

Review article

Okratoksin A'nın Fiziksel, Kimyasal Özellikleri ve Sinyal Yolakları Üzerine Etkileri

Physical, Chemical Properties of Ochratoxin A and Its Effects on Signal Pathways

Fevziye Özdemir Şimşek ^{a,*} & Nurten Özçelik ^a

^aDepartment of Medical Biology, School of Medicine, University of Süleyman Demirel, Isparta, Turkey

Özet

Okratoksin A (OTA), 1965 yılında *Aspergillus ochraceus* suşlarının ikincil metaboliti olarak keşfedilmiştir. OTA başlıca *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* ve *Aspergillus carbonarius* küf mantarı türleri tarafından üretilen bir mikotoksindir. Okratoksin A, rensiz, suda az ancak sulu sodyum bikarbonatlı çözeltilerde iyi çözünen, zayıf organik asit gibi davranan, kristal toz halinde bir bileşiktir. Isıya karşı oldukça dirençlidir. Işık ve havaya dayanıklı olmayıp, nemli ve güneş ışığı gibi koşullara maruz kaldığı zaman bozulabilir.

OTA'nın doğal kontaminasyon dozlarının seçici olarak böbrekleri ve böbrek fonksiyonlarını etkilediği, bunun yanı sıra karaciğer, immün sistem ve beyin hücrelerinin de OTA'nın olası hedefleri olduğu gösterilmiştir. OTA'nın böbrek, karaciğer ve beyin gibi bazı dokularda hasara yol açtığı tespit edildiği görülmektedir. Genel olarak, non-genotoksik karsinojenler sınır etki üreten maddeler olarak düşünülmektedir. Karsinojenlerin non-genotoxic mekanizmalarından dolayı DNA üzerine direkt kimyasal bir etki içermemektedir, daha çok hedef hücreler üzerine ya da hücre dışı matris üzerine kanserojen etkiler gösterdikleri düşünülmektedir. OTA serbest radikal oluşturarak lipid peroksidasyonuna neden olur ve toksisitesini ortaya çıkarır. OTA'nın sinyal yolakları üzerine yapılan çalışma sonucunda JNK ve p38 aktivasyonunu teşvik ettiği ortaya koyulmuştur.

Derlemede Okratoksin A'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri, sinyal yolakları ve hedef doku-organlarda etkilerinin incelenmesi ve genel literatürün tartışılması amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Okratoksin A; Sinyal Yolakları; Hedef Organ; Böbrek.

Abstract

Ochratoxin A (OTA) was discovered in 1965 as a secondary metabolite of *Aspergillus ochraceus* strains. OTA is a mycotoxin produced mainly by the species *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius*. Ochratoxin A is a colourless, crystalline powder compound that is slightly water-soluble but well soluble in aqueous sodium bicarbonate solutions, behaving like a weak organic acid. It is very resistant to heat. It is not resistant to light and weather. It can deteriorate when exposed to conditions such as humid and sunlight.

* Corresponding author:

Fevziye Özdemir Şimşek is an PhD Student and research assistant in the Department of Medical Biology at Süleyman Demirel in Isparta, Turkey. Her research interests include the Medical Biology and Genetics. She has studied in Aydın at Adnan Menderes University, Science Technology Research and Application Center, Aydın, Turkey.
Email: fevziyeozdemirr@gmail.com

It has been shown that natural contamination doses of OTA selectively affect kidneys and kidney functions, as well as liver, immune system and brain cells as possible targets of OTA. It is observed that OTA causes damage to some tissues such as kidney, liver and brain. Generally, non-genotoxic carcinogens are considered to be borderline effects. Carcinogens do not have a direct chemical effect on DNA due to their non-genotoxic mechanisms, they are thought to have carcinogenic effects on target cells or extracellular matrix. OTA creates free radicals, causing lipid peroxidation and revealing its toxicity. As a result of the study on signalling pathways of OTA, it has been revealed that it promotes JNK and p38 activation.

In the review, it is aimed to examine the physical and chemical properties of Ochratoxin A, signals pathways and its effects on target tissues-organs and to discuss the general literature.

Keywords: Ochratoxin A; Signal Pathways; Target Organ; Kidney.

Received: 19 December 2020 * **Accepted:** 30 December 2020 * **DOI:** <https://doi.org/10.29329/jiam.2020.299.5>

GİRİŞ

Canlı organizmaya (insan ve sıcak kanlı hayvanlara) ağız, solunum, deri ve enfeksiyon yolu ile girdiğinde normal fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmaları bozan veya canlının ölümüne sebep olan kimyasal maddelere toksik madde denilmektedir. Küfler, uygun koşullarda ham ve işlenmemiş materyalde çoğalarak bir yandan ürünün nitelik ve niceliğini değiştirip bozulmasına neden olmakta, diğer yandan da insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere sahip toksik maddeleri oluşturmaktadırlar. Oluşan bu ürünler, mikotoksin olarak adlandırılan, son derece toksik, çoğu nefrotoksik, hepatotoksik, kanserojen, mutajenik, teratojenik ve immünosupresif maddelerdir(Sabuncuoğlu, Baydar et al. 2008, Vettorazzi, van Delft et al. 2013). Mikotoksinler bazı küflerin gıda ve yemlerde gelişmeleri sonucunda oluşan düşük molekül ağırlıklı ikincil metabolitlerdir. Mikotoksin üreticisi olduğu bilinen 350'den fazla küf bulunmakta ve bunlara ek olarak her yıl yeni toksin üreticisi küflerin varlığı belirlenmektedir(Lobeau, De Saeger et al. 2005, Amezcua, González-Peñas et al. 2008). En önemli mikotoksinler olarak, Aspergillus türleri tarafından oluşturulan aflatoksinler, Aspergillus ve Penicillium türleri tarafından oluşturulan OTA ve patulin, Fusarium cinsine bağlı küfler tarafından üretilen toksinler olarak kabul edilmektedir(Krska and Molinelli 2007).

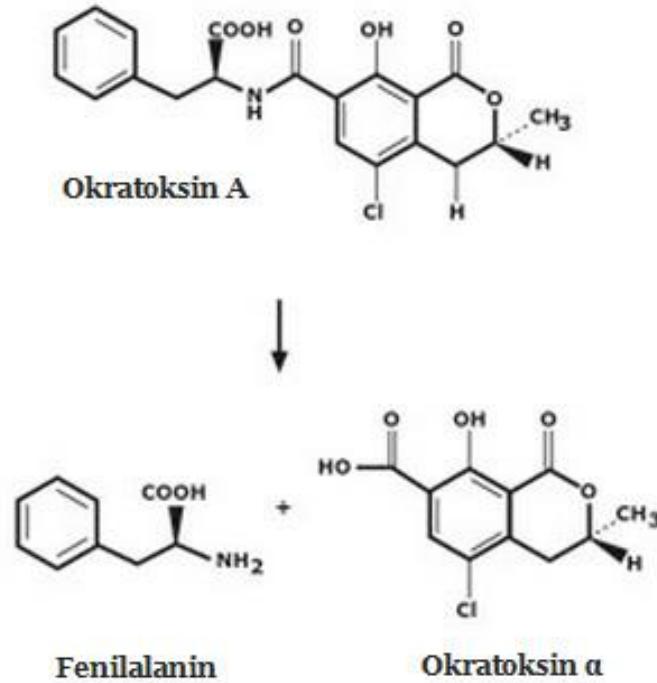
Mikotoksikozis, toksin içeren su veya çeşitli gıda maddelerinin sindirim sisteminden vücuda girdikten sonra toksinin türü, miktarı, alınan gün veya alınma miktarı, hayvanın yaşı, cinsiyeti ve türü, çevresel koşullara bağlı olmak üzere, açık veya gizli enfeksiyonlarla ortaya çıkar. Epidemiyolojik, klinik ve histolojik bulgular, aflatoksin, ergotokratoksin A, 3-nitropropionik asit ve fumonisine maruz kalmanın mikotoksikozise sebep olduğunu göstermiştir(Soyöz and Özçelik 2002).

Derlemede Ochratoxin A'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri, sinyal yolları ve hedef doku-organlarda etkilerinin incelenmesi ve genel literatürün tartışılması amaçlanmıştır.

Okratoksin A'nın Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Okratoksin A (OTA), 1965 yılında *Aspergillus ochraceus* suşlarının ikincil metaboliti olarak keşfedilmiştir. Aynı yıl OTA'nın analogları olan Okratoksin B (OTB) ve C (OTC) de tanımlanmıştır (Van der Merwe, Steyn et al. 1965). Okratoksin A (OTA) başlıca *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* ve *Aspergillus carbonarius* küf mantarı türleri tarafından üretilen bir mikotoksindir. Üzüm, şarap, tahıl ve tahıl ürünleri, bakliyat, kahve, kakao, baharat, kurutulmuş meyveler ve kuruyemişler gibi çok geniş çapta besinde OTA kontaminasyonuna rastlanmaktadır. Ayrıca, hayvan yemlerinin OTA ile kontaminasyonu sonucunda hayvanların kan serumunda, böbrek ve karaciğer gibi yenilebilir sakatatlarında kalıntıları görülebilmektedir (Alexander, Autrup et al. 2006).

Okratoksin A, renksiz, suda az ancak sulu sodyum bikarbonatlı çözeltilerde iyi çözünen, zayıf organik asit gibi davranan, kristal toz halinde bir bileşiktir. Isıya karşı oldukça dirençlidir. Işık ve havaya dayanıklı olmayıp, nemli ve güneş ışığı gibi koşullara maruz kaldığı zaman bozulabilir (Sedefoğlu 2013). OTA 12-karboksi grubundan L-fenil alanine bağlanmış bir pentaketit türevi hidrosikumarin yapısındadır. Kapalı kimyasal formülü $C_{20}H_{18}O_6NCl$ ve Moleküler ağırlığı $403.82 \text{ g mol}^{-1}$. Kristal formda ultraviyole ışık altında, asit solüsyonda yeşil, alkalik solüsyonda ise mavi floresans verir. Kristal formların erime noktası 169°C 'dir (Değirmenci 2013).



Şekil 1. OTA'nın kimyasal yapısı ve hidroliz ürünleri

OTA'nın hidrolizi sonucu Okratoksin α ve fenilalanin oluşur (Şekil 1)(Van der Merwe, Steyn et al. 1965). Okratoksin α , klorlu dihidroizokumarin molekülüdür ve test edilen tüm canlılarda OTA'nın başlıca metabolitidir(Meeting and Organization 2007). OTA fenilalanin yapısından dolayı zayıf bir organik asittir. Lipofilik yapısından dolayı, hücrelerde toplanabilme ve membran-geçirgenliği özelliğine sahiptir(Ringot, Chango et al. 2006).

OTA Toksisitesi

Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (National Institutes of Health, NIH) Ulusal Toksikoloji Programı (National Toxicology Program) kapsamında sıçanlar üzerinde yapılan toksikoloji ve karsinogenez araştırmaları sonucu OTA'nın nefrotoksik ve renal karsinojen olduğu gösterilmiştir. Literatürde OTA toksisitesine aracılık ettiği gösterilen/önerilen mekanizmalar arasında doğrudan ya da dolaylı yoldan makromolekül sentezinin inhibisyonu, DNA "ekleni" oluşumu, lipid peroksidasyonu, oksidatif hasar, mitokondrial fonksiyon bozukluğu yer almaktadır(Gekle, Sauvant et al. 2005). OTA'nın hücrel kalsiyum homeostazisi ile ilişkili genlerin anlatımını değiştirdiği, HNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 alpha) ve Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) transkripsiyon faktörleri ile düzenlenen yolların bozulmasına yol açtığı gösterilmiştir. Birçok Nrf2 ile düzenlenen gen kimyasal detoksifikasyon ve antioksidan yanıtta rol alan enzimleri kodlamaktadır. Bu nedenle böbrekte Nrf2 sinyali ile düzenlenen proteinlerin yokluğunun hücrenin savunma mekanizmasını zayıflatarak oksidatif strese kronik bir yükselmeye sebep olduğu önerilmektedir(Marin-Kuan, Nestler et al. 2006).

Makromolekül Sentezinin İnhibisyonu

OTA yapısal olarak içerisinde fenilalanin aminoasidi (Phe) içerir. Bu nedenle, fenilalanini substrat olarak kullanan birçok enzim için inhibitör etkisine sahip olduğu düşünülmektedir. Özellikle Phe-tRNA sentetaz'ı inhibe ederek protein sentezi inhibisyonuna neden olabileceği ileri sürülmektedir. Fenilalanine benzer özelliği nedeniyle OTA aynı zamanda antibiyotik bir moleküldür. pH seviyesi 7'den düşük ortamlarda Gram-pozitif bakterilerin büyümesini inhibe eder. OTA'nın, fenilalanin ile yarışarak, Phe-tRNA sentetaz enzimine bağlandığı ve saflaştırılmış Bacillus subtilis Phe-tRNA sentetaz'ı kullanılarak yapılan çalışmada enzim aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir(Roth, Eriani et al. 1993).

Oksidatif Stres

Canlı organizmaların çoğu hayatta kalmak için oksijene ihtiyaç duyar. Oksijen hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) ve süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) gibi reaktif oksijen türlerini (ROT) oluşturma eğilimindedir. Normal fizyolojik durumda, canlı sistemlerde ROT üretimi ve ROT'un nötralizasyonu arasında bir denge vardır, bu nedenle oksidatif stres meydana gelmez. Ancak ağır metaller, ilaçlar, toksinler, UV, diyabet gibi nedenlerle oksidan ve antioksidan arasındaki denge bozulup oksidan tarafına kaydığında oksidatif stres durumu ortaya çıkar. Oksidatif stres genellikle hayati hücrel bileşenlerin ciddi oksidatif hasara

uğradığını ve sonunda hücre canlılığının tehlikede olduğunu bildiren bir durumu ifade eder. Oksidatif stres boyunca ROT birikimi gerçekleşir. Kısa ömürlü olsalar da yüksek oranda reaktif olmaları nedeniyle fazla miktarda ROT üretimi sonucu hücrede bulunan protein, lipit ve nükleik asitlerin oksidatif hasara uğraması kaçınılmaz olmaktadır(Sinha, Das et al. 2013). Artmış oksidatif stres kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve yaşlanma gibi çeşitli patolojik durumların oluşumunda kritik rol oynar(Trachootham, Lu et al. 2008).

OTA- aracılı toksisite çalışmaları, öncelikli olarak böbrek ve karaciğerde tümör oluşumunda oksidatif stres tümör oluşumunda önemli rol oynamaktadır(Gautier, Holzhaeuser et al. 2001, Palma, Cinelli et al. 2007). Flow sitometri ile ROS seviyesinin ölçüldüğü in-vitro çalışmalarda, 24 saat OTA'ya maruz kalmış böbrek tübül hücrelerinde oksidatif stresde artış gözlemlenmiştir. Dahası, OTA maruziyetinden sonra oksidatif strese karşı hücrel koruma dahil glutatyon S-transferazın down – regulation'u(reseptörlerin azalması bazı ilaç ve agonist kullanımından dolayı) gözlemlenmiştir(Boesch-Saadatmandi, Loboda et al. 2008). ROS lipidlerin bozunmasına sebep olduğunda, lipid peroksidasyonu oluşur ve malondialdehit analizi gerçekleşir. Bazı çalışmalar, OTA'yı lipid peroksidasyon imalatçısı gibi tanımlamaktadır. Hoehler ve Marquardt çalışmalarında tavukları OTA ve antioksidan olan vitamin E ve C ile beslenmişler ve sonucunda OTA ile beslenen tavukların MDA değerleri daha yüksek bulmuşlardır(Hoehler and Marquardt 1996). Bir diğer çalışmada ise, OTA ile beslenen ratların kan, böbrek ve karaciğerlerinde oksidatif stres değerleri yüksek bulunmuştur(Gautier, Holzhaeuser et al. 2001).

Anti-oksidatif savunma mekanizması olan (Nrf2) nükleer faktör eritroid 2-related factor2 yolu proksimal tübül hücrelerindeki bazı hücrelerde yüksek ROS karşı aktive olmuştur(Wilmes, Crean et al. 2011). Ancak, OTA insan proksimal epitel hücresi olan HK-2 ve ratların böbrek hücrelerinde Nrf2 mekanizmasını zayıflatmaktadır(Jennings, Weiland et al. 2012). OTA ile beslenen ratların böbreklerinde ve domuz epitel proksimal tübül hücrelerinde OTA, Nrf2 aktivitesini ve Nrf2 bağımlı gen ekspresyonunu azaltmaktadır(Cavin, Delatour et al. 2007, Boesch-Saadatmandi, Wagner et al. 2009).

Lipit Peroksidasyonu

Yüksek ROT seviyeleri DNA, protein ve lipit gibi hücrel moleküllerin oksidatif hasarlarına yol açabilir(Sinha, Das et al. 2013). Oksidatif hücre hasarına neden olan serbest radikal oluşumunun OTA sitotoksitesisi ve karsinojenitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Lipit peroksidasyonu ile oluşumu başlatılan reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , ROO^{\cdot}) buldukları hücrelerdeki membranları, proteinleri ve nükleik asitleri hedef alarak geniş çapta doku lezyonları oluştururlar. Sıçanlarda OTA'nın karaciğer ve böbreklerde lipid peroksidasyonunu arttırarak oksidatif hasara neden olduğu in vivo ve in vitro deneylerle gösterilmiştir(Gautier, Holzhaeuser et al. 2001, Klarić, Pepeljnjak et al. 2007, Ramyaa and Padma 2014). Maymun böbrek hücrelerinde OTA ile tetiklenen lipit peroksidasyonunun, oksijen radikallerinin temizleyicileri olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz

(CAT) gibi enzimler ve çeşitli antioksidanlar varlığında azaldığı saptanmıştır(Baudrimont, Ahouandjivo et al. 1997, Ramyaa and Padma 2013).

DNA “Eklenti” Oluşumu

ROS-ilişkili oksidatif stresin planlanmamış DNA onarım ve mikronüklei, DNA bükülme kırıklarının, DNA-eklentilerinin ana sebebi olduğu düşünülmektedir. OTA'nın genotoksik olduğunu ve OTA'nın ya da metabolitlerinin doğrudan DNA'ya kovalent bağlarla bağlanarak DNA “eklenti”lerini oluşturduğunu ve bu yolla karsinojenik etkilerini sergilediğini savunan Pfohl-Leszkowicz ve çalışma arkadaşları ³²P-etiketleme yöntemi ile DNA “eklenti”lerini görüntüleme çalışmaları yürütmektedirler(Pfohl-Leszkowicz and Manderville 2007). Fare ve sıçanlarda tek bir OTA muamelesi sonrasında bile böbreklerde ve karaciğerde DNA “eklenti”lerinin oluştuğunu ve çeşitli antioksidanlar varlığında bu eklentilerin % 90'lara varan oranlarda azaldığını bildirmişlerdir(Grosse, Chekir-Ghedira et al. 1997). Ancak benzer bir çalışmayı yürüten Gautier ve arkadaşları, trityum ile işaretli OTA (3H-OTA) ve ³²P-etiketleme yöntemini birlikte kullanmış ancak bu eklentilerin oluşumunu tespit edememiştir. Bu deneyin sentetik OTA-DNA adduct standardı kullanmadan yapıldığı için ³²P-etiketleme ile belirlenen “eklenti”lerin yapısının bilinmediği ve bu lezyonların aslında DNA'ya doğrudan bağlanan OTA metabolitlerinden ziyade OTA'nın sitotoksik etkisi sonucu oluşan ve DNA ile reaksiyona giren ROT partikülleri olabileceği yönünde bir hipotezleri bulunmaktadır(Gautier, Richoz et al. 2001). DNA hasarının oksidatif stres kaynaklı olduğunu savunan ve ayrıca OTA'nın protein oksidasyonunu da gösteren çalışmalar da literatürde mevcuttur(Kamp, Eisenbrand et al. 2005). Arbilliga ve ark. yaptığı çalışmada; HK-2 hücre hattında DNA hasarı görüldü, ve ROS savıncı N-asetil-L-sistein (NAC)'nin OTA maruziyetinde hücreleri DNA hasarından da koruduğu gözlemlenmiştir(Arbilliga, Azqueta et al. 2006).

Mitokondriyal Fonksiyon Bozukluğu

Mitokondri apoptozda merkezi bir role sahiptir. Mitokondriyal dış membran geçirgenliğinin artması proapoptotik faktörler olan sitokrom c ve AIF (apoptosis inducing factor) gibi proteinlerin salınımına yol açar. Mitokondriyal membran potansiyelinin ($\Delta\psi_m$) kaybının normal mitokondriyal fonksiyonun bozulması yoluyla hücre ölümü (apoptoz) ile ilişkilendirilmektedir(Lakhani, Masud et al. 2006).

İnsan böbrek epitel hücrelerinde (IHKE1; immortalized human kidney epithelial), OTA'nın Ca^{+2} homeostasisi ile etkileşerek Na^+/H^+ değişimini ve mitokondri aktivasyonunu arttırdığı sonucuna varılmıştır. Mitokondriyal metabolizmanın uyarılması sonucu proton üretiminin yükseltildiği buna karşın anaerobik glikolizisin etkilenmediği gösterilmiştir. OTA'nın Ca^{+2} bağımlı olarak $\Delta\psi_m$ 'nin hiperpolarizasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, OTA muamelesi sonrasında mitokondri-bağımlı hücre ATP seviyesinde artış gözlenmiştir(Eder, Benesic et al. 2000).

Apoptoz

Embriyogenezden immün sistemin gelişimine kadar birçok biyolojik süreçte önemli bir role sahip olan apoptoz ya da diğer bir ifadeyle programlı hücre ölümü evrimsel olarak korunmuş bir intihar mekanizması olarak bilinir(Tewari, Quan et al. 1995). Apoptoz sırasında hücreler ilk önce küçülüp büzülür ve hücre çekirdeği yoğunlaşır. Ardından zarla çevrili olan apoptotik cisimlere parçalanırlar. Apoptozun biyokimyasal belirteçleri arasında kaspazlar gibi özgül proteazların aktivasyonu, PARP'ın (Poly (ADP-Ribose) Polymerase) kesilmesi ve DNA'nın fragmanlara ayrılması yer alır(Proskuryakov, Konoplyannikov et al. 2003).

Efektör (etkileyici) kaspazlar olarak da adlandırılan kaspaz 3 ve kaspaz 7 apoptozun çok önemli düzenleyicileridir. Kaspaz 3 DNA fragmanlarının oluşumunu ve apoptozdaki morfolojik değişimleri kontrol ederken, kaspaz 7'nin bu süreçlerdeki rolünün daha az olduğu gösterilmiştir. Kaspaz 7'nin hücre canlılığının kaybının düzenlenmesinde daha önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Kaspaz substratı olan PARP'ın kesilmesi de kaspaz 3 ve kaspaz 7'ye bağlıdır(Lakhani, Masud et al. 2006). Nükleusa özgü bir protein olan PARP (116 kDa) apoptoz sırasında özgül kesilerek 85 kDa'luk bir fragmanı verir(Tewari, Quan et al. 1995). DNA kırıklarını tanıyarak aktive olan PARP, NAD⁺ molekülünü donör olarak kullanarak ADP-riboz polimerlerini oluşturur ve bu polimerleri bir ester bağı ile hedef proteinlerdeki glutamik asit, aspartic asit ve lizin aminoasitlerine ekler. Diğer bir deyişle PARP, poli(ADP-ribozil)asyon (PARilasyon) olarak adlandırılan bu eşsiz posttranslasyonel modifikasyonu gerçekleştiren bir enzimdir. Hasarlı dokularda PARP'ın aşırı aktivasyonu mitokondri ile ilişkili hücre ölümünü uyardığı da bildirilmiştir(Ba and Garg 2011)

Kültür hücrelerinde OTA'nın nanomolar gibi düşük dozlarda başlıca apoptotik olmak üzere ölümü teşvik ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Keseli sıçan (opossum kidney; OK hücreleri), köpek (MDCK; Madin-Darby canine kidney) ve insan (IHKE) kaynaklı hücre hatları kullanılarak yapılan çalışmalarda OTA'nın apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir(Schwerdt, Freudinger et al. 1999). Gekle ve arkadaşları böbrek kanallarından köken alan MDCK-C7 ve MDCK-C11 hücreleri ile yaptıkları çalışmada OTA'nın nanomolar dozlarının özgül olarak apoptozu uyardığını bildirmişlerdir. Ayrıca OTA muamelesi altındaki MDCK-C11 hücrelerinin MDCK-C7 hücrelerine göre apoptozda daha dirençli olduğunu göstermişlerdir(Gekle, Schwerdt et al. 2000). Sıçanlarla yapılan bir çalışmada OTA'nın hem proksimal hem de distal epitel böbrek hücrelerinde apoptozda giden hücre sayısında artışa sebep olduğu TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling) yöntemi ile belirlenmiştir. OTA ile kontamine yemle beslenen sıçanların böbrek dokularında gözlenen apoptozda 10 gün sonrasında 5 kat, 30 gün sonrasında 6.4 ve 60 gün sonrasında 12.7 kat artış olduğu bildirilmiştir(Petrik, Žanić-Grubišić et al. 2003).

OTA - Sinyal Yolakları

Gekle ve arkadaşlarının hipotezine göre; OTA, ikincil habercileri düzenleyen enzimler gibi belirli hücresel kilit hedeflerle etkileşime girerek hücre sinyali yolaklarının ve düzenleyici faktörlerin bozulmasına yol açar. Hücre sinyalindeki ve düzenleyici mekanizmalardaki bu değişimler ise hücre fonksiyonunda ve/veya fenotipinde özgül değişimlere neden olur. Bu durum böbrek fonksiyonlarının değişimine dolayısıyla organizmanın homeostazisinde bozulma ile sonuçlanır(Gekle, Sauvant et al. 2005). In vitro ve in vivo deneyler sonucunda mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK; mitogen-activated protein kinases) sinyali yolaklarının ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K; fosfatidilinositol 3-kinase)/Akt sinyali yolağının OTA muamelesi altındaki hücrelerde aktive edildiği gösterilmiştir(Kumar, Alam et al. 2013, Özcan, Gül et al. 2014).

Mitojen İle Aktivite Edilen Protein Kinazlar (MAPK)

MAPK sinyali yolakları hücre dışından gelen sinyalleri ileterek, çoğaltarak ve farklı sinyalleri birleştirerek, değişen çevre koşullarına karşı hücrelerin genomik veya fizyolojik cevaplar oluşturmaya aracılık ederler(Weston and Davis 2002). Bir hücrenin kanser hücresi haline gelebilmesi için, proliferasyon sinyallerinden bağımsız olarak bölünebilmesi, apoptozdan kaçma mekanizmasını programlaması, büyümeyi durdurucu sinyallere duyarsız hale gelmesi, sınırsız replikasyon potansiyeline sahip olması, yayılma, metastaz ve anjiyogenez yeteneğine sahip olması gereklidir(Hanahan and Weinberg 2000). OTA'nın MAC-T (sığırcı meme epitel hücresi) hücrelerinde Mapk ve JNK sinyali yolakları aracılığıyla hücre döngüsü tutuklanmasını ve apoptozu indükleyebileceği bildirilmektedir(Lee, Lim et al. 2019).

MEK/ERK Sinyali Yolağı

ERK sinyali yolağı, hücre tipine de bağılı olarak, proliferasyon, hayatta kalma, migrasyon, anjiyogenez kromatinin yeniden modellenmesi ve apoptoz gibi süreçleri düzenler(Dhillon, Hagan et al. 2007). Uzun süreli ERK sinyali siklin D1 gibi hücre döngüsüne giriş için gerekli proteinlerin düzenlenmesini sağlamakla birlikte, proliferasyonu inhibe eden genlerin baskılanmasını da sağlar(Yamamoto, Ebisuya et al. 2006). Renal ve nöral hücrelerde farklı stres uyaranlarına ve toksik maddelere cevaben ERK1-2 yolağının aktivasyonunun apoptotik ölüm süreciyle bağlantılı olduğu gösterilmiştir(Wang, Martindale et al. 2000, Subramaniam, Zirrgiebel et al. 2004, Jo, Cho et al. 2005).

JNK Sinyali Yolağı

JNK aktivasyonu TPY (treonin, prolin, tirozin) motifinde yer alan treonin ve tirozinin, MEK4 ve MK7 tarafından fosforilasyonu ile gerçekleşir. Aktivasyonun ardından NK sitoplazmadan nükleusa geçiş yapar. JNK MAPK ailesinin efektörleri arasında başlıca c-Jun, Elk-1, ATF-2, STAT3, p53 gibi transkripsiyon faktörleri yer alır. JNK yolağının inflamasyon, tümörigenez ve apoptozda rolü olduğu

bilinmektedir. Apoptozu teşvik etmesi nedeniyle JNK sinyalinin tümör baskılayıcı bir görevi olduğu düşünülmektedir(Tian, Zhang et al. 2000, Dhillon, Hagan et al. 2007).

p38 Sinyal Yolağı

P38 sinyal yolağı apoptozun düzenlenmesinde, hücre döngüsünün ilerleyişinde, büyüme ve farklılaşmada da önemli rol oynar. Büyüme faktörleri ve hormonlar tarafından da uyarılma p38 yolağının çok geniş çeşitlilikteki dış sinyalleri alan ve dağıtan çok çeşitli MAPKKK'lara sahiptir(Tian, Zhang et al. 2000, Dhillon, Hagan et al. 2007). MDCK-C7 hücrelerinde OTA'nın zaman- ve konsantrasyon-bağımlı olarak ERK1-2 fosforilasyonunun artmasına neden olduğu gösterilmiştir(Schramek, Wilflingseder et al. 1997). Keseli sıçan proksimal tübül epitel hücrelerinde de OTA'nın doz-bağımlı olarak ERK1-2, p38 ve JNK aktivitesinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir(Sauvant, Holzinger et al. 2005). Gekle ve arkadaşlarının hipotezine göre OTA'nın tümör tetikleyici etkisi ERK1-2 ile JNK ve p38 aktivasyonu arasındaki dengeye bağlı olabileceği yönündedir. OTA'ya maruz kalan hücrelerde JNK ve p38 aktivasyonuna göre ERK1-2 aktivasyonu daha güçlü ise, apoptozun inhibe edilerek tümör gelişiminin teşvik edebileceği ileri sürülmüştür(Gekle, Sauvant et al. 2005).

İnsan böbrek proksimal tübülü HK-2 ve fare embriyonik fibroblast (MEF) hücreleri OTA'ya maruz bırakıldıktan sonra hem ana proteolitik sistemler, otofaji hem de ubiquitin-proteazom sisteminin (UPS) aktive olduğu gösterilmiştir. Uzun süreli OTA maruziyeti, proteozomal aktiviteyi artırarak ubiquitin protein seviyelerini düşürdüğü gösterilmiş ve çalışma sonucunda; otofajinin ve devamında UPS aktivasyonunun, OTA toksisitesini de içeren kritik fosfotaz VHR/DUSP3, DUSP4 ve PHLPP seviyelerini düzenleyerek PI3K/AKT ve MAPK/ERK1-2 sinyal yollarının sorumlu olduğunu göstermiştir(Akpınar, Kahraman et al. 2019).

OTA Absorpsiyonu, Metabolizması ve Boşaltımı

Zayıf bir organik asit olan OTA'nın pKa değeri, fenilalanin artığının karboksil grubu nedeniyle 4.2-4.4 ve fenolik grubu nedeniyle de 7.0-7.3 aralığında değişir. Bu asidik artıklar OTA absorpsiyonunda rol oynar(Pfohl-Leszkowicz and Manderville 2007). Ayrışmamış formdaki OTA lipofilik karakterinden dolayı hücre membranından geçebilme özelliğindeyken, ayrılmış formu ise (pH 7.4'te 2/3) hidrofildir(Gekle, Sauvant et al. 2005).

OTA başlıca ince bağırsak olmak üzere gastrointestinal sistemden etkin bir şekilde emilip kan yoluyla böbreklere taşınır. Kanda OTA'nın % 99'u başta albümin olmak üzere serum proteinlerine bağlanır. Bu nedenle vücut içindeki yarı ömrü de uzamış olur. OTA, organik anyon taşıyıcı (OAT) proteinler sayesinde böbrek tübüllerinden atılır ve başta proksimal tübül olmak üzere tüm nefron segmentleri tarafından OAT ve H⁺-dipeptid taşıyıcı proteinleri sayesinde tekrar geri emilir(Dahlmann, Dantzler et al. 1998). Bu taşıyıcı proteinler ve geri emilim mekanizması OTA'nın böbreklerde birikmesine neden olur(Schwerdt, Bauer et al. 1996). Bundan dolayı böbrek OTA'nın ana hedef organı

olarak düşünülmektedir. Karaciğerde, kaslarda ve yağ dokuda da OTA'nın varlığı tespit edilmiştir(Meeting and Organization 2007). OTA idrar ve dışkı ile dışarı atılır. Serum proteinlerine bağlanması ve enterohepatik sirkülasyonu (ince bağırsakla böbrek, karaciğer arasındaki sirkülasyon) nedeniyle boşaltım organlarının OTA tarafından en çok etkilenen organlar olması kaçınılmazdır(Meeting and Organization 2007).

OTA'nın Hedef Organları

OTA'nın doğal kontaminasyon dozlarının seçici olarak böbrekleri ve böbrek fonksiyonlarını etkilediği, bunun yanı sıra karaciğer, immün sistem ve beyin hücrelerinin de OTA'nın olası hedefleri olduğu gösterilmiştir(IARC 1993, Özçelik, Koşar et al. 2001, Abdel-Wahhab, Abdel-Galil et al. 2005). İnsanlarda OTA'nın Balkan Endemik Nefropati (BEN) hastalığının patogenezi ve üriner sistem tümörleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir(Castegnaro, Canadas et al. 2006). Böbreklerde doku ağırlığı başına kan akışı çok yüksektir ve bu durum diğer organlara kıyasla daha fazla miktarda OTA geçişi ile sonuçlanır. Test edilen insan kan serumları, böbrekleri ve insan sütü örneklerinin % 50-100'ünde OTA'nın varlığı gösterilmiştir(Ziegler 2000). Eser miktarda olmasına rağmen, yüksek stabilitesi ve geniş çaptaki besin kontaminasyonu nedeniyle insan popülasyonu sürekli olarak OTA'ya maruz kalmaktadır(Alexander, Autrup et al. 2006).

Ayrıca, serbest OTA proksimal tübüllerden salınır ve ardından yeniden emilir. Bu emilim başlıca proksimal düz tübül olmak üzere, Henle kulpunun yukarı uzanan kalın kolunda ve toplama kanallarında gerçekleşir. Bu durum renal dokularda OTA birikimi ile sonuçlanır. Renal dokularda en yüksek OTA konsantrasyonu papilla ve iç medullada tespit edilmiştir(Gekle, Sauvant et al. 2005). OTA ile beslenen F344 erkek sıçanlarda patolojik olarak OTA'dan en şiddetli etkilenen organın böbrekler olduğu ve böbrek epitelinde sitoplazmik vakuol oluşumunun ve karyomegalinin belirgin bir şekilde arttığı bildirilmiştir. Ayrıca renal tübül epitel hücre membranlarında böbrek hasarının özgül biyobelirteci olan Kim-1 (kidney injury molecule-1)'in varlığı gösterilmiştir(Qi, Yu et al. 2014). OTA'nın nefrotoksik özelliği ile birlikte yapılan çalışmada domuz nefropatisinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. OTA ile kontamine yemle beslenen domuzlarda nefropati görülme oranının arttığı gösterilmiştir(Stoev, Gundasheva et al. 2012).

Ülkemizde sağlıklı çocuklarda kan OTA düzeylerinin ölçülmesine yönelik yapılan bir çalışmada serum OTA düzeylerinin coğrafik bölge, mevsim, yaş ve cinsiyet ile değişkenlik olabileceği araştırılmıştır. Çalışmada İç Anadolu, Karadeniz ve Akdeniz Bölgesi'nde yaşayan 7-17 yaş aralığındaki çocuklardan alınan kan örneklerinde serum OTA düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçülmüş. Tüm çalışma grubunda ortalama serum OTA düzeyi 0.59 +- 0.08 ng/ml ve günlük OTA alım düzeyi 0.82+- 0.11 ng/kg/gün olarak belirlenmiş. Okratoksin A düzeyleri yönünden cinsiyete göre gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamış. Bölgeler arasında ise istatistiksel olarak önemli farklılıklar saptanmış. Akdeniz Bölgesi'nde yaşayan çocukların serum OTA düzeyleri diğer bölgelere oranla daha düşük olarak

gözlemlenmiş. Gözlenen bu farklılık iklim koşullarının ve/veya beslenme alışkanlıklarının farklılığına bağlanmıştır. Günlük alım düzeyleri, İç Anadolu ve Karadeniz Bölgeleri'nde Akdeniz Bölgesi'ne oranla altı kat fazla bulunmakla birlikte her üç bölgede de Dünya Sağlık Örgütü başta olmak üzere uzman kuruluşlar tarafından bildirilen TDI değerlerinin altında olduğu vurgulanmıştır(Giray, Erkekoğlu et al. 2009).

OTA nefrotoksitesi ile ratların böbreklerinde miRNA profillemek için, bioinformatik çalışmalar ve high-throughput sekanslama yapılmış. Çalışmada OTA'nın 3 farklı dozuna göre grup oluşturulmuştur. Ayrıca OTA uygulanan ratların böbrek, testis ve dalak ağırlıkları ölçülmüştür. OTA ile muamele edilen ratların böbreklerinde miRNA analizi yapılmış. Toplamda bilinen 4099 miRNA ve 8 yeni miRNA böbrekte tanımlanmıştır. Yeni miRNA'ların OTA'nın ve değişik miRNA'lar OTA'nın farklı dozlarında etkilerinin farklı olduğu gözlenmiştir. Orta doz OTA uygulanan grupta miR-3588, miR-2186, miR141, miR130a, miR129 ekspresyonlarında OTA etkisinin olmadığını fakat yüksek doz OTA uygulanan ratlarda ekspresyon düzeylerinin arttığı gözlenmiştir. OTA uygulanan erkek ratların böbrek, testis ve dalak ağırlıkları ölçülmüş. Böbrek ağırlıklarının arttığı fakat testis ve dalak ağırlıklarının artmadığı gözlemlenmiştir(Dai, Zhao et al. 2014).

OTA'nın bağışıklığı baskılayıcı aktivitesi timus, dalak ve lenf nodları gibi hayati öneme sahip immün sistem organlarının boyutlarındaki küçülmeyle, antikor yanıtlarının azalmasıyla, immün sistem hücrelerinin fonksiyonundaki ve sayısındaki değişimlerle ve sitokin üretimindeki azalmalarla karakterize edilmektedir. OTA'nın immünotoksik aktivitesi, hasar yaratan değişimlerin sebep olduğu hücre ölümlerinin ardından, protein sentezinin inhibisyonu nedeniyle immün sistem hücrelerinin yerine konmasındaki yavaşlama nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir(Al-Anati and Petzinger 2006). OTA teşvikli apoptoz insan periferik lenfositleri, insan lenfoit T hücre hattı (Kit 225 hücreleri) ve sığır lenfositleri gibi immün sistem hücrelerinde de gözlenmiştir(Assaf, Azouri et al. 2004, Lioi, Santoro et al. 2004).

Wangikar B.P. ve ark çalışmalarında, OTA'nın gebe sıçan ve gebe fareler den plasentaya geçebildiğini bildirmişlerdir. OTA ve aflatoksin B₁ in tek veya kombine teratojenik etkisi incelendiğinde, hem OTA hem de aflatoksin B₁ nöral tüp gelişimini bozmuştur. Kombine halde uygulandığında ise, nöral tüp üzerindeki etkileri azalmış ancak kalp defektleri gözlenmiştir. Embriyolar histopatolojik olarak incelendiğinde kalp kasında dejeneratif değişiklikler belirlenmiştir. Bu iki mikotoksine kombine halde maruz kaldığında OTA'nın etkisinin aflatoksin B₁ tarafından antagonize (zıtlık) edildiği düşünülmüştür(Wangikar, Sinha et al. 2007).

Xiaozhe ve ark.(2014), çalışmalarında ratlara uygulanan Okratoksin A'dan kaynaklanan erken hepatotoksitesinde microRNA, mRNA ve proteomik profillemesinden yeni mekaniksel kavramalar göstermişleridir. Bu çalışmada, ratlara farklı haftalarda OTA gavaj yoluyla verilmiş. Daha sonra, mikroRNAlar, mRNA ve protein ekspresyonları, 13 hafta süreyle OTA ile muamele edilmiş ratların

karaciğer ağırlıkları ölçülmüş. Çalışma sonucunda orta ve yüksek doz OTA'nın, karaciğer üzerinde farklı etkiler gösterdiklerini belirtmişlerdir. microRNA, mRNA ve protein seviyelerinde OTA tedavi sonrasında 5 farklı yoldan bahsetmişlerdir. Bunlardan primer safra asidi biyosentezinin ve sitokrom P450 ile ksenobiyotiklerin metabolizması doğrudan karaciğer hasarı ile ilişkili iken arginin ve prolin metabolizma, sistein ve metionin metabolizması ve PPAR sinyal yolağında metabolik hastalığa neden olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada çoklu omik metodlarının birleştirilmesiyle ilk kez, erken hepatotoksisite OTA kaynaklı ortaya koymaktadır. Yeni metabolik yollar sonraki hayatında metabolik hastalıkların patogenezinde katkıda bulunabileceklerini söylemektedirler(Qi, Yu et al. 2014).

Okratoksin A ile kronik maruziyet sonucu indüklenen oksidatif hasar ve ratların distal tübül toksisitesine karşı günlük meyve ekstraktların koruyucu etkisini araştırmışlardır. Çalışma; 28 gün süreli kontrol ve 4 grup olarak planlanmıştır. 1. grup kontrol, 2. grup OTA, 3. grup Acve Hurması, 4. grup OTA + Acve Hurması olarak planlanmıştır. Çalışma sonucunda anlamlı olarak hurma ile birlikte OTA'nın oksidatif stres etkinliğini azaltarak nefrotoksisinde azalma olduğu söylenmektedir(Ali, Abdu et al. 2011). OTA ve AFB1 uygulanan ratlarda, kemik iliğinde mikronükleus testi, karaciğer ve böbrekte comet assay uygulamışlar. Her iki toksin madde de kemik iliğinde toksisiteye neden olmuş. OTA ve AFB1 uygulanan ratlarda, karaciğerde DNA hasarı indüklenmiş böbrekte ise etki görülmemiştir. Çalışma sonucunda her iki mikotoksin genotoksisite ile ilgili antagonist bir ilişki gösterdiği düşünülmüştür(Corcuera, Vettorazzi et al. 2015). OTA'nın zararlı etkilerini rat oosit matürasyonu, in vitro fertilizasyon (IVF), pre-post implantasyon sonrası gelişimi in vitro ve in vivo olarak araştırmışlar. Çalışmada özellikle, OTA'nın önemli ölçüde rat oosit matürasyonunun bozulduğunu, IVF oranlarını azaltarak in vitro olarak embriyo gelişimini inhibe ettiği gözlenmiştir. Bu, hayvan modellerinde olduğu gibi, embriyonik implantasyon ve fetüs sağkalım oranları üzerinde zararlı etkileri olabileceği belirtilmiştir(Huang and Chan 2014). Anne sütündeki Aflatoksin M1 ve Okratoksin A miktarları ile annenin beslenme durumu arasındaki ilişkiyi değerlendirdikleri çalışmalarında besinlerinde tüketim miktarları ve saklama koşullarının önemini vurgulamışlardır(Barut Uyar 2013).

SONUÇ

OTA'nın böbrek, karaciğer ve beyin gibi bazı dokularda hasara yol açtığı tespit edildiği görülmektedir. Genel olarak, non-genotoksik karsinojenler sınır etki üreten maddeler olarak düşünülmektedir. Karsinojenlerin non-genotoksik mekanizmalarından dolayı DNA üzerine direkt kimyasal bir etki içermemektedir, daha çok hedef hücreler üzerine ya da hücre dışı matriks üzerine kanserojen etkiler gösterdikleri düşünülmektedir. OTA serbest radikal oluşturarak lipid peroksidasyonuna neden olur ve toksisitesini ortaya çıkarır. OTA'nın sinyal yolları üzerine yapılan çalışma sonucunda JNK ve p38 aktivasyonunu teşvik ettiği ortaya koyulmuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda OTA'nın hasarlı hücrelerin sağkalımını desteklediği ve böylelikle insan böbreğinde olası karsinogenez mekanizmalara sebep olduğu açığa çıkarılmıştır.

Ek Beyan

Yazar katkı oranları: Yazarlar çalışmaya eşit oranda katkı sağlamıştır.

Etik: Makalenin tüm süreçlerinde JIAM'ın araştırma ve yayın etiği ilkelerine uygun olarak hareket edilmiştir.

Çıkar çatışması bildirimi: Bu çalışmada herhangi bir potansiyel çıkar çatışması bulunmamaktadır.

KAYNAKÇA

- Abdel-Wahhab, M. A., et al. (2005). "Melatonin counteracts oxidative stress in rats fed an ochratoxin A contaminated diet." *Journal of pineal research* 38(2): 130-135.
- Akpinar, H. A., et al. (2019). "Ochratoxin A Sequentially Activates Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System." *Toxins* 11(11): 615.
- Al-Anati, L. and E. Petzinger (2006). "Immunotoxic activity of ochratoxin A." *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 29(2): 79-90.
- Alexander, J., et al. (2006). "Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food." *EFSA J* 365: 1-56.
- Ali, A., et al. (2011). "Renoprotective effect of date fruit extract on ochratoxin (A) induced-oxidative stress in distal tubules of rat: A light and electron microscopic study." *Kidney Res. J* 1: 13-23.
- Amezqueta, S., et al. (2008). "OTA-producing fungi isolated from stored cocoa beans." *Letters in applied microbiology* 47(3): 197-201.
- Arbillaga, L., et al. (2006). "Oxidative DNA damage induced by ochratoxin A in the HK-2 human kidney cell line: evidence of the relationship with cytotoxicity." *Mutagenesis* 22(1): 35-42.
- Assaf, H., et al. (2004). "Ochratoxin A induces apoptosis in human lymphocytes through down regulation of Bcl-xL." *Toxicological Sciences* 79(2): 335-344.
- Ba, X. and N. J. Garg (2011). "Signaling mechanism of poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in inflammatory diseases." *The American journal of pathology* 178(3): 946-955.
- Barut Uyar, B. (2013). "Anne Sütündeki Aflatoksin M1 Ve Okratoksin A Miktarları Ile Annenin Beslenme Durumu Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi."
- Baudrimont, I., et al. (1997). "Prevention of lipid peroxidation induced by ochratoxin A in Vero cells in culture by several agents." *Chemico-Biological Interactions* 104(1): 29-40.
- Boesch-Saadatmandi, C., et al. (2008). "Effect of ochratoxin A on redox-regulated transcription factors, antioxidant enzymes and glutathione-S-transferase in cultured kidney tubulus cells." *Food and chemical toxicology* 46(8): 2665-2671.
- Boesch-Saadatmandi, C., et al. (2009). "Ochratoxin A impairs Nrf2-dependent gene expression in porcine kidney tubulus cells." *Journal of animal physiology and animal nutrition* 93(5): 547-554.

- Castegnaro, M., et al. (2006). "Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxins A through biomarkers." *Molecular nutrition & food research* 50(6): 519-529.
- Cavin, C., et al. (2007). "Reduction in antioxidant defenses may contribute to ochratoxin A toxicity and carcinogenicity." *Toxicological Sciences* 96(1): 30-39.
- Corcuera, L.-A., et al. (2015). "Genotoxicity of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A after simultaneous application of the in vivo micronucleus and comet assay." *Food and Chemical Toxicology* 76: 116-124.
- Dahlmann, A., et al. (1998). "Detailed mapping of ochratoxin A reabsorption along the rat nephron in vivo: the nephrotoxin can be reabsorbed in all nephron segments by different mechanisms." *Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 286(1): 157-162.
- Dai, Q., et al. (2014). "MicroRNA profiling of rats with ochratoxin A nephrotoxicity." *BMC genomics* 15(1): 1.
- Değirmenci, C. (2013). Kırmızı Şarapta Okratoksin A Ve Fumonisin B2 Varlığının İncelenmesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Dhillon, A. S., et al. (2007). "MAP kinase signalling pathways in cancer." *Oncogene* 26(22): 3279-3290.
- Eder, S., et al. (2000). "Nephritogenic ochratoxin A interferes with mitochondrial function and pH homeostasis in immortalized human kidney epithelial cells." *Pflügers Archiv* 440(4): 521-529.
- Gautier, J.-C., et al. (2001). "Oxidative damage and stress response from ochratoxin A exposure in rats." *Free Radical Biology and Medicine* 30(10): 1089-1098.
- Gautier, J.-C., et al. (2001). "Metabolism of ochratoxin A: absence of formation of genotoxic derivatives by human and rat enzymes." *Chemical research in toxicology* 14(1): 34-45.
- Gekle, M., et al. (2005). "Ochratoxin A at nanomolar concentrations: a signal modulator in renal cells." *Molecular nutrition & food research* 49(2): 118-130.
- Gekle, M., et al. (2000). "Ochratoxin A induces JNK activation and apoptosis in MDCK-C7 cells at nanomolar concentrations." *Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 293(3): 837-844.
- Giray, B., et al. (2009). "Çocuklarda serum okratoksin A düzeyleri Orijinal Araştırma." *Türk Pediatri Arşivi* 44(4).
- Grosse, Y., et al. (1997). "Retinol, ascorbic acid and α -tocopherol prevent DNA adduct formation in mice treated with the mycotoxins ochratoxin A and zearalenone." *Cancer letters* 114(1-2): 225-229.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *cell* 100(1): 57-70.
- Hoehler, D. and R. R. Marquardt (1996). "Influence of vitamins E and C on the toxic effects of ochratoxin A and T-2 toxin in chicks." *Poultry science* 75(12): 1508-1515.
- Huang, F. J. and W. H. Chan (2014). "Effects of ochratoxin a on mouse oocyte maturation and fertilization, and apoptosis during fetal development." *Environmental toxicology*.
- IARC, W. (1993). "Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins." *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans* 56.

- Jennings, P., et al. (2012). "Transcriptomic alterations induced by Ochratoxin A in rat and human renal proximal tubular in vitro models and comparison to a rat in vivo model." *Archives of toxicology* 86(4): 571-589.
- Jo, S.-K., et al. (2005). "MEK inhibitor, U0126, attenuates cisplatin-induced renal injury by decreasing inflammation and apoptosis." *Kidney international* 67(2): 458-466.
- Kamp, H. G., et al. (2005). "Ochratoxin A induces oxidative DNA damage in liver and kidney after oral dosing to rats." *Molecular nutrition & food research* 49(12): 1160-1167.
- Klarić, M. Š., et al. (2007). "Lipid peroxidation and glutathione levels in porcine kidney PK15 cells after individual and combined treatment with fumonisin B1, beauvericin and ochratoxin A." *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 100(3): 157-164.
- Krska, R. and A. Molinelli (2007). "Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends." *Analytical and bioanalytical chemistry* 387(1): 145-148.
- Kumar, R., et al. (2013). "Ochratoxin A-induced cell proliferation and tumor promotion in mouse skin by activating the expression of cyclin-D1 and cyclooxygenase-2 through nuclear factor-kappa B and activator protein-1." *Carcinogenesis* 34(3): 647-657.
- Lakhani, S. A., et al. (2006). "Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis." *Science* 311(5762): 847-851.
- Lee, J.-Y., et al. (2019). "Ochratoxin A mediates cytotoxicity through the MAPK signaling pathway and alters intracellular homeostasis in bovine mammary epithelial cells." *Environmental Pollution* 246: 366-373.
- Lioi, M., et al. (2004). "Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 557(1): 19-27.
- Lobeau, M., et al. (2005). "Development of a new clean-up tandem assay column for the detection of ochratoxin A in roasted coffee." *Analytica chimica acta* 538(1-2): 57-61.
- Marin-Kuan, M., et al. (2006). "A toxicogenomics approach to identify new plausible epigenetic mechanisms of ochratoxin a carcinogenicity in rat." *Toxicological Sciences* 89(1): 120-134.
- Meeting, J. F. W. E. C. o. F. A. and W. H. Organization (2007). Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, World Health Organization.
- Özcan, Z., et al. (2014). "Ochratoxin A activates opposing c-MET/PI3K/Akt and MAPK/ERK 1-2 pathways in human proximal tubule HK-2 cells." *Archives of toxicology*: 1-15.
- Özçelik, N., et al. (2001). "Ochratoxin A in human serum samples collected in Isparta-Turkey from healthy individuals and individuals suffering from different urinary disorders." *Toxicology letters* 121(1): 9-13.
- Palma, N., et al. (2007). "Ochratoxin A-induced mutagenesis in mammalian cells is consistent with the production of oxidative stress." *Chemical research in toxicology* 20(7): 1031-1037.
- Petrik, J., et al. (2003). "Apoptosis and oxidative stress induced by ochratoxin A in rat kidney." *Archives of toxicology* 77(12): 685-693.

- Pfohl-Leskowicz, A. and R. A. Manderville (2007). "Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans." *Molecular nutrition & food research* 51(1): 61-99.
- Proskuryakov, S. Y., et al. (2003). "Necrosis: a specific form of programmed cell death?" *Experimental cell research* 283(1): 1-16.
- Qi, X., et al. (2014). "Ochratoxin A induces rat renal carcinogenicity with limited induction of oxidative stress responses." *Toxicology and applied pharmacology* 280(3): 543-549.
- Ramyaa, P. and V. V. Padma (2013). "Ochratoxin-induced toxicity, oxidative stress and apoptosis ameliorated by quercetin—Modulation by Nrf2." *Food and Chemical Toxicology* 62: 205-216.
- Ramyaa, P. and V. V. Padma (2014). "Quercetin modulates OTA-induced oxidative stress and redox signalling in HepG2 cells—up regulation of Nrf2 expression and down regulation of NF- κ B and COX-2." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1840(1): 681-692.
- Ringot, D., et al. (2006). "Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update." *Chemico-Biological Interactions* 159(1): 18-46.
- Roth, A., et al. (1993). "Kinetic properties of pure overproduced *Bacillus subtilis* phenylalanyl-tRNA synthetase do not favour its in vivo inhibition by ochratoxin A." *FEBS letters* 326(1): 87-91.
- Sabuncuoğlu, S. A., et al. (2008). "Mikotoksinler: toksik etkileri, degradasyonları, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması." *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*(1): 63-92.
- Sauvant, C., et al. (2005). "The nephrotoxin ochratoxin A induces key parameters of chronic interstitial nephropathy in renal proximal tubular cells." *Cellular physiology and biochemistry* 15(1-4): 125-134.
- Schramek, H., et al. (1997). "Ochratoxin A-induced stimulation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 is associated with Madin-Darby canine kidney-C7 cell dedifferentiation." *Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 283(3): 1460-1468.
- Schwerdt, G., et al. (1996). "Accumulation of ochratoxin A in rat kidney in vivo and in cultivated renal epithelial cells in vitro." *Toxicology* 114(3): 177-185.
- Schwerdt, G., et al. (1999). "The nephrotoxin ochratoxin A induces apoptosis in cultured human proximal tubule cells." *Cell biology and toxicology* 15(6): 405-415.
- Sedefoğlu, C. (2013). *Antep Fıstıklarında Ochratoxin A Ve Aflatoksin Varlığının İncelenmesi*, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Sinha, K., et al. (2013). "Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis." *Archives of toxicology* 87(7): 1157-1180.
- Soyöz, M. and N. Özçelik (2002). "Ochratoxin A'nın Toksik Etkileri Ve Eliminasyonu." *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 22(4): 421-427.
- Stoev, S. D., et al. (2012). "Experimental mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a mouldy diet containing ochratoxin A and fumonisin B1." *Experimental and Toxicologic Pathology* 64(7-8): 733-741.
- Subramaniam, S., et al. (2004). "ERK activation promotes neuronal degeneration predominantly through plasma membrane damage and independently of caspase-3." *The Journal of cell biology* 165(3): 357-369.

- Tewari, M., et al. (1995). "Yama/CPP32 β , a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase." *cell* 81(5): 801-809.
- Tian, W., et al. (2000). "MAPK signaling and the kidney." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 279(4): F593-F604.
- Trachootham, D., et al. (2008). "Redox regulation of cell survival." *Antioxidants & redox signaling* 10(8): 1343-1374.
- Van der Merwe, K., et al. (1965). "The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* wilh." *Journal of the Chemical Society (Resumed)*: 7083-7088.
- Vettorazzi, A., et al. (2013). "A review on ochratoxin A transcriptomic studies." *Food and Chemical Toxicology* 59: 766-783.
- Wang, X., et al. (2000). "Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis." *Journal of Biological Chemistry* 275(50): 39435-39443.
- Wangikar, P. B., et al. (2007). "Teratogenic Effects of Ochratoxin A and Aflatoxin B 1 Alone and in Combination on Post-Implantation Rat Embryos in Culture." *Journal of the Turkish-German Gynecological Association* 8(4).
- Weston, C. R. and R. J. Davis (2002). "The JNK signal transduction pathway." *Current opinion in genetics & development* 12(1): 14-21.
- Wilmes, A., et al. (2011). "Identification and dissection of the Nrf2 mediated oxidative stress pathway in human renal proximal tubule toxicity." *Toxicology in Vitro* 25(3): 613-622.
- Yamamoto, T., et al. (2006). "Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression." *Current Biology* 16(12): 1171-1182.
- Ziegler, K. (2000). "Ochratoxin A from a toxicological perspective." *J. Vet. Pharmacol. Ther* 23: 91-98.