cells for 24 hours at 1,2 nM and 6 nM doses. Cell viability, amount of glutathione, antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase, glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase) rate were measured in Leydig cells. The results indicated that antioxidant enzymes and non enzymatic antioxidant glutathione decreased, while cell viability increased. This findings are indicated that, zearalenone depending on generation of reactive oxygen species (ROS) inhibited intracellular antioxidant enzymes.

May, 2014, 66.

Keywords: Zearalenone, TM3, Leydig cell, Antioxidant Enzyme Activities.

1. GİRİŞ

Mikotoksinler; *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinsi mantar türleri tarafından üretilen mantar metabolitleridir (Blunden ve diğ., 1991). Dünya üzerinde toksik etkisi olduğu bilinen 400'den fazla mantar metaboliti bulunmaktadır. Ayrıca bu metabolitlerden %25'i çeşitli şekillerde kontaminasyona sebep olmaktadır (FAO, 1999). İnsanların ve hayvanların bu kontaminasyonla karşılaşması sonucunda çeşitli sağlık problemleri ortaya çıkmaktadır. Sağlık problemlerini oluşturan bu kontaminantlar arasında aflatoksin, sitrinin, okratoksin ve zearalenon gibi birçok mikotoksin bulunmaktadır.

Zearalenon, non-steroidal östrojenik bir mikotoksin çeşidi olup, çeşitli *Fusarium* cinsi küf mantarları tarafından üretilen sekonder bir metabolittir (Bennet ve Klich, 2003; Richard, 2007). Ayrıca zearalenon mantarlar tarafından üretildiği bilinen tek östrojenik metabolittir (Janssen ve diğ., 1997). Günlük hayatta sıkça tükettiğimiz ve beslenme alışkanlıklarımız yüzünden kaçınmadığımız zearalenonun mısır, arpa, buğday ve yulaf gibi tahıl gurubunda kontaminasyonu fazladır (Girgin, 2001; Marin ve diğ., 2010). Bunlara ek olarak yüksek nem içeriği olan saman yığınlarında ve büyükbaş hayvan yemlerinde zearalenona sıkça rastlanmaktadır (Bennet ve Klich, 2003; Sabuncuoğlu ve diğ., 2008). Zearalenon hayvan yemlerinde yüksek miktarda bulunduğunda, bu yemi tüketen hayvanların etine, sütüne ve yumurtasına geçebilir. Bu yüzden zearalenona birçok hayvansal orijinli gıda ürününde rastlamak mümkündür (Sorensen ve Elbaek, 2005; Huang ve diğ., 2014). Bu nedenle zearalenon tüm dünya ülkelerinde büyük bir problem olarak karşımıza çıkarak insan ve hayvan sağlığı açısından büyük sorunlar oluşturmaktadır (Dalcero ve diğ., 1997; Zinedine ve diğ., 2007).

Yapılan birçok çalışmaya göre; zearalenonun gerçek mekanizması hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (Gazzah ve diğ., 2013). Toksik bir madde olduğu bilinen zearalenonun hepatotoksik, hematotoksik, immunotoksik, genotoksik ve embriyotoksik etkilerinin olduğu saptanmıştır (Vesely ve Vesela; 1995; Zinedine ve diğ., 2007). Ayrıca zearalenon erkek üreme fonksiyonunu da etkilemektedir. Zearalenonun etkisi

sonucunda; üreme kapasitesinin düşmesi, testis ağırlığının azalması, testikular ve epididimal sperm sayısının azalması, sperm hareketliliğinin azalması, sperm morfolojisinin değişmesi, sperm kalitesinin düşmesi ve germ hücrelerinin apoptozu gibi çeşitli problemler ortaya çıkmaktadır. Ayrıca zearalenon Leydig hücrelerinde meydana getirdiği hasar sebebiyle serum testosteron miktarını düşürür ve spermatogenezi engeller (Yang ve diğ., 2007b). Bunlara ek olarak; zearalenonun serbest radikal oluşumunu tetikleyerek ve hücrel membran yapısını bozarak lipid peroksidasyonunu arttırdığı *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir (Yang ve diğ., 2007b; Abid-Essefi ve diğ., 2004).

Yapılan çeşitli hayvan deneylerine göre zearalenonun erkek üreme fonksiyonunu bozduğu bulunmuştur (Kim ve diğ., 2003; Tiemann ve Dänicke, 2007; Yang ve diğ., 2007a; Zinedine ve diğ., 2007; Minervini ve Aquilla, 2008; Lopez-Casas ve diğ., 2012). Zearalenonun erkek üreme sistemi üzerindeki etkileri ile ilgili çok az *in vitro* çalışma bulunmaktadır (Yang ve diğ., 2007a).

Bu çalışmada, zearalenonun Leydig hücrelerindeki antioksidan enzim aktivitelerine etkileri araştırılmıştır. Tezin “Genel Kısımlar” bölümünde testis, Leydig hücreleri, zearalenon ve oksidatif hasar ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Tezin “Malzeme ve Yöntem” bölümünde laboratuarda 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.

Bu çalışma, zearalenonun erkek üreme sisteminde testosteron üretimi gibi önemli bir rol üstlenen TM3 Leydig hücrelerindeki antioksidan enzim aktivitelerine etkileri enzimatik antioksidanlar ölçülerek hesaplanacak ve zearalenonun TM3 Leydig hücresi üzerinde oluşturduğu toksisite ortaya çıkartılacaktır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. TESTİSİN GENEL YAPISI

Erkek üreme sistemi; sperm üreten ve androjenleri sentezleyen ve salgılayan testislerden; dışarıya spermatozoa taşınmasından sorumlu olan dış kanallar sistemini oluşturan epididimis, vaz deferans, ejakülatuar kanallar sistemi ve erkek üretrasının bir parçasından; yardımcı bezler olan vesikula seminalis, prostat bezi ve bulboüretral bezlerden ve penisten oluşur. Erkek üreme sistemi haploid erkek gametlerin(spermatozoa veya sperm) devamlı üretimi, beslenmesi ve geçici olarak depolanmasından; erkek seks hormonlarının (androjenler) sentezi ve sekresyonundan da sorumludur.

Testisler; seminifer tübüller ve interstisiyal alandan meydana gelmektedir. Seminifer tübüllerin görevi; sperm üretimi ve spermlerin boşaltıcı kanallara taşınmasından sorumludur ve spermatogenik siklusun farklı evrelerinde bulunan farklılaşmamış germ hücrelerini ve Sertoli hücrelerini içerir. Destek hücreleri olarakta bilinen Sertoli hücreleri seminifer tübülün bazalinden lümenine kadar uzanır. Sertoli hücreleri göstermiş olduğu bu yapısal düzen sayesinde spermatogenik hücrelerle ilişki kurarak yapısal destek sağlar ve spermatogenezde önemli bir rol oynar (Munoz ve diğ., 2001; Mruk ve Yan, 2004). Ayrıca Sertoli hücreleri komşu Sertoli hücreleri arasında kurdukları bağlantılar ile hem birbirlerine tutunur hem de kan-testis bariyerini oluşturarak kan yoluyla gelen zararlı maddelere karşı spermatogenik hücreleri korur (Fawcett ve Bloom, 1994; Gartner ve Hiatt, 2001; Junqueira ve Cornerio, 2003).

Seminifer tübüllerin arasında, gevşek bağ doku karakterinde olan interstisiyal alanda; Leydig hücreleri, bağ dokusu, sinirler, makrofajlar, fibroblastlar, miyoid hücreler, lenfositler, kan ve lenf damarları bulunur. Ergenlikte işlevsel olarak belirgin hale gelen Leydig hücrelerinin temel görevi; sekonder seks karakterinin gerçekleşmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan adlandırılan testosteronu üretmektir (Junqueira ve Carneiro, 2003). Bu hormon spermatogenez, steroidogenez ve normal üreme

fonksiyonlarının sürdürülebilmesi için gereklidir (Erbengi, 1990; Fawcett ve Bloom, 1994; Kierszenbaum, 2006).

2.2. LEYDIG HÜCRESİ

Leydig hücresi, diğer adıyla interstisiyal hücre, ilk defa 1850 yılında Franz Leydig tarafından memeli testisinde tanımlanmıştır. Poul Bouin ve Paul Ancel tarafından keşfedilmesinden yaklaşık 50 yıl sonra Leydig hücresinin bir endokrin bez tarafından kontrol edildiği, erkeğe özgü özellikleri verdiği, sperm üretimi ve sekonder eşey karakterlerinin oluşumunu teşvik ettiği ortaya çıkartılmıştır (Bremmer, 1981; Christensen, 1975). 1935 yılında ise Leydig hücresinin bir hormonu olan testosteron izole edilmiştir. 1960'ların sonu ve 1970'lerin başında hipotalamus-testis-hipofiz ekseninde başlıca hormonal etkileşimler ve Leydig hücrelerinde steroidlerin temel biyosentez yolları ve metabolik yolları açığa çıkartılmıştır (Saez, 1994).

Memelilerde Leydig hücreleri intersitisiyal alanda düzensiz şekilde seminifer tübüllerin etrafında bulunur. Tek nukleus ve 1-2 nukleolus içeren Leydig hücreleri; kan veya lenf damarlarının etrafında kümeler oluşturur (Fawcett ve dirğ., 1973; Christensen, 1975; Gartner ve diğ., 2001). Birçok steroid üreten hücre gibi Leydig hücreleri de bol miktarda lipid damlacıkları, karakteristik tübüler kristal mitokondri ve iyi gelişmiş düz yüzlü endoplazmik retikulumdan oluşan bir sisteme sahiptir (Magre ve Jost, 1979).

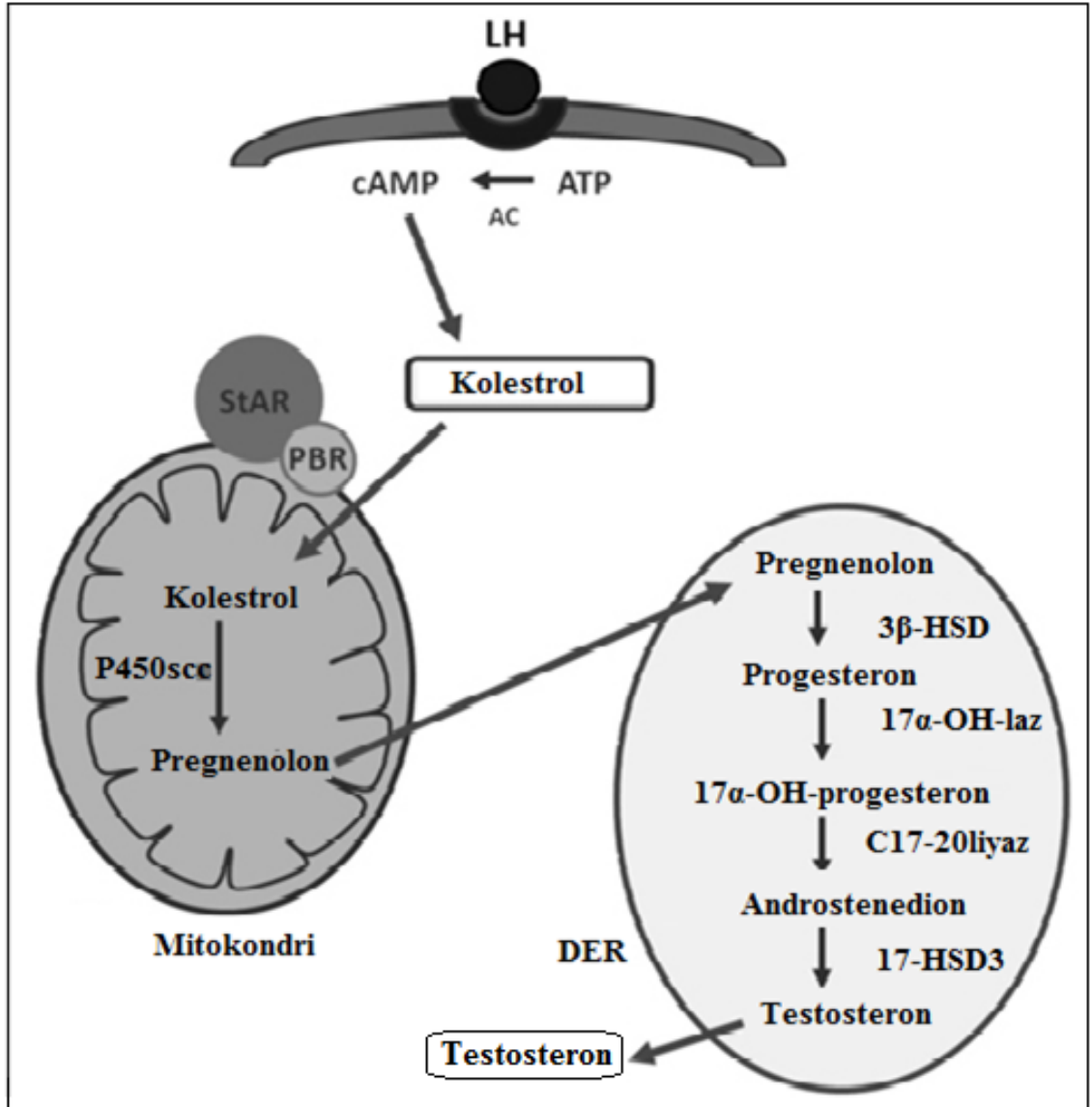
Testiste en çok bulunan androjen testosterondur. Serumda bulunan testosteronun %95'i (seks hormon bağlayıcı globulin ve diğer proteinlere bağlanmış halde) Leydig hücreleri tarafından sentezlenir; %5'i ise adrenal korteks tarafından üretilir.

Leydig hücresi fonksiyonunu ön hipofizin iki hormonu ile ayarlar: luteinizan hormon (LH), testosteron üretimini uyarırken; prolaktin, LH reseptör ekspresyonunu başlatır. Testosteron, Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında bulunan lipid damlacıklarındaki kolestrolde sentezlenir ve bu olaya steroidogenez denir (Haider, 2004).

Steroidogenez; LH reseptörüne bağlanarak, adenosin trifosfat (ATP)'tan cAMP (siklik AMP veya 3'-5'-siklik adenosin monofosfat) sentezini uyarması ile başlar. Sitoplazmadan mitokondriye kolestrolün taşınmasında gerekli olan Protein Kinaz A (PKA)'yı cAMP aktifleştirir (Haider, 2004). Kolestrol mitokondrinin dış zarından iç zarına StAR ve Periferik Tip Benzodiazepine reseptör (PBR) adlı taşıyıcı proteinler tarafından taşınır (Stocco, 1996). StAR, steroid yapıdaki hormonların sentezindeki ilk

basamakta kolestrolün mitokondrinin dış zarından iç zarına taşınmasında gereklidir (Stocco, 1999).

Steroidogenez kolestrolün P450_{sc} enzim sistemi ile pregnenolona çevrilmesi ile başlar. Pregnenolon daha sonra DER (Düz yüzlü endoplazmik retikulum) zarına taşınır. DER pregnenolonun testosterona çevrilmesinde gerekli olan birçok hidroksteroit dehidrogenaz (HSD) enzimleri içerir. Bu enzimler 3 β -HSD ve 17 β -HSD gibi enzimlerdir. Ayrıca bu enzimler steroidogenez için testosteron üretiminin temelini oluşturur (Haider ve diğ., 1986).



Şekil 2.3.1: Leydig hücrelerinde steroidogenez. LH, Lüteinizan Hormon; cAMP, siklik AMP veya 3'-5'-siklik adenzin monofosfat; StAR, Steriodogenik akut regülatör protein; PBR, Periferal Tip Benzodiazepine reseptör; P450scc, P450 yan zincir kıran enzim sistemi (Amaral ve diğ., 2013).

2.3. ZEARALENON

Mikotoksinler, geniş bir yayılım alanına sahip olan *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* gibi mantar türlerinin ürettiği toksik maddelerdir (Steyn, 1998; Scudamore ve diğ., 1998). Günümüzde 350 mantar türünün 400'den fazla mikotoksin çeşidi ürettiği bilinmektedir. Mikotoksinler dünya çapında 90 ülkede bulunmaktadır. Mikotoksinlerin bu kadar yaygın bulunmalarının sebebi, mikotoksinleri üreten mantar türlerinin uygun koşulların olduğu her ortamda üreyebilmeleridir (Mobarak, 2007). Mikotoksin çeşitlerinden en yaygın olanları ise aflatoksin (AF), okratoksin (OC), trikokenes, ergot alkaloidleri, deoksinivalenol (DON) ve zearalenondur. Bu mikotoksin çeşitleri canlı sağlığı açısından büyük problem teşkil etmektedir (Castells ve diğ., 2005). Son yıllarda sağlıklı ve kaliteli ürünlerin tüketilmesine yönelik tüketicinin bilinçlenmesi, gıda güvenliğini önemli hale getirip mikotoksinler üzerinde yapılan çalışmalara önem verilmesine neden olmuştur (Basmacıoğlu ve Ergül, 2003).

2.3.1. Zearalenonun genel özellikleri

Zearalenon ilk kez 1966 yılında izole edilen bir küf türü olan *Giberalla zeae*'nin kombinasyonundan türemiş olan bir mikotoksin çeşididir. Bu mikotoksin çeşidi *Fusarium culmorum*, *Fusarium trinctum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium cerealis* gibi *Fusarium* cinsi mantar türleri tarafından uygun koşulların olduğu her ortamda doğal olarak üretilir (Gajecka ve diğ., 2011; Liu ve diğ., 2012) (Tablo 2.3.1.1).

Tablo 2.3.1.1: Zearalenonun oluşabilmesi için gereken optimal sıcaklık değerleri (Samson ve Hoekstra, 2004)

FUSARIUM TÜRLERİ	<u>SICAKLIK</u>		
	Optimal	Minimum	Maksimum
<i>F. avenaceum</i>	25	-3	31
<i>F.crookwellense (F.cerealis)</i>	21	0	30
<i>F. equiseti</i>	21-30	-3	>35
<i>F.graminearum</i>	25	0	31
<i>F.oxysporum (F.redolens)</i>	25-30	5	37
<i>F.tritinctum</i>	22-23	0-10	31-32,5
<i>F.culmonorum</i>	25	0	31

Günlük hayatta sıkça tükettiğimiz tahıllardan zearalenon ile kontaminasyonu en çok olanlar mısır, buğday, arpa ve yulaftır (Girgin, 2001; Marin ve diğ., 2010). Ayrıca usulüne uygun olmayan hasat işlemi ve sonrasında tahılların 24-27°C 'de ve rutubetli ortamlarda depolanması zearalenon oluşumunu teşvik eder. Domates, üzüm gibi birçok bitki çeşidinde de pek çok hastalığa neden olmaktadır (Kaya ve diğ., 1998). Bunlara ek olarak bazı fermente ürünlerin ve biranın da zearalenon kalıntısı içerdiği saptanmıştır (Ergün,1992; Krogh, 1987). Yüksek miktarda zearalenon içeren yemlerle beslenen hayvanların etine, sütüne ve yumurtasına geçebilir. Bu yüzden zearalenona birçok hayvansal orijinli gıda ürününde rastlamak mümkündür (Sorensen ve diğ., 2005). Bu gıdalardaki zearalenonun maksimum sınır değerleri Türk Gıda Kodeksi tarafından belirlenmiştir (Tablo: 2.3.1.1).

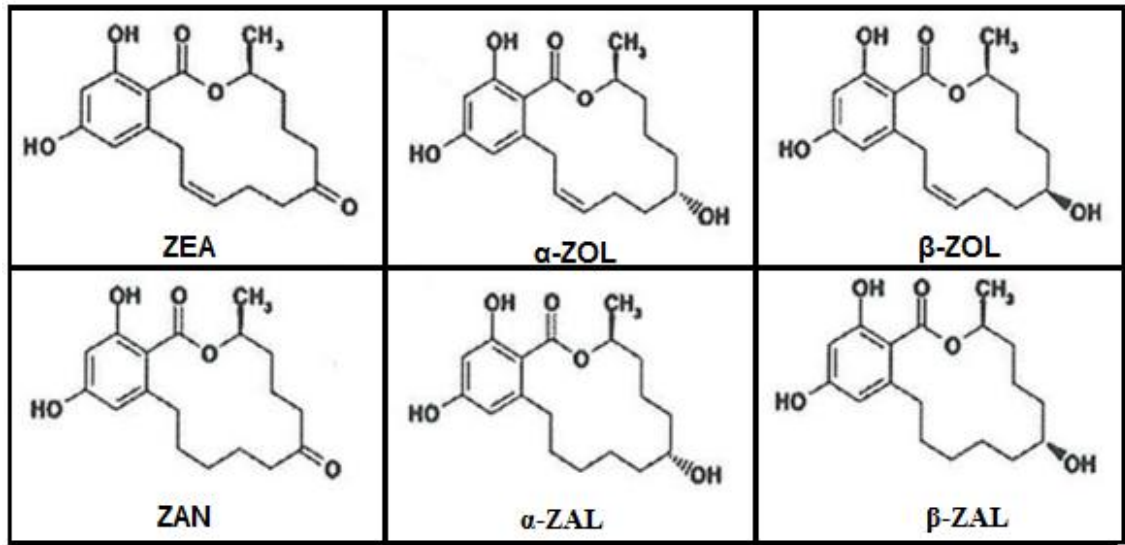
Tablo 2.3.1.2: Zearalenonun Türk Gıda Kodeksi tarafından belirlenmiş maksimum sınır değerleri (2008).

<u>Gıda Maddesi</u>	<u>Maksimum limit</u> <u>(µg/kg)</u>
ZEARALENON	
İşlenmemiş tahıllar (mısır hariç)	100
İşlenmemiş mısır (ıslak öğütülecekler hariç)	350
Doğrudan tüketime sunulan tahıllar, doğrudan insan tüketimine sunulan tahıl unları, kepek (son ürün olarak) ve embriyo	75
Rafine mısır yağı	400
Ekmek (hafif fırıncılık ürünleri dahil), pastacılık ürünleri, bisküvi, tahıl çerezleri, kahvaltılık tahıllar (mısır çerezleri ve mısır bazlı kahvaltılık tahıllar hariç)	50
Doğrudan insan tüketimine sunulan mısır, mısır çerezleri ve mısır bazlı kahvaltılık tahıllar	100
Bebek ve küçük çocuk ek gıdalar	20
500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısırın kabaca öğütülmesinden elde edilen küçük parçalar ve mısır irmiği (GTİP 1103 13) veya mısırdan elde edilen pelletler (GTİP 1103 20 40) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	200
500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır unu (GTİP 1102 20) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	300

Mikotoksin çeşitlerinden olan zearalenon adını üzerinde ürettiği Zea bitkisinden almıştır ve kimyasal formülü $C_{18}H_{22}O_5$ 'dir. Beyaz ve kristal yapıda olan zearalenonun moleküler ağırlığı 318.36 g/mol olup, erime derecesi 164-165°C ve kaynama noktası 576-599°C'dir. Bu nedenle zearalenon son derece dayanıklı bir toksin çeşidi olup, ısıtma ve diğer işlemlerden etkilenmemektedir. Ayrıca zearalenon kimyasal yapısı nedeniyle suda çözünmeyerek sadece alkali sıvılarda çözünür (FDA, 1979; Kuiper-Goodman ve diğ., 1987; Döll ve Dänicke, 2011).

Kimyasal adı 6-β resorsiklik asit lakton olan zearalenonun kendisi dışında beş tane türevi (α zearalenol, β-zearalenol, zearalanon, α-zearalanol ve β-zearalanol) bulunmaktadır. Zearalenonun türevleri temelde homologtur ancak α-zearalenol ve β-zearalenol doğal olarak kontamine olmuş gıdalarda ya da laboratuarda optimum kültür

koşulları altında çok düşük seviyelerde meydana gelebilir (Desjardins ve diğ., 2006) (Şekil 2.3.1.1). Ayrıca zearalenon ve türevleri östrojen hormonunun doğal dengesini değiştiren endokrin bozucular arasındadır (Penning ve diğ., 2004). Zearalenon alfa ve beta zearalenola dönüştüğünde Alfa-zearalenol zearalenondan dört kat daha fazla östrojenik iken, β -zearalenolün etkisi zearalenona eşittir (Fink-Gremmels, 1999; Yiannikouris ve diğ., 2002).



Şekil 2.3.1.1: Zearalenon ve türevleri

Zearalenon oral yolla alınır ve %80-85'i vücut içinde tutulur. Vücuda alımından yaklaşık 30 dakika sonra üreme hormonları gibi globulinlere bağlanır ve yaklaşık 30 dakika sonra kanda görülmeye başlanır (Olsen, 1989; Gajecki, 2002). Karaciğerde metabolize edilir ve üre yardımıyla dışarıya atılır. Kaslarda, yumuşak dokuda ve özellikle üreme organlarında birikimi fazladır (Olsen, 1989; Gajecki, 2002).

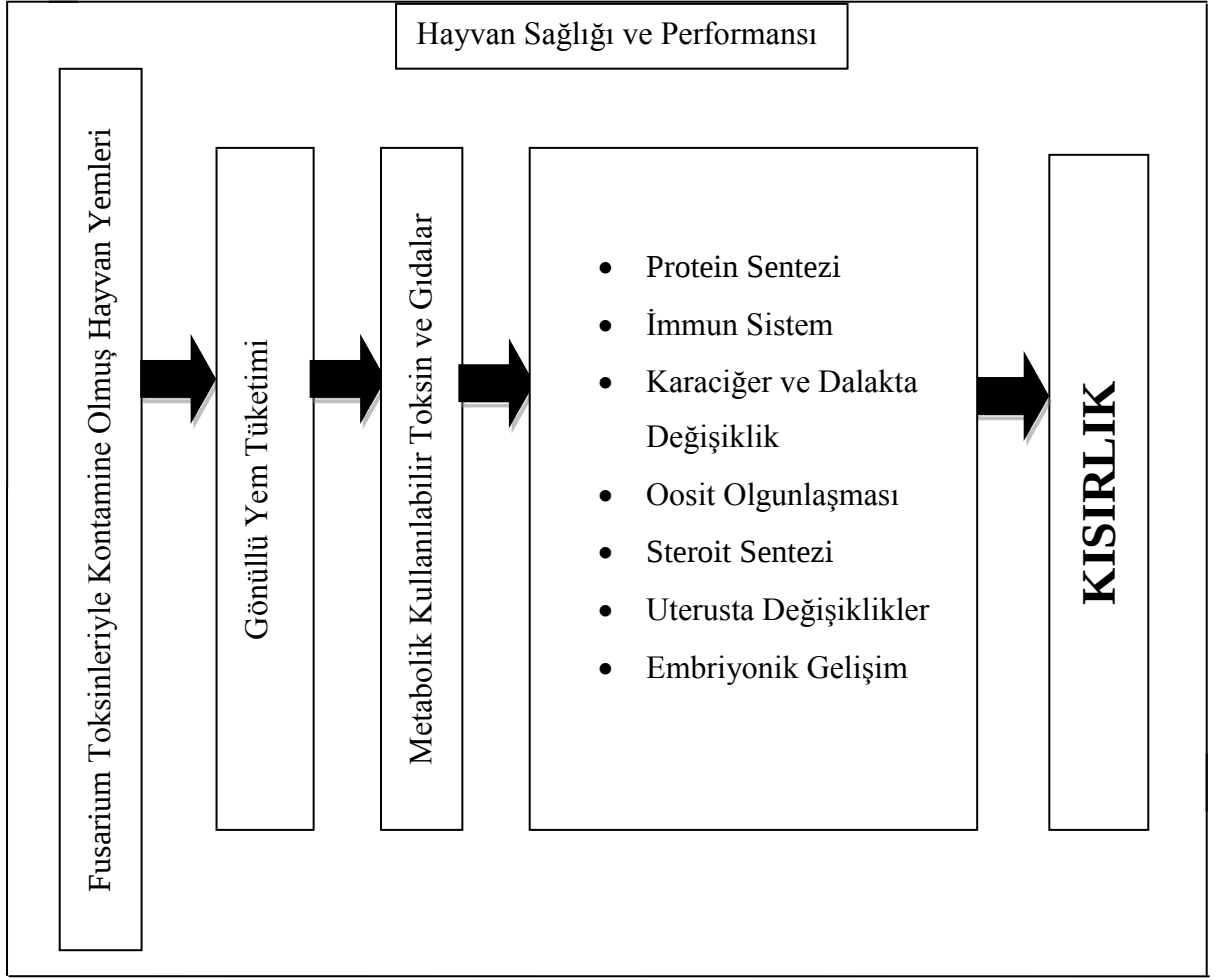
F2 toksini ya da Fermentasyon östrojenik madde (FES) olarak da bilinen zearalenon mantarlar tarafından üretildiği bilinen tek östrojenik metabolittir (Janssen ve diğ., 1997). Çok geniş biyolojik aktiviteye sahip olan zearalenonun ana etki bölgesinin östrojen reseptörleri olduğu konusunda birçok araştırmacı hem fikirdir (Krogh, 1987; Yang ve diğ., 2007b). Yapılan çalışmalarda zearalenonun steroidal olmayan yapısına rağmen, steroidal yapıdaki hormonlardaki özellikle de 17β östrodiol benzeri yapılarıdaki hedef bölgelerle etkileşim kurdukları gösterilmiştir. Zearalenon bir östrojen agonisti gibi davranarak 17β östrodiol ile östrojen reseptörlerine bağlanmak üzere yarışarak östrojen reseptörlerine bağlanır ve zayıf bir mitojen gibi davranır (Yang ve diğ., 2007a).

2.3.2. Zearalenonun Etkileri

Zearalenonun etkisi birçok canlı grubu için alındıkları doz, süre ve alınma sıklığına bağlı olarak değişmekle birlikte kronik alınımlı toksisiteyi artırmaktadır (Topal, 1993). DNA (deoksiribo nükleik asit), RNA(ribonükleik asit) ve protein gibi hücresel makro moleküllere afinite gösterir ve onların sentezini inhibe ederek metabolizmada protein sentezi ve büyüme üzerinde olumsuz etki meydana getirir. Ayrıca lizozomal enzimleri inhibe ederek kromozomal kırıklara sebep olurken, topoizomera II enziminin aktivitesini engelleyerek DNA tamir mekanizmasını bozar ve kromozomal hatalara neden olur (Cavin ve diğ., 1998). Bunlara ek olarak, zearalenon herhangi bir organ yada dokuya özgü olmayıp kemik, merkezi sinir sistemi ve kardiyovasküler sistem gibi birçok sistemde de hasara neden olmaktadır (Brase ve diğ., 2009, Desjardins, 2006).

Yüksek miktarda zearalenon içeren yemlerle beslenen hayvanlarda protein sentezi ve immün sistem baskılanır, karaciğer ve dalakta çeşitli hasarlar meydana gelir. Ayrıca zearalenon uterusda hasara neden olarak, steroid sentezini baskılayarak, oosit olgulaşmasını durdurarak ve embriyonik gelişimi baskılayarak hayvanlarda çeşitli problemler meydana getirmektedir (Döll ve Dänicke; 2011)(Şekil 2.3.2.1).

Çeşitli klinik araştırmalar ve hayvan deneyleri zearalenonun yapısal ve fonksiyonel sperm kusurlarına neden olarak; sperm sayısının azalmasına, sperm hareketliliğinin düşmesine ve sperm morfolojisinin değişmesine neden olduğunu göstermiştir. Testis ağırlığında azalma ve germ hücrelerinde apoptoz gibi çeşitli sorunlara da yol açarak erkek üreme fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilediği belirtilmiştir (Kim ve diğ., 2003; Yang ve diğ., 2007a; Yang ve diğ., 2007b; Zinedine ve diğ., 2007; Nones, 2013). Yapılan başka çalışmalarda zearalenonun testislerdeki seminifer tübüllerin arasında kalan, intersitisiyal alanda konumlanmış, testosteron sentezinden ve salgılanmasından sorumlu olan Leydig hücrelerinde çeşitli hasarlar meydana getirerek testosteron sentezini inhibe ettiği ve buna bağlı olarak spermatogenezi, sperm olgunlaşmasını ve seksüel davranışları olumsuz yönde etkilediği bulunmuştur. (Kim ve diğ.,2003; Yang ve diğ.,2007a). Ayrıca zearalenonun karsinojenik, mutajenik, teratojenik ve genotoksik etkilerinin de olduğu bilinmektedir (Zinedine ve diğ.,2007).



Şekil 2.3.2.1: Fusarium toksinleriyle beslenen hayvanlarda meydana gelen değişiklikler

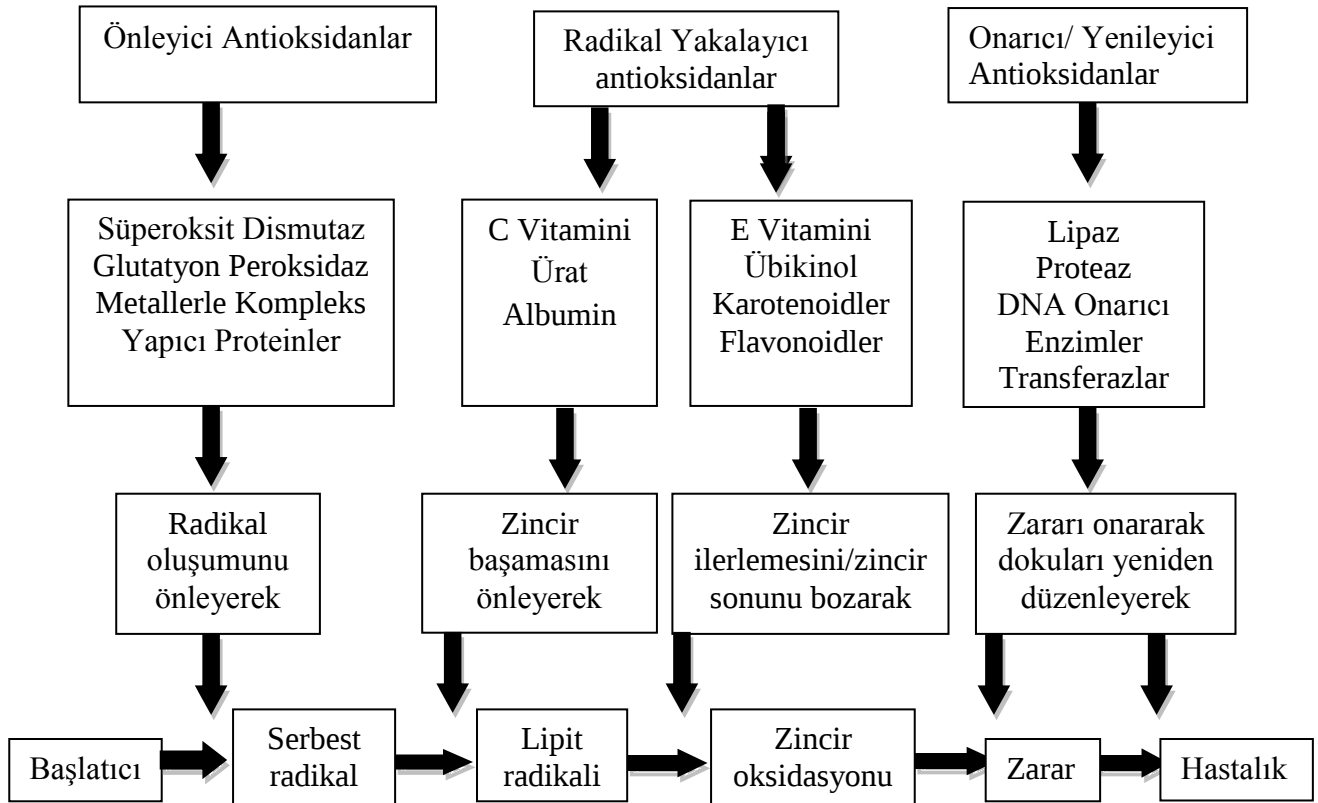
2.4. OKSİDATİF HASAR VE ANTİOKSİDAN SİSTEM

Serbest radikaller, besinlerin oksijen kullanılarak enerjiye dönüşümü sırasında meydana gelir ve dış orbitalinde tek sayıda ortaklanmış elektron taşıyan, elektrik yüklü veya yüksüz olabilen, kısa ömürlü reaktif maddelerdir. Serbest radikaller, radikal olmayan maddeler ile reaksiyona girerek yeni radikaller oluşturup zincir reaksiyonu başlatarak DNA, lipid ve protein gibi hücrenin devamlılığı için gerekli olan bileşenlere zarar verir. Metabolizma sırasında serbest radikal kaynağı olarak bilinen oksijen molekülleri son derece reaktif olan ara ürünleri oluşturur. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (Diplock, 1998). Bunlar süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve tekli oksijendir.

Serbest radikaller hücrelerde ekzojen ve endojen kaynaklı olabilirler. İyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği, alkol, uyuşturucu gibi bağımlılık yapıcı maddeler, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaçlar ve sigara toksinleri ekzojen kaynaklı serbest radikallerdir. Aşırı fiziksel egzersiz, stres, yaşlanma, doku hasarı ve kronik hastalıklar endojen kaynaklı serbest radikalleri oluşturur. Serbest radikaller hücre membran proteinlerini yıkarak hücreleri öldürebilmekte, DNA'ya zarar vererek DNA'yı mutasyonlara açık hale getirmekte, bağışıklık sistemi hücrelerini etkileyerek zayıflatmaktadır. Süren hücre ve doku hasarı sonucu hastalıklar ortaya çıkmaktadır (Young ve Woodside, 2001; Wei ve Pang, 2005; Gökpınar ve diğ., 2006; Haşimi, 2006; Sivrikaya, 2007; Demircan ve diğ., 2005).

Reaktif oksijen türlerinin zararlarına karşılık vücutta farklı doğal savunma sistemleri serbest radikalleri kontrol altında tutmaktadır. Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere “antioksidan” denir. Serbest radikallerin oluşum hızı ve onların antioksidanlar tarafından nötralize edilmesi arasında bir dengenin olması beklenir. Bu şekilde hücre serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korunur. Eğer bu denge serbest radikaller lehine bozulursa, yani yapımdan daha yavaş nötralize edilirse, hücrede serbest radikaller artar. Serbest radikallerin hücrede artışı ve hücre fonksiyonları üzerinde yaptıkları olumsuz etkiye ise (oksidatif hasar) “oksidatif stres” denir. Ayrıca oksidatif stres; hücresel antioksidan düzeyinin, reaktif oksijen düzeylerine karşı yetersiz kalması sonucu, toksik bir etkinin başlaması olarak da tarif edilir. Bu durum ya antioksidan

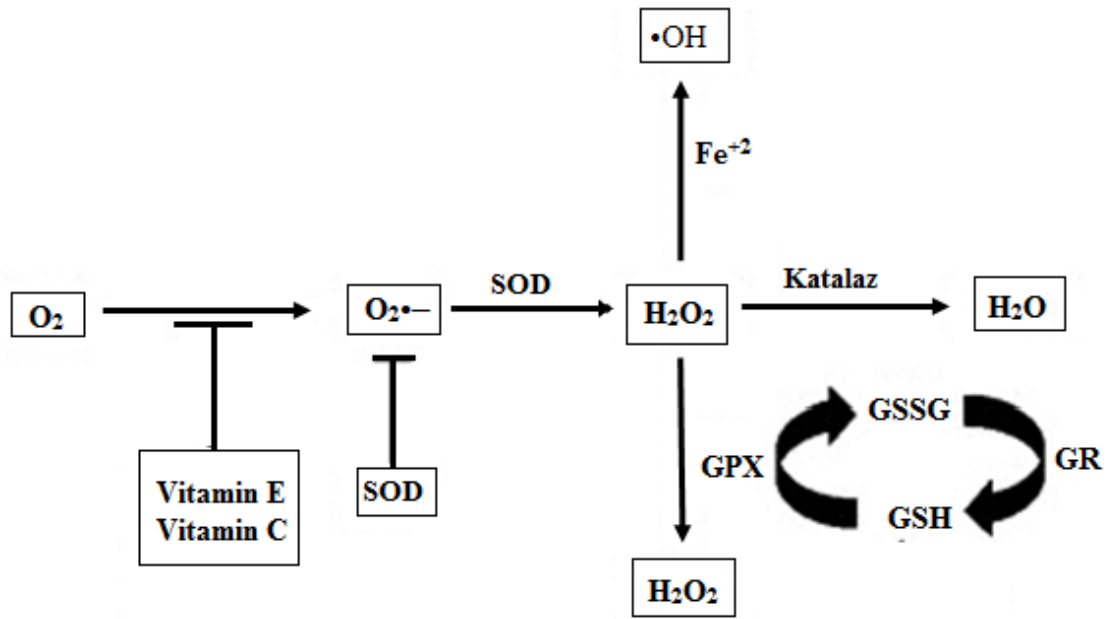
savunmaların yetersizliği, ya reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi, ya da her ikisinden dolayı olmaktadır (Halliwell ve Chirico, 1993). Antioksidanlar radikal oluşumunu önleyici, oluşan radikali tutucu ve oluşan hasarı onarıcı/hücreyi yenileyici antioksidanlar olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. İlk aşamada önleyici antioksidanlar radikal oluşmasını engellerler. Engellenemeyen antioksidanlar radikal yakalayıcılar tarafından tutularak zincirin başlaması veya ilerlemesi durdurulur. Durdurulamayan radikaller hücreye zarar vermişse, onarıcı/yenileyici antioksidanlar devreye girerler ve hücreleri onararak ya da yenileyerek hastalıkların oluşmasına engel olurlar (Willcox ve diğ., 2004)(Şekil 2.4.1.).



Şekil 2.4.1: Antioksidan grupları ve özellikleri (Willcox ve diğ., 2004).

Antioksidanları organizmadaki etki mekanizmaları ve lokalizasyonlarına göre de sınıflandırmak mümkündür. Endojen kaynaklı (hücre içi) antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutasyon peroksidaz (GPx), glutasyon S-transferaz (GST) ve sitokrom oksidaz (Sit O)'dır. Süperoksit dismutaz enzimi, süperoksit anyonunun, hidrojen peroksit (H₂O₂)'ye oksijene dönüşümünü katalizle ederek bu

radikallerin etkisini azaltmaktadır (Koca ve Karadeniz, 2005). Peroksisomlarda lokalize olmuş katalaz enzimi hidrojen peroksiti oksijene ve suya parçalayan reaksiyonu katalizler (Duthie ve diğ., 1989). GPx, hem lipid peroksidasyonunun başlamasını önler, hem de lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerin metabolizmasını sağlar. Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen okside glutatyon (GSSG), glutatyon redüktaz (GR)'ın katalizlediği reaksiyon ile tekrar glutatyon (GSH)'a dönüşür (Delibaş ve Özcanakaya, 1995; Şimşek, 1999; Burçak ve Andican, 2004). GST, sisteinin sülfür atomu üzerinden çeşitli elektrofillere glutatyonu aktaran proteindir (Boyer, 1989). Organizmanın bütün hücrelerinde bulunan glutatyon zararlı bileşiklerin etkisizleştirilmesinde kullanılan non-enzimatik bir moleküldür. Ekzojen kaynaklı antioksidanlar (hücre dışı) arasında ise; transferin, bilirubin, mukus, eritrositler ve askorbik asit gibi enzim sistemleri sayılabilir (Şekil 2.4.2.).



Şekil 2.3.2: Antioksidan sistemde yer alan bazı enzimler (Li ve diğ., 2003)

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada, zearalenon 24 saat boyunca farklı dozlarda TM3 Leydig hücre soyuna uygulanmıştır. Zearalenon belirlenen bu dozlara uygulanarak hücre canlılığı, non enzimatik hücre içi bir antioksidan olan glutasyon miktarı ve süperoksitdismutaz, katalaz, glutasyon peroksidaz, glutasyon-S-transferaz, glutasyon peroksidaz gibi hücre içi enzimatik antioksidanların miktarları biyokimyasal yöntemler kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

3.1. KULLANILAN HÜCRE SOYU VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

Deneyde kullanılan TM3 Leydig hücre soyu 11-13 günlük farelerin Leydig hücrelerinden elde edilmiş tümörük olmayan bir hücre soyudur. Laboratuvarımıza ATCC (American Type Culture Collection): The Global Bioresource Center'dan getirilmiş olup *in vitro* koşullarda haftada iki-üç kez düzenli pasajları yapılarak yetiştirilmektedir. Hücreler %5 At Serumu, %2,5 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, %5 CO₂ ve %95 hava içeren nemli ortamda, 37°C'de inkübe edilerek yetiştirilmektedir.

3.2. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ

Deneyde kullanılan hücreler, yetiştirildikleri kültür kapları içinde yeterli yoğunluğa eriştiklerinde haftada iki-üç defa düzenli pasajları yapılmaktadır. Bu amaçla, hücreler tripsinle 37°C'de 3 dakika muamele edildikten sonra pipetaj yapılarak toplanır ve santrifüj tüpüne aktarılır. 1500 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. ZEARALENON KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI

Zearalenonun TM3 Leydig hücre soyu üzerine uygulanan konsantrasyonları, toksikoloji çalışmalarında sıklıkla kullanılan NOEL (hiçbir yan etkinin gözlenmediği seviye) ve LOEL (en düşük etkinin gözlemlendiği seviye) değerleri kullanılarak belirlenmiştir (Shin ve diğ., 2009). Domuzlarda belirlenen NOEL ve LOEL değerinin plazmadaki konsantrasyonlarının (Cp) değerini bulabilmek için; oral yolla vücuda alındıktan sonra kan dolaşımında bulunabilecek olan zearalenon miktarı vücuttaki dağılım hacmi (Vd) ve biyoyararlanım (F) gibi temel farmakokinetik parametreler esas alınarak ortaya çıkarılmıştır (Dhillon ve Gill, 2006).

$$\text{Oral alınan doz (D)} = \frac{\text{Plazma konsantrasyon miktarı (Cp)} \times \text{Dağılım hacmi (Vd)}}{\text{Biyoyararlanımı (F)}}$$

(3.3.1.)

Tüm deneyler boyunca uygulanan konsantrasyonlar %0,1 DMSO içeren kültür medyumunda her gün taze olarak hazırlandı. Hazırlanan 1,2 nM ve 6 nM'lık zearalenon solüsyonları 0,2 µm milipor filtre ile steril edilerek TM3 Leydig hücrelerine 24 saat boyunca uygulanmıştır.

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

ZEARALENON	
Kontrol Grubu (K)	%0,1 DMSO içeren kültür medyum
1,2 nM	1,2 nM Zearalenon + %0,1 DMSO içeren kültür medyum
6 nM	6 nM Zearalenon + %0,1 DMSO içeren kültür medyum

3.4. HÜCRE ÇOĞALMA HIZI

3.4.1. MTT Hücre Canlılık Testi

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman Tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Trypan blue boyası ile boyanan hücreler, Thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak MTT hücre canlılık testi için 96 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde ekildi. %0,1 dimetil sülfoksit (DMSO) içeren kültür medyumunda hazırlanmış zearalenon hücrelere 24 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 (Mossman, 1983).

3.5. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

Deneyisel uygulamalar sonunda 6 kuyulu kültür kaplarına ekilen hücreler (5×10^5) kaldırılarak, Tris-HCl tamponuna (pH:7,2) alındı. Daha sonra ultrasonikatör ile sonike edilerek hücrelerin membranlarının parçalanması sağlanmış ve elde edilen hücre süspansiyonu 14000 g'de Nüve marka soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant alındı. Alınan süpernatantlar, total protein miktarının, glutatyonun (GSH) antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon S-transferaz (GST) enzimlerinin ölçülmesi için kullanıldı.

3.5.1. Total Protein Tayini

Total protein tayini Lowry ve diğ., (1951) yöntemine göre yapıldı. Deneyin prensibi fosfomolibdotungstik asit çözeltisinin (Folin-Ciocalteu belirteci) tirozin bakiyeleri ile

reaksiyona girerek mavi bir renk oluşturma esasına dayanır. Bu mavi renk 660 nm dalga boyunda absorbands verir.

3.5.1.1. Kullanılan Çözeltiler

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

B Reaktifi: %1 (w/v) Na-K Tartarat içinde %5 (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

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

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

3.5.1.2. Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

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

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

3.5.1.3. Hesaplama

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

3.5.2. Süperoksit dismutaz (SOD) Tayini

Süperoksit dismutaz enzimi gösterilmesi için Marklund ve Marklund (1974)'un yöntemi kullanıldı. Deneyin prensibi pyrogallolün otooksidasyonunun SOD enzimi tarafından inhibe edilmesi esasına dayanır.

3.5.2.1. Kullanılan Çözeltiler

0,05 M Tris Tamponu (pH 8,5)

20 mM Pyrogallol

3.5.2.2. Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

DENEY KARIŞIMI	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Hücre Ekstresi	0,05 ml	—
Tris Tamponu	1,4 ml	1,45 ml
Pyrogallol	0,05 ml	0,05 ml

Örnek ve kör tüplerindeki absorbens değişimi çözeltiler konduktan sonra 3 dakika boyunca 30 saniye aralıklarla 420 nm'de spektrofotometrede okunur.

3.5.2.3. Hesaplama

Körün absorbens değişimi: ΔA

Örneğin absorbens değişimi: ΔB

$$\Delta A = \frac{A_{\text{Son}} - A_{\text{İlk}}}{T_{\text{Son}} - T_{\text{İlk}}} \quad (3.5.2.1.)$$

$$\Delta B = \frac{B_{\text{Son}} - B_{\text{İlk}}}{T_{\text{Son}} - T_{\text{İlk}}} \quad (3.5.2.2.)$$

$$\text{SOD'un \%50 inhibisyon miktarı} = \frac{(\Delta A - \Delta B) \times 100}{\Delta A \times 50} \quad (3.5.2.3)$$

3.5.3. Katalaz Tayini

Katalaz gösterilmesi için Sinha (1972)'nin yöntemi kullanıldı. Katalaz enzimi hücre için çok zararlı olan hidrojen peroksidi (H_2O_2) su ve moleküler oksijene dönüştürür. Deney prensibi H_2O_2 'nin dikromat/asetik asit belirteci ile oluşturduğu koyu mavi-mor çökeltinin kaynatılarak açık yeşil renge dönüştürülmesi esasına dayanır. Bu açık yeşil renk 570 nm dalga boyunda absorbans verir.

3.5.3.1. Kullanılan Çözeltiler

0,01 M Sodyum Fosfat Tamponu (pH 7)

2 M H_2O_2

Dikromat/asetik asit belirteci: 5 gr potasyum dikromat 100 ml ultrasaf suda çözülür. Bu karışıma yavaşça 300 ml glasiyal asetik asit eklenir.

3.5.3.2. Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

DENEY KARIŞIMI	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Hücre Ekstresi	0,1 ml	—
Tris Tamponu	—	0,1 ml
Sodyum Fosfat Tamponu	0,5 ml	0,5 ml
H_2O_2	0,4 ml	0,4 ml
Dikromat/Asetik Asit Belirteci	0,2 ml	0,2 ml

Örnek ve kör tüplerine sodyum fosfat tamponu, H_2O_2 ve hücre süspansiyonu konduktan sonra tüpler hafifçe çalkalandı. Daha sonra dikromat/asetik asit belirteci eklenir ve tüpler 10 dk kaynayan su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüpler soğutulularak 570 nm dalga boyunda köre karşı okunur.

3.5.3.3. Hesaplama

$$\text{Tüketilen } H_2O_2 = \frac{A_{\text{Örnek}} \times df \times V_{\text{Toplam}}}{\epsilon m M \times LP \times V_{\text{Örnek}}} \quad (3.5.3.1.)$$

H₂O₂ için molar ekstinksiyon katsayısı: $\epsilon_{mM} = 1.88 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

V_{toplam}: Toplam hacim

V_{örnek}: Kullanılan örnek hacmi

A_{örnek}: Örnek absorbansı

df: Sulandırma katsayısı

LP: Işık yolu

3.5.4. Glutasyon peroksidaz (GPx) Tayini

Glutasyon peroksidaz gösterilmesi için Hafeman ve diğerlerinin (1974) yöntemi kullanıldı. Bu deney prensibi GPx enzimi tarafından tüketilen glutasyonun 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) belirteci ile 412 nm dalga boyunda ölçülebilir bir bileşik oluşturma esasına dayanır.

3.5.4.1. Kullanılan Çözeltiler

0,4 M Sodyum Fosfat Tamponu (pH 7) (0,4 mM EDTA içerir)

2 mM Redükte glutasyon

10 mM Sodyum azid

1,25 mM H₂O₂

DTNB belirteci: 40 mg DTNB 100 ml %1 sodyum sitrat içinde çözülür. Bu belirteç ışıktan korunur.

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

0,4 M Sodyum fosfat solüsyonu (Na₂HPO₄)

3.5.4.2. Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

DENEY KARIŞIMI	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Hücre Ekstresi	0,15 ml	—
Tris Tamponu	—	0,15 ml
Sodyum Fosfat Tamponu	0,5 ml	0,5 ml
Redükte glutatyon	0,5 ml	0,5 ml
Sodyum azid	0,25 ml	0,25 ml
Ultrasaf su	0,6 ml	0,6 ml

Örnek ve kör tüplerine deney karışımı konduktan sonra tüpler 5 dakika 37°C’de inkübe edilir. Daha sonra 0,5 ml H₂O₂ eklenir ve 3 dk 37°C’de inkübe edilir. Bunun ardından 1 ml TCA eklenerek 1500 g’de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatanttan 0,2 ml alınır ve buna 0,2 ml Na₂HPO₄ solüsyonu ve 0,1 ml DTNB eklenerek 412 nm dalga boyunda köre karşı okunur.

3.5.4.3. Hesaplama

$$\text{Tüketilen glutatyon} = \frac{A_{\text{Örnek}} \times df \times V_{\text{Toplam}}}{\epsilon_{\text{mM}} \times LP \times V_{\text{Örnek}}} \quad (3.5.4.1.)$$

DTNB için molar ekstinksiyon katsayısı: $\epsilon_{\text{mM}} = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

V_{toplam} : Toplam hacim

$V_{\text{örnek}}$: Kullanılan örnek hacmi

$A_{\text{örnek}}$: Örnek absorbansı

df: Sulandırma katsayısı

LP: Işık yolu

3.5.5. Glutatyon-S-Transferaz (GST) Tayini

Glutatyon-S-transferaz (GST) gösterilmesi için Habig ve diğerlerinin (1974) yöntemi kullanıldı. GST enzimi glutatyon ve 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) varlığında Glutatyon-DNB konjugatı oluşturur. Deney prensibi oluşan bu Glutatyon-DNB konjugatının 340 nm dalga boyunda absorbans vermesi esasına dayanır. Artan absorbsiyon oranı GST enzimi aktivitesi ile doğrudan ilişkilidir.

3.5.5.1. Kullanılan Çözeltiler

0,1 M Potasyum Fosfat Tamponu (pH 6,5)

0,1 M CDNB

0,2 M Redükte Glutasyon

Deney Karışımı: 9,8 ml Potasyum Fosfat Tamponu

0,1 ml Redükte Glutasyon

0,1 ml CDNB

Bu hazırlanan karışım 50 tüp içindir.

3.5.5.2. Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

DENEY KARIŞIMI	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Hücre Ekstresi	0,02 ml	—
Tris Tamponu	—	0,02 ml
Deney Karışımı	0,18 ml	0,18 ml

Örnek ve kör tüplerindeki absorbens değişimi çözeltiler konduktan sonra 5 dakika boyunca 60 saniye aralıklarla 340 nm’de spektrofotometrede okunur.

3.5.5.3. Hesaplama

Dakikadaki absorbens değişimi: ΔA

ϵ_{mM} : $5,3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

V_{toplam} : Toplam hacim

$V_{\text{örnek}}$: Kullanılan örnek hacmi

$A_{\text{örnek}}$: Örnek absorbensı

df: Sulandırma katsayısı

LP: Işık yolu

$$\Delta A = \frac{A_{\text{son}} - A_{\text{ilk}}}{T_{\text{son}} - T_{\text{ilk}}} \quad (3.5.5.1.)$$

$$\text{GST spesifik aktivitesi} = \frac{(\Delta A_{\text{örnek}} - \Delta A_{\text{blank}}) \times V_{\text{toplam}} \times \text{df}}{\epsilon_{mM} \times V_{\text{örnek}} \times \text{LP}} \quad (3.5.5.2.)$$

3.5.6. Glutasyon (GSH) Tayini

Glutasyon tayini Ellman (1959)'nın yöntemine göre yapıldı. Bu yöntem glutasyonun 5,5'-DTNB tarafından oksitlenerek okside glutasyon ve 5-thio-2-nitrobenzoikasit (TNB) oluşumuyla TNB'nin 414 nm dalga boyunda absorbands vermesi esasına dayanır.

3.5.6.1. Kullanılan Çözeltiler

0,4 M Tris-HCl (pH 8.9)

3,4 mg/ml Ellman ayırıcı (DTNB)

3.5.6.2. Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

DENEY KARIŞIMI	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Hücre Ekstresi	0,1 ml	—
Tris Tamponu	—	0,1 ml
Tris-HCl	0,16 ml	0,16 ml
DTNB	0,004 ml	0,004 ml

Örnek ve kör tüplerine Tris-HCl, DTNB ve hücre süspansiyonu konduktan sonra 5 dk karanlıkta oda ısısında inkübe edilir ve 5-10 dk içinde hemen 414 nm dalga boyunda köre karşı okunur.

3.5.6.3. Hesaplama

$$\text{Tüketilen glutasyon} \frac{\text{mmol}}{\text{ml}} = \frac{A_{\text{örnek}} \times V_{\text{toplam}} \times df}{\epsilon_{\text{mM}} \times V_{\text{örnek}} \times LP} \quad (3.5.6.1.)$$

$$\epsilon_{\text{mM}} = 13,6 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$$

V_{toplam} : Toplam hacim

$V_{\text{örnek}}$: Kullanılan örnek hacmi

$A_{\text{örnek}}$: Örnek absorbandsı

df: Sulandırma katsayısı

LP: Işık yolu

3.6. İSTATİSTİK ANALİZ

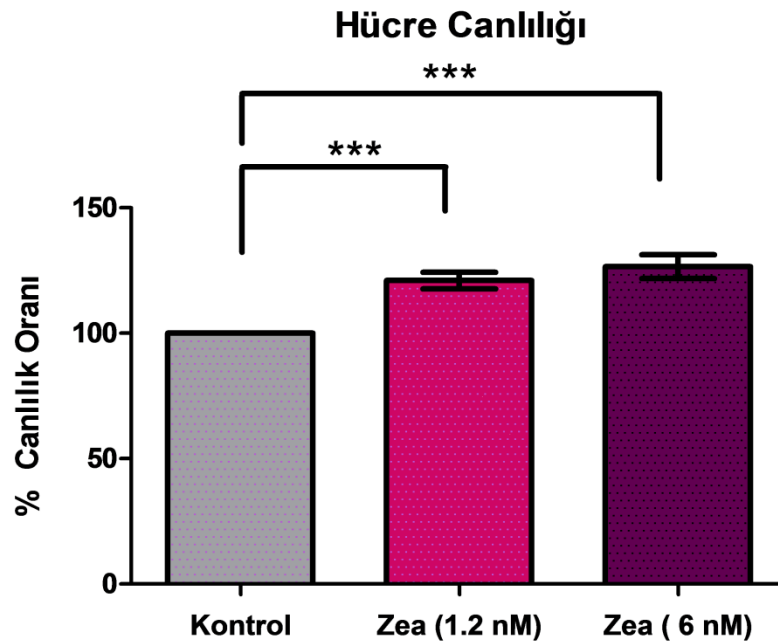
Deney gruplarında, uygulanan doz zamana bağı olarak, hücre canlılık testi total protein miktarı, glutatyon miktarı, SOD enzimi, katalaz enzimi, GPx enzimi ve GST enzim miktarı saptandı. Daha sonra yapılan karşılaştırmalarda ANOVA varyans analizinde posthoc test olarak Tukey kullanıldı. Sonuçların değerlendirilmesinde $p<0.001$, $p<0.01$ ve $p<0.05$ anlamlılık seviyesi temel alındı.

4. BULGULAR

4.1. HÜCRE ÇOĞALMA HIZI BULGULARI

4.1.1. MTT Bulguları

Zearalenonun iki farklı dozu TM3 Leydig hücrelerinde 24 saat sürenin sonunda kontrol ve deney gruplarındaki hücre canlılığındaki değişim hücre canlılığı MTT testi yapılarak tespit edildi. Kontrol ve deney gruplarındaki % canlılık oranları şekil 4.1.1.1’de verilmiştir. 24 saat sürenin sonunda kontrol grubu ve iki farklı deney grubu MTT değerleri bakımından karşılaştırıldığında zearalenonun iki dozu kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken ($p<0,001$), 1,2 nM ve 6 nM zearalenon dozu arasında ise anlamlı bir fark bulunamamıştır.

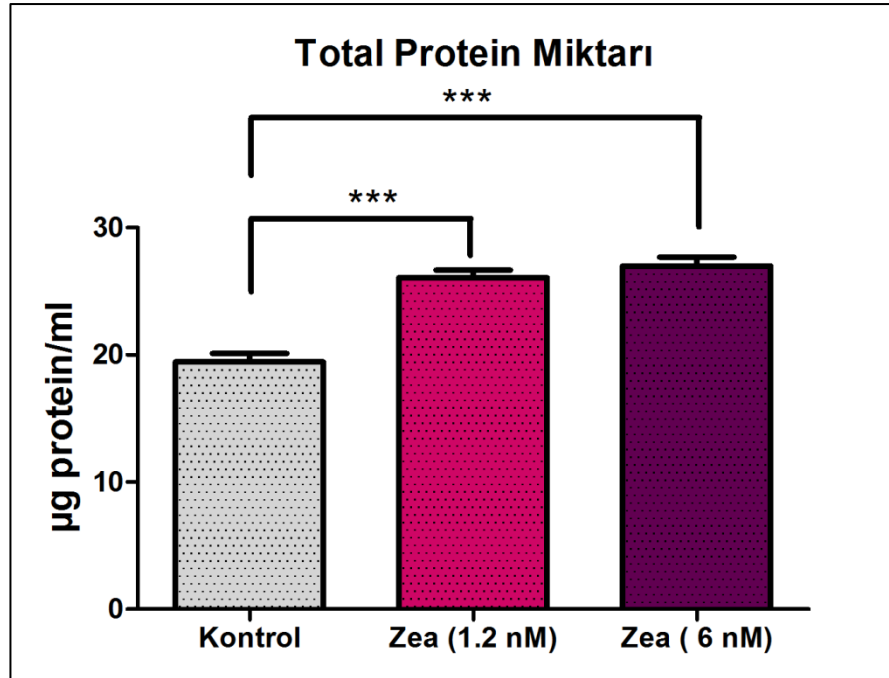


Şekil 4.1.1.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücrelerinde % canlılık üzerine (doza bağlı) etkileri (***: $p<0,001$).

4.2. OKSİDATİF HASAR BULGULARI

4.2.1. Total Protein Miktarı

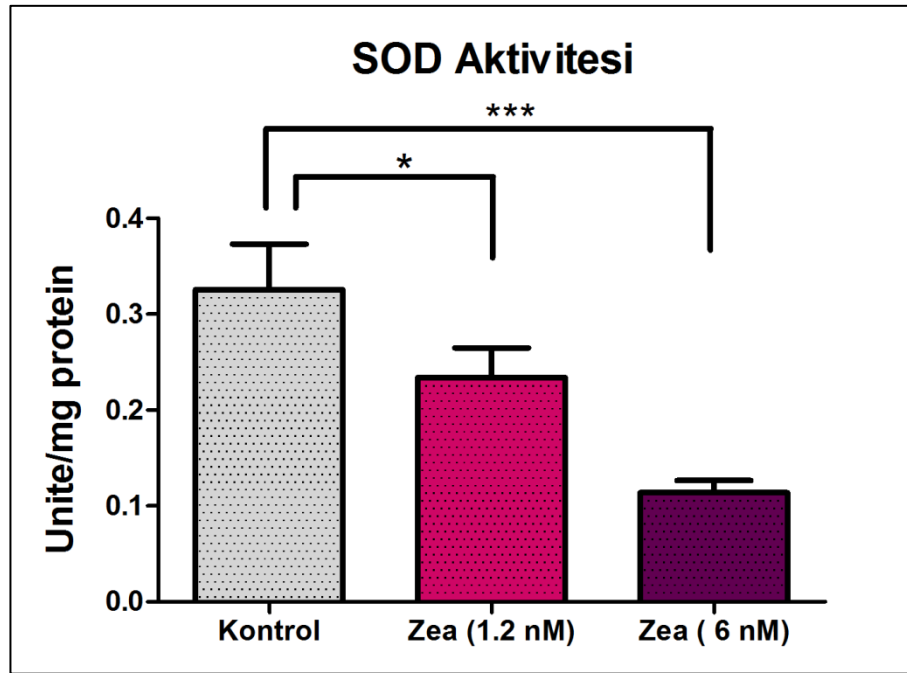
TM3 Leydig hücrelerinin sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanan total protein miktarı şekil 4.2.1.1’de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve zearalenonun iki farklı dozu total protein miktarı bakımından karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre zearalenonun iki farklı dozu olan 1,2 nM ve 6 nM dozlarında anlamlı bir artış gözlenirken ($p < 0,001$), zearalenonun iki farklı dozu arasında ise anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.2.1.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücreleri üzerindeki total protein miktarına (doza bağlı) etkileri (***: $p < 0,001$)

4.2.2. SOD Enzim Aktivitesi

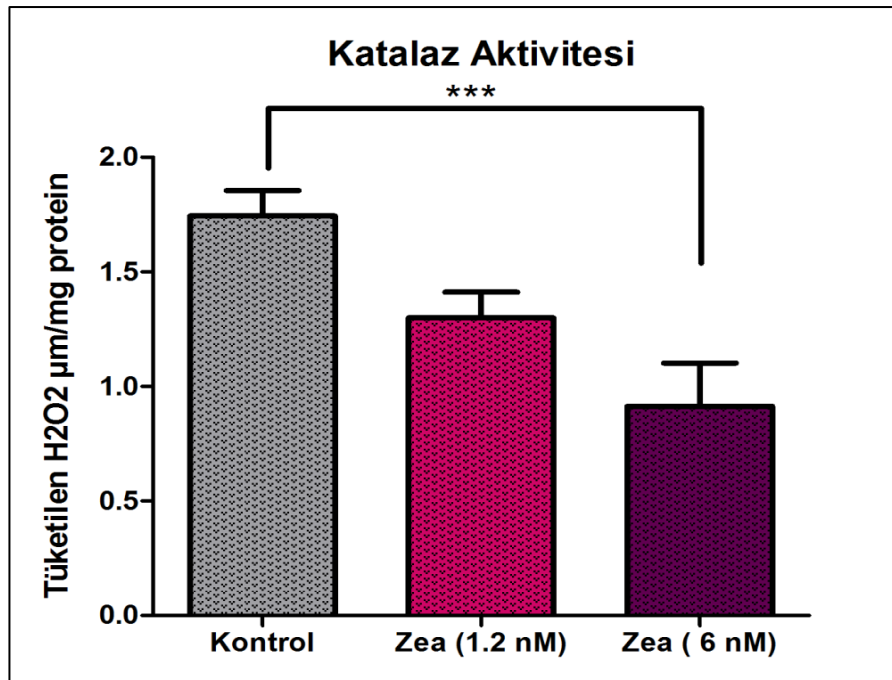
TM3 Leydig hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanan SOD enzimi miktarı şekil 4.2.2.1’de verilmiştir. 24 sonunda kontrol grubu ve 1,2 nM ve 6 nM olarak seçilen zearalenon dozları SOD enzimi miktarı bakımından karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunmazken, kontrole göre 1,2 nM dozunda ($p<0,05$) ve 6 nM dozunda ($p<0,001$) anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir.



Şekil 4.2.2.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücreleri üzerindeki süperoksit dismutaz aktivitesine (doza bağlı) etkileri (***: $p<0,001$, *: $p<0,05$).

4.2.3. Katalaz Enzim Aktivitesi

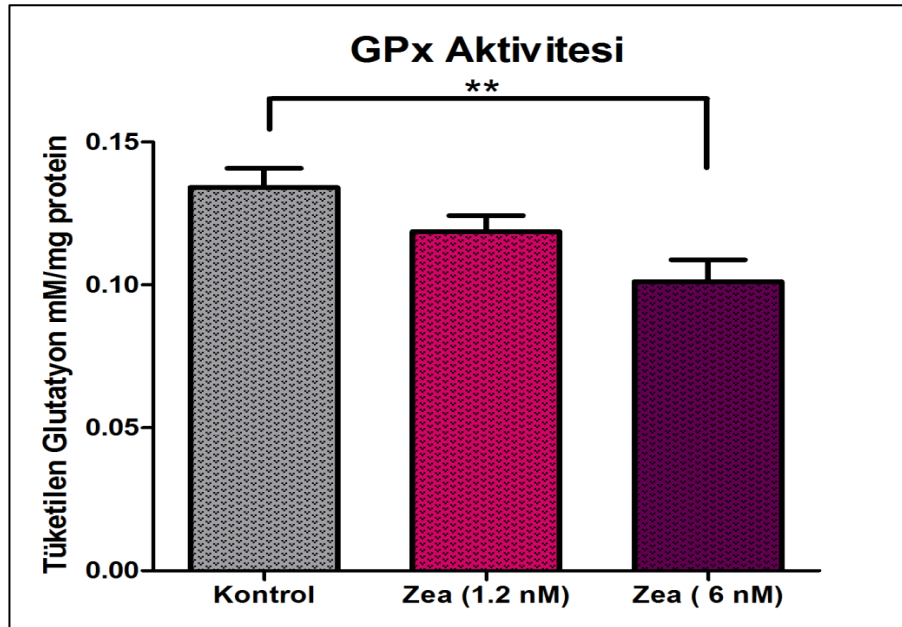
TM3 Leydig hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak tüketilen H_2O_2 miktarına bağlı olarak hesaplanan katalaz enzimi miktarı şekil 4.2.3.1’de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve zearalenonun iki farklı dozu katalaz enzimi miktarı bakımından karşılaştırıldığında kontrol grubu ile 1,2 nM’lık zearalenon dozu arasında, 1,2 nM ile 6 nM zearalenon dozları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmezken, 6nM’lık zearalenon dozunda kontrole göre anlamlı olarak azalma gözlemlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 4.2.3.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücrelerinde tüketilen H_2O_2 miktarına bağlı olarak değişen katalaz enzimi aktivitesine (doza bağlı) etkileri (***: $p<0,001$).

4.2.4. GPx Enzim Aktivitesi

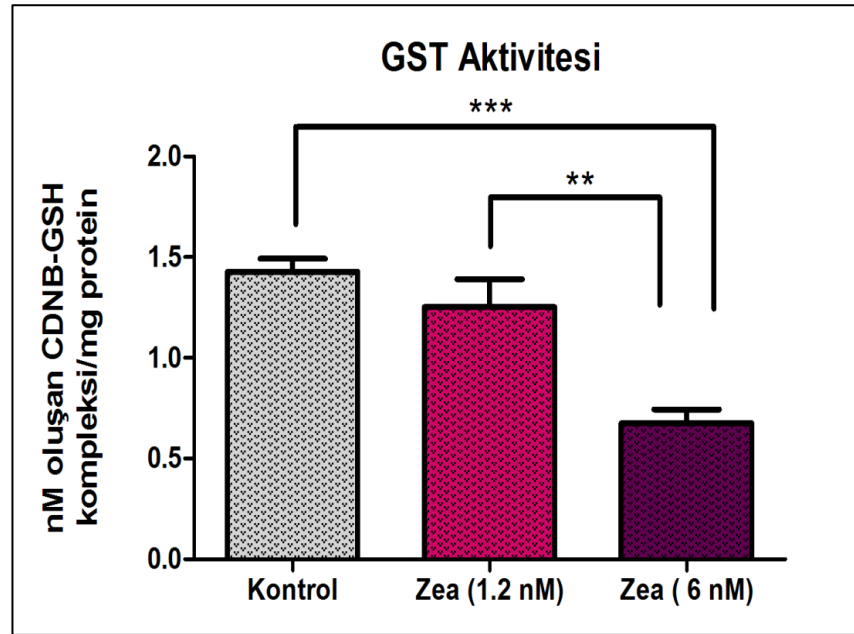
TM3 Leydig hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak tüketilen glutatyon miktarına bağlı olarak hesaplanan glutatyon peroksidaz (GPx) enzimi miktarı şekil 4.2.4.1’de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve zearalenonun iki farklı dozu GPx enzimi miktarı bakımından karşılaştırıldığında 1,2 nM’lık zearalenon dozunda kontrole göre ve zearalenonun iki farklı dozu olan 1,2 nM ve 6 nM dozları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmezken, 6 nM olan zearalenon dozunda kontrole göre anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ($p<0,01$).



Şekil 4.2.4.1: Zearelenonun TM3 Leydig hücreleri üzerindeki glutatyon peroksidaz aktivitesine (doza bağlı) etkileri (**: $p<0,01$).

4.2.5. GST Enzim Aktivitesi

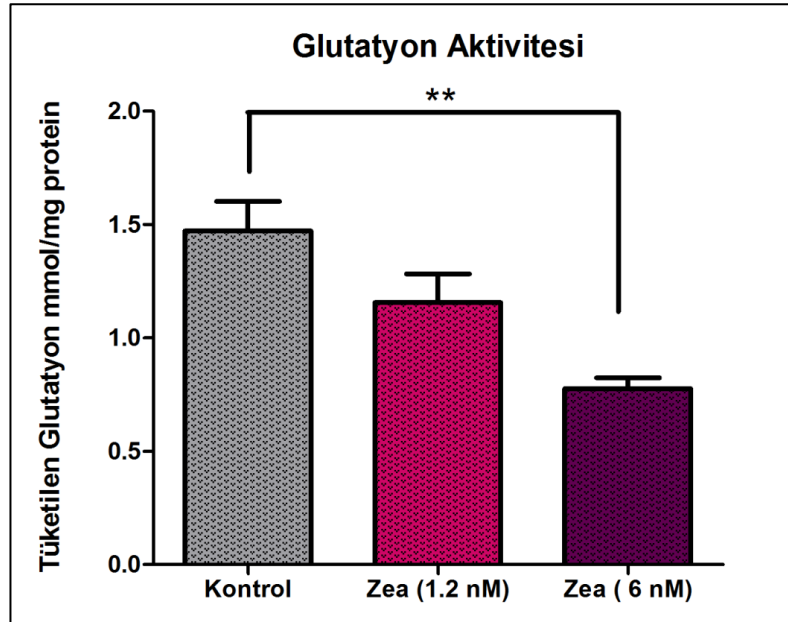
TM3 Leydig hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak dakikada oluşan CDNB-GSH kompleksinin miktarına bağlı olarak hesaplanan GST enzimi miktarı şekil 4.2.5.1’de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve zearalenonun iki farklı dozu GST enzimi miktarı bakımından karşılaştırıldığında 6 nM’lık zearalenon dozunun hem kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ($p<0,001$), hem de 1,2 nM’lık zearalenon dozuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir ($p<0,01$). Zearalenonun 1,2 nM dozunda ise kontrole göre anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.2.5.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücreleri üzerindeki glutatyon S-transferaz aktivitesine (doza bağlı) etkileri (***: $p<0,001$, **: $p<0,01$).

4.2.6. Glutasyon Aktivitesi

TM3 Leydig hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanan hücre içi glutasyon düzeyleri şekil 4.2.6.1’de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve zearalenonun iki farklı dozu glutasyon miktarı bakımından karşılaştırıldığında kontrole grubuna göre 1,2 nM’lık zearalenon dozunda ve zearalenonun iki farklı dozu olarak seçilen 1,2 nM ve 6 nM olan dozları arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmezken, kontrole göre 6 nM olan zearalenon dozunda glutasyon miktarı bakımından anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ($p<0,01$).



Şekil 4.2.6.1: Zearalenonun TM3 Leydig hücrelerinde glutasyon aktivitesine (doza bağlı) etkileri (** $p<0,01$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde insan nüfusunun artması, besin ihtiyacının da paralel olarak artmasına neden olmaktadır. Bu besin ihtiyacının önemli bir kısmını karşılayan tahılların *Fusarium* cinsi mantarlar tarafından kontamine olması besin zincirine zearalenon gibi zehirli metabolitlerin karışmasına yol açar (CAST, 2003). Besinler yoluyla alınan zearalenonun insan sağlığı üzerinde çeşitli etkilerinin olduğu bilinmektedir (Wayne, 2007). Son yıllarda sağlıklı ve kaliteli ürünlerin tüketilmesine yönelik tüketicinin bilgilendirilmesi, gıda güvenliğinin önemli hale getirilmesi ve çeşitli belirlenmelerin yapılmasına rağmen bitkilerde, hayvanlarda ve insanlarda en sık karşılaşılan toksin çeşidinin *Fusarium* cinsi mantarlar tarafından üretilmesi zearalenona olan ilgiyi günümüzde arttırmaktadır (Gajecki, 2002; Basmacıoğlu ve Ergül, 2003; Zinedine ve diğ., 2007; Gromadzka ve diğ., 2008).

Fazla miktarda vücuda alınan zearalenonun erkek üreme sistemini olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir (Kim ve diğ., 2003; Yang ve diğ., 2007a; Yang ve diğ., 2007b; Zinedine ve diğ., 2007; Minervini ve diğ., 2008; Hou ve diğ., 2013; Lopez-Cassas ve diğ., 2012; Marin ve diğ., 2013; Nones ve Scussel., 2013; Wang ve diğ., 2012). Zearalenon germ hücrelerinde vakuol oluşmasına, spermin karakteristik özelliklerinin (sperm hareketi, canlılığı ve akrozom reaksiyonu) bozulmasına ve sperm kromatin yapısının denatüre olmasına neden olmaktadır (Tsakmakidis ve ark., 2006; Yang ve ark., 2007; Benzoni ve ark., 2008). Zearalenonun testiste Leydig hücreleri üzerindeki olumsuz etkilerini gösteren *in vitro* çalışma sayısı çok azdır (Yang ve diğ., 2007b). Ancak zearalenonun Leydig hücrelerinde meydana getirdiği hasar sebebiyle serum testosteron miktarını düşürdüğü bilinmektedir. Ayrıca steroidogenik yolda görevli olan enzimlerin mRNA seviyelerinin azalmasına yol açar (Yang ve ark., 2007a). Yukarıda bahsedilen nedenler ve zearalenonun endokrin bozucu etkileri nedeniyle zearalenona maruz kalmış bireylerde üreme sistemi etkilenecek infertilite meydana gelmektedir.

Günlük yaşantımızda sıkça maruz kaldığımız zearalenon gıda maddelerinin kontaminasyonu sonucunda insanlara ve diğer canlılara beslenme yoluyla ulaşmaktadır. Dünya’da gıdalarla maruz kalınan günlük zearalenon miktarları Amerika’da 12 ve 69 $\mu\text{g/kg/va}$, Almanya’da 6.35 ng/kg/va , Fransa’da 8.3 ng/kg/va ve Kıbrıs’ta 8.6 ng/kg/va olarak öngörülmüştür (EFSA, 2011). Türkiye’de ise Türk Gıda Kodeksi tarafından gıdalarda bulunabilecek zearalenonun maksimum kontaminasyon sınır değeri 20 $\mu\text{g/kg}$ ve 400 $\mu\text{g/kg}$ aralığında tespit edilmiştir (TGK, 2008). Bazı ülkelerde insanların tüketimine sunulan mısırlı yiyecekler ve mısır gevreğinde 70 $\mu\text{g/kg}$ seviyesinde belirlenen zearalenon dozu maymunlar üzerinde etkili olacak dozdan 400 kat, fareler üzerinde etkili olacak dozdan 600 kat daha düşüktür. FAO/WHO tarafından öngörülen zearalenonun maksimum tolere edilebilir günlük alım dozu ise 0,5 $\mu\text{g/kg/va}$ ’dır (Mitterbauer ve diğ., 2003). Ayrıca toksikoloji çalışmalarında sıklıkla kullanılan NOEL (Hiçbir etkinin gözlemlenmediği doz) değeri domuzlarda 40 $\mu\text{g/kg/va}$ olarak belirlenirken yine domuzlarda LOEL değeri 200 $\mu\text{g/kg/va}$ olarak belirlenmiştir (Zwierzchowski ve diğ., 2006; Gajecka ve diğ., 2011).

Bu çalışmada seçilen yüksek zearalenon ve düşük zearalenon dozları, hiçbir yan etkinin gözlemlenmediği değer olan NOEL değeri ve en düşük etkinin gözlemlendiği değer olan LOEL değeri göz önüne alınarak belirlenmiştir. Bulunan bu değerlerin oral olarak vücuda alımını takiben plazmaya geçen zearalenon konsantrasyonu (C_p)’nu bulabilmek için ise, zearalenonun vücuttaki dağılım hacmi (V_d), biyoyararlanımı (F) gibi çeşitli farmakokinetik değerlerin formüle edilmesi ile *in vitro* çalışma için uygun hale getirilmiştir (Dhillon ve Gill, 2006; Shin ve diğ., 2009). NOEL ve LOEL dozlarının *in vitro*’ya uyarlanmış hali kullanılarak elde edilen bu veriler deney gruplarına 24 saat boyunca uygulanmıştır.

Kouadio ve diğerlerinin 2005 yılında yaptıkları çalışmada, insan kolon kanser hücrelerine (Caco-2), 1-150 μM konsantrasyonları arasında zearalenonun 72 saat süreyle uygulanması sonucunda zearalenonun artan konsantrasyonlarında hücre canlılığı inhibisyonunun arttığı tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada at ovaryumundan izole edilmiş granüloza hücrelerine 1×10^{-8} -1 μM konsantrasyon aralığında zearalenonun 72 saat süreyle muamelesi sonucunda 1×10^{-4} μM ve 1×10^{-3} μM zearalenon dozunda

granüloza hücrelerinin çoğalmasının kontrol gruplarına göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir (Minervini ve diğ., 2006).

Zhu ve diğerlerinin 2011 yılında yaptıkları *in vitro* çalışmada domuz granüloza hücrelerine 30, 60, 90 ve 120 μM zearalenon 24 saat süreyle uygulanmıştır. Çalışma sonucunda 60, 90 ve 120 μM zearalenon uygulanan gruplar kontrole göre kıyaslandığında hücre çoğalmasında anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. 2011 yılında Ayed ve diğerlerinin yaptığı çalışmaya göre 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 ve 180 μM zearalenonun 24 saat süreyle insan rahim servikal karsinoma (HeLa) hücre soyuna uygulanması sonucu, artan toksin konsantrasyonuna bağlı olarak hücre canlılığının kontrole göre azaldığı belirlenmiştir. Prouillac ve diğerlerinin 2012 yılında yaptıkları çalışmada, insan trofoblast hücre soyuna (The Bewo) 1, 20, 25, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarda 48 saat süreyle zearalenon uygulanmıştır. 48 saatlik uygulamanın sonucunda 25, 50 ve 100 μM zearalenon dozlarında hücre canlılığının kontrole göre anlamlı bir şekilde azaldığı bildirilmiştir. 2013 yılında Bouaziz ve diğerlerinin (2013) yaptığı çalışmaya göre yeşil maymun böbreğinden izole edilmiş hücrelere (Vero) 5, 20, 40, 60, 80, 100 nM zearalenon 24 saat süreyle uygulanmıştır. 24 saat sonunda yapılan MTT deneyi ile zearalenonun artan konsantrasyonlarının doza bağlı olarak hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir. The Chang karaciğer hücre soyu (CCL 13) ile yapılan *in vitro* bir çalışmada, 0-200 μM konsantrasyon aralığında zearalenonun 24 saat süreyle uygulanması sonucunda, artan zearalenon konsantrasyonlarında hücre canlılığındaki anlamlı azalmanın 150 ve 200 μM zearalenon dozunda gerçekleştiği tespit edilmiştir (Kang ve diğ., 2013).

In vivo olarak yapılan bir çalışmada iki yaşındaki sağlıklı domuzlardan dört hafta aralıklarla alınan semen örnekleri seyreltilerek 125 μM (düşük), 187,5 μM (orta), 250 μM (yüksek) konsantrasyonlarında zearalenon ve α -zearalenon uygulanması sonucunda artan doza ve artan zamana bağlı olarak sperm canlılığının azaldığı gözlemlenmiştir (Tsakmakidis ve diğ., 2006). Yang ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada intraperitoneal yolla farelere yedi gün boyunca 25 $\mu\text{g/kg/va}$, 50 $\mu\text{g/kg/va}$ ve 75 $\mu\text{g/kg/va}$ zearalenon ve α -zearalenol uygulanmıştır. Çalışma sonucunda hem zearalenon hem de α -zearalenol uygulanan gruplarda sperm canlılığının artan doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bildirilmiştir. Boeira ve diğerlerinin 2012 yılında yaptığı bir

çalışmada albino sıçanlara oral olarak 40 mg/kg verilen zearalenonun 48 saat sonra yaptığı etkiler incelenmiştir. Çalışma sonucunda, 48 saat sonrasında canlı spermatozoa sayısında azalma meydana geldiği tespit edilmiştir.

Transforme edilmemiş intestinal hücreler (IPEC-J2) ile yapılan başka bir çalışmada 0, 5, 10, 20 ve 40 μ M zearalenon 48 saat süreyle hücrelere uygulanmış ve deney sonucunda 10 μ M zearalenon uygulanan grupta hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir artma gözlenirken, 40 μ M zearalenonun uygulandığı gruplarda hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Wan ve diğ., 2013). Raghad ve diğerlerinin 2013 yılında yaptıkları bir çalışmada ise, malignant olmayan fare hücre soyuna (L20B) 0,039 ng/ml, 0,078 ng/ml, 0,156 ng/ml, 0,313 ng/ml, 0,625 ng/ml, 1,25 ng/ml ve 2,5 ng/ml zearalenon 24 saat süreyle uygulanmıştır. Deney sonucunda 2,5 ng/ml-0,625 ng/ml konsantrasyonlarında hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir artış saptanmıştır.

Yapılan bu *in vitro* çalışmada, TM3 Leydig hücrelerine zearalenonun 1,2 nM ve 6 nM dozlarının uygulanması sonucunda hücre canlılığının iki dozda da anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Bu veriler ışığında, Minervini ve diğerlerinin 2006 yılında yaptıkları çalışmada, 1×10^{-4} ve 1×10^{-3} dozlarındaki zearalenon konsantrasyonlarının at granüloza hücrelerine uygulanmasıyla hücre canlılığının anlamlı olarak artması, Wan ve diğerlerinin 2013 yılında yaptıkları başka bir çalışmada, IPEC-J2 hücrelerine uyguladıkları 10 μ M zearalenon dozunda hücre canlılığını anlamlı olarak arttırması ile paralellik göstermekle birlikte bunlara ek olarak Raghad ve diğerlerinin 2013 yılında L20B hücreleri ile yaptıkları çalışmada, 0,625 ng/ml ve 2,5 ng/ml aralığındaki tüm dozların hücre canlılığını arttırması yapılan bu çalışmada kullanılan 1,2 nM (0,371 ng/ml) ve 6 nM (1,860 ng/ml) dozlarında hücre canlılığını arttırması ile de paralellik göstermektedir. Yapılan bu çalışmada, TM3 Leydig hücrelerine uygulanan zearalenonun meydana getirdiği artış, çok yüksek olmayan dozlarda zearalenonun östrojenik etkisinden dolayı hücre çoğalmasını pozitif yönde indüklediğini düşündürmektedir.

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyici hücresel yanıt olarak birçok savunma sistemi vardır. Bu savunma sistemlerinden biri olan antioksidan enzimler ROS'un detoksifikasyonundan sorumludurlar ve bu enzimlerin artan aktiviteleri dolaylı olarak ROS üretiminin arttığına işaret eder (Higuchi ve diğ., 2008). Süperoksit dismutaz

(SOD) bu savunma sisteminde yer alan ve süperoksit anyonu ile hidrojen peroksit arasındaki reaksiyonu katalizleyerek moleküler oksijen ve hidrojen peroksit oluşmasını sağlar (Zhang ve diğ., 2007). Boiera ve diğerlerinin 2012 yılında yaptıkları çalışmaya göre, albino farelere 1000 gr vücut ağırlığı başına 40 mg zearalenon uygulanmıştır. 48 saat sonunda alınan karaciğer, böbrek ve testis dokusunda zearalenon uygulanan tüm gruplarda SOD enzimi aktivitesinin anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Ben Salah-Abbes ve diğerlerinin 2009 yaptığı çalışmada ise, 28 gün boyunca erkek farelere 40 mg/kg/va zearalenon uygulanmış ve çalışma sonucunda homojenize edilen testis dokuları, SOD enzim miktarı bakımından incelendiğinde SOD enzimi miktarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Farelere 28 gün boyunca günlük olarak uygulanan 40 mg/kg zearalenonun uygulandığı başka bir çalışmada, karaciğer dokusunda SOD enzim miktarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. (Salah-Abbes ve diğ., 2009). Stadnik ve diğerlerinin 2010 yılında sıçanlarla yaptıkları başka bir çalışmada, ilk gruba 24 saatte tek doz olarak 1, 2, 3 mg/kg, ikinci gruba ise; 10 gün boyunca günde bir defa olmak üzere 50, 100, 200, 500 µg/kg olacak şekilde zearalenon uygulanmıştır. Sonuç olarak, ilk gruptaki karaciğer dokularında SOD enzimi miktarında anlamlı bir değişiklik olmazken, ikinci gruptaki zearalenonun 200 µg/kg ve 500 µg/kg olarak uygulandığı hayvanların karaciğer dokusunda SOD enzimi miktarında anlamlı bir azalma meydana geldiği görülmüştür.

TM3 Leydig hücreleri ile yapılan bu çalışmayla, zearalenonun 1,2 nM ve 6 nM olarak 24 saat süresince uygulandığı gruplarda SOD enzim miktarının anlamlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Boiera ve diğerlerinin yaptığı çalışmadan farklı olarak Ben Salah-Abbes ve diğerlerin (2009), Salah-Abbes ve diğerlerinin (2009)'ın yaptıkları çalışmalar ile de paralellik gösteren bu çalışma, Stadnik ve diğerlerinin (2010) verilerine ek olarak, zearalenonun süperoksit anyonu ile hidrojen peroksit arasındaki reaksiyonu katalizleyerek moleküler oksijen ve hidrojen peroksit oluşumuna yol açtığı ve bunun sonucunda uygulanan düşük dozlarda bile TM3 Leydig hücreleri üzerinde toksik etkisinin olduğunu düşündürmektedir.

Katalaz, hidrojen peroksiti ortadan kaldırmada görev alan antioksidan enzimlerden biridir. Bu enzim iki hidrojen peroksit molekülünü reaksiyona sokarak su ve O₂ oluşumunu sağlar ve genel olarak peroksizomlarda bulunur (Cederbaum ve diğ., 2009).

Ayrıca katalaz enzimi aktivitesi süperoksit radikali tarafından inhibe edilir (Kono ve Fridovich, 1982). Farelere 28 gün boyunca günlük olarak 40 mg/kg zearalenon uygulanan çalışmada, karaciğer dokusunda katalaz enzim miktarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı belirtilmiştir (Salah- Abbes ve diğ., 2009). Ben Salah- Abbes ve diğerlerinin 2009 yılında yaptıkları başka bir çalışmada ise, 28 gün boyunca erkek farelere 40 mg/kg/va zearalenon uygulanması sonucunda homojenize edilen testis dokusu katalaz enzim miktarı bakımından incelendiğinde, kontrole göre anlamlı bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Boeira ve diğerlerinin 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada, albino farelere 40 mg/kg/va zearalenon uygulanmıştır. Deney gruplarından 48 saat sonunda alınarak homojenize edilen karaciğer, böbrek ve testis dokularında katalaz aktivitesindeki değişiklik incelendiğinde, testis ve karaciğer dokularında anlamlı bir farklılık gözlemlenmezken, böbrek dokusundaki katalaz aktivitesinde anlamlı bir artma meydana gelmiştir.

Vero hücreleriyle yapılmış başka bir çalışmada ise, hücrelere 40, 60, 120 μ M zearalenon uygulanmıştır. 24 saat sonunda hücrelerin katalaz enzimi aktivitesi yani hücrede oluşan H_2O_2 miktarının artan doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir (Abid- Essefi ve diğ., 2012).

Bu çalışmadan elde edilen bulgular sonucunda, 24 saat sonunda kontrol grubu ve zearalenonun iki farklı dozu katalaz enzimi miktarı bakımından karşılaştırıldığında kontrol grubu ile 1,2 nM'lık zearalenon dozu arasında anlamlı bir fark gözlemlenmezken, 6 nM'lık zearalenon dozunda kontrole göre anlamlı olarak azalma gözlemlenmesi sonucu *in vivo* olarak Ben Salah Abbes ve diğerleri (2009) ile Salah Abbes ve diğerleri (2009)'nin yaptıkları *in vivo* olarak yaptığı çalışmayla paralellik göstermektedir. Bunlara ek olarak bu çalışma Abid- Essefi ve diğerlerinin 2012 yılında yaptığı *in vitro* çalışma ile de paralellik gösteriyor olup katalaz enzim miktarının azalması, ortamda hidrojen peroksit oluştuğunu (Yıldırım, 2014) ve hidrojen peroksit oluşumu sonrasında ortaya çıkan bu toksisiteyi önlemek için de katalaz enziminin kullandığını göstermektedir.

Glutatyon S-transferaz (GST) substrat olarak GSH'ı kullanan, elektrofilik bileşiklerin ve GPx ile benzer şekilde lipid hidroperoksitlerin detoksifiye edilmesinde rol alan bir hücre içi bir antioksidan enzimdir (Piner, 2009). Salah-Abbes ve diğerlerinin yaptıkları bir

çalışmada, 28 gün boyunca farelere 40 mg/kg zearalenon uygulanmıştır. Çalışma sonucunda ise, homojenize edilen karaciğer dokusunda zearalenon uygulanmış gruptaki GST enzimi miktarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı belirtilmiştir (Salah-Abbes ve diğ., 2009). Boeira ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada ise, albino farelere oral olarak tek doz olmak üzere 40 mg/kg/va zearalenon uygulanmıştır. Sonuç olarak; karaciğer, böbrek ve testis dokusundaki GST enzimi miktarı incelendiğinde, karaciğerdeki GST enzim miktarında anlamlı bir değişiklik olmadığı ancak böbrek ve testis dokularındaki GST enzim miktarının anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, 14 gün boyunca Balb/c farelerine günlük olarak 50, 100, 200 µg/kg/va zearalenon oral yolla uygulanmıştır. Sonuç olarak, homojenize edilen karaciğer dokusunda GST enzimi miktarının artan doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir (Chatopadhyay ve diğ., 2012).

Zearalenonun TM3 Leydig hücreleri üzerindeki toksisitesini araştırmak için yapılmış bu çalışmada ise, uygulanan zearalenon dozlarının (1,2 nM ve 6 nM) GST enzim miktarını anlamlı bir şekilde düşürdüğü tespit edilmiştir. Salah-Abbes ve diğerlerinin (2009), Chatopadhyay ve diğerlerinin (2012) çalışmalarına ek olarak Boeira ve diğerlerinin yaptığı çalışmayla da paralellik gösteren bu çalışma zearalenonun toksisitesine bağlı olarak ortaya çıkan lipid peroksidlerin GST enzimi tarafından detoksifiye edildiğini düşündürmekte ve yine bu toksisiteye bağlı olarak oluşan reaktif ara ürünlerin GST enzimin reaktif bileşiklerin daha az reaktif olan bileşenlere dönüşümünü katalizlediği düşüncesini ortaya çıkarmaktadır.

Glutasyon peroksidaz (GPx), hücredeki hidrojen peroksidin detoksifikasyonunda anahtar rol oynayan bir enzimdir. Glutasyon peroksidaz, glutasyonun indirgeyici gücünü kullanarak hidrojen peroksidin ve doymamış yağlardan meydana gelen organik hidroperoksidlerin deaktivasyonunu katalizler (Fantone ve Ward, 1985; Basaga, 1990). Peroksidlerin indirgenmesini katalizleyen glutasyon peroksidaz enzimi hücredeki indirgenmiş glutasyonu (GSH) yükseltgenmiş glutatona (GSSG) dönüştürmektedir (Frei, 1994; Akkuş, 1995). Glutasyon peroksidaz glutasyonu hidrojen vericisi olarak kullanarak hidrojen peroksiti elimine etmektedir. Bu reaksiyonlar, canlı organizmada oksidatif stresin zararlı etkilerinden hücresel membranları korumaya yarar (Di Mascio ve diğ., 1991). Farelere 28 gün boyunca günlük olarak 40mg/kg zearalenonun

uygulandığı başka bir çalışmada, testis dokusundaki GPx enzim miktarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı belirtilmiştir (Ben Salah-Abbes ve diğ., 2009). Stadnik ve diğerlerinin 2010 yılında farelerle yaptıkları başka bir çalışmada ise, birinci gruba; vücut ağırlığı başına 1, 2, 3 mg/kg olarak zearalenon, ikinci gruba; 10 gün boyunca günde bir defa olmak üzere vücut ağırlığı başına 50, 100, 200, 500 mg/kg zearalenon uygulanmıştır. Çalışma sonucunda karaciğer dokusunda ölçülen GPx enzimi miktarı, birinci grupta anlamlı olarak değişmezken, ikinci gruptaki zearalenonun 500 µg/kg olarak uygulandığı gruplarda anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır.

Yapılan bu çalışmada ise, TM3 Leydig hücrelerinde zearalenonun GPx enzim miktarında 6 nM dozunda meydana getirdiği anlamlı azalma, Ben Salah-Abbes ve diğerlerinin (2009) çalışmalarındaki GPx enzim miktarlarındaki anlamlı azalmayla, Stadnik ve diğerlerinin 2010 yılında yaptıkları çalışmanın ikinci grubunda yüksek doz olarak (200 µg/kg/va ve 500 µg/kg/va) farelere uygulanan zearalenon dozunun 24 saat sonunda karaciğer dokusunda meydana getirdiği GPx enzim miktarındaki anlamlı azalmaya da benzerlik gösteriyor olup meydana gelen bu azalmanın zearalenonun düşük dozlarda bile TM3 Leydig hücreleri üzerindeki toksik etkisinden dolayı hücrede meydana getirdiği lipid peoksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerin metabolizmasını sağlamada ve bu toksisiteyi ortadan kaldırmada GPx enzimini kullandığını düşündürmektedir.

Başta karaciğer olmak üzere pek çok dokuda yüksek düzeylerde bulunan glutatyon (GSH), glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir tripeptittir. Glutatyon, GST ve GPx enzimleri tarafından substrat olarak kullanılarak okside glutatyon (GSSG)'a yükseltgenir ve daha sonra NADPH'ı elektron kaynağı olarak kullanan GR enzimi ile yeniden GSH'a indirgenir. GSH düzeyindeki değişimler canlının detoksifikasyon yeteneğinin önemli bir indikatörü olabilir. Glutatyon oksijen radikali yakalayıcı olarak antioksidan savunmada önemlidir (Durmaz Bekmezci, 2010) Zearalenonun yapılan çalışmalarla hücre içi GSH düzeylerini azalttığı ve bir kofaktör olarak GSH gerektiren çeşitli enzimleri inhibe ettiği belirtilmiştir. GSH düzeylerindeki bu zearalenona bağlı düşüşe, diğer antioksidan enzim miktarlarının azalmasının ve ROS üretiminin aşırı artmasının neden olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Hassen ve diğ., 2007; Salah-Abbes ve diğ., 2008; Chatopadhyay ve diğ., 2012; Lee ve diğ., 2013). Salah-

Abbes ve diğerlerinin 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada, farelere 10 gün boyunca oral olarak vücut ağırlığı başına 40 mg/kg zearalenon uygulanmıştır. 10 günlük çalışma sonunda homojenize edilen karaciğer ve böbrek dokusunda zearalenonun uygulanan gruplarda kontrole göre anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir. Farelere 28 gün boyunca günlük olarak uygulanan 40 mg/kg zearalenonun uygulandığı başka bir çalışmada, karaciğer dokusunda glutatyon enzim miktarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. (Salah- Abbas ve diğ., 2009). Hassen ve diğerlerinin 2007 yılında insan karaciğer kanser hücre soyu olan HepG2 hücreleriyle yaptığı bir çalışmada ise, hücrelere 10, 50, 75, 100, 150, 200 µg zearalenon uygulanmış ve hücrelerin 3. ve 24. saatte glutatyon enzimi miktarı ölçülmüştür. Çalışma sonucunda, glutatyon enzim miktarının artan zamana ve doza bağlı olarak azalma gösterdiği belirlenmiştir. 2013 yılında CCL 13 (The Chang karaciğer hücre soyu) hücre soyuyla yapılmış bir çalışmada, hücrelere artan dozlarda (10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM ve 200 µM) zearalenon uygulanmıştır. Çalışma sonucunda, glutatyon miktarının 25 µM ve 200 µM dozları arasında kontrole göre anlamlı olarak azaldığı saptanmış ve en yüksek doz olan 200 µM dozundaki azalmanın %71,1 oranında olduğu belirlenmiştir. (Lee ve diğ., 2013).

Zearalenonun TM3 Leydig hücreleri üzerindeki toksik etkisini saptamak için yapılmış bu çalışmada ise, uygulanan 1,2 nM dozu glutatyon miktarında anlamlı bir farklılık oluşturmazken, 6 nM dozunda ise anlamlı bir azalma meydana getirmiştir. Bu bilgiler ışığında bu çalışma bugüne kadar yapılmış hem *in vivo* (Salah Abbas ve diğ., 2008; Salah Abbas ve diğ., 2009) hem de *in vitro* çalışmalarla (Hassen ve diğ., 2007; Lee ve diğ., 2013) paralellik gösteriyor olup bu bilgilere ek olarak zearalenonun serbest radikaller ve peroksitlerin oluşumu sonucunda onlarla reaksiyona girerek oksidatif hasar karşı koruduğu ayrıca sülfidril (-SH) gruplarını redükte tutarak bu grupları oksidasyona karşı koruduğu düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Bunlara ek olarak, düşük zearalenonun düşük dozlarda bile kofaktör olarak GSH gerektiren GST ve GPx gibi enzimlerin aktivitelerini inhibe ettiğini düşündürmektedir.

Yapılan bu çalışmanın sonuçlarına göre, zearalenonun hücre içi non enzimatik bir antioksidan olan glutatyonun miktarını azaltması ve yine hücre içi enzimatik antioksidanlardan olan SOD, CAT, GPx, GST gibi enzimlerin miktarlarını azaltması

TM3 Leydig hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açtığı ve oksidatif hasar oluşturduğu düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Bunlara ek olarak uygulanan düşük dozlarda (1,2 nM ve 6 nM) zearalenonun hücre canlılığında anlamlı olarak artma meydana getirmesi zearalenonun düşük dozlarda östrojenik bir metabolit olmasından dolayı hücre çoğalmasını pozitif yönde indüklediği düşüncesini ortaya çıkarmıştır.

KAYNAKLAR

- Abid-Essefi, S., Baudrimont, I., Hassen, W., Ouanes, Z., Mobio, T. A., Anane, R., Creppy, E. E. and Bacha, H., 2003, DNA fragmentation, apoptosis and cell cycle arrest induced by zearalenone in cultured DOK, Vero and Caco-2 cells: prevention by Vitamin E, *Toxicology*, 192, 237-248.
- Abid-Essefi, S., Ouanes, Z., Hassen, W., Baudrimont, I., Creppy, E. and Bacha, H., 2004, Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone, *Toxicology in vitro*, 18, 467-474.
- Abid-Essefi, S., Zaied, C., Bouaziz, C., Salem, I. B., Kaderi, R. and Bacha, H., 2012, Protective effect of aqueous extract of *Allium sativum* against zearalenone toxicity mediated by oxidative stress, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64, 689-695.
- Akkuş, D., 1995, Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, *Konya Mimoza Yayınları*, (1.Baskı), 1-84.
- Amaral, S., Amaral, A. and Ramalho-Santos, J., 2012, Aging and male reproductive function: a mitochondrial perspective, *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 5, 181-197.
- Ayed, Y., Ayed-Boussema, I., Ouanes, Z. and Bacha, H., 2011, In vitro and in vivo induction of chromosome aberrations by alpha-and beta-zearalenols: Comparison with zearalenone, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726, 42-46.
- Basaga, H.S., 1990, Biochemical Aspects of Free Radicals, *Biochemistry and Cell Biology*, 68: 989-998.
- Basmacıoğlu, H. and Ergül, M., 2003, Yemlerde bulunan toksinler ve kontrol yolları, *Hayvansal Üretim*, 44, 9-17.
- Bennett, J.W., and Klich, M., 2003, Mycotoxins, *Clinical Microbiology*, 16,497-516.
- Ben Salah-Abbès, J., Abbès, S., Abdel-Wahhab, M. A. and Oueslati, R., 2009, Raphanus sativus extract protects against Zearalenone induced reproductive toxicity, oxidative stress and mutagenic alterations in male Balb/c mice, *Toxicon*, 53, 525-533.
- Benzoni, E., Minervini, F., Giannoccaro, A., Fornelli, F., Vigo, D. and Visconti, A., 2008, Influence of in vitro exposure to mycotoxin zearalenone and its derivatives on swine sperm quality, *Reproductive Toxicology*, 25, 461-467.

- Blunden, G., Roch, O., Rogers, D., Coker, R., Bradburn, N. and John, A., 1991, Mycotoxins in food. *Medical laboratory sciences*, 48, 271-282.
- Bremmer, W.J., 1981, The testis, the testis, Burger H, de Kretser D (Eds) Raven Press, New York, 1-5.
- Bryden, W.L., 2007, Mycotoxins in the food chain: human health implications, Asia Pacific *Journal of Clinical Nutrition*, 16, 95-101.
- Boeira, S. P., Del'fabbro, L., Freire Royes, L. F., Jessé, C. R., Oliveira, M. S. and Furian, A. F., 2012, Possible role for glutathione-S-transferase in the oligozoospermia elicited by acute zearalenone administration in Swiss albino mice, *Toxicon*, 60, 358-366.
- Bottalico, A., Logrieco, A. and Visconti, A., 1989, Fusarium species and their mycotoxins in infected corn in Italy, *Mycopathologia*, 107, 85-92.
- Bouaziz, C., Bouslimi, A., Kadri, R., Zaied, C., Bacha, H. and Abid-Essefi, S., 2012, The in vitro effects of zearalenone and T-2 toxins on Vero cells, *Experimental and Toxicologic Pathology*.
- BräSe, S., Encinas, A., Keck, J. and Nising, C. F., 2009, Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites, *Chemical reviews*, 109, 3903-3990.
- Burçak, G. and Andican, G., 2004, Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa Journal of Medicine*, 35, 159-169.
- CAST, 2003, Mycotoxin: risk in plant, animal and human system, Council of Agricultural Science and Technology, Task fore rep. No:139; CAST, Ames IA.
- Castells, M., Marin, S., Sanchis, V. and Ramos, A., 2005, Fate of mycotoxins in cereals during extrusion cooking: a review, *Food additives and contaminants*, 22, 150-157.
- Cederbaum, A. I., Lu, Y. and Wu, D., 2009, Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury, *Archives of toxicology*, 83, 519-548.
- Chatopadhyay, P., Pandey, A., Chaurasia, A. K., Upadhyay, A., Karmakar, S. and Singh, L., 2012, Hepatic hyperplasia and damages induces by zearalenone Fusarium mycotoxins in BALB/c mice, *Arquivos de Gastroenterologia*, 49, 77-81.
- Christensen, A., 1975, Leydig cells, *Handbook of physiology*, 5, 57-94.
- Dalcero, A., Magnoli, C., Chiacchiera, S., Palacios, G. and Reynoso, M., 1997, Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina, *Mycopathologia*, 137, 179-184.
- Delibaş, N., 1995, Özçankaya R., Serbest radikaller, *SDÜ Tıp Faültesi.Dergisi*, 2, 11-7.

- Demircan, G., Dıraman, E. and Demircan, S., 2005, Kalp hastalıklarında oksidatif stresin rolü, *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi*, 33, 488-492.
- Desjardins, A. E., 2006., Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics, and biology, *American Phytopathological Society (APS Press)*.
- Dhillon, S. and Gill, K., 2006, Basic pharmacokinetics, *Clinical Pharmacokinetics*, 1-44.
- Di Mascio, P., Murphy, M. E. and Sies, H., 1991, Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols, *The American journal of clinical nutrition*, 53, 194S-200S.
- Diplock, A. 1998. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, 59 p., Belgium.
- Döll, S. and Dänicke, S., 2011, The Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding, *Preventive veterinary medicine*, 102, 132-145.
- Durmaz Pekmezci H, 2010, Aşağı Seyhan Ovası Drenaj Sistemlerindeki Kirlilik Etmenlerinin *Clarias gariepinus*'da toksik etkileri, Doktora Tezi Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Duthie, G., Wahle, K. and James, W., 1989, Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease, *Nutrition research reviews*, 2, 51-62.
- EFSA, 2011, Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain, EFSA Journal, 9(6), 2197.
- Ellman, G. L., 1959, Tissue sulfhydryl groups, *Archives of biochemistry and biophysics*, 82, 70-77.
- Ergün, Ö., 1992, Ülkemizde tüketilen enzim immünolojik test çubukları metodu ile zearalenon ve aflatoxin B1 kalıntıları yönünden incelenmesi, *Gıda* 17(6),409-412.
- Fantone, J.C.and Ward, P. A., 1985, Polymorphonuclear Leucocyte Mediated and Tissue Injury, *Human Pathology*, 16: 973-978.
- FAO, Food and nutrition paper manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevent and control, 1999 Rep. No.: 73, Rome.
- Fawcett, D. And Bloom, R. E., 1994, Fawcett: A Text Book Of Histology, *WB Saunders Company*.
- Fawcett, D. W., Neaves, W.B. ind FLORES, M. N., 1973, Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis, *Biology of reproduction*, 9, 500-532.

- FDA, Food and Drug Administration (1979), Conference on Mycotoxins in animal Feeds and Grains Related to Animal Health, June,8, Rockville, Maryland.
- Fink-Grenmels, J., 1999, Mycotoxins: their implications for human and animal health, *Veterinary Quarterly*, 21, 115-120.
- Frei, B., 1994, Reactive Oxygen Species and Antioxidants Vitamins Mecanism of Action, *The American Journal of Medicine*, 97: 5-13.
- Gajęcka, M., Rybarczyk, L., Zwierzchowski, W., Jakimiuk, E., Zielonka, Ł., Obremski, K. and Gajęcki, M., 2011, The effect of experimental, long-term exposure to low-dose zearalenone mycotoxicosis on the histological condition of ovaries in sexually immature gilts, *Theriogenology*, 75, 1085-1094.
- Gajęcki, M., 2002, Zearalenone--undesirable substances in feed, *Polish journal of veterinary sciences*, 5, 117.
- Gajęcki, M., Gajęcka, M., Jakimiuk, E., Zielonka, Ł. and Obremski, K., 2010, Zearalenone: Undesirable Substance, Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons, *Springer*.
- Gartner, L. P. and Hiatt, J. L., 2001, Colour textbook of histology, *London: WB Saunders*.
- Gazzah, A. C., Camoin, L., Abid, S., Bacha, H. and Ladjimi, M., 2013, ITRAQ: a method to elucidate cellular responses to mycotoxin zearalenone, *Journal of Applied Toxicology*, 33, 566-575.
- Girgin, G., Başaran, N. and Şahin, G., 2001, Dünyada ve Türkiye’de insan sağlığını tehdit eden mikotoksinler, *Mycotoxins in Turkey and the World, Türk Hijyen ve Deneyisel Biyoloji Dergisi*, 58, 97-118.
- Gökpinar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T. and Durmaz, Y., 2006, Algal antioksidanlar, *EÜ Su Ürünleri Dergisi*, 85-89.
- Gromadzka, K., Waskiewicz, A., Chelkowski, J. and Golinski, P., 2008., Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines, *World Mycotoxin Journal*, 1, 209-220.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. Jakoby, W.B., 1974, Glutathione-S-transferase. the first enzymatic step in mercapturic acid formation, *The Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130-7139.
- Hafeman, D.G., Sunde, R.A., Hoekstra, W.G., 1974, Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat, *Journal of Nutrition*, 104, 580-587.
- Haider, S., Passia, D. And Overmeyer, G., 1986, Studies on the fetal and postnatal development of rat Leydig cells employing 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity, *Acta histochemica. Supplementband*, 32, 197.

- Haider, S. G., 2004, Cell biology of Leydig cells in the testis, *International review of cytology*, 233, 181-241.
- Halliwell, B. and Chirico, S., 1993, Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance, *The American journal of clinical nutrition*, 57, 715S-724S.
- Hassen, W., Ayed-Boussema, I., Oscoz, A. A., De Cerain Lopez, A. and Bacha, H., 2007, The role of oxidative stress in zearalenone-mediated toxicity in Hep G2 cells: oxidative DNA damage, glutathione depletion and stress proteins induction, *Toxicology*, 232, 294-302.
- Haşimi, N., 2006, Bazı Bitki Ekstraktlarının Adriyaminin Uygulanan Piliç Embriyosunun Göz ve Kalp Kası Üzerindeki Antioksidan Etkileri, Harran Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Urfa.
- Higuchi, C. T., Pavan, F. R., Leite, C. Q. F., Sannomiya, M., Vilegas, W., Leite, S. R. D. A., Sacramento, L. V. S. and Sato, D. N., 2008, Triterpenes and antitubercular activity of *Byrsonima crassa*, *Quimica Nova*, 31, 1719-1721.
- Hou, Y. J., Xiong, B., Zheng, W. J., Duan, X., Cui, X. S., Kim, N. H., Wang, Q., Xu, Y. X. and Sun, S. C., 2013, Oocyte quality in mice is affected by a mycotoxin-contaminated diet, *Environmental and molecular mutagenesis*.
- Huang, L., Zheng, N., Zheng, B., Wen, F., Cheng, J., Han, R., Xu, X., Li, S. and Wang, J. 2014. Simultaneous determination of aflatoxin M₁, ochratoxin A, zearalenone and α -zearalenol in milk by UHPLC–MS/MS. *Food chemistry*, 146, 242-249.
- Janssen, M., Put, H. and Nout, M., 1997, Natural toxins, *Food Safety and Toxicology*, CRC Press, USA.
- Junqueira, L. and Carneiro, J., 2003, Basic Histology: Text and Atlas. 9th Edn., *McGraw-Hill Companies*. USA.
- Kang, C., Lee, H., Yoo, Y. S., Hah, D. Y., Kim, C. H., Kim, E. and Kim, J. S., 2013, Evaluation of Oxidative DNA Damage Using an Alkaline Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) Comet Assay, and the Protective Effects of N-Acetylcysteine Amide on Zearalenone-induced Cytotoxicity in Chang Liver Cells, *Toxicological Research*, 29, 43-52.
- Kaya, S., 1998, Mikotoksinler ve mikotoksin zehirlenmeleri, In. *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji*, 1, 341-375.
- Kierszenbaum, A.L., 2006, *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*, Özkan Matbaacılık Gazetecilik San. Tic. Ltd. Şti, Ankara, 0-323-01639-1.
- Kim, I. H., Son, H. Y., Cho, S. W., Ha, C. S. and Kang, B. H., 2003, Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats, *Toxicology letters*, 138, 185-192.

- Kono, Y. and Fridovich, I., 1982, Superoxide radical inhibits catalase, *Journal of Biological Chemistry*, 257, 5751-5754.
- Kouadio, J. H., Mobio, T. A., Baudrimont, I., Moukha, S., Dano, S. D. and Creppy, E. E., 2005, Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2, *Toxicology*, 213, 56-65.
- Krogh, P., 1987, Mycotoxins in food, *Academic press limited harcourt brace javanovich*, Copenhagen.
- Kiiper-Goodman, T., Scott, P. and Watanabe, H., 1987, Risk assessment of the mycotoxin zearalenone, *Regulatory toxicology and pharmacology*, 7, 253-306.
- Lee, H., Kang, C., Yoo, Y.-S., Hah, D.-Y., Kim, C. H., Kim, E. and Kim, J. S., 2013, Cytotoxicity and the induction of the stress protein Hsp 70 in Chang liver cells in response to zearalenone-induced oxidative stress, *Environmental toxicology and pharmacology*, 36, 732-740.
- Li, N., Hao, M., Phalen, R. F., Hinds, W. C. and Nel, A. E., 2003, Particulate air pollutants and asthma: a paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects, *Clinical Immunology*, 109, 250-265.
- Liu, G., Han, Z., Nie, D., Yang, J., Zhao, Z., Zhang, J., Li, H., Liao, Y., Song, S. and De Saeger, S., 2012, Rapid and sensitive quantitation of zearalenone in food and feed by lateral flow immunoassay, *Food Control*, 27, 200-205.
- López-Casas, P. P., Mizrak, S. C., López-Fernández, L. A., Paz, M., De Rooij, D. G. and Del Mazo, J., 2012, The effects of different endocrine disruptors defining compound-specific alterations of gene expression profiles in the developing testis, *Reproductive Toxicology*, 33, 106-115.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Magre, S. and Jost, A., 1979, The initial phases of testicular organogenesis in the rat, An electron microscopy study. *Archives d'anatomie microscopique et de morphologie experimentale*, 69, 297-318.
- Marin, D. E., Pistol, G. C., Neagoe, I. V., Calin, L. and Taranu, I., 2013, Effects Of Zearalenone On Oxidative Stress And Inflammation In Weanling Piglets, *Food and Chemical Toxicology*.
- Marin, D. E., Taranu, I., Burlacu, R. and Tudor, D. S., 2010, Effects of zearalenone and its derivatives on the innate immune response of swine, *Toxicon*, 56, 956-963.
- Marklund, S. and Marklund, G., 1974, Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *European Journal of Biochemistry*, 47, 469-474.

- Minervini, F. and Dell'aquila, M. E., 2008, Zearalenone and reproductive function in farm animals, *International journal of molecular sciences*, 9, 2570-2584.
- Minervini, F., Giannoccaro, A., Fornelli, F., Dell'aquila, M. E., Minoia, P. and Visconti, A., 2006, Influence of mycotoxin zearalenone and its derivatives (alpha and beta zearalenol) on apoptosis and proliferation of cultured granulosa cells from equine ovaries, *Reprod. Biol. Endocrinol*, 4, 62-75.
- Mitterbauer, R., Weindorfer, H., Safaie, N., KRSKA, R., LEMMENS, M., RUCKENBAUER, P., KUCHLER, K. and Adam, G., 2003, A sensitive and inexpensive yeast bioassay for the mycotoxin zearalenone and other compounds with estrogenic activity, *Applied and environmental microbiology*, 69, 805-811.
- Mobarak, Y. M., 2007, Impacts of Three Naturally Occurring Mycotoxins (Aflatoxins, Ochratoxins And Zearalenone) On The Embryonic Development Of Vertebrates, *Egyptian Journal of Natural Toxins*, 4, 108-131.
- Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of immunological methods*, 65, 55-63.
- Mruk, D. D. and Cheng, C. Y., 2004, Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis, *Endocrine reviews*, 25, 747-806.
- Muñoz, E. M., Fogal, T., Dominguez, S., Scardapane, L. and Piezzi, R. S., 2001, Ultrastructural and morphometric study of the Sertoli cell of the viscacha (*Lagostomus maximus maximus*) during the annual reproductive cycle, *The Anatomical Record*, 262, 176-185.
- Nones, J. and Scussel, V., 2013, Zearalenone, metabolites and their effects on swine reproductive performance: a review, *PUBVET*, 7.
- Olsen, M., 1989, Metabolism of zearalenone in farm animals, *Topics in Secondary Metabolism (Netherlands)*, no. 2 p., 167-177.
- Penning, T. M., Jin, Y., STECKELBROECK, S., Lanišnik Rižner, T. and Lewis, M., 2004, Structure–function of human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases: genes and proteins, *Molecular and cellular endocrinology*, 215, 63-72.
- Piner, P., 2009, Lambda-cyhalothrinin *Oreochromis niloticus*'da karaciğerde piperonil bütoksit modülatörlüğünde oksidatif stres potansiyelinin belirlenmesi, stres proteinleri ve apoptozis üzerine etkileri, Doktora Tezi Biyoloji Anabilim Dalı, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Prouillac, C., Koraichi, F., Videmann, B., Mazallon, M., Rodriguez, F., Baltas, M. and Lecoœur, S., 2012, In vitro toxicological effects of estrogenic mycotoxins on human placental cells: Structure activity relationships, *Toxicology and applied pharmacology*, 259, 366-375.

- Puntarulo, S. and Cederbaum, A. I., 1988, Effect of oxygen concentration on microsomal oxidation of ethanol and generation of oxygen radicals, *Biochemical journal*, 251, 787-794.
- Raghad, D.H., Jahlill, A., Shafiq, S. H. and Hussein, H.Z., 2013, Comparison the cytotoxicity of aflatoxin B1 and zearalenone in L20B cells, *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences*, 3 (1), 104-113.
- Richard, J. L., 2007, Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—an overview, *International journal of food microbiology*, 119, 3-10.
- Saez, J. M., 1994, Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation, *Endocrine reviews*, 15, 574-626.
- Sabuncuoğlu, S. A., Baydar, T., Giray, B. and Şahin, G., 2008. Mikotoksinler: toksik etkileri, degradasyonları, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması, *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 28 (1), 63-92.
- Salah-Abbès, J. B., Abbès, S., Ouane, Z., Houas, Z., Abdel-Wahhab, M. A., Bacha, H., and Oueslati, R., 2008, Tunisian radish extract (*Raphanus sativus*) enhances the antioxidant status and protects against oxidative stress induced by zearalenone in Balb/c mice, *Journal of Applied Toxicology*, 28, 6-14.
- Salah-Abbès, J. B., Abbès, S., Haous, Z. and Oueslati, R., 2009, *Raphanus sativus* extract prevents and ameliorates zearalenone-induced peroxidative hepatic damage in Balb/c mice, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61, 1545-1554.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S. and Frisvad, J. C., 2004, Introduction to food-and airborne fungi, *Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)*.
- Scudamore, K. A. and Livesey, C. T., 1998, Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 1-17.
- Scudamore, K. A. and Patel, S., 2000, Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom, *Food Additives ve Contaminants*, 17, 407-416.
- Shephard, G. S., 2008, Risk assessment of aflatoxins in food in Africa, *Food additives and contaminants*, 25, 1246-1256.
- Shimoda, W., 1980, Conference on Mycotoxins in Animal Feeds and Grains Related to Animal Health, June 13, 1980, *Food and Drug Administration*.
- Shin, B. S., HONG, S. H., Bulitta, J. B., HWANG, S. W., KİM, H. J., LEE, J. B., YANG, S. D., KİM, J. E., YOON, H. S. and Kim, D. J., 2009, Disposition, oral bioavailability, and tissue distribution of zearalenone in rats at various dose levels, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72, 1406-1411.

- Sinha, A. K., 1972, Colorimetric assay of catalase, *Analytical biochemistry*, 47, 389-394.
- Sivrikaya, A., 2007. Sağlıklı Kişilerde ve Koroner Kalp Hastalarında Bitki Sterolleri, Total Antioksidan Kapasite (Tas), Okside Ldl (Ox-Ldl) ve Homosistein Düzeylerinin Araştırılması. Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Tıp) Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Konya.
- Sørensen, L. and Elbæk, T., 2005, Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of chromatography B*, 820, 183-196.
- Stadnik, A., Wojtowicz-Chomicz, K. and Borzęcki, A., 2010, Influence of zearalenone on Free radical reactions in rat liver cells, *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 54, 611-615.
- Steyn, P., 1998, The biosynthesis of mycotoxins, *Revue de médecine vétérinaire*, 149, 469-478.
- Stocco, D., 1999, An update on the mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein, *Experimental and clinical endocrinology ve diabetes*, 107, 229-235.
- Stocco, D. M. and Clark, B. J., 1996, Regulation of the Acute Production of Steroids in Steroidogenic Cells, *Endocrine reviews*, 17, 221-244.
- Şimşek, F., 1999, Serbest Oksijen Radikalleri, Antioksidanlar ve Lipit Peroksidasyonu, *Türkiye Klinikleri Pediatri Dergisi*, 8, 42.
- Tiemann, U. and Dänicke, S., 2007, In vivo and in vitro effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: a review, *Food additives and contaminants*, 24, 306-314.
- Topal S., 1993, Gıdalarda Küf Kontaminasyon Riskleri Ve Önlemleri (124), Kocaeli: Tübitak-Mam Press, 174–187.
- Tsakmakidis, I., LYMBEROPOULOS, A., ALEXOPOULOS, C., BOSCO, C. and Kyriakis, S., 2006, In vitro Effect of Zearalenone and α -Zearalenol on Boar Sperm Characteristics and Acrosome Reaction, *Reproduction in Domestic Animals*, 41, 394-401.
- Türk Gıda Kodeksi, 2008, Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ (Tebliğ No: 2008 / 26), *Resmi Gazete*.
- Vesely, D. and Vesela, D., 1995, Embryotoxic effects of a combination of zearalenone and vomitoxin (4-dioxynivalenole) on the chick embryo, *Veterinární medicína*, 40, 279.
- Wan, L. Y. M., Turner, P. C. and EL-Nezami, H., 2013, Individual and combined cytotoxic effects of Fusarium toxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and

- fumonisin B1) on swine jejunal epithelial cells, *Food and Chemical Toxicology*, 57, 276-283.
- Wang, D., Zhang, N., Peng, Y. and Qi, D., 2012, Interaction of zearalenone and soybean isoflavone in diets on the growth performance, organ development and serum parameters in prepubertal gilts, *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 96, 939-946.
- Wei, Y.-H., Pang, C.-Y., 2005. The role of mitochondria in the human ageing process. National Health Research Institutes (NHRI-EX93-9120BN), Taiwan (Republic of China).
- Willcox, J. K., Ash, S. L. and Catignani, G. L., 2004, Antioxidants and prevention of chronic disease, *Critical reviews in food science and nutrition*, 44, 275-295.
- Yang, J., Zhang, Y., Wang, Y. and Cui, S., 2007a, Toxic effects of zearalenone and α -zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells, *Toxicology in vitro*, 21, 558-565.
- Yang, J. Y., Wang, G. X., Liu, J. L., Fan, J. J. And Cui, S., 2007b. Toxic effects of zearalenone and its derivatives α -zearalenol on male reproductive system in mice, *Reproductive Toxicology*, 24, 381-387.
- Yiannikouris, A. and Jouany, J.-P., 2002, Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review, *Animal Research*, 51, 81-100.
- Yıldırım, G., 2014 (Yayınlanmamış), Zearalenonun TM3 Leydig hücreleri üzerinde oksidatif etkisi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Young, I. and Woodside, J., 2001, Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 54, 176-186.
- Zhang, M., Wang, A., He, W., He, P., Xu, B., Xia, T., Chen, X. and Yang, K. 2007, Effects of fluoride on the expression of NCAM, oxidative stress and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons, *Toxicology*, 236, 208-216.
- ZHU, L., YUAN, H., GUO, C., LU, Y., DENG, S., YANG, Y., WEI, Q., WEN, L. and HE, Z., 2012, Zearalenone induces apoptosis and necrosis in porcine granulosa cells via a caspase-3-and caspase-9-dependent mitochondrial signaling pathway, *Journal of cellular physiology*, 227, 1814-1820.
- ZiNEDiNE, A., SORiANO, J. M., MOLTO, J. C. and MANES, J., 2007, Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin, *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1-18.
- Zwierzchowski, W., Obremski, K., Zielonka, Ł., SKORSKA-WYSZYŃSKA, E., GAJECKA, M., Jakimiuk, E., POLAK, M., JANA, B., RYBARCZYK, L. and Gajewski, M., 2006, The impact of zearalenone on the level of the selected

estrogens in blood serum of sexually immature gilts, *Polish journal of veterinary sciences*, 9, 247.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Mine Celep
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	31.07.1990, Osmangazi
Telefon	05386199417
e-mail	minecelep@gmail.com

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoloji Anabilim Dalı / Zooloji Programı	2014
Lisans	İstanbul Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2012
Lise	Turhan Tayan Anadolu Lisesi	2008