



ORJİNAL MAKALE / ORIGINAL ARTICLE

Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi / BAUN Sağ Bil Derg
Balıkesir Health Sciences Journal / BAUN Health Sci J
ISSN: 2146-9601- e ISSN: 2147-2238
Doi: <https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1159774>



Çevresel Kirleticiler ve Plasental Transporterlar: PCB ile SLC ve ABCB1 Örneği

Begüm YURDAKÖK DİKMEN¹, Recep UYAR², Özgür KUZUKIRAN³,
Mehmet Altay ÜNAL⁴, Hasan Tolga ÇELİK⁵, Ümmü Gülsüm BOZTEPE²,
Kübra KARAKAŞ ALKAN⁶, Özgür ÖZYÜNCÜ⁷, Yağmur TURGUT BİRER²,
Hilal ÖZDAĞ SEVGİLİ⁸, Halit KANCA⁹, Çağdaş AKTAN¹⁰, Ayhan FİLAZİ¹

¹ Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı,

² Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,

³ Çankırı Karatekin Üniversitesi Eldivan Meslek Yüksekokulu,

⁴ Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü,

⁵ Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı,

⁶ Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı,

⁷ Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı,

⁸ Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü,

⁹ Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı,

¹⁰ Beykent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı.

Geliş Tarihi / Received: 10.08.2022, **Kabul Tarihi / Accepted:** 29.08.2022

ÖZ

Amaç: Çevresel kirletici maruziyetine bağlı olarak işlevselliği değişen ve bozulan membran transporterları nedeniyle, bu maddeler plasental bariyeri geçerek plasental kan dolaşımına geçebilmektedir. Çalışmada, çevresel kirleticilerin bu transport proteinleriyle etkileşimlerinin moleküler boyutta incelenmesi amaçlanmaktadır. **Gereç ve Yöntem:** Araştırma kapsamında hemokoryal yapıya sahip insan ve endotelyokoryal yapıya sahip köpek plasentasında; 28 kirleticinin analizi GC-MS ile yapılmış (PCB, PBDE, PAH ve Organik klorlu pestisitler); RNaseq ile plasental tüm genom ifade profili araştırılmış, in silico (moleküler kenetleme) ve in vitro (PCB 101, PCB118 uygulanan plasental hücre hattı HTR8/SVneo'da SLC ve ABCB1 mRNA ifadesi) değerlendirilmiştir. **Bulgular:** Test edilen 60 örnek içerisinde bir örnekte PCB101 826.4µg/kg; 23 örnekte ise PCB118 0.14 ile 41.9µg/kg arasında bulundu. Biyoinformatik bulgularda sekans analizi yapılan 55 numunede PCB pozitif ve negatif numuneler arasında 742 gende farklılık bulundu (p<0.05). Bu genler içerisinde 14 adet SLC ve 2 adet ABC ailesinde gruplara göre ifade farklılığı bulundu. SLC içerisinde en düşük p değerine sahip ilk iki gen SLC4A1 (p=0.000126) ve SLC38A5 (p=0.000563) olurken, ABC'ler içerisinde ABCA8 (0.022997) ve ABCC1 (p=0.025288) olarak bulundu. qPCR bulgularına göre hem ABCB1 için hem de SLC22A6 için mRNA ifadesinde artış görülmekte birlikte bu artış ABCB1 için daha yüksek bulundu (p<0.05). **Sonuç:** ABCB1 gen ifadesi ve PCB ligandlarına bağlanma affiniteleri de SLC (SLC1A5)'ye göre daha yüksek bulundu. Sonuç olarak PCB maruziyetinin ABCB1 ifadesini değerlendirmeye alınan SLC'lere göre daha fazla etkilediği gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Placenta, Genomik, PCB, SLC, ABCB1.

Environmental Contaminants and Placental Transporters: Example of PCB vs. SLC and ABCB1

Abstract

Objective: Due to widespread presence and exposure to environmental pollutants, structural and functional changes in membrane transporters could occur, leading to placental transport of these compounds. In this study, the effects of PCBs on SLC and ABCB1 membrane transport molecules were evaluated. **Materials and Methods:** Hemochorial structured human placenta and endotheliochorial structured dog placenta were analyzed for 28 pollutants (PCB, PBDE, PAH and Organochlorines) using GC-MS. The expression profile of the placental whole genome were investigated with RNaseq, and in silico (molecular chelation) and in vitro (SLC and ABCB1 mRNA expression in the placental cell line HTR8/SVneo treated with PCB 101, PCB118) were evaluated. **Results:** PCB101 826.4µg/kg in one sample out of 60 samples tested; In 23 samples, PCB118 was found to be between 0.14 and 41.9µg/kg. In the bioinformatics findings, there were differences in 742 genes between PCB positive and negative samples in 55 samples that were sequenced (p<0.05). Among these genes, expression differences were found in 14 SLC and 2 ABC families according to groups. The first two genes with the lowest p values in SLC were SLC4A1 (p=0.000126) and SLC38A5 (p=0.000563), while ABCA8 (p=0.022997) and ABCC1 (p=0.025288) were found in ABCs. According to the qPCR findings, there was an increase in mRNA expression for both ABCB1 and SLC22A6, but this increase was found to be higher for ABCB1 (p<0.05). **Conclusion:** ABCB1 gene expression and binding affinities to PCB ligands were also higher than SLC (SLC1A5). Placental PCB exposure affected ABCB1 expression more than the tested SLCs.

Keywords: Placenta, Genomic, PCB, SLC, ABCB1.

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Recep UYAR, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.

E-mail: recepuyar@gmail.com

Bu makaleye atıf yapmak için / Cite this article: Yurdakök Dikmen, B., Uyar, R., Kuzukiran, O., Ünal, M.A., Çelik, H. T., Boztepe, U. G., Karakas Alkan, K., Ozyuncu, O., Turgut Birer, Y., Özdağ Sevgili, H., Kanca, H. Aktan, C & Filazi, A. (2022). Çevresel kirleticiler ve plasental transporterlar: PCB ile SLC ve ABCB1 örneği. *BAUN Sağ Bil Derg*, 11(Supplement 1): 29-37.

<https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1159774>



BAUN Health Sci J, OPEN ACCESS <https://dergipark.org.tr/tr/pub/balikesirsbd>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

GİRİŞ

Çevresel kirleticiler arasında kalıcı organik kirleticiler (KOKlar) uzun mesafelere taşınabilmeleri, çevrede kalıcı olmaları, ekosistemde biyoakümüle ve biyomagnifiye olmaları nedeniyle küresel olarak endişe oluşturan kimyasallar olarak değerlendirilmektedir. KOK'ların plasentadan fetüse geçişinde önemli olan transport proteinlerinin ifadesi ve işlevine ilişkin türler arası pek çok ortak nokta olsa da ifade düzeyi ve ifadesi farklılıklar göstermektedir. Aynı ortamı paylaşsalar bile köpek ve insanlarda KOK konsantrasyonlarında, özellikle metabolizmasına bağlı olarak farklılıklar görülebilmektedir. Çevresel faktörlerin, hastalıkların etiyojoloji ve patogenezinde türler arasında ortak rol oynayabileceği düşünüldüğünde türler arası farklılıkların, bu proteinlerin fonksiyonuna yönelik etkilerinin araştırılması ve ilişkilendirilebilmesi açısından temel oluşturacağı görülmektedir (Yurdakok-Dikmen ve ark. 2022).

Plasentada bulunan trofoblast hücrelerindeki transport proteinleri, ksenobiyotiklerin transplasental dispozisyonunda (hücre içerisine alınması, uzaklaştırılması) görev alarak fetüsü maternal toksinlerden korur (Burton GJ ve ark. 2015). Potansiyel zararlı olan kimyasalların fetal kompartımana geçmesini engelleyen transport proteinleri arasında özellikle efluks transportundan sorumlu ATP'ye bağımlı olan, ATP-bağımlı taşıyıcı kaset (ATP-binding cassette-ABC) ailesi ve influks ya da hücre membranında iki taraflı taşımayı sağlayan çözünmüş-likit- taşıyıcı (solute liquid carrier-SLC) ailesi öne çıkmaktadır. Bu iki ailenin trofoblastın apikal ve bazolateral kısımlarında koordineli ekspresyonu, ilaç ve kimyasalların geçişinde, ilaç-ilaç etkileşimlerinde ve ilaca bağımlı yanıt ve toksik etkilerin görülmesinde belirleyici olmaktadır (Pang KS, ve ark. 2010). SLC ailesinin 380 üyesinin 48 alt ailesi içerisinde sadece 19'unun (organik anyon transport polipeptid-SLC0, oligopeptid transportör-SLC15, organik anyon/kasyon/zwitteriyon transportör- SLC22, organik kasyon transportör- SLC47) ksenobiyotik transportundaki işlevi tespit edilebilmiştir (Lin L ve ark. 2015). ABC transport genlerinin yedi alt ailesi insanda 49 farklı taşıyıcı proteinin kodlanmasından sorumludur. Bunlardan özellikle ABCB (p-glikoprotein, MDR1, ABCB1 gibi), ABCC (çoklu ilaç direnci ile ilişkili proteinler- MRP gibi) ve ABCG (BCRP, ABCG2 gibi) alt aileleri ilaç ve ksenobiyotiklerin taşınmasında önem taşır. Plasentadaki ABC transportları trofoblast hücresinden maternal dolaşıma maddeleri aktif olarak pompalar (Wakabayashi K ve ark. 2006). Trofoblast hücrelerindeki ABC transportlarının apikal yüzeyde (P-glikoprotein/P-gp, BCRP, MRP2) bazolateral yüzeye göre (MRP1) plasental bariyerde etkin olduğu bildirilmiştir (Ni Z ve ark. 2011). SLC transportlarından ise OCT (organik kasyon transport), OAT (organik anyon transport), karnitin

transportör (OCTN), nükleosid transportör (CNT), organik anyon transport polipeptidleri (OATP) ve çoklu ilaç ve toksin atım proteinlerinin (MATE) ilaç ve ksenobiyotiklerin taşınmasında önemli olduğu bildirilmiştir (Staud, Cerveny, and Ceckova 2012). Bu maddelerin transport protein ekspresyonundaki bozukluklara (polimorfizm, kimyasal veya diğer aracılı ekspresyon azalması/artması, fonksiyon bozuklukları) bağlı olarak fetüse geçebildiği ve konjenital anomalilere, gebeliğin sonlanmasına ve diğer fetal sağlık sorunlarına yol açabildiği gösterilmiştir (Daud ve ark. 2015). Transport proteinlerinin ekspresyon ve etkinliği, gebelik dönemi, gebeliğe özgü hormon düzeyleri, büyüme faktörleri, kullanılan ilaç ve hastalık durumuna bağlı olarak değişebilmektedir. Dolayısıyla fetüsün bu ksenobiyotiklere maruziyeti; gebelik süresince transport protein ifade ve fonksiyonuna göre değişebilmektedir (Ni and Mao 2011). Transport proteinlerinin endojen regülasyon kapsamında progesteron ve östrojenin ABCB1 ve ABCG2'de ifade seviyesinde artışa neden olduğu; glukokortikoidlerin ise ilaç taşınmasının önemli kontrol mekanizması olduğu, uzun süreli deksametazonun plasental ABCB1A/P-gp ekspresyonunu arttırdığı, ABCG2/BCRP ekspresyonunu ise azalttığı gösterilmiştir (Han LW ve ark. 2018). Fetüs hedefli ilaç taşıma sistemleri (unilamelar ipozomlar) ve farmakolojik manipülasyonlar (p-glikoprotein baskılanması gibi) ilaçların fetüse daha fazla miktarda geçmesini sağlayan plasental transport proteinlerine yönelik yapılan uygulamalardır; ancak plasental transport proteinlerinin hedefleri ve işlevlerine yönelik çalışmaların sınırlı olmasına bağlı olarak uygulamalar da henüz yaygın değildir (Staud F ve ark. 2012b).

GEREÇ ve YÖNTEM

Plasenta örnekleri

Araştırmada Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nde zamanında (38-42 hafta) canlı doğum yapan 25-35 yaş arası annelerden edilen plasenta örnekleri (n=60) ile Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hastanesi Doğum ve Jinekoloji Kliniği ile Ankara Çevresi kliniklerinde miyadında (58-63 gün) canlı doğum yapan (1-6 yaş) köpeklerden (n=25) (gebelik komplikasyonu, erken doğum, sistemik hastalıklar, düzenli aşılaması yapılmayan hayvanlar çalışma kapsamı dışında tutuldu) alınan plasenta örnekleri kullanıldı. Araştırma; Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (Etik Kurul Onayı: 07.03.2019 tarih ve 2019-5-49 sayılı karar) ve Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (Etik Kurul Onayı: 20.02.2019 tarih ve 2019-5-49 sayılı karar) belirlemiş olduğu etik ve Helsinki Bildirgesi prensipleri göz önünde bulundurularak yapıldı. Örneklerin elde edilmesi ve bölümlendirme işlemi Şekil 1'de gösterildi.

GC-MS analizi

Örneklerin GC/MS analizi için hazırlanması, kirletici analizi için örneklerin ekstraksiyonu ve derivatizasyonu, GC/MS analizi için cihaz optimizasyonu ve validasyonu tamamlandı (Yurdakok-Dikmen ve ark. 2022).

RNA-Seq analizi

RNA izolasyonu için örnekler, sıvı azot içerisinde çıkarılarak, RNAaz ari şartlarda; GeneAll Hybrid-R (GeneAll, Güney Kore) kiti kullanılarak yapıldı. RNA izolasyonunu takiben RNA konsantrasyonu NanoDrop ND-1000 Spektrometre (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) ile tayin edildi. Absorbans 260/280 oranı 2.0-2.2 arası olan örnekler çalışmaya dahil edildi, örnek kalitesi çalışmaya uygun düzeyde değil ise hastanın yedik örneğine dönüldü ve izolasyon işlemi tekrarlandı. Plasentadan RNA ekstraksiyonuna ilişkin köpeklerde herhangi bir kaynak bulunmamaktadır. İnsan örneklerinde yapılan araştırmalarda ise dokunun yapısı nedeniyle RNA bütünlüğünün çoğunlukla sağlanamadığı ve RNA degradasyonuna açık olduğu (kanda ve dokuda yüksek RNAaz aktivitesi bulunması nedeniyle) görülmektedir. Araştırmada da örneklerdeki ekstraksiyonlar ideal analizin yapılabilmesi için optimize edilmiştir (Şekil 2). İnsan placentada örnekleri (n=55) ile gerçekleştirilen RNAseq analizleri sonrasında biyoinformatik analizler Cancer Genomic Cloud üzerinden gerçekleştirildi. Ardından R program alt yazılımlarından DeSeq paketi kullanıldı.

In silico

Moleküler yerleştirme simülasyonları ve konformasyonel analiz, Autodock Vina'nın web tabanlı sürümü Webina 1.0.3 kullanılarak yapıldı (Suemune ve ark. 2022). Test edilen ligandlar PubChem kimyasal veri tabanından SDF formatında, proteinler ise PDB formatında RCSB PDB (Research Collaboratory Structural Bioinformatics Protein Data Bank) veri tabanı kullanılarak indirildi.

In vitro

HTR8/SVneo (ATCC CRL-3271TM) hücre hattı L-glutamin ve 25mM HEPES, %5 FBS (Biological Industries, İsrail) ve %1 Penisilin-Streptomisin (Biological Industries, İsrail) içeren RPMI 1640 (Biological Industries, İsrail) ortamında 37°C'de kültüre edildi. Hücre konfluensliği, Juli FL Live Cell Analyzer cihazında otomatik olarak hesaplandı (NanoEnTek Inc, Seul, Güney Kore).

PCB118, PCB101 ve B-HCH (12 seri seyreltme ile), ortam (negatif kontrol) ve Triton X ile inkübe edildi. 24 saatlik bir inkübasyonun ardından hücreler PBS ile nazikçe yıkandı, süpernatantlar çıkarıldı ve MTT solüsyonu (Sigma-Aldrich, MO, USA) uygulandı. 540 nm'de absorbans, bir mikropilaka okuyucu (SpectraMax i3/i3x MultiMode Detection Platform,

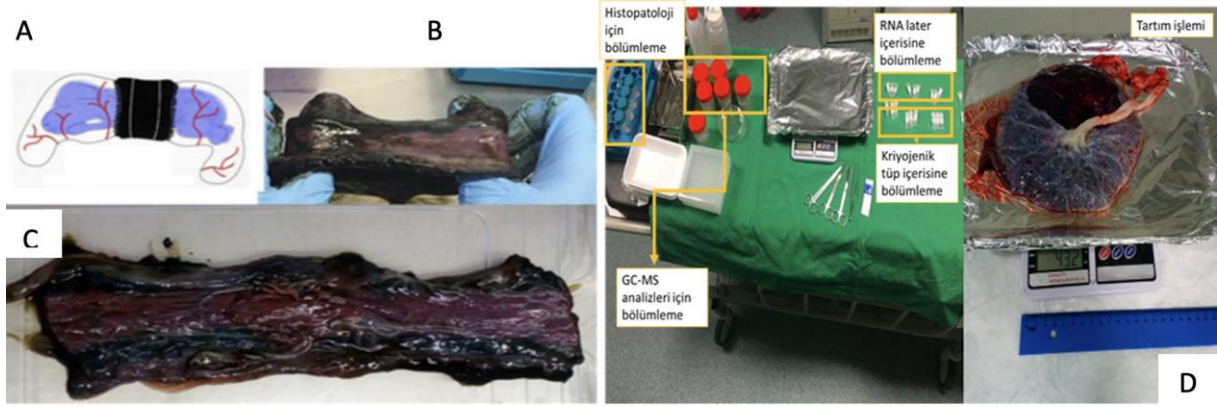
Molecular Devices, Sunnyvale, CA) kullanılarak ölçüldü ve toksisite yüzdesi, pozitif (Triton X) ve negatif kontroller (yalnızca orta) kullanılarak hesaplandı. IC50'yi hesaplamak için regresyon eğrisi. IC50, GraphPad Prism 7 yazılımı kullanılarak hesaplandı.

qPCR analizi

2x10⁴ hücre, qPCR analizi için 6 kuyucuklu plakalarda PCB118, PCB101 ve B-HCH MTT tarafından belirlenen IC50/2 ve IC50/4 konsantrasyonları uygulanarak 24 s inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, qPCR adımları gerçekleştirildi. mRNA, üreticinin talimatlarına göre GeneAll kiti kullanılarak ekstrakte edildi. İlgili genlerin eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile amplifikasyonu, cDNA, 500 nM ileri ve geri primer ve SYBR Green PCR Master Mix Buffer (BioRad, ABD) kullanılarak toplam 20µl hacimde üreticinin protokolüne göre gerçekleştirildi. Housekeeping gen olarak beta-aktin kullanıldı (Lan ve ark. 1. 2017). Döngü koşulları aşağıdaki gibidir: 95°C'de 2 dakika süreyle ilk denatürasyon, ardından 40 döngü 95°C 15's, sırasıyla ABCB1 için 62 °C, Beta-aktin için 62 °C ve SLC22a6 için 57 °C'de 15's ve 68°C 20's. Amplifikasyon için aşağıdaki primerler kullanıldı: ABCB1 + 5'-GTC TGG ACA AGC ACT GAA A-3', ABCB1- 5'-AAC AAC GGT TCG GAA GTT T-3', beta-aktin, + 5'-TGAAACGACTGGAGGTGGACA-3', rev CACGAGCTAAAGCCCTACTGC. SLC22a6 5'-CTCAGCTCCCGGAGCAACCCA -3', GCCCCAGCCGCTGGGCTGGG. Real-time PCR amplifikasyonları, bir CFX96 Real-Time System (Biorad) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Tüm deneyler iki kopya halinde yapıldı ve 7500 Software v2.0.6 ile analiz edildi. Referans gen olarak beta-aktin ve GAPDH (Arenas-Hernandez ve Vega-Sanchez 2013) kullanıldı.

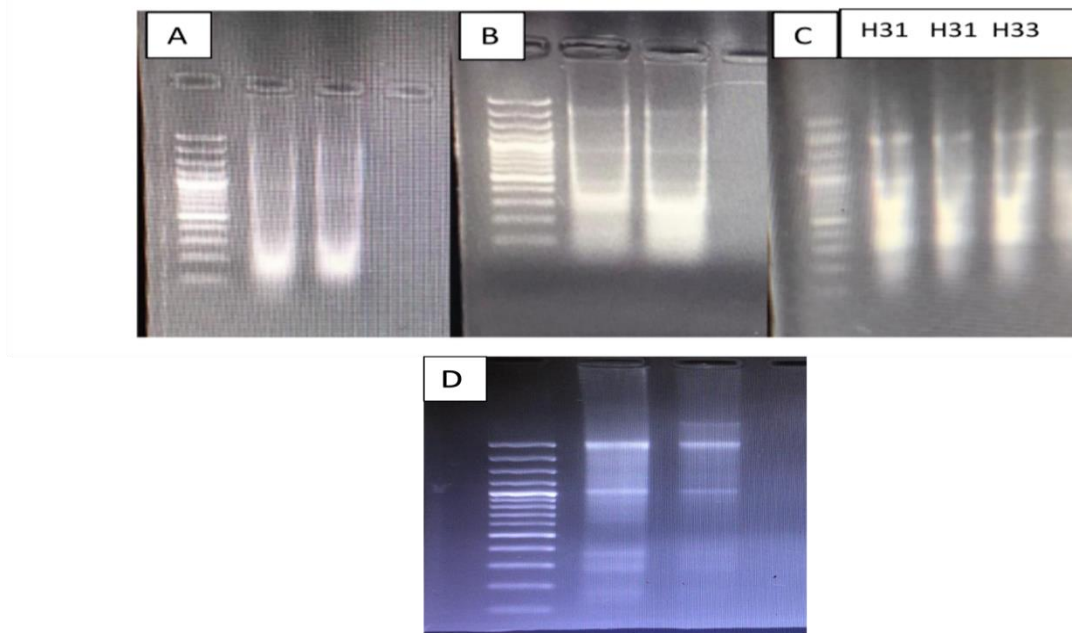
İstatistiksel analiz

Veri girişleri Microsoft Excel kullanılarak yapıldı. Sitotoksosite testlerinde IC50 değeri için GraphPadPrism 9.3.1 ve NCSS2007 yazılımları kullanıldı, en yüksek powera sahip eğri ile hesaplama tamamlandı. İstatistik analiz için SPS 11.00 sürümünden yararlanıldı. rtPCR bulguları delta-delta Ct metot kullanılarak değerlendirildi (Zhang, Ruschhaupt, and Biczok 2013). mRNA ifadesi kat değişimi ve ortalama standart sapma olarak verildi, farklı genlerin ifade karşılaştırılmasında ANOVA kullanıldı. P anlamlılık değeri <0.05 olarak kabul edildi. Biyoinformatik analizler için R3.1.1. yazılımı kullanıldı ve DAVID programının kendine ait alt istatistik verileri kullanıldı. Yolak analizi için Reactome yazılımı kullanıldı, FDR (Hochberg yanlış keşif oranı) değerlendirmeye alındı.



Şekil 1. Örneklerin elde edilmesi ve bölümlendirme işlemi

A. Köpek plasenta morfolojisi şematik gösterimi. B. Sezaryen operasyonu sonrası alınan köpek plasenta örneği (Ring) yüzük şeklinde görünümü. C. Plasenta yüzük morfolojisi açılmış hali. D. İnsan Plasenta Örneklerinin Bölümlendirme İşlemi



Şekil 2. RNA ekstraksiyon optimizasyonu için yapılan denemelere örnekler.

A. Doğrudan ekstraksiyon tamponuna konulan H31 ve H33 örnekleri ile ekstraksiyon yapıldı, B. Doğrudan ekstraksiyon tamponuna ve buz içerisinde çalışılan H31 ve H33 örnekleri ile ekstraksiyon yapıldı. C. Doğrudan beta mercaptoethanol (BME) eklenmiş ekstraksiyon tamponuna konulan ve buz içerisinde çalışılan H31 ve H33 örnekleri ile ekstraksiyon yapıldı. D. Doğrudan BME eklenmiş ekstraksiyon tamponuna konulan ve içerisinde örneklerin erimesi beklenilmeden disekte edildi H31 ve H33 örnekleri ile ekstraksiyon yapıldı.

BULGULAR

GC-MS

Değerlendirilen 28 kirleticiden, hedef analitlerin birikimi türlere göre farklılık gösterdi. İnsan plasentalarındaki kontaminasyonun insidansı ve konsantrasyonu, doğum sayısı, yaş, çalışma durumu ve ızgara et tüketimi gibi belirli faktörlerden etkilenmedi ve köpeklerin daha yüksek atılım hızına sahip olduğu gösterildi. Plasenta için validasyon parametreleri uygun bulundu. Tüm katsayı verisi >0,99 idi. Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik için hesaplanan tüm görece standart sapma değerleri (RSD) < %20 idi. PCB 101, PCB118 ve β -HCH için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.48-1.45; 0.49-1.47; 0.63-1.89 $\mu\text{g}/\text{kg}$ arasında bulundu.

Tümanalitler için geri kazanımlar %97.6-99 arasında bulundu. Böylece ekstraksiyon yönteminin Eurachem Kılavuzuna uygun olduğu görüldü (Yurdakok-Dikmen ve ark. 2022). İnsan numunelerinde bir örnekte PCB101 826.400 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 23 örnekte ise PCB118 0.14 ile 41.9 arasında bulundu; köpek numunelerinde ise LOQ değeri üzerinde PCB kirleticisine rastlanmadı.

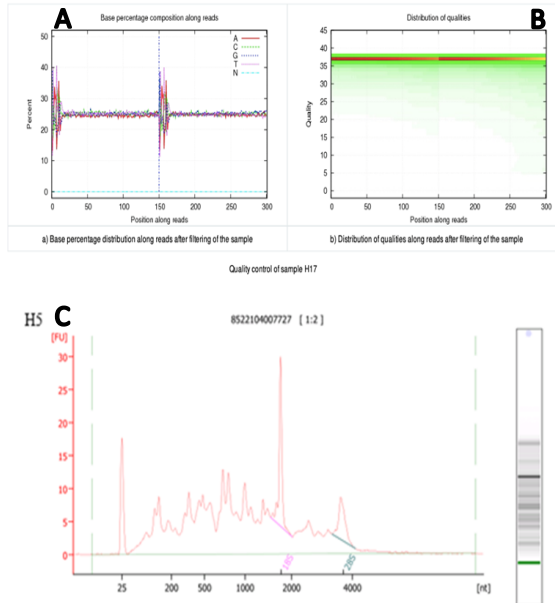
Tablo 1. Örneklerde pozitif çıkan ve in vitro analizlerde uygulanan analitler için validasyon parametreleri.

Kirletici	Linearite (µg/kg)	r2	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	G. K (%)	T.E (RSD%)	O.H (RSD%)
PCB101	5-100	0.994	0.48	1.45	97.9 ± 6.6	5.70	5.10
PCB118	5-100	0.993	0.49	1.47	97.6 ± 9.6	5.20	5.40

(Yurdakok-Dikmen ve ark. 2022) (G. K: Geri Kazanım, T. E: Tekrar Edilebilirlik, O. H: Orta Hassasiyet).

Biyoinformatik

RNA ekstraksiyon optimizasyonunu takiben uygun kalitede ekstraktlar veya RNA örnekleri elde edildi. RIN (RNA Intact Number) değerleri 5.5 ile 7 arasında bulundu. Bu değer kabul edilebilir çalışma aralıklarında bulundu (Wolfe ve ark. 2014). Veri filtrelemede okumalar boyunca yer alan bazların yüzdesi ve kalite dağılımı ile analiz edilen baz kalite dağılımı örnekleri ile biyoanalizör jel sonucu örnekleri Şekil 3'te gösterildi.



Şekil 3. A. Numunelerin filtrenmesi sonrasında okumalarda yer alan bazların yüzde bileşimi. B. Numunelerin filtrenmesi sonrasında okumalarda yer alan kalite dağılımı. C. Analiz edilen baz kalite dağılımı örnekleri ile biyoanalizör (bioanalizer) jel sonucu örneği.

İnsan numunelerinde test edilen gruplar arasında, negatif numunelere kıyasla PCB pozitif grup için 742 genin farklı şekilde ifade edildiği gösterildi ($p < 0.05$). 742 gen içerisinde p değeri en düşük olan ilk 10 gen bölgesi Tablo 2'de gösterildi. Köpek numunelerinde PCB pozitif örnek bulunmaması nedeniyle inforamatik araştırma yapılmadı.

Tablo 2. PCB tespit edilen ve edilmeyen gruplarda p değerine göre fark görülen genler (ilk 10).

Gen adı	p	Kat değişimi
GYPC	0.00012	4.61
PAGE2	0.00012	6.03
SLC4A1	0.00013	5.66
RPS17	0.00014	4.37
GALNT3	0.00014	5.95
MAP1LC3C	0.00018	4.22
STC1	0.00018	5.06
GREB1L	0.00018	5.77
ALAS2	0.00027	5.17
CRHBP	0.00029	3.67

Araştırma konusu olan SLC için 14 gen ve ABC için 2 gende anlamlı farklılık bulundu (Tablo 3).

Tablo 3. PCB tespit edilen ve edilmeyen gruplarda ifade farklılığı bulunan SLC ve ABC genleri ($p < 0.05$).

GeneID	p	Kat değişimi
SLC4A1	0.00013	5.66
SLC38A5	0.00056	4.73
SLC25A12	0.0007	4.61
SLC30A8	0.0011	4.23
SLC14A1	0.0047	2.80
SLC15A1	0.0072	2.33
SLC39A10	0.0122	2.35
SLC33A1	0.0154	2.04
SLC25A6	0.0162	1.85
SLC22A18AS	0.0169	2.07
SLC25A37	0.0207	1.97
SLC31A1	0.0355	1.61
SLC6A12	0.0365	1.33
SLC4A4	0.0415	1.41
ABCA8	0.023	1.50
ABCC1	0.0253	1.66

İn siliko

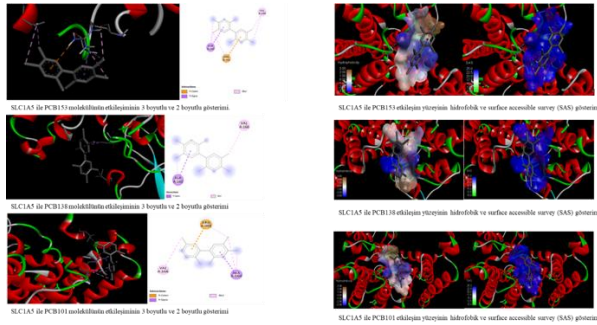
Birbirine ilgisi olan moleküllerin (önerilen çalışmada, kirleticiler ve hücre proteinleri) etkileşim süreçlerinin aydınlatılmasında Docking (moleküler kenetleme) analizi kullanıldı. Protein Data Bank ve ChemicalPub taramaları sonucunda, iki tane kararlı yapıda ve 3 boyutlu uzaydaki konformasyonu belli olan molekül elde edildi. Docking analizinde bu iki molekülün (protein-ligand etkileşimi) birbirleriyle olan ilişkisi incelendi. Ligandın proteinin hangi epitoplarna hangi enerji değerleriyle bağlandığı tespit edildi. Bu bilgilerin ışığında hücre içine giren kirleticilerin hangi aday proteinlerle ve nasıl etkileştiklerine dair önemli bilgileri elde edildi.

Bu aşamada Swissdock (Grosdidier A ve ark. 2011) ve Autodock Vina programları kullanıldı.

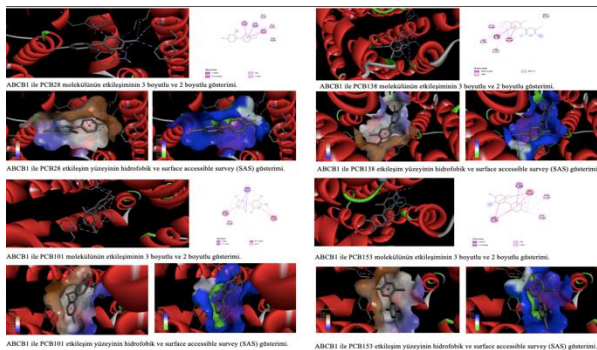
Protein-ligand etkileşimlerinin enerji değerleri üzerinden değerlendirme yapıldı. Etkileşim yüzeyleri hidrofobik ve SAS görüntüleri SLC için Şekil 4'te, ABCB1 için Şekil 5'te gösterildi. ABCB1 ile PCBlerin bağlanma afinitesi, SLC1A5'e göre daha yüksek bulundu. En yüksek bağlanma afinitesi PCB118 ile ABCB1 arasında bulundu (Tablo 4).

Tablo 4. Ligand-protein bağlanma afinitesi.

Ligand	Bağlanma Afinitesi
ABCB1_PCB28	-8.3
ABCB1_PCB101	-7.2
ABCB1_PCB138	-7.5
ABCB1_PCB153	-8.3
ABCB1_PCB180	-7.3
ABCB1_PCB118	-8.4
SLC1A5_PCB28	-3.2
SLC1A5_PCB101	-3.4
SLC1A5_PCB138	-3.4
SLC1A5_PCB153	-3.5
SLC1A5_PCB180	-3.5
SLC1A5_PCB118	-3.4



Şekil 4. SLC1A5 ile PCB153,138,101 arasında etkileşim yüzeyleri hidrofobik ve SAS görüntüleri.

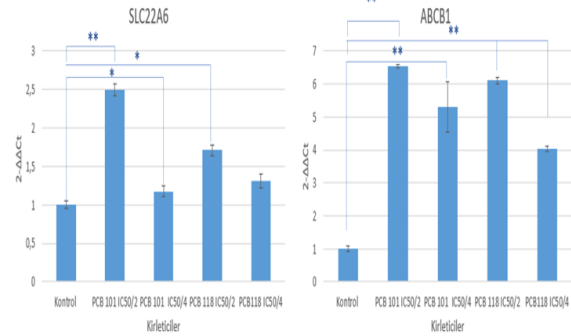


Şekil 5. ABCB1 ile PCB 28, 101,138, 153 arasında etkileşim yüzeyleri hidrofobik ve SAS görüntüleri.

qPCR

In vitro MTT sitotoksinite çalışmasında IC50 değerleri Pcb118 için 225 ve Pcb101 için 185 µg/ml olarak bulundu. IC50 dozunun alt dozları (IC50/2 ve IC50/4) ile transport genleri ifadesi için çalışıldı. ABCB1 ve SLC22A6 mRNA ifadeleri test edilen dozlarda (IC50/2 ve IC50/4 dozlarında) doza bağımlı

olarak arttı. En yüksek artış kontrole göre 6.54 mRNA ifadesinde artış ile PCB101 ve ABCB1 için bulundu (Şekil 6).



Şekil 6. PCB 101 ve PCB 118 uygulanan HTR8/SVneo'da SLC22A6 ve ABCB1 mRNA ifadesi. (* p<0.05, ** p<0.01)

TARTIŞMA

İnsan ve çevre sağlığını korumak, maruziyeti azaltmak için 2004 yılında yürürlüğe giren Stockholm Sözleşmesi kapsamında KOK'ların üretim ve kullanımı sınırlandırılıp yasaklanmasına karşın (PCB'ler, diklorodifeniltriokloroetan-DDT ve ana metaboliti diklorodifenil dikloroetan-DDE, polibromludifenileterler-PBDE, heksaklorobenzen-HCB), bu maddelerin kalıcılıklarına bağlı olarak toplumda düşük dozda KOK maruziyeti görülmektedir. Bu antropojenik bileşiklerden polibromlu difenil eterler poliüretan köpüklerin, mobilyaların, inşaat malzemelerinin, araba koltuklarının ve elektronik ekipmanların (cep telefonu, televizyon kumandası gibi) imalatında alev geciktirici katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Bu bileşikler ürün malzemelerine kovalent olarak bağlanamazlar ve materyal yüzeyinden ayrılabilirler için çevreye kolayca salınabilme özelliğine sahiptirler (Siddiqi MA ve ark. 2003). Klorlu hidrokarbon bileşiklerden PCB'lerin 209 ayrı bileşiği (konjener) bulunur. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından kanserojenik olarak (sınıf 1) sınıflandırılmış olup; reproduktif, gelişimsel ve endokrin bozucu etkinlik oluşturdukları bildirilmiştir. In utero maruziyet nedeniyle, bu maddelerden uzaklaşabilme imkanı olmayan; organ sisteminin, detoksifikasyon enzim ve diğer mekanizmaların işlevselliğini kazanamamış fetüs, popülasyon içerisinde en duyarlı gruptur. KOK maruziyetine bağlı olarak işlevselliği değişen ve bozulan membran transportları nedeniyle, bu maddelerin plasental bariyeri geçerek plasental kan dolaşımına geçebileceği bildirilmiştir. Yukarıda bahsedilen erişkin koroner arter ve diyabet hastalıklarına temel oluşturacak epigenetik (Reynolds R ve ark. 2013) ve glukoz metabolizmasında değişiklikler (Herbstman J ve ark. 2008) ile gestasyonel hipertansiyon ve preeklampsiye (Zhu Y ve ark. 2017) ek olarak KOK'ların fetüste; yapısal anomaliler, fonksiyonel eksiklikler, konjenital

neoplazi, büyüme geriliği (Triche E 2007), erken doğum (Padula A 2018) , in utero vitamin D yetersizliği (fetüste akciğer ve bağışıklık sistemi için kritik), sistemik enflamasyon (Yurdakök K, 2013) , düşük doğum ağırlığı (Vafeiadi ve ark. 2014), abortus (Kumar S, 2011) ve fetus ölümüne (Yang S ve ark. 2018) neden olabildiği gösterilmiştir. Prenatal PCB konsantrasyonunun, düşük doğum ağırlığına (yaşama gücü, diyabet ve kardiyovasküler sistem hastalıklarıyla ilişkili kronik hastalıklara etkilidir) sebep olduğu bildirilmiştir. (Debost-Legrand A ve ark. 2016). Ayrıca, prenatal PCB maruziyetinin gelişim gerilikleri (Hertz-Picciotto I, ve ark. 2005) , nörolojik gelişimsel gerilikler (Park H, ve ark. 2010), astım (Karmaus W, ve ark. 2008) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada farklı plasental yapıya sahip insan ve köpeklerde farklı fonksiyona sahip olabilecek membran transport proteinleri ifadelerinin, kirleticilere bağlı olarak değişebileceği hipotezi araştırılmış ve bu proteinlerin fonksiyonu ve koruyucu özelliklerinin daha iyi anlaşılması amaçlanmıştır. Hem hayvan, hem de insan sağlığı için risk değerlendirmelerinin temelini oluşturan toksikokinetik çalışmalar için önemli bir altyapı oluşturması bakımından araştırma bulgularımız önem taşımaktadır.

Literatürde PCB ile membran taşıyıcı proteinler arasında ilişkiyi gösteren bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte halojenli hidrokarbonların membran taşıyıcı proteinlerin ifadesini etkileyerek ilaçların toksikokinetik, toksisite ve farmakokinetik etkinliğini değiştirdiği ortaya konmuştur (Fardel ve ark, 2011). Plasentada yoğun miktarda bulunan SLC ailesine ait taşıyıcı proteinlerden hENT1, FR α , ve SERT ve ABC protein ailesinden ABCB1, ABCG2, ABCC2 gen ifadelerinin PCB, PAH ve Fitalat gibi çevresel kirleticilerin bu proteinlere olan affiniteleri ile değişebileceği görülmüştür (Li ve ark. 2021). Çevresel PCB maruziyetinin Parkinson hastalığının etiolojisiyle ilgili mekanistik ilişkisini araştıran deneysel bir çalışmada, doza bağlı striatal dopamin taşıyıcı protein (SLC6A3) ifadesinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Caudle, 2006); benzer bir bulgu transformatörlerde kullanılan ve yasaklanan PCB karışımı Araclor için de bulunmuştur (Bemis, 2004). Araştırmamızın biyoinformatik bulgularına göre, SLC6A3'e ilişkin anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. Bunun, kontrol gruplarının sadece PCB maruziyetine göre ayrılmış olması, PCB ve kontrol gruplarında farklı kirleticilerin (pestisit, ağır metal, kalıcı organik kirleticiler, fitalat/adipat, diğer plastikleştiriciler gibi) bulunmasına bağlı olabileceği değerlendirilmiştir. Proje kapsamında (119S702), gündelik maruziyete uygun şekilde çoklu organik kirleticiler çalışılmıştır (PBDE, PCB, organoklorlu pestisit, PAH gruplarında 28 kirleticiler), ancak bu araştırmada sadece PCB ile ilişkili değerlendirme yapılmıştır. Bulgularımız, çoklu organik kirleticilerin

transport proteinleri üzerine etkilerinin tekli maruziyetten farklı olabileceğini göstermektedir. RNA-Seq verilerine göre test edilen gruplar arasında, negatif numunelere kıyasla PCB pozitif grup için 742 genin farklı şekilde ifade edildiği gösterildi. Bu verilerin içinde farklı ifade edilen SLC22A6 ve ABCB1 genleri qPCR ve in siliko yöntemlerle desteklenerek plasentada saptanan PCB yükünün hücre membran transferinde sorumlu olan genlerin ifadelerinde değişime yol açtığı gösterilmiştir. KOK'ların organizmaya etkilerinin araştırılmasında, öncelikle bu bileşiklerin hücre içerisine alınmasını ve atılımını kontrol eden membran transportları ön plana çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda KOK'ların çoğunluğunun (DDT, DDE, DDD, dieldrin, endrin, PCB-146, PCB-170, PCB-187, PBDE-47 ve PBDE-100) P-gp gibi transportlarla etkileşime girerek, bu proteinlerin taşıma işlevini engellemek suretiyle normalde hücreden atılabilecek ksenobiyotiklere karşı canlıları duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Nicklisch SC ve ark. 2016). Araştırmamızda in siliko bulgularında PCBlerin bağlanma affinitesi ABCB1'de SLC'ye (SLC1A5) göre daha yüksek bulundu. ABCB1 mRNA ifadesi PCB101'in IC50/2 dozunda SLC22A6'ya göre 2,6 kat daha yüksek bulundu; PCB118 için ise bu fark 3,57 kat idi. PCB'lerin ABCB1 ifadesine etkisi çalışılan SLClere göre daha yüksek bulunmuştur. Araştırmamızın in siliko bulguları, in vitro bulgular ile paralellik göstermiştir.

SLC grubunda, sekans bulgularında en düşük p değerine sahip SLC4A1 geni tarafından kodlanan protein, anyon değiştirici (AE) ailesinin bir parçasıdır ve dokulardan akciğerlere karbondioksit taşınmasında rol oynayan bir klorür/bikarbonat değiştirici olarak işlev gördüğü eritrosit plazma zarında ifade edilmektedir. İkinci gen olan SLC38A5 tarafından kodlanan protein ise sodyuma bağlı amino asit taşıyıcısıdır. ABC transporterlarından ifadesi farklı olan ABCA8 geni tarafından kodlanmış protein, lipid metabolizmasını düzenlemede ve miyelinin oluşumu ile korunmasında görev alırken, ABCC1 tarafından kodlanan protein, substrat olarak oksitlenmiş glutasyon, sisteinil lökotrienler için organik anyon taşıyıcısı olarak işlev görür. Aynı zamanda steroid hormonlarının ve safra tuzlarının glukuronidlerini ve sülfat konjugatlarını da taşır (Genecards 2022). Araştırmamız bulgularında da gösterildiği üzere, plasentada kirleticilere bağlı transport proteinlerini kodlayan genlerde ifade değişiklikleri bulunmakta olup, fetal gelişim üzerine etkileri için deneysel in vivo çalışmaların yapılması için önemli bir alt yapı sağlamıştır.

SONUÇ

KOK maruziyetine bağlı, ksenobiyotiklerin transplasental olarak fetüse aktarılmasında plasental transport proteinlerinin ekspresyon miktarı ve fonksiyonu değişebilmektedir. Fetüsün kirleticilere karşı korunmasında ekspresyondaki değişiklikler büyük öneme sahiptir. Yapılan araştırmalar plasentada kirletici miktarının tespitine veya plasental membran proteinlerinin deneysel koşullarda bir veya birkaçının maruziyetine bağlı ifadesinin araştırılmasına yönelik olup, gerçek maruziyet koşullarında etkileşimi ve bu etkileşimin yollarını kapsayan bir araştırma bulunmamaktadır. Araştırma kapsamındaki hem epidemiyolojik hem de deneysel bulgularımız, PCB maruziyetine bağlı özellikle ABCB1 ifadesinde artış olduğunu göstermektedir. Sekans bulgularında ifade artışı olan genlerin eş zamanlı farklı maruziyetlere bağlı olabileceği veya polimorfizmlerden kaynaklanabileceği düşünülse de in vitro bulgularımız bu değerlendirmemizi kuvvetlendirmektedir. ABCB1 artışı koryoamniyonit gibi enflamasyon durumu, gestasyon dönemi gibi fizyolojik faktörler veya maternal stresten de etkilenebilmektedir (Han, Gao, and Mao 2018). İlerleyen çalışmalarda, epidemiyolojik ve in vitro araştırmamızın bulgularının in vivo deneysel modellerde de teyit edilmesi amaçlanmıştır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, bu makalenin araştırılması, yazarlığı ve/veya yayımlanması ile ilgili olarak herhangi bir potansiyel çıkar çatışması beyan etmemiştir.

Yazar Katkıları

Plan, tasarım: BYD, AF. **Gereç ve yöntem ve veri toplama:** Hücre kültürü ve rt-PCR analizler RU, YT, BYD; insan plasenta örneklerinin toplanması ÖÖ, HTÇ; köpek plasenta örneklerinin toplanması HK, KKA; kromatografik analizler ÖK, ÜGB, AF; moleküler kenetleme: MAÜ; informatik değerlendirme: ÇA; sekans optimizasyon: HÖS. **Veri analizi ve yorum:** RU, BYD, ÖK, HÖS. **Yazım ve eleştirel değerlendirme:** BYD, AF, HÖS.

Finansal Destek

Bu çalışma TÜBİTAK 119S702 numaralı proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

Arenas-Hernandez, Marcia, and Rodrigo Vega-Sanchez. (2013). Housekeeping gene expression stability in reproductive tissues after mitogen stimulation. *BMC research notes*, 6.1: 1-7. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-285>.

Bemis, Jeffrey C., and Richard F. Seegal. (2004). PCB-induced inhibition of the vesicular monoamine transporter predicts reductions in synaptosomal dopamine content." *Toxicological Sciences*, 80.2: 288-295. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh153>.

Burton, G. J., & Fowden, A. L. (2015). The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1663), 20140066. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0066>.

Caudle, W. M., Richardson, J. R., Delea, K. C., Guillot, T. S., Wang, M., Pennell, K. D., & Miller, G. W. (2006). Polychlorinated biphenyl-induced reduction of dopamine transporter expression as a precursor to Parkinson's disease-associated dopamine toxicity. *Toxicological Sciences*, 92(2), 490-499. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl018>.

Daud, Aizati NA, et al. (2015). P-glycoprotein-mediated drug interactions in pregnancy and changes in the risk of congenital anomalies: a case-reference study. *Drug safety* 38.7: 651-659. <https://doi.org/10.1007/s40264-015-0299-3>.

Debost-Legrand, A., Warembourg, C., Massart, C., Chevrier, C., Bonvallot, N., Monfort, C., ... & Cordier, S. (2016). Prenatal exposure to persistent organic pollutants and organophosphate pesticides, and markers of glucose metabolism at birth. *Environmental research*, 146, 207-217. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2016.01.005>.

Genecards. (2022). SLC4A1 Gene - GeneCards | B3AT Protein | B3AT Antibody. Genecards, the Human Gene Database. 2022.

Han, L. W., Gao, C., & Mao, Q. (2018). An update on expression and function of P-gp/ABCB1 and BCRP/ABCG2 in the placenta and fetus. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 14(8), 817-829. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1499726>

Herbstman, J. B., Sjödin, A., Kurzon, M., Lederman, S. A., Jones, R. S., Rauh, V., ... & Perera, F. (2010). Prenatal exposure to PBDEs and neurodevelopment. *Environmental health perspectives*, 118(5), 712-719.

Hertz-Picciotto, I., Charles, M. J., James, R. A., Keller, J. A., Willman, E., & Teplin, S. (2005). In utero polychlorinated biphenyl exposures in relation to fetal and early childhood growth. *Epidemiology*, 648-656.

Karmaus, W., Osuch, J., Zhang, J., Mikucki, D., & Haan, P. (2008). Prenatal exposure to PCBs is related to asthma in female adult offspring. *Epidemiology*, 19(6), S128.

Lan, Xi, et al. "Bisphenol A exposure promotes HTR-8/SVneo cell migration and impairs mouse placentation involving upregulation of integrin-β1 and MMP-9 and stimulation of MAPK and PI3K signaling pathways." *Oncotarget* 8.31 (2017): 51507. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.17882>

Lin, L., Yee, S. W., Kim, R. B., & Giacomini, K. M. (2015). SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nature reviews Drug discovery*, 14(8), 543-560. <https://doi.org/10.1038/nrd4626>.

Ni, Z., & Mao, Q. (2011). ATP-binding cassette efflux transporters in human placenta. *Current pharmaceutical biotechnology*, 12(4), 674-685.

- Nicklisch, S. C., Rees, S. D., McGrath, A. P., Gökirmak, T., Bonito, L. T., Vermeer, L. M., ... & Hamdoun, A. (2016). Global marine pollutants inhibit P-glycoprotein: Environmental levels, inhibitory effects, and cocrystal structure. *Science advances*, 2(4), e1600001. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600001>.
- Padula, A. M., Huang, H., Baer, R. J., August, L. M., Jankowska, M. M., Jellife-Pawlowski, L. L., ... & Woodruff, T. J. (2018). Environmental pollution and social factors as contributors to preterm birth in Fresno County. *Environmental Health*, 17(1), 1-21.
- Pang, K. S., Rodrigues, A. D., & Peter, R. M. (2010). Enzyme-and Transporter-Based Drug-Drug Interactions. New York: Springer, 2010, 301-307. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0840-7>.
- Park, H. Y., Hertz-Picciotto, I., Sovcikova, E., Kocan, A., Drobna, B., & Trnovec, T. (2010). Neurodevelopmental toxicity of prenatal polychlorinated biphenyls (PCBs) by chemical structure and activity: a birth cohort study. *Environmental Health*, 9(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-9-51>.
- Reynolds, R. M. (2013). Glucocorticoid excess and the developmental origins of disease: two decades of testing the hypothesis—2012 Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology*, 38(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.08.012>.
- Siddiqi, Muhammad Akmal, Ronald H. Laessig, and Kurt D. Reed. "Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): new pollutants—old diseases." *Clinical medicine & research* 1.4 (2003): 281-290. Staud, Frantisek, Lukas Cervený, and Martina Ceckova. "Pharmacotherapy in pregnancy; effect of ABC and SLC transporters on drug transport across the placenta and fetal drug exposure." *Journal of drug targeting* 20.9 (2012): 736-763. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.716847>.
- Suemune, Hironori, et al. "Crystal structures of a 6-dimethylallyltryptophan synthase, IptA: Insights into substrate tolerance and enhancement of prenyltransferase activity." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 593 (2022): 144-150. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2022.01.018>.
- Triche, E. W., & Hossain, N. (2007, August). Environmental factors implicated in the causation of adverse pregnancy outcome. In *Seminars in perinatology* (Vol. 31, No. 4, pp. 240-242). WB Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2007.07.013>.
- Vafeiadi, Marina, et al. "Persistent organic pollutants exposure during pregnancy, maternal gestational weight gain, and birth outcomes in the mother-child cohort in Crete, Greece (RHEA study)." *Environment international* 64 (2014): 116-123. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2013.12.015>.
- Wakabayashi, K., Tamura, A., Saito, H., Onishi, Y., & Ishikawa, T. (2006). Human ABC transporter ABCG2 in xenobiotic protection and redox biology. *Drug metabolism reviews*, 38(3), 371-391.
- Wolfe, L. M., et al. "Banking placental tissue: an optimized collection procedure for genome-wide analysis of nucleic acids." *Placenta* 35.8 (2014): 645-654. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.05.005>.
- Yang, Shaoping, et al. "Ambient air pollution the risk of stillbirth: a prospective birth cohort study in Wuhan, China." *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 221.3 (2018): 502-509.
- Yurdakok-Dikmen, B., Kuzukiran, O., Uyar, R., Boztepe, U. G., Çelik, H. T., Ozyuncu, O., ... & Filazi, A. (2022). Live in same region, respond differently: Canine and human response to pollutants in placental accumulation. *Chemosphere*, 301, 134470. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134470>.
- Yurdakök, K. (2013). Ambient air pollution and the fetus. *Journal of Pediatric and Neonatal Individualized* 2 (2): 1-6. <https://doi.org/10.7363/020232>.
- Zhang, J. D., Ruschhaupt, M., & Biczok, R. (2013). ddCt method for qRT-PCR data analysis. *Citeseer*, 48(4), 346-356.
- Zhu, Y., Zhang, C., Liu, D., Ha, S., Kim, S. S., Pollack, A., & Mendola, P. (2017). Ambient air pollution and risk of gestational hypertension. *American journal of epidemiology*, 186(3), 334-343. <https://doi.org/10.1093/aje/kwx097>.