

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ (VETERİNER)
DOKTORA PROGRAMI

OKRATOKSİN A TOKSİKASYONUNDA
FOLİK ASİT VE ELLAJİK ASİDİN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

MEMDUHA ERZURUM
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Murat BOYACIOĞLU

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VFT-15083 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2020

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji (Veteriner) Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Memduha ERZURUM tarafından hazırlanan “Okrotoksin A Toksikasyonunda Folik Asit ve Ellajik Asidin Etkilerinin Araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 23/12/2019

Üye (T.D.)	: Doç. Dr. Murat BOYACIOĞLU	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye	: Prof. Dr. Selim SEKKİN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye	: Prof. Dr. Funda KIRAL	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye	: Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ	Ankara Üniversitesi
Üye	: Prof. Dr. Songül SONAL	Uludağ Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cavit KUM
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalıőmam sũresince, tecrũbesi ve hoőgũrusũ ile bana yol gũsteren değerli danıőmanım Doç. Dr. Murat BOYACIOĞLU'na çok teőekkũr ederim. Her konuda bana destek olan Aydın Adnan Menderes Őniversitesi Veteriner Fakũltesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı oğretim ũyeleri Prof. Dr. Cavit KUM, Prof. Dr. Ferda AKAR, Prof. Dr. Selim SEKKİN, Araç. Gũr. Dr. Hande Sultan ŐAHİNER, doktora oğrencisi Uzm. Vet. Hek. Őzge BARDAKÇI'ya ve emeği geçen tũm yũksek lisans ve doktora oğrencilerine teőekkũrlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında yanımda olup beni bugũnlere getiren aileme ve sevgili eőim Zafer ERZURUM ile biricik oğlum Yiğit ERZURUM'a destek, sabır ve ũzverilerinden dolayı teőekkũr ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Mikotoksinler	3
2.1.1. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler	7
2.1.2. Mikotoksinlerin Etki Şekilleri	9
2.1.3. Mikotoksinlerin Kontaminasyonu ve Dekontaminasyonu	11
2.2. Okratoksinler	12
2.2.1. Okratoksin A'nın Fiziksel ve Kimyasal Yapısı.....	13
2.2.2. Okratoksinlerin Etkileri	13
2.2.3. Okratoksin A için Belirlenmiş Limit Değerler	16
2.2.4. Okratoksin A Metabolizması.....	18
2.2.5. Okratoksin A Zehirlenmesinde Tanı	19
2.2.6. Okratoksin A Zehirlenmesinde Sağaltım	19
2.3. Serbest Radikaller, Antioksidanlar ve Oksidatif Stres	20
2.3.1. Serbest Radikaller.....	20
2.3.2. Antioksidan Savunma Sistemleri	22
2.3.3. Antioksidan Etki Tipleri	23
2.3.4. Oksidatif Stres	24
2.3.5. Folik Asit	27
2.3.6. Ellajik Asit.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32

3.1. Gereç.....	32
3.1.1. Cihazlar, Araç ve Gereçler	32
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	33
3.1.3. Hayvan Materyali	35
3.1.4. Deneysel Aşama	37
3.2. Yöntem	38
3.2.1. Karaciğer Fonksiyonlarının Tespiti	39
3.2.1.1. Serum <i>alanin aminotransferaz</i> (ALT) analizi	39
3.2.1.2. Serum <i>aspartat aminotransferaz</i> (AST) analizi	39
3.2.1.3. Serum <i>alkalin fosfataz</i> (ALP) analizi	40
3.2.2. Böbrek Fonksiyonlarının Tespiti	40
3.2.2.1. Serum kreatinin konsantrasyonu analizi	40
3.2.2.2. Serum gama glutamil transferaz (GGT) aktivite analizi	41
3.2.2.3. Serum üre konsantrasyonu analizi	41
3.2.3. Karaciğer ve Böbrek Dokularında Oksidan ve Antioksidan Parametre Analizi	42
3.2.3.1. Dokuların homojenizasyonu	42
3.2.3.2. Total protein analizi	43
3.2.3.3. Süperoksit dismutaz (SOD) analizi	44
3.2.3.4. Katalaz (CAT) analizi	46
3.2.3.5. İndirgenmiş glutasyon (GSH) analizi	47
3.2.3.6. Malondialdehit (MDA) analizi	48
3.2.4. Kanda Oksidan ve Antioksidan Parametre Analizi	49
3.2.4.1. Hemoglobin tayini	49
3.2.4.2. Süperoksit dismutaz (SOD) analizi	51
3.2.4.3. Katalaz (CAT) analizi	52
3.2.4.4. İndirgenmiş glutasyon (GSH) analizi	54
3.2.4.5. Malondialdehit (MDA) analizi	54
3.2.5. DNA Hasarının Belirlenmesi	55
3.2.6. Serum Okratoksin A Analizi	58
3.3. İstatistiksel Değerlendirme	60
4. BULGULAR	61
4.1. Canlı Ağırlık	61
4.2. Karaciğer ve Böbrek Dokusu Nispi Ağırlıkları	63
4.3. Karaciğer ve Böbrek Dokularına ait Biyokimyasal Parametreler	64

4.3.1. Karaciğer Dokusuna ait Biyokimyasal Parametreler.....	64
4.3.2. Böbrek Dokusuna ait Biyokimyasal Parametreler.....	65
4.4. Oksidan ve Antioksidan Parametre Analizleri	67
4.4.1. Karaciğer Dokusu Oksidan ve Antioksidan Parametre Analizleri	67
4.4.2. Böbrek Dokusu Oksidan ve Antioksidan Parametre Analizleri	68
4.4.3. Kanda Oksidan ve Antioksidan Parametre Analizleri.....	69
4.5. DNA Hasarının Değerlendirilmesi	74
4.6. Serum Oksitoksin A Seviyesi	76
5. TARTIŞMA.....	77
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	87
KAYNAKLAR.....	88
EKLER	101
Ek 1 (ADÜ-HADYEK KARARI).....	101
ÖZGEÇMİŞ.....	102

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<i>A. flavus</i>	: <i>Aspergillus flavus</i>
<i>A. ochraceus</i>	: <i>Aspergillus ochraceus</i>
<i>A. parasiticus</i>	: <i>Aspergillus parasiticus</i>
AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devleti
ADÜ	: Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
ALP	: <i>Alkalin fosfataz</i>
ALT	: <i>Alanin aminotransferaz</i>
AST	: <i>Aspartat aminotransferaz</i>
BHA	: Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksi tolüen
°C	: Santigrat derece
CAS	: Kimyasal Kuramlar Servisi
CAT	: <i>Katalaz</i>
dl	: Desilitre
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DTNB	: 5,5'-Ditiyobis(2-nitrobenzoik asit)
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
FBS	: Fötal Bovin Serum
g	: Gram
GCC	: Körfez Ülkeleri İşbirliği Konseyi
GGT	: <i>Gama glutamil transferaz</i>
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSH-Px	: <i>Glutasyon peroksidaz</i>
GST	: <i>Glutasyon-S-transferaz</i>
Hb	: Hemoglobin
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HRP	: Horseradish peroksidaz

IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
kg	: Kilogram
L	: Litre
LMPA	: Düşük erime noktalı agaroz
LOOH	: Lipit peroksitleri
µg	: Mikrogram
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MDA	: Malondialdehit
MERCOSUR	: Güney Amerika Ortak Pazarı
ng	: Nanogram
NTB	: Nitrotetrazolium mavi klorür
nmol	: Nanomol
NMPA	: Düşük erime noktalı agaroz
O₂⁻	: Süperoksit
OTA	: Okratoksin A
<i>P. viridicatum</i>	: <i>Penicillium viridicatum</i>
PABA	: p-aminobenzoik asit
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltisi
RNA	: Ribonükleik asit
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: <i>Süperoksid dismutaz</i>
TBA	: 2-tiyobarbitürik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
U	: Unite
WHO - IARC	: Dünya Sağlık Örgütü - Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Gıda zincirinde mikotoksin oluşumunu etkileyen faktörler.....	7
Şekil 2. Bazı mikotoksinlerin etki şekilleri	9
Şekil 3. Okratoksin A'nın kimyasal yapısı.....	13
Şekil 4. Serbest radikal oluşumuna neden olan kaynaklar.	21
Şekil 5. Antioksidanların sınıflandırılması.....	23
Şekil 6. Oksidatif denge	25
Şekil 7. Oksidatif stresin kaynakları ve karsinogenez son noktaları üzerindeki etkileri.....	27
Şekil 8. Folik asitin kimyasal yapısı.....	28
Şekil 9. Ellajik asitin kimyasal yapısı	30
Şekil 10. Total protein analizi test aşamaları	44
Şekil 11. SOD analizi test aşamaları	46
Şekil 12. GSH analizi test aşamaları	48
Şekil 13. MDA analizi test aşamaları.....	49
Şekil 14. Hemogloblin tayini analizi test aşamaları	51
Şekil 15. Kanda CAT analizi test aşamaları.....	53
Şekil 16. Kanda GSH analizi test aşamaları.....	54
Şekil 17. Kanda MDA analizi test aşamaları	55

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Araştırma kapsamında kullanılan <i>Wistar albino</i> sıçanlar ve deneysel gruplar (n = 8).	36
Resim 2. Deney hayvanları ünitesinde sıçan tartımı.....	36
Resim 3. Deney hayvanları ünitesinde sıçanlara gavaj yolu ile ilaç uygulaması.....	37
Resim 4. Sıçanlardan izole edilen lenfositlere ait floresan mikroskop görüntüleri.	75

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. İnsan veya hayvan tüketimine sunulan gıdalarda bulunabilecek mikotoksinler	4
Tablo 2. Bazı gıda ürünlerinde bulunabilecek mikotoksinlerin ülkelere göre değişen tolere edilebilir seviyeleri	6
Tablo 3. 1965 - 2000 yılları arasında okratoksin A araştırmalarındaki dönüm noktaları.....	15
Tablo 4. 2001 - 2015 yılları arasında okratoksin A araştırmalarındaki dönüm noktaları.....	16
Tablo 5. Ülkemizde okratoksin A için gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum limitler	17
Tablo 6. Bazı antioksidanların formları ve ana görevleri	24
Tablo 7. Ellajik asit içeren bitkiler.....	31
Tablo 8. Deneysel gruplara ait çalışma öncesi ve haftalık ortalama canlı ağırlıkları (g).	62
Tablo 9. Deneysel grupların zamana bağlı ortalama canlı ağırlık değişimleri (g).....	62
Tablo 10. Deneysel gruplara ait nispi doku ağırlıkları (g).....	63
Tablo 11. Karaciğer dokusuna ait serum biyokimyasal parametreler.....	64
Tablo 12. Böbrek dokusuna ait serum biyokimyasal parametreler.....	66
Tablo 13. Deneysel okratoksin A toksikasyonu sonucunda karaciğer dokusu oksidan ve antioksidan parametre sonuçları.	71
Tablo 14. Deneysel okratoksin A toksikasyonu sonucunda böbrek dokusu oksidan ve antioksidan parametre sonuçları.	72
Tablo 15. Deneysel gruplara ait serum SOD ve plazma CAT aktiviteleri ile plazma GSH ve serum MDA seviyeleri.	73
Tablo 16. Deneysel okratoksin A toksikasyonu sonucunda lenfositlerde oluşan DNA hasarı sonuçları.	74
Tablo 17. Deneysel okratoksin A toksikasyonu sonucunda serumda OTA seviyesi.....	76

ÖZET

OKRATOKSİN A TOKSİKASYONUNDA FOLİK ASİT VE ELLAJİK ASİDİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

**Erzurum M. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakoloji ve Toksikoloji (Veteriner) Programı Doktora Tezi, Aydın, 2020.**

Okratoksin A (OTA) hayvanlarda ve insanlarda akut, subakut ve kronik zehirlenmelere sebep olan; kuvvetli nefrotoksik, hepatotoksik, teratojenik, karsinojenik vb. etkileri bulunan bir mikotoksidir. Çalışmamızda OTA toksikasyonunda folik asit ve ellajik asidin etkileri *Wistar albino* sıçanlarda 28 gün gavaj yoluyla uygulanarak araştırıldı. Kontrol, OTA (210 µg/kg/gün), folik asit (20 mg/kg/gün), ellajik asit (10 mg/kg/gün), OTA + folik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında; canlı ağırlık değişimleri, karaciğer ve böbrek dokusu nispi ağırlıkları, karaciğer ve böbrek dokusuna ait bazı serum biyokimyasal parametreleri analiz edildi. Karaciğer ve böbrek dokuları ile kanda, süperoksid dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktivitesi, glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA) seviyeleri, lenfositlerde DNA hasarı (comet) ve serum OTA seviyesi değerlendirildi. Tüm deneysel gruplarda zamana bağlı olarak canlı ağırlıkların anlamlı arttığı belirlendi. Kontrol grubuna kıyasla karaciğer nispi ağırlıklarının OTA + folik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında ve böbrek nispi ağırlıklarının ise OTA + ellajik asit grubunda anlamlı azaldığı belirlendi (P<0,001). *Alanin aminotransferaz* ve *aspartat aminotransferaz* değerlerinin kontrole göre OTA ve OTA + ellajik asit gruplarında anlamlı düştüğü (sırasıyla P<0,001, P<0,01) ve OTA + folik asit grubunda kontrole yaklaştığı bulundu. Üre düzeyinin kontrol ve OTA grubu ile karşılaştırıldığında OTA + folik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında anlamlı (P<0,01) olarak azaldığı görüldü. Karaciğerde MDA düzeyinin OTA'ya göre OTA + folik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında anlamlı (P<0,01) olarak azaldığı görüldü. Böbreklerde SOD ve CAT aktivitesinin ve GSH düzeyinin OTA'ya kıyasla OTA + folik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında anlamlı arttığı tespit edildi (sırasıyla P<0,01, P<0,05, P<0,001). Böbreklerde MDA düzeyinin OTA'ya kıyasla OTA + ellajik asit grubunda anlamlı azaldığı görüldü (P<0,001). Comet analizi sonucunda DNA hasarının kuyruk momenti ve kuyruk yoğunluğu açısından anlamlı olarak en yüksek OTA ile OTA + folik asit gruplarında olduğu belirlendi (P<0,001). Çalışma bulguları

değerlendirildiğinde folik asit ve ellajik asitin OTA'nın olumsuz etkilerine karşı koryucu olabileceği belirlendi.

Anahtar kelimeler: Ellajik asit, folik asit, okratoksin A, oksidatif stres, sıçan.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF FOLIC ACID AND ELLAGIC ACID IN OCHRATOXIN A TOXICATION

Erzurum M. Aydin Adnan Menderes University Health Sciences Institute of Pharmacology and Toxicology (Veterinary) PhD Program, Aydin, 2020.

Ochratoxin A (OTA) causes acute, subacute and chronic poisoning in animals and human. OTA is a mycotoxin with strong nephrotoxic, hepatotoxic, teratogenic, carcinogenic etc. effects. In our study, the effects of folic acid and ellagic acid on OTA toxicity were investigated by gavage for 28 days in *Wistar albino* rats. In the control, OTA (210 µg/kg/day), folic acid (20 mg/kg/day), ellagic acid (10 mg/kg/day), OTA + folic acid and OTA + ellagic acid groups; body weight changes, liver and kidney tissue relative weights, serum some biochemical parameters of liver and kidney tissues were analyzed. Liver and kidney tissues and blood, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity, glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels, DNA damage in lymphocytes (comet) and serum OTA levels were evaluated. It was determined that body weights increased significantly in all experimental groups. Compared to the control group, liver relative weights were significantly reduced in the OTA + folic acid and OTA + ellagic acid groups and renal relative weights in the OTA + ellagic acid group ($P<0,001$). *Alanin aminotransferaz* and *aspartat aminotransferaz* values were significantly lower in the OTA and OTA + ellagic acid groups ($P<0,001$, $P<0,01$, respectively) than the control group, and were closer to the control in the OTA + folic acid group. Urea levels decreased significantly in the OTA + folic acid and OTA + ellagic acid groups ($P<0.01$) compared with the control and OTA groups. Liver MDA levels were significantly decreased ($P<0.01$) in OTA + folic acid and OTA + ellagic acid groups compared to OTA group. SOD and CAT activity and GSH levels in the kidneys were significantly increased in OTA + folic acid and OTA + ellagic acid groups compared to OTA group ($P<0,01$, $P<0,05$, $P<0,001$, respectively). MDA levels in the kidneys were significantly decreased in the OTA + ellagic acid group compared to OTA group ($P<0.001$). As a result of the comet analysis, DNA damage was found to be significantly higher in OTA and OTA + folic acid groups in terms of tail moment and tail density ($P<0.001$). When the findings of the

study were evaluated, it was determined that folic acid and ellagic acid could be protective against the negative effects of OTA.

Keywords: Ellagic acid, folic acid, ochratoxin A, oxidative stress, rat.

1. GİRİŞ

Mikotoksinler, halk sağlığı, gıda güvenliği ve gelişmekte olan ülkeler başta olarak birçok ülkenin ulusal ekonomisi üzerindeki olumsuz etkileri bakımından en önemli gıda kirleticileri arasında sayılır (FAO, 2001).

Yemlerin ve gıdaların mikotoksinlerle bulaşması dünya çapında önemli bir problemdir. Hayvanlar ve insanlar için büyük tehlike oluşturan mikotoksinler, gıda endüstrisinde ve hayvancılıkta önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Ji ve ark, 2016; Luo ve ark, 2018).

Mikotoksinlerle en çok kontamine olan ürünlerin başında baharatlar, tarım ürünleri, et ve süt ürünleri gelir (Darwish ve ark, 2014). Aflatoksinler, okratoksinler, trikotesenler, zearalenon, fumonisinler, tremorjenik toksinler ve ergot alkaloidler en önemli mikotoksinlerdir (Zain, 2011). Bu mikotoksinlerin ekonomik ve sosyal etkileri içerisinde, insanlarda ve hayvanlarda görülen hastalıklar ya da ölümler, sağlıkla ilgili üstlenilen giderler, hayvan verimliliklerinin azalması, çiftçiler için gıda ve yemlerin kullanılamaması yoluyla oluşan maliyetler yer alır (Bankole ve Adebajo, 2004; Atherstone ve ark, 2014). Mikotoksinlerden dolayı oluşan olumsuz etkiler bilinçli ürün işleme ve depolama gibi iyi tarım uygulamaları kullanılarak azaltılabilir (Atherstone ve ark, 2014).

Dünyanın her yerinde mikotoksin üretebilen mantarlar bulunmaktadır. Hem sahada hem de harmanlama, depolama, taşıma ve hazırlama aşamalarında, uygun sıcaklık ve rutubette yem ve gıda maddeleri mikotoksin salgılayan mantarlar tarafından kirletilebilmektedir. Bu yüzden yemlerde mikotoksin kaynaklı kirlenmeler sıklıkla görülebilmektedir. Kirlenmelerden kaynaklı olumsuzluklar hayvanlarda fark edilmeden ilerlediği için hayvan sağlığı ve ekonomik işletmeler için istenmeyen etkiler oluşturmaktadır. Ayrıca kalıntılarında dolayı da toplum sağlığında da olumsuz etkilere yol açmaktadır (Kaya, 2002).

Hayvanlarda akut, subakut ve kronik zehirlenmelere neden olan okratoksinlerin karsinojenik, mutajenik ve teratojenik etkileri de vardır. Okratoksin öncelikle böbreklerde ve daha sonra karaciğerde olumsuz etkiler gösterir. Bununla beraber okratoksinler vücudun diğer doku ve organlarında da az ya da çok etki edebilirler. Okratoksin A (OTA) zehirlenmelerinde sağaltım için özel bir yöntemin olmaması konuyu daha da önemli kılmaktadır. OTA'nın serbest oksijen radikallerinin üretimine ve dolayısıyla DNA hasarına neden olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma ile ilgili antioksidanların insan ve veteriner hekimliğinde OTA'nın

toksik etkilerine karşı koruyucu alternatif birer farmakolojik ajan olarak kullanılıp kullanılmayacağı, kullanılacaksa da hangisinin daha etkili olabileceği konusu araştırıldı. Bu araştırmayla, OTA ile mikotoksikozis oluşturulmuş sıçanlarda folik asit ve ellajik asidin DNA hasarı ile karaciğer ve böbrek dokularına yönelik koruyucu etkileri ile oksidan / antioksidan denge üzerine etkili olup olmadığının belirlenmesi açısından önemli bir eksikliğin tamamlanması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinler

Mikotoksin kelimesi, Yunanca mantar anlamındaki ‘*mykes*’ ve Latince zehir anlamındaki ‘*toxicum*’ kelimelerinin birleşiminden oluşmaktadır (Turner ve ark, 2009). Mikotoksinler, çeşitli mantarlar tarafından üretilen ve maruz kalındığında insanlar ve hayvanlarda mikotoksikozis olarak adlandırılan toksik etkilere neden olan düşük molekül ağırlıklı ikincil metabolitler olarak tanımlanmaktadır (Sweeney ve Dabson, 1999; Zain, 2011; Luo ve ark, 2018).

Mikotoksinler mantar gelişimi için gerekli olmadığından ikincil metabolitler olarak düşünülür ve sadece birincil metabolik süreçlerin bir ürünüdür. Mikotoksinlerin işlevleri açıkça tespit edilmemiştir ancak; aynı ortamda yarışan diğer mikroorganizmaların yok edilmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca, parazit mantarların konakçı dokuları istila etmelerine yardımcı olduklarına inanılmaktadır (Brase ve ark, 2009).

Mikotoksin terimi 1962’de İngiltere’de Londra yakınlarında yaklaşık 100 000 hindi palazının ölmesiyle sonuçlanan bir olayla ortaya çıkmıştır. Bu gizemli ‘hindi X hastalığı’ hindi palazlarının yemlenmesinde kullanılan yarfistiklarında kontamine olmuş *Aspergillus flavus* (*A. flavus*)’dan izole edilmiş ikincil metabolitlere bağlandığı zaman, bilim adamları diğer bilinmeyen küf metabolitlerinin de ölümcül olabileceği konusunda hassaslaşmıştır (Bennett ve Klich, 2003).

Mikotoksin üreten mantarlar mikotoksijenik olarak bilinir. Bazı mantarlar birden fazla mikotoksin üretebilir. Ayrıca bazı mikotoksinler de birden fazla mantar türü tarafından üretilmektedir (Brase ve ark, 2009; Vila-Donat, 2018). Günümüzde kanserojenik ya da toksik etkisi olan, 100’den fazla mantar tarafından üretilen yaklaşık 400 mikotoksin bilinmektedir (Steyn, 1995; Hussein ve Brasel, 2001; Zain, 2011; Rocha ve ark, 2014; Luo ve ark, 2018).

Bu mikotoksinlerin çoğu *Aspergillus*, *Penisillium*, *Fusarium*, *Alternaria* ve *Claviceps* cinslerine ait türler tarafından üretilmektedir (Steyn, 1995; Binder, 2007; Luo ve ark, 2018).

Aflatoksinler, okratoksinler, trikotesenler, zearalenon, fumonisinler, patulin, sitrinin ve ergot alkoloitleri en çok bilinen mikotoksinlerdir. Bu mikotoksinler insan veya hayvanlarda, akut veya kronik çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır (Hussein ve Brasel, 2001; Bennett ve Klich, 2003; Binder, 2007; Luo ve ark, 2018).

Birçok tahıl ürünü, yağlı tohumlar, et ve et ürünleri, yumurta, kuru yemişler ve kuru meyveler mantar kontaminasyonu ve mikotoksin üremesi için uygundur (Steyn, 1995). Bazı mikotoksinlerle kontamine olmuş ürünlerin bir kısmı Tablo 1’de gösterilmiştir (Paterson ve Lima, 2010).

Tablo 1. İnsan veya hayvan tüketimine sunulan gıdalarda bulunabilecek mikotoksinler (Paterson ve Lima, 2010).

Mikotoksin	Ürün
Aflatoksin	Fıstık, mısır, buğday, pamuk tohumu, kurutulmuş hindistan cevizi, fındık, süt, yumurta, peynir, incir
Sitrinin	Tahıl (buğday, arpa, mısır, pirinç)
Siklopiazonik asit	Mısır, fıstık, peynir
OTA	Tahıl (buğday, arpa, yulaf, mısır), kuru fasulye, fıstık, peynir, domuz, kahve, kuru üzüm, üzüm, kuru meyve, şarap, kakao
Patulin	Yem, elma, elma suyu, buğday samanı artığı
Penisillik asit	Depolanmış mısır, tahıl taneleri, kuru fasulye, küflü tütün
Penitrem	Krem peynir, ceviz, bira
Sterigmatosistin	Yeşil kahve, buğday, tahıllar, sert peynir, bezelye, pamuk tohumu
Trikotesen	Mısır, buğday, ticari sığır yemleri, karma yemler, arpa, yulaf
Zearalenon	Mısır, saman, peletlenmiş ticari yem

Mikotoksinler canlılarda meydana getirdikleri etkiye göre hepatotoksik, nefrotoksik, nörotoksik ve immünotoksik olarak sınıflandırılmaktadır. Hücre bilimcileri bunları genel olarak terotojen, mutajen, karsinojen ve allerjen diye sınıflandırmaktadır. Organik kimyacılar bu sınıflandırmayı kimyasal yapılarına göre (kumarinler, laktonlar gibi) yaparken, bu sınıflandırmayı biyokimyacılar biyosentez kökenlerine göre (polipeptidler, amino asit türevleri gibi) yapmaktadırlar. Hekimler sebep oldukları hastalığa göre (St. Anthony hastalığı, staşibotoksikoz gibi), mantar uzmanları üretildikleri mantarlara göre (*Aspergillus* toksini, *Penisillium* toksini gibi) sınıflandırmaktadırlar (Bennett ve Klich, 2003).

Mikotoksinlerin insanlardaki kanserojenik potansiyellerine göre sınıflandırması 1993 yılında Dünya Sağlık Örgütü - Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (WHO – IARC) tarafından yapılmıştır. Yapılan sınıflandırmayla; aflatoksinler insanlar için kanserojenik mikotoksin (1. Grup) olarak belirlenirken, OTA ve fumonisin insanlar için muhtemel kanserojenik mikotoksin (2B grup) olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, zearalenon ve

trikotesen mikotoksinlerinin insanlarda kanserojenik aktivitesinin olmadığı (3. Grup) ifade edilmiştir (WHO-IARC, 1993).

İnsan ve havan sağlığı için risk teşkil eden bu ikincil metabolitler doğa olarak ortaya çıktığından mikotoksinlerin ürünlerden tamamen uzaklaştırılmasının oldukça zor olduğu görölmektedir. Bununla birlikte, fungal proliferasyona daha eğilimli olan ve tekrarlanan bir maruz kalma kaynağı olan bazı ürünlerde grubun en yaygın ve toksik üyeleri için tüm dünyada kabul edilebilir azami seviyeler belirlenmiştir. Tüketicilerin korunması, iyi tarım, depolama ve işleme uygulamalarının ardından mikotoksin seviyeleri makul ölçüde düşük tutularak da takip edilmektedir. Mikotoksinler ve ürünlerdeki izin verilen maksimum düzeyler ülkeden ülkeye önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Mikotoksinlerin ülkelere göre bazı ürünlerdeki tolere edilebilir miktarları Tablo 2’de gösterilmiştir (Anfossi ve ark, 2016).

Tablo 2. Bazı gıda ürünlerinde bulunabilecek mikotoksinlerin ülkelere göre değişen tolere edilebilir seviyeleri (Anfossi ve ark, 2016).

Mikotoksin	Ürün	Ülke	Maksimum tolere edilebilir seviyeler ^a (µg/kg)
Aflatoksinler	Yağlı tohumlar, fındık, kuru meyveler, tahıllar, baharatlar	AB	4 – 15 ^a (2-12 ^a aflatoksin B1)
		Avustralya, Kanada, GCC	(15 aflatoksin B1)
		Nijerya, Yeni Zelanda, Güney Afrika	20
		ABD, Brezilya, MERCOSUR	30
Aflatoksin M1	Süt ve bebek formülü	AB, Güney Afrika	0,25 - 0,05 ^a
		Arjantin, Çin, GCC	0,5
		Hindistan, Kenya, Meksika	
		Uruguay, ABD	
		Brezilya, MERCOSUR	0,5 – 5 ^a
Deoksivinalenol	Tahıllar, unlu mamüller	AB	500 - 1750 ^a
		Brezilya	750 - 3000 ^a
		Rusya	700 - 1000
		Kanada, Çin, Hindistan	1000
		Japonya, ABD ^b	
Fumonisinler	Mısır	AB, Norveç, İsviçre,	800 - 4000 ^a
		ABD ^b	2000 - 4000 ^a
		Brezilya	2000 - 5000 ^a
Okrotoksin A	Tahıllar, kuru meyveler, kahve, kakao, şarap, bira, üzüm suyu, baharat, meyankökü	AB, Mısır	2 – 10 ^a
		Çin, GCC, Kenya	5
		Nijerya, Rusya	
		Hindistan	20
		Brezilya	2 – 30 ^a
		Uruguay	50
Patulin	Meyve suyu, elma ürünleri	Brezilya, Çin, AB, GCC, Hindistan, Japonya, Kenya, Nijerya, Rusya	50
T-2 ve HT-2	Tahıllar	AB	İzin verilmiyor
		Rusya	50 – 100 ^a
Zearalenon	Tahıllar, unlu mamüller, mısır yağı	AB	75 - 400 ^a
		Brezilya	200 - 1000 ^a
		Çin, Rusya, Şili	200000 ^a

^a Ürüne göre değişir (en düşük - en yüksek maksimum tolere edilebilir seviyeler)

^b Öneri seviyesi

AB: Avrupa Birliği

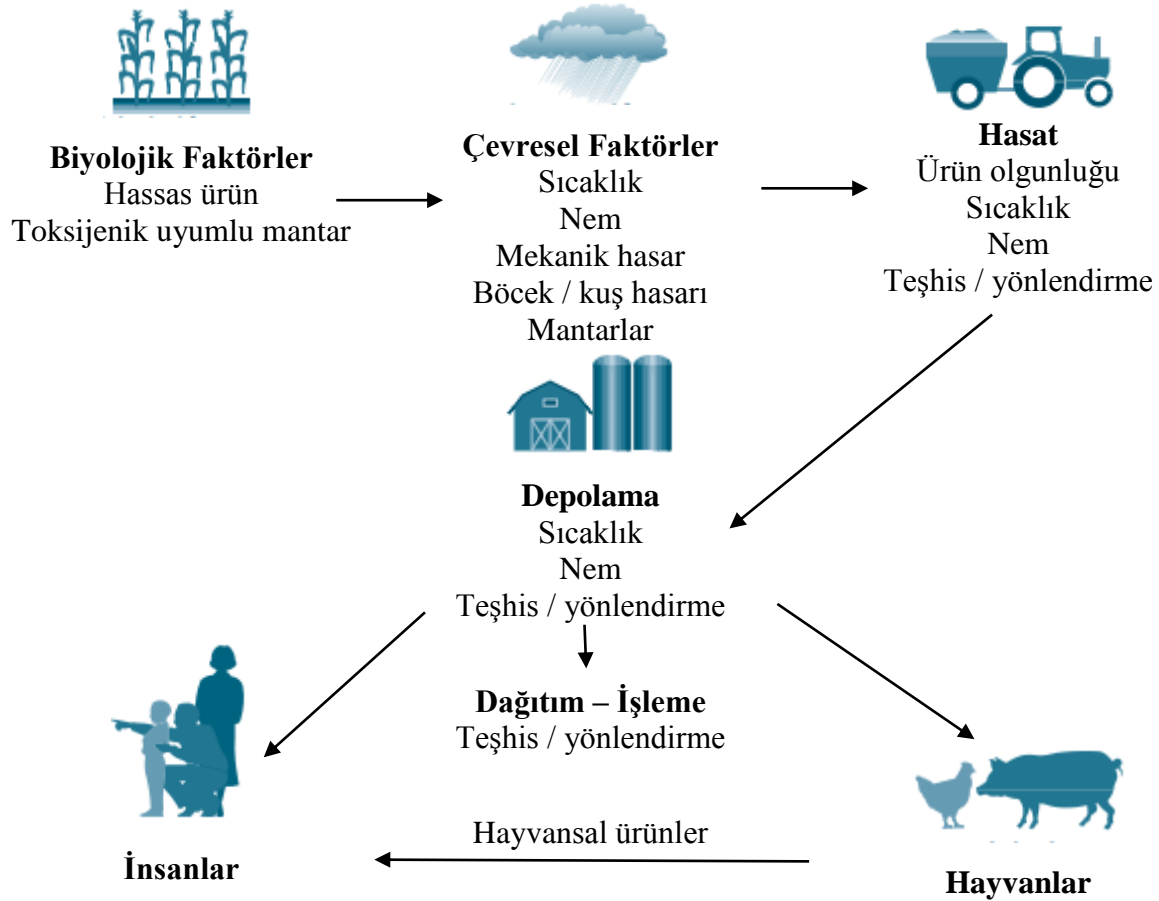
ABD: Amerika Birleşik Devleti

GCC: Körfez Ülkeleri İşbirliği Konseyi (Gulf Cooperation Council)

MERCOSUR: Güney Amerika Ortak Pazarı (Mercado Comun del Sur)

2.1.1. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Mantarlar tarafından üretilen düşük molekül ağırlıklı mikotoksinler gıda ve yemleri kirletmektedir. İnsanların ve hayvanların mikotoksinlere maruz kalmasını en aza indiren düzenlemeler ürün sahipleri, üreticiler, işletmeciler ve pazarlamacılar için yüksek ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Mikotoksin tüketimi sonucunda ciddi sağlık sorunları ve ölüm meydana gelebilmektedir. Mikotoksin kontaminasyonu ile ilgili iklim ve depolama koşulları gibi birçok faktör vardır. Oluşan mikotoksinlerin insanlar veya hayvanlar tarafından tüketilmesi kaçınılmazdır (Paterson ve Lima, 2010). Gıda zincirinde mikotoksin oluşumunu etkileyen faktörler Şekil 1’de gösterilmiştir (CAST, 2003).



Şekil 1. Gıda zincirinde mikotoksin oluşumunu etkileyen faktörler (CAST, 2003).

Mikotoksin oluşumunu etkileyen faktörler fiziksel faktörler, kimyasal faktörler ve biyolojik faktörler olarak sınıflandırılmaktadır (Öksüztepe ve Erkan, 2016):

✓ Nispi nem, çevre sıcaklığı veya gıda maddesinin nem miktarı fiziksel faktörler olarak sayılabilir. Sıcaklık her bir mikotoksin için farklı değerleri ifade edebilmektedir. *A. flavus* ve *A. parasiticus* tarafından üretilen aflatoksinler için uygun sıcaklık derecesi 25 - 35 °C, *Penicillium expansum* tarafından sentezlenen patulin için uygun ortam 20 - 25 °C, *Penicillium rubrum* tarafından üretilen rubratoksin için ise 25 - 30 °C'dir.

✓ Kimyasal faktörlerden mikotoksin üretiminde etkili olanlardan en önemlisi mikotoksin üreten küflerin beslendikleri ortamın kimyasal bileşimidir. Mikotoksin üreten küflerin beslenmesine etki eden faktörler ise gıdanın bileşimi, su miktarı, pH değeri gibi kimyasal özellikleridir.

✓ Mikotoksin sentezine etki eden önemli biyolojik faktörler arasında küf suşunun toksijenik olup olmadığı, toksijenik ise toksin üretme kabiliyeti, aynı ortamda toksin üreten diğer küf türleri ile rekabet durumu ve mikrobiyal detoksifikasyon sayılabilir.

Mikotoksin oluşumunu etkileyen birçok faktör bulunmakla beraber bunların başında çevresel faktörler gelmektedir. Tarım ürünü veya gıdanın nem içeriği, atmosfer bağıl neminden etkilendiğinden, sıcaklıkla birlikte bağıl nem öncelikle mantar sporlarının çimlenmesini ve misellerin gelişmesini sağlayarak toksin oluşumunu etkileyen en önemli faktördür. Sıcaklık ve bağıl nem haricinde mikotoksin oluşumunu etkileyen başlıca faktörler;

- ✓ Tarım ürününün veya gıdanın çeşidi, kimyasal kompozisyonu, ürünün yetiştirildiği klima zonu,
- ✓ Ürünün olgunluk durumu, hasat işlemleri, depolama koşulları,
- ✓ Atmosferik oksijen, diğer atmosfer gazları, ışık, süre, pH,
- ✓ Tarımsal ürünün veya gıdanın küf spektrumunda bulunan küflerin potansiyel mikotoksin üreticisi olup olmamasıdır.

Ürünlerin mekanik işlemlere ve böceklere maruz kalması da bitkilerdeki koruyucu yapıyı bozarak mikotoksin üremesine sebep olabilmektedir (Tunali, 2000).

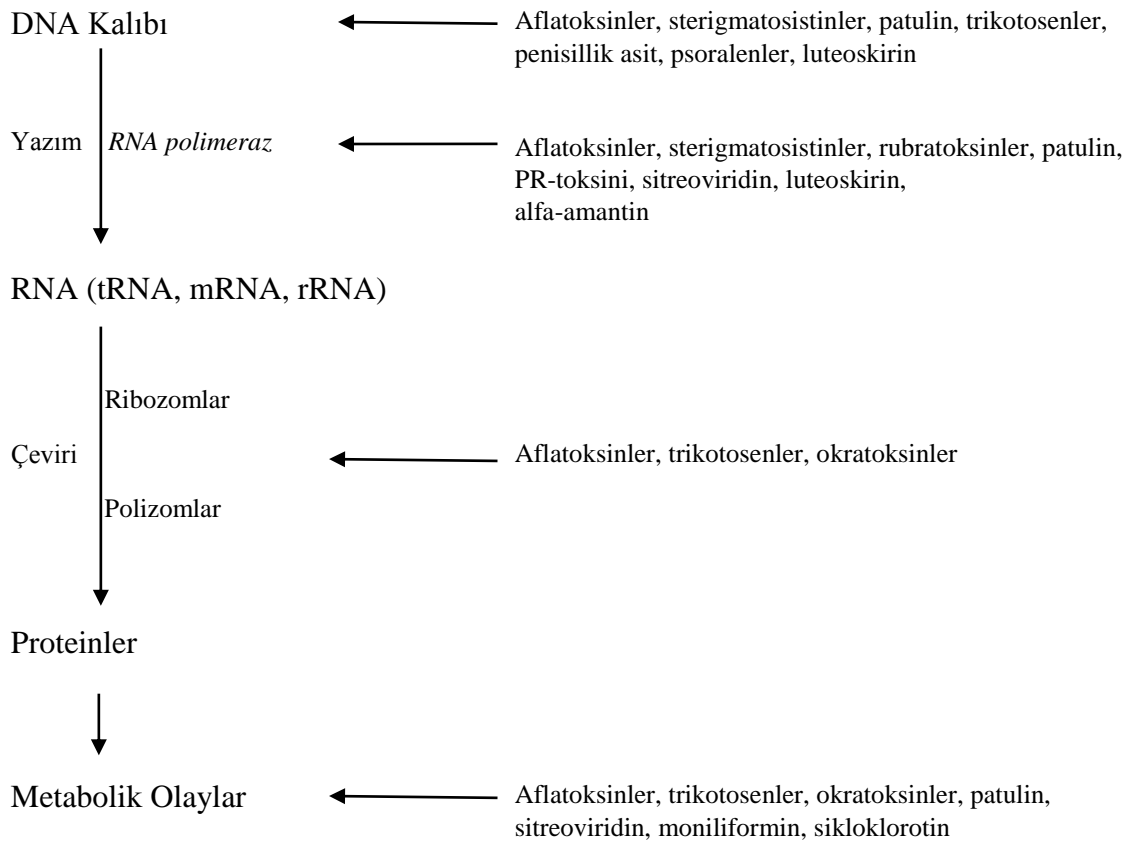
Uygun sıcaklık ve nem, mikotoksijenik mantarların mikotoksin üretmesi için en önemli çevresel faktörlerdir. Genel olarak, ılıman ve subtropikal iklimlerde bulunan ülkelerdeki mahsuller mikotoksinlere daha kolay maruz kalabilir, oysa tropikal ülkelerdeki koşullar fungal büyüme ve mikotoksin üretimi için uygun değildir (FAO, 2001). Uganda'da aflatoksinle kirlenmiş hasat edilmiş mısır numuneleri nemli bölgede kuru bölgeden çok daha yüksek bulunmuştur (Kaaya ve ark, 2006). Kuzey Amerika'da, buğdaydaki yüksek deoksivinalenon seviyeleri genellikle hasattan önce aşırı ıslak dönemlerle ilişkilendirilmiştir (Bianchini ve ark, 2015). Beklenmeyen yağmurlar mikotoksin üretiminde önemli bir rol

oyun. Kenya'da 2004 yılında görülen sezon dışı yağışlar 125 ölüm ve 317 klinik aflatoksikoz vakasının rapor edildiği mısırdaki aflatoksin salgını ile sonuçlanmıştır (CDC, 2004).

Mikotoksinler hasattan önce, hasattan sonra veya işleme, depolama ve yemleme sırasında tarlada oluşabilir ve gıda kalitesini olumsuz yönde etkileyebilmektedirler (Sforza ve ark, 2006).

2.1.2. Mikotoksinlerin Etki Şekilleri

Mikotoksinler doğrudan ya da metabolik değişiklikler sonucu oluşan metabolitleri aracılığıyla Şekil 2'de ana hatlarıyla belirtilen etki şekillerinden birisi veya birkaçıyla etkilerini oluşturmaktadırlar (Kaya, 2002).



Şekil 2. Bazı mikotoksinlerin etki şekilleri (Kaya, 2002).

Mikotoksinler ve DNA kalıbı arasındaki etkileşimler sonucu DNA'da bilgi aktarım sırası değişmektedir; bu durum bileşiklerin mutajenik ve karsinojenik etkilerinin doğmasına

sebepler. Mikotoksinlerin DNA kalıbına (DNA sentezi) olan etkilerinin yanında yazım (RNA sentezi) ve çeviri (protein sentezi) üzerine etkileri de mevcuttur. Mikotoksinlerin hücre zararının geçirgenliğini değiştirme, hücre solunumunu etkileme ve hormonal etkileri de bulunmaktadır (Kaya, 2002).

Bir mikotoksin olan OTA'nın doğrudan veya dolaylı birçok etkisinin olduğu üzerinde durulmaktadır. Bu etkilerden en iyi bilinenleri mitokondrial solunuma, lipit peroksidasyonuna ve fenilalanin metabolizmasındaki enzimlere olan etkileridir (Girgin ve ark, 2001; Soyöz ve ark, 2004).

OTA toksisitesinin altında yatan mekanizmalardan birinin fenilalanin ile rekabet ettiği ve fenilalanine bağımlı enzimlerin inhibisyonu olduğu inanılmaktadır (Creppy ve ark, 1979). Buradaki etki bahsi geçen enzimin sentezine kalıp oluşturacak mRNA'nın ribozomlarda okunmasını engellemesiyle ilişkilidir (Kaya, 2002). Bu durum protein, DNA ve RNA sentezinin inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır (Fung ve Clark, 2004). OTA, *fenilalanin hidroksilazın* etkinliğini *fenilalanin-tRNA sentetaz* tarafından katalizlenen reaksiyonda fenilalaninle ile yarışa girerek engellemektedir. Böylece ortamda bulunan fenilalanin miktarının artması OTA'nın etkisinin azalmasına neden olmaktadır (Dirheimer ve Creppy, 1991; Zanic-Grubisic ve ark, 2000; Ringot ve ark, 2006; Marin ve ark, 2013).

OTA, lipit peroksidasyonunu arttırarak oksidatif hasara yol açmaktadır (Omar ve ark, 1991). Geçiş metalleri ve demir iyonları lipit peroksidasyonunda önemli rol oynamaktadır (Halliwell, 1991). NADPH-CYP 450 redüktaz, EDTA, demir iyonları ve NADPH'ı içeren mikrozomal bir sistem oluşturulduğunda, OTA demir iyonlarını halkasal yapısına katar ve OTA-Fe⁺³ kompleksinin oluşmasıyla lipit peroksidasyonu uyarmaktadır. OTA-Fe⁺³ NADPH-CYP 450 redüktaz tarafından OTA-Fe⁺² kompleksine indirgenmektedir. OTA varlığında Fe⁺³'ün Fe⁺²'ye indirgenmesi artmaktadır (Omar ve ark, 1991). OTA'nın toksik etkisi ile oluşan H₂O₂, ortamda artan Fe⁺² iyonları aracılığıyla Fenton reaksiyonu ile daha potent olan hidroksil radikale dönüştürülmekte, bu da lipit peroksidasyonunu hızlandırmaktadır. Hücresel çevre içinde çoklu doymamış yağ asitleri ve oksijenin bulunduğu yerde bu sürecin başlaması kaçınılmazdır. Oksijen vasıtasıyla, lipitlerin oksidasyonu, MDA ve diğer oksidasyon ürünleri gibi, yüksek oranda indirgenmiş bileşikler oluşmaktadır. Bu ürünlerin çoğu kimyasal olarak reaktiftir ve yapısal doku hasarlarını oluşturmaktadır (Ginkel ve Sevanian, 1994).

Okratoksinin bir diğer etkisi mitokondriyal ATP üretimi üzerinedir; OTA mitokondri zararının iç tarafında bulunan taşıt proteininin etkinliğini yarışmalı şekilde engelleyerek, tüm mitokondriyal solunumu önleyebilmektedir. Burada mikotoksin mitokondriyalara etkin taşıma

ile girmektedir. Bu etki mitokondri içindeki ATP'nin tükenmesine yol açmakta; ayrıca, mitokondri içinde inorganik fosfatın taşınmasını da engellemektedir. Böbreklere yönelik etkide mitokondriyal enerji üretiminin bozulması daha fazla önem taşımaktadır (Kaya, 2002).

Önceden tanımlanmış fenilalanin içeren metabolik sistemlere müdahale, mitokondriyal solunum zincirinin inhibisyonu, membran lipit peroksidasyon mekanizmaları dışında; oksidatif stres yoluyla metabolizmaya bağlı toksisite, organik anyon taşıyıcılarının bir fonksiyonu olarak hücre içi OTA birikimi ve nanomolar konsantrasyonlarda hücre içi ve hücre içi sinyal iletimi mekanizmalarından da söz edilmektedir (Ringot ve ark, 2006).

2.1.3. Mikotoksinlerin Kontaminasyonu ve Dekontaminasyonu

Mikotoksinlerle kirlenen gıda ve yemlerde mikotoksinlerin dekontaminasyonunda üç yoldan söz edilmektedir. Bunlar;

- ✓ Kontaminasyonun önlenmesi,
- ✓ Mikotoksin içeren gıda ve yemlerin detoksifikasyonu,
- ✓ Tüketilen gıdaların mikotoksin içeriğinin sindirim sisteminde emilmesinin engellenmesi olarak sıralanmaktadır (Halász ve ark, 2009).

Ürünlerin mikotoksinlerden korunması için en fazla özen gösterilmesi gereken zaman, gıda ve yemlerde görülen kontaminasyonların daha fazla ortaya çıkmasından dolayı hasat veya saklama dönemleridir. Detoksifikasyon için sürekli olarak yeni yöntemler geliştirilmektedir. Bu amaçla fiziksel tekniklerden, doğal veya sentetik kaynaklı kimyasal maddelerden ve biyolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Fiziksel detoksifikasyon için uygulanan genel metotlar arındırma, mekanik sıralama ve dağılım, yıkama, yoğunluk farkının gözlenmesi, termal inaktivasyon, mikrodalga uygulamalarını da içeren radyasyon uygulaması ve solvan ekstraksiyonu olarak sıralanmaktadır. Doğal veya sentetik kimyasal madde uygulamalarında ise doğal ve sentetik kaynaklı kimyasal maddeler karşımıza çıkmaktadır. Doğal kaynaklı kimyasal maddeler vitamin kombinasyonları, melatonin, likopen, propolis ve bal, yeşil çay, sarımsak, kahve, su yosunu türleri, kil mineralleri vb olup; sentetik kaynaklı kimyasal maddeler bütillenmiş hidroksi tolüen (BHT), bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), propil paraben, etoksikuin, N-asetil sistein, aspirin, indometazin, amonyum hidroksit, kalsiyum hidroksit monometilamin gibi maddelerdir. Biyolojik detoksifikasyon, mikotoksinlerin deaktivasyonu için seçilen yöntemlerden biridir ve spesifik mikroorganizma

veya enzimler tarafından mikrobiyal inaktivasyonun yanı sıra adsorptif materyaller tarafından bağlanmayı da kapsamaktadır (Sabuncuoğlu ve ark, 2008).

2.2. Okratoksinler

Okratoksinler yeni mikotoksin moleküllerini tanımlama amaçlı çalışmalar sırasında 1965 yılında *A. ochraceus*'un bir metaboliti olarak keşfedilmiştir (Van der Merwe ve ark, 1965).

Okratoksinler çeşitli *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından, özellikle *A. ochraceus* ile *Penicillium viridicatum* (*P. viridicatum*) ait ondan fazla tür (*A. fresenii*, *A. melleus*, *A. ostianus*, *P. verricosum*, *P. cyclopium*, *P. palitans*, *P. commune* gibi) tarafından depolama sırasında ve çeşitli üretim aşamalarında oluşan mikotoksinlerdir (Kaya, 2002; Bayman ve Baker, 2006; Pleadin ve ark, 2015).

Merwe ve ark 1965 yılında A, B ve C olmak üzere 3 tip okratoksin tanımlamıştır. Gıdalarda ve yemlerde yaygın olarak bulunan ve zehirlenmeye neden olan OTA'dır. Okratoksin B, OTA'dan daha az toksiktir. Okratoksin C'ye doğada nadir olarak rastlanmaktadır (Van der Merwe ve ark, 1965).

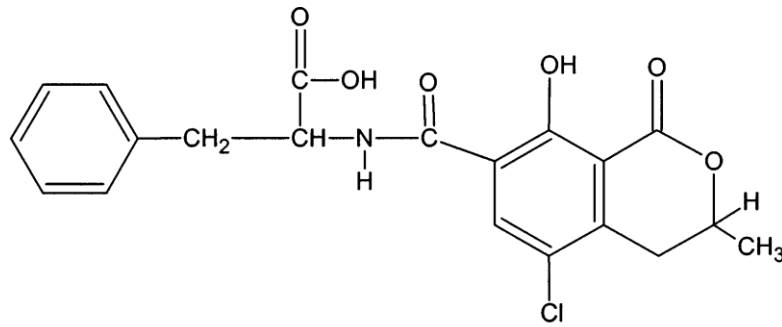
Okratoksin B, OTA'dan daha az toksik olduğundan karaciğer hücrelerinde protein biyosentezini inhibe etmemektedir. Dihidro-metil-izokumarin halkasındaki C5 üzerindeki klor atomuna fenolik OH eklenmesi OTA toksisitesinin fazla olmasının nedenidir. Okratoksin B'de bu klor atomu bulunmadığından bu metabolit OTA'ya göre daha az toksik etki göstermektedir. Okratoksinlerde bulunan dihidroizokumarin ve fenilalanin bileşikleri, birbirlerine amid bağı ile bağlandıklarından, okratoksinler sıcaklığa ve su ile parçalanmaya karşı çok kararlı özellik gösterirler (Petzinger ve Ziegler, 2000).

Okratoksin üretimi sıcaklık, nem miktarı ve besi yeri içeriği gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Ringot ve ark, 2006). Tahıllar, baklagiller, şarap ve üzüm suyu ile kuru meyve ve baharatlar sıklıkla OTA ile kontamine olabilmektedir (EFSA, 2006).

A. ochraceus, hem *A. flavus* hem de *A. parasiticus*'dan daha yavaş büyür. *A. ochraceus*'un büyümesi için gerekli sıcaklık aralığı 8 - 37 °C olarak bildirilmiştir, optimum büyüme 25 - 31 °C olarak rapor edilmiştir. OTA, 15 - 37 °C sıcaklık aralığında ürer, optimal üreme 25 - 28 °C'de olmaktadır. *P. verricosum*'un büyümesi için gerekli sıcaklık aralığı 0 - 31 °C'dir ve minimum su aktivitesi 0,80'dir (FAO, 2001).

2.2.1. Okratoksin A'nın Fiziksel ve Kimyasal Yapısı

Moleküler formülü $C_{20}H_{18}ClNO_6$ olan OTA'nın CAS (Kimyasal Kuramlar Servisi - Chemical Abstracts Services) ismi Kayıt No'su 303-47-9 dur. OTA'nın IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) ismi (2S)-2-[[[(3R)-5-klore-8-hidroksi-3-metil-1-oxo-3,4-dihidroisokromene-7-karbonil]amino]-3-fenilpropanoik asit şeklindedir. OTA'nın molekül ağırlığı 403,815 g/mol'dür ve kaynama noktası 169 °C'dir (WEB_1, 2018). OTA'nın kimyasal yapısı Şekil 3'de gösterilmiştir (Hussein ve Brasel, 2001).



Şekil 3. Okratoksin A'nın kimyasal yapısı (Hussein ve Brasel, 2001).

Zayıf asidik özellikteki OTA, kristalimsi ve renksizdir. Polar organik solventlerde yüksek çözünürlüğe sahip olan OTA, suda az çözünürken, sulu sodyum hidrojen karbonatlı çözeltilerde çözünebilmektedir. OTA'nın sodyum tuzu suda çözünebilmektedir (Ringot ve ark, 2006; WEB_1, 2018).

2.2.2. Okratoksinlerin Etkileri

Hayvanlarda ve insanlarda akut, subakut ve kronik zehirlenmelere neden olan okratoksinlerin bir üyesi olan OTA, insan sağlığı için önemli mikotoksinlerden biridir. Bu bileşik kuvvetli nefrotoksik (majör toksik etki) olup, aynı zamanda immünoşüpresif, teratojenik, nörotoksik ve karsinojenik özelliktedir (Kaya, 2002; EFSA, 2006).

Lipit peroksidasyonu, mitokondrideki oksidatif fosforilasyonun bozulması, kan pıhtılaşmasının önlenmesi, DNA'daki kırılmalar, protein sentez inhibisyonu, glikoneogenezis, adipogenezin baskılanması, kalsiyum homeostazındaki bozulmalar ve apoptik etki OTA'nın

sebebi olduğu moleküler etkilerinden bazılarıdır (Ringot ve ark, 2006; Marin ve ark, 2013; Türel ve Calapoğlu, 2017).

Epidemiyolojik çalışmalar insanlarda uzun dönem OTA maruziyetinin Balkan Endemik Nefropatisi olarak adlandırılan ilerleyici nefropati ve üriner sistem tümörleri ile ilişkisini göstermiştir (Bocharova ve ark, 1988; Plestina ve ark, 1990; Nikolov ve ark, 1996; Pfohl-Leszkowicz ve ark, 2002).

Bulgaristan, Romanya, İspanya, Çek Cumhuriyeti, Türkiye, İtalya, Mısır, Cezayir ve Tunus'ta yapılan epidemiyoloji çalışmalarında, sağlıklı insanlara göre bazı böbrek rahatsızlıkları olan hastalarda OTA'nın kandaki düzeyi anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Scott, 2005).

OTA kronik maruziyet sonucunda erkek farelerde ve her iki cins sıçanlarda böbrek tümörüne neden olmaktadır. OTA sıçanlarda ve diğer hayvanlarda tübulo interstisiyel nefropatiye neden olan güçlü sitotoksik etkili bir bileşiktir (Kamp ve ark, 2005). Erkek sıçanlar dişi sıçanlardan daha hassas bulunmuştur (EFSA, 2006). OTA erkek sıçanlarda potansiyel renal karsinogeniktir (Vettorazzi ve ark, 2013). Cinsiyete bağlı olarak OTA'nın farklı etki mekanizmasının olmasının altında testosteron hormonu ve buna bağlı olarak alfa-2u globulin proteinlerinin rolünün olabileceği ileri sürülmektedir (Mantle ve Nagy, 2008).

OTA maruziyetinin hayvanlarında süt ve yumurta üretiminde azalma, kilo kaybı ve ölüm oranında artış ile ilgili ekonomik etkileri de mevcuttur (Duarte ve ark, 2010). Ruminantlar tek mideli hayvanların aksine OTA'ya daha az duyarlıdır çünkü rumen sıvısındaki protozoan fraksiyonu OTA'yı enzimatik degradasyon ile daha az toksik metaboliti olan okratoksin- α 'ya çevirir (Martella ve ark, 2006).

OTA'nın keşfi ve günümüze kadar OTA ile yapılan araştırmalara ait genel bakış Tablo 3 ve 4'de gösterilmiştir.

Tablo 3. 1965 - 2000 yılları arasında okratoksin A araştırmalarındaki dönüm noktaları (Malir ve ark, 2016).

YIL	GELİŐME
1965	OTA'nın keşfi
1967	OTA'nın yapısının belirlenmesi
1968	OTA'nın LD ₅₀ değerinin tespiti
1969	OTA'nın mısır unundan izolasyonu <i>Penicillium verrucosum</i> 'un OTA üreticisi olarak belirlenmesi
1970	Küflü tahıllarda OTA'nın tespit edilmesi
1972 - 1974	Balkan Endemik Nefropatisi (BEN) ve OTA nefrotoksisitesi arasındaki benzerliklerinin belirlenmesi
1973	OTA'nın arpada ki keşfi ile OTA'nın beslenmede olduğunun fark edilmesi OTA ile Okratoksin B ve esterlerinin analizi
1974	OTA'nın hayvanlarda nefropatiye sebep olduğunun belirlenmesi OTA'nın teratojenik etkisi
1977 - 1984	OTA'nın protein sentezini inhibe etmesinin belirlenmesi
1979- 1990	OTA'nın idrar ve kan biyomarkerlarının bulunması
1987	OTA'nın IARC tarafından grup 3'de sınıflandırılması
1988	Sıçan ve fareler için OTA'nın karsinogenetik etkisinin keşfi
1990	OTA ile ilgili ilk yasal düzenlemelerin yapılması
1991	Fare böbrek, karaciğer ve dalağında OTA - DNA eklentilerinin belirlenmesi
1993	OTA'nın IARC tarafından grup 2B'de sınıflandırılması Sıçanlarda DNA eklentilerinin bulunması Bulgaristan'da Balkan Endemik Nefropatisi (BEN) hastalarında OTA – DNA eklentilerinin belirlenmesi
1994	<i>Aspergillus niger</i> 'in OTA üreticisi olarak belirlenmesi
1995	OTA biyotransformasyonunun genotoksisite ile iliŐkilendirilmesi
1996	<i>Aspergillus carbonarius</i> 'un OTA üreticisi olarak keŐfedilmesi OTA'nın insandaki yarılanma ömrünün 35 gün olarak belirlenmesi
1998	LC – ESI – MS/MS ile OTA analizi Cinsiyet ve suŐ duyarlılığına göre OTA ile ilgili yeni kanserojenik çalışmaların yapılması
1999	OTA maruziyeti sonrasında apoptoz görölmesi
2000	OTA günlük alım dozunun 5 ng/kg/gün olarak belirlenmesi (EFSA)

Tablo 4. 2001 - 2015 yılları arasında okratoksin A araştırmalarındaki dönüm noktaları (Malir ve ark, 2016).

YIL	GELİŐME
2001	<i>Penicillium nordicum</i> 'un OTA reticisi olduğunun bulunması
2002	Oksidatif yolağa bağlı OTA nefrotoksisitesinin bulunması
2004 – 2005	OTA – DNA eklentilerinin kimyasal tanımlamasının yapılması
2006	OTA haftalık alım miktarının 120 ng/kg/hafta olarak belirlenmesi (EFSA)
2008	OTA geçici tolere edilebilir haftalık alım miktarının 100 ng/kg/hafta olarak belirlenmesi (EFSA)
2010	Kümes hayvanlarında OTA kanserojenliğinin bulunması OTA günlük alım miktarının 4 ng/kg/gün olarak belirlenmesi (Kanada)
2012	OTA'nın genotoksik ve genotoksik olmayan etki Őekillerinin tespit edilmesi
2013	OTA ve mikro RNA iliŐkisinin belirlenmesi
2015	Kanda OTA α amide ve 2'R OTA'nın belirlenmesi

2.2.3. Okratoksin A için Belirlenmiş Limit Değerler

Diğer mikotoksinler gibi OTA'nın da gıdalardan tamamen uzaklaştırılmasının oldukça zor olduğu grlmektedir. Bundan dolayı ulusal ve uluslararası kuruluŐlar tarafından gıda maddelerinde OTA'nın bulunabileceği limit değerler belirlenmiştir.

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA - The European Food Safety Authority), 4 Nisan 2006 tarihinde gıdada OTA ile ilgili güncel bilimsel bir düŐünceyi benimsemiŐ ve yeni bilimsel bilgileri dikkate alarak tolere edilebilir haftalık alımı 120 ng/kg olarak kabul etmiştir (European Commission, 2010).

Kodeks Alimentarius okratoksin için bir takım limit değerler belirlemiŐtir. Okratoksin terimini A, B, C ve bunların esterleri ve metabolitlerini içerecek Şekilde kabul etmiştir. Bunlardan en önemlisinin OTA olduğunu belirtmiŐtir. Kodeks Alimentarius standartları içerisinde gıdalarda bulunmasına izin verilen OTA maksimum limitleri buğday, arpa ve avdar için 5 μ g/kg dır (Kodeks Alimentarius, 2015).

Ülkemizde 29 Aralık 2011 tarihinde yayımlanan 28157 no'lu Resmi Gazete'nin Türk Gıda Kodeksi BulaŐanlar Yönetmeliğinde OTA için belirtilen maksimum limit Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5. Ülkemizde okratoksin A için gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum limitler (WEB_2, 2018).

Gıda Maddesi	Maksimum limit (µg/kg)
İşlenmemiş tahıllar	5,0
İşlenmemiş tahıldan elde edilen tüm ürünler (doğrudan insan tüketimine sunulan tahıllar ve işlenmiş tahıl ürünleri dahil)	3,0
Kurutulmuş asma meyveleri (kuşüzümü, kuru üzüm ve çekirdeksiz üzüm dahil)	10,0
Kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahve	5,0
Kahve ekstraktı, çözünebilir kahve ekstraktı veya çözünebilir kahve	10,0
Şarap ve meyve şarapları (köpüklü şarap / şampanya dahil, likör şarapları ve hacmen alkol miktarı en az %15 olan şaraplar hariç)	2,0
Aromatize şarap, aromatize şarap bazlı içki ve aromatize şarap kokteyli	2,0
Üzüm suyu, konsantreden üretilen üzüm suyu, üzüm nektarı, üzüm şırası ve konsantreden üretilen üzüm şırası (doğrudan insan tüketimine sunulan)	2,0
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,5
Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0,5
Baharatın aşağıdaki türleri için; Kırmızıbiber (<i>Capsicum spp.</i>) (Bunların kurutulmuş meyveleri, tüm ve öğütülmüş halleri dahil) Karabiber (<i>Piper spp.</i>) (Bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil) Hintcevizi/Muskat (<i>Myristica fragrans</i>) Zencefil (<i>Zingiber officinale</i>) Zerdeçal (<i>Curcuma longa</i>) Bunların bir veya bir kaçını içeren karışım baharat	15
Meyan kökü (<i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza inflata</i> ve diğer türler)	20
Meyan kökü (bitkisel infüzyon bileşeni olarak kullanılanlar)	
Meyan kökü ekstraktı (özellikle alkolsüz içecek ve şekerleme üretiminde kullanılan)	80

2.2.4. Okratoksin A Metabolizması

OTA'nın organizmadaki yolu temel olarak üç adımdan oluşmaktadır. Bunlar emilim, dağılım ve atılımdır. Mide ve gastrointestinal kanalda emilen OTA, serum albümin proteinlerine bağlanıp, portal venöz sistem yoluyla taşınarak, farklı doku ve organlara dağıtılmaktadır. OTA, karaciğer ve böbreklerde birikmektedir ve son olarak idrar, dışkı veya süt ile atılmaktadır (Kamp ve ark, 2005; Coronel ve ark, 2010).

OTA'nın çeşitli hayvan türlerinde oral alımdan sonra hızla emildiği bildirilmiştir. Sıçanlarda, oral uygulama sonrası emilim süresi 18 dakikadır. OTA'nın esas olarak mideden, gastrointestinal kanaldan ve özellikle proksimal jejunumdan emildiği kabul edilmektedir. Bununla birlikte jejunumdan absorpsiyon ise doza bağlı gerçekleşebilir ve jejunumun mukozal yüzeyindeki pH değerine bağlıdır (Vettorazzi ve ark, 2014).

OTA emildikten sonra albümin ve diğer makromoleküllere bağlanmaktadır. Bağlanmayan kısım, sıçanlarda ve insanlarda %0,02'dir. Bu bağlanma, iyonlaşmamış formdaki pasif emilimini kolaylaştırır ve kısmen vücuttaki uzun yarı ömrünü açıklar. Ayrıca OTA'nın plazma proteinlerine bağlanma ile toksikokinetiği arasındaki ilişki birçok hayvan türünde araştırılmıştır ve türler arasında önemli farklılıklar bulunmuştur (Vettorazzi ve ark, 2014). OTA'nın yarılanma ömrü geniş getiren hayvanlar dışındaki memelilerde uzun sürmektedir. Örneğin yarılanma ömrü farelerde 24-39 saat, sıçanlarda 55-120 saat, domuzlarda 72-120 saat, Güney Afrika maymunlarında 19-21 gündür. Gönüllü insanlarda OTA'nın yarılanma ömrü ile ilgili yapılan çalışmalarda ise bu süre 35 gün olarak bildirilmiştir (Creppy, 2002; Kamp ve ark, 2005). Kolestiramin veya mikronize buğday lifleri gibi bazı maddelerin, yemde uygulandığında OTA'nın biyoyararlanımını azalttığı gösterilmiştir (Vettorazzi ve ark, 2014).

Deneysel olarak ağızdan alınan OTA'nın yarı ömrü, intravenöz yoldan alınan OTA'dan daha kısadır ve hepatik bir ilk geçiş eliminasyonuna tabi tutularak sistemik kan dolaşımına girmeden önce safra tarafından çıkarılmaktadır. Karaciğer klirensi, karaciğer hücre membranında bulunan organik anyon transfer eden polipeptit taşıyıcı adı verilen bir multispesifik safra asidi taşıyıcısına bağlıdır (Petzinger ve Ziegler, 2000).

Bir diğer önemli eliminasyon organı ise böbrektir. OTA'nın burada proteine bağlanma oranı %100'e yakındır. Bu bağlanma oranı doğal olarak bulunan konsantrasyon aralığında (1-100 nM) doyumluğa ulaşamamaktadır. Bu yüzden OTA glomerüler filtrasyonla değil, tübüler sekresyonla idrara geçmektedir. Bu işlem de proksimal tübül hücrelerinin bazolateral hücre membranında bulunan başka bir multispesifik ksenobiyotik taşıyıcısı para-amino-hippürik-

asit taşıyıcı sistemi tarafından gerçekleşmektedir. OTA'nın uzun süreli teması sonucu proksimal tübül kökenli böbrek hücrelerinde genel hücre fonksiyonları etkilenmeksizin organik anyon taşıyıcı aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. OTA'nın kendi itrahi da azalmıştır, bu yüzden diğer ksenobiyotik ve ilaçların da itrahi bozulabilir ve OTA dolaylı toksik etki gösterebilir. OTA tüm nefron segmentlerinden reabsorbe olabilir. Bu işlem toksinin renal dokuda birikmesi ve toksisitesinin artması (örneğin renal papilladaki pH homeostazının bozulması) ile sonuçlanabilir (Petzinger ve Ziegler, 2000). Böbrek ve karaciğerden elimine edilen relatif OTA miktarı hayvanın türüne, uygulama doz ve yoluna, enterohepatik dolaşıma, toksinin serum makromoleküllerine bağlanma düzeyine bağlıdır (Girgin ve ark, 2001).

2.2.5. Okratoksin A Zehirlenmesinde Tanı

Klinik tanının okratoksin zehirlenmelerinde genel olarak zor olması araştırmacıları farklı tanı yollarına yönlendirmiştir. Bunlar tüketilen yemin okratoksinler açısından analiz edilmesi, hayvanlarda otopsi yapılması ve histopatolojik incelemelerdir. Okratoksin zehirlenmelerinin tanısında kullanılan bir başka bilgi de kanatlılar gibi protein metabolizmasının son ürünü ürik asit olan hayvanların iç organ yüzeylerinin ürik asit kristalleriyle bezenmiş olmasıdır. Yine serum protein ve albümin düzeylerindeki azalışla birlikte idrarla çıkarılmasındaki artış okratoksin zehirlenmesi tanısında kullanılabilir. Başta domuzların ve diğer hayvanların böbrek *fosfoenolpirüvat karboksikinaz* enzim etkisinin azalmasının belirlenmesi de yol gösterici olabilmektedir (Kaya, 2002).

2.2.6. Okratoksin A Zehirlenmesinde Sağaltım

Okratoksin zehirlenmelerinin sağaltımı için uygulanabilecek özel bir yöntem yoktur (Kaya, 2002).

Koruyucu anlamda diğer mikotoksinlerde kullanılan bentonit, hidrate sodyum kalsiyum alüminyum silikat ve kolestiramin gibi bağlayıcılarla okratoksinler bağlanamamaktadır. Diyetle beraber alınan %10'luk aktif kömür, yemlerdeki okratoksini bağlayarak kandaki, safradaki ve dokulardaki okratoksin seviyelerini aşağıya çekmektedir (Arslanbaş ve Baydan 2010).

Sıçanlarda OTA'nın indüklediği nefrotoksisite üzerindeki etkilerin araştırıldığı bir çalışmada fenilalaninin zehirlenmelerin sağaltımında denemeye değer bir aminosit olarak belirlenmiştir (Baudrimont ve ark, 1994).

Yumurtacı tavuk yemlerine katılan 300 ppm askorbik asitin 3 ppm OTA'ya karşı etkili olabileceği bildirilmiştir (Kaya, 2002).

2.3. Serbest Radikaller, Antioksidanlar ve Oksidatif Stres

2.3.1. Serbest Radikaller

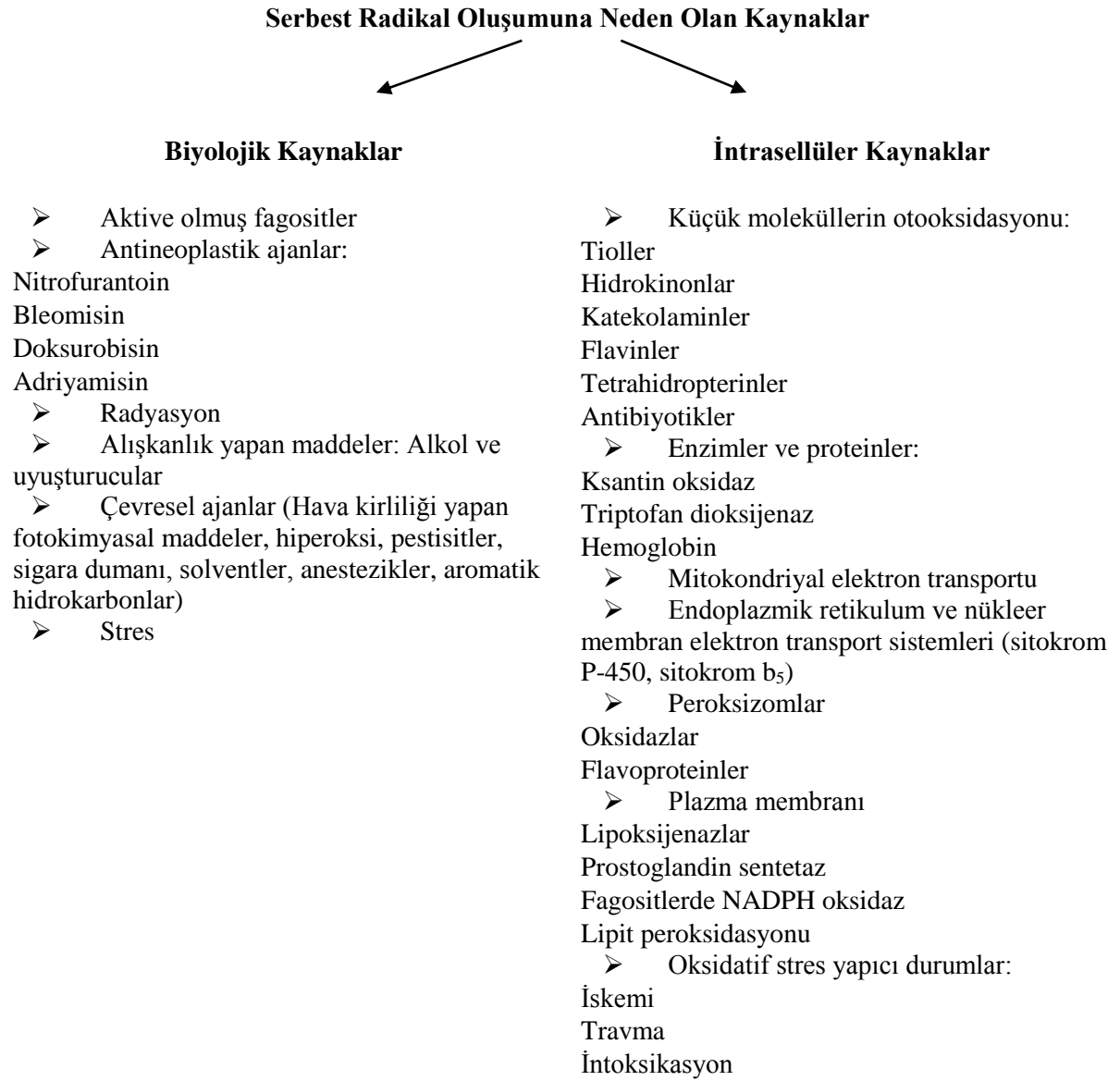
Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşlenmemiş elektronu dış orbitalinde bulunduran atom veya moleküllerdir (Valko ve ark, 2007). Serbest radikaller eşlenmemiş elektronlara sahip olduklarından oldukça reaktiflerdir. Eşlenmemiş elektron, genellikle üst tarafa yazılan bir nokta aracılığıyla gösterilmektedir (Akkuş, 1995). Ortaklanmamış elektrona sahip oldukları için serbest radikaller başka maddelerle rahatlıkla reaksiyona girebilmektedirler. Eşlenmiş elektronlara sahip atomlar veya moleküller kararlı bir yapıda bulduklarından, diğer moleküllerle reaksiyona girme istekleri serbest radikaller gibi fazla olmamaktadır. Ortaklanmamış elektronu bulunmayıp kararlı yapıya sahip olan ve başka maddelerle radikallere kıyasla daha az reaksiyonda bulunan moleküller non-radikaller şeklinde tanımlanmaktadır (Karabulut ve Gülay, 2016).

Serbest radikaller, normal hücre metabolizması sırasında, bakterilerin ve fagositoz tarafından alınan diğer mikroorganizmaların tahribi, genel bağışıklık sisteminin aktivasyonu, lipit peroksidasyonu, elektron taşıma sistemi ve iskemi gibi birçok farklı biyokimyasal reaksiyonla üretilmektedir. Bununla birlikte, radyasyon, ksenobiyotikler, çevresel kirleticiler veya aşırı egzersiz, hipoksi ve tramvaya bağlı olarak da serbest radikaller üretilebilmektedir. Hücrelerde aşırı miktarda serbest radikal oluşumu hücre hasarına ve ölüme neden olabilmektedir. Bu hasar antioksidan moleküllerin varlığı ile önlenemekte veya azaltılabilmektedir (Kandemir ve ark, 2013).

Serbest radikaller istenmeyen oksidasyon reaksiyonları sonucunda protein modifikasyonları, lipit peroksidasyonu ve DNA hasarına bağlı olarak hücre ölümlerine neden olmaktadır. Serbest radikallerin aynı zamanda yaşlanma, kalp - damar rahatsızlıkları (aterosklerozis), katarakt, sepsis, kanser, diyabetik retinopati, gastrointestinal organlarda

kronik iltihaplar, solunum yolu rahatsızlıkları ve damar hasarlarına bağı olarak ortaya çıkan iskemi gibi birçok rahatsızlığın etkenleri arasında olduğu belirtilmektedir (Ekici ve Sağdıç, 2008).

Serbest radikallerin kaynakları genel olarak biyolojik kaynaklar ve intrasellüler kaynaklar olarak ikiye ayrılmaktadır. Bunlar Şekil 4’de gösterilmiştir.

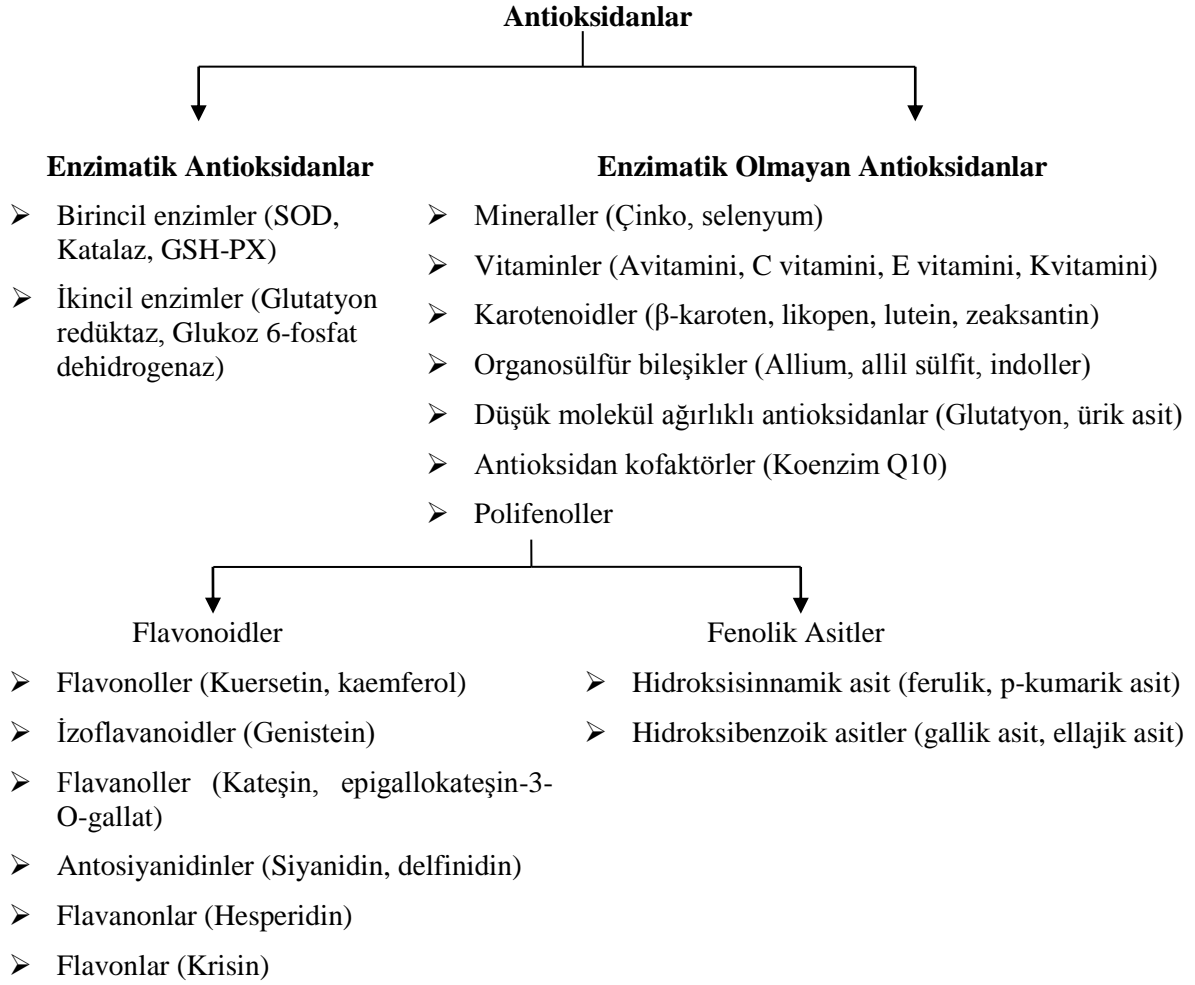


Şekil 4. Serbest radikal oluşumuna neden olan kaynaklar (Akkuş, 1995).

2.3.2. Antioksidan Savunma Sistemleri

Canlılardaki en önemli serbest radikaller oksijen aracılığıyla oluşur. Oksijen; karbon (C), hidrojen (H), nitrojen (N) ve kükürt (S) ile beraber, organik moleküllerin temel yapısal atomlarını oluşturduğundan ve aerobik canlılarda enerji metabolizmasına katıldığından tüm canlıların vazgeçilmez bir elementidir (Diplock, 1998). Ortaklanmamış iki elektron içerdiğinden diradikal olarak adlandırılan oksijen, diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girebilir. Değişik faktörlerin etkisiyle ya da yüksek konsantrasyonda bulunduğu yerlerde oksijen, toksik olan reaktif oksijen türleri (ROT) denilen serbest radikalleri oluşturabilir. Bunlar süperoksit (O_2^-) radikali, hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil (OH) radikali, hipokloröz asit (HOCl), singlet oksijen (1O_2) olabilir. Bu durum organizma için tehlikeli sonuçlar doğurur (Mandal ve ark, 2009).

ROT'nin oluşmasını ve bunların sebep olduğu hasarı önlemek amacıyla vücut çeşitli savunma mekanizması oluşturmuştur. Bu mekanizmalar kısaca antioksidanlar olarak bilinen antioksidan savunma sistemleridir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya ROT'yi toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar, doğal (endojen) ve sentetik (eksojen) kaynaklı antioksidanlar olarak ayrılabilir. Bununla beraber serbest radikallerin oluşmasına engel olanlar ve hali hazırdaki serbest radikalleri etkisiz hale getirenler olarak da sınıflandırılabilirler. Enzim olan antioksidanlar ve enzim olmayan antioksidanlar olarak da sınıflandırmak mümkündür. Antioksidanlar hücrelerin sıvılarında ya da membranlarında karşımıza çıkarlar (Akkuş, 1995). Antioksidanların sınıflandırılması Şekil 5'de gösterilmiştir.



Şekil 5. Antioksidanların sınıflandırılması (Ratnam ve ark, 2006).

2.3.3. Antioksidan Etki Tipleri

Pro-oksidan/antioksidan denge organizmanın sağlıklı bir yaşam sürdürebilmesi için oldukça önemlidir. Serbest oksijen radikallerinin oluşmasını ve sebep oldukları hasarları önlemek amacıyla ve detoksifikasyonu için organizmayı koruyan antioksidan savunma sistemi dört şekilde etkili olmaktadır (Akkuş, 1995; Şener ve Yeğen, 2009):

- Toplayıcı etki: Etkiledikleri serbest oksijen radikallerini tutma ya da çok daha zayıf bir başka moleküle çevirme işlemine denir. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip bir etkiye sahiptirler.

➤ **Bastırıcı etki:** Serbest oksijen radikalleri ile etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren etkiye denir. Vitaminler, flavanoidler, trimetazidin ve antosiyanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

➤ **Zincir kırıcı etki:** Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir. Hemoglobinin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

➤ **Onarıcı etki:** Serbest oksijen radikallerinin meydana getirdiği hasarın antioksidanlar tarafından onarılması onarıcı etki olarak adlandırılmaktadır.

Çeşitli sebeplerle oluşan oksidanlara karşı koruma görevi olan bazı antioksidanların ana görevleri Tablo 6'da gösterilmiştir.

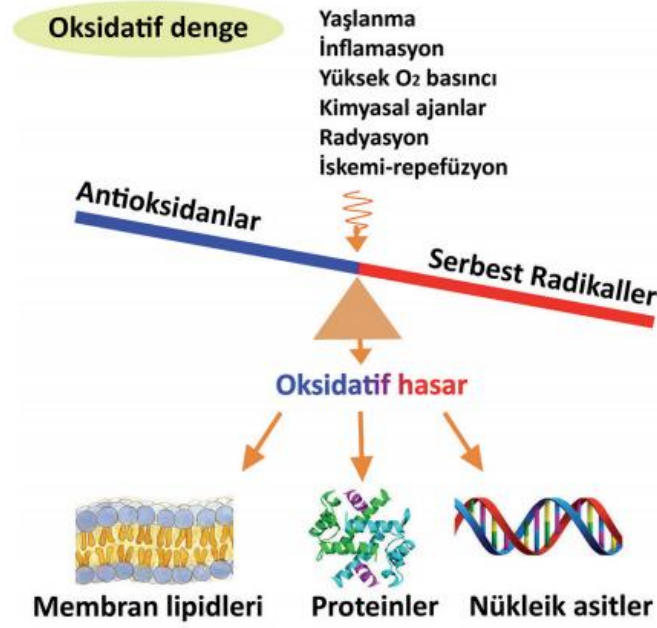
Tablo 6. Bazı antioksidanların formları ve ana görevleri (Scicchitano ve ark, 2018).

Antioksidanlar	Formları	Ana Görevi
<i>Süperoksit dismutaz (SOD)</i>	SOD1, SOD2, SOD3	Süperoksit radikallerine karşı H ₂ O ₂ ve O ₂ oluşturmak için ilk savunma hattını oluşturur.
<i>Katalaz (CAT)</i>	CAT	H ₂ O ₂ 'nin H ₂ O ve O ₂ 'ye ayrılmasını katalize eder.
<i>Glutasyon peroksidaz (GTPx)</i>	GPX1 – GPX5	H ₂ O ₂ 'nin veya organik hidroperoksidin (ROOH) sırasıyla H ₂ O ve alkole (ROH) indirgenmesini katalize eder.
<i>Tioredoksin (TRX)</i>	TRX1, TRX2	Protein oksidasyonunun önlenmesi, apoptosisin kontrolü.
<i>Peroksiredoksin (PRX)</i>	PRX I – VI	Hem hidroperoksitleri hem de peroksinitriti azaltabilen peroksitlerdir.
<i>Glutaredoksin (GRX)</i>	GRX1, GRX2, GRX5	Protein ve protein olmayan tiyollerin korunması ve onarımını sağlar.
<i>Glutasyon transferaz (GST)</i>	GSH sınıfı: Alfa, Delta, Kappa, Mu, Omega, Pi, Teta, Zeta	Doymamış aldehitler, epoksitler ve hidroperoksitler gibi sekonder metabolitleri inaktive eder.

2.3.4. Oksidatif Stres

Hücre aktivitesinin bir sonucu olarak organizmanın içinde doğal ve sürekli olarak oluşan ROT veya serbest radikaller, en azından fizyolojik konsantrasyonda büyüme, çoğalma, farklılaşma ve adaptasyonun önemli düzenleyicileridir. Serbest radikallerin fizyolojik üretimi ile hücrelerin onları süpürme kabiliyeti arasındaki dengesizlik, oksidatif stres olarak adlandırılan bir oksidasyon durumuna yol açmaktadır (Özcan ve ark, 2015; Schoots ve ark, 2018; Scicchitano ve ark, 2018). Bir başka deyişle, oksidatif stres mevcut antioksidan

tamponlama kapasitesini aşan aktif oksijen türlerinin varlığıdır. ROT'lerin yapılarını ve işlevlerini değiştirerek proteinlere, lipitlere, DNA'ya ve karbonhidratlara zarar verebilirler. Oksidatif stresin, kanser ve kardiyovasküler, nörodejeneratif ve akciğer hastalıkları gibi birçok akut ve kronik hastalıkla ilişkili olduğu bilinmektedir (Şkrkat ve ark, 2018). Oksidan – antioksidan ilişkisindeki oksidatif denge durumu Şekil 6'da gösterilmiştir.

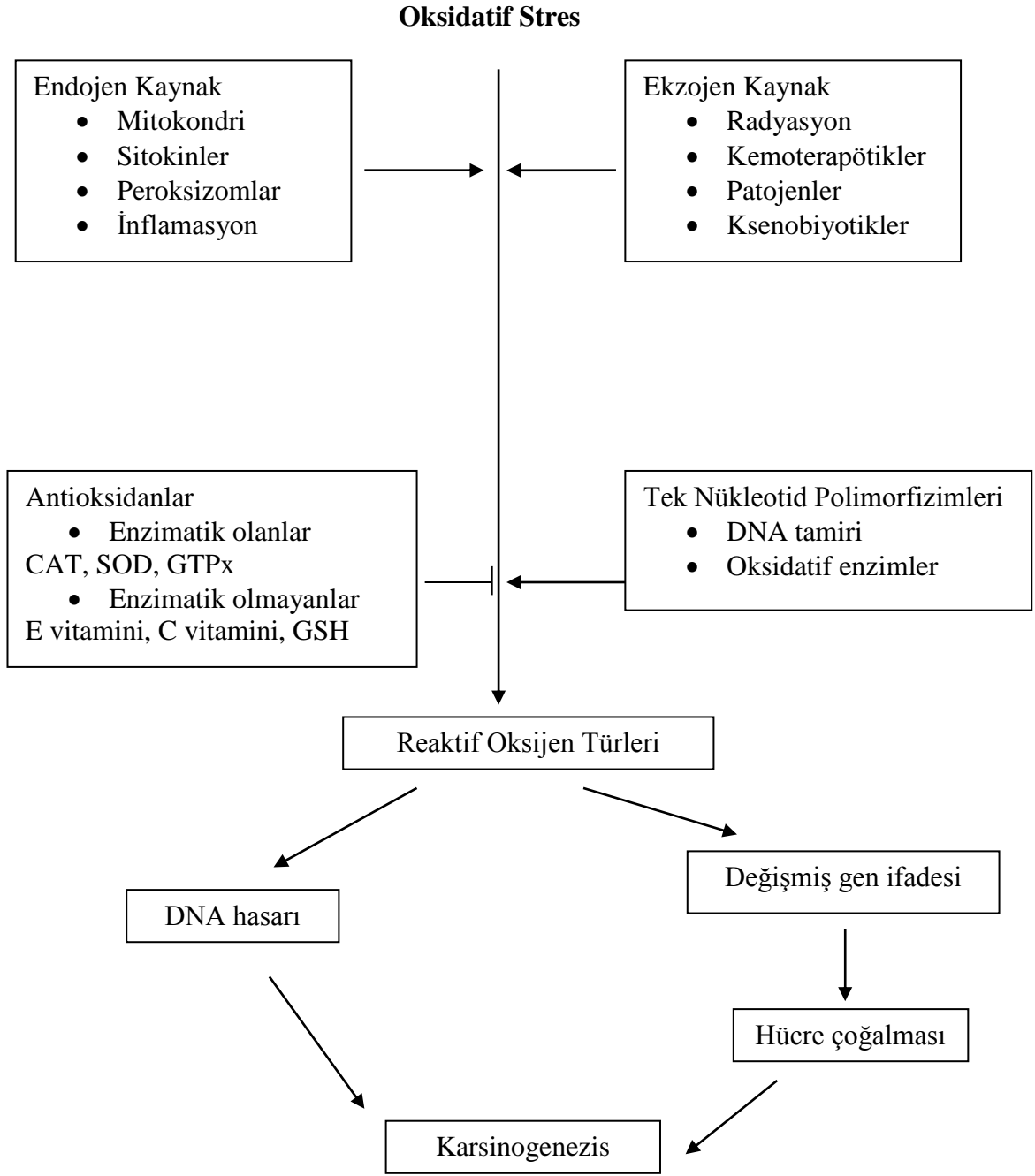


Şekil 6. Oksidatif denge (Özcan ve ark, 2015).

Antioksidan savunma sistemi ile donatılmış olan hücreler oksidanlara karşı savunmanın ilk basamağıdır. Elektronlarını oksidanlara eşleştirebilen antioksidanlar, kontrollü koşullarda oksidanların reaktivitelerini söndürürler ve onları hücrel makromoleküllere çevirirerek zararsız hale dönüştürürler. Antioksidanlar kendiliğinden radikallere dönüşelerde bunlar çok daha kararlıdır. Bu yüzden hücrel hasar oluşturmamaktadırlar (Lykkesfeldt ve Svendsen, 2007).

Hücreler, SOD, CAT, peroksidaz ve ROT'nin atılması gibi hücre içi olaylarla ROT aktivitesine karşı koymaktadırlar. Bunu da E vitamini, C vitamini, glutasyon gibi düşük moleküler ağırlıklı antioksidan türleri ve ROT'nin hasarlı moleküllerinin uzaklaştırılması ile yapmaktadırlar. Oksidatif fosforilasyon gibi işlemlerle açığa çıkan O_2^- önce H_2O_2 'ye dönüştürülmektedir ve daha sonra su vermek üzere indirgenmektedir. Bu detoksifikasyon, ilk adımı katalize eden SOD ve CAT ile başlamakta daha sonra H_2O_2 'yi gideren çeşitli peroksidazlarla olmaktadır (Scicchitano ve ark, 2018).

Bir dizi çalışma, tümör gelişiminde ROT'nin önemli bir rol oynadığını göstermiştir. ROT, dış kaynaklı (mitokondri, peroksizomlar ve inflamatuvar hücre aktivasyonu) ve eksojen kaynaklı (çevresel ajanlar, radyasyon, farmasötikler ve endüstriyel kimyasallar) üretilebilir. Kanserojen sonlanım noktalarında endojen ve ekzojen oksidatif stres kaynaklarının etkisi Şekil 7'de gösterilmiştir. Genetik ve genetik olmayan onarım yolları, ROT'ne neden olan aşırı oksidatif stresle aşınabilir ve bu da DNA'ya zarar verebilir veya gen ekspresyonunu (özellikle hücre büyüme genleri) değiştirebilir ve karsinogenez sürecinde aktiviteye neden olur (Klaunig ve Wang, 2018).

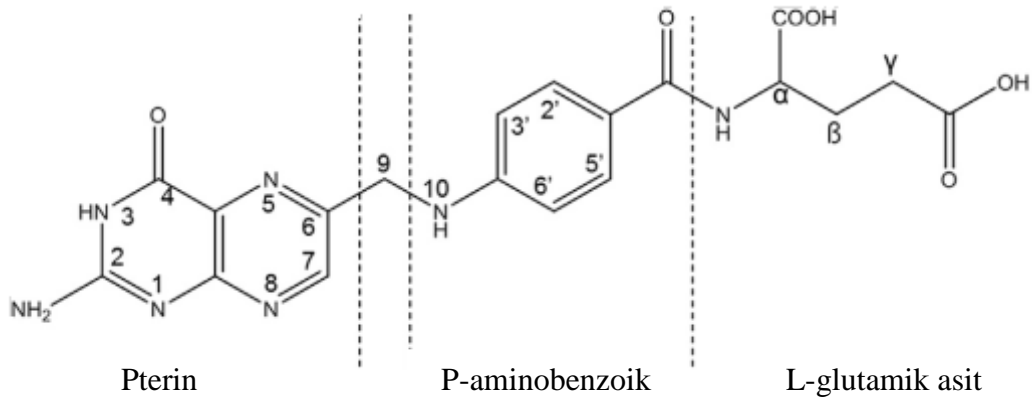


Şekil 7. Oksidatif stresin kaynakları ve karsinogenez son noktaları üzerindeki etkileri (Klaunig ve Wang, 2018).

2.3.5. Folik Asit

Folik asit 1930'lu yıllarda, Wills maya denilen Wills faktörü adı verilen ve ölümcül olabilen megaloblastik anemiye önleyebilecek bir maddenin varlığı bildirdiğinde keşfedilmiştir (Wills, 1931). Folik asit teriminin 1941'de yaprak anlamına gelen folium adlı

latince sözcükten üretilmesinin sebebi; folik asitin çimlenen yeşil yapraklarda bolca bulunmasıdır (Mitchell ve ark, 1941). Pteroilglutamik asit (PteGlu) olarak da adlandırılan folik asit, B kompleks ailesinin suda çözünür bir vitamindir. En çok vitamin B9 olarak anılır (Akbar ve ark, 2016; Gazzali ve ark, 2016). Folik asitin IUPAC ismi (2S) -2 - [[4 - [(2-amino-4-okso-1H-pteridin-6-il) metilamino] benzoil] amino] pentandioik asittir (WEB_3, 2017). Folik asit moleküller olarak glutamik asit (Glu), p-aminobenzoik asit (PABA) ve pterin parçası olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Pterin kısmı, bir metilen köprüsü ile PABA'ya bağlanır ve buna karşılık PABA, peptidik bir bağ ile Glu'ya bağlanarak folik asiti oluşturur (Vora ve ark, 2002). Folik asitin kimyasal yapısı Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8. Folik asitin kimyasal yapısı (Akbar ve ark, 2016).

Folik asit hem doğal hem de sentetik olarak bulunur. Folat, folik asidin anyonik şeklidir. Fizyolojik pH'da asit - baz formu folattır. Çoğu zaman, "folik asit" terimi, diyet takviyelerinde kullanılan tamamen oksitlenmiş sentetik bileşiği belirtirken, "folat" doğal olarak gıdalarda bulunan çeşitli tetrahydrofolat türevlerine karşılık gelir. Bununla birlikte, "doğal" veya "sentetik" folik asitte fark yoktur (Gazzali ve ark, 2016).

Folik asit insanlardaki birçok önemli fizyolojik ve biyokimyasal süreçte, esas olarak iyonik formda yer alan önemli bir bileşiktir. Hücrenin çoğaltılması, gen aktivitesinin düzenlenmesi, kırmızı ve beyaz hücre üretimi, cildin yenilenmesi ve bağırsak yüzeyinin yanı sıra beyin işlevini modüle eden kimyasalların sentezinde yer alır (Gazzali ve ark, 2016). Sağlıklı büyüme ve fetus gelişimi için vazgeçilmez bir vitamindir (Pitkin, 2007). Folik asit normal DNA sentezi için ko-enzim görevi görür ve aynı zamanda amino asit ve çekirdek

protein sentezinde ko-enzim sisteminin bir parçası olarak işlev görmektedir (Vora ve ark, 2002).

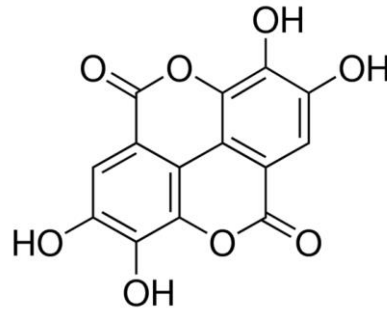
Folik asit insan vücudunda depolanamaz. Bu nedenle eksikliği en yaygın olan vitaminlerden biridir. Sağlıklı yaşam için folik asitin düzenli olarak alımı esastır. Yapraklı yeşil sebzeler, brüksel lahanası, şalgam yeşillikleri, patates, maya, kuru fasulye, bakliyat, portakal ve karaciğer gibi gıdalar folik asidin doğal kaynaklarıdır (Talaoukar ve Arulkumaran, 2013). Düşük tüketim oranları nedeniyle folik asit eksikliği ortaya çıkabilir; bu durum, megaloblastik anemi ve gelişmekte olan fetuslarda nöral tüp kusurları, kanser ve kalp hastalıkları gibi birçok sağlık sorununa yol açabilir (Duthie, 1999; Green, 2002). Bu risk faktörlerinden kaçınmak için, folik asit takviyeli diyet takviyelerinin veya besinlerin kullanımı hızla artmaktadır (Bailey ve ark, 2003).

B vitaminleri folat ve vitamin B12 bir karbon metabolik yolunda merkezi rol oynar. Bu karbon yolu, nükleotit biyosentezi için öncüdür ve metilasyon reaksiyonları için metil grupları oluşturur. Metiyonin sentaz ile 5-metil tetrahidrofolattan metil grubu kullanılarak homosisteinin metiyonine dönüştürülmesi B12 vitaminine bağlı bir reaksiyondur. Ancak yeterli B12 vitamini olmazsa, 5-metil tetrahidrofolat bu formda sıkışıp kalır, çünkü 5, 10-metilen tetrahidrofolatın 5-metil tetrahidrofolatın sentezi geri dönüşü olmayan bir reaksiyondur. Bu, hücre bölünmesinden önce DNA sentezi için nükleotit öncüllerinin mevcudiyetini azaltır, bu da B12 vitamini eksikliği ile ilişkili klinik sonuçlardan biri olan megaloblastik anemiyle sonuçlanır. Yeterli folat mevcut olduğunda, “metil tuzağı” aşılır ve B12 vitamini eksikliği devam etse bile anemi giderilir. Bu, folik asidin zararlı aneminin tedavisi için uygun hale geldiği 20. yüzyılın başlarında gözlemlenmiştir. Zararlı anemide, hastalar, iç faktör olmadığından B12 vitaminini diyetten alamazlar. Tedavi edilmediğinde, bu durum nörolojik dejenerasyona neden olabilir. Aşırı kansızlığı olan hastalar yüksek dozda folik asit ile tedavi edilip kansızlıkları düzeltilebilir, ancak B12 vitamini eksikliği tedavi edilmeden bırakıldığından, subakut kombine omurilik dejenerasyonu gibi durumlarla sonuçlanabilir (Ross ve ark, 1948). Folik asit fazlalığı vitamin B12 eksikliği semptomlarını maskeleyebileceğinden sağlık riski de oluşturmaktadır. Bu durum, araştırmacıların doğal kaynaklarda, zenginleştirilen gıdalarda ve çoklu vitamin preparatlarında bulunan folik asit miktarını doğru bir şekilde ölçebilecek analitik yöntemler geliştirmelerine yol açmıştır (Akbar ve ark, 2016).

2.3.6. Ellajik Asit

Braconnot tarafından 1831’de keşfedilen ellajik asit böğürtlen, ahududu, çilek, kızılıçık, ceviz, fındık, nar, kurt üzümü gibi gıdalarda bulunan bir polifenolik antioksidandır (Malini ve ark, 2011).

Molekül ağırlığı 302,194 g/mol olan ellajik asitin kimyasal formülü $C_{14}H_6O_8$ şeklindedir. IUPAC ismi 2,3,7,8-tetrahidroksikromeno[5,4,3-cde]kromene-5,10-dione olup, kimyasal yapısı Şekil 9’da gösterilmiştir. Ellajik asitin kaynama noktası 360 °C’den yüksektir (WEB_4, 2017).



Şekil 9. Ellajik asitin kimyasal yapısı (WEB_4, 2017).

Ellajik asidin antiproliferatif ve antioksidan özellikleri potansiyel sağlık yararları ile ilgili ön araştırmaları hızlandırmıştır (Malini ve ark, 2011). Ellajik asit, foliküler lenfoma tedavisinde (faz 2 deneme), intrauterin büyüme kısıtlı bebeklerin beyin hasarına karşı korunma (faz 1 ve 2 deneme), obez olan ergenlerde kardiyovasküler işlevin iyileştirilmesi (faz 2 deneme) için araştırılan bir ilaçtır ve güneş lentijinlerinin (lekelerinin) topikal tedavisi için de araştırılmaktadır (WEB_5, 2017).

Ellajik asitin antimutajenik, antigenotoksik, antiapoptotik, antikarsinojenik, antibakteriyal, antiviral, antimalaryal, antialerjik, antiinflamatuvar, antiaterojenik, antidiyabetik, antiepileptik, antidepresan, antianksiyetik, nöroprotektif, pnömoprotektif, nefroprotektif, kardiyoprotektif, hepatoprotektif etkinliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Ramsés García-Nino ve Zazueta, 2015). Ellajik asit içerdiği bilinen bitkiler Tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7. Ellajik asit içeren bitkiler (Ramsés García-Nino ve Zazueta, 2015).

Latince İsmi	Farmakolojik Özellikler
<i>Barringtonia racemosa</i>	Antioksidan
<i>Carya illinoensis</i>	Antioksidan, antihiperlipidemik
<i>Chrozophora senegalensis</i>	Antimalaryal
<i>Cistus laurifolius</i>	Antioksidan, antidiyabetik
<i>Cochlospermum angolensis</i>	Antioksidan, antidepresan
<i>Decalepis hamiltonii</i>	Antioksidan
<i>Delonix elata</i>	Antihepatotoksik
<i>Dimocarpus longan</i>	Antioksidan, antifungal, antimikrobiyal
<i>Embllica officinalis, syn</i>	Antioksidan, antihepatotoksik,
<i>Phyllanthus emblica</i>	antiinflamatuvar, antidiyabetik, antikansirojenik
<i>Eucalyptus globulus</i>	Antioksidan
<i>Euphorbia supina</i>	Antioksidan
<i>Ficus glomerata</i>	Antioksidan, gastropretiktör
<i>Gentiana scabra</i>	Antihepatotoksik
<i>Geranium carolinianum</i>	Antihepatit B virüsü
<i>Lagerstroemia speciosa</i>	Antidiyabetik, antihiperürisemik, antiimmun yetmezlik virüsü (anti-HIV)
<i>Macrosiphonia longiflora</i>	Antiinflamatuvar
<i>Mangifera indica</i>	Antioksidan
<i>Moringa oleifera</i>	Antioksidan
<i>Myrciaria dubia</i>	Antioksidan
<i>Polygonum chinense</i>	Antidiyareik
<i>Psidium friedrichsthalianum</i>	Antioksidan, antiinflamatuvar
<i>Punica granatum</i>	Antioksidan, antiinflamatuvar, antikarsinojenik, antidiyabetik, antinosiseptif, antibakteriyal, antifungal, antihepatit C virüsü
<i>Rubus parvifolius</i>	Antihepatotoksik
<i>Sebastiania chamaelea</i>	Antimalaryal
<i>Terminalia chebula</i>	Antioksidan, antikarsinojenik, antibakteriyal, antihepatit C virüsü
<i>Thespesia lampas</i>	Antioksidan, antihepatotoksik
<i>Trapa taiwanensis</i>	Antihepatotoksik
<i>Vitis rotundifolia</i>	Antioksidan, antikarsinojenik
<i>Woodfordia fruticosa</i>	Antioksidan, antiinflamatuvar, antibakteriyal, antifibrotik, antiastmatik

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Cihazlar, Araç ve Gereçler

Çalışma kapsamında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında bulunan cihaz ve laboratuvar araçlarından yararlanıldı;

- Buzdolabı / derin dondurucu (Samsung, RL62ZBSW)
- Cerrahi eldiven (Beybi)
- Cerrahi makas, pens
- Değişik hacimlerde otomatik pipetler (Ependorf, Brand, Biohit)
- Dijital pH metre (Denver Instrument, Model 225)
- Distile su cihazı (Nüve, NS 112)
- EDTAlı tüp (BD Vacutainer)
- Etüv (Nüve, FN 500)
- Farklı boyutlarda deney tüpü, beher, petri kabı
- Filtre kağıdı (WHA 10347510, Sigma-Aldrich)
- Floresan mikroskop (Leica, DM 3000) ve kamera (Leica, DC 200 CCD)
- Güç kaynağı (Cleaver Scientific, CS 300V)
- Hassas terazi (Shimadzu, AX 120)
- Heparinli tüp (BD Vacutainer)
- Isıtmalı manyetik karıştırıcı (IKA, RH Basic 2)
- İnkübatör (Nüve, ES 110)
- Kesintisiz güç kaynağı (MGE, Evolution 650 ve Tunçmatik, Newtech ECO 1-2 kVA)
- Kuartz küvetler (Hellma Analytics, 104 - QS ve 100 - QS, 10 mm)
- Lam (Isolab, 24x 24 mm ile 24 x 60 mm)
- Lamel (Isolab, 24x 24 mm ile 24 x 60 mm)
- Mikrosantrifüj tüpü (Isolab)
- Polietilen enjektör (Ayset 2,5, 5, 10 ml)

- Polietilen insülin enjektörü (Ayset)
- Rotator (P Selecta)
- Santrifüj (Nüve, NF 800R)
- Serum tüpü (BD Vacutainer)
- Sıçan besleme sondası (16 G Harvard Aparatus)
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Hettich Zentrifugen, Mikro 200 R)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Zentrifugen, Universal 320 R)
- Spektrofotometre (Shimadzu, UV-1601)
- Su banyosu (Memmert WNB 10)
- Teflon başlıklı homojenizatör (Yellowline, OST basic)
- Thoma sayım lamı (Neubauer)
- Vorteks (Nüve, NM 110 ve IKA, MS3 Basic)
- Yatay elektroforez tankı (Cleaver Scientific, CSL – COM 20) ve bağlı sirkülasyonlu soğutucu (Julabo, FL 300)

Ayrıca elde edilen doku ve kan numunelerinin muhafaza işlemi için Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda bulunan -80 °C dolap (Nuair, NU 9668E), deney hayvanlarının canlı ağırlıklarının belirlenmesi amacıyla Fizyoloji Anabilim Dalı'na ait terazi (Kern, CB 12K1N) ve serum OTA miktarının belirlenmesi için Parazitoloji Anabilim Dalı'nda bulunan ELISA okuyucusu (Thermo Scientific Multi-Scan 60 Spectrophotometer) kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Çalışma sürecinde kullanılan kimyasallar aşağıda belirtilmiştir:

- %30'luk hidrojen peroksit (H_2O_2) (Merck 1.08597)
- %35'lik hidroklorik asit (HCl) (Carlo Erba 302626)
- 2-tiyobarbitürik asit (TBA) (Sigma Aldrich T5500)
- Albumin (Sigma Aldrich A7906)
- Amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$) (Merck 1.01216)
- Bakır klorür ($CuCl_2$) (Aldrich 222011)
- DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindole dihidroklorid) (Sigma 9542)
- Di-sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) (Sigma S7907)
- Di-sodyum hidrojen fosfat 2-sulu ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) (Merck 6576)

- Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma D8418)
- 5,5'-Ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) (Sigma D8130)
- Etilendiamintetraasetik asit disodyum tuzu dihidrat (EDTA) (Sigma E5134)
- Ellajik asit (Sigma E2250)
- Etanol (Merck 1.11727)
- Fötal Bovine Serum (FBS) (Sigma Aldrich A7906)
- Folik asit (Sigma F7876)
- Glutasyon (GSH) (Merck 1.04090)
- İzotonik sodyum klorür çözeltisi (Polifarma)
- Kloroform (Sigma Aldrich 24216)
- Ksantin (Sigma X626)
- Ksantin oksidaz (Sigma X1875-25UN)
- Düşük erime noktalı agaroz (LMPA - Low melting point agarose) (Sigma A9045)
- Metafosforik asit (Merck 1.00546)
- Mısır özü yağı
- n-butanol (Sigma Aldrich 24124)
- Nitrotetrazoliyum mavi klorür (NTB) (Sigma Aldrich N6876)
- Normal erime noktalı agaroz (NMPA - Normal melting point agarose) (Sigma A7174)
- Okratoksin A (OTA) (Cayman Chemical 1.800.364.9897)
- Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS tablet) (Sigma P4417)
- Potasyum ferrosiyaniür ($K_3Fe(CN)_6$) (Sigma Aldrich 244023)
- Potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4) (Sigma Aldrich 04243)
- Potasyum siyaniür (KCN) (Merck 1.04965)
- Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) (Sigma S5761)
- Sodyum fosfat dibazik dihidrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) (Sigma 71643)
- Sodyum fosfat dibazik (Na_2HPO_4) (Sigma Aldrich S9763)
- Sodyum hidroksit (NaOH) (Sigma Aldrich 06203)
- Sodyum karbonat (Na_2CO_3) (Sigma Aldrich S7795)
- Sodyum klorür (NaCl) (Sigma Aldrich S9625)
- Sodyum sitrat tribazik dihidrat (Sigma Aldrich S4641)
- Trikloroasetik asit (TCA) (Sigma Aldrich 27242)
- TritonTMx100 (Sigma T8787)
- Trizma[®] base (Sigma T1503)

3.1.3. Hayvan Materyali

Çalışmada hayvan materyali olarak ağırlıkları 180-207 g arasında değişen 10-12 haftalık 48 adet *Wistar albino* sıçan kullanıldı. Kullanılan sıçanlar ADÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi Araştırma Merkezi'nden temin edildi. İlgili sıçanların sütten kesilme döneminden hemen sonra her bir kafese dörder tane yerleştirildi. Sıçanların seçiminde sağlık durumlarının iyi olmasına ve daha önce herhangi bir araştırmada kullanılmamış olmasına dikkat edildi. ADÜ Veteriner Fakültesi Dekanlığı'ndan alınan izin doğrultusunda ilgili kurumun Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'ne getirilen sıçanlar çalışma odasına yerleştirildi. Çalışma odasının kapısına ve duvarına görülebilecek şekilde sıçan bakımı, yemleme, temizlik vb işlemlerin proje çalışanları tarafından yapılacağı ve proje çalışanları ile ilgili bilgilendirme yazısı asıldı.

Çalışmada kullanılan sıçanlar, nem oranı % 55-65 aralığında, 22-24 °C oda sıcaklığında 12 saat aydınlık 12 saat karanlıkta kalacak şekilde polietilen şeffaf kafeslerde tutuldu. Kafeslerin içine altlık olarak talaş serildi ve talaşlar haftada iki ya da üç kez değiştirildi. Sıçanlara çalışma süresince standart sıçan yemi ve çeşme suyu *ad libitum* verildi.

Sıçanlar 10 günlük adaptasyon süresinin ardından gruplandırıldı. Bu kapsamda sıçanlar 6 eşit deneysel gruba (n = 8) ayrıldı. Çalışma süresi 28 gün olarak belirlenerek ilgili maddeler gavaj yoluyla verildi. Gruplar sıçanların ortalama ağırlıkları birbirine yakın olacak şekilde ayarlandı.

Sıçanlar pikrik asit ile sistematik olarak boyanarak numaralandırıldı. Böylece canlı ağırlığa göre verilecek miktar için bireysel uygulama tablosu oluşturuldu. Uygulanacak miktara %10'luk sonda kaybı da ilave edildi.

Deneysel çalışma ADÜ "Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu" (ADÜ-HADYEK) tarafından 14.08.2015 tarih ve 2015/090 sayılı izni alınarak gerçekleştirildi.

Deneysel aşamalara ait görüntüler Resim1, 2 ve 3'de gösterilmiştir.



Resim 1. Araştırma kapsamında kullanılan *Wistar albino* sıçanlar ve deneysel gruplar (n = 8).



Resim 2. Deney hayvanları ünitesinde sıçan tartımı.



Resim 3. Deney hayvanları ünitesinde sıçanlara gavaj yolu ile ilaç uygulaması.

3.1.4. Deneysel Aşama

Deneysel çalışmamız 6 gruptan ve her grupta 8 sıçan olacak şekilde aşağıda belirtildiği şekilde oluşturuldu:

- Grup I (Kontrol grubu): OTA'nın olumsuz etkilerinin ve folik asit ile ellajik asidin antioksidan etkilerinin karşılaştırılabilmesi için sadece %0,9 NaCl gavaj yoluyla verildi.
- Grup II (OTA grubu): OTA maruziyeti sonucu ortaya çıkacak etkilerin araştırıldığı gruptur. Bu amaçla 210 µg/kg/gün dozda OTA gavaj yoluyla verildi (Aydın ve ark, 2013; Palabıyık ve ark, 2013; Qi ve ark, 2014; Tanai ve ark, 2014).
- Grup III (Folik asit grubu): Folik asitin etkilerinin araştırıldığı gruptur. Bu amaçla 20 mg/kg/gün dozda folik asit gavaj yoluyla verildi (Mohammadi ve ark, 2012).
- Grup IV (Ellajik asit grubu): Ellajik asitin etkilerinin araştırıldığı gruptur. Bu amaçla 10 mg/kg/gün dozda ellajik asit gavaj yoluyla verildi (Padma ve ark, 2014).

- Grup V (OTA + Folik asit grubu): OTA maruziyeti sonucunda folik asitin etkilerinin araştırıldığı grup olarak oluşturuldu. Bu amaçla 210 µg/kg/gün dozda OTA gavaj yoluyla, 1 saat sonra 20 mg/kg/gün dozda folik asit gavaj yoluyla verildi.

- Grup VI (OTA + Ellajik asit grubu): OTA maruziyeti sonucunda ellajik asidin etkilerinin araştırıldığı grup olarak oluşturuldu. Bu amaçla 210 µg/kg/gün dozda OTA gavaj yoluyla, 1 saat sonra 10 mg/kg/gün dozda ellajik asit gavaj yoluyla verildi.

Deneysel aşamada kullanılan kimyasallar uygun çözücüler (OTA – 0,5 mg/ml 1:1 etanol:PBS, folik asit – 6 mg/1 ml distile su, ellajik asit – 10 mg/1 ml mısır yağı) içerisinde çözdürüldü ve alüminyum folyo sarılı şişelerde saklandı. Çözeltiler haftalık hazırlandı ve haftalık canlı ağırlık ölçümü yapılarak uygulanacak ilaç miktarları revize edildi.

Belirlenmiş olan 28 günlük çalışma süresi sonunda canlı ağırlıkları ölçülen sıçanlar 60 mg/kg ketamin (Alfamine %10, Ata Fen) ve 10 mg/kg ksilazin (Xylazinbio %2, Bioveta) anestezisine alındı. Anestezi altında kardiyak punksiyon ile kalpten alınan kanlar tüplere aktarıldı. Alınan kanlar karaciğer ve böbrek fonksiyonlarının tespitinde, serumda bulunan OTA konsantrasyonunun analizinde ve DNA hasarının belirlenmesinde kullanıldı. Kanların tüplere aktarılmasının ardından sıçanlar servikal dislokasyon ile ötenazi edildi. Karaciğer ve böbrek dokusu örneklerinde oksidan ve antioksidan parametre analizleri için sıçanlar disseke edildi. Elde edilen doku örnekleri kanlarının uzaklaştırılması amacı ile distile su ile yıkandı, filtre kağıdı ile kurutuldu, terazide tartılarak ağırlıkları ölçüldü ve ardından analiz edileceği zamana kadar - 80 °C’de muhafaza edildi.

3.2. Yöntem

Anestezi sonrası kardiyak punksiyon ile alınan kanlar, ilgili analizler için hazırlandı. Bu amaçla herbir sıçandan alınan 5 ml kan serum tüpüne, 1 ml kan heparinli tüpe ve 2,5 ml kan EDTA’lı tüpe aktarıldı.

Serum tüpüne alınan 5 ml kan 3500 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Tüpün üst kısmında kalan serum analiz aşamasında kullanılmak üzere otomatik pipetler aracılığı ile üzeri etiketli mikrosantrifüj tüplerine aktarılarak - 80 °C’de muhafaza edildi. Heparinli tüpler içerisine alınan kanlar comet analizi için ve EDTA’lı tüpler içerisine alınan kanlar CAT ve GSH analizi için kullanıldı.

3.2.1. Karaciğer Fonksiyonlarının Tespiti

Karaciğer fonksiyonlarının tespiti amacıyla sıçanlardan elde edilen serum örneklerinden *alanin aminotransferaz* (ALT), *aspartat aminotransferaz* (AST) ve *alkalin fosfataz* (ALP) enzim analizleri spektrofotometrede yapıldı.

3.2.1.1. Serum *alanin aminotransferaz* (ALT) analizi

Serum ALT miktarının belirlenmesinde ticari test kiti (A2222, Archem Diagnostik Ind. Ltd., Türkiye) kullanıldı.

Prensip:

ALT enzimi, L-alanin ile 2-okzoglutarat arasındaki *transaminaz* reaksiyonunu katalizler. Oluşan piruvat LDH varlığında laktatı indirger. Reaksiyon ilerlerken NADH NAD'a yükseltgenir. Birim zamanda azalan NADH miktarı 340 nm'de absorbanstaki azalmanın ölçülmesi ile takip edilir.

Yöntem:

Çalışmalar 340 nm'de 37 °C'de gerçekleştirildi. Test kiti içerisinde çıkan reaktif 1'in 4 birimi ile reaktif 2'nin 1 birimi karıştırıldı. Elde edilen karışımdan 1 ml alınarak üzerine 100 µl örnek ilave edildi. Tüpler vortekslendi ve ilk okuma 90 sn sonra yapıldı. Ardından tüpler 37 °C'de inkübe edildi ve 60 sn ara ile 3 okuma yapılarak değerler kaydedildi. Sonuçlar U/L olarak ifade edildi.

3.2.1.2. Serum *aspartat aminotransferaz* (AST) analizi

Serum AST miktarının belirlenmesinde ticari test kiti (A2212, Archem Diagnostik Ind. Ltd., Türkiye) kullanıldı.

Prensip:

AST enzimi, L-aspartat ile 2-okzoglutarat arasındaki *transaminaz* reaksiyonunu katalizler. *Malat dehidrojenaz* varlığında 2-okzaloasetat malatı indirger. Reaksiyon ilerlerken NADH NAD'a yükseltgenir. Birim zamanda azalan NADH miktarı 340 nm'de absorbanstaki azalmanın ölçülmesi ile takip edilir.

Yöntem:

Analiz 340 nm'de 37 °C'de gerçekleştirildi. Test kiti içerisinde çıkan reaktif 1'in 4 birimi ile reaktif 2'nin 1 birimi karıştırıldı. Elde edilen karışımdan 1 ml alınarak üzerine 100 µl örnek ilave edildi. Tüpler vortekslendi ve ilk okuma 90 sn sonra yapıldı. Ardından tüpler 37 °C'de 30 sn inkübe edildi ve 60 sn ara ile 3 okuma yapılarak değerler kaydedildi. Sonuçlar U/L olarak ifade edildi.

3.2.1.3. Serum *alkalin fosfataz* (ALP) analizi

Serum ALP miktarının belirlenmesinde ticari test kiti (A2022, Archem Diagnostik Ind. Ltd., Türkiye) kullanıldı.

Prensip:

ALP enzimi, 4-NPP'i alkali şartlarda 4-nitrofenol salınımı için hidrolizler. Numunedeki ALP aktivitesini ölçmek için 4-nitrofenol formu 405 nm dalga boyunda tespit edilir.

Yöntem:

Analiz 405 nm'de 37 °C'de gerçekleştirildi. Test kiti içerisinde çıkan reaktif 1'in 4 birimi ile reaktif 2'nin 1 birimi karıştırıldı. Elde edilen karışımdan 1 ml alınarak üzerine 20 µl örnek ilave edildi. Tüpler vortekslendi ve 60 sn sonra başlangıç absorbansı okundu. Ardından 60 sn ara ile 3 okuma yapılarak, değerler U/L olarak kaydedildi.

3.2.2. Böbrek Fonksiyonlarının Tespiti

Böbrek fonksiyonlarının tespiti amacıyla sıçanlardan elde edilen serum örneklerinden kreatinin, gama glutamil transferaz (GGT) ve üre analizleri spektrofotometrede yapıldı.

3.2.2.1. Serum kreatinin konsantrasyonu analizi

Serum kreatinin konsantrasyonunun belirlenmesinde ticari test kiti (A2162, Archem Diagnostik Ind. Ltd., Türkiye) kullanıldı.

Prensip:

Kreatin alkali ortamda renk kompleksi oluşturmak için pikrik asitle reaksiyona girer. Kırmızı rengin gelişimi 500–520 nm’de fotometrik yolla takip edilebilir. Sürfaktanla sodyum tetraboratın birleşimi enterferansı minimumda tutar.

Yöntem:

Çalışmalar 510 nm’de 37 °C’de gerçekleştirildi. Test kiti içerisinde çıkan reaktif 1’in 1 birimi ile reaktif 2’nin 1 birimi karıştırıldı. Elde edilen karışımdan 1 ml alınarak kör olarak kullanıldı ve cihaz sıfırlandı. Karışımdan 1 ml alınarak üzerine 100 µl örnek ilave edildi. Yine karışımdan 1 ml alınarak üzerine 100 µl standart ilave edildi. Tüpler vortekslenildi ve 37 °C’de 60 sn yapılan inkübasyonun ardından absorbans 1 değeri okundu. Ardından tüpler 60 sn 37 °C’de inkübe edildi ve absorbans 2 değeri için okuma yapıldı. Elde edilen değerler mg/dL olarak ifade edildi.

3.2.2.2. Serum gama glutamil transferaz (GGT) aktivite analizi

Serum GGT aktivitesinin belirlenmesinde ticari test kiti (A2172, Archem Diagnostik Ind. Ltd., Türkiye) kullanıldı.

Prensip:

GGT enzimi, p-nitroanilin salınımı için GLUPA-C’yi hidroliz eder. p-nitroanilin 405 nm’de spektrofotometrik olarak numunedeki GGT aktivitesini tespit etmek için tespit edilir.

Yöntem:

Analizler 340 nm’de 37 °C’de gerçekleştirildi. Test kiti içerisinde çıkan reaktif 1’in 4 birimi ile reaktif 2’nin 1 birimi karıştırıldı. Elde edilen karışımdan 1 ml alınarak üzerine 100 µl örnek ilave edildi. Tüpler vortekslenildi ve ilk okuma 60 sn sonra yapıldı. Ardından tüpler 37 °C’de inkübe edildi ve 60 sn ara ile 3 okuma yapılarak değerler kaydedildi. Sonuçlar U/L olarak ifade edildi.

3.2.2.3. Serum üre konsantrasyonu analizi

Serum ürenin kantitatif tayininde ticari test kiti (A2332, Archem Diagnostik Ind. Ltd., Türkiye) kullanıldı.

Prensip:

Üreaz, numunedeki üreyi glutamat ve NAD⁺ oluşturmak için *glutamat dehidrogenaz* varlığında 2-oksoglutarat ve NADH ile reaksiyona giren amonyum iyonlarını açığa çıkarmak için hidroliz eder. Absorbans düşüşü 340 nm’de ölçülür.

Yöntem:

Analiz 340 nm’de 37 °C’de gerçekleştirildi. Test kiti içerisinde çıkan reaktif 1’in 4 birimi ile reaktif 2’nin 1 birimi karıştırıldı. Elde edilen karışımdan 1 ml alınarak kör olarak kullanıldı ve cihaz sıfırlandı. Karışımdan 1 ml alınarak üzerine 10 µl örnek ilave edildi. Yine karışımdan 1 ml alınarak üzerine 10 µl standart ilave edildi. Tüpler vortekslendi ve 37 °C’de 30 sn inkübe edildi. Yapılan inkübasyonun ardından absorbans 1 değeri okundu. Ardından tüpler 60 sn 37 °C’de inkübe edildi ve absorbans 2 değeri için okuma yapıldı. Elde edilen değerler kaydedildi. Sonuçlar mg/dL olarak ifade edildi.

3.2.3. Karaciğer ve Böbrek Dokularında Oksidan ve Antioksidan Parametre Analizi

Karaciğer ve böbrek dokularında oksidan ve antioksidan parametre analizlerinde ilk olarak doku homojenizasyonu yapıldı. Ardından karaciğer ve böbrek dokularında SOD, CAT, GSH ve MDA analizleri gerçekleştirildi.

3.2.3.1. Dokuların homojenizasyonu

Kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

Solüsyon 1: 1000 ml distile su içerisinde 21,29 g Na₂HPO₄ ve 8,76 g NaCl çözdürüldü.

Solüsyon 2: 1000 ml distile su içerisinde 20,42 g KH₂PO₄ ve 8,76 g NaCl çözdürüldü.

Solüsyon 1 den bir miktar alınarak solüsyon 2 yardımı ile pH 7,4’e ayarlandı ve böylece 150 mM fosfat tamponu elde edildi.

Yöntem:

Ötenazi işleminden sonra - 80 °C’ye kaldırılan karaciğer ve böbrek dokularından 0,5’er g tartıldı. Tartılan kısım 150 mM fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkandı. Kurutma işlemi sonrası doku örneği 5 ml fosfat tamponla 2000 devir ve 1 dakika süreyle buzlu su dolu kap içerisinde teflon başlıklı homojenizatörde homojenize edildi. Homojenizatlar + 4 °C’de 12 000 rpm’de

10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar total protein, SOD, CAT, GSH ve MDA analizinde kullanılana kadar - 80 °C’de mikrosantrifüj tüpleri içerisinde saklandı.

3.2.3.2. Total protein analizi

Oksidan / antioksidan parametrelerin hesaplanmasında ara parametre olarak total protein analizi Biüret metoduna göre ticari total protein kiti (A2301, Archem Diagnostik Ind. Ltd., Türkiye) kullanılarak gerçekleştirildi.

Prensip:

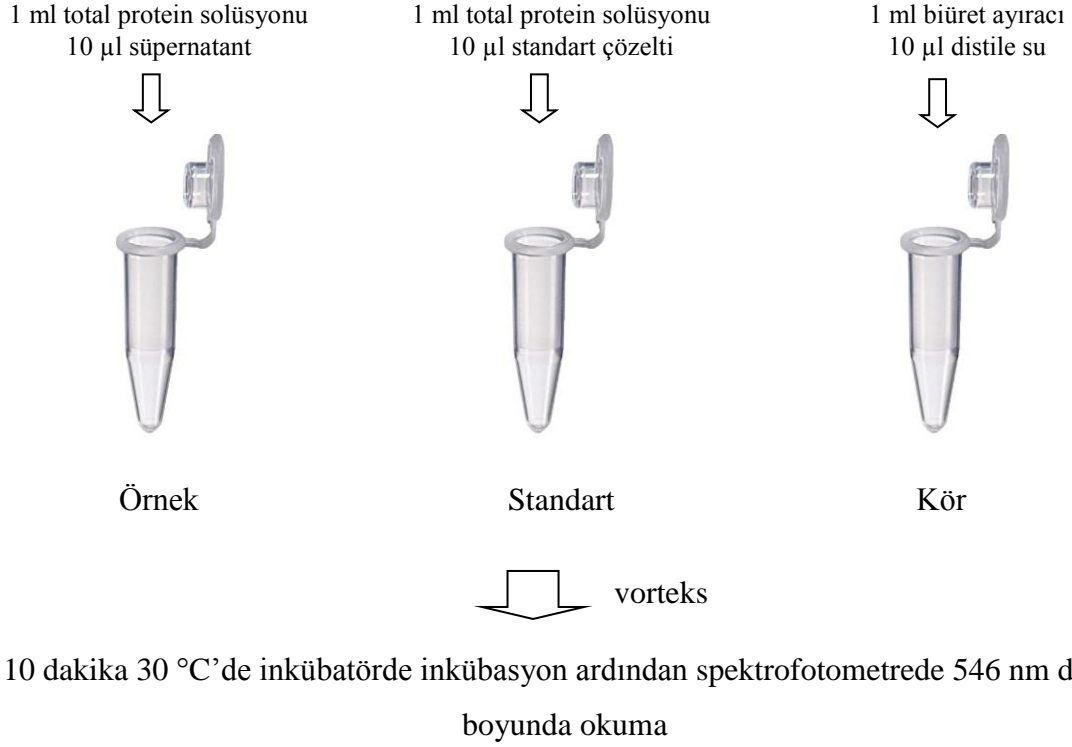
Protein peptid bağları, absorpsiyonu 520 – 560 nm’de ölçülebilen mavi – mor kompleksi oluşturmak için alkali solüsyondaki Cu(II) ile etkileşime girer. Her Cu(II) 6 peptik bağ ile kompleks oluşturabilmektedir. Tartarat tuzu stabilizasyonu sağlar, iyot molekülleri ise alkali bakır kompleksinin kendi kendine azalmasını engellemek için kullanılır.

Biüret ayırıcının içeriği:

Bakır sülfat 6 mM, sodyum potasyum tartarat 21 mM, potasyum iyodür 6 mM, NaOH 0,75 M olacak şekilde solüsyon hazırlandı.

Yöntem:

Kör, standart ve örnek için kullanılacak her bir mikrosantrifüj tüpüne total protein kiti içerisindeki biüret ayırıcından 1 ml eklendi. Süpernatantlar vortekslenerek örnek mikrosantrifüj tüplerinin içerisine 10 µl ilave edildi. Spektrofotometrede okumak üzere 2 adet kör ve 1 adet standart hazırlandı. Kör için 10 µl distile su kullanıldı. Standart için kit içerisinde bulunan standart çözeltisinden 10 µl mikrosantrifüj tüpüne ilave edildi. Tüpler vortekslendikten sonra 10 dakika süreyle 30 °C’de inkübatörde inkübe edildi. Daha sonra spektrofotometrede kuartz küvetlerde köre karşı 546 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Sonuçlar g/dl olarak ifade edildi. Yöntem Şekil 10’da gösterilmiştir.



Şekil 10. Total protein analizi test aşamaları.

3.2.3.3. Süperoksit dismutaz (SOD) analizi

SOD aktivitesi Sun ve ark’nın (1988) yöntemine göre ölçüldü.

Prensip:

Reaksiyon ortamında enzimatik bir reaksiyon ile üretilen süperoksit radikallerinin, ortamda bulunan nitrotetrazolium mavi klorür (NTB) indirgemesinin, numunede bulunan SOD tarafından engellenmesi prensibine dayanır. Yöntemde süperoksit radikali üretimi ksantin- ksantin oksidaz enzimatik reaksiyonu ile sağlanır. Ksantin, ksantin oksidaz enzimi vasıtasıyla ürik aside dönüştürülürken meydana gelen süperoksit radikalleri NTB varlığında reaksiyona girerek bu maddeyi indirgemesi sonucunda, maksimum absorbanası 560 nm’de veren formazon boyası oluştururlar. Ortama ilave edilen enzimin, üretilen radikalleri dismutasyona uğratması nisbetinde, NTB redüksiyon reaksiyonu yavaşlar ve sonuçta spektrofotometrede okunan absorbanans değerleri düşer. Dolayısıyla, formazon oluşumunun inhibisyonunun tayin edilmesiyle SOD miktarı indirekt olarak saptanmaktadır.

Kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

Reaktif karışımı: 1225 µl × numune sayısı kadar çözelti

Ksantin oksidaz çözeltisi: 25 µl × numune sayısı kadar çözelti

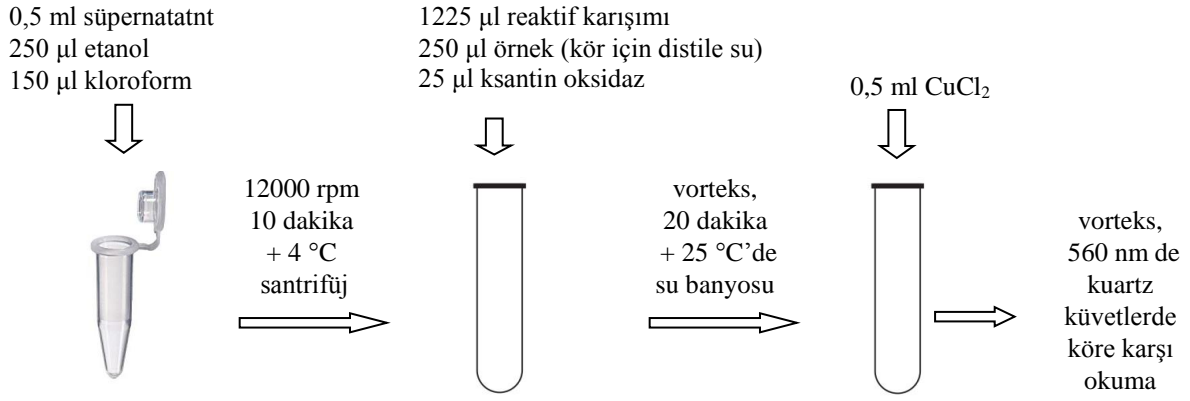
CuCl₂ çözeltisi: 0,5 ml × numune sayısı kadar çözelti

Reaktif karışımı için hazırlanan çözelti içerisinde; 20 ml 10 kat sulandırılmış ksantin stok çözeltisi, 10 ml EDTA, 10 ml NTB, 6 ml Na₂CO₃, 3 ml sığır albümini bulunacak şekilde 49 ml reaktif karışımı elde edildi. Çözeltiler bu toplam miktar göz önünde bulundurulacak şekilde hazırlandı.

Ksantin stok çözeltisi hazırlanırken 23 mg ksantin üzerine 5 ml 0,1 N NaOH ve 45 ml distile su ilave edildi ve analiz günü 10 kat sulandırılarak kullanıldı. EDTA'nın 0,249 g'ı 1000 ml distile suda, NTB'nin 12,3 mg'ı 100 ml distile suda, Na₂CO₃'ün 4,2 g'ı 100 ml distile suda, sığır albüminin 100 mg'ı 100 ml distile suda, ksantin oksidaz çözeltisi 20 U olacak şekilde hazırlandı ve 2 ml 2 M amonyum sülfat içerisinde çözdürüldü. CuCl₂ ise 10,7 mg'ı 100 ml distile su içerisinde hazırlandı.

Yöntem:

Mikrosantrifüj tüplerinin içerisine vortekslenen süpernatantlardan 0,5 ml aktarıldı. Üzerine 250 µl etanol ve 150 µl kloroform eklenerek + 4 °C'de 12 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Cam tüplere 1225 µl reaktif karışımı ve 250 µl örnek ilave edildi. Spektrofotometrede kör olarak kullanmak amacı ile 1225 µl reaktif karışımı üzerine 250 µl distile su ilave edildi. Numune ve kör olarak kullanılacak tüplerin üzerine 25 µl ksantin oksidaz ilave edilerek tüpler vortekslendi. Vortekslenen tüpler + 25 °C'deki su banyosunda 20 dakika bekletildi. Ardından 0,5 ml CuCl₂ ilave edilerek vortekslenen tüpler spektrofotometrede kuartz küvetlerde köre karşı 560 nm dalga boyunda okunarak hesaplama yapıldı. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi. Yöntem Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11. SOD analizi test aşamaları.

3.2.3.4. Katalaz (CAT) analizi

Katalaz aktivitesi Luck (1965) tarafından tarif edilen yöntem ile ölçüldü.

Prensip:

CAT enzim aktivitesi, ışık spektrumunda H_2O_2 'nin 240 nm'de H_2O 'ya dönüşümü sırasında absorbanstın azalmasını ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Absorbansta gözlenen azalma hızı CAT enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

Fosfat tamponu (1/15 mmol/l; pH=7,0): 3,522 g KH_2PO_4 ve 7,268 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ distile suda çözdürüldü ve bir litreye tamamlandı. Daha sonra HCl ile pH 7,0'a ayarlandı.

H_2O_2 'li fosfat tamponu: %30'luk H_2O_2 çözeltilisinden 0,16 ml alınarak, daha önce hazırlanmış olan fosfat tamponununun 100 ml'sinde seyreltilti. Bu karışımın 240 nm'deki absorbanstının 0,5 olmasına dikkat edildi.

Yöntem:

Spektrofotometre 240 nm dalga boyuna ayarlandı ve kuartz küvetlerde okuma gerçekleştirildi. Test küveti içerisine 2,95 ml H_2O_2 'li fosfat tamponu üzerine 50 µl numune, kör olarak kullanılan küvet içerisine 2,95 ml fosfat tamponu ve 50 µl numune ilave edildi. Kuartz küvetlerin kapakları kapatılarak alt-üst edilerek karıştırıldı ve spektrofotometre içerisindeki kuyucuklara yerleştirildi. Spektrofotometredeki absorbanst değeri kaydedildi ve 15 saniyede bir bu değer tekrar kaydedildi. Küvetler distile su ile yıkanarak diğer numunelerin okuması gerçekleştirildi. Sonuçlar k/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.3.5. İndirgenmiş glutasyon (GSH) analizi

GSH seviyesi spektrofotometrik olarak Tietze (1969)'e göre analiz edildi.

Prensip:

GSH, ölçüm ortamındaki disülfit bir kromojen olan DTNB (5,5'-ditiyobis, 2-nitrobenzoik asit) ve sülfidril gruplu bileşikler tarafından kolayca indirgenir. GSH bu kompleks oluşumunu katalizlediği için oluşan rengin şiddeti ile GSH aktivitesi arasında doğru orantı vardır.

Kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

Reaktif 1 (presipitasyon solüsyonu): 100 ml distile su içerisinde 1,67 g glasiyel metafosforik asit, 0,2 g disodyum EDTA ve 30 g NaCl çözdürüldü. Ardından + 4 °C'de muhafaza edildi.

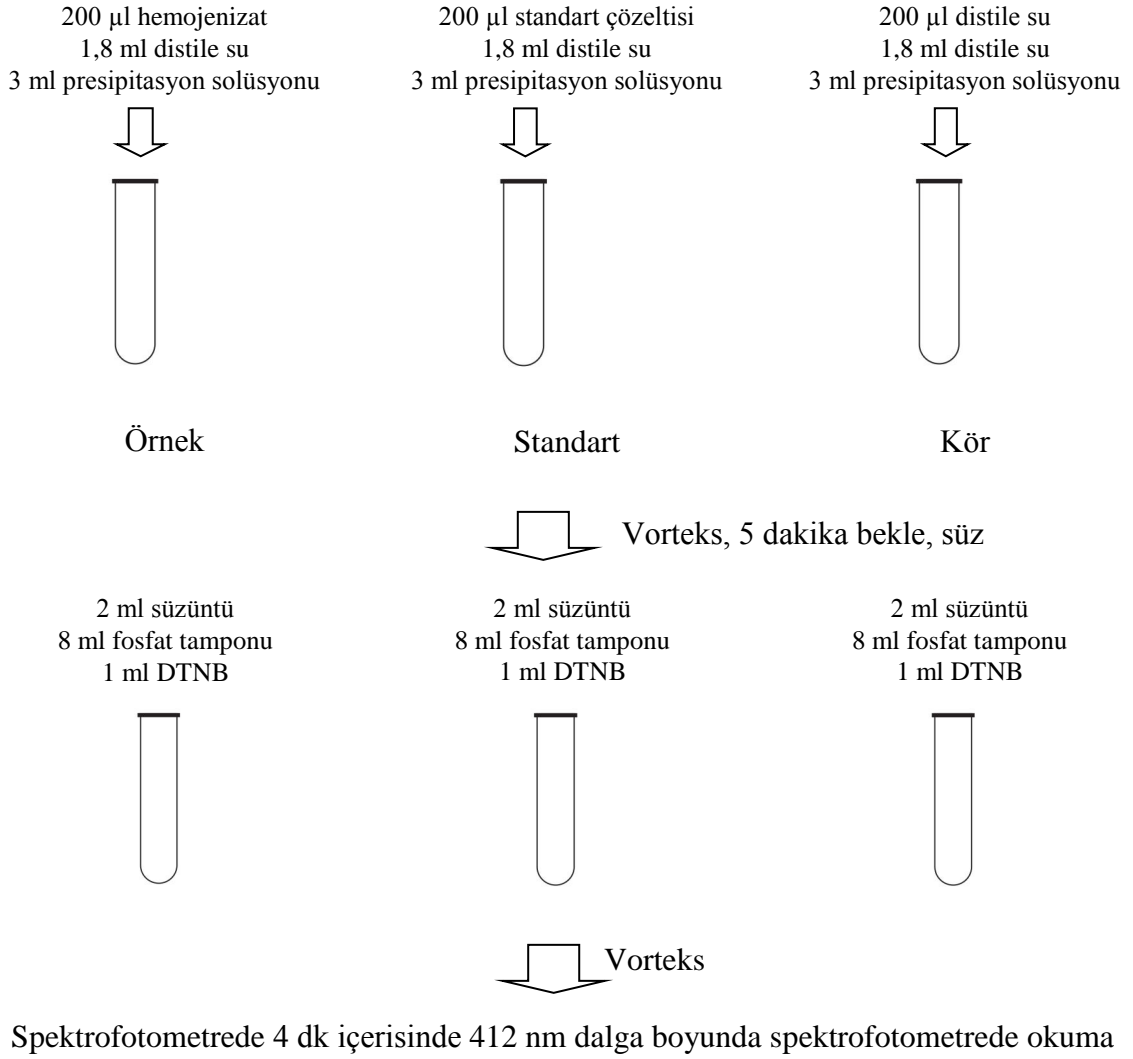
Reaktif 2 (fosfat tamponu): 1000 ml distile su içerisinde 42,59 g Na₂HPO₄ çözdürüldü. Böylece 0,3 M'lık Na₂HPO₄ elde edildi. Elde edilen çözelti + 4 °C'de muhafaza edildi.

Reaktif 3 (DTNB): 100 ml distile su içerisinde 40 mg DTNB çözdürüldü ve üzerine 1g/dl olacak şekilde sodyum sitrat ilave edildi.

Reaktif 4 (standart): GSH (glutasyon)'ın 100 mg'ı tartılarak üzerine 100 ml distile su ilave edildi.

Yöntem:

Örnek, standart ve kör için 5 ml'lik cam tüpler hazırlandı. Her bir tüp içerisine sırayla 200'er µl homojenizat, standart ve distile su ilave edildi. Ardından bütün tüplere 1,8 ml distile su ve 3 ml presipitasyon solüsyonu ilave edildi. Hazırlanan karışımlar vortekslenerek 5 dakika bekletildi ve ardından filtre kağıdı ile süzme işlemi gerçekleştirildi. Süzme işlemi sonrası cam tüp içerisine 2 ml süzüntü, 8 ml fosfat tamponu ve 1 ml DTNB ilave edildi ve tüpler vortekslendi. Spektrofotometrede 4 dk içerisinde 412 nm'de kuartz küvetlerde okuma gerçekleştirildi. Sonuçlar mg/g protein olarak ifade edildi. Yöntem Şekil 12'de gösterilmiştir.



Şekil 12. GSH analizi test aşamaları.

3.2.3.6. Malondialdehit (MDA) analizi

MDA analizi Ohkawa (1979) ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı.

Prensip:

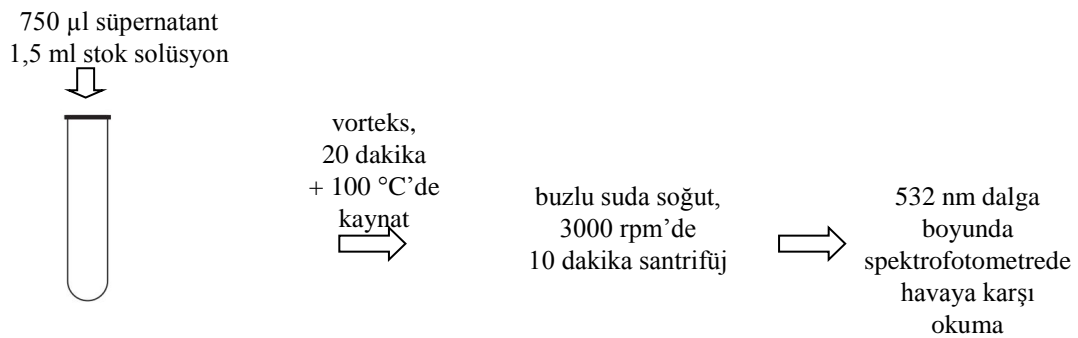
MDA analizi, serbest radikallerin hücre zarında oluşturduğu lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA düzeyini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Yöntemlerin çoğu MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile verdiği reaksiyonu temel alır. Bu metod MDA'nın asidik ortamda TBA ile oluşturduğu rengin 532 nm'de optik dansitesinin ölçülmesi prensibine dayanarak yapıldı.

Kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

Stok solüsyonu: 100 ml distile suda 2,07 ml %30'luk HCl, 0,37 g TBA, 15 g TCA çözdürüldü.

Yöntem:

Kapaklı cam tüp içerisine vortekslenen süpernatanttan 750 µl aktarıldı ve üzerine 1,5 ml stok solüsyondan eklendi. Vortekslenen cam tüpler 20 dakika + 100 °C'de kaynatıldı. Tüpler buzlu su içerisinde soğutulduktan sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Spektrofotometrede kuartz küvetlerde 532 nm'de havaya karşı okuma yapıldı. Sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edildi. Yöntem Şekil 13'de gösterildi.



Şekil 13. MDA analizi test aşamaları.

3.2.4. Kanda Oksidan ve Antioksidan Parametre Analizi

Sıçanlardan alınan kanlarda oksidan ve antioksidan parametre analizleri gerçekleştirilirken GSH seviyesi ve CAT aktivitesi ölçülmeden önce ara parametre olarak kullanılacak olan hemoglobin miktarı hesaplandı.

3.2.4.1. Hemoglobin tayini

Prensip:

Drabkin solüsyonunda bulunan potasyum siyanit ve potasyum ferri siyanit ile hemoglobinin siyanomethemoglobine dönüşmesi ve oluşan rengin 540 nm'de spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanır.

Kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

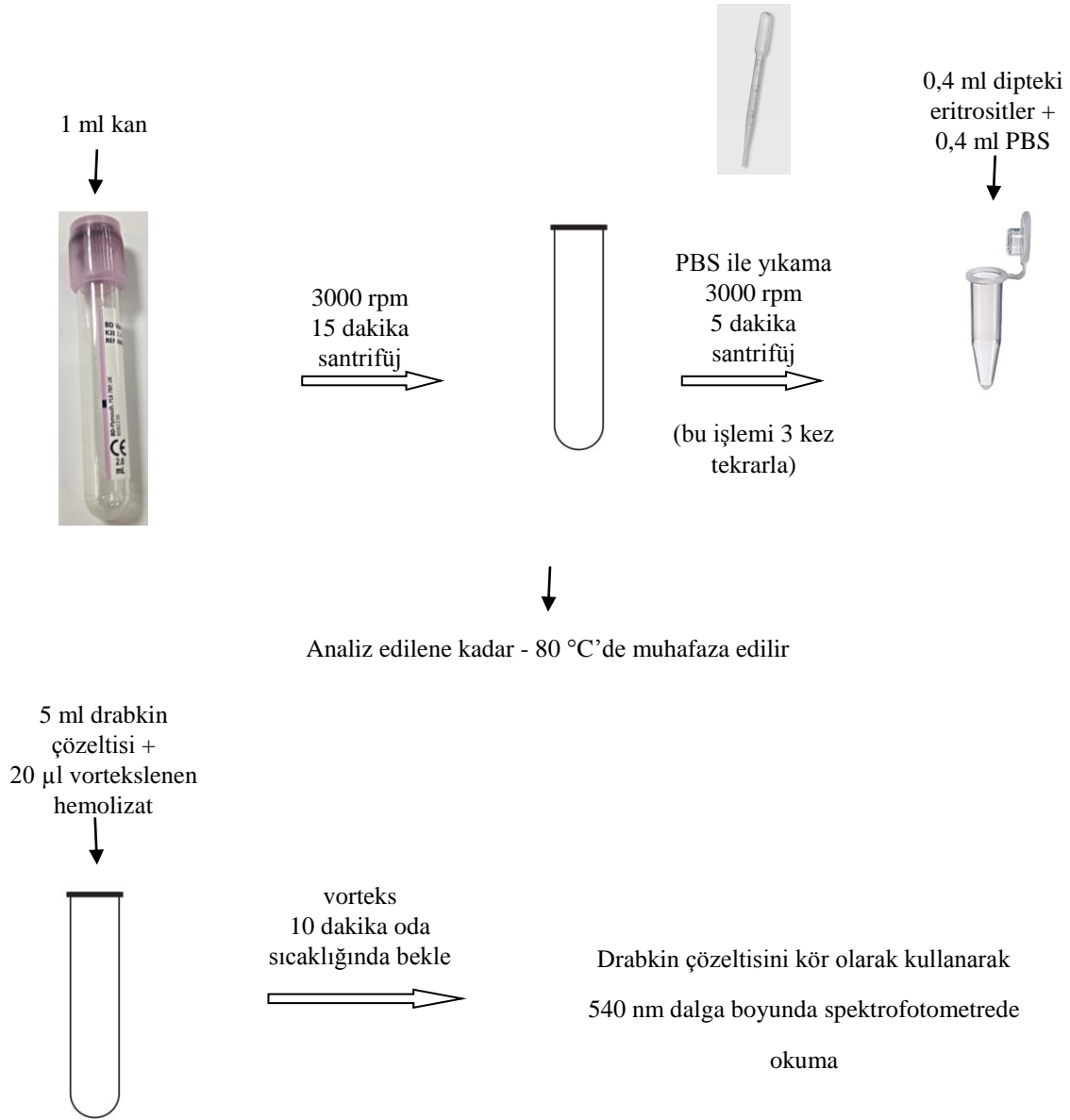
Drabkin çözeltisi: Balon jöje içerisine koyulan 0,198 g $K_3Fe(CN)_6$, 0,052 g KCN ve 1 g $NaHCO_3$ üzerine distile su ilave edilerek 1 litreye tamamlandı.

PBS (fosfat tampon solüsyon): 200 ml distile suya 1 tablet atılarak hazırlandı.

Yöntem:

Hemolizat hazırlanması ve örneklerin muhafaza edilmesi: EDTA'lı tüplere alınan 1 ml kan örneği 3000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Tüpün dibindeki eritrositlerin başka tüpe aktarılmasının ardından pastör pipeti yardımıyla PBS ile 3 kez yıkandı. Her bir yıkama işleminden sonra tüpler 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Son yıkama ve santrifüj sonrasında dipte bulunan eritrositlerden 0,4 ml alınarak mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Üzerine 0,4 ml PBS ilave edilerek analizin gerçekleşeceği güne kadar - 80 °C'de muhafaza edildi.

Analiz günü içerisine 5 ml drabkin çözeltisi koyulan cam tüp içerisine vortekslenen hemolizattan 20 µl eklendi. Vortekslenen tüpler 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra drabkin çözeltisi kör olarak kullanılarak spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Sonuçlar CAT aktivitesinin hesaplanması için g Hb/100 ml kan olarak ifade edildi. GSH seviyesinin hesaplanmasında ise aynı yöntem ile EDTA'lı tüplerdeki tam kan kullanıldı. Yöntem Şekil 14'de gösterilmiştir.



Şekil 14. Hemoglobin tayini analizi test aşamaları.

3.2.4.2. Süperoksit dismutaz (SOD) analizi

Kanda yapılan SOD analizi prensip ve yöntem olarak karaciğer ve böbrek dokularında yapılan SOD analizi ile benzer olup aralarındaki fark doku örneği yerine serum kullanılmış olmasıdır.

3.2.4.3. Katalaz (CAT) analizi

Eritrosit hemolizatta CAT analizi Aebi (1984) tarafından belirtilen yönteme göre gerçekleştirildi ve EDTA'lı kandan  tenaziden hemen sonra yani aynı gün yapıldı.

Prensip:

CAT enzim aktivitesi, ışık spektrumunda H₂O₂'nin 240 nm'de H₂O'ya dönüşümü sırasında absorbans azalmasının  lulmesi esasına dayanmaktadır. Absorbansta gözlenen azalma hızı CAT enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Kullanılan ozeltilerin hazırlanması:

Tampon A: 1000 ml distile su içerisinde 6,81 g KH₂PO₄ ozd r ld .

Tampon B: 1000 ml distile su içerisinde 8,90 g Na₂HPO₄.2H₂O ozd r ld .

Tampon A + B = 1 : 1,5 olacak şekilde karıştırıldı.

H₂O₂ tamponu; 25 ml Tampon A + B karışımı üzerine 85  l %30'luk H₂O₂ ilave edilerek hazırlandı.

Yöntem:

EDTA'lı kandan 1 ml alındı ve dibi konik cam tüpe aktarıldı. T p  zerine 1 ml soğuk serum fizyolojik ilave edildi ve 5 – 10 sn pastör pipeti yardımıyla pipetlenerek hücreler yıkandı. Tüpler soğutmalı santrifüj ile + 4  C'de 2300 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Üst kısımdaki soğuk serum fizyolojik döküldü. Bu aşama 3 kez tekrarlanarak analiz aşamasına geçildi. Tüpün dibindeki eritrositlerden 200  l alınarak üzerine 800  l distile su ilave edilerek bir hemolizat elde edildi. Cam tüp içerisine konulan 10 ml tampon A + B  zerine 10  l hemolizat ilave edildi ve vortekslendi. Numune için bu cam tüpten 2 ml alınıp üzerine 1 ml H₂O₂ tamponu ilave edildi. K r için ise aynı cam tüpten yine 2 ml alınıp ve üzerine 1 ml tampon A + B ilave edildi. Spektrofotometrede köre karşı 240 nm dalga boyunda kuartz küvetlerde 15 sn'de bir toplamda 5 okuma yapılarak kaydedildi. Sonuçlar U/g Hb olarak ifade edildi. Yöntem şekil 15'de gösterilmiştir.

EDTA 'lı kan



1 ml örnek
1 ml soğuk
serum fizyolojik



2300 rpm
+ 4 °C
10 dakika
santrijüj
(üst kısımaki
soğuk serum
fizyolojiği dök
ve işlemi 3 kez
tekrarla)

200 µl
süpernatant
800 µl distile su



Hemolizat
elde
edilir

10 ml tampon A + B
+
10 µl hemolizat



Numune

2 ml tampon A+B'li hemolizat
1 ml H₂O₂ tamponu



Kör

2 ml tampon A+B'li hemolizat
1 ml tampon A + B



240 nm dalga boyunda spektrofotometrede okuma

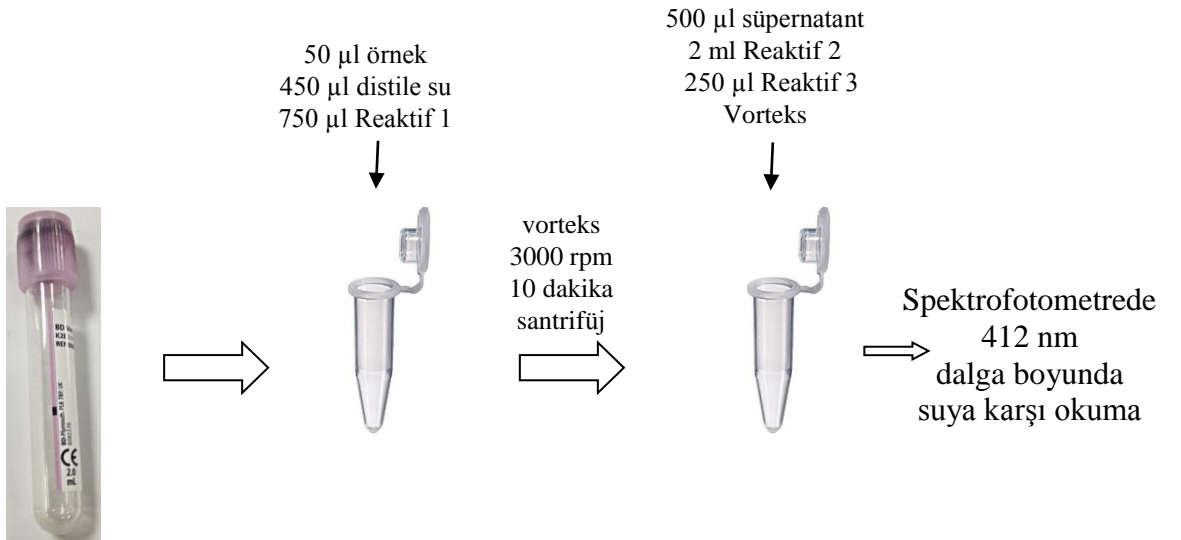
Şekil 15. Kanda CAT analizi test aşamaları.

3.2.4.4. İndirgenmiş glutasyon (GSH) analizi

Kanda yapılan GSH analizi prensip olarak karaciğer – böbrek dokularında yapılan GSH analizi ile benzer olup Beuther ve ark (1963)'nın bildirdiği yöntemle göre EDTA'lı taze kandan yapıldı.

Yöntem:

EDTA'lı tüp içerisinde alınan 50 µl kan mikrosantrifüj tüpüne aktarılıp üzerine 450 µl distile su ve 750 µl Reaktif 1 ilave edildi. Tüpler vortekslendi ve ardından 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanttan 500 µl alınarak ayrı bir tüpe aktarıldı. Süpernatant üzerine 2 ml Reaktif 2 ve ardından 250 µl Reaktif 3 ilave edilerek tüpler vortekslendi. Vorteks işleminin ardından 412 nm dalga boyunda spektrofotometrede suya karşı okundu. Sonuçlar µM/g Hb olarak ifade edildi. Yöntem Şekil 16'da gösterilmiştir.



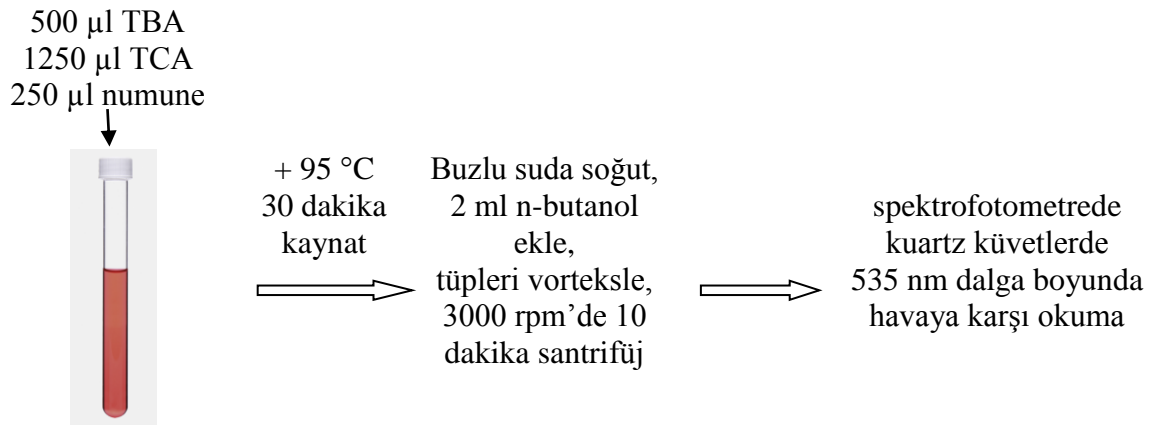
Şekil 16. Kanda GSH analizi test aşamaları.

3.2.4.5. Malondialdehit (MDA) analizi

Serumda MDA analizi Ohkawa ve ark (1979)'ye göre gerçekleştirildi. Serumda yapılan MDA analizinin prensibi karaciğer ve böbrek dokularında yapılan MDA analizi ile aynıdır.

Yöntem:

Kapaklı cam tüp içerisine koyulan 500 µl TBA ve 1250 µl TCA üzerine 250 µl serum aktarıldı. Cam tüpler + 95 °C'de 30 dakika boyunca kaynatıldı. Tüpler buz dolu kapta soğutuldu. Soğutma işlemi sonrası 2 ml n-butanol ilave edilerek tüpler vortekslendi ve ardından 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan kısımlar kullanılarak spektrofotometrede kuartz küvetlerde 535 nm dalga boyunda havaya karşı okuma yapıldı. Sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edildi. Yöntem Şekil 17'de gösterilmiştir.



Şekil 17. Kanda MDA analizi test aşamaları.

3.2.5. DNA Hasarının Belirlenmesi

DNA hasarının belirlenmesinde alkali comet yöntemi (Tek Hücre Jel Elektroforezi, Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE) kullanıldı.

Prensip:

Rydberg ve Johanson (1978) tarafından DNA'daki sarmal kırıkların ölçümü için oluşturulmuş olan comet yöntemi Ostling ve Johanson (1984) tarafından geliştirilmiştir. Nötral pH'daki lizing ve elektroforez şartları kullanılmıştır. Sing ve ark (1988) yapmış oldukları protokol değişiklikleriyle yöntemi alkali lizing koşullarına uyarlamışlardır. Yöntem, izole edilen DNA içeren tek hücrelerin DNA'larının lam üzerinde hazırlanan agar jel içerisinde elektroforotik ortamda yürütülmesi ve hasar seviyesine göre göç eden farklı yük ve molekül ağırlıklarına sahip DNA parçalarının DNA spesifik floresan boya ile boyandıktan

sonra, floresan mikroskop altında değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır (Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010).

Kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (PBS): PBS tableti 200 ml distile suda çözdürüldü ve pH: 7,4 olarak ayarlandı. Hazırlanan çözelti daha sonra + 4 °C’de saklandı.

LMPA (Low melting point agarose – düşük erime noktalı agaroz) Çözeltisi: LMPA %0,5 veya %0,75’lik olarak hazırlanmaktadır. LMPA’nın 250 mg’ı 50 ml PBS’de mikrodalgada eritildi. Tüpler içerisine 5’er ml’lik küçük hacimlere bölünerek konuldu. Hazırlanan çözelti kullanılabildiği kadar buzdolabında saklandı. Kullanılacağı zaman 37 °C’ye getirilerek kullanıldı.

NMPA (Normal melting point agarose – düşük erime noktalı agaroz) Çözeltisi: NMPA %1 veya %1,5’lik olarak hazırlanmaktadır. NMPA’nın 500 mg’ı 50 ml PBS’de mikrodalgada eritildi. Tüpler içerisine konularak 60 °C’de lam kaplamasında kullanıldı.

Lizing Stok Çözeltisi: Karıştırıcı altında 2,5 M NaCl (146,1 gr), 100 mM EDTA (37,2 gr), 10 mM Trisma baz (1,2 gr) ve 8 gr NaOH 700 ml distile su ile eritildi. Ardından pH 10 olacak şekilde ayarlandı ve hacim 1000 ml’ye tamamlandı. Çözelti manyetik karıştırıcı altında 1–2 gün boyunca karıştırıldı ve oda sıcaklığında saklandı. Lizing solüsyonu kullanılacağı zaman taze olarak %1 Triton×100 ilave edildi. Ayrıca eritrositlere ilişkin kontaminasyonu önlemek için %10 DMSO ilave edildi (DMSO ilavesi, eritrositlerde hemoglobinin etkisini engellemektedir). Lamlar lizing solüsyonuna daldırılmadan en az 30 dakika önce solüsyon soğutularak + 4 °C’ye getirildi.

Elektroforez Tamponu Çözeltisi: Stok olarak 10 N NaOH ve 200 mM EDTA hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyonu içerisinden 30 ml NaOH ve 5 ml EDTA alınarak distile su ile 1000 ml’ye tamamlandı. Tampon hazırlandıktan sonra buzdolabında soğutularak kullanıldı. Kullanımdan önce pH’nın 13’den yüksek olmasına dikkat edildi.

Nötralizasyon Tampon Çözeltisi: Şişe içerisine 0,4 M Trisma (48,5 gr Trisma Base) konularak 800 ml suda çözdürüldü. pH 7,5 olacak şekilde ayarlandı ve 1000 ml’ye distile su ile tamamlanarak oda sıcaklığında saklandı. Kullanılmadan önce soğutularak + 4 °C’ye getirildi.

Boyama solüsyonu: DAPI (4’,6-Diamidino-2-fenilindole dihidroklorid) stok solüsyonundan 70 µl alındı ve üzerine 450 µl distile su ilave edildi.

10 N Sodyum Hidroksit (NaOH) Çözeltisi: 200 gr NaOH 500 ml distile suda çözdürüldü.

200 mM EDTA Çözeltisi: 14,89 g EDTA disodyum tuzu 200 ml distile suda çözülerek pH 10'a ayarlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

DAPI Çözeltisi: 1 mg DAPI 100 ml distile suda çözüldükten sonra mikrosantrifüj tüplerine birer ml olarak aktarıldı ve 10 µl/ml'lik çözeltiler elde edildi. Elde edilen çözeltiler daha sonra kullanılmak üzere - 20 °C'de saklandı.

Freezing Solüsyonu: PBS'den 75 ml, DMSO'dan 15 ml ve son olarak da 10 ml FBS (fötal bovine serum) sırayla konularak hazırlandı.

Yöntem:

Lenfosit İzolasyonu:

Sıçanlardan alınarak heparinli tüplere akıtılan kanlar rotatorda sürekli döndürülerek pıhtılaşması engellendi ve 2 saat içerisinde işlendi. Dibi küt konik cam tüpler içerisinde bulunan 1 ml PBS üzerine 1 ml heparinli kan ilave edilmesinin ardından pipetle 4-5 defa çekip bırakılarak homojenize edildi. Homojenizat üzerine 1 ml histopak tüpün dibinden yavaşça ilave edildi. Histopaklı karışım 2100 devirde + 4 °C'de 25 dakika santrifüj edildi. Pastör pipeti ile içerisinde lenfositleri barındıran aradaki bulutsu yapı alınarak dibi daha geniş konik cam tüplere aktarıldı. Bulutsu yapı üzerine 2 ml PBS ilave edilerek hücreler yıkandı ve ardından tüpler tek tek 5 – 10 sn pipetlendi. Pipetleme işleminden sonra 2300 devirde + 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi ve üstteki faz atıldı. Tüplere 1 ml freezing solüsyonu ilave edildi. Tüpün dibinde lenfosit kalmayacak şekilde otomatik pipetle basınç uygulandı ve daha sonra değerlendirilmek üzere kademeli olarak soğutularak – 80 °C'ye mikrosantrifüj tüpler içerisinde kaldırıldı.

Lam kaplama:

Temizlenmiş rodajlı lamlar içerisinde %1'lik NMPA bulunan beher içerisinde daldırılarak kaplandı. Lamlar çıkartıldıktan sonra alt yüzeyi silinerek kurumaya bırakıldı. Kaplanan lamlar kullanılıncaya kadar saklanmak üzere buzdolabına kaldırıldı.

Hücre sayımı ve lizing:

Mikrosantrifüj tüpler içerisinde – 80 °C'ye kaldırılan örnekler 37 °C'de 1 dakika tutularak çözdürüldü. Numuneler pipetaj yöntemiyle homojen hale getirildi. Mikrosantrifüj tüplerin içerisine 90 µl türk eriyiği (boya) koyuldu ve üzerine 10 µl hücre süspansiyonu eklendi. Bu aşamada yine pipetaj yöntemiyle homojenizasyon sağlandı. Thoma lamı ile ışık mikroskopunda hücre sayımı yapıldı. Sayım sonucunda lenfositler bir jelde 15000 hücre olacak şekilde hesaplanarak PBS ile sulandırıldı. Elde edilen PBS–lenfosit karışımından alınan 40 µl hücre süspansiyonu boş bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. LMPA ile karıştırılan süspansiyon hemen NMPA ile kaplanmış lamların üzerine mikropipetle yayılarak üzeri

lamelle kapatıldı. Lam hemen buz üzerine koyularak agarın donması sağlandı. Dondurma işleminden sonra lam üzerindeki lamel sıyrıldı ve lamlar şalelere dizildi. Taze hazıranmış lizing çözeltisi şale içerisine ilave edildi ve şaleler buzdolabında + 4 °C’de bir gece bekletildi. Bu aşamada kullanılan lizing solüsyonu ile hücre ve çekirdek zarının lize edilip DNA sarmalının agaroz içinde serbest kalmasını sağlamak amaçlanmaktadır.

Elektroforez tamponu, elektroforezde yürütme ve nötralizasyon:

Belirtilen süre sonunda şaleden çıkartılan lamlar + 4 °C’ye ayarlanmış sirkülasyonlu soğutucu ile soğutulan elektroforez tankına yerleştirildi ve tank içerisine alkali elektroforez solüsyonu ilave edildi. Bu alkali ortam içerisinde lamlar 40 dakika bekletilerek elektroforezden önce DNA zincirlerinin ayrılması sağlandı. Alkali elektroforez tamponunda inkübasyon tamamlandıktan sonra bu tampon çözelti içerisinde 20 dakika boyunca 20 volt ve 300 mA’de hücrelerin yürütülmesi işlemi gerçekleştirildi. Yürütme işleminin ardından alkali tampon çözeltisini slaytlardan uzaklaştırmak için lamlar içerisinde soğuk nötralizasyon tamponu bulunan şale içerisine alındı ve burada 10 dakika bekletildi. Aynı işlem 2 kere tekrarlandı. Lamlar sırasıyla % 50, %70 ve %90’lık alkolde 5’er dakika bekletilerek hücreler sabitlendi. Lamlar, değerlendirme aşamasına kadar karanlık ortamda kurutularak kapaklı ve ışık almayan kutularda saklandı.

Boyama ve değerlendirme:

Değerlendirme aşamasında hazırlanan flöresanlı boyama solüsyonundan (DAPI) her bir lama 70 µl damlatılarak hücreler boyandı ve lamların üzeri lamelle kapatıldı. Boyanın hücreye etki edebilmesi amacı ile 5 dakika beklendi. Lamlar 20 × 10 büyütme flöresan mikroskop altında değerlendirmeye alındı ve 100 adet hücre görüntüsü Comet Assay Perceptive Instruments v4,3 programı ile değerlendirildi.

3.2.6. Serum Okratoksin A Analizi

Serum OTA miktarının belirlenmesinde ve buna ait hesaplamalarda Helica Biosystem Inc. (991OCH01MS-96, ABD) marka ticari test kitinde belirtilen yöntem dikkate alındı.

Prensip:

Test kiti insan veya hayvan süt/serum örneklerinde OTA’nın ölçümü için tasarlanmış immünojenik testtir. OTA’ya yüksek affiniteli olan bir antikor polisitiren mikrokuyucuların üstüne kaplanmıştır. Standart veya örnek uygun kuyucuğa eklenir ve eğer OTA mevcutsa kaplanmış antikor ile bağlanır. Sonra okratoksin A bağlı HRP (horseradish peroksidaz)

eklenir ve daha önce standart veya örnekteki OTA tarafından işgal edilmeyen antikora bağlanır. Bu inkübasyon periyodundan sonra, kuyucuk içerikleri boşaltılır, yıkanır ve mevcut enzim ile mavi renk geliştiren HRP substratı eklenir. Bu rengin yoğunluğu bağlı konjugatın miktarı ile düz orantılı ve standart veya örnekteki OTA miktarı ile ters orantılıdır. Onun için, örnek ya da standarttaki OTA konsantrasyonu arttıkça, mavi rengin yoğunluğu azalır. Reaksiyon mavi rengin sarıya dönmesine sebep olan asit solüsyonunun eklenmesiyle sonlanır.

Yöntem:

Tüm çözeltiler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. PBS-tween paketinin içeriği distile su ile 1 litreye tamamlandı ve kullanılmadığı süre boyunca buzdolabında saklandı. Mikrokuyucuk tutucusuna, test edilecek her bir standart ve numune için bir karıştırma kuyucuğu yerleştirildi. Yine başka bir mikrokuyucuk tutucusuna eşit sayıda antikor kaplı mikrotitre kuyucuğu yerleştirildi. Karıştırma kuyucukları içerisine 200 µl seyreltici eklendi. Her standart ve numuneden, önceden belirlenen ve seyreltici içeren karıştırma kuyucuklarına 100 µl koyuldu ve otomatik pipetle en az 3 kere çekilip bırakılarak seyreltici ile karışması sağlandı. Her bir karıştırma kuyucuğundan 100 µl içerik, ona karşılık gelen antikor kaplı mikrotitre kuyucuğuna aktarıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Mikrokuyucuklardaki içerik bir atık kabına boşaltıldı. Mikrokuyucuklar, herbirine PBS-Tween yıkama tamponu doldurarak yıkandı. Sonra kuyucuklardaki yıkama tamponu da atık kabına boşaltıldı. Yıkama işlemi toplamda 3 kere olacak şekilde tekrarlandı. Kuyucuklarda kalan fazla sudan kurtulmak için mikrokuyucuklar üst yüzü aşağıya bakacak şekilde bir absorban havlu (kağıt havlu) tabakası üzerine vuruldu. Her bir antikor kaplı kuyucuğa 100 µl konjugat eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edildi. Daha önce yapıldığı gibi mikrokuyucuklardaki içerik bir atık kabına boşaltıldı. Mikrokuyucuklar, herbirine PBS-tween yıkama tamponu doldurarak yıkandı. Sonra kuyucuklardaki yıkama tamponu da atık kabına boşaltıldı. Yıkama işlemi toplamda 3 kere olacak şekilde tekrarlandı. Kuyucuklarda kalan fazla sudan kurtulmak için mikrokuyucuklar üst yüzü aşağıya bakacak şekilde bir absorban havlu tabakası üzerine vuruldu. Gerekli substrat reajanı miktarı ölçülerek (1 ml/strip veya 120 µl/kuyucuk) başka kaba aktarıldı. Bütün kuyucuklara 100 µl eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyonu sağlandı. Işıktan korumak için üzeri kapatıldı. Gerekli durdurma çözeltisi (stop solution) miktarı ölçüldü (1 ml/strip veya 120 µl/kuyucuk) ve ayrı bir kaba aktarıldı. Substrat reajanı nasıl koyulduysa, aynı sırayla ve aynı hızda her kuyucuğa 100 µl durdurma çözeltisinden eklendi. Mikrotitre plak okuyucusu ile her bir mikrokuyucuğun optik dansitesi 450 nm filtre kullanarak okutuldu. Her bir mikrokuyucuğun optik dansitesi kaydedildi. OTA içeriğine karşı optik dansite doz - cevap standart eğrisi oluşturuldu.

Bilinmeyen numune miktarları standart eğriden yola çıkarak (interpolasyon ile) ölçüldü. Serumdaki OTA miktarı ng/ml olarak ifade edildi.

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi için SPSS (Statistical Packag for Social Sciences) 22.00 paket programı kullanıldı. Shapiro-Wilk testi kullanılarak verilerin normal dağılıma uygunluğu belirlendi. Normal dağılım göstermeyen gruplar arası farklılık Kruskall Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile normal dağılım gösteren gruplar arası farklılık testi yapılırken, post hoc Duncan testi ile farkların önem kontrolü yapıldı. Farkın hangi grup veya gruplardan kaynaklandığını belirlemek için Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi yapıldı. Deneysel grupların zamana bağlı ortalama canlı ağırlık değişimleri karışık ölçümler için iki faktörlü ANOVA ile değerlendirildi. İstatistiksel analizlerden elde edilen sonuçlardan $p < 0,05$ olan değerler önemli kabul edildi. Tüm veriler ortalama ve \pm standart hata olarak verildi. Gruplar arası farkın önemliliği *; $P < 0,05$, **; $P < 0,01$ ve ***; $P < 0,001$ şeklinde verildi (Conover, 1980).

4. BULGULAR

4.1. Canlı Ağırlık

Adaptasyon sürecini tamamlayan sıçanların çalışma öncesinde tartımları yapılarak deneysel grupların başlangıç canlı ağırlıkları belirlendi ve yine her hafta tartımları gerçekleştirilerek istatistiksel değerlendirilmesi yapıldı. Yapılan değerlendirme sonucunda başlangıç, birinci ve ikinci hafta sonu ağırlıkları arasında anlamlı farkın olmadığı belirlendi. Üçüncü hafta ($P<0,05$) ve dördüncü hafta ($P<0,01$) sonunda ise canlı ağırlıklar karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark olduğu belirlendi. Üçüncü ve dördüncü haftada canlı ağırlıkların en yüksek folik asit ve en düşük ise OTA + ellajik asit grubunda olduğu görüldü (Tablo 8).

Başlangıç canlı ağırlıklarında gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı. İkinci hafta sonunda da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasına rağmen OTA ile OTA + ellajik asit ($P=0,039$) ve folik asit ile OTA + ellajik asit ($P=0,006$) grupları arasında fark bulundu. Üçüncü hafta sonunda görülen anlamlı farklılık ise kontrol ile folik asit ($P=0,027$), OTA ile OTA + ellajik asit ($P=0,004$), folik asit ile ellajik asit ($P=0,015$), folik asit ile OTA + folik asit ($P=0,034$) ve folik asit ile OTA + ellajik asit ($P=0,000$) grupları arasında görüldü. Dördüncü hafta sonunda görülen anlamlı farklılığın ise kontrol ile folik asit ($P=0,011$), OTA ile OTA + ellajik asit ($P=0,006$), folik asit ile ellajik asit ($P=0,014$), folik asit ile OTA + folik asit ($P=0,002$) ve folik asit ile OTA + ellajik asit ($P=0,000$) grupları arasında olduğu belirlendi.

Deneysel grupların zamana bağlı ortalama canlı ağırlık değişimlerinin değerlendirilmesi sonucunda tüm gruplarda anlamlı artışın olduğu belirlendi. Bu anlamlı artışın folik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında $P<0,05$ düzeyinde, diğer gruplarda ise $P<0,001$ düzeyinde olduğu belirlendi. OTA + folik asit grubunda zamana bağlı olarak anlamlı artış ($P<0,001$) olmasına rağmen ikinci ile üçüncü hafta arasında ve üçüncü ile dördüncü hafta arasında anlamlı farklılığın olmadığı gözlemlendi (Tablo 9).

Tablo 8. Deneysel gruplara ait çalışma öncesi ve haftalık ortalama canlı ağırlıkları (g).

Gruplar (n = 8)	Başlangıç	Birinci hafta	İkinci hafta	Üçüncü hafta	Dördüncü hafta
Kontrol	200 ± 13,23	238 ± 11,61	276 ± 11,35	293 ± 10,81 ^{b,c}	312 ± 9,59 ^{b,c}
OTA	201 ± 7,10	242 ± 6,73	279 ± 5,62	306 ± 5,38 ^{a,b}	322 ± 5,44 ^{a,b}
Folik asit	196 ± 7,88	244 ± 9,72	291 ± 9,33	321 ± 8,62 ^a	341 ± 6,93 ^a
Ellajik asit	182 ± 5,32	231 ± 6,46	269 ± 7,36	289 ± 7,85 ^{b,c}	313 ± 8,99 ^{b,c}
OTA+ Folik asit	207 ± 9,92	240 ± 9,41	271 ± 11,30	288 ± 13,49 ^{b,c}	299 ± 12,77 ^{b,c}
OTA+ Ellajik asit	180 ± 6,37	225 ± 9,25	251 ± 9,28	269 ± 8,98 ^c	290 ± 8,02 ^c
P	AD	AD	AD	*	**

OTA: Okratoksin A

AD: Anlamlı Değil

a, b, c: Aynı sütunda bulunan farklı harfler istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.

*: P<0,05 ** : P<0,01

Tablo 9. Deneysel grupların zamana bağlı ortalama canlı ağırlık değişimleri (g).

Gruplar (n = 8)	Başlangıç	Birinci hafta	İkinci hafta	Üçüncü hafta	Dördüncü hafta	P
Kontrol	200 ± 13,23 ^e	238 ± 11,61 ^d	276 ± 11,35 ^c	293 ± 10,81 ^b	312 ± 9,59 ^a	***
OTA	201 ± 7,10 ^e	242 ± 6,73 ^d	279 ± 5,62 ^c	306 ± 5,38 ^b	322 ± 5,44 ^a	***
Folik asit	196 ± 7,88 ^e	244 ± 9,72 ^d	291 ± 9,33 ^c	321 ± 8,62 ^b	341 ± 6,93 ^a	*
Ellajik asit	182 ± 5,32 ^e	231 ± 6,46 ^d	269 ± 7,36 ^c	289 ± 7,85 ^b	313 ± 8,99 ^a	***
OTA+ Folik asit	207 ± 9,92 ^d	240 ± 9,41 ^c	271 ± 11,30 ^b	288 ± 13,49 ^{a,b}	299 ± 12,77 ^a	***
OTA+ Ellajik asit	180 ± 6,37 ^e	225 ± 9,25 ^d	251 ± 9,28 ^c	269 ± 8,98 ^b	290 ± 8,02 ^a	*

OTA: Okratoksin A

a, b, c, d, e: Aynı satırda bulunan farklı harfler istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.

*: P<0,05 ***: P<0,001

4.2. Karaciğer ve Böbrek Dokusu Nispi Ağırlıkları

Her gruptaki sıçanın karaciğer ve böbrek (sağ ve sol böbrek) ağırlıkları diseksiyon sonrası tartılarak, bu organların nispi ağırlıkları istatistiksel yönden değerlendirildi. Hem karaciğer hem de böbrek nispi ağırlıkları açısından gruplar arasında anlamlı fark olduğu belirlendi ($P<0,001$) (Tablo 10).

Tablo 10. Deneysel gruplara ait nispi doku ağırlıkları (g).

Gruplar (n=8)	Dokular		
	Karaciğer	Böbrek (sağ)	Böbrek (sol)
Kontrol	0,039 ± 0,000 ^a	0,004 ± 0,000 ^{a, b}	0,004 ± 0,000 ^{a, b}
OTA	0,039 ± 0,000 ^a	0,003 ± 0,000 ^{c, d}	0,003 ± 0,000 ^{c, d}
Folik asit	0,038 ± 0,000 ^{a, b}	0,004 ± 0,000 ^a	0,004 ± 0,000 ^a
Ellajik asit	0,036 ± 0,000 ^{b, c}	0,004 ± 0,000 ^{b, c}	0,003 ± 0,000 ^{b, c}
OTA+ Folik asit	0,034 ± 0,001 ^c	0,004 ± 0,000 ^{b, c}	0,004 ± 0,000 ^{a, b, c}
OTA+ Ellajik asit	0,035 ± 0,000 ^c	0,003 ± 0,000 ^d	0,003 ± 0,000 ^d
P	***	***	***

OTA: Okratoksin A

^{a, b, c, d}: Aynı sütunda bulunan farklı harfler istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.

***: $P<0,001$

Deneysel gruplara ait karaciğer nispi ağırlıkları istatistiksel yönden karşılaştırıldığında kontrol ve OTA grubunda en yüksek; OTA + folik asit ve OTA + ellajik asit grubunda ise en düşük olduğu belirlendi. Karaciğer dokusunda görülen farklılıklar kontrol ile ellajik asit ($P=0,009$), kontrol ile OTA + folik asit ($P=0,000$), kontrol ile OTA + ellajik asit ($P=0,000$), OTA ile ellajik asit ($P=0,004$), OTA ile OTA + folik asit ($P=0,000$), OTA ile OTA + ellajik asit ($P=0,000$), folik asit ile OTA + folik asit ($P=0,008$), folik asit ile OTA + ellajik asit ($P=0,005$) grupları arasında görüldü.

Deneysel gruplara ait sağ ve sol böbrek nispi ağırlıkları incelendiğinde en düşük ağırlığın OTA + ellajik asit grubunda olduğu görüldü.

Sağ böbrekte görülen farklılıklar kontrol ile OTA ($P=0,022$), kontrol ile OTA + ellajik asit ($P=0,001$), OTA ile folik asit ($P=0,001$), folik asit ile ellajik asit ($P=0,037$), folik asit ile OTA + ellajik asit ($P=0,000$), ellajik asit ile OTA + ellajik asit ($P=0,010$) grupları arasında olduğu belirlendi.

Sol böbrekteki farklılıklar kontrol ile OTA (P=0,025), kontrol ile OTA + ellajik asit (P=0,000), OTA ile folik asit (P=0,002), folik asit ile ellajik asit (P=0,038), folik asit ile OTA + ellajik asit (P=0,000), ellajik asit ile OTA + ellajik asit (P=0,010) grupları arasında görüldü.

4.3. Karaciğer ve Böbrek Dokularına ait Biyokimyasal Parametreler

4.3.1. Karaciğer Dokusuna ait Biyokimyasal Parametreler

Deneysel olarak OTA toksikasyonu oluşturulmuş sıçanların karaciğer enzim parametrelerinden ALT, AST ve ALP düzeyleri ölçüldü ve elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmesi yapıldı. Yapılan değerlendirme sonucunda ALT (P<0,001), AST (P<0,01) ve ALP (P<0,001) düzeylerinde gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü (Tablo 11).

Tablo 11. Karaciğer dokusuna ait serum biyokimyasal parametreler.

Gruplar (n=8)	Parametreler		
	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)
Kontrol	38,68 ± 0,97 ^a	24,96 ± 1,11 ^a	2535,13 ± 27,44 ^b
OTA	35,35 ± 1,02 ^{b, c}	17,00 ± 0,30 ^b	2497,07 ± 15,62 ^b
Folik asit	36,50 ± 0,95 ^{a, b}	25,90 ± 1,30 ^a	2556,42 ± 33,77 ^b
Ellajik asit	29,88 ± 0,80 ^d	18,39 ± 0,31 ^b	2764,81 ± 33,01 ^a
OTA+ Folik asit	38,70 ± 0,82 ^a	25,00 ± 1,94 ^a	2536,32 ± 32,64 ^b
OTA+ Ellajik asit	32,71 ± 1,13 ^d	21,40 ± 3,99 ^b	2631,32 ± 83,48 ^b
P	***	**	***

OTA: Okratoksin A

ALT: Alanin aminotransferaz, AST: Aspartat aminotransferaz, ALP: Alkalın fosfataz

^{a, b, c, d}: Aynı sütunda bulunan farklı harfler istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.

** : P<0,01 ***: P<0,001

Karaciğer dokusu ALT ve AST yönünden değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak en yüksek enzim aktivitesinin kontrol, folik asit ve OTA + folik asit gruplarında, en düşük enzim aktivitesinin ise OTA (ALT hariç), ellajik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında olduğu belirlendi.

ALT düzeyinde görülen farklılıklar kontrol ile OTA (P=0,010), kontrol ile ellajik asit (P=0,000), kontrol ile OTA + ellajik asit (P=0,000), OTA ile ellajik asit (P=0,001), OTA ile

OTA + folik asit (P=0,016), OTA ile OTA + ellajik asit (P=0,045), folik asit ile ellajik asit (P=0,000), folik asit ile OTA + ellajik asit (P=0,004), ellajik asit ile OTA + folik asit (P=0,000) ve OTA + folik asit ile OTA + ellajik asit (P=0,000) grupları arasında bulunmaktadır.

AST düzeyinde görülen farklılıklar kontrol ile OTA (P=0,000), kontrol ile ellajik asit (P=0,000), kontrol ile OTA + ellajik asit (P=0,000), OTA ile folik asit (P=0,000), OTA ile OTA + folik asit (P=0,000), folik asit ile ellajik asit (P=0,000), folik asit ile OTA + ellajik asit (P=0,000), ellajik asit ile OTA + folik asit (P=0,001) ve OTA + folik asit ile OTA + ellajik asit (P=0,000) grupları arasında olduğu belirlendi.

Karaciğer enzim parametrelerinde ALP'nin ise istatistiksel olarak en yüksek ellajik asit grubunda olduğu, diğer deneysel gruplar arasında ise anlamlı fark olmadığı belirlendi. ALP düzeyinde görülen farklılıkların ise kontrol ile ellajik asit (P=0,000), OTA ile ellajik asit (P=0,000), OTA ile OTA + ellajik asit (P=0,045), folik asit ile ellajik asit (P=0,001), ellajik asit ile OTA + folik asit (P=0,000) ve ellajik asit ile OTA + ellajik asit (P=0,009) grupları arasında olduğu tespit edildi.

4.3.2. Böbrek Dokusuna ait Biyokimyasal Parametreler

Deneysel olarak OTA toksikasyonu oluşturulmuş sıçanların böbrek enzim parametrelerinden kreatinin, GGT aktivitesi ve üre düzeyleri ölçülerek elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi yapıldı. Yapılan değerlendirme sonucunda kreatinin ve GGT aktivitesi düzeylerinde anlamlı fark bulunamazken; üre düzeyinde anlamlı (P<0,01) farklılık görüldü (Tablo 12).

Tablo 12. Böbrek dokusuna ait serum biyokimyasal parametreler.

Gruplar (n=8)	Parametreler		
	Kreatinin (mg/dl)	GGT (U/L)	Üre (mg/dl)
Kontrol	0,24 ± 0,01	1,76 ± 0,28	1,45 ± 0,00 ^a
OTA	0,23 ± 0,00	2,23 ± 0,17	1,44 ± 0,01 ^{a, b}
Folik asit	0,23 ± 0,00	1,57 ± 0,23	1,43 ± 0,01 ^{a, b}
Ellajik asit	0,24 ± 0,01	1,73 ± 0,83	1,37 ± 0,01 ^c
OTA+ Folik asit	0,21 ± 0,00	1,61 ± 0,14	1,40 ± 0,01 ^{b, c}
OTA+ Ellajik asit	0,23 ± 0,01	1,48 ± 0,27	1,40 ± 0,01 ^c
P	AD	AD	**

OTA: Okratoksin A

GGT: *Gama glutamil transferaz*

AD: Anlamlı Değil

^{a, b, c}: Aynı sütunda bulunan farklı harfler istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.

** : P<0,01

Kreatinin düzeyinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamasına rağmen kontrol ile OTA + folik asit (P=0,027) ve OTA ile OTA + folik asit (P=0,035) grupları arasında anlamlı fark bulundu.

GGT aktivite düzeyinde de gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamasına rağmen OTA ile ellajik asit (P=0,010) ve OTA ile OTA + ellajik asit (P=0,042) grupları arasında anlamlı fark tespit edildi.

Üre düzeyinde görülen farklılıklar ise kontrol ile ellajik asit (P=0,000), kontrol ile OTA + folik asit (P=0,005), kontrol ile OTA + ellajik asit (P=0,002), OTA ile ellajik asit (P=0,002), OTA ile OTA + ellajik asit (P=0,037) ve folik asit ile ellajik asit (P=0,006) grupları arasında görüldü. Burada kontrol, OTA ve folik asit gruplarında üre düzeyi anlamlı olarak en yüksek seviyede iken, ellajik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında ise anlamlı olarak en düşük seviyede olduğu belirlendi.

4.4. Oksidan ve Antioksidan Parametre Analizleri

4.4.1. Karaciğer Dokusu Oksidan ve Antioksidan Parametre Analizleri

Deneysel olarak OTA toksikasyonu oluşturulmuş sıçan karaciğer dokusunda oksidan / antioksidan parametreler açısından SOD ve CAT aktiviteleri ile GSH ve MDA düzeyleri değerlendirildi. Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmesi yapıldı. Yapılan değerlendirme sonucunda CAT aktivitesi ve GSH düzeyinde $P<0,01$ seviyesinde anlamlı farklılık bulunurken; SOD aktivitesi ve MDA düzeyinde $P<0,001$ olarak anlamlı farklılık bulundu (Tablo 13).

SOD aktivitesi kontrol grubunda en yüksek olmasına rağmen kontrol, OTA ve folik asit grupları arasında anlamlı fark bulunamadı. Buna karşılık SOD aktivitesinin OTA + folik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında istatistiksel olarak düşük olduğu görüldü. SOD aktivitesinde görülen farklılıkların kontrol ile ellajik asit ($P=0,002$), kontrol ile OTA + folik asit ($P=0,000$), kontrol ile OTA + ellajik asit ($P=0,000$), OTA ile ellajik asit ($P=0,004$), OTA ile OTA + folik asit ($P=0,000$), OTA ile OTA + ellajik asit ($P=0,000$), folik asit ile OTA + folik asit ($P=0,000$), folik asit ile OTA + ellajik asit ($P=0,000$), ellajik asit ile OTA + folik asit ($P=0,005$) ve ellajik asit ile OTA + ellajik asit ($P=0,012$) grupları arasında olduğu belirlendi.

Karaciğer dokusu CAT aktivitesinin OTA grubunda anlamlı olarak en yüksek değerde olduğu, buna karşılık ellajik asit, OTA + folik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında anlamlı olarak düşük olduğu belirlendi. CAT aktivitesinde görülen farklılıklar kontrol ile OTA + ellajik asit ($P=0,030$), OTA ile ellajik asit ($P=0,004$), OTA ile OTA + folik asit ($P=0,002$), OTA ile OTA + ellajik asit ($P=0,000$) ve folik asit ile OTA + ellajik asit ($P=0,041$) grupları arasında görüldü.

Karaciğer GSH aktivitesi kontrol, folik asit ve ellajik asit uygulanan gruplarda istatistiksel olarak en yüksek düzeyde iken, OTA uygulanan deneysel gruplarda ise istatistiksel olarak en düşük olduğu belirlendi. GSH düzeyinde görülen farklılıklar kontrol ile OTA ($P=0,028$), kontrol ile OTA + folik asit ($P=0,006$), kontrol ile OTA + ellajik asit ($P=0,005$), OTA ile folik asit ($P=0,024$), OTA ile ellajik asit ($P=0,005$), folik asit ile OTA + folik asit ($P=0,005$), folik asit ile OTA + ellajik asit ($P=0,004$), ellajik asit ile OTA + folik asit ($P=0,001$) ve ellajik asit ile OTA + ellajik asit ($P=0,001$) grupları arasında bulundu.

Karaciğer dokusu MDA seviyesinin OTA grubunda anlamlı olarak en yüksek OTA + folik asit ile OTA + ellajik asit gruplarında ise anlamlı olarak en düşük seviyede olduğu ve bu

gruplar arasında anlamlı fark olmadığı görüldü. MDA düzeyinde görülen farklılıkların ise kontrol ile OTA (P=0,014), kontrol ile ellajik asit (P=0,001), kontrol ile OTA + folik asit (P=0,000), kontrol ile OTA + ellajik asit (P=0,000), OTA ile folik asit (P=0,000), OTA ile ellajik asit (P=0,000), OTA ile OTA + folik asit (P=0,000), OTA ile OTA + ellajik asit (P=0,000), folik asit ile ellajik asit (P=0,043), folik asit ile OTA + folik asit (P=0,000), folik asit ile OTA + ellajik asit (P=0,000), ellajik asit ile OTA + folik asit (P=0,001) ve ellajik asit ile OTA + ellajik asit (P=0,000) grupları arasında olduğu tespit edildi.

4.4.2. Böbrek Dokusu Oksidan ve Antioksidan Parametre Analizleri

Deneyssel olarak OTA toksikasyonu oluşturulmuş sıçan böbrek dokusunda oksidan / antioksidan parametreler açısından SOD ve CAT aktiviteleri ile GSH ve MDA düzeyleri incelenerek elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi yapıldı. Yapılan değerlendirme sonucunda SOD aktivitesinde (P<0,01), CAT aktivitesinde (P<0,05), GSH düzeyinde (P<0,001) ve MDA düzeyinde (P<0,001) anlamlı farklılık görüldü (Tablo 14).

Böbrek dokusu SOD aktivitesinin OTA grubunda anlamlı olarak düşük olduğu, diğer deneyssel gruplarda ise folik asit hariç, anlamlı olarak yüksek olduğu ve bu gruplar arasında anlamlı fark olmadığı saptandı. SOD aktivitesinde görülen farklılıklar kontrol ile OTA (P=0,011), OTA ile ellajik asit (P=0,000), OTA ile OTA + folik asit (P=0,008), OTA ile OTA + ellajik asit (P=0,003), folik asit ile ellajik asit (P=0,002) ve folik asit ile OTA + ellajik asit (P=0,037) grupları arasında görüldü.

Aynı şekilde CAT aktivitesinin de ellajik asit, OTA + folik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında anlamlı olarak OTA grubuna göre yüksek seviyede olduğu belirlendi. CAT aktivitesinde görülen farklılıkların kontrol ile OTA + folik asit (P=0,008), OTA ile ellajik asit (P=0,014), OTA ile OTA + folik asit (P=0,000), OTA ile OTA + ellajik asit (P=0,003), folik asit ile ellajik asit (P=0,047), folik asit ile OTA + folik asit (P=0,001) ve folik asit ile OTA + ellajik asit (P=0,013) grupları arasında olduğu belirlendi.

Diğer deneyssel gruplarla karşılaştırıldığında GSH seviyesinin OTA grubunda anlamlı olarak düşük olduğu, buna karşılık OTA + folik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında ise istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi. GSH düzeyinde görülen farklılıklar kontrol ile OTA (P=0,002), kontrol ile ellajik asit (P=0,000), kontrol ile OTA + folik asit (P=0,000), kontrol ile OTA + ellajik asit (P=0,000), OTA ile folik asit (P=0,013), OTA ile ellajik asit (P=0,000), OTA ile OTA + folik asit (P=0,000), OTA ile OTA + ellajik asit (P=0,000), folik

asit ile ellajik asit (P=0,000), folik asit ile OTA + folik asit (P=0,000), folik asit ile OTA + ellajik asit (P=0,000) ve ellajik asit ile OTA + folik asit (P=0,017) grupları arasında bulundu.

Antioksidan parametrelerden farklı olarak OTA grubunda MDA seviyesinin diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek olduğu (OTA + folik asit grubu hariç) belirlendi. MDA düzeyinde görülen farklılıkların ise kontrol ile OTA (P=0,003), kontrol ile folik asit (P=0,000), OTA ile folik asit (P=0,000), OTA ile ellajik asit (P=0,017), OTA ile OTA + ellajik asit (P=0,000), folik asit ile ellajik asit (P=0,000), folik asit ile OTA + folik asit (P=0,000), folik asit ile OTA + ellajik asit (P=0,006), OTA + folik asit ile OTA + ellajik asit (P=0,011) grupları arasında görüldüğü belirlendi.

4.4.3. Kanda Oksidan ve Antioksidan Parametre Analizleri

Deneyssel olarak OTA toksikasyonu oluşturulmuş serum / plazma örnekleri SOD ve CAT aktiviteleri ile GSH ve MDA düzeyleri açısından incelendi ve elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmesi yapıldı. Yapılan değerlendirme sonucunda SOD (P<0,001) ve CAT (P<0,05) aktiviteleri ile GSH ve MDA düzeylerinde (P<0,01) anlamlı farklılık görüldü (Tablo 15).

Serum SOD aktivitesinde görülen farklılıklar kontrol ile OTA (P=0,015), kontrol ile ellajik asit (P=0,000), kontrol ile OTA + folik asit (P=0,000), kontrol ile OTA + ellajik asit (P=0,000), OTA ile folik asit (P=0,002), OTA ile ellajik asit (P=0,000), OTA ile OTA + folik asit (P=0,000), OTA ile OTA + ellajik asit (P=0,000), folik asit ile ellajik asit (P=0,000), folik asit ile OTA + folik asit (P=0,000) ve folik asit ile OTA + ellajik asit (P=0,000) grupları arasında görüldü. Serum SOD aktivitesinin OTA grubunda anlamlı olarak en düşük seviyede olduğu, ellajik asit, OTA + folik asit ve OTA + ellajik asit grubunda ise en yüksek olduğu ve bu gruplar arasında anlamlı fark olmadığı belirlendi.

Plazma CAT aktivitesinde görülen farklılıklar kontrol ile folik asit (P=0,019), OTA ile folik asit (P=0,001), folik asit ile ellajik asit (P=0,037), folik asit ile OTA + folik asit (P=0,019) ve folik asit ile OTA + ellajik asit (P=0,049) grupları arasında görüldü. Buradaki anlamlı artışın folik asit grubunda olduğu saptanırken, diğer deneyssel gruplar arasında herhangi bir farklılığın olmadığı gözlemlendi.

Plazma GSH düzeyinde görülen farklılıklar kontrol ile ellajik asit (P=0,003), kontrol ile OTA + ellajik asit (P=0,006), OTA ile ellajik asit (P=0,021), OTA ile OTA + ellajik asit (P=0,045), folik asit ile ellajik asit (P=0,020), folik asit ile OTA + ellajik asit (P=0,043),

ellajik asit ile OTA + folik asit (P=0,021), OTA + folik asit ile OTA + ellajik asit (P=0,046) arasındadır. GSH aktivitesinin ellajik asit uygulanan gruplarda anlamlı olarak yükseldiği bulundu.

Serum MDA düzeyinde görülen farklılıklar kontrol ile OTA (P=0,034), OTA ile folik asit (P=0,017) ve OTA ile ellajik asit (P=0,018) grupları arasında gözlendi. Buradaki anlamlı artışın OTA grubunda olduğu ve OTA, OTA + folik asit ve OTA + ellajik asit grupları arasında herhangi bir anlamlı farklılığın olmadığı belirlendi.

Tablo 13. Deneysel okratoksin A toksikasyonu sonucunda karaciğer dokusu oksidan ve antioksidan parametre sonuçları.

Gruplar (n = 8)	Parametreler			
	SOD (U/mg protein)	CAT (k/mg protein)	GSH (mg/g protein)	MDA (nmol/ g protein)
Kontrol	6,75 ± 1,40 ^{a, b}	6,35 ± 1,10 ^{a, b}	26,42 ± 2,91 ^a	25,36 ± 2,66 ^b
OTA	5,75 ± 1,11 ^{a, b}	10,07 ± 1,19 ^a	17,81 ± 1,26 ^b	42,65 ± 5,50 ^a
Folik asit	3,60 ± 0,38 ^{b, c}	6,18 ± 1,14 ^b	28,58 ± 4,95 ^a	21,65 ± 2,20 ^b
Ellajik asit	3,12 ± 0,51 ^c	4,40 ± 1,06 ^{b, c}	32,09 ± 4,79 ^a	18,01 ± 3,25 ^c
OTA+ Folik asit	1,81 ± 0,21 ^d	4,21 ± 1,29 ^{b, c}	16,90 ± 2,21 ^b	9,93 ± 1,07 ^d
OTA+ Ellajik asit	1,94 ± 0,16 ^d	3,07 ± 1,08 ^c	16,77 ± 2,07 ^b	9,46 ± 1,06 ^d
P	***	**	**	***

OTA: Okratoksin A

SOD (*Süperoksid dismutaz*), CAT (*Katalaz*), GSH (*İndirgenmiş glutatyon*), MDA (*Malondialdehit*)

^{a, b, c, d}: Aynı sütunda bulunan farklı harfler istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.

** : P<0,01 ***: P<0,001

Tablo 14. Deneysel okratoksin A toksikasyonu sonucunda böbrek dokusu oksidan ve antioksidan parametre sonuçları.

Gruplar (n = 8)	Parametreler			
	SOD (U/mg protein)	CAT (k/mg protein)	GSH (mg/g protein)	MDA (nmol/ g protein)
Kontrol	3,40 ± 0,46 ^{a, b}	4,46 ± 0,97 ^{b, c}	21,17 ± 1,69 ^c	21,77 ± 3,01 ^{b, c}
OTA	1,97 ± 0,13 ^c	2,94 ± 0,19 ^c	15,40 ± 1,08 ^d	33,48 ± 4,60 ^a
Folik asit	2,41 ± 0,16 ^{b, c}	3,28 ± 0,36 ^c	19,75 ± 0,75 ^c	10,18 ± 1,23 ^d
Ellajik asit	4,47 ± 0,45 ^a	4,70 ± 0,63 ^{a, b}	29,56 ± 1,54 ^b	22,96 ± 0,78 ^{b, c}
OTA+ Folik asit	3,65 ± 0,78 ^{a, b}	6,34 ± 0,78 ^a	39,73 ± 3,34 ^a	26,87 ± 3,42 ^{a, b}
OTA+ Ellajik asit	3,95 ± 0,58 ^a	5,19 ± 0,88 ^{a, b}	35,14 ± 5,09 ^{a, b}	19,73 ± 2,16 ^c
P	**	*	***	***

OTA: Okratoksin A

SOD (*Süperoksid dismutaz*), CAT (*Katalaz*), GSH (*İndirgenmiş glutatyon*), MDA (*Malondialdehit*)

^{a, b, c, d}: Aynı sütunda bulunan farklı harfler istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.

*: P<0,05 ** : P<0,01 ***: P<0,001

Tablo 15. Deneysel gruplara ait serum SOD ve plazma CAT aktiviteleri ile plazma GSH ve serum MDA seviyeleri.

Gruplar (n = 8)	Parametreler			
	SOD (U/mg protein)	CAT (U/g Hb)	GSH (μ M/g Hb)	MDA (nmol/g protein)
Kontrol	0,50 \pm 0,07 ^b	0,52 \pm 0,07 ^b	1,79 \pm 0,11 ^b	5,57 \pm 0,72 ^b
OTA	0,26 \pm 0,05 ^c	0,43 \pm 0,01 ^b	1,87 \pm 0,08 ^b	8,88 \pm 1,30 ^a
Folik asit	0,55 \pm 0,04 ^b	0,67 \pm 0,07 ^a	1,84 \pm 0,07 ^b	5,13 \pm 0,32 ^b
Ellajik asit	1,05 \pm 0,09 ^a	0,46 \pm 0,02 ^b	2,36 \pm 0,18 ^a	5,09 \pm 0,67 ^b
OTA+ Folik asit	1,15 \pm 0,05 ^a	0,48 \pm 0,03 ^b	1,84 \pm 0,04 ^b	5,69 \pm 0,41 ^{a, b}
OTA+ Ellajik asit	1,23 \pm 0,06 ^a	0,50 \pm 0,04 ^b	2,12 \pm 0,10 ^a	6,29 \pm 0,35 ^{a, b}
P	***	*	*	**

OTA: Okratoksin A

SOD (*Süperoksid dismutaz*), CAT (*Katalaz*), GSH (*İndirgenmiş glutatyon*), MDA (*Malondialdehit*)

^{a, b, c}: Aynı sütunda bulunan farklı harfler istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.

*: P<0,05 ** : P<0,01 ***: P<0,001

4.5. DNA Hasarının Değerlendirilmesi

Sıçanlardan alınan lenfosit örneklerinde yapılan comet analiz yöntemi ile DNA hasarı incelendi ve genetik hasarın saptanmasında kuyruk momenti (%) ve kuyruk yoğunluğu parametreleri istatistiksel yönden değerlendirildi. Hem kuyruk momenti (%) hem de kuyruk yoğunluğu açısından gruplar arasında anlamlı fark olduğu belirlendi ($P<0,001$) (Tablo 16).

Tablo 16. Deneysel okratoksin A toksikasyonu sonucunda lenfositlerde oluşan DNA hasarı sonuçları.

Gruplar (n=8)	Parametreler	
	Kuyruk momenti (%)	Kuyruk yoğunluğu
Kontrol	0,05 ± 0,01 ^d	10,64 ± 1,61 ^c
OTA	0,25 ± 0,02 ^a	24,59 ± 2,14 ^a
Folik asit	0,12 ± 0,01 ^{b, c}	13,01 ± 1,27 ^{b, c}
Ellajik asit	0,10 ± 0,01 ^{c, d}	11,34 ± 1,98 ^c
OTA+ Folik asit	0,17 ± 0,01 ^{a, b}	17,69 ± 1,57 ^{a, b}
OTA+ Ellajik asit	0,11 ± 0,02 ^{c, d}	9,97 ± 1,40 ^c
P	***	***

OTA: Okratoksin A

a, b, c, d: Aynı sütunda bulunan farklı harfler istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.

***: $P<0,001$

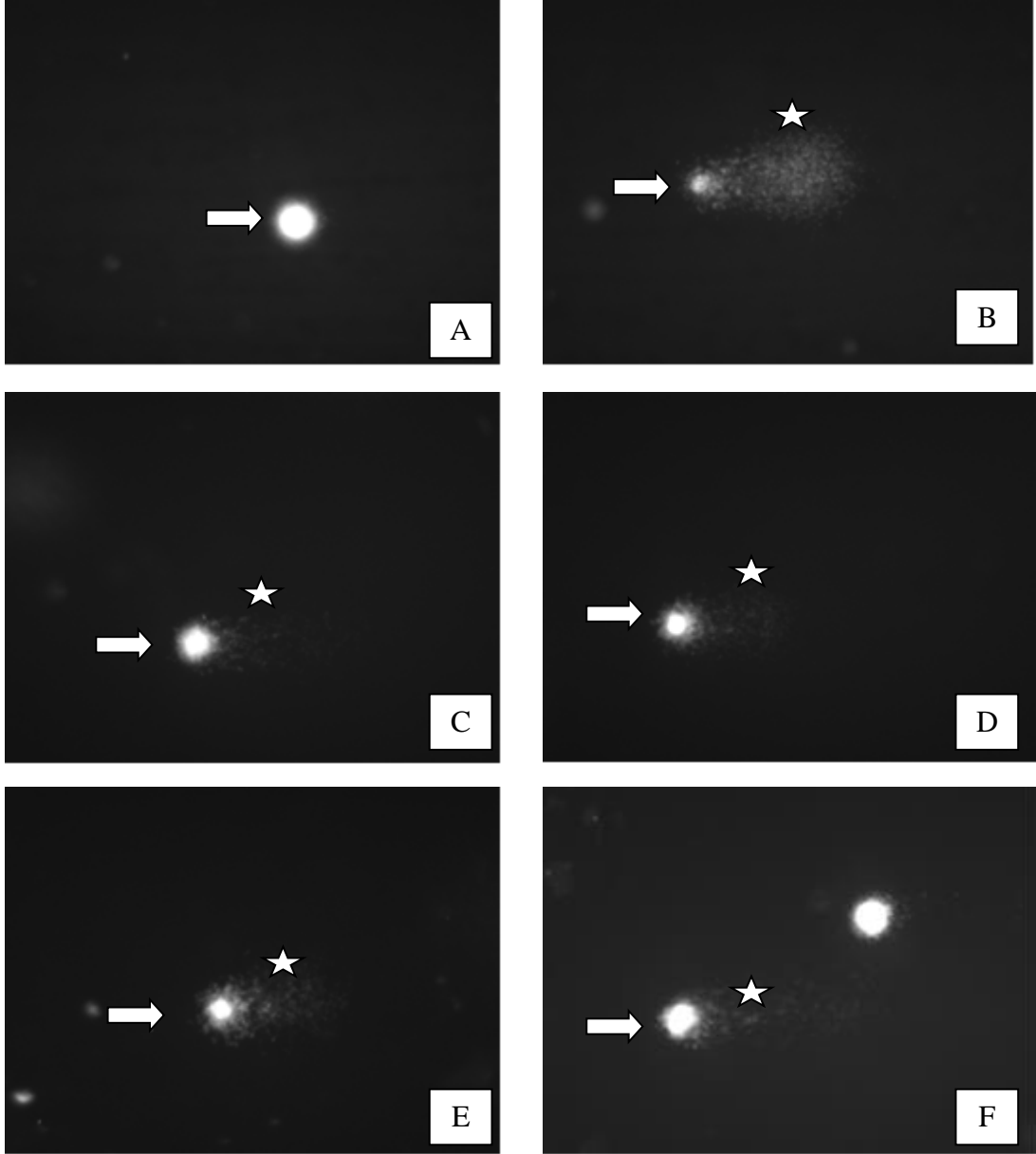
Comet analizi sonucunda DNA hasarının kuyruk momenti ve kuyruk yoğunluğu açısından anlamlı olarak en yüksek OTA ile OTA + folik asit gruplarında olduğu belirlendi. Kuyruk momenti açısından değerlendirildiğinde hasarın en düşük kontrol grubunda, kuyruk yoğunluğu değerlendirildiğinde ise hasarın kontrol, ellajik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında düşük olduğu görüldü.

Kuyruk momentinde görülen farklılıkların kontrol ile OTA ($P=0,000$), kontrol ile folik asit ($P=0,005$), kontrol ile OTA + folik asit ($P=0,000$), OTA ile folik asit ($P=0,001$), OTA ile ellajik asit ($P=0,000$), OTA ile OTA + ellajik asit ($P=0,000$), ellajik asit ile OTA + folik asit ($P=0,006$) ve OTA + folik asit ile OTA + ellajik asit ($P=0,007$) grupları arasında olduğu belirlendi.

Kuyruk yoğunluğunda görülen farklılıklar ise kontrol ile OTA ($P=0,000$), kontrol ile OTA + folik asit ($P=0,005$), OTA ile folik asit ($P=0,001$), OTA ile ellajik asit ($P=0,000$),

OTA ile OTA + ellajik asit (P=0,000), ellajik asit ile OTA + folik asit (P=0,006) ve OTA + folik asit ile OTA + ellajik asit (P=0,001) grupları arasında bulundu.

İzole edilen lenfositlere ait floresan mikroskop görüntüsü Resim 4’de verilmiştir.



A. Kontrol grubu **B.** OTA grubu **C.** Folik asit grubu **D.** Ellajik asit grubu **E.** OTA + folik asit grubu
F. OTA + ellajik asit grubu

Beyaz oklar: Lenfositlerin başı

Beyaz yıldızlar: Lenfositlerin kuyruk göçü

OTA: Okratoksin A

Resim 4. Sıçanlardan izole edilen lenfositlere ait floresan mikroskop görüntüleri.

4.6. Serum Okratoksin A Seviyesi

Sıçanlardan alınan kan örneklerinden elde edilen serumlarda OTA seviyesi ticari test kiti ile belirlendi. İstatistiksel yönden değerlendirme sonucunda gruplar arasında anlamlı fark olduğu belirlendi ($P<0,001$) (Tablo 17).

Tablo 17. Deneysel okratoksin A toksikasyonu sonucunda serumda OTA seviyesi.

Gruplar (n=8)	Serum OTA Seviyesi (ng/ml)
Kontrol	$0,58 \pm 0,01$ ^b
OTA	$0,79 \pm 0,00$ ^a
Folik asit	$0,40 \pm 0,03$ ^c
Ellajik asit	$0,50 \pm 0,03$ ^{b, c}
OTA+ Folik asit	$0,79 \pm 0,01$ ^a
OTA+ Ellajik asit	$0,81 \pm 0,01$ ^a
P	***

OTA: Okratoksin A

^{a, b, c}: Aynı sütunda bulunan farklı harfler istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.

***: $P<0,001$

Okratoksin uygulanan gruplarda serum OTA seviyesinin diğer deneysel gruplara göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi. Serum OTA seviyesinde görülen farklılıkların kontrol ile OTA ($P=0,000$), kontrol ile folik asit ($P=0,000$), kontrol ile OTA + folik asit ($P=0,000$), kontrol ile OTA + ellajik asit ($P=0,000$), OTA ile folik asit ($P=0,000$), OTA ile ellajik asit ($P=0,000$), folik asit ile OTA + folik asit ($P=0,000$), folik asit ile OTA + ellajik asit ($P=0,000$), ellajik asit ile OTA + folik asit ($P=0,000$) ve ellajik asit ile OTA + ellajik asit ($P=0,000$) grupları arasında olduğu belirlendi.

5. TARTIŞMA

Küflü gıdalar insan ve hayvan sağlığını tehdit eden sorunlardır. Doğada oldukça yaygın bulunan küfler, tarımsal ürünlerin yanı sıra işlenmiş, işlenmemiş ve yarı işlenmiş gıda maddelerinde de sorunlara yol açabilen önemli kontaminantlardır. Küflerin ekonomi ve sağlık problemlerine sebep olan metabolitleri ise mikotoksinlerdir. Mikotoksinler, insanlar ve hayvanlarda toksik etkilere sebep olan sekonder metabolitlerdir. Mikotoksinleri ihtiva eden gıdaların tüketilmesiyle insan ve hayvanlarda görülen sağlık problemleri mikotoksikozis şeklinde adlandırılmaktadır (Öksüztepe ve Erkan, 2016).

Kanserojenik, teratojenik, mutajenik, hepatotoksik, dermatotoksik, nörotoksik, östrojenik gibi çeşitli etkileri bulunan mikotoksinlerin toksik etki mekanizmaları incelendiğinde serbest radikaller ve reaktif oksijen üretimine aracılık etmesinin oldukça önemli olduğu ve oluşan ürünlerin sitotoksitede ve hepatokarsinojenitede rol aldığı bildirilmektedir. İnsan ya da hayvanlarda mikotoksinlerin yol açabileceği hasarın önüne geçilmesinde antioksidan kullanımının önemi büyüktür (Sabuncuoğlu ve ark, 2008; Öksüztepe ve Erkan, 2016).

OTA, dünyadaki en önemli gıda ve yem kirleticilerinden biri olarak kabul edilmektedir. OTA insanlar, evcil hayvanlar ve laboratuvar hayvanlarında çeşitli toksikolojik etkilere neden olabilmektedir (Tao ve ark, 2018).

Organizmada herhangi bir patolojik olay veya fizyolojik şartlarda oluşan serbest radikaller ile bunların süpürücüsü olan antioksidan savunma sistemi arasında bir denge bulunmaktadır. Bu dengenin serbest radikaller lehine kayması oksidatif stresi göstermektedir. Canlılar oksidatif hasara karşı antioksidan sistem ve moleküllerle korunmaktadır. Antioksidan sistemi kuvvetlendiren en önemli faktörlerden birisini tükettiğimiz besinler oluşturmaktadır. Zengin antioksidan içerikli besinleri tüketmenin vücudumuzun oksidanlara karşı olan direncine büyük katkısı vardır (Öğüt, 2014).

OTA ile yapılan akut toksisite çalışmalarında türlere ve uygulama yoluna bağlı farklı LD₅₀ değerleri elde edilmiştir. Örneğin köpekler ve domuzlar sırasıyla 0,2 ve 1,0 mg/kg/gün (oral) LD₅₀ değeri ile çok duyarlı görünmektedir. Tavuklar için LD₅₀ 3,3 mg/kg/gün'dür. Bu değer sıçanlar ve farelerde 20-58 mg/kg/gün'e yükselmektedir. Bu değerler periton içi veya damar içi uygulamada daha düşüktür (WHO, 2001).

Alvarez ve ark (2004) 12 haftalık erkek *Wistar albino* sıçanlara OTA'nın 0, 50, 150 ve 450 µg/kg/gün dozunda haftanın 5 günü gavaj yolu ile 28 gün uygulamışlardır. Sıçanların

canlı ağırlık artışı çalışma sonunda değerlendirildiğinde kontrol grubu ile OTA grupları arasında anlamlı farklılığın olmadığı ifade edilmiştir. Yüksek doz OTA grubunda (450 µg/kg/gün) canlı ağırlık artışının ikinci hafta itibari ile daha düşük olduğu ama bunun kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ifade edilmiştir. Karaciğer, böbrek ve dalak ağırlıklarının OTA uygulamasından etkilenmediği ve elde edilen sonuçlara göre AST, üre, kreatinin ve total protein değerlerinde hem 7. gün hem de 28. günde yapılan testlerde anlamlı bir farklılığın olmadığı ifade edilmiştir.

Gagliano ve ark (2006) yapmış oldukları çalışmada *Wistar albino* sıçanlara 90 gün boyunca 289 µg/kg/gün boyunca gastrik gavaj yolu ile OTA uygulamışlardır. Çalışma sonunda sıçanların canlı ağırlık artışı kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmüştür. Yine aynı çalışmada karaciğer ağırlıkları incelendiğinde kontrol grubu ile OTA grubu kıyaslandığında anlamlı bir farklılığın oluşmadığı bildirilmiştir.

Rached ve ark (2007) 6 - 7 haftalık erkek F344/N sıçanlarına OTA'nın 0, 21, 70 ve 210 µg/kg/gün dozunda haftanın 5 günü gavaj yolu ile 14, 28 ve 90 gün uygulamışlardır. Bu çalışma sonucunda canlı ağırlığı ve karaciğer ağırlıkları incelendiğinde anlamlı farklılığın olmadığı gözlenmiştir. Buna karşılık, böbrek ağırlığının zamanla ve doza bağımlı bir şekilde anlamlı olarak azaldığı ifade edilmiştir. Çalışmada 90 günlük OTA uygulaması sonucunda idrar GGT aktivitesinde azalmanın (70 ve 210 µg/kg/gün dozlarında) ortaya çıktığı bildirilmiştir. Kreatinin konsantrasyonuna bakıldığında 28. günde yapılan değerlendirmelerde herhangi bir artış gözlenmezken; 90. günde yapılan değerlendirmede sadece 210 µg/kg/gün dozda anlamlı bir artış olduğu bildirilmiştir. Üre düzeyleri incelendiğinde ise herhangi bir anlamlı farklılığın olmadığı belirtilmiştir.

Abbas ve ark (2012) yapmış oldukları çalışmada 150 - 200 g'lık 20 erkek *Wistar albino* sıçanları dört gruba ayırmışlardır. Kontrol grubuna distile su uygulanırken diğer gruplara OTA'nın 70, 140 ve 210 µg/kg/gün dozları 20 gün uygulanmıştır. Biyokimyasal testler için 0., 10. ve 20. günlerde sıçanlardan kan örnekleri toplanmıştır. Biyokimyasal sonuçlar incelendiğinde, ALT ve AST aktivitesinde yükselme ve ALP enzim aktivitesinde azalma tespit edilmiştir.

Soyöz (2002), yapmış olduğu çalışmada, sıçanlarda okratoksikozis oluşturarak serum ve doku enzim düzeylerini belirlemiş ve bir antioksidan olan melatoninin bu enzim düzeylerine etkisini araştırmıştır. Bu amaçla her grupta 8 erkek *Wistar albino* sıçan olmak üzere; kontrol, OTA (289 µg/kg/gün) ve OTA + melatonin (289 µg/kg/gün + 10 mg/kg/gün) gruplarını oluşturmuş, OTA ve melatoninini 1 ay boyunca oral olarak uygulamıştır. OTA grubunda, karaciğerde ALT seviyesinde kontrole göre anlamlı artış bulmuşken (P<0,01), AST

seviyesindeki artışı anlamlı bulmamıştır. Çalışmada LDH aktivitesi ise kontrole göre anlamlı bir azalma göstermiştir ($P<0,03$). Serumda kontrollere göre, ALT ($P<0,008$), AST ($P<0,004$) ve LDH ($P<0,002$) seviyeleri, OTA'lı grupta anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur.

Çalışmamızda haftalık canlı ağırlıkları kıyaslandığında üçüncü ($P<0,05$) ve dördüncü ($P<0,01$) haftalarda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olduğu görüldü. Bu anlamlı farklılığın folik asit grubunda en yüksek olduğu belirlendi. Tüm deneysel gruplarda zamana bağlı anlamlı canlı ağırlık artışının olduğu görüldü. Grupların karaciğer nispi ağırlıkları incelendiğinde kontrol grubu ile OTA grubu arasında anlamlı farklılığın olmadığı belirlenirken, bu gruplarla karşılaştırıldığında OTA + folik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında anlamlı bir azalma olduğu belirlendi ($P<0,001$). Sağ ve sol böbrek nispi ağırlıkları değerlendirildiğinde kontrol grubu ile OTA ve OTA + ellajik asit grupları arasında $P<0,001$ düzeyinde anlamlı azalma tespit edilmiştir.

Çalışma sonucunda yapılan değerlendirmede ALT ve AST değerlerinin kontrol grubuna göre OTA, ellajik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi ($P<0,001$). ALP değerinin ise kontrol grubuna kıyasla yalnızca ellajik asit grubunda yükseldiği belirlendi ($P<0,001$). Çalışmamızda kreatinin düzeyi ve GGT aktivitesinde gruplar arasında anlamlı farklılığın olmadığı görüldü. Üre düzeyinin ise kontrol ve OTA gruplarına kıyasla OTA + folik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi ($P<0,001$).

Çalışmamız sonucunda elde edilen verilere ve daha önceki çalışma sonuçlarına baktığımızda OTA uygulamasının canlı ağırlığa etkisinin olmadığını söyleyebiliriz. Tek başına OTA uygulaması sonucunda karaciğer dokusu nispi ağırlığı etkilenmedi. OTA uygulaması böbrek dokusu nispi ağırlığında anlamlı azalmaya ($P<0,001$) sebep oldu. OTA ile birlikte folik asit ve ellajik asit uygulaması karaciğer nispi ağırlığı üzerinde etkili olmuştur. OTA ile birlikte ellajik asit uygulaması ise böbrek nispi ağırlıklarını etkilemiştir. Bu durum bize kullanılan her kimyasalın çok yönlü değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Karaciğer ve böbrek dokularına ait biyokimyasal parametreler değerlendirildiğinde çalışmamız ile daha önceki çalışmalarda görülen farklılıklar OTA'nın uygulama süresi, uygulama dozu ve bireysel farklılıklardan ileri gelebilir.

Meki ve Hussein (2001), yapmış oldukları çalışmada, antioksidan ve serbest radikal temizleyici özelliklerine sahip melatoninin sıçanlarda OTA uygulaması tarafından indüklenen oksidatif stres üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla her biri 15 erkek *Sprague Dawley* türü sıçandan oluşan dört grup kullanılmıştır. Gruplar kontrol, melatonin (5 mg/kg) uygulanan sıçanlar, OTA (250 µg/kg) uygulanan sıçanlar, OTA + melatonin uygulanan

sıçanlar olarak düzenlenmiş ve 4 haftalık uygulamadan sonra, bir lipit peroksidasyon ürünü olan MDA seviyeleri, serum ile karaciğer ve böbrek homojenatlarında ölçülmüştür. Ayrıca, karaciğer ve böbreklerde GSH seviyeleri ve glutatyon redüktaz (GR), GSPx, SOD, CAT ve GST aktiviteleri belirlenmiştir. OTA uygulanan sıçanlarda serum, karaciğer ve böbrekteki lipit peroksidaz seviyeleri, kontrollerdeki seviyelere kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. İstatistiksel analiz sonucunda OTA + melatonin uygulanan grup ile yalnızca OTA uygulanan grup karşılaştırıldığında serum ve dokulardaki lipit peroksidasyon seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Bu grupta serum ve dokulardaki lipit peroksidasyon seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak değişmemiştir. Bununla birlikte, hem karaciğer hem de böbrek dokularındaki GSPx, GR ve GST aktivitelerinin seviyeleri, kontrole kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Çalışmada oksidatif stresin OTA toksisitesi için önemli bir mekanizma olabileceği bildirilmiş ve melatoninin oksidatif hasarın inhibe edilmesi ve GST aktivitelerinin uyarılması yoluyla OTA toksisitesine karşı koruyucu bir etkiye sahip olacağı bildirilmiştir. Bu nedenle, okratoksikoz vakalarında melatoninin tedavi amacıyla klinik olarak uygulanması önerilmiştir.

Soyöz (2002), OTA (289 µg/kg/gün) uygulanan sıçanlarda, lipit peroksidasyon ürünlerinin ve GSH-px seviyesinin, karaciğer ve serumda anlamlı şekilde arttığını tespit etmiştir. Serumda ise CAT seviyesinin anlamlı derecede arttığını (P<0,01), SOD seviyesinin ise anlamlı derecede azaldığını (P<0,004) bulmuştur. OTA + melatonin (289 µg/kg/gün + 10 mg/kg/gün) verilen deney grubunda, yalnız OTA uygulanan sıçanlara göre, lipit peroksidasyon ürünlerinin karaciğerde azaldığı ve serumda arttığı gösterilmiştir. OTA ve OTA + melatonin grupları karşılaştırıldığında, OTA + melatonin grubunda karaciğerde ve serumda SOD, CAT, GSH-Px seviyeleri düşük bulunmuş, fakat sadece serumdaki SOD azalması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0,001). Sonuçta OTA'nın karaciğerde yapısal doku hasarına yol açtığını, melatoninin ise antioksidan savunma sistemini destekleyerek ve / veya radikal süpürücü etkisi ile hasar oluşumunu en aza indirdiğini bildirmişlerdir.

Abbas ve ark (2012) OTA'nın 70, 140 ve 210 µg/kg/gün dozlarını 20 gün uyguladıkları çalışmada OTA'ya maruz kalan grupların GSH serum konsantrasyonunun OTA'ya maruz kalmasından 10 ve 20 gün sonra arttırmasıyla, artan OTA dozlarıyla orantılı olduğunu bildirmişlerdir.

Palabıyık ve ark (2013) yapmış oldukları çalışmada likopenin OTA'nın renal toksik etkilerine karşı olası koruyucu etkisini araştırmak için *Sprague Dawley* cinsi erkek sıçanlara (<200 g, n=6) 14 gün boyunca sonda ile OTA (0.5 mg/kg/gün) ve / veya likopen (5

mg/kg/gün) uygulamışlardır. Biyokimyasal parametreler ve renal antioksidan selenoenzimlerin [glutation peroksidaz 1 (GPx1), tioredoksin redüktaz (TrxR)], CAT, SOD aktivitelerini; GSH ve MDA seviyelerini ölçmüşlerdir. OTA uygulaması sonucunda, sıçan böbreklerinde oksidatif stresin indüklendiğini, CAT aktivitesinde (%35) ve GSH seviyelerinde (%44) belirgin azalmaların olduğunu ve SOD aktivitesinde (%22) kontrol grubuna göre artış olduğunu tespit etmişlerdir. OTA ile yapılan likopen takviyesinin GPx1 aktivitesini ve GSH seviyelerini arttırdığını gözlemlemişlerdir. OTA'nın renal toksisitesinin altında yatan mekanizmalardan en az birinin oksidatif stres olduğunu bildirmişlerdir. Sonuçta, doğal antioksidan likopenin sıçanlarda OTA kaynaklı nefrotoksisite ve oksidatif strese karşı kısmen koruyucu olabileceğini belirtmişlerdir.

Qi ve ark (2014), yapmış oldukları çalışmada oksidatif stres ile OTA'nın indüklediği renal kanserojenite arasındaki ilişkiyi netleştirmek için 6 - 7 haftalık erkek F344 sıçanlarına 4 - 13 hafta boyunca 70 ve 210 µg/kg dozda OTA uygulamışlar. OTA memelilerde nefrotoksisite ve renal kanserojenlik göstermiş, ancak oksidatif stres ile bu toksisiteler arasındaki ilişkiyi detaylandıran açık mekanizmalar tanımlanamamıştır. OTA'nın 13 hafta boyunca uygulandığı sıçanlarda böbrek dokusunun ciddi şekilde hasar gördüğü, fakat karaciğerdeki ve böbrekteki oksidatif stres seviyesini önemli ölçüde değiştirmedeği bildirilmiştir. Sonuç olarak OTA'nın 13 hafta içinde belirgin böbrek hasarına neden olduğu, ancak oksidatif stres parametrelerini sınırlı bir şekilde etkilediği belirtilmiştir.

Yılmaz ve ark (2018) yapmış oldukları çalışmada, sıçanlarda antioksidan savunma sistemlerini ve lipid peroksidasyonunu değerlendirerek, böbrek ve kalpte likopenin aflatoksin B1'in toksik etkilerine karşı koruyucu etkilerini araştırmayı amaçlamışlardır. Bu kapsamda 42 sağlıklı üç aylık erkek *Wistar albino* sıçan (n=7) kullanılmıştır. Çalışmada gruplar şu şekilde düzenlenmiştir: kontrol grubu, likopen (5 mg/kg/gün, 15 gün oral) grubu, aflatoksin B1 (0,5 mg/kg/gün, 7 gün oral) grubu, aflatoksin B1 (1.5 mg/kg/gün 3 gün oral) grubu, aflatoksin B1 (0,5 mg/kg/gün, 7 gün oral) + likopen (5 mg/kg/gün, 15 gün oral) grubu ve aflatoksin B1 (1,5 mg/kg/gün, 3 gün oral) + likopen (5 mg/kg/gün, 15 gün oral) grubu. Aflatoxine maruz kalan sıçanlarda, antioksidan enzimlerin ve enzimatik olmayan antioksidan sistemin aktivitelerinde, kontrol grubuna kıyasla anlamlı azalmanın, aflatoksin kaynaklı böbrek ve kalp hasarı sırasında gözlenen MDA seviyelerinin artmasından sorumlu olabileceği belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre likopenin, aflatoksin kaynaklı nefrotoksisiteye karşı koruma gösterdiği bildirilmiştir.

ROT'ne karşı ilk savunma hattını oluşturan, O₂⁻ radikalini H₂O₂ ve O₂'ye katalizleyen SOD, bakır ve çinko içeren enzimatik bir antioksidandır. H₂O₂ daha sonra, CAT ya da GPx ile

ortamdan uzaklaştırılır (Young ve Woodside, 2001). Çalışmamızın sonuçları değerlendirildiğinde karaciğer dokusu SOD düzeyinde kontrol grubuna kıyasla OTA grubunda anlamlı bir değişiklik bulunmadı. Bununla beraber kontrol ve OTA grupları ile karşılaştırıldığında OTA + folik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında anlamlı bir azalma gözlemlendi (P<0,001). Buna karşılık böbrek SOD düzeyinde kontrol grubuna kıyasla OTA grubunda anlamlı bir azalma bulunmasına rağmen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında OTA + folik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında anlamlı bir fark bulunamadı. Bu anlamlı artışın kontrol grubu seviyesinde ve hatta üstünde olduğu gözlemlendi. Serum SOD düzeyine bakıldığında kontrol grubuna kıyasla OTA grubunda anlamlı bir azalma tespit edildi. OTA + folik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında ise SOD düzeyinin kontrol ve OTA grubuna kıyasla anlamlı olarak yükseldiği belirlendi (P<0,001). SOD aktivitesindeki bu anlamlı artışlar OTA'ya bağlı oksidatif strese bağlı ortaya çıkan O_2^- 'nin aşırı üretimi olabilir. OTA'nın SOD moleküllerinde bakır ve çinko ile etkileşime girip ve enzim aktivitesinin inhibisyon yaratmasının mümkün olabileceği bildirilmiştir (Meki ve Hussein, 2001). SOD aktivitesi açısından yapılan değerlendirmede folik asit ve ellajik asidin böbrekler ve serum kan değerleri üzerinde olumlu bir sonuç gösterdiği söylenebilir.

CAT, SOD aktivitesi sonucunda oluşmuş olan H_2O_2 'nin H_2O ve O_2 'ye ayrılmasını katalize eder (Scicchitano ve ark, 2018). Karaciğer dokusu CAT aktivitesine bakıldığında kontrole kıyasla OTA + ellajik asit grubunda ve OTA grubu ile karşılaştırıldığında OTA + folik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında anlamlı azalış tespit edildi (P<0,01). Böbrek dokusunda ise CAT aktivitesinde OTA grubuna kıyasla OTA + folik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında anlamlı artış bulundu (P<0,05). Plazma CAT aktivitesi incelendiğinde bulunan anlamlı farklılığın (P<0,05) folik asit grubundan ileri geldiği görülmektedir. OTA uygulaması ile CAT aktivitesindeki azalma, bu enzimin aktivitesi için gerekli olan temel elementin emilimindeki azalmayı yansıtabileceği ileri sürülmüştür (Meki ve Hussein, 2001). CAT aktivitesi değerlendirildiğinde kullanılan antioksidan maddelerin böbrek dokusunda olumlu sonuçlara neden olduğu ifade edilebilir.

Antioksidan enzim aktivitelerindeki ve doku GSH konsantrasyonlarındaki belirgin değişiklikler dokuların oksidatif hasarlarına neden olmaktadır. Karaciğer dokusu GSH seviyesinde kontrol grubuna kıyasla OTA, OTA + folik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında anlamlı azalma tespit edildi (P<0,01). Böbrek dokusu GSH düzeylerine bakıldığında kontrol grubuna göre özellikle OTA grubunda anlamlı bir azalma görüldü. OTA + folik asit grubu ile OTA + ellajik asit grubunda kontrol ve OTA grubuna kıyasla anlamlı bir artış görüldü (P<0,001). Plazma GSH aktivitesinde kontrol ve OTA gruplarına kıyasla OTA + folik asit ve

OTA + ellajik asit grubunda anlamlı artış bulundu. OTA uygulamasının GSH oranını önemli ölçüde azalttığı ve GSH seviyelerindeki azalmanın, toksinin, biyotransformasyona girdikten ve reaktif bir ara madde oluşturduktan sonra GSH ile kovalent reaksiyona girme kabiliyetinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Dai ve ark, 2002). GSHpx aktivitesindeki bu düşüş, OTA'nın kofaktör olan selenyum emilimiyle etkileşimi nedeniyle selenyum seviyelerinin düşmesine bağlı olabileceği bildirilmiştir (Meki ve Hussein, 2001). GSH düzeyleri incelendiğinde kullanılan folik asit ve ellajik asitin böbrek dokusu üzerinde olumlu etkilere yol açtığı söylenebilir. Ayrıca ellajik asitin plazma GSH seviyesini olumlu yönde etkilediği görülmüştür.

Lipit peroksidasyonu, oluşan serbest radikal varlığı ile membrandaki poliansatüre yağ asitleri zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ve bu yağ asidi zincirinin lipit radikal (L[•]) özelliği kazanması ile başlamaktadır. Dayanaksız ve bir dizi değişikliğe uğrayan lipit radikalının moleküler oksijenle reaksiyonundan lipit peroksit radikali oluşmaktadır (LOO[•]). Lipit peroksit radikalının membrandaki poliansatüre yağ asitleriyle yeni lipit radikalleri oluşturarak bir yandan kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarıyla lipit hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşürler. Bu şekilde reaksiyonlar kendi kendini katalizleyerek devam eder (Lobo ve ark, 2010). Geçiş metalleri LOOH'ni yıktığında çoğu aktif olan aldehitler oluşmakta ve bu oluşan aldehitler ya hücrede metabolize olmakta ya da hücre hasarına sebep olmaktadır. Lipit peroksidasyonu sonucu açığa çıkan MDA üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu olmakla birlikte lipit peroksitlerinin ölçülmesinde çoğunlukla kullanılmaktadır (Akkuş, 1995). Otokatalitik işlemlerle hücre hasarına ve ölüme neden olan lipit peroksidasyonu; kanser ve iltihaplanma gibi alanlarda peroksidatif doku hasarına neden olabilmektedir (Bartsch ve Nair, 2006). MDA, serbest radikallerin hücre zarında oluşturduğu lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden biridir ve lipit peroksidasyonunun derecesini tahmin etmek için yaygın olarak kullanılan analizlerden biridir (Tsikas, 2017; Yılmaz ve ark, 2018). OTA ile muamele edilmiş hücrelerde artan MDA içeriği, proteinler ve lipitler gibi biyolojik makromoleküllere zarar verebilir. Bu nedenle, artmış ROT ve lipit peroksidasyonu ile azalmış GSH'ın, OTA'nın oksidatif strese neden olduğunun göstergesi olabileceği bildirilmiştir (Lee ve ark, 2018). Bir oksidan parametre olan MDA düzeylerine bakıldığında karaciğer dokusunda kontrol grubuna kıyasla OTA grubunda anlamlı artış görüldü. OTA + folik asit grubu ile OTA + ellajik asit grubunda kontrol ve OTA gruplarına kıyasla anlamlı azalma tespit edildi (P<0,001). Böbrek dokusunda da MDA düzeyi OTA uygulanan grupta kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Fakat OTA + folik asit uygulanan grupta MDA düzeyi kontrol ve OTA gruplarına göre anlamlı farklılık

göstermezken, OTA + ellajik asit uygulanan grupta OTA uygulanan gruba göre anlamlı bir azalma görüldü. Hatta bu azalmanın kontrol grubu seviyelerinde olduğu belirlendi. Serum MDA seviyesi incelendiğinde OTA uygulanan grubun MDA seviyesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğu bulundu ancak; OTA + folik asit ve OTA + ellajik asit gruplarında gözlenen düşüşün kontrol ve OTA gruplarına göre anlamlı olmadığı belirlendi. Karaciğer ve böbrek dokusu ile serum MDA seviyelerine göre folik asitin karaciğer dokusu üzerinde, ellajik asitin ise hem karaciğer hem de böbrek dokusu üzerinde etkili olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışmada elde edilen oksidan / antioksidan parametre sonuçları folik asit ve ellajik asitin özellikle nefrotoksik olduğu bilinen OTA'nın olumsuz oksidatif etkilerine karşı etkili olduğunu göstermektedir.

Grosse ve ark (1997) 7 haftalık erkek farelere gavaj yolu ile 2 mg/kg OTA uygulamasından önce 7 gün boyunca süperoksit anyon temizleyicileri olduğu bilinen retinol (A), askorbik asit (C) ve α -tokoferol (E) uygulayarak verilmiş ve bu vitaminlerin OTA genotoksitesisi üzerindeki etkilerini incelemiş ve farelerde E vitamininin böbreklerde DNA eklentilerini % 80, A vitamininin % 70 ve C vitamininin % 90 azalttığını belirtmişlerdir.

Aydın ve ark (2013) yapmış oldukları çalışmada likopenin sıçan dokularında OTA'nın genotoksitesine karşı alkali comet yöntemi kullanılarak olası koruyucu etkilerini erkek *Sprague Dawley* sıçanlarını kullanarak araştırmışlardır. OTA (0,5 mg/kg/gün) 14 gün boyunca gavajla uygulanırken, son 7 gün ve 14 gün boyunca OTA ile beraber likopen (5 mg/kg/gün) uygulanmıştır. OTA kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk yoğunluğunda, böbrek ve karaciğer hücrelerinde kontrole göre belirgin bir anlamlı artışa neden olmuş, ancak lenfositlerde ilgili parametreler açısından herhangi bir değişime neden olmamıştır. Tek başına likopen uygulaması, lenfositler ile böbrek ve karaciğer hücrelerinin DNA'larında bir değişiklik sağlamamıştır. Bununla birlikte, renal ve hepatik hücrelerde OTA'ya maruz kalma ile 7 ve 14 gün boyunca likopen uygulanması kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk yoğunluğunda yalnızca OTA uygulanan gruba kıyasla anlamlı azalmaya yol açmıştır. Likopenin 14 günlük takviyesinin, özellikle hepatik hücelere karşı daha koruyucu olduğu belirlenmiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre, likopenin karaciğer ve böbrek dokusunu OTA'nın neden olduğu DNA hasarından koruyabileceğini belirtmişlerdir.

Rasic ve ark (2018) DNA ve lipidlerin oksidatif hasarı ile GSH konsantrasyonunun yanı sıra resveratrolün olası antioksidan etkilerini *in vivo* olarak incelemek amacı ile yapmış oldukları çalışmada erkek yetişkin *Wistar albino* sıçanlara, 21 gün boyunca OTA (0,125 ve 0,250 mg/kg/gün), resveratrol (20 mg/kg/gün), 2 gün sitrinin (20 mg/kg/gün) ve bunların

kombinasyonlarını oral olarak uygulamışlardır. Böbrek ve karaciğerde resveratrol tarafından tersine çevrilemeyen oksidatif DNA hasarını OTA + sitrinin uygulanmış ve OGG1 (8-oksoguanin DNA N-glikosilaz 1) ile modifiye edilmiş hayvanlarda comet yöntemini kullanarak bulmuşlardır. OTA'nın, böbrekteki GSH'yi düşürdüğünü ve böbrek ve karaciğer dokularındaki MDA'yı arttırdığını bulmuşlardır. Resveratrolün tüm dokularda GSH konsantrasyonlarını arttırdığını ve sadece karaciğerde MDA konsantrasyonunu azalttığını bulmuşlardır. Oksidatif stresin OTA toksisitesinde rol oynadığını bildirmişlerdir. Resveratrolün, tüketilen GSH'yi tüm dokularda restore etmede etkili olduğu, ancak MDA konsantrasyonu ve DNA hasarı üzerinde etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

ROT aşırı üretimi lipitleri, proteinleri ve nükleik asitleri etkiler, ancak hücreler buna karşı çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan savunma biçimleri geliştirir. ROT ve DNA arasındaki etkileşim, 8-hidroksideoksiguanozinin (8-OHdG) en sık olduğu pürin ve pirimidin bazlarının oksidasyonu ile sonuçlanır (Rose ve ark, 2012; Rasic ve ark, 2018). Bu çalışma ile alkali comet yöntemi kullanılarak folik asit ve ellajik asitin sıçan lenfositlerinde OTA'nın genotoksitesine karşı etkili olup olmadıkları araştırıldı. Yapmış olduğumuz çalışmadan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde OTA uygulanan gruplarda kuyruk momentleri ve kuyruk yoğunluğu parametrelerinde kontrol grubuna göre anlamlı artış olduğu görüldü. OTA + folik asit uygulanan grupta bu iki parametrenin sonuçları OTA grubuna kıyasla anlamlı bulunmazken, OTA + ellajik asit uygulanan gruplarda kuyruk momentleri ve kuyruk yoğunluğu değerleri anlamlı olarak düşük ($P < 0,001$) bulundu. Bu durum bize OTA'nın DNA üzerindeki zararlı etkilerine karşı ellajik asitin etkili olabileceğini gösterdi.

Mally ve ark (2005) yapmış oldukları çalışmada OTA'nın 0, 0,25, 0,5, 1 ve 2 mg/kg/gün dozda haftanın 5 günü erkek F344 sıçanlarına ($n = 3$), 2 hafta süreyle oral gavaj yoluyla uygulamışlardır. Hem plazmada hem de karaciğer ve böbrek dokularında doza bağlı olarak OTA yoğunluğunda artış olduğunu belirtmişlerdir. Plazma OTA konsantrasyon değerlerini artan doz sırasına göre 0,008 nmol/ml, 9,29 nmol/ml, 16,08 nmol/ml, 41,61 nmol/ml, 101,78 nmol/ml şeklinde belirtmişlerdir.

Çalışmamızda plazma OTA konsantrasyon değerine bakmamızdaki amaç, uygulanan dozlarda OTA toksikasyonu oluşturup oluşturamadığımızı değerlendirebilmektir. Çalışma sonucunda serum OTA seviyesinin OTA uygulanan gruplarda uygulanmayan gruplara kıyasla anlamlı bir şekilde yükseldiği fakat OTA uygulanan diğer deneysel gruplar arasında anlamlı farklılığın olmadığı belirlendi. Yapılan değerlendirme sonucunda OTA uygulamasının serum konsantrasyon seviyesini arttırdığı görüldü. Burada bizim için düşündürücü olan durum OTA uygulanmayan gruplarda da OTA'ya rastlanmasıdır. Ancak Mally ve ark (2005) da OTA

uygulanmayan grupta, plazmada OTA varlığına rastlamışlardır. OTA uygulanmamış olan hayvanların kan örneklerinde OTA'nın bulunması hava yolu ile bulaşabileceği konusunun göz önünde bulundurulması gerektiğini göstermektedir. Yine verilerin daha sağlıklı elde edilebilmesi için, sıçanların beslenmesinde kullanılan yemlerin de OTA veya diğer mikotoksinler açısından değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mikotoksinler, çok çeşitli gıdalar ve yemlerde ortaya çıkarak insan ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara neden olurlar. Mikotoksinlere maruziyet merkezi sinir sistemi, kardiyovasküler sistem, pulmoner sistem ve beslenme sistemi üzerinde çeşitli zararlı etkilerden ölüme kadar değişen hem akut hem de kronik toksisiteye sebep olabilir. Mikotoksinler ayrıca kanserojen, mutajeni, teratojen veya immünosupresif olabilir. Bazı mikotoksinlerin immün yanıtı tehlikeye atması ve sonuçta bulaşıcı hastalığa karşı direnci azaltması, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, mikotoksinlerin en önemli etkisi olarak kabul edilmektedir (FAO, 2001).

OTA toksisitesi çeşitli mekanizmalara dayanmaktadır. Bunlar içerisinde protein sentezinin inhibe edilmesi, lipid peroksidasyonu, mitokondriyal solunumun engellenmesi, kalsiyum homeostazının bozulması ve DNA hasarının bozulması yer almaktadır. Yapılmış olan birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışmada OTA toksisitesinin yol açtığı hasarda oksidatif stresin etkisiyle ilgili kanıtlar bulunmuştur. OTA maruziyeti sonucunda oluşan serbest radikallerin olumsuz etkilerini önlemek amacıyla farklı farklı antioksidanların kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar bizlere OTA maruziyetiyle ortaya çıkabilecek olumsuz etkilerin diyetle beraber alınacak antioksidanlar aracılığı ile azaltılabileceğini göstermektedir.

Bu çalışma OTA'nın yol açtığı oksidatif hasarın önlenmesinde, güçlü antioksidan özellikleri bulunan folik asit ve ellajik asidin etkili olabileceklerini gösterdi. Comet metodu kullanılarak OTA'nın genotoksik etkisi ve bu genotoksik etki karşısında ilgili antioksidanların antigenotoksik özelliklerinin olup olmadığı belirlendi. Özellikle ellajik asidin OTA'nın sebep olduğu genotoksikite üzerinde etkili olabileceği bulundu. Çalışma sonuçları, insanların ve hayvanların sağlığına zararı bulunmayan, uygulanacak tedavi yaklaşımlarında iyileştirme özelliği fazla, ekonomik ve ulusal kaynaklı yeni koruyucu farmakolojik maddelerin geliştirilmesine ciddi katkıda bulunabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abbas DA, Faraj MK, Abed AR.** Some biochemical and histopathological effects of different oral doses Ochratoxin A in male rats. *Proceeding of the Eleventh Veterinary Scientific Conference* 2012, 182-189.
- Aebi H.** Catalase *in vitro* assay methods. *Methods in Enzymology* 1984, 105, 121-126.
- Akbar S, Anwar A, Kanwal Q.** Electrochemical determination of folic acid: A short review. *Analytical Biochemistry* 2016, 510, 98-105.
- Akkuş İ.** Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Basım Yayım ve Dağıtım, Konya, 1995.
- Alvarez L, Gil AG, Ezpeleta O, García-Jalón JA, López de Cerain A.** Immunotoxic effects of Ochratoxin A in Wistar rats after oral administration. *Food and Chemical Toxicology* 2004, 42(5), 825-834.
- Anfossi L, Giovannoli C, Baggiani C.** Mycotoxin detection. *Current Opinion in Biotechnology* 2016, 37, 120-126.
- Arslanbaş E, Baydan E.** Domuzlarda Yaygın Görülen Zehirlenmeler: 1. Mikotoksin Zehirlenmeleri. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi* 2010, 81(1), 9-12.
- Atherstone C, Grace D, Waliyar F, Lindahl J, Osiru M.** Aflatoxin Literature Synthesis and Risk Mapping: Special Emphasis on Sub-Saharan Africa. *International Livestock Research Institute* 2014, 1-104.
- Aydın S, Palabıyık SS, Erkekoğlu P, Şahin G, Başaran N, Giray BK.** The carotenoid lycopene protects rats against DNA damage induced by Ochratoxin A. *Toxicon* 2013, 73, 96-103.
- Bailey LB, Rampersaud GC, Kauwell GPA.** Folic acid supplements and fortification affect the risk for neural tube defects, vascular disease and cancer: Evolving Science. *The Journal of Nutrition* 2003, 133, 1961-1968.

Bankole S, Adebajo A. Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it. *African Journal of Biotechnology* 2004, 2, 254-263.

Bartsch H, Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbeck's Archives of Surgery* 2006, 391, 499-510.

Baudrimont I, Betbeder AM, Gharbi A, Pfohl-Leszkowicz A, Dirheimer G, Creppy EE. Effect of superoxide dismutase and catalase on the nephrotoxicity induced by subchronical administration of ochratoxin A in rats. *Toxicology* 1994, 89(2), 101-111.

Bayman P, Baker JL. Ochratoxins: A global perspective. *Mycopathologia* 2006, 162, 215-223.

Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 2003, 16(3), 497-516.

Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1963, 61, 882-888.

Bianchini A, Horsley R, Jack MM, Kobielush B, Ryu D, Tittlemier S, Wilson WW, Abbas HK, Abel S, Harrison G, Miller JD, Shier WT, Weaver G. DON Occurrence in Grains: A North American Perspective. *Cereal Food World* 2015, 60(1), 32-56.

Binder ME. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology* 2007, 133, 149-166.

Bocharova TP, Chernozemsky IN, Castegnaro M. Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. *Food Additives and Contaminants* 1988, 5, 299-301.

Brase S, Encinas A, Keck J, Nising CF. Chemistry and Biology of Mycotoxins and Related Fungal Metabolites. *Chemical Reviews* 2009, 109, 3903-3990.

CAST. Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA, 2003.

CDC. Outbreak of aflatoxin poisoning-eastern and central provinces, Kenya, *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2004, 53(34), 790-793.

Conover WJ. Practical Nonparametric Statistics 2 nd ed, John Wiley and Sons, New York 1980, 229-239.

Coronel MB, Sanchis V, Ramos AJ, Marin S. Ochratoxin A: Presence in Human Plasma and Intake Estimation. *Food Science and Technology International* 2010, 16(1), 5-18.

Creppy E, Schlegel M, Rösenthaller R, Dirheimer G. Preventive action of phenylalanine on acute intoxication of ochratoxin-A. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* 1979, 289(13), 915-918.

Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* 2002, 127, 19-28.

Dai J, Park G, Wright MW, Adams M, Akman SA, Manderville RA. Detection and characterization of a glutathione conjugate of ochratoxin A. *Chemical Research in Toxicology* 2002, 15, 1581-1588.

Darwish WS, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Ishizuka M. An overview on mycotoxin contamination of foods in Africa. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2014, 76, 789-797.

Dikilitaş M, Koçyiğit A. Canlılarda “tek hücre jel elektroforez” yöntemi ile DNA hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 2010, 14(2), 77-89.

Diplock, A. Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. *ILSI Europe Concise Monograph Series* 1998, 59.

Dirheimer G, Creppy EE. Mechanism of action of ochratoxin A. *IARC Scientific Publications* 1991, 115, 171-186.

Duarte SC, Pena A, Lino CM. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology* 2010, 27, 187-198.

Duthie SJ. Folic acid deficiency and cancer mechanisms of DNA instability. *British Medical Bulletin* 1999, 55(3), 578-592.

EFSA (European Food Safety Authority). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. *The European Food Safety Authority Journal* 2006, 365, 1-56.

Ekici L, Sağdıç O. Serbest radikaller ve antioksidan gıdalarla inhibisyonu. *Gıda* 2008, 33(5), 251-260.

European Commission (2010). Maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010R0105&from=EN> (30.03.2018)

FAO. Manual on the application of the HACCP system in Mycotoxin prevention and control. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, 2001.

Fung F, Clark RF. Health Effects of Mycotoxins: A Toxicological Overview. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* 2004, 42(2), 217-234.

Gagliano N, Donne ID, Torri C, Migliori M, Grizzi F, Milzani A, Filippi C, Annoni G, Colombo P, Costa F, Ceva-Grimaldi G, Bertelli AAE, Giovannini L, Gioia M. Early cytotoxic effects of ochratoxin A in rat liver: A morphological, biochemical and molecular study. *Toxicology* 2006, 225, 214-224.

Gazzali AM, Lobry M, Colombeau L, Acherar S, Azaïs H, Mordon S, Arnoux P, Baros F, Vanderesse R, Frochot C. Stability of folic acid under several parameters. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016, 93, 419-430.

Ginkel G, Sevanian A. Lipid peroxidation-induced membrane structural alterations. *Methods in Enzymology* 1994, 233, 273-288.

Girgin G, Başaran N, Şahin G. Dünyada ve Türkiye’de insan sağlığını tehdit eden mikotoksinler. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2001, 58(3), 97-118.

Green NS. Folic acid supplementation and prevention of birth defects. *The Journal of Nutrition* 2002, 132, 2356-2360.

Grosse Y, Chekir-Ghedira L, Huc A, Obrecht-Pflumio S, Dirheimer G, Bacha H, Pfohl-Leszkwicz A. Retinol, ascorbic acid and a-tocopherol prevent DNA adduct formation in

mice treated with the mycotoxins ochratoxin A and zearalenone. *Cancer Letters* 1997, 114, 225-229.

Halász A, Lásztity R, Abonyi T, Bata Á. Decontamination of Mycotoxin-Containing Food and Feed by Biodegradation. *Food Reviews International* 2009, 25, 284-298.

Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine* 1991, 91(3), 14-22.

Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 2001, 167, 101-134.

Ji C, Fan Y, Zhao L. Review on biological degradation of mycotoxins. *Animal Nutrition* 2016, 2, 127-133.

Kaaya AN, Kyamuhangire W, Kyamanywa S. Factors affecting aflatoxin contamination of harvested maize in the three agroecological zones of Uganda. *Journal of Applied Sciences* 2006, 6, 2401-2407.

Kamp HG, Eisenbrand G, Janzowski C, Kiossev J, Latendresse JR, Schlatter J, Turesky RJ. Ochratoxin A induces oxidative DNA damage in liver and kidney after oral dosing to rats. *Molecular Nutrition & Food Research* 2005, 49, 1160-1167.

Kandemir H, Abuhandan M, Aksoy N, Savik E, Kaya C. Oxidative imbalance in child and adolescent patients with obsessive compulsive disorder. *Journal of Psychiatric Research* 2013, 47, 1831-1834.

Karabulut H, Gülay MŞ. Serbest Radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2016, 4(1), 50-59.

Kaya S. Mikotoksinler. In: Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji (Baskı 2), Kaya S, Piriççi İ, Bilgili A, (Eds), Medisan, Ankara, 2002, s 537-573.

Klaunig JE, Wang Z. Oxidative stress in carcinogenesis. *Current Opinion in Toxicology* 2018, 7, 116-121.

Kodeks Alimentarius (2015). General standard for contaminants and toxins in food and feed. file:///C:/Users/asus/Downloads/CXS_193e_2015%20(1).pdf (30.03.2018)

Lee HJ, Pyo MC, Shin HS, Ryu D, Lee K. Renal toxicity through AhR, PXR, and Nrf2 signaling pathway activation of ochratoxin A-induced oxidative stress in kidney cells. *Food and Chemical Toxicology* 2018, 122, 59-68.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 2010, 4(8), 118-126.

Luck H. Catalase: In methods of enzymatic analysis. Bergmeyer HU, (Ed), Academic Press New York, USA, 1965, 885-894.

Luo Y, Liu X, Li J. Updating techniques on controlling mycotoxins - A review. *Food Control* 2018, 89, 123-132.

Lykkesfeldt J, Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal* 2007, 173, 502-511.

Malini P, Kanchana G, Rajadura M. Antidiabetic efficacy of ellagic acid in streptozotocin-induced diabetes mellitus in albino wistar rats. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 2011, 4(3), 124-128.

Malir F, Ostry V, Pfohl-Leszkowicz A, Malir J, Jakub Toman J. Ochratoxin A: 50 Years of Research. *Toxins* 2016, 8, 191-240.

Mally A, Wolfgang Völkel W, Amberg A, Kurz M, Wanek P, Eder E, Hard G, Dekant W. Functional, Biochemical, and Pathological Effects of Repeated Oral Administration of Ochratoxin A to Rats. *Chemical Research Toxicology* 2005, 18, 1242-1252.

Mandal S, Yadav S, Nema, RK. Antioxidants: A review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2009, 1(1), 102-104.

Mantle PG, Nagy JM. Binding of ochratoxin a to a urinary globulin: A new concept to account for gender difference in rat nephrocarcinogenic responses. *International Journal of Molecular Science* 2008, 9, 719-735.

Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, V. Sanchis V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology* 2013, 60, 218-237.

Matrella R, Monaci L, Milillo MA, Palmisano F, Tantillo MG. Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples from swines slaughtered in southern Italy. *Food Control* 2006, 17, 114-117.

Meki AMA, Hussein A. Melatonin reduces oxidative stress induced by ochratoxin A in rat liver and kidney. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 2001, 130, 305-313.

Mitchell HK, Snell EE, Williams RJ. The concentration of "folic acid". *Journal of the American Chemical Society* 1941, 63, 2284-2284.

Mohammadi A, Omrani L, Omrani LR, Kiani F, Eshraghian A, Azizi Z, Omrani GR. Protective effect of folic acid on cyclosporine-induced bone loss in rats. *Transplant International* 2012, 25, 127-133.

Nikolov IG, Bocharova TP, Castegnaro M, Leskiewicz AP, Gill C, Day N, Chernozemsky IN. Molecular and epidemiological approaches to the etiology of urinary tract tumors in an area with Balkan endemic nephropathy. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 1996, 15, 201-207.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979, 95(2), 351-358.

Omar RF, Rahimtula AD, Bartsch H. Role of cytochrome P450 in ochratoxin A stimulated lipid peroxidation. *Journal of Biochemical Toxicology* 1991, 6(3), 203-209.

Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1984, 123(1), 291-298.

Öğüt S. Doğal antioksidanların önemi. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 2014, 11(1), 25-30.

Öksüztepe G, Erkan S. Mikotoksinler ve halk sağlığı açısından önemi. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2016, 5(2), 190-195.

Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations* 2015, 6 (3), 331-336.

Padma VV, Selvi PK, Sravani S. Protective effect of ellagic acid against TCDD-induced renal oxidative stress: Modulation of CYP1A1 activity and antioxidant defense mechanisms. *Molecular Biology Reports* 2014, 41, 4223-4232.

Palabıyık SS, Erkekoğlu P, Zeybek DN, Kızılgün M, Baydar DE, Şahin G, Giray BK. Protective effect of lycopene against ochratoxin A induced renal oxidative stress and apoptosis in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2013, 65(6), 853-861.

Paterson RRM, Lima N. How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International* 2010, 43, 1902-1914.

Petzinger E, Ziegler K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2000, 23, 91-98.

Pfohl-Leszkowicz A, Petkova-Bocharova T, Chernozemsky IN, Castegnaro M. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Additives and Contaminants* 2002, 19, 282-302.

Pitkin RM. Folate and neural tube defects. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2007, 85, 285-288.

Pleadin J, Kovacevic D, Persi N. Ochratoxin A contamination of the autochthonous dry-cured meat product “Slavonski Kulen” during a six-month production process. *Food Control* 2015, 57, 377-384.

Plestina R, Ceovic S, Gatenbeck S, Habazin-Novak V, Hult K, Hökby E, Krogh P, Radic B. Human exposure to ochratoxin A in areas of Yugoslavia with endemic nephropathy. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 1990, 10, 145-148.

Qi X, Yu T, Zhu L, Gao J, He X, Huang K, Luo Y, Xu W. Ochratoxin A induces rat renal carcinogenicity with limited induction of oxidative stress responses. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2014, 280, 543-549.

Rached E, Hard GC, Blumbach K, Weber K, Draheim R, Lutz WK, Özden S, Steger U, Dekant W, Mally A. Ochratoxin A: 13-Week oral toxicity and cell proliferation in male F344/N rats. *Toxicological Sciences* 2007, 97(2), 288-298.

Ramsés García-Nino W, Zazueta C. Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. *Pharmacological Research* 2015, 97, 84-103.

Rasic D, Mladinic M, Zeljezic D, Pizent A, Stefanovic S, Milicevic D, Konjevoda P, Peraica M. Effects of combined treatment with ochratoxin A and citrinin on oxidative damage in kidneys and liver of rats. *Toxicon* 2018, 146, 99-105.

Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MNVR. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release* 2006, 113, 189-207.

Ringot D, Chango A, Schneider Y, Larondelle Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions* 2006, 159, 18-46.

Rocha MEB, Freire FCOF, Maia FEF, Guedes MIF, Rondina D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control* 2014, 36, 159-165.

Rose S, Melnyk S, Pavliv O, Bai S, Nick TG, Frye RE, James SJ. Evidence of oxidative damage and inflammation associated with low glutathione redox status in the autism brain. *Translational Psychiatry* 2012, 2, e134.

Ross JF, Belding H, Paegel BL. The development and progression of subacute combined degeneration of the spinal cord in patients with pernicious anemia treated with synthetic pteroylglutamic (folic) acid. *Blood* 1948, 3 (1), 68-90.

Rydberg B, Johanson JJ. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: DNA repair mechanisms, Hanawalt PC, Friedberg EC, C.F. Fox CF (eds), Academic Press, New York, 1978, s 465-468.

Sabuncuoğlu SA, Baydar T, Giray B, Şahin G. Mikotoksinler: Toksik etkileri, degradasyonları, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması. *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi* 2008, 28, 1, 63-92.

Schoots MH, Gordijn SJ, Scherjon SA, Goor H, Hillebrands J. Oxidative stress in placental pathology. *Placenta* 2018, 69, 153-161.

Scicchitano BM, Pelosib L, Sicaa G, Musarò A. The physiopathologic role of oxidative stress in skeletal muscle. *Mechanisms of Ageing and Development* 2018, 170, 37-44.

Scott PM. Biomarkers of human exposure to ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 2005, 22(1), 99-107.

Sforza S, Dall'Asta C, Marchelli R. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques / mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 2006, 25, 54-76.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 1988, 175(1), 184-191.

Škrjat S, Marčun R, Kern I, Šilar M, Šelb J, Fležar M, Korošec P. Systemic and airway oxidative stress in competitive swimmers. *Respiratory Medicine* 2018, 137, 129-133.

Sorrenti V, Giacomo CD, Acquaviva R, Barbagallo I, Bognanno M, Galvano F. Toxicity of ochratoxin A and its modulation by antioxidants: A review. *Toxins* 2013, 5, 1742-1766.

Soyöz M, Özçelik N, Kılınç İ, Altutaş İ. The effects of ochratoxin A on lipid peroxidation and antioxidant enzymes: a protective role of melatonin. *Cell Biology and Toxicology* 2004, 20, 213-219.

Soyöz M. Okratoksin A ve melatoninin ratlarda bazı serum ve karaciğer enzim düzeylerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Isparta 2002.

Steyn PS. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicology Letters* 1995, 82/83, 843-851.

Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry* 1988, 34(3), 497-500.

Sweeney MJ, Dabson ADW. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters* 1999, 175, 149-163.

Şener G, Yeğen BÇ. İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi* 2009, 22, 5-13.

Talaulikar V, Arulkumaran S. Folic acid in pregnancy. *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine* 2013, 23(9), 286-287.

Tanai E, Yafune A, Nakajima M, Hayashi SM, Nakane F, Itahahi M, Shibutani M. Ochratoxin A induces karyomegaly and cell cycle aberrations in renal tubular cells without relation to induction of oxidative stress responses in rats. *Toxicology Letters* 2014, 224, 64-72.

Tao Y, Xie S, Xu F, Liu A, Wang Y, Chen D, Pan Y, Huang L, Peng D, Wang X, Yuan Z. Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food and Chemical Toxicology* 2018, 112, 320-331.

Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Annals of Biochemistry* 1969, 27(3), 502-522.

Tsikakos D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry* 2017, 524, 13-30.

Tunali N. Funguslar ve Mikotoksinler. In: Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları (Genişletilmiş Baskı 2), Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını, 03. Bölüm, 13.kısım, Sim Matbaası, Ankara, 2000, s 522.

Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta* 2009, 632, 168-180.

Türel GY, Calapoğlu NŞ. Mikotoksinler ve moleküler düzeydeki etkileri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2017, 24(1), 24-28.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007, 39, 44-84.

Van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L, Scott DB, Theron JJ. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 1965, 205(976), 1112-1113.

Vettorazzi A, Delft JV, Cerain AL. A review on ochratoxin A transcriptomic studies. *Food and Chemical Toxicology* 2013, 59, 766-783.

Vettorazzi A, Gonzalez-Penas E, Lopez de Cerain A. Ochratoxin A kinetics: A review of analytical methods and studies in rat model. *Food and Chemical Toxicology* 2014, 72, 273-288.

Vila-Donat P, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ. A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food and Chemical Toxicology* 2018, 114, 246-259.

Vora A, Riga A, Dollimore D, Alexander KS. Thermal stability of folic acid. *Thermochimica Acta* 2002, 392-393, 209-220.

WEB_1. (2018). National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=442530. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ochratoxin_a#section=Top (31.03.2018).

WEB_2. (2018). Resmi Gazete. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-8-1.pdf> (30.03.2018).

WEB_3. (2017). National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=6037. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6037> (26.10.2017).

WEB_4. (2017). National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5281855. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281855> (09.11.2017).

WEB_5. (2017). DrugBank. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB08846> (09.11.2017).

WHO (World Health Organization) Safety evaluation of certain mycotoxins in food. *WHO Food Additives Series: 47* Geneva, 2001.

WHO-IARC (World Health Organization International Agency for Research on Cancer). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 1993, 56, 245-524.

Wills L. Treatment of “pernicious anaemia of pregnancy” and “tropical anaemia”. *The British Medical Journal* 1931, 1, 1059-1064.

Yılmaz S, Kaya E, Karaca A, Karataş Ö. Aflatoxin B₁ induced renal and cardiac damage in rats: Protective effect of lycopene. *Research in Veterinary Science* 2018, 119, 268-275.

Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology* 2001, 54, 178-186.

Zain ME. Impact of mycotoxins on human and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* 2011, 15, 129-144.

Zanic-Grubisic T, Zrinski R, Cepelak I, Petrik J, Radic B, Pepeljnjak S. Studies of ochratoxin A-induced inhibition of phenylalanine hydroxylase and its reversal by phenylalanine. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2000, 167, 132-139.

EKLER

Ek 1 (ADÜ-HADYEK KARARI)



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(ADÜ-HADYEK)



Aydın, 14 Ağustos 2015


Oturum : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2015 Yılı VIII. Oturumu
Sayı : 64583101/2015/090
Proje Başlığı : Okratoksin A toksikasyonunda folik asit ve ellajik asidin etkinliklerinin araştırılması
Proje Yürütücüsü : Murat BOYACIOĞLU
Proje Ekibi : Memduha ERZURUM

Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:

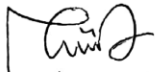
İnsan embriyosu ve fötüsü kullanılması
İnsan embriyosu ve fötüsü dokularının kullanılması
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması

Hayvan Çalışması : İnsanlarda araştırma
İnsan olmayan primatların kullanılması
Transgenik hayvanların kullanılması
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

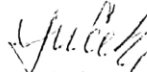
Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.


Prof. Dr. Turhan DOST
(Başkan)


İzinli


Prof. Dr. İbrahim CEMAL
(Üye)


Yrd. Doç. Dr. Cengiz ÜNSAL
(Üye)


Doç. Dr. Yücel KOÇA
(Üye)

İzinli
Vet. Hek. Ufuk SAYIN
(Üye)


Dr. Nurten ATALAY
(Üye)


Vet. Hek. Serdar AKTAŞ
(Üye)


Şevket AKYOL (Raportör)

Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : ERZURUM Memduha
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Kırşehir / 20.07.1985
Telefon : 05427354812
E-mail : memduhae@yahoo.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı	2020
Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı	2011
Lisans	Anadolu Üniversitesi Sağlık Kurumları İşletmeciliği	2013
Lisans	Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi İşletme Bölümü	2010
Lisans	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2008

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2009 - 2011	Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi	Eczacı
2011 - 2016	Yıldız Eczanesi	Uzman Eczacı
2016 - 2018	Aydın Yıldız Eczanesi	Uzman Eczacı
2018 - ...	Yıldız Eczanesi	Uzman Eczacı