

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN
AFLATOKSİKOZİSTE BALIN KORUYUCU ETKİSİNİN VE
ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN HİSTOPATOLOJİK,
İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE BİYOKİMYASAL OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Turan YAMAN
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Zabit YENER

VAN-2013

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN
AFLATOKSİKOZİSTE BALIN KORUYUCU ETKİSİNİN VE
ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN HİSTOPATOLOJİK,
İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE BİYOKİMYASAL OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Turan YAMAN
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Zabit YENER

VAN-2013

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL NİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KATLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN AFLATOKSİKOZİSTE
BALIN KORUYUCU ETKİSİNİN VE ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN
HİSTOPATOLOJİK, İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE BİYOKİMYASAL OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Turan YAMAN
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
DOKTORA TEZİ

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Harun ÖZER

Üye


Prof. Dr. Zabit YENER



Üye


Prof. Dr. İsmail ÇELİK

Üye

Prof. Dr. Semiha DEDE



Üye

Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ



TEZ KABUL TARİHİ

27. 11.2013

TEŞEKKÜR

Tez konusu seçiminden tezin bitimine kadar, çalışmalarımın her aşamasında deneyimlerinden ve bilgi birikiminden yararlandığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Zabit YENER'e, çalışma süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. İsmail ÇELİK, Doç. Dr. Fatma İLHAN, Yrd. Doç. Dr. Serkan YILDIRIM ve Yrd. Doç. Dr. Zafer ÖZYILDIZ'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince her türlü desteklerini esirgemeyen, sabırlı ve fedakâr aileme de sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	I
Teşekkür.....	II
İçindekiler.....	III
Simgeler ve Kısaltmalar	VI
Şekiller Listesi.....	VII
Tablolar Listesi.....	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Mikotoksinler.....	3
2.2. Aflatoksinler.....	6
2.2.1. Aflatoksinlerin genel özellikleri	7
2.2.2. Aflatoksinlerin toksikokinetiği	7
2.2.2.1. Aflatoksinlerin emilimi.....	8
2.2.2.2. Aflatoksinlerin dağılımı.....	8
2.2.2.3. Aflatoksinlerin atılımı.....	8
2.2.3. Aflatoksinlerin etki şekli ve metabolizması.....	9
2.2.3.1. Aflatoksikozis.....	11
2.2.3.2. Aflatoksinlerin karsinojenik etkileri.....	14
2.2.3.3. Aflatoksinlerin mutajenik etkileri.....	15
2.2.3.4. Aflatoksinlerin teratojenik etkileri.....	15
2.2.4. Aflatoksinlerin oluşumunu önleme ve detoksifikasyon yöntemleri.....	16
2.3. Bal.....	19

2.3.1. Balın bileşimi.....	19
2.3.1.1. Şekerler.....	19
2.3.1.2. Su.....	20
2.3.1.3. Organik asitler.....	20
2.3.1.4. Mineral maddeler.....	20
2.3.1.5. Enzimler.....	21
2.3.1.6. Proteinler ve aminoasitler.....	21
2.3.1.7. Vitaminler.....	22
2.3.2. Balın kullanım alanları ve yapılan araştırmalar.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Deney Hayvanları	26
3.2. Aflatoksinin Yeme Katılması.....	26
3.3. Kimyasallar.....	27
3.4. Deneme Şeması.....	27
3.5.Yapılan Analiz ve İncelemeler.....	27
3.5.1. Biyokimyasal analizler.....	27
3.5.2. Karaciğer enzimleri düzeylerinin analizi.....	28
3.5.3. İstatistiksel analizler.....	28
3.5.4. Histopatolojik incelemeler.....	28
3.5.5. İmmunohistokimyasal incelemeler.....	28
4. BULGULAR.....	30
4.1. Ratların Canlı Ağırlık Sonuçları.....	30
4.2. Biyokimyasal Bulgular.....	30
4.3. Makroskopik Bulgular.....	32

4.4. Histopatolojik Bulgular.....	32
4.4.1. Grup A (Kontrol).....	33
4.4.2. Grup B (AFB ₁)	33
4.4.3. Grup C (AFB ₁ + Bal)	34
4.4.4. İmmunohistokimyasal bulgular	36
4.4.5. Mikroskopik şekiller.....	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	46
5.1. Canlı Ağırlık Artışları	46
5.2. Biyokimyasal Sonuçlar	46
5.3. Makroskopik Bulgular	51
5.4. Histopatolojik Bulgular	51
5.5. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	55
ÖZET.....	59
SUMMARY.....	60
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

AF	: Aflatoksin
AFB ₁	: Aflatoksin B ₁
AFB ₂	: Aflatoksin B ₂
AFG ₁	: Aflatoksin G ₁
AFG ₂	: Aflatoksin G ₂
AFM ₁	: Aflatoksin M ₁
AFM ₂	: Aflatoksin M ₂
AFP	: Alpha-fetoprotein
ALT	: Alanin transaminaz
ASMA	: Alpha-smooth muscle actin
AST	: Aspatat transaminaz
CAT	: Katalaz
GGT	: Gama glutamil tranferaz
GR	: Glutathione redüktaz
GSH	: Glutathion
GST	: Glutation-S-transferaz
H.E	: Hematoksilen-eosin boyama
MDA	: Malondialdehid
SOD	: Süperoksit dismutaz

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Grup A (Kontrol): Karaciğerin normal histolojik görünümü. H. E. Bar=200µ	37
Şekil 2.	Grup B (AFB ₁): Geniş odaklar halinde hepatositlerde dejenerasyon ve nekroz. H. E. Bar=200µ.....	37
Şekil 3.	Grup B (AFB ₁): Hepatositlerde dejenerasyon ve nekroz. H. E. Bar=50µ.....	38
Şekil 4.	Grup B (AFB ₁): Hepatositlerde dejenerasyon ve megalositik hücreler. H. E. Bar=25µ.....	38
Şekil 5.	Grup B (AFB ₁): Normal safra kanalları (bitişik oklar) ve proliferatif safra kanalları (küçük oklar). H. E. Bar=50µ	39
Şekil 6.	Grup B (AFB ₁): İntrahepatik kolestazis (ince oklar) ve veziküler çekirdek (kalın ok). H. E. Bar=25µ.....	39
Şekil 7.	Grup C (AFB ₁ + Bal): Parankimde tek tük dejeneratif ve displazik hepatositler ile fokal dejeneratif hücre topluluğu (oklar). H. E. Bar=100µ....	40
Şekil 8.	Grup B (AFB ₁): Böbrek proksimal tubulus epitellerinde nekroz (ince oklar) ve megalositik tubul epitel hücresi (kalın ok) ile kapillar hiperemi. H. E. Bar=25µ.....	40
Şekil 9.	Grup B (AFB ₁): Tubul epitel hücrelerinde megalositozis (kalın oklar) ve hücre sitoplazmasında hiyalin damlacıkları (ince oklar). H. E. Bar=25µ.....	41
Şekil 10.	Grup C (AFB ₁ + Bal): Bazı proksimal tubul epitellerinde dejenerasyon ve nekroz. H. E. Bar=50µ.....	41
Şekil 11.	Grup B (AFB ₁): Peribronşiyal, peribronşiyoler ve perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu ile muskuler tabakada hiperplazi ve interalveoler septumlarda kalınlaşma. H. E. Bar=100µ.....	42
Şekil 12.	Grup A (Kontrol): ASMA negatif normal karaciğer dokusu. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen. Bar=100µ.....	42
Şekil 13.	.Grup B (AFB ₁): Dejeneratif ve nekrotik hücrelerin bulunduğu odaklarda ASMA pozitif immunreaksiyon. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen. Bar=50µ.....	43

Şekil 14.	Grup C (AFB ₁ + Bal): Periasiner bölgede dejeneratif ve nekrotik hücre odağında ASMA pozitif immunreaksiyon. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen. Bar=50µ.....	43
Şekil 15.	Grup A (Kontrol): CD68 pozitif Kupffer hücreleri (oklar). İmmunoperoksidaz-Hematoksilen. Bar=50µ.....	44
Şekil 16	Grup B (AFB ₁): CD68 pozitif kupffer hücreleri (oklar). İmmunoperoksidaz-Hematoksilen. Bar=50µ.....	44
Şekil 17.	Grup B (AFB ₁): Hepatositlerin sitoplazmasında alpha-fetoprotein antijenleri. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen. Bar=50µ.....	45

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	AFB ₁ ve balın ratlarda vücut ağırlığı üzerindeki etkileri.....	30
Tablo 2.	AFB ₁ ve balın ratlarda karaciğer enzim düzeyleri üzerindeki etkileri	30
Tablo 3.	AFB ₁ ve balın ratlarda antioksidan savunma sistemi ve çeşitli dokulardaki MDA içeriği üzerine etkileri.	31
Tablo 4.	AFB ₁ ve balın ratlarda karaciğer ile böbreklerdeki patolojik etkileri	35
Tablo 5.	AFB ₁ ve balın Kupffer hücre sayısı üzerine etkileri.	36

1. GİRİŞ

Aflatoksinler (AF), çok sayıda gıda ve yem maddelerinde kontaminant olarak bulunabilen, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* mantarları tarafından sekonder metabolit olarak üretilen bir grup mikotoksindir (Theumer ve ark., 2003). Bu toksinler çeşitli gıda ve yemlerin üretim, hasat, depolama ve işlenmesi sırasında mantarlar tarafından üretilir. İnsan ya da hayvanlar tarafından bu yem veya besinlerdeki metabolitlerin alınmasından sonra akut veya kronik toksikasyon ve kanser oluşabilmektedir (Robb, 1993). AFB₁ mikotoksinler içerisinde en yaygın formdur ve aynı zamanda toksinlerin en güçlü olanıdır. Ayrıca güçlü bir hepatotoksik ve hepatokarsinogeniktir (Eaton ve Gallagher, 1994). Hayvanlar ya da insanlar kontamine gıdaları tükettikleri zaman, AFB₁ karaciğerde metabolize edilir ve yüksek reaktif kimyasal araçlar ortaya çıkar. Bu araçlar DNA'da transkripsiyonun bozulmasına ve anormal hücre proliferasyonuna sebep olup mutagenesis ve karsinogenezisin oluşmasına neden olurlar (Theumer ve ark., 2003). AF'nin tüm dozları kanser riski için kümülatif etkiye sahiptir. AF özellikle az gelişmiş ülkelerin gıda hammadelerinde yaygın olarak bulunabilen bir kontaminanttır. Bu toksin, özellikle yetersiz beslenmenin fazla olduğu üçüncü dünya ülkelerinde yaşayan insanlarda karaciğer kanseriyle yakın ilişkilidir (Williams, 2004).

Mikotoksinler ile bulaşık hale gelmiş gıda ve yemler için tam bir detoksifikasyon yolu bilinmemektedir. Bu yüzden, mikotoksinleri ortadan kaldırmak için yeni yöntem arayışları sürekli devam etmektedir (Eaton ve Gallagher, 1994). Yemde bulunan AF'lerin detoksifikasyonu insan ve hayvan sağlığı ile ekonomik açıdan da gerekli ve önemli görülmektedir. Eliminasyonda kullanılan yöntemlerin başında, yemde bulunan AF'nin bazı kimyasal maddelerle bağlanarak etkisiz hale getirilmesi gelmektedir. Bunların yanı sıra çeşitli doğal bitkiler kullanılarak organ ve dokulardaki hasar oluşumunu en aza indirmeyi sağlamaktır (Karaman ve ark., 2005; Atalay, 2007; Yener ve ark., 2009). Günümüzde çeşitli medikal bitkiler, destekleyici tıbbi yardım olarak yaygın bir şekilde kullanılmakta ve "Alternatif Tıp" gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Dünya Sağlık Teşkilatı'nın (WHO) tahminlerine göre dünya üzerinde 20.000'den fazla bitki türü tıbbi maksatlı kullanılmaktadır (Wagner ve Fransworth, 1990). Kanser dünyada en önemli ölüm sebeplerinden biridir (Zhao ve ark., 1999). Bu

nedenle kanserin kimyasal bileşiklerle önlenmesi konusu geniş bir araştırma konusu olmaktadır. Bu amaçla doğal veya sentetik bazı kimyasal bileşiklerle kanser oluşumunun engellenmesi konusunda araştırmalar yapılmaktadır (Singh ve Lippman, 1998). Bunun yanı sıra meyve, sebze ve bazı medikal bitkilerin değişik kanser türlerinin önleminde etkili kimyasal bileşiklere sahip oldukları gösterilmiştir (Hong ve Sporn, 1997; Singh ve Lippman, 1998).

Doğal bal, arılar tarafından birçok bitkinin nektarından toplanarak hazırlanan olağan üstü bir sıvıdır. Tüm dünyada özellikle gastrointestinal sistem için alternatif tıbbın bir parçası olarak kabul edilmektedir. İnsanlarda balın gastrik ülser ve gastrointestinal bozukluklar üzerindeki etkinliği ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Haffejee ve Moosa, 1985; Ladas ve ark., 1995). Ayrıca, çalışmalar balın yara ve yanık iyileştirici, mide ülseri tedavisinde yararlı ve antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere de sahip olduğunu göstermiştir (Gheldof ve Engeseth, 2002). Ancak, tıbbi literatürde balın teröpatik etkilerine ilişkin kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Sunulan bu çalışma ile AFB₁ ile ratlarda oluşturulan aflatoksikoziste balın koruyucu etkinliği ve antioksidan rolü histopatolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal olarak araştırmak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinler

Mikotoksikozların varlığı insanlığın düzenli tarım üretimine başlamasından beri bilinmekle beraber, II. dünya savaşından sonra Rusya'da ortaya çıkan ve küflenmiş buğdayların yenmesine bağlı olarak insanlarda deri nekrozları, kanamalar, kemik iliği yıkımı ve lökopeni gözlenmesine sebep olan 'Alimentary Toxic Aleukia' ve Japonya'da görülen 'Sarı Pirinç' hastalıklarının çok sayıda ölümlere neden olması ile bu konunun önemi anlaşılmıştır (Ciegler, 1975). Bilinen ilk mikotoksikozis, çavdar ve diğer tahıl tanelerinde üreyen *Claviceps purpurea*'nın salgıladığı, hallusinogenil etkiye sahip ergot alkaloidinden kaynaklanan ve "Ergotizm" olarak adlandırılan mikotoksikozistir. Ülkemizde bu problem ilk defa 1967 yılında Kanada'ya ihraç edilen fındıkların geri çevrilmesi ile gündeme gelmiş, daha sonraki yıllarda da kuru incir gibi diğer ürünlerimizde de aflatoksin kontaminasyonunun olduğu belirlenmiştir (Başaran ve ark., 1986). Yine ülkemizde bulgur tüketiminin fazla olduğu bölgelerde karaciğerle ilgili tümör oluşumunun sıklığı dikkat çekmiş ve tüketilen bulgurların %31'inin sınır kabul edilen değerin üzerinde toksin içerdiği bildirilmiştir (Eser ve ark., 1978).

Mikotoksinler; Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Alternaria başta olmak üzere bazı mantarların oluşturdukları fungal metabolitlerdir (Soyöz ve Özçelik, 2002). Mikotoksin oluşturan mantarlar yaygın bir problem olup dünyanın her tarafında bulunurlar (Pereyra ve ark., 2008). Başta ısı ve rutubet olmak üzere şartlar mantarların gelişmesine uygun olduğu zaman hem sahada ve hem de harmanlama, depolanma, taşınma ve hazırlanma safhalarında yem ve besinler mantarların istilasına uğrayarak mikotoksinlerle kirlenebilirler (Oğuz ve Kurtoglu, 2000). Mantar üremesi silaj, yem ve gıdaların besin değerinde azalmaya sebep olur (O'Brien ve ark., 2006). Ayrıca yemin renk, koku, kıvam ve tadında da bazı değişikliklerin oluşmasına neden olmaktadır (Nizamlioğlu, 1996).

Mikotoksinlerden aflatoksinler (AF), okratoksin A, fumonisinler, trikotesenler ve zearalenonun birinci derecede önemli mikotoksinler olduğu belirtilmektedir (Huwing ve ark., 2001; Oruç, 2005). Mikotoksin adı verilen bu eksojen metabolitler, mantar

anlamına gelen myco ve zehir terimini karşılayan toksin kelimelerinin birleştirilmesiyle türetilmiştir (Şanlı, 1995). Mikotoksin alımına bağlı olarak şekillenen klinik tabloya “mikotoksikoz” denilmektedir. Mikotoksikozda görülen belirtilerin şiddeti ve görülen hastalıkların tipi; genel olarak maruz kalınan mikotoksin türü, miktarı, birden fazla mikotoksin varlığının yanı sıra vücut ağırlığı, fiziksel ve beslenme durumu gibi bireysel özelliklere bağlı olarak farklılıklar gösterebilir (Steyn ve Stander, 1999).

Mikotoksinleri üreten mantarlar rüzgar ve hava akımlarıyla taşınarak her yerde (atmosferin çeşitli katmanları da dahil) bulunabilirler (Steyn ve Stander, 1999). Bu da; küf sporlarının bitki, gıda ve yemlerin yanı sıra hava, su, toprak gibi yollarla da bulaşabileceğini göstermektedir. Mantar üremesinin sıklığı ve derecesi çevre ısısı, rutubet, mekanik hasar, yemin kimyasal bileşimi, yağ ve karbonhidrat içeriği, pH durumu ve tarlada yetişen ürünlerin zamanında hasat edilmemesi, yağışlı ve rutubetli iklim koşullarının oluşması, depoların yeteri kadar ışık almaması, havalandırmanın yeterli olmaması, ortamda birden fazla parazit veya mantar türünün mevcut olması gibi hazırlayıcı faktörlere göre önemli oranda değişmektedir (Topal ve ark., 1999; Kaya, 2002; Yaroğlu, 2002; Yiannikouris ve Jouany, 2002).

Depolama süresinin uzunluğu üreme ve mikotoksin sentezinin artmasına neden olmaktadır. Şartlar uygun olduğu takdirde 2-4 gün içerisinde küflenmeyle beraber mikotoksin ile kirlenme oluşabilmektedir. Bunun yanı sıra 16-24 günlük bir süreçte aflatoksin miktarı dört katına çıkabilmektedir (Kaya, 2002). Gelişmelerine uygun şartlar yok ise yıllarca spor formunda kalabilirler (Kaya, 2002; Whitlow ve Hagler, 2005).

Fungal etkinin ve çoğalmanın başlayabilmesi için gerekli olan çevresel koşulların başında rutubet gelir. Genellikle kseroofil nitelikli mantar sporlarının gelişebilmesi için ortam havasındaki oransal rutubetin %50 veya daha yüksek ve çoğalma ortamındaki rutubet içeriğinin de %10'nun üstünde olması gerekir (Şanlı, 1995; Whitlow ve Hagler, 2002). Küfler pH 2.1-11.2 gibi geniş bir aralıkta üreyebilmelerine karşın, pH 3.0-8.0 arasında optimum üremeleri gerçekleşmektedir (Şanlı, 1995).

Sıcaklığın mikotoksin oluşumuna çok önemli etkileri vardır. Ortam ısısı özellikle mantar florasının büyüme hızı ve metabolik etkinlikleri üzerine etkili olur. Her

toksin için farklı sıcaklık dereceleri geçerlidir. Küflerin optimum gelişme sıcaklıkları 20-40 °C'dir. Büyük çoğunluğu en iyi 25-26 °C arasında ürer. Bazı küfler ise 15 °C'ye kadar olan düşük ısılarda da çoğalma kabiliyetine sahiptir (Jarvis, 1971). Bu faktörler dikkate alındığında, yemlerin mikotoksinlerle kontaminasyonu açısından en riskli coğrafi bölgelerin, tropikal iklim şartlarının hüküm sürdüğü ılıman ve nemli bölgeler olduğu anlaşılmaktadır (Glavitis ve Salyi, 1998). Ülkemizde de özellikle Akdeniz, Marmara ve Karadeniz bölgelerinde bu koşullar sağlanabilmektedir (Sur, 2001).

Mantar türleri sıkı bir şekilde aerob yaşam biçimine bağımlıdır. Ortamdaki oksijenin %1'in altına düşürülmesiyle küf gelişimine paralel olarak toksin üretimi de azalır. Ancak üremeleri ve mikotoksin sentezlemeleri için oksijene olan ihtiyaçları bakımından mantar türleri arasında önemli farklar bulunabilmektedir. Şöyle ki; ortamın oksijen yoğunluğunun %45'ten %1'e düşürülmesi veya karbondioksit yoğunluğunun %10'dan daha yukarı çıkartılması *Aspergillus flavus*'un üremesini ve aflatoksin sentezini önemli seviyede azaltır. Ortamdaki karbondioksit yoğunluğu %20'nin üzerine çıkarıldığında ise küflerin üremesi ve toksin sentezleri önemli ölçüde etkilenir (Şanlı, 1995; Kaya, 2002).

Besin maddesinin çeşidi ve fiziksel durumu fungal gelişme, çoğalma ve mikotoksin çeşitlerinin sentezi üzerinde etkili olur. Küfler, üremeleri için organik karbonlara ve diğer enerji kaynaklarına ihtiyaç duyarlar. Glikoz ve diğer düşük molekül yapısına sahip monosakkaridler ile suda çözünebilen organik maddeleri besin kaynağı olarak kullanabilirler. Ayrıca, küflerin üreyip toksin sentezleyebilmeleri için pepton, polipeptid ve aminoasitler gibi organik maddeleri azot kaynağı olarak kullanmaya ve kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), potasyum (K), demir (Fe), çinko (Zn), fosfor (P) gibi elementlere ihtiyaçları vardır. Karbonhidrat ve yağ bakımından zengin gıda ve yem maddeleri küflerin üreyip toksin sentezleyebilmeleri için uygun ortamlardır. Özellikle mısır, buğday, arpa, yulaf, pirinç gibi ürünler ile yer fıstığı, fındık, ayçiçeği, soya fasulyesi ve pamuk tohumu gibi yağlı ürünlerde küfler sıklıkla üremekte ve mikotoksin sentezlemektedirler. Bunun yanı sıra özellikle yem maddelerinde bulaşmanın tarlada başladığı göz önüne alınırsa gerek hasat ve gerekse işleme aşamasında fazla mekanik hasar görmüş veya çeşitli parazitlerin hücumuna uğramış ve fiziki bütünlüğünü yitirmiş

tarımsal ürünlerin mantar invazyonlarına karşı direnci bütünüyle kaybolur (Şanlı, 1995; Yaroğlu, 2002; Agag, 2004).

Gıda ve yem maddelerinde, görülebilir bir küflenme olmadığında bile mikotoksinler tehlikeli düzeylerde bulunabilir. Normal pişirme ve işleme uygulamaları sırasında, özellikle aflatoksinler olmak üzere, mikotoksinlerin önemli bir kısmının parçalanmadan kalması, insan ve hayvan sağlığı açısından konunun önemini daha da artırmaktadır (Kaya, 2002). Özellikle yemlerle alınan AF'ler sindirim kanalından kolayca emilir ve başlıca karaciğer ile yumuşak dokulara dağılarak metabolize olurlar (Karakaya, 2006).

2.2. Aflatoksinler

Aflatoksinler (AF); *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* (Candlish ve ark., 1988; Oğuz ve Kurtoğlu, 2000; Khanafari ve ark., 2007) ve bazı *Penicillium* ve *Rhizopus* türü mantarlar tarafından üretilen toksik metabolitlerdir (Candlish ve ark., 1988). AF, kökenini *Aspergillus*'un A, *flavus*un FLA harflerinden almıştır (Tuncer, 1990). Söz konusu toksin 1962'de "aflatoksin" olarak isimlendirilmiştir (Sharby, 1978). Mikotoksinler içerisinde en önemlisi AF'dir (Nizamlioğlu, 1996; Richard ve ark., 2007). Çünkü diğerlerine oranla daha toksiktir ve daha kısa sürede oluşurlar (Salwa ve ark., 2000). Tüm hayvan türleri ve insanlarda zehirlenmeye neden olurlar; her çeşit yem ile besin maddelerinde bulunabilirler ve karsinojenite riskleri diğer mikotoksinlere göre daha fazladır (Nizamlioğlu, 1996; Giray ve ark., 2007).

AF'lerin B₁, B₂, G₁, G₂ ve sütte bulunan M₁, M₂ formları ve P₁, Q₁, aflatoksikol, B_{2a}, G_{2a}, D₁, GM₁, GM_{2a}, B₃ (Leeson, 1995; Şanlı, 1995) gibi yaklaşık 20 çeşidi belirlenmiştir. Bu sınıflama aflatoksinlerin ultraviolet ışığı ile aydınlatıldıklarında verdikleri spesifik floresans özelliklerine göre yapılmıştır. Buna göre mavi floresans verenler (Blue) "B", yeşil floresans verenler ise (Green) "G" harfi ile simgelenmiştir (Ellis ve ark., 1991). Doğada, yem maddelerinde üreyen küflerin en yaygın ve önemlisi olan *Aspergillus* türlerinin ürettiği aflatoksinlerin çok büyük bir oranı (%75-83) AFB₁'dir ve bu nedenle aflatoksikozlardan da büyük oranda bu aflatoksin türü sorumludur (Oğuz, 1997; Oğuz ve ark., 2000).

2.2.1. Aflatoksinlerin genel özellikleri

Aflatoksinler kimyasal yapı olarak lakton bağı ve bifuran halkası içeren difurano kumarin türevleridir (Özkarlı, 2003). Aflatoksinlerin belirlenmiş önemli 4 tipi AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ dir. AFB₁ ve AFG₁ difuran halkası içerirken AFB₂ ve AFG₂ ise tetra bifuran halkası içermektedir (Sweeney ve Dobson, 1999). G serisi aflatoksinlerde üçüncü lakton halkası, siklopentan halkasının yerine geçmiştir. AFB₁ ve AFG₁'de merkezdeki furan halkasının 8. ve 9. karbon atomları arasında çift bağ bulunmaktadır (Jaimez ve ark., 2000).

Aflatoksinler yüksek sıcaklıklara karşı oldukça dayanıklı olup, normal pişirme sıcaklıklarında ve pastörizasyon sıcaklıklarına karşı oldukça dayanıklıdır. Pastörizasyon sıcaklığında aflatoksinlerin parçalanma oranları çok düşüktür, hatta bazıları hiç parçalanmamaktadır. Aflatoksinler ancak 300 °C'nin üzerindeki ısıda tamamen yıkımlanmakta, 230 °C'de 25 dakikada hazırlanan karma yemlerde aflatoksin içeriği yaklaşık %60 azalabilmektedir (Samarajeewa ve ark., 1990). Yüksek sıcaklıklarda bile stabilitelerini koruyabilen aflatoksinler (300 °C'a kadar); formaldehit, sodyum hipoklorit, amonyak ve potasyum permanganat gibi kuvvetli alkali ve yükseltgen bileşiklere karşı oldukça dayanıksızdırlar (Kaya, 2002). Aflatoksinler, kloroform, aseton, etanol, karbon tetraklorür ve metanol gibi polar çözücüler ve özellikle dimetilsülfoksitte çözünebilmektedir. Ayrıca aflatoksinin yapısında bulunan lakton halkası bu molekülün alkali hidrolizine karşı hassas olmasını sağlamaktadır (Leeson ve ark., 1995; McLean ve Dutton, 1995).

2.2.2. Aflatoksinlerin toksikokinetiği

Vücuda giren tüm yabancı moleküller gibi aflatoksinlerin metabolize edilmesinde de emilim, dağılım, biyotransformasyon ve vücuttan atılım aşamaları bulunmaktadır (Sur, 2001). AF'ler, kimyasal olarak yüksek derecede reaktif bifuran halkası ile pentanon halkası (B serisine karakteristik) veya 6 karbonlu lakton halkası (G serisine karakteristik) arasında bulunan kumarin çekirdeğinden oluşan polisiklik doymamış bileşiklerdir. Bu nedenle difurocumarocyclopentanon derivatı olarak kabul edilmektedirler (Dalvi ve McGowan, 1984). AFB₁'in maksimal toksisiteye ulaşması

için mikrozomal oksidaz enzim sistemi yoluyla AFB₁ 8,9-epoksite dönüştürülmesi gerekmektedir (Moss ve ark., 1985).

2.2.2.1. Aflatoksinlerin emilimi

Doğada fazla miktarda bulunan ve en çok kontaminasyona yol açan AF olduğundan, toksikoknetiği ve metabolizması üzerinde en yoğun biçimde çalışılmış olan AFB₁'in, lipofilik özellikleri ve düşük molekül ağırlığına sahip oldukları için gastro-intestinal kanaldan emilerek, düşük moleküler ağırlıklı kan plazması proteinlerine bağlanmak suretiyle portal dolaşıma geçtiği ve bu yolla hepatositlere taşındığı ortaya konmuştur (Busbee ve ark., 1990).

2.2.2.2. Aflatoksinlerin dağılımı

Toksinler dolaşıma geçtikten sonra kısa sürede plazmadan ayrılır ve yoğun olarak karaciğer, böbrek, adipoz doku, kaslarda ve diğer yumuşak dokularda dağılım gösterirler (Mabee ve Chipley, 1973). Ancak asıl birikim yerleri, toksinin biyotransformasyonunun gerçekleştiği karaciğer ve böbrek gibi organlardır (Leeson ve ark., 1995). AF klirens zamanının süte 3-6 gün, idrar ve dışkıda 6-9 gün olduğu bildirilmektedir (Kaya, 2002). Yem ile alınan AF'in karaciğere geçiş oranı sığırdan 1/14.000, domuzda 1/800, et tipi civcivde 1/1200 ve sığırdan süte geçiş oranı ise yaklaşık 1/300 olarak tespit edilmiştir (Rodricks ve Stoloff, 1977). Süte geçişle ilgili diğer çalışmalarda hayvanlar arasında ferdi farklılık görülmekle birlikte bu oranın 1/300-1/1600 arasında olduğu bildirilmektedir. İşaretlenmiş AF'in 14 gün süreyle civcivlere verildiği bir çalışmada (Tuncer, 1987), %90.64'ünün dışkı ile atıldığı, vücutta alıkonan kısmının da %11.04'ünün kanda, %9.83'ünün karaciğerde, %4.30'unun kalp kasında, %12.52'sinin kursakta, %31.66'sının göğüs kasında ve %30.63'ünün de bacak kasında tespit edildiği kaydedilmektedir (Oğuz, 1997).

2.2.2.3. Aflatoksinlerin atılımı

Vücuda giren AFB₁'in %85-90'ı ilk 24 saat içinde dışkı (%75'i), idrar (%15-20'si) ve sütle değişmemiş metabolitleri halinde atılır. Dışkıyla bu ölçüde atılması ağızdan alınan toksinin sindirim kanalından sınırlı ölçüde emildiğini gösterir. Özgün

bileşikler ve metabolitlerin tamamen atılabilmeleri için yaklaşık bir haftalık sürenin geçmesi gerekmektedir (Dafalla ve ark., 1987). Ayrıca çeşitli hayvansal dokular (Stubblefield ve ark., 1983) ile süt (Harvey ve ark., 1991) ve yumurta (Hamilton, 1982) gibi hayvansal ürünlere insan sağlığını tehdit edebilecek düzeylerde AFB₁ ve metabolitleri geçebilmektedir (Kaya, 1982).

Aflatoksinler vücutta çeşitli metabolik değişikliğe maruz kalırlar. AFB₁ biyotransformasyon sonucu kendisinden 10 kez daha az karsinogenik etkiye sahip olan AFM₁'e dönüştürülür (Cullen, 1987). Laktasyon dönemindeki hayvanlar ve insanlar AFB₁ ile kontamine yiyeceklere maruz kaldıklarında, alınan AFB₁ sitokrom P-450 enzimi tarafından hidroksilasyona uğratarak metabolit halinde AFM₁ olarak sütle atılmaktadır (FAO/WHO, 2002). AFB₁'in ilk alınmasından 12-24 saat sonra sütte AFM₁ saptanabilir. AFB₁ alınması durdurulduğunda, sütteki AFM₁ düzeyi azalarak 72 saat sonra belirlenemeyecek düzeylere ulaşmaktadır (Sibanda ve ark., 1999). Aflatoksin bulaşmış yemin tüketilmesinden sonra ilk sağımda sütte yine AFM₁ olarak görülür (Masoero ve ark., 2007). AFB₁ alınması ile sütle çıkarılan AFM₁ arasındaki oran %1-3 arasında belirlenmiştir ancak bu oran Veldman (1992) tarafından % 6 olarak rapor edilmiştir. Genel olarak hayvan yemlerinde bulunan aflatoksin B₁'in %0.3-6.2'sinin süte geçtiği belirtilmektedir (FAO/WHO, 2002). Atılım hızları yüksek olan toksinler olsalar da AF₁'in kümülatif etkileri olduğundan, az miktarlarda uzun süreli alındıklarında kronik zehirlenmelere de neden olmaktadır (Leeson ve ark., 1995).

2.2.3. Aflatoksinlerin etki şekli ve metabolizması

Kontamine yem ve gıdalarla alınan aflatoksinler doğrudan toksik bileşikler olmayıp, onların karaciğer, akciğer veya böbreklerdeki metabolik ürünleri bu etkiye sahiptirler (Oğuz, 1997). Karaciğer ve böbrekler aflatoksikozisten en çok etkilenen organlardır (Bullerman, 1978).

Aflatoksinler, sindirim kanalından absorbe edilerek kan dolaşımına geçer ve albüminlere bağlanarak taşınırlar. Kandaki aflatoksinin çoğu karaciğerde tutulur. Aflatoksinlerin bir kısmı hepatositlerde endoplazmik steroidler ve çeşitli enzimler gibi makromoleküllere bağlanırken bir kısmı da yağda ve suda çözünebilen metabolitlere (AFQ₁, P₁, B_{2a}, G_{2a}, aflatoksikol, M₁, M₂) çevrilir (Campbell ve Hayes, 1976; Schell ve

ark., 1993). Aflatoksinler, karaciğerde oksidazlar tarafından metabolize edilir. Hidroksilasyonla detoksifiye edilen aflatoksin ana bileşiği glukuronik asit veya sülfatla konjuge edildikten sonra idrar ve çoğunlukla safra ile atılır (Campbell ve Hayes., 1976).

Mikotoksinler ve özellikle aflatoksinlerin genel etki mekanizmaları, DNA, RNA ve protein sentezinin inhibisyonu şeklindedir (Jeffery ve ark., 1984). Aflatoksin türleri içerisinde en toksik tür olarak bilinen AFB₁'in toksisitesinden ise kendisinin değil, sitokrom P-450 ve aril hidrokarbon hidroksilaz gibi bir takım enzimlerin etkileri sonucu ortaya çıkan metabolitlerinin sorumlu olduğu bildirilmektedir (Iwaki ve ark., 1990; Cavin ve ark., 1998). Kendisi etkisiz olan AF, karaciğerde P-450'ye bağlı (geviş getirenlerde p-448) karma işlevli oksidaz enzim sistemiyle (MFO) metabolik değişikliğe uğratılarak (okside edilerek) epoksit türevlerine (AFB₁ 8,9-epoksit gibi) dönüştürüldükten sonra sitotoksik, karsinogenik, mutajenik ve teratojenik etkinlik kazanır. AF'in bu etkileri, öncelikle hücrel nükleoproteinler ve nükleik asitler gibi makromoleküllerle kolayca ve hızla tepkimeye girerek, sonuçta protein sentezi ve hücrel bütünlüğün bozulmasına neden olmalarından kaynaklanır. Sitotoksik ve karsinogenik özelliğinin, AFB₁'in metabolitleri olan AFQ₁, P₁, M₁ ve AFR₀'ın 8,9-epoksit türevlerinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Haworth ve ark., 1989).

Aflatoksinlerin toksik etkisi, karaciğerde çeşitli epoksit türevlerine dönüştürüldükten sonra ortaya çıkmaktadır. Akut veya kronik toksisite ile karsinogenik etkilerden sorumlu olan bu türevlerin karaciğerde moleküler düzeyde tepkimeye girmeleri sonucu, ribozomal bozukluklar ortaya çıkmaya başlar. DNA ve RNA polimeraz enzimlerinin kısa sürede inhibisyonuna bağlı olarak, daha önce değinildiği gibi, protein sentezinde ciddi aksamalar ortaya çıkabilir ve bağışıklık sistemi zayıflamaya başlar (Iwaki ve ark., 1990). Amstad ve ark. (1984)'nın in vitro çalışmalarında, AFB₁'in serbest radikallerin oluşumunu uyardığı saptanmıştır. Bu serbest radikaller kromozomlarda hasara neden olmaktadır. Nakae ve ark. (1987), süperoksit dismutaz ve katalazın AFB₁'in rat karaciğer hücreleri üzerindeki öldürücü etkisini engellediklerini saptamışlardır. Bu bilgi, reaktif oksijen türlerinin AFB₁ tarafından oluşturulan hücre toksikasyonunda önemli bir role sahip olduklarını kanıtlamaktadır (Atalay, 2007).

AF'nin epoksit şekilleri ara ürün durumunda olup karaciğerde glutasyon (GSH)-S-transferaz enzimi tarafından katalize edilen tepkimelerle GSH ile konjuge edilerek veya epoksit hidrataz enzimi yardımıyla AFR₀'a dönüştürülerek nispeten zehirsiz metabolitleri oluşturulur. Ancak uzun süre veya fazla miktarlarda AF alınması veya aynı zehirsizleştirme mekanizması ile zararsız hale getirilen besinsel kaynaklı öğelerin fazla alınması durumunda, AF'nin toksik metabolitlerinin miktarı artar. Bunun tersi olarak da, karaciğerde zehirsizleştirmede görev alan GSH-S-transferaz ve anilin hidroksilaz gibi enzimlerin bütilli hidroksi tolue (BHT), bütilli hidroksi anisol (BHA), fenobarbital ve indirgenmiş glutation gibi maddelerle indüklenmesiyle AF'nin vücuttan atılımının hızlandığı ve bundan dolayı da zehirliliğinin azaldığı kaydedilmektedir (Fukayama ve Hsieh, 1985).

2.2.3.1. Aflatoksikozis

Aflatoksikozis; özellikle *Aspergillus* cinsi mantarların ürettikleri aflatoksinlerin vücutta metabolize olduktan sonra oluşturduğu hasara verilen isimdir. Aflatoksikozis, insan ve hayvanlarda doğrudan veya dolaylı olarak görülebilen bir mikotoksikozistir. Aflatoksinlerin insanlarda ve hayvan türlerinde akut ve kronik zehirlenmelere yol açmaları ve bilinen en güçlü doğal karsinojenlerden biri olmaları nedeniyle konu üzerinde çok sayıda araştırma yapılmıştır (Hamilton, 1982; Robb, 1993). Yem veya gıdalarla alınan aflatoksin, karaciğer hücrelerinde sitokrom P-450 monooksijenaz enzim sistemi tarafından metabolize edilir. Bu metabolik proses sonucu açığa çıkan bazı aflatoksin metabolitleri toksik, karsinojenik ve mutajenik etkilere sahiptirler (Salmanoğlu, 2002).

Hem halk sağlığı hem de hayvan sağlığı açısından oldukça önemli sorunlara yol açan aflatoksikozis akut ve kronik olarak iki alt grup altında incelenmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda AF tüketilmesiyle akut primer aflatoksikozis meydana gelmekte ve duyarlılığa bağlı olarak genellikle hayvanların ölümü ile sonuçlanabilmektedir (Moss ve ark., 1985). Toksik düzeyde AF alınmasını takiben 3-6 saat içerisinde karaciğerde hasar, yağ dejenerasyonu ve fonksiyon bozukluğu ortaya çıkar. Karaciğerin ileri derecede hasarına bağlı olarak kanın pıhtılaşma mekanizması bozulur, sarılık durumu gelişir ve karaciğer kaynaklı serum proteinlerinde ciddi azalmalar meydana gelir. Kanın

pıhtılaşma yeteneğinin azalması ve kapillar damar çeperlerinin hasarına bağlı olarak mukoz zarlar ve vücut boşluklarında yaygın kanamalar meydana gelir (Oğuz ve Kurtoğlu, 2000; Ortatatlı ve Oğuz, 2001). Akut aflatoksikozisde iştahsızlık, solunum güçlüğü, burun akıntısı, durgunluk, kansızlık, öksürük, kanlı ishal, çırpınma, bitkinlik, karaciğer harabiyeti, kılcal damarlarda kanamalar ve ani ölüm görülebilir. Subakut olgularda ise sarılık, hematoma, hemorajik enteritis ve trombosit sayısında azalma dikkat çeker. Ayrıca karaciğerde nekroz, kanın pıhtılaşma süresinin uzaması, sarılık ve serum proteinlerinde azalma da sık karşılaşılan bulgulardandır (Sur, 2001).

Uzun bir süre içerisinde düşük düzeyde AF alınması sonucunda ortaya çıkan kronik zehirlenmeler subklinik seyrettiği için zehirlenme belirtileri gözden kaçırılır. Bu tip zehirlenmelerde özellikle bağışıklık sisteminin baskılanması ve kazanılmış direncin kırılması nedeniyle birçok hastalık ön plana çıkar. Hayvanlarda hastalanma ve ölüm oranları artar. Kronik olarak etkilenen hayvanlarda protein sentezi, vitamin ve minerallerin değerlendirilmesi de baskılandığından etkilenen genç hayvanlarda yemden yararlanma ve canlı ağırlık kazancı azalır, büyüme hızı yavaşlar (Candlish ve ark., 1988; Nizamlioglu, 1996). Anormal tüylenme, kılıklarda düzensizlik, anemi, depresyon, hafif derecede sarılık gibi klinik belirtiler görülür (Huff ve ark., 1986). Patolojik olarak karaciğerde konjesyon, hemoraji ve nekrotik odaklar, böbreklerde konjesyon ve nadiren de hemorajik enteritis görülmektedir (Moss ve ark., 1985).

Hayvanlarda aflatoksikozis: Aflatoksikozis, hayvanlarda bireysel olmaktan ziyade sürüyü ilgilendiren bir problemdir (Kaya, 2002). Hayvanlardaki aflatoksikozis önemli sağlık problemlerine sebep olmasının yanı sıra büyük ölçüde verim kayıplarını da beraberinde getirmekte ve bu da önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Hafez ve ark., 1982).

Çiftlik hayvanlarının aflatoksinlere duyarlılığı farklı olup, en hassas türler ördek, tavşan ve hindi palazlarıdır. Bunu sırasıyla tavşan, kedi, alabalık, hindi, sülün, kaz, civciv, piliç, bıldırcın, tavuk, köpek, domuz, at, sığır, koyun ve keçi izlemektedir (Acay, 2006). Yemdeki 0.2 ppm düzeyinde aflatoksin, genç ve gebe domuzlar ile buzağılarda (16 haftalık) hafif karaciğer hasarı meydana getirirken bu oran atlar için 0.4-0.6 ppm, etlik domuz, yetişkin sığır ve koyun için 0.66 ppm düzeyindedir (Angsubhakorn ve ark., 1981). AFB₁ düzeyleri 1 ppm'in üzerine çıktığı zaman çiftlik hayvanlarında ciddi

karaciğer hasarlarına ve akut ölümlere sebep olur (Smith, 1997). Süt inekleri ve danalar koyun ve atlara göre çok daha duyarlıdır. Bütün türlerde genç hayvanlar olgunlara göre aflatksinlerin etkilerine daha duyarlıdır. Yine gebe ve büyüme dönemindeki hayvanlar genç hayvanlara göre daha az duyarlıdır fakat yaşlılara göre duyarlılıkları fazladır (Cassel ve ark., 2001).

FAOAVHO/Unicef komitesinin Şubat 1985 tarihli genelgesiyle besinlerdeki aflatoksin düzeyi 20 ug/kg (0.02 ppm =20 ppb) olarak belirlenmiş olmakla birlikte; Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) ise 1966'dan beri bu sınırı 20 ppb olarak kabul etmiştir.

Karma yem veya yem hammaddelerinin nem içeriklerinin norm değerlerine uygun olması, küf gelişimini kısıtlayan en önemli faktördür. Ancak, söz konusu materyallerin homojen olarak kurutulmaması veya depolamadaki anormallikler küf gelişimini başlatabilmektedir. Bununla birlikte, uzun süre depolanmış yemlerde mikotoksin görülme riski, kısa süre depolananlardan daha yüksektir. Dolayısıyla, mümkün olduğu kadar taze materyallerin kullanımı toksikasyonları önemli ölçüde azaltabilecektir (Çelik, 2001). Özellikle, hayvan beslemede yoğun olarak kullanılan mısır, pamuk tohumu küspesi, soya küspesi, ayçiçeği tohumu küspesi, hayvansal kaynaklı yem hammaddeleri küf gelişimi için uygun materyallerdir (Çelik, 2007). Çiftlik hayvanları aflatoksin içeren rasyonlarla yemlendiklerinde sadece kendileri çeşitli toksikasyonlara uğramakla kalmayıp, aynı zamanda bu toksinleri et, süt, yumurta gibi hayvansal ürünlere geçirerek dolaylı olarak insan sağlığına zarar verebilmektedirler (Acay, 2006). Zira aflatoksinler bilinen en önemli hepatokarsinojenlerdendir (Hamilton, 1982).

İnsanlarda aflatoksikozis: Aflatoksinler insanlarda karaciğer kanserinin sebeplerinden biri olarak tanımlanmıştır. Fakat buna ilaveten oldukça önemli toksik etkilere de sahiptir. Dünya çapında aflatoksine maruz kalan insanlardaki aflatoksin seviyesi ve yaygınlığı incelenmiş ve gelişen ülkelerde yaşayan 4.5 milyona yakın insanın, büyük ölçüde kontrolsüz bir şekilde artan toksine kronik olarak maruz kaldığı görülmüştür (Williams ve ark., 2004). Aflatoksinler, çeşitli dokularda birikerek veya hayvansal ürünlere geçerek bu tip ürünleri tüketen insanlarda önemli sağlık sorunlarına

yol açabilmektedirler (Acay, 2006). İnsanların bu besinlerdeki metabolitleri almasından sonra akut veya kronik toksikasyon ve kanser oluşabilmektedir (Robb, 1993).

Laktasyon dönemindeki insanlar AFB₁ ile kontamine yiyeceklere maruz kaldıklarında, alınan AFB₁ sitokrom P-450 enzimi tarafından hidroksilasyona uğratarak metabolit halinde AFM₁ olarak sütle atılmaktadırlar (FAO/WHO, 2002). Bundan dolayı, çocukların özellikle anne sütü aracılığıyla aflatoksinlere maruz kalmaları söz konusu olduğundan, annelerin beslenme alışkanlıklarını mantar üremesine engel olacak şekilde düzenlemesi, başta anneler olmak üzere halkın bu konuda eğitilmesi ve gıdalarda aflatoksin kirliliği olup olmadığı zaman zaman kontrol edilmesi gerekmektedir (Kuyucuoğlu, 2007).

2.2.3.2. Aflatoksinlerin karsinojenik etkileri

AF'ler özellikle karaciğer ve böbrek kanserlerine neden oldukları bilinen en güçlü doğal karsinojenlerdir. Nitekim Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) aflatoksinleri 1B grubu karsinojenler içinde değerlendirmektedir (IARC, 1993). Aflatoksinlerin primer ajan olarak insanlarda kansere yol açtıkları henüz gösterilememiştir. Bununla birlikte; epidemiyolojik çalışma sonuçları, aflatoksinle kontamine besinlerin fazla miktarda tüketildiği Afrika, Güneydoğu Asya ülkeleri ve Hindistan'da yaşayanlarda hepatokarsinoma insidensinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda Doğu ve Orta Anadolu bölgelerimizde tüketilen bulgurların çoğunluğunda aflatoksinlerle kontaminasyon belirlenmiş, bu bölgelerde görülen karaciğer kanseri insidensinin İstanbul ve Trakya bölgesindekinden yaklaşık dört kat daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Eser ve ark., 1978). AFB₁'in karaciğer, kolon ve böbrek kanserlerine sebep olduğu belirtilmiştir (Madhusudhanan ve ark., 2004). Hayvanlarda AFB₂ ve AFG₁'in de kanserojen oldukları bilinmesine rağmen AFB₁'in daha kuvvetli hepatokarsinojen olduğu ifade edilmektedir (Moss ve ark., 1985).

Aflatoksinlerin salınımına neden oldukları serbest radikallerin en önemli hasarları membran lipidleri, DNA (deoksiribo nükleik asit) ve proteinlere verdikleri hasarlardır. Serbest radikaller pürin ve pirimidin modifikasyonuna veya DNA iplikleri ve kromozom kırılmalarına, onkojen aktivasyonuna neden oldukları için karsinogenezi önemli rol oynarlar (Seven ve Candan, 1995). DNA hasarına yol açan

hidroksil radikallerinin, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksitin geçis metalleriyle reaksiyonu sonucu oluştuğu gösterilmiştir (Bukan, 1999). Geis metalleri ve serbest radikallerin etkisiyle DNA’da oluşan majör oksidatif etkiler sarmal aımları, deprinasyon, çapraz bağlanma ve baz modifikasyonları olarak bilinmektedirler. Özellikle baz modifikasyonlarından timin bazı, timin glikol ve 5-hidroksimetil urasile, guanin bazı da 8-hidroksiguanine (8-OH-Gua) dönüşür (Kasprzak, 2002). Aflatoksin tüketimi, hücrelerde 8-OH-Gua miktarında artışa neden olduğu için, özellikle p-53 geninin 249. kodonunda mutajeniteye neden olarak kansere sebep olur (Wang and Groopman, 1999).

Deney hayvanlarında aflatoksinlerin karaciğer ve böbreklerde kanser oluşumuna sebep oldukları gösterilmiştir. Ratlara günlük olarak 100 μ g/kg dozda 12-22 ay boyunca aflatoksin verildiğinde ratların %100’nde kanser oluştuğu bildirilmiştir (Ellis ve ark., 1991).

2.2.3.3. Aflatoksinlerin mutajenik etkileri

Aflatoksinler, hepatositlerin nukleus membranlarında ve endoplazmik retikulumlarında bulunan P-450 monooksidaz sistemiyle metabolize edilerek aşırı derecede reaktif olan epoksit türevler oluşmaktadır. Bu epoksit türevler DNA ve RNA gibi sellüler makromoleküller ile kovalent bağlar oluşturarak DNA ve RNA’da mutasyonlar meydana getirebilmektedir (Haworth ve ark., 1989). Aflatoksinlerin epoksit türevleri hücrede yeni DNA zincirlerinin oluşturulması sırasında sentezlenmekte olan DNA zincirlerine bağlanarak, DNA polimeraz enziminin aktivitesini inhibe etmek suretiyle mutasyona neden olmaktadır (Ellis ve ark., 1991). DNA’nın taşıdığı şifre bozulacağından, DNA ve RNA’da mutasyonların şekillenebileceği düşünülmektedir (Haworth ve ark., 1989).

2.2.3.4. Aflatoksinlerin teratojenik etkileri

Hamsterlere gebeliğin 8. gününde 4 mg/kg dozunda intraperitoneal AFB₁ verilmiş, gebelik sonunda bu hayvanların % 52.9’u normal, % 29.4’ malforme yavru doğurmuş, %17,6’sında ise l veya resorbe fetüs saptanmıştır. Bu malforme yavruarda anensefali, ektopiya kordis, büyümede gerilik, mikrosefali ve umblikal herni gibi

gelişim bozuklukları belirlenmiştir (Ellis ve ark., 1991). Yapılan diğer bir çalışmada da 3-30 ng/yumurta dozunda aflatoksin verilen embriyolu yumurtalarda mortalite %33, kalp anomalisi oranı %12 ve vücut anomalilerinin sıklığı %0.04 olarak saptanmıştır (Jelinek ve Peterka, 1985). Cilievici ve ark. (1980)'nın çalışmasında 0.01 ve 0.002 ppm dozunda AFB₁ verilen gruplarda spina bifida ve anoftalmus gibi yapısal anomalilere ise sırasıyla %35 ve %13.3 oranında rastlanmıştır.

2.2.4. Aflatoksin oluşumunu önleme yöntemleri ve detoksifikasyon

Mikotoksin oluşumunu önlemek için esas çözüm küf ve mikotoksin oluşumuna yol açan koşulların giderilmesi ve bu şekilde sorunun başlamadan çözülmesidir. Tarımsal ürün henüz tarlada iken küf ile kontamine olabilmektedir. Bu nedenle ham mahsulün erken hasat edilmemesi, olgun mahsulün yağmur ve kar altında bırakılmaması, hasattan önce böceklerle karşı etkin mücadele ilaçlarının kullanılması, az küflü ürünlerin hasat sırasında ayrılıp sağlam ürüne karıştırılmaması gibi ilk önlemlerle toksin oluşumu büyük ölçüde önlenabilmektedir (Karaali, 1986). Ancak, toksin oluşumu meydana gelmiş bir üründe aflatoksini uzaklaştırmaya, parçalamaya, azaltmaya ve bağlamaya yönelik çalışmalar da aflatoksinlerin keşfinden bu yana yapılmaktadır (Rustom, 1997).

Gıda ve yemlerdeki aflatoksinlerin kimyasal detoksifikasyonu uygulanabilir bir hasat sonrası yaklaşımıdır. Yem ve yem hammaddelerindeki mikotoksinlerin kimyasal yöntemlerle kontrolünde çok çeşitli ajanlar kullanılabilmektedir. Bu amaç doğrultusunda asitler, bazlar (NH₃, NaOH), okside edici ajanlar, aldehitler, gazlar, bisüfitler klorlayıcı ajanlar, tuzlar ve diğerleri (formaldehit) gibi çok sayıda madde ile çalışılmıştır (Moss ve ark., 1985). Asitlerin AF'leri, özellikle de AFB₁ ve G₁'i yıkımlama yeteneği suyun inkorporasyonu ile hemiasetal formları olan B_{2a} ve G_{2a}'ya dönüşümüyle başarılıdır (Pons ve ark., 1972). Kuvvetli asitler AF'leri etkili olarak bozundurmalarına rağmen ürünün özelliğini değiştirebilmektedirler (Ellis ve ark., 1991). Günümüzde aflatoksikozise karşı sıklıkla başvuru yöntemleri arasında rasyonlara zeolit, bentonit, polivinil pirrolidin (PVP), silikat, clinoptilolit ve oligosakkarid ilavesi gibi alternatif korunma yöntemleri üzerinde de durulmaktadır (Oğuz, 1997). Sodyum bisüfit ise aflatoksin ve T-2 toksinlerine karşı büyük afinite göstermekte ve bunlarla

reaksiyona girerek sülfonat derivativlerini oluşturmaktadır. Formik, propiyonik ve sorbik asitlerin de yemlerdeki okratoksin A bulaşıklığını % 0.25-1'lik konsantrasyonlarda 24 saatlik kısa bir sürede ortadan kaldırdıkları bildirilmiştir (Varga ve Toth, 2005).

Aflatoksinler, 237 ile 306 °C arasında değişen yüksek dekompozisyon sıcaklıklarına sahip olmaları nedeniyle ısıya oldukça dayanıklıdırlar. Aflatoksinlerin kısmen parçalanabilmeleri için sıcaklığın 150 °C'nin üzerinde olması gereklidir. Aflatoksinin ısı ile degradasyonunda kritik faktör ürünün nem içeriğidir. Nem içeriğinin fazla olması aflatoksinin ısı ile inaktivasyonunu oldukça kolaylaştırmaktadır. Nemin varlığı, AFB₁'in lakton halkasının açılarak terminal karboksilik asit oluşmasına neden olmaktadır. Daha sonra karboksilik asit ısının etkisiyle dekarboksilasyona uğramaktadır (Samarajeewa ve ark., 1990).

A, C ve E vitaminleri ve selenyum birer antioksidan olarak görev yaparlar. Bu vitaminler karaciğerin mikrozomal enzimlerini aktive ederek aflatoksikozise bağlı olarak şekillenen karaciğerde kanser oluşumunu engellemektedirler. Mikrozomal enzimler, aflatoksinleri kanserojenik olmayan metabolitlere dönüştüren enzimlerdir (Davila ve ark., 1983; Nakae ve ark., 1987; Netke ve ark., 1997).

Enzim ve bileşiklerin çoğu oksidatif stresin etkilerine karşı hücreleri korurken E vitamini antioksidan sistemin tamamında önemli rol oynar. E vitamini doymamış yağ asitlerini korumada ilk savunma elemanıdır. E vitamini aflatoksinin neden olduğu lipid peroksidasyonunu önemli derecede azaltır (Shen ve ark., 1994). E vitamini ve aflatoksin ile yapılan bir çalışmada, aflatoksinle birlikte vitamin E (2 mg/gün/hayvan) verildiğinde sadece aflatoksin verilen gruplara göre malondialdehid (MDA) düzeyini azalttığı glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzimlerinin aktivitesini ise artırdığı sonucuna varılmıştır (Verma ve Nair, 2001). Selenyum ve vitamin E noksanlığı durumunda aflatoksinlerin *in vivo* olarak zararsızlaştırılmaları işlemlerinde aksamalar meydana gelmektedir. Bu tür vitamin ve mineral noksanlıkları bir bakıma aflatoksinlerin aktivasyonunu teşvik etmekte, zararlı etkilerinin daha şiddetli düzeylerde sonuçlanmasına olanak sağlamaktadır (Chen ve ark., 1982; Cassand ve ark., 1993).

A vitamini singlet oksijen temizliyici olmasý nedeniyle oksijen radikallerine karřý koruyucu etki yapar (Kılınç, 1985). Vitamin A'nın öncül maddeleri olan karotenoidler de karaciđeri aflatoksinlerin kanser yapıcı etkilerine karřý koruma özelliđine sahiptirler (Cassand ve ark., 1993).

Son yıllarda *in vivo* düzeyde laktik asit bakterileri, çeşitli baharat ve bitki ekstraktları ve tanen üzerinde durulmaktadır (Acay, 2006). Ratlarda yapılan bir çalışmada deneysel olarak oluşturulan aflatokzide ısırgan otu tohumu yağı 2ml/rat/gün oranında oral olarak verilmesiyle karaciğeri koruduğu bildirilmiştir (Yener ve ark., 2009).

2.3. Bal

Bal; bal arıları (*Apis mellifera*)'nın çiçek nektarlarını, bitkilerin canlı kısımlarının veya bu kısımlar üzerinde yaşayan bazı böceklerin şekerli salgılarını toplayarak vücutlarında yapısını değiştirip içerisine bazı maddeler karıştırdıktan sonra, petek gözlerine depolayıp fazla suyunu uçurmak suretiyle hazırlanan; çoğunlukla basit şekerlerden oluşan ve diğer bazı kompleks karbonhidratları da içeren, bunlardan başka yapısında her zaman polen taneleri ile bazı minerallerin, enzimlerin ve renk maddelerinin bulunduğu bir gıda maddesidir (Genç ve Dodoloğlu, 2003). Bal arıları tarafından çiçeklerden ve meyve tomurcuklarından alınarak yutulan nektar, arıların bal midesi denilen organlarında invertaz enzimi sayesinde kimyasal değişime uğratılır ve kovandaki petek hücrelerine yerleştirilir. Nektar bala çevrilirken arılar sağladıkları invertaz enzimi sayesinde sakkarozu inversiyona uğratarak fruktoz ve glukoz şeklinde basit şekerlere dönüştürür ve fermantasyonun meydana gelmesini önleyecek miktarda suyunu uçururlar. Kovandaki hücrelere yerleştirilen ve üzeri mumdan bir kapakla örtülen ürün, arılar tarafından sağlanan özel havalandırma sistemi sayesinde bildiğimiz tat ve kıvama gelir (Anonim, 1990).

2.3.1. Balın bileşimi

Balların bileşimi arının nektar topladığı bitkilerin türüne, çevresel koşullara göre değişim göstermektedir (Anklam, 1998). Ağırlıklı olarak monosakkaritler ve oligosakkaritlerden oluşan bal en az 181 tane bileşenden oluşur (Bogdanov ve ark., 2008). Aynı zamanda fenolik bileşikler, organik asitler, karotenoid türevi bileşikler, nitrik oksit (NO) metabolitleri, askorbik asit, aromatik bileşikler, vitaminler, aminoasitler ve proteinler gibi diğer biyolojik olarak aktif ürünler içerir (Bogdanov ve ark., 2008). Çalışmalar balın bazı çeşitlerinin antimikrobiyal özelliklerine katkıda bulunabilecek kynurenik asit (nöro-aktif aktiviteye sahip bir triptofan metaboliti) içerdiğini göstermiştir (Beretta, 2007).

2.3.1.1. Şekerler

Balın karbonhidrat yapısı %70-80 kadar olup, karbonhidratların %80-90'nını glukoz ve fruktoz şekerleri oluşturmaktadır (Bogdanov ve ark., 2004). Genellikle

fruktoz glukozdan daha fazla miktarda bulunmaktadır. Glukoz ve fruktozun büyük çoğunluğu oluşturması ve fruktozun yüksek oranda olması balın birçok fiziksel ve beslenme ile ilgili karakteristiklerini etkilemektedir (Krell, 1996). Balda az miktarlarda diğerk şekerler de bulunmaktadır. Bunlar maltoz, izomaltoz, mellebioz, sukroz, melezitoz ve rafinoz gibi 25 farklı şekerden oluşmuştur (Doner, 1977). Bu şekerler az miktarlarda bulunsalar da varlıkları balda yapılan hileler hakkında ve balın botanik kōkeni ile ilgili bilgiler vermektedir (Krell, 1996). Ayrıca balın çeker kapsamının elde edildiğı kaynağı ve arıların yavru gıda bezlerince salgılanan enzimlerin aktivitelerine bağı olduğı bildirilmiştir (Siddiqui, 1970).

2.3.1.2. Su

Su, miktar olarak balın ikinci en önemli bileşiğidir. Miktarı kritiktir, çünkū balın depo edilmesini etkilemektedir. Sadece su içeriğı %18'in altında bulunan ballar çok az veya hiř fermentasyon riski olmadan depolanabilir (Krell, 1996). Yapılan araştırmalarda, baldaki su miktarının değışiklik gösterdiğı ve normal olarak olgunlaşmış ballarda su miktarının %17.2 olduğı bildirilmiştir (White, 1975; Ball, 2007).

2.3.1.3. Organik asitler

Balda bulunan küçük bileşenler arasında en önemlisi organik asitlerdir. Balda en çok bulunan asit glukonik asittir (Krell, 1996). Bu asit glukoz oksidaz enziminin glukoz üzerine etkisiyle oluşur ve laktonu ile dengededir. Glukonik asit yanında formik, asetik, bütirik, sitrik, laktik, maleik, malik, okzalik, piroglukonik ve suksinik asidin varlığı kesin yöntemlerle gösterilmiştir. Ayrıca glikonik, α -ketoglutarik, piruvik, tartarik, 2 veya 3-fosfo-gliserik asitlerin de bulunduğı bildirilmektedir (Ağırbaş, 2001).

2.3.1.4. Mineral maddeler

Balın mineral kompozisyonu ve iz element içeriğı ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Popek, 2003). White (1975), 100 gr balda; kalsiyum, fosfor, potasyum, demir, bakır, manganez, magnezyum, silisyum, alüminyum, krom, nikel ve kobalt miktarlarının 0.02-1.03 gr arasında değıştiğini bildirmiştir. Balın mineral madde kompozisyonu bünyesindeki biyokimyasal faaliyetleri doğrudan etkilemekte ve

minerallerce zengin olan ballar daha koyu renkte olmaktadır. Nitekim çam balı çiçek ballarına göre daha koyu renkli ve mineral maddece daha zengindir (Gonzalez-Miret ve ark., 2005). Balın kül miktarı ise ağırlığının yaklaşık %0.17 kadardır. Fakat bu oran %0.02 ile %1 arasında oldukça geniş bir varyasyon göstermektedir (White, 1975).

Türkiye’de balların mineral kompozisyonu ve iz element içeriği ile ilgili ilginç sonuçlar elde edilmiştir. Türkiye’de değişik botanik kökene sahip 25 bal örneğinin iz element içerikleri değerlendirilmiştir. En çok miktarda bulunan elementin demir olduğu, en az miktarda bulunan elementin de kadmiyum olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar genellikle iz element konsantrasyonlarının, çevrenin iz element kontaminasyon seviyesi ile bağlantılı olduğunu göstermektedir (Tuzen ve ark., 2007).

2.3.1.5. Enzimler

Balda enzimler üzerine yapılan bir çalışmada, balın invertaz ve diastaz (amilaz) enzimleri ile katalaz, fosfataz ve glukoz-oksidad enzimlerini bünyesinde bulundurduğu ortaya konmuştur. Bal özünden balın olgunlaşması sırasında oluşan kimyasal değişikliklerden sorumlu olan enzim invertazdır. Sakkarozu glukoz ve fruktoza hidrolize eder. Aynı zamanda α -D-glukozil gruplarını sakarozdan uygun moleküllere transfer eder. Glukoz oksidad enzimi ise glukoz üzerine olan etkisi ile glukonik asit ve hidrojen peroksit oluşturan enzimdir. İnhibin diye bilinen antibakteriyel etki, seyretilmiş ballarda glukoz oksidad tarafından üretilen hidrojen peroksitten ileri gelmektedir (Ağırbaş, 2001). İki önemli enzim olan glukoz oksidad ve katalazın, balın antibakteriyel faktörlerinden biri olan hidrojen peroksit üretimini düzenlediği bildirilmektedir (Taormina ve ark., 2001).

2.3.1.6. Proteinler ve aminoasitler

Balın bünyesindeki aminoasit kapsamı ve kompozisyonu da kaynağına bağlı olarak değişebilmektedir. Aminoasitler nektar, polen veya vücut orijinli olup farklı kaynaklardan elde edilen ballarda farklı amino asitlerine rastlamak mümkündür (Cotte ve ark., 2004; Perez ve ark., 2007). Baldaki proteinler albumin, globulin, proteoz, pepteoz ve peptonlardan oluşur (Ağırbaş, 2001).

2.3.1.7. Vitaminler

Yapılan çalışmalarda balda tiamin (B1), riboflavin (B2), askorbik asit (C), piridoksin (B6), niasin, patotenik asit, nikotinik asit ve bazılarında da biotin ve folik asit belirlenmiştir (Ağırbaş, 2001).

2.3.2. Balın kullanım alanları ve yapılan araştırmalar

Eski ağlardan beri arı ürünleri hem gıda maddesi olarak hem de birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Besin maddesi ve enerji kaynağı olarak kullanılan bal, insan sağlığı bakımından da önem taşımakta, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Geçmişte bala isnat edilen sağlık yararlarının çoğunun herhangi bir bilimsel desteği olmadan sadece gözlem ve genellemelere dayanmaktaydı. Ancak son birkaç yıl içinde çeşitli hastalıkların tedavisinde doğal ve işlenmemiş balın faydalarını inceleyen araştırmalara ilgi artmıştır. Bu da balın bazı tıbbi etkilerinin kanıtlanmasıyla sonuçlanmıştır. Bu etkiler; kardiyoprotektif (Rakha ve ark., 2008), hipoglisemik ve hepatoprotektif (Erejuwa ve ark., 2012), antioksidan (Erejuwa ve ark., 2010), antihipertansif (Al-Waili, 2003a), antibakteriyel (Tan ve ark., 2009), antifungal (Feas ve Estevinho, 2011), antiviral (Zeina ve ark., 1996), anti-inflamatuar (Kassim ve ark., 2010) ve antitümör (Fukuda ve ark., 2011) gibi geniş bir spektruma sahiptir. Bu etkilere ilaveten gastrik ülser, gastrointestinal bozukluk, astım, enfeksiyonlu yaralar, yanıklar ve deri ülserlerinin tedavisinde de kullanılmaktadır (Anklam, 1998; Attia ve ark., 2008).

Balın antibakteriel-antifungal etkisi ve yara tedavilerinde kullanımı: Balın antibakteriyel özelliği insanlar tarafından yüzyıllardır bilinmektedir. Henüz bakterilerin enfeksiyonlara neden olduğu bilinmeden önce, enfekte yaraları tedavi etmek için 2000 yıldan uzun bir süredir bal kullanılmaktadır. Balın gram-pozitif, gram-negatif, aerob ve anaerob bakteriler dahil olmak üzere toplam 60 tür bakteri için önleyici etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Molan, 1992). Saf bal *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* gibi enteropatojenler dahil olmak üzere diğer gram negatif ve gram pozitif organizmalara bakterisit etki gösterdiği kaydedilmiştir (Radwan ve ark., 1984). Yine yapılan çalışmada balın *Pseudomonas aeruginosa*'nın tüm dayanıklı fenotipleri ve suşlarını in vitro ortamda inhibe ettiği ıspatlanmıştır (Shenoy ve

ark., 2012). Balın yüksek antimikrobiyal aktivitesi ozmotik etkisi, asitliği ve sahip olduğu hidrojen peroksit ve fitokimyasal faktörlerin bir sonucu olduğu belirtilmiştir (Jeddar ve ark., 1985).

Bal; ülser, dekubituslar, yanıklar ve yaralardan kaynaklanan diğer yüzeysel enfeksiyonlar için antibakteriyel ajan olarak kabul edilmektedir. Pek çok durumda standart antibiyotik ve antiseptik tedavilerine cevap vermeyen enfeksiyonlarda başarı ile kullanılmıştır. Balın bir yaraya uygulanarak orayı temizlemesi sadece antibakteriyel etkisinden dolayı değil aynı zamanda, periferel kandaki B-lenfosit ve T-lenfositleri de stimüle etmekte ve fagositleri aktif hale getirmektedir (Zumi ve Luto, 1989).

Yapılan çalışmalarda bal, *A. flavus* NRRL 5862 ve *A. parasiticus* NRRL 2999'un toksijenik suşları ile aynı ortama inokule edilmiş ve balın mantar çoğalmasını ve sporlanmasını azalttığı ve böylece toksin üretimini baskıladığı sonucuna varılmıştır (Wellford ve ark., 1978).

Ezz el-arab ve ark. (2006) balın intestinal mikroflora ve mikotoksinlerin toksisitesi üzerine etkisini belirlemek için yaptıkları çalışmada, balın antimikrobiyal koruyuculuk etkisinin yanı sıra, faydalı olan kolonik probiyotik bakterilerin çoğalmasını da (bifidogenik etki) sağladığı tespit edilmiştir. Böylece bal ilavesiyle probiyotik bakterilerin detoksifikasyon özellikleriyle mikotoksinlerin zararlı etkilerinin azaltıldığı bildirilmiştir.

Balın tedavi amaçlı bir madde olarak kullanılması hekimler tarafından son zamanlarda yeniden keşfedilmiş, ülser, yara ve yanıklardan kaynaklanan deri enfeksiyonları için antimikrobiyal bir madde olduğu kabul görmüştür (Allen ve ark., 1991). Postmes ve ark. (1997) yara ve yanıkların tedavisinde kullanılan krem ve antibiyotiklerin, yara izi ve yara kabuğu gibi olumsuz etkilerinin bulunduğunu, bal kullanılmasıyla bu olumsuz etkilerin ortadan kalktığını ve yanıklara karşı silver sulfadiazine yerine bal kullanılmasıyla iyileşmenin daha kısa süre içinde gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Balın antibakteriyel özelliği yara enfeksiyonlarını temizlemeye, anti-inflamatuar özelliği şişlikleri azaltmaya ve kan dolaşımını normalleştirmeye yardımcı olmakta ve iyileşmeyi hızlandırmaktadır. Balın içeriğinde hücre yenilenmesini teşvik eden enzimler de bulunmaktadır. Bu enzimler ise yaranın iyileşmesi ve yara izinin

kaybolmasını hızlandırmaktadır (Terzi, 2009). Yanık tedavisi üzerine yapılan bir çalışmada balın, yanık bölgenin kısa sürede iyileşmesini sağladığı görülmüştür. Bal, antibakteriyel özelliği nedeniyle enfeksiyonu önlemesi, yarayı tamamıyla kaplayıp su kaybını ve mikrop bulaşmasını engellemesi, baldaki enzimlerin hücre dokusunun düzelmesine katkı sağlaması, ödemi absorbe ederek yarayı temizlemesi nedeniyle tedavide çok önemli bir yere sahiptir (Terzi, 2009).

Balın bağırsak mikroflorası üzerine etkisi: Bal yararlı ve patojen olmayan bağırsak mikroorganizmalarına olumlu bir etki gösterir. İn vivo ve in vitro yapılan çalışmalar balın lactobacillusların sayısını belirgin derecede arttırdığını ortaya koymuştur (Shamala ve ark., 2000). Ayrıca balın *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus* gibi bakterilerin çoğalmasında olumlu etkilediği rapor edilmiştir (Chick ve ark., 2001).

Antidiyabetik etki: Erejuwa ve ark. (2012) ratlarda yaptıkları deneysel çalışmada, streptozotosin (STZ; 60 mg/kg) verilerek diyabet oluşturmuşlar ve ratların içme sularına bal (1 g/kg vücut ağırlığı) ilave edilmesiyle; serum AST, ALT ve ALP değerlerinde önemli oranda düşüş kaydedildiği, böylece balın antidiyabetik ve antioksidan etki göstererek karaciğeri koruduğunu bildirmişlerdir.

Erejuwa ve ark. (2010) ratlarda streptozotosin (STZ; 60 mg/kg i. P.) ile deneysel olarak diyabet oluşturdukları çalışmada, ratların sularına bal ilave (0.2 g/kg/day, 1.2 g/kg/day and 2.4 g/kg/day) edilmesiyle; vücut ağırlığı, total antiokasidan düzeyi ve CAT, SOD, GR, ve GST aktivitelerinin önemli oranda arttığı bildirmiştir. Bu sonuçların balın hipoglisemik ve antioksidan etkisiyle oluştuğu vurgulanmıştır.

Antitümöral etki: Yapılan bir çalışmada (Attia ve ark., 2008), balın tümör hücrelerinin proliferasyonu ve tümör büyüklüğü üzerinde inhibe edici etkinliği gösterilmiş ve bu etkinin makrofajlar, T-hücreleri ve B-hücreleri aktivasyonu ile oluşabileceği ifade edilmiştir. Bal, kolon kanserinin sebepleri arasında sayılan HT 29 geninin çoğalmasında, DNA hasarlarını, apoptozisi ve yangıyı baskılamak yoluyla kolon kanseri gelişimini engellediği kaydedilmiştir (Pey Wen ve ark., 2012).

Balın diğer etkileri: Yapılan bir çalışmada (Kassim var ark., 2012) balın kan parametrelerini düzelttiği, nötrofil infiltrasyonunu azalttığı ve miyeloperoksidaz

aktivitesini azaltarak organları koruduğu ortaya konmuştur. Bal ilavesiyle birlikte üre, kreatinine, ALT, AST, ALP, GGT, triglyserit, total kolesterol, kreatine kinaz ve amilaz gibi parametrelerin değerlerinde azalma meydana gelirken bikarbonat (HCO_3), alyuvar (RBC), akyuvar (WBC) gibi parametrelerin değerlerinde de artış şekillenmiştir. Sağlıklı koyunlarda yapılan bir çalışmada bal takviyesi ile kan üre nitrojen (BUN) seviyesini düşürdüğu, bununla birlikte serum protein, albumin, hemoglobin ve lökosit yüzdesinde artışa sebep olduğu kaydedilmiştir (Al-Waili, 2003b).

Deneysel olarak oluşturulan duktus koledokus obstruksiyonuna bağılı şekillenen sarılıkta serum ALT ve ADA miktarı artarak karaciğerde hasara sebep olmuştur. Bal verildiğinde karaciğerde meydana gelen bu hasarın azaldığı tespit edilmiştir. Böylece balın serum ALT ve ADA miktarını düşürerek karaciğeri koruduğu sonucuna varılmıştır (Erguder ve ark., 2008).

Balın yorgunluğa karşı direnci arttırdığı, özellikle yüksek zihinsel verimliliği desteklediği bilinmektedir. Bu yüzden hem sağlıklı hem de hastalar tarafından zayıflık durumlarında kullanılmaktadır. Ilıman iklimlerde ve önemli sıcaklık dalgalanmalarının bulunduğu bölgelerde bal, soğuk algınlığı, ağız, boğaz ve bronş enfeksiyonları için bilinen iyi bir ilaçtır. Balın buradaki faydası antibakteriyel etkiden başka, fruktozun yatıştırıcı ve rahatlatıcı etkisi ile ilgili olduğu varsayılmaktadır (Krell, 1996).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

250-300 gr ağırlığında, 5.5-6 aylık, 18 adet sağlıklı Sprague-Dawley ırkı erkek ratlar, her grupta 6 rat olacak şekilde, 3 gruba ayrılarak standart plastik rat kafeslerine yerleştirildi. Denemede parametrelere olumsuz etki edecek faktörlerin en aza indirilmesi için gerekli bütün önlemler alındı. Ortam sıcaklığı gece gündüz $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ de tutuldu. Bütün gruplar buğday, soya ve ekmek temelli diyetle ve paslanmaz kaplarda bulunan yeterli miktarda su ile beslendi. Kontrol ve tüm deneme grubundaki denekler aynı koşullarda tutuldu. Etik kurul raporu alındı.

3.2. Aflatoksinin Yeme Katılması

Aflatoksin bulundurmadağı laboratuvar kontrolleri sonucu belirlenen ticari yeme aflatoksin (AFB_1) (Sigma – Aldrich A6636 from *A.flavus*) karıştırılarak pelet yem hazırlandı ve kurutuldu. Bu amaçla hayvanların günlük yem tüketimleri belirlendi. Bir ratın günlük olarak yaklaşık 20 gr yem tükettiğı saptandı. Dolayısıyla çalışma grubunda kullanılan 12 rat günlük olarak yaklaşık 240 gr yem tüketmektedir. 10 gündeki toplam yem tüketimi 2,4 kg'dır. Aflatoksinin yeme karıştırılması, pelet yem hazırlanması ve kurutulması işlemlerinin daha kolay gerçekleştirilmesi için ve kurutma esnasında tekrar küflenme oluşmaması için 10'ar gün arayla, yani bir dönemde 2.4 kg yeme aflatoksin katılarak pelet yem hazırlandı. Bu yem tükendiğinde tekrar yem hazırlandı. Yemlerin tekrar kontamine olmaması için hazırlanan karışımlar plastik kaplara doldurularak saklandı. Yeme katılacak aflatoksin miktarının belirlenmesi ise literatür bilgisine göre; ratlarda karaciğer kanseri oluşması için en az 100-150 mikrogram/kg/gün dozda aflatoksin (AFB_1) verilmesinin gerektiğı belirtilmektedir (Ellis ve ark., 1991). Dolayısıyla bir ratın günlük olarak alması gereken en düşük toksik doz yaklaşık 20–30 mikrogram olarak belirlendi. Bu nedenle, bir ratın günlük olarak yaklaşık 20 gr yem tükettiğı dikkate alınarak kilogram yeme 1.25 mg aflatoksin katıldı.

3.3. Kimyasallar

Bu çalışmada Sigma Chemical CO. (St. Louis, MO, USA)'dan temin edilen Tiobarbiturik asit (TBA), trikloroasetik asit (TCA), etilenediaminetetraasetik asit (EDTA), metfosforik asit, 5.5'dithiobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), trihidroksimetil aminometan (Tris), 1-kloro-2.4-dinitrobenzen (CDNB), β -Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (reduced) (NADPH), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve sodyum klorid (NaCl) kullanıldı. Antioksidan enzim analiz kitleri Randox Laboratories Ltd.'den tedarik edildi.

3.4. Deneme Şeması

Deneme 90 gün olarak planlandı. 18 adet rat rastgele 3 gruba (A, B ve C) ayrıldı. Gruplardan biri kontrol grup (A) olarak sadece standart rat yemi ile beslendi. Diğer 2 grup ise çalışma grubu olarak belirlendi. Çalışma grubundaki ratlardan B grubu sadece aflatoksinli yem (yaklaşık olarak 25 μg AF/rat/gün) alırken, C grubu ratlara aflatoksinli yemle birlikte aynı zamanda literetür bilgileri ışığında (Alagwu ve ark., 2011) 10 ml içme suyuna 1 ml bal ilave edilerek deneme süresince oral olarak verildi. Bütün gruplardaki ratların; 0., 10., 30., 60. ve 90. günlerde canlı ağırlıkları ile toplam yem tüketimleri belirlendi. Deneme sonunda ketamin ile anesteziye alındıktan sonra nekropsi yapılarak histopatolojik ve biyokimyasal analizler için usulüne uygun olarak kan ve doku örnekleri alındı.

3.5. Yapılan Analiz ve İncelemeler

3.5.1. Biyokimyasal analizler

Doku ve eritrositlerdeki MDA konsantrasyonu Jain ve ark. (1989)'nın tarif ettikleri metoda göre belirlendi. Doku ve eritrositlerdeki GSH konsantrasyonu, CAT (EC 1.11.1.6) ve GR (EC 1.6.4.2) aktivitesi Beutler (1984) tarafından tarif edilen metod kullanılarak belirlendi. GST (EC 2.5.1.18) aktivitesi Mannervik ve Guthenberg (1981)'in tarif ettikleri şekilde, SOD (EC 1.15.1.1) aktivitesi ise McCord and Fridovich (1969) tarafından tarif edilen şekilde ölçüldü.

3.5.2. Karaciğer enzimleri düzeylerinin analizi

Karaciğer enzim analizleri için kan örnekleri enjektör kullanılarak kalpten alındı. 3 ml kan santrifüj tüplerine alındı ve 3000 rpm 15 dak. +4 °C de santrifüj edilerek serumlar elde edildi. Karaciğer enzim analizleri bu serumlarda yapıldı. Karaciğer enzim aktiviteleri aspartat aminotransferaz (AST) (EC2.6.1.1), alanin aminotransferaz (ALT) (EC2.6.1.2) ve gama glutamil transferaz (GGT) (EC2.6.1.3) kitleri (DPC; Diagnostic Products Corporation, CA 90045, USA) kullanılmak suretiyle otoanalizörde (BM/HITACHI-911) ölçüldü.

3.5.3. İstatistik analizler

Üzerinde durulan özellikler için tanımlayıcı istatistikler, ortalama ve standart sapma ($X \pm SD$) olarak ifade edildi. Bu özellikler bakımından grupları karşılaştırma da Tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) yapıldı. Kategorik yapıdaki patolojik değişiklikler ile gruplar arasındaki ilişki için Ki-kare testi kullanıldı. Hesaplamalarda istatistik önemlilik düzeyi % 5 olarak alındı ve hesaplamalar için MINITAB (ver: 14) istatistik paket programı kullanıldı.

3.5.4. Histopatolojik inceleme

90. günde tüm ratların ötenazi sonrası nekropsileri yapılarak organlardaki makroskopik bulgular kaydedildi. Alınan doku örnekleri %10'luk tamponlu formalin solusyonunda tespit edildikten sonra rutin takip yapılarak parafin bloklara gömüldü ve mikrotomla 4 µm'lik kesitler alındı. Kesitler hematoxilen-eozin, gerekli görülenler ise Masson's trichrom ve Sudan black boyaları ile boyanarak araştırma mikroskopunda incelendi.

3.5.5. İmmunohistokimyasal inceleme

Hazırlanan kesitler alpha-smooth muscle actin (ASMA), CD68, alpha-fetoprotein (AFP) ve p53 gen proteini tümör markırlarıyla immunoperoksidaz metoduna göre boyanarak araştırma mikroskopunda incelendi. İmmunoperoksidaz inceleme için parafin bloklardan hazırlanan kesitler adezivli lamalar üzerine alındıktan sonra, ksilol ve

alkol serilerinden geçirildi. Kesitler PBS (phosphate buffer solution) ile yıkandıktan sonra %3'lük H₂O₂ de 20 dakika tutularak endojen peroksidaz inaktive edildi. Antijen retrieval solüsyonuna (sitrata buffer) konulup üzeri kapatıldıktan sonra 20 dakika süreyle ikişer kez ısıya tabi tutuldu. Fırından çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi. Dokular yeniden PBS ile yıkandıktan sonra 20 dakika protein bloking (nonimmun serum) ile bloke edildi. Her bir doku kesitine p53 (Dako Compartmentation, carpinteria, CA 93013 USA), ASMA (Lab Vision Compartmentation, Fremont, CA 94538-6406 USA), AFP (Dako Compartmentation, carpinteria, CA 93013 USA) ve CD68 (Lab Vision Compartmentation, Fremont, CA 94538-6406 USA) serumundan (primer antikorlar) damlatılıp 37 °C de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Kesitler PBS ile yıkanıp biotinize sekonder antikor ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. PBS ile tekrar yıkanan kesitler, streptavidin-peroksidaz da 20 dakika bekletildikten sonra PBS ile aynı şekilde yıkandı. Yıkama işleminden sonra p53 ve AFP için AEC (3-amino-9-etil karbazol) kromojen damlatılarak kromojeni almasına göre 5-10 dakika bekletildi. CD68 ve ASMA doku preparatlarına ise DAP damlatılıp 5-10 dakika bekletildi. Daha sonra tüm dokular zemin boyanması için Mayer's hematoksilende 1-2 dk bekletilip zeminin boyayı almasından sonra musluk suyunda yıkandı. P53 ve AFP için sulu bir yapıştırıcı kullanılarak lamelle kapatılırken CD68 ve ASMA için entellan kullanılarak lameller kapatıldı.

4. BULGULAR

4.1. Ratların Canlı Ağırlık Sonuçları

Kontrol ve çalışma gruplarının canlı ağırlık ortalamaları standart hataları ile birlikte tablo 1’de verildi. Ratların canlı ağırlığının grup B (AFB₁)’de ($p < 0.05$) azaldığı, grup C (AFB₁ + Bal)’de ise $p < 0.05$ arttığı tespit edildi.

Tablo 1. AFB₁ ve balın ratlarda vücut ağırlığı üzerindeki etkileri.

Parametre	Kontrol (A)		AFB ₁ (B)		AFB ₁ + Bal (C)	
Vücut ağırlığı (gr)	0. gün	90. gün	0. gün	90. gün	0. gün	90. gün
	322±2.9	335±1.8*	325±2.1	312±1.9	323±1.6	334±2.3*

Her bir değer ortalama $\pm$ SD gösterir. *Kontrol grubuna göre istatistiki açıdan önemli, ^ΨB grubuna göre istatistiki açıdan önemli ($p < 0.05$) (One way ANOVA).

4.2. Biyokimyasal Bulgular

Karaciğer AST, ALT ve GGT enzim aktivite değerleri tablo 2’de sunuldu.

Tablo 2. AFB₁ ve balın ratlarda karaciğer enzim düzeyleri üzerindeki etkileri.

Parametreler	Kontrol (A)	AFB ₁ (B)	AFB ₁ + Bal (C)
AST(U/L)	161.5±39.2	248.5±66.6*	183.3±32.4 ^Ψ
ALT (U/L)	43.0±9.1	115.5±27.7*	57.2±7.3 ^Ψ
GGT (U/L)	0.1±0.04	2.8±1.2*	0.84±0.08 ^{*Ψ}

Her bir değer ortalama $\pm$ SD gösterir. *Kontrol grubuna göre istatistiki açıdan önemli, ^ΨB grubuna göre istatistiki açıdan önemli ($p < 0.05$) (One way ANOVA).

Karaciğer AST ve ALT ve GGT enzim düzeylerinin tablo 2’de incelenmesinde, kontrol (A) grubu ile karşılaştırıldığında, grup B (AFB₁)’de istatistikî açıdan önemli ($p < 0.05$) derecede arttığı izlenmektedir. Grup C (AFB₁ + Bal) değerlerinin ise grup B (AFB₁)’ye oranla istatistiksel olarak önemli oranda azaldığı görülmektedir. Deneme sonunda, bütün grupların karaciğer, akciğer, böbrek, kalp ve beyin dokularından alınan örneklerde GSH, MDA, CAT, GST, GR ve SOD enzim aktivite sonuçları tablo 3’te sunuldu. Tabloda görüleceği gibi farklı uygulamalar sonrası, eritrosit ve doku GSH, MDA, CAT, GST, GR ve SOD aktivite düzeylerinde önemli değişimler saptandı.

Tablo 3. AFB₁ ve balın ratlarda antioksidan savunma sistemi ve çeşitli dokulardaki MDA içeriği üzerine etkileri.

Doku	Parametreler	Kontrol (A)	AFB ₁ (B)	AFB ₁ + Bal (C)
Eritrosit	GSH mg/dl	39.5±0.84	38.8±1.2	43.8±1.5
	MDA nmol/ml	0.39±0.08	0.69±0.2*	0.49±0.1 ^{*ψ}
	CAT U/ml	461.1±40.4	112.6±12.1*	401.4±147.1 ^ψ
	GST U/ml	0.62±0.16	0.75±0.39	0.35±0.21
	GR U/ml	0.37±0.12	0.7±0.34*	0.85±0.29*
	SOD U/ml	428.6±10.5	443.5±3.5	436.5±13.5
Beyin	GSH mg/g	28.4±4.4	32.5±5.4	33.7±3.8
	MDA nmol/g	34.1±2.4	38.1±3.4	38.3±4.7
	CAT U/g	54.9±13.3	52.3±21.5	55.6±12.2
	GST U/g	2.6±0.3	2.6±0.3	2.8±0.5
	GR U/g	0.94±0.2	0.83±0.14	0.73±0.07
	SOD U/g	1511.7±115.2	1605.1±55.3	1631.6±55.3
Karaciğer	GSH mg/g	27.5±2.1	21.8±0.5*	24.6±1.5
	MDA nmol/g	35.4±3.04	73.7±13.8*	49.1±8.1 ^{*ψ}
	CAT U/g	79.7±13.2	30.8±13.7*	66.3±17.6 ^ψ
	GST U/g	8.8±1.2	8.7±2.7	8.5±1.6
	GR U/ml	1.34±0.1	0.85±0.11*	0.80±0.19*
	SOD U/g	1879.7±36.8	1451.9±275*	1582.5±90*
Böbrek	GSH mg/g	46.5±0.6	45.7±1.9	45.7±1.8
	MDA nmol/g	6.3±2.5	72.9±43.8*	11.9±3.1 ^{*ψ}
	CAT U/g	24.1±11.9	24.8±14.7	20.7±2.8
	GST U/g	6.5±1.1	5.3±0.3	4.6±0.4
	GR U/g	0.37±0.1	0.26±0.1	0.3±0.1
	SOD U/g	1504.7±161.8	1485.6±303.6	1468.3±250.7
Kalp	GSH mg/g	36.4±0.9	39.6±2.3	41.1±1.7
	MDA nmol/g	7.12±1.2	21.8±1.2*	8.3±3.1 ^ψ
	CAT U/g	22.8±1.5	16.7±4.1	16.7±6.3
	GST U/g	2.5±0.19	2.8±0.2	2.17±0.3
	GR U/g	1.2±0.16	1.15±0.06	1.15±0.06
	SOD U/g	1349.3±69.4	1471.3±78.5	1467.9±8.2
Akciğer	GSH mg/g	39.9±4.8	27.8±3.5*	39.4±3.2
	MDA nmol/g	11.8±2.8	73.4±11.8*	42.3±6.1 ^{*ψ}
	CAT U/g	43.5±14.2	37.5±17.6	37.5±22.3
	GST U/g	6.2±1.3	5.7±1.2	3.3±0.5
	GR U/g	1.3±0.14	1.5±0.08	1.2±0.2
	SOD U/g	1879.8±36.8	1643.6±112.1*	1582.6±89.9*

Her bir değer ortalama ± SD gösterir. *Kontrol grubuna göre istatistiki açıdan önemli, ^ψB grubuna göre istatistiki açıdan önemli (p<0.05) (One way ANOVA).

MDA verilerinin tablo 3'te incelenmesinde, kontrol (A) grubu ile karşılaştırıldığında, B (AFB₁) ve C (AFB₁ + Bal) grup ratların eritrosit ve doku MDA düzeylerinin yüksek ve aradaki farkın istatistiksel olarak ($p<0.05$) anlamlı olduğu görülmektedir. Bal katkılı C (AFB₁ + Bal) grup ratların eritrosit ve doku MDA düzeylerinin, AFB₁ (B grubu) uygulanan grup ile karşılaştırılmasında ise istatistiksel olarak ($P<0.05$) önemli derecede azalma meydana geldiği görülmektedir.

Doku ve eritrosit CAT verilerinin tablo 3'te incelenmesinde, kontrol (A) grubuna göre grup B (AFB₁)'de bulunan ratların karaciğer ve eritrosit CAT değerlerinde istatistiki olarak önemli oranda azalma ($p<0.05$) meydana geldiği görülmektedir. C grup (AFB₁ + Bal) ratların CAT değerlerinin ise kontrol (A) grubunun değerlerinden farklı olmadığı görülmektedir.

Doku ve eritrosit SOD verilerinin tablo 3'te incelenmesinde, kontrol (A) grubu ile karşılaştırıldığında, diğer uygulama gruplarının karaciğer ve akciğer SOD değerinde istatistiki olarak önemli ($p<0.05$) oranda azalma meydana geldiği görülmektedir.

Doku ve eritrosit GSH verilerinin tablo 3'te incelenmesinde, kontrol (A) grubu ile karşılaştırıldığında B (AFB₁) grup ratların karaciğer ve akciğer dokularının GSH değerinde istatistiksel olarak önemli oranda azalma meydana geldiği görülürken, C grup (AFB₁ + Bal) ratlarda bu değer kontrol (A) grubuna göre değişmediği görülmektedir.

4.3. Makroskopik Bulgular

Çalışma süresi sonunda grup A (kontrol) ve grup C (AFB₁ + Bal)'deki ratlarda canlı ağırlık artışı meydana geldi. Grup B (AFB₁)'de ise canlı ağırlığın azaldığı tespit edildi. Kontrol ve deneme gruplarında, aflatoksin verilmeye başlanmasından 90. güne kadarki sürede ratlarda ölüm görülmedi. Organlardaki makroskopik değişimlere sadece grup B (AFB₁)'deki ratların karaciğerlerinde rastlandı. Bu karaciğerlerin yer yer hafif solgun renkli olduğu saptandı.

4.4. Histopatolojik Bulgular

İncelemeler sonucunda karaciğer ve böbreklerde gözlenen bulgular tablo 4'de özetlendi ve gruplar arasındaki farklar belirtildi.

4.4.1 Grup A (Kontrol)

Bütün olgularda organların normal histolojik görünümü gözlemlendi (Şekil 1).

4.4.2. Grup B (AFB₁)

Karaciğer: Bu gruptaki bütün ratların karaciğerlerinde şiddetli histopatolojik değişimler gözlemlendi. Bütün olgularda baskın olarak tespit edilen lezyonlar, geniş sahalar halinde hidropik dejenerasyon ve nekroz alanları ile yer yer displastik hepatositlerin varlığıydı. Karaciğer lopçuklarının özellikle periasiner ve intermedier bölgelerinde, geniş odaklar halinde hepatositlerin sitoplazmasının granüler bir hal almasıyla karakterize bulanık şişkinlik ya da vakuoler-hidropik dejenerasyon belirlendi. Bu hepatositlerin genellikle çekirdekleri koyu boyanmış ve piknotikti. Çoğunlukla çevresindeki hepatositlerden belirgin bir şekilde ayrılan bu dejeneratif odakların genişliği bazen lopçuğun yarısını ya da tümünü kapsayacak kadar yaygındı. Özellikle dejenerasyonlu hücre topluluklarında olmak üzere, kimi hepatositlerin sitoplazmasında değişik büyüklüklerde vakuollerin oluştuğu, özel yağ boyamaları ile bu vakuollerin yağlanma ile ilgili olduğu belirlendi. Kısmen normal görünümlü hepatositlere genellikle periportal bölgelerde ve dejeneratif odaklar arasında kalan parankimde rastlandı, ancak bu bölgelerde de sıklıkla fokal nekrozlar şekillenmişti (Şekil 2-3). Bu alanlarda bazı hücrelerin çekirdekleri piknotik ya da karyoreksize, sitoplazmaları ise koyu eozinofilik boyanmış ya da lize olmuştu. Genel olarak hepatositlerin çekirdeklerinin farklı büyüklüklerde olduğu ve farklı derecelerde boya aldığı, bazı hepatositlerin çift çekirdekli, bazı hepatositlerin ise belirgin 2-4 çekirdekçiğe sahip olduğu dikkati çekti. Ayrıca kimi dejenere hepatositlerin nükleuslarında marjinal hiperkromazi ve çekirdek içinin boş olduğu görüldü (Şekil 6). Özellikle periasiner bölgelerde olmak üzere dejeneratif bazı hepatositlerin hem sitoplazma hem de çekirdeğinin çok büyük ve anormal şekilli olduğu (megalositozis) gözlemlendi (Şekil 4). Bazı dejeneratif hepatositlerde mitotik figürlere de rastlandı. Şiddetli dejenerasyonlar sonucu remark kordonlarının dizilişi bozulmuş, ayrıca şiddetli dejeneratif hücre odaklarının çevresindeki parankimde de kompresif atrofi şekillenmişti. Bazı venalarda ve sinuzoidlerde hiperemi, perisinüzoidal hücre artışı ve intrahepatik kolestazis (Şekil 6) gözlemlendi. Beş olguda bazı portal bölgelerde safra kanalları sayısında artış (Şekil 5) ve epitellerinde hiperplazi ile

portal bölgelerde fokal mononükleer hücre infiltrasyonları görüldü. Portal aralıklarda bağdoku artışı gözlenmekle birlikte, bu bölgelerden parankime doğru yayılan bağdoku proliferasyonu saptanmadı.

Böbrek: Bu gruptaki bütün ratların böbreklerinde, daha çok kortekste olmak üzere, histopatolojik değişimler gözlemlendi. Bu değişiklikler; proksimal tubul epitel hücrelerinde dejenerasyon ve koagülasyon nekrozu (tubulonefroz), tubulus epitelinde megalositik hücreler, arterioller ile glomeruler ve intersitisyel kapillarlarda belirgin hiperemi şeklindeydi (Şekil 8). Ayrıca medullada bazı tubulusların lümeninde hiyalin silindirleri görüldü (Şekil 9).

Akciğer: Peribronşiyal, peribronşiyoler ve perivasküler olarak mononükleer hücre infiltrasyonu görüldü. Bronş ve bronşiyollerin submukoza ve propriya mukozasında da benzer hücre infiltrasyonu saptandı. Bronş ve bronşiyol duvarlarında musküler hiperplazi ile mukozanın lümenine doğru papillar uzantılar oluşturduğu dikkati çekti. İnteralveoler septumlarda hiperemi ve lenfoid hücre infiltrasyonu sonucu kalınlaşma görüldü (intersitisyel pnömoni) (Şekil 11). Ayrıca bazı alveollerde de amfizem şekillenmişti.

4.4.3. Grup C (AFB₁ + Bal)

Karaciğer: Bu grup ratların tamamının karaciğerlerinde değişikliklere rastlandı, fakat bu değişikliklerin grup B (AFB₁) ile oranlandığında önemli ölçüde azaldığı veya tersine döndüğü görüldü. Bu grup ratların karaciğerlerinde geniş hidropik dejenerasyon alanlarının ve nekrotik değişikliklerin olmadığı saptandı. Lezyonların bazı lobüllerde ve daha az sayıda hücreden oluşan dejeneratif hücre odakları şeklinde olduğu belirlendi (Şekil 7). Fakat lobullerin yapısı bozulmamıştı. Ayrıca seyrek olmakla birlikte bazı apoptotik ve displastik hücreler ile megalositik hepatositlere de rastlandı. İki olguda safra kanalı proliferasyonuna rastlanırken, bir olguda da hafif periportal fibrozis şekillendiği görüldü.

Böbrek: Bu grup ratların böbrekleri kontrol grubu ile benzer histolojik görünümdeydi. Fakat seyrek olarak bazı tubul epitel hücrelerinde dejenerasyon ve

nekroz şekillendiği görüldü. Ayrıca kapillar hiperemi mevcuttu (Şekil 10). Grup B (AFB₁) ratların tubul epitel hücrelerinde görülen megalositik hücelere ise rastlanmadı.

Akciğer: İki olguda peribronşiyal ve perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu ile alveolar amfizem görüldü. Diğer olgular ise kontrol grubuyla benzer bulgulara sahipti.

Tablo 4. AFB₁ ve balın ratlarda karaciğer ile böbreklerdeki patolojik etkileri.

Karaciğerde şekillenen makroskopik ve mikroskopik lezyonlar	Kontrol Grup (A)	Grup B (AFB ₁)	Grup C (AFB ₁ + Bal)	P Değeri
1. Büyüme ve Solgunluk	-/6 ^b	2/6 ^a	-/6 ^b	*
Hafif	*	2	*	
Orta	*	*	*	
Şiddetli	*	*	*	
2. Hidropik Dejenerasyon	-/6 ^b	6/6 ^a	6/6 ^c	**
Hafif	*	*	4	
Orta	*	2	2	
Şiddetli	*	4	*	
3. Displastik hepatositler	-/6 ^b	6/6 ^a	4/6 ^c	**
Hafif	*	*	2	
Orta	*	3	2	
Şiddetli	*	3	*	
4. Safra kanalı proliferasyonu	-/6 ^b	5/6 ^a	2/6 ^c	**
5. Periportal fibrozis	-/6 ^b	6/6 ^a	1/6 ^b	*
Hafif	*	2	1	
Orta	*	2	*	
Şiddetli	*	2	*	
Böbrek epitel hücrelerinde dejenerasyon ve nekroz	-/6 ^b	6/6 ^a	2/6 ^b	*
Hafif	*	2	2	
Orta	*	4	*	
Şiddetli	*	*	*	
Böbrek epitel hücrelerinde megalositozis	-/6 ^b	6/6 ^a	-/6 ^b	*
Hafif	*	2	*	
Orta	*	*	*	
Şiddetli	*	*	*	

a,b,c: aynı satırda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (*: p< 0.05, ** p < 0.01).

4.4.4. İmmunohistokimyasal bulgular

Alfa düz kas aktin (ASMA): Grup A (Kontrol)'da bulunan ratların karaciğerlerinde boyanmalara rastlanmadı (Şekil 12). Fakat hem grup B (AFB₁)'de hem de grup C (AFB₁ + Bal)'de boyanmalar görüldü. Özellikle dejeneratif ve nekrotik hücrelerin bulunduğu yerlerde yoğun boyanma alanlarına rastlandı. Grup B (AFB₁)'de bu odaklar ve hücreler fazla olduğu için bu grup ratların karaciğerlerinde daha yoğun boyanma alanları gözlenirken (Şekil 13), grup C (AFB₁ + Bal)'de boyanma alanlarının daha az olduğu tespit edildi (Şekil 14).

CD68: Bütün grupların karaciğer dokularında perisinüzoidal hücrelerden Kupffer hücrelerinin boyandığı görüldü. Boyanmaların deneme gruplarında daha yoğun olarak gerçekleştiği dikkat çekti (Şekil 15-16). Her bir preparatta 40 büyütmede on alan seçilerek Kupffer hücrelerinin çekirdekleri esas alınarak sayıldı ve ortalamaları alındı. Daha sonra her gruptaki bütün preparatların ortalaması alınarak elde edilen değerlerin gruplar arasındaki farkının anlamlı olup olmadığı ANOVA testine göre hesaplandı. Tablo 5'in incelemesinde görüldüğü gibi Kupffer hücre sayısındaki artış kontrol grubu ile deneme grupları arasında anlamlı olduğu ($p<0,05$), ancak deneme grupları arasında farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p<0,05$) görülmektedir.

Tablo 5. AFB₁ ve balın Kupffer hücre sayısı üzerine etkileri.

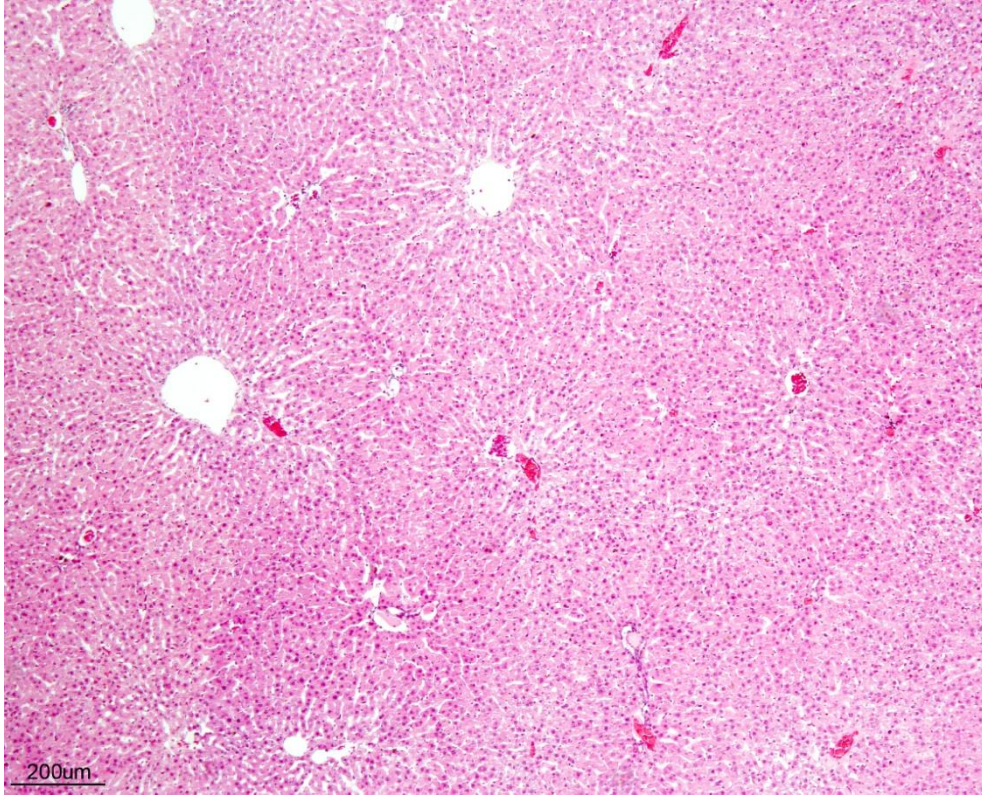
Grup	Kontrol (A)	AFB ₁ (B)	AFB ₁ + Bal (C)
Ortalama	51.73±8,24	79.17±3.92*	81.83±7,55*

Her bir değer ortalama $\pm$ SD gösterir. *Kontrol grubuna göre istatistiki açıdan önemli, ^ΨB grubuna göre istatistiki açıdan önemli ($p<0.05$) (One way ANOVA).

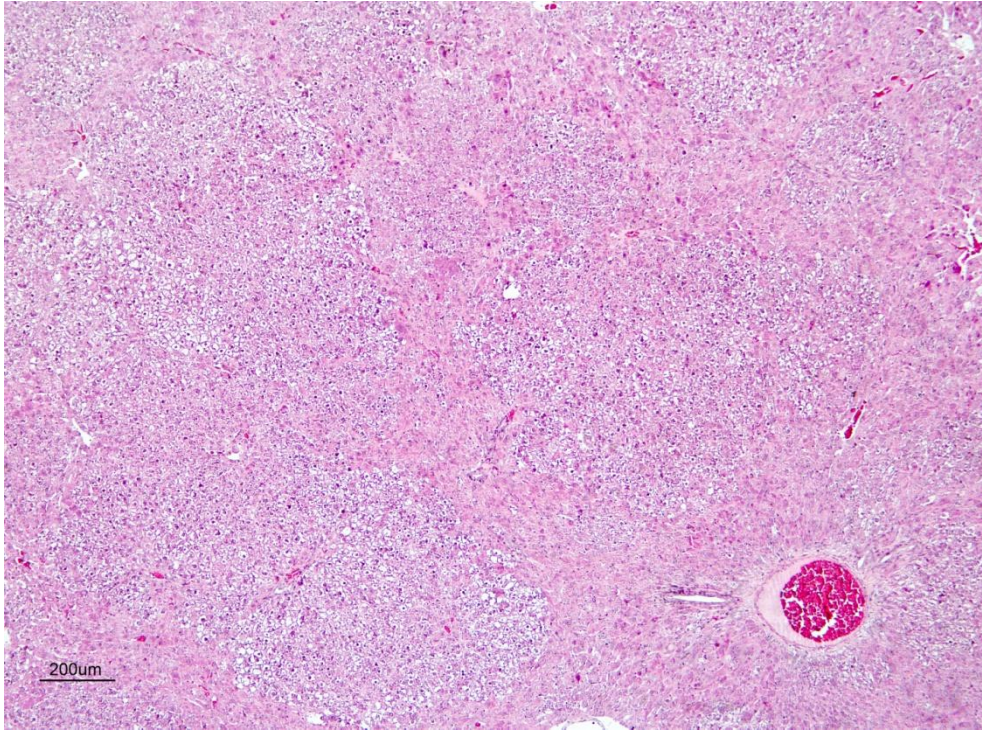
Alpha-fetoprotein (AFP): Grup B (AFB₁)'de fokal olarak hepatositlerin sitoplazmasında, genellikle ince granüller şeklinde boyanma saptandı. Boyanmalar özellikle periasiner bölgedeki normal görünümlü hepatositlerde, bazen de hidropik dejenerasyonlu hücre topluluklarının içindeki hepatositlerde olduğu gözlemlendi. Ancak dejeneratif hücrelerdeki boyanmaların daha az olduğu görüldü (Şekil 17). Diğer gruplarda (A ve C) herhangi bir immunoreaksiyon saptanmadı.

P53 gen proteini: Bütün gruplarda boyanmalara rastlanmadı.

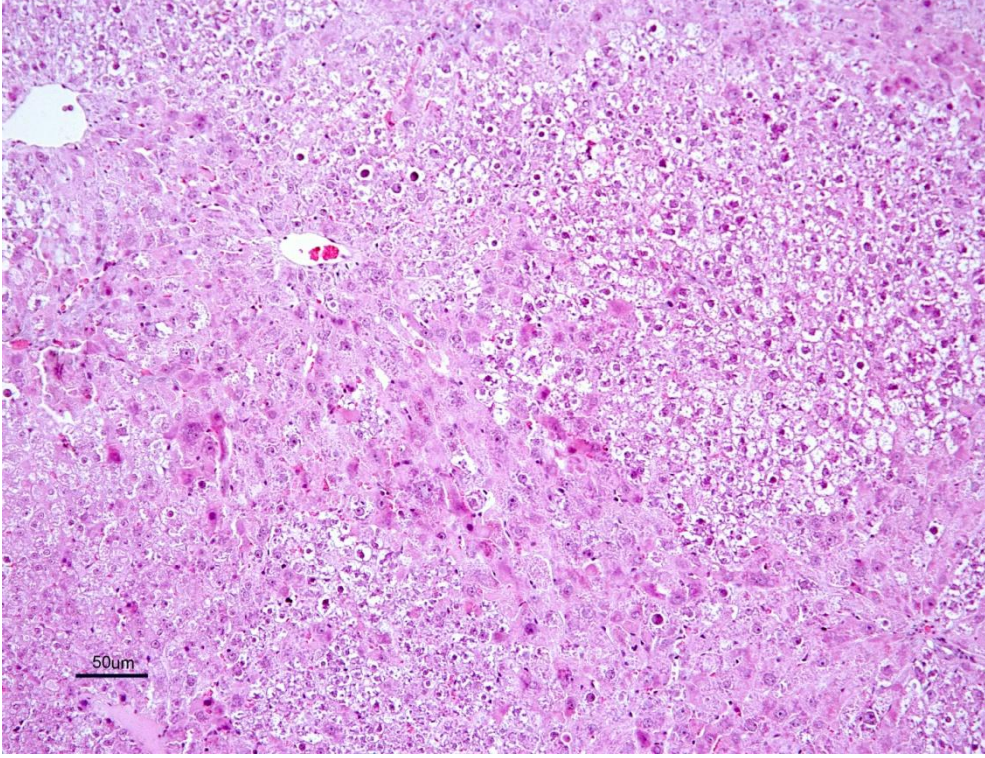
4.4.5. Mikroskopik şekiller



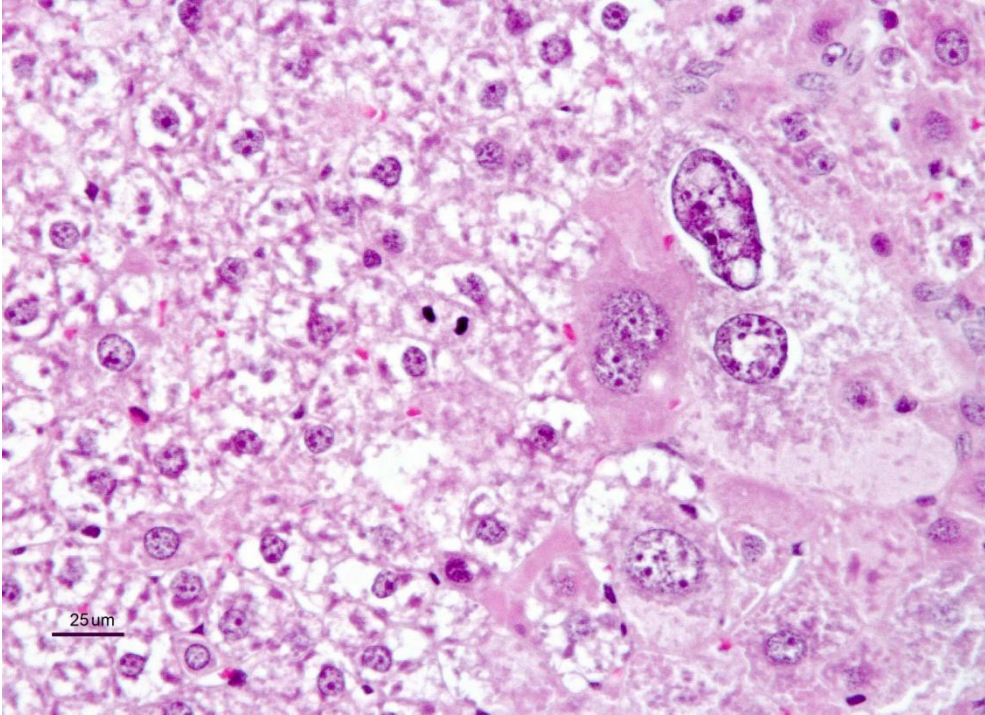
Şekil 1. Grup A (Kontrol): Karaciğerin normal histolojik görünümü. H. E. Bar=200µ.



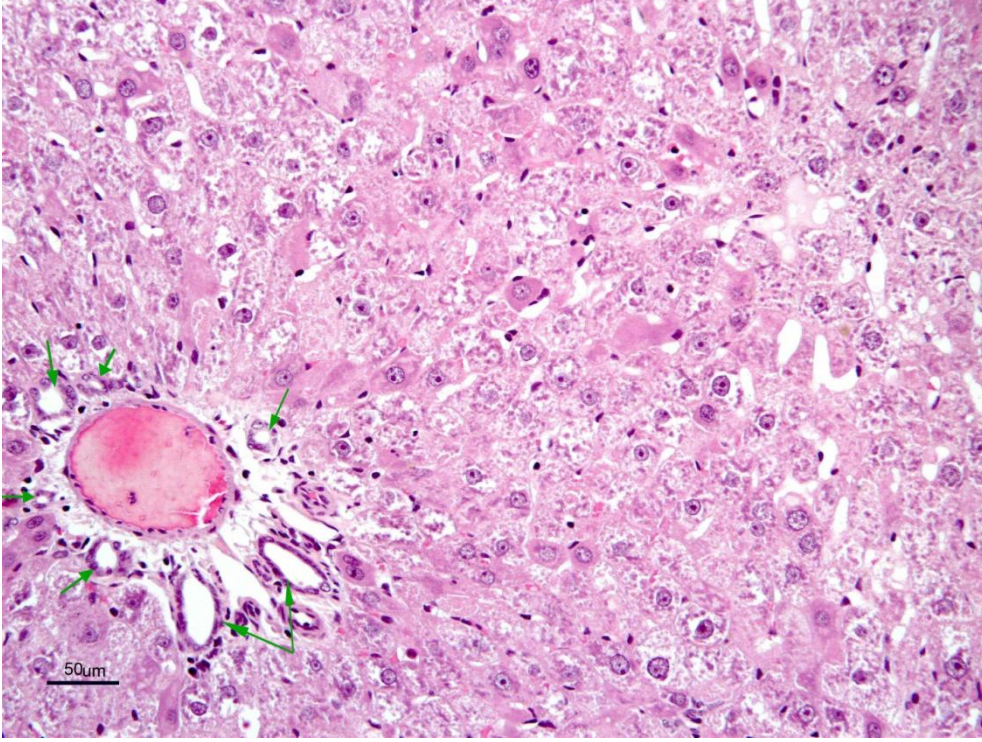
Şekil 2. Grup B (AFB₁): Geniş odaklar halinde hepatositlerde dejenerasyon ve nekroz. H. E. Bar=200µ.



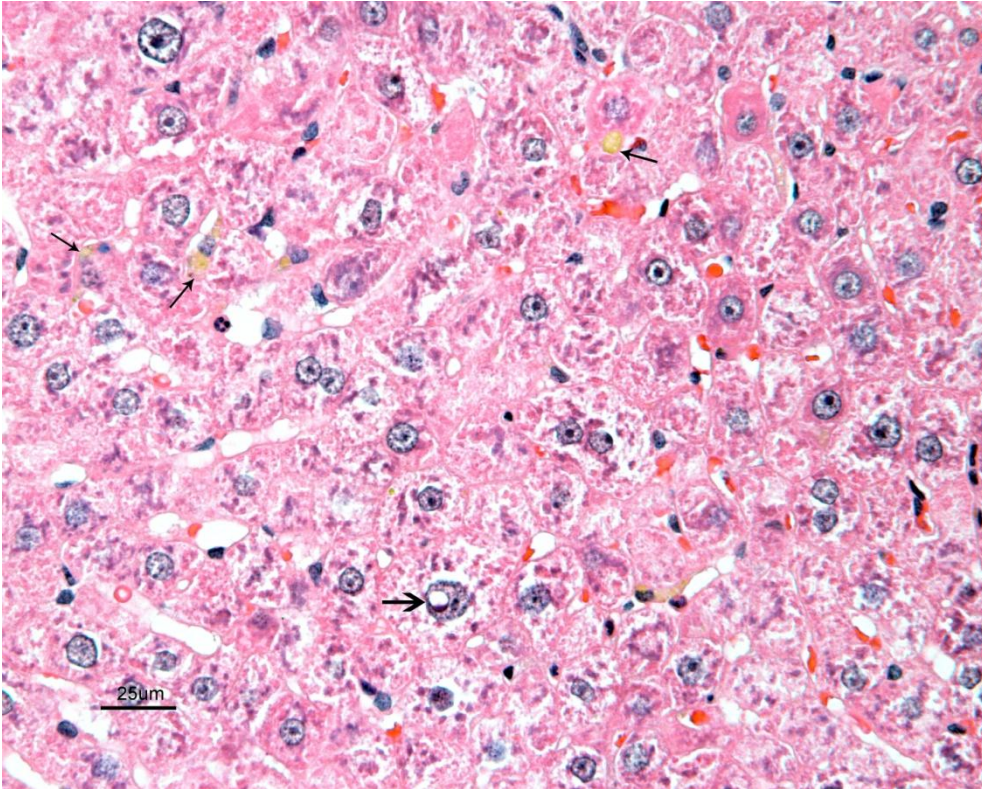
Şekil 3. Grup B (AFB₁): Hepatositlerde dejenerasyon ve nekroz. H. E. Bar=50µ.



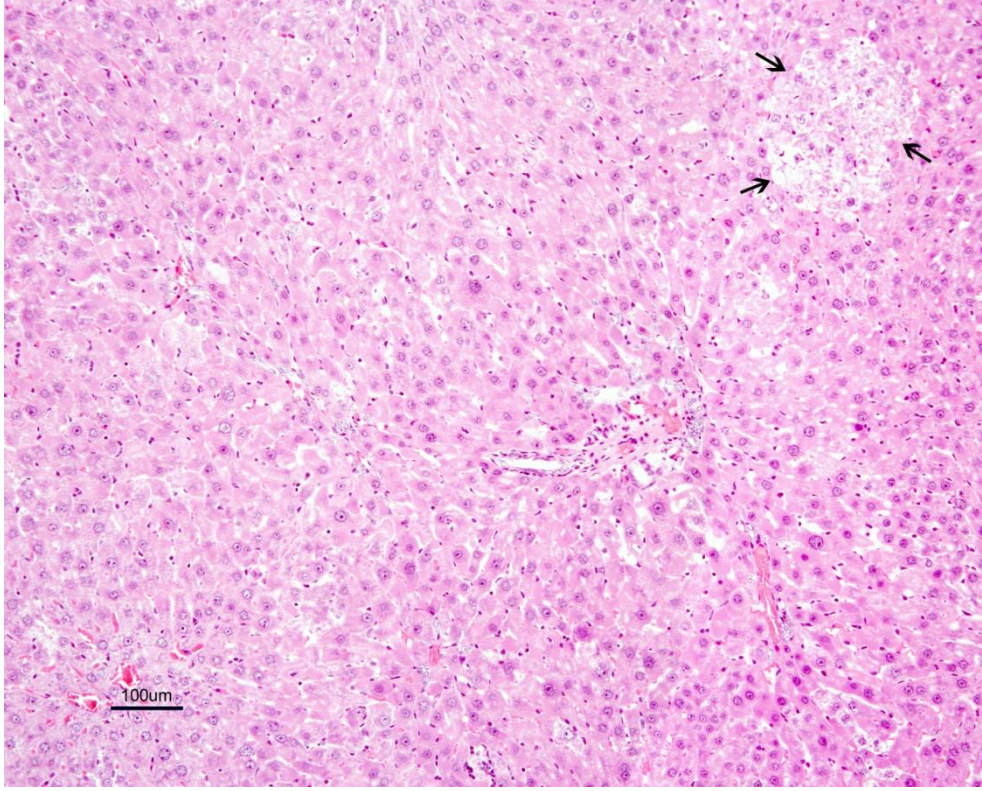
Şekil 4. Grup B (AFB₁): Hepatositlerde dejenerasyon ve megalositik hücreler. H. E. Bar=25µ.



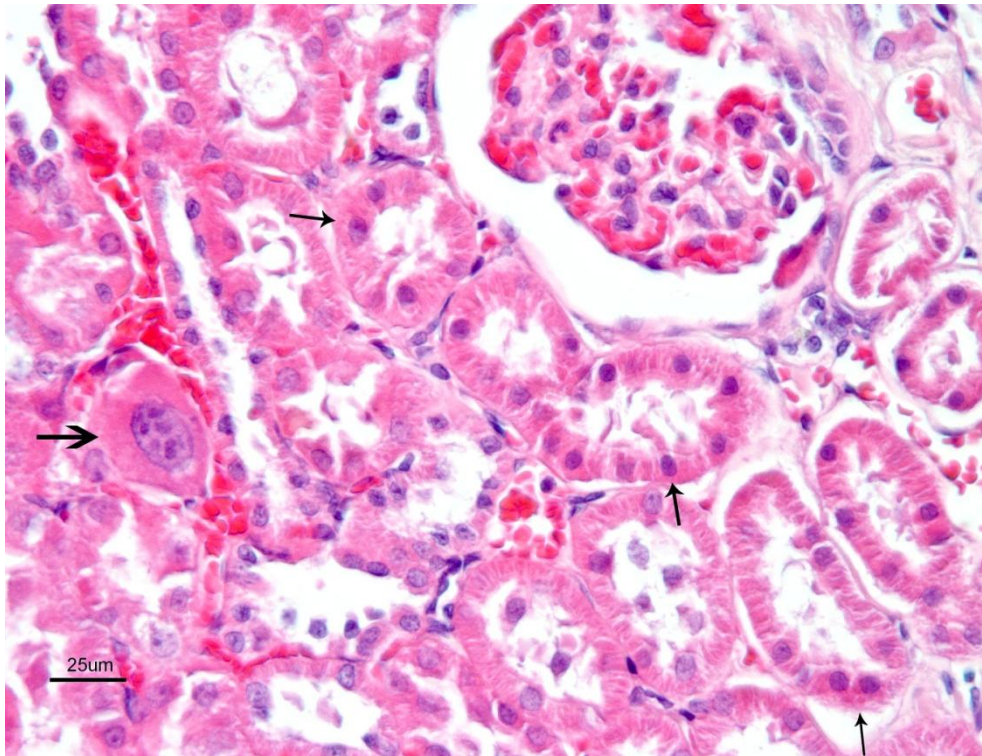
Şekil 5. Grup B (AFB₁): Normal safra kanalları (bitişik oklar) ve proliferate safra kanalları (küçük oklar). Bar=50µ.



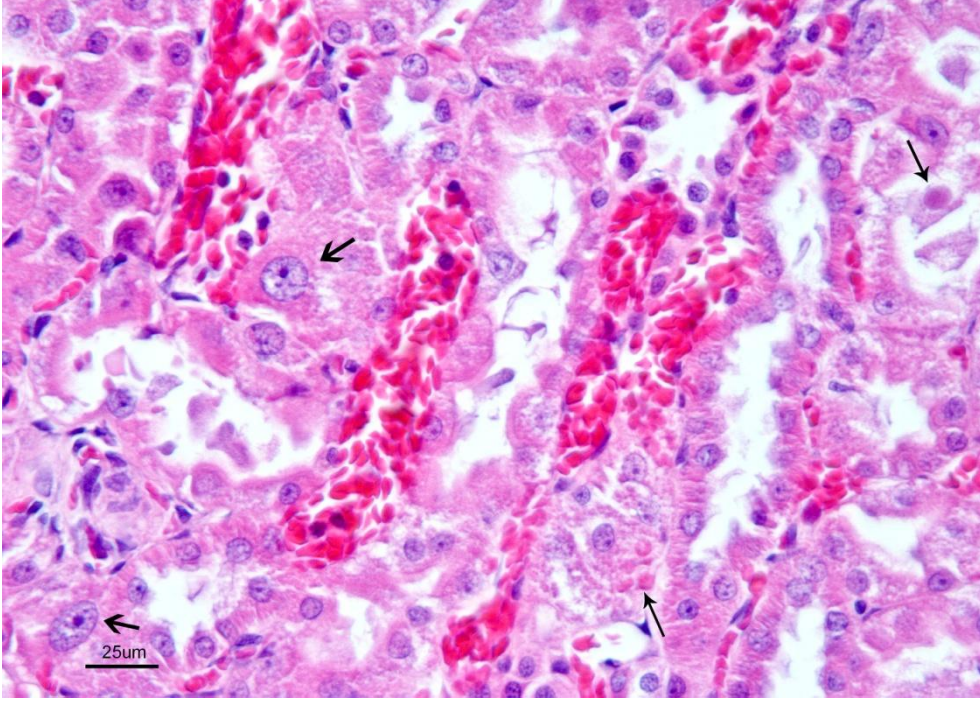
Şekil 6. Grup B (AFB₁): İntrahepatik kolestazis (ince oklar) ve veziküler çekirdek (kalın ok). H. E. Bar=25µ.



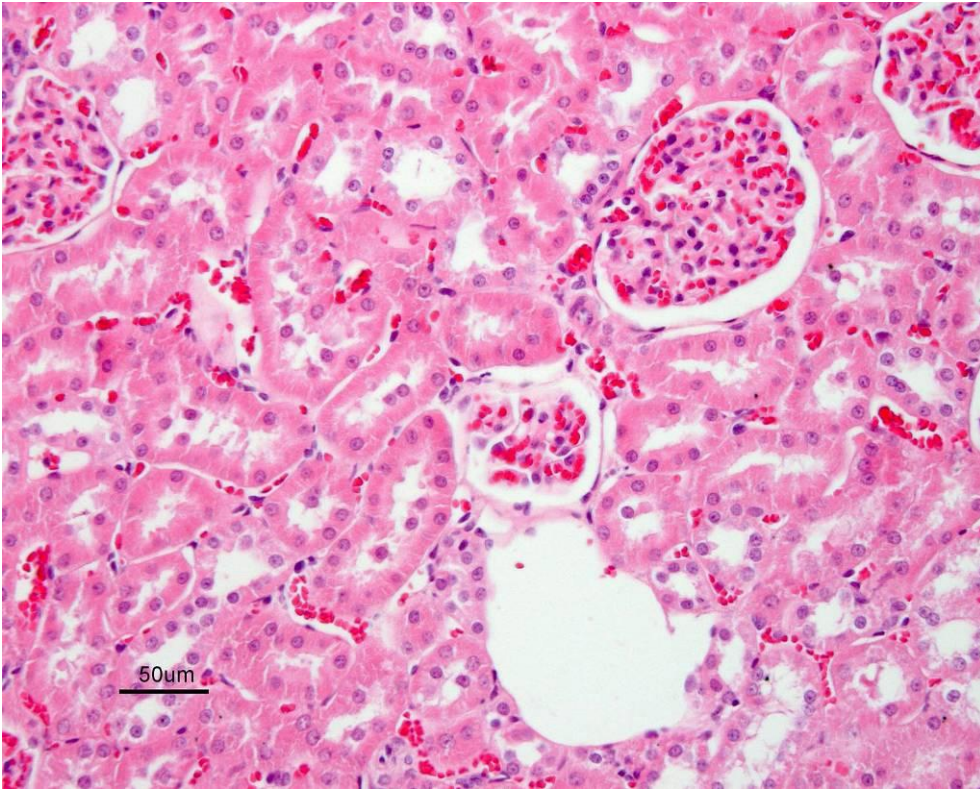
Şekil 7. Grup C (AFB₁ + Bal): Parankimde tek tük dejeneratif ve displazik hepatositler ile fokal dejeneratif hücre topluluğu (oklar). H. E. Bar=100µ.



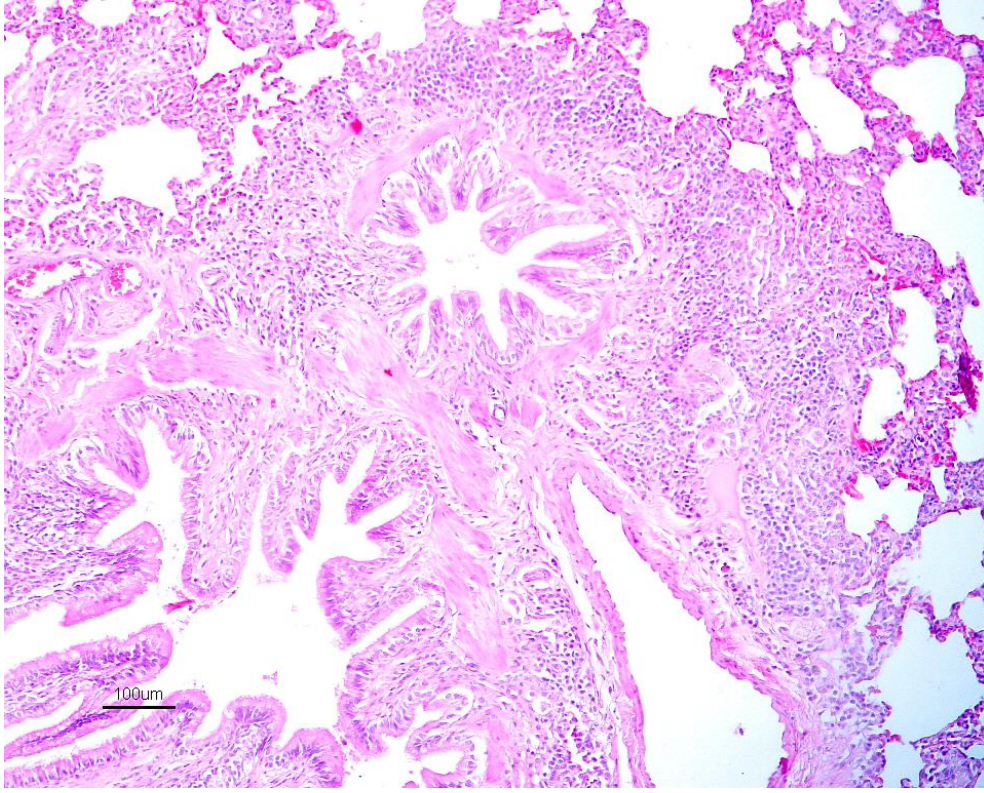
Şekil 8. Grup B (AFB₁): Böbrek proksimal tubulus epitellerinde nekroz (ince oklar) ve megalositik tubul epitel hücresi (kalın ok) ile kapillar hiperemi. H. E. Bar=25µ.



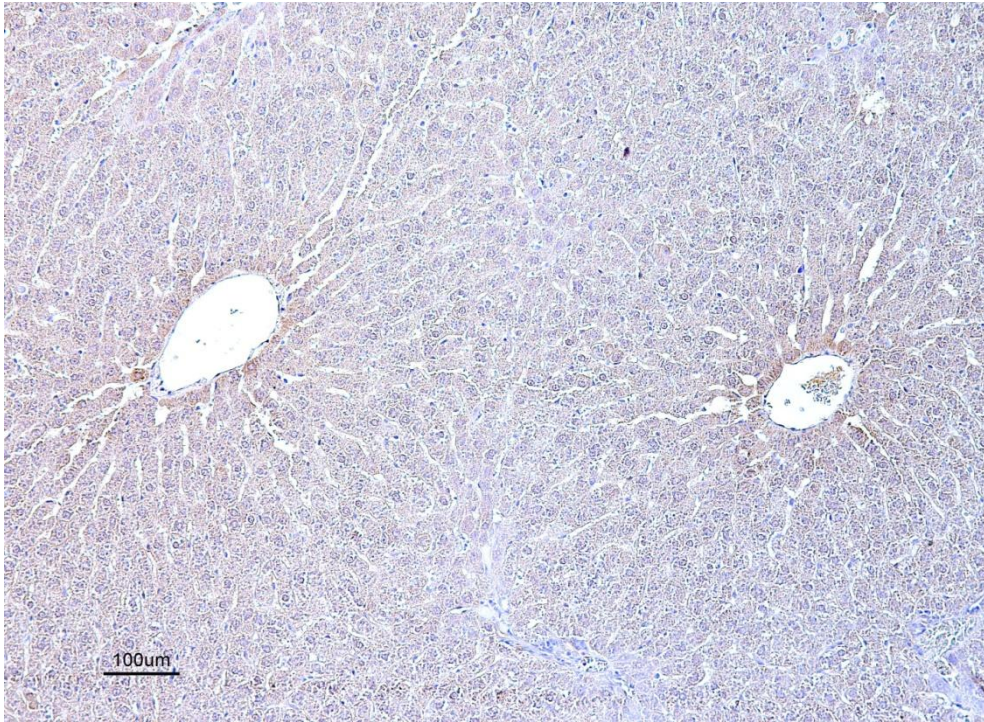
Şekil 9. Grup B (AFB₁): Tubul epitel hücrelerinde megalositozis (kalın oklar) ve hücre sitoplazmasında hiyalin damlacıkları (ince oklar). H. E. Bar=25µ.



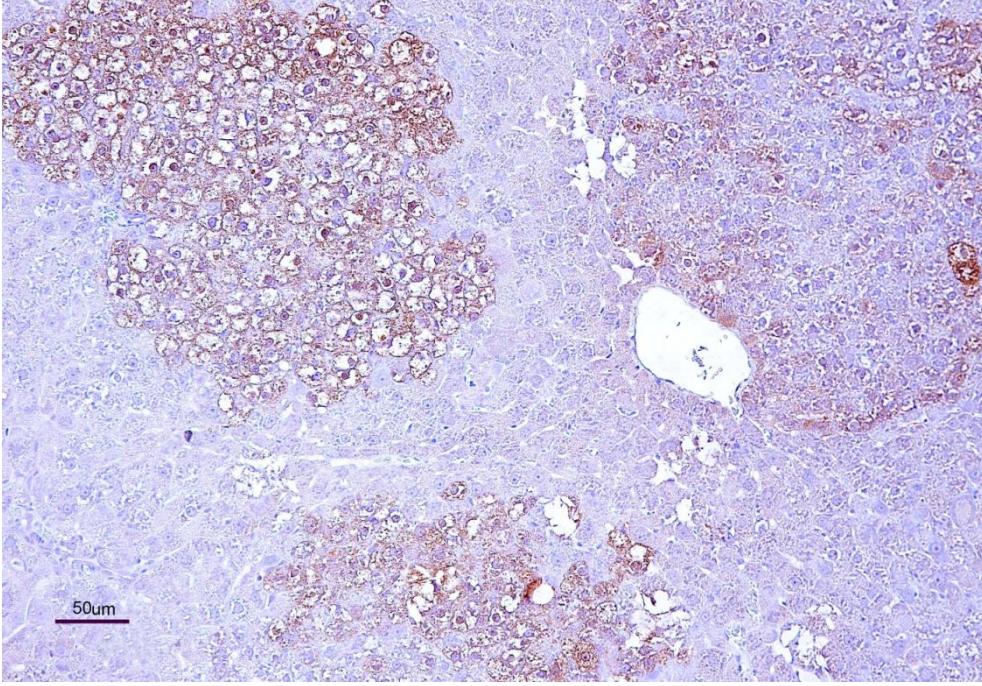
Şekil 10. Grup C (AFB₁ + Bal): Bazı proksimal tubul epitellerinde hafif dejenerasyon ve nekroz. H. E. Bar=50µ.



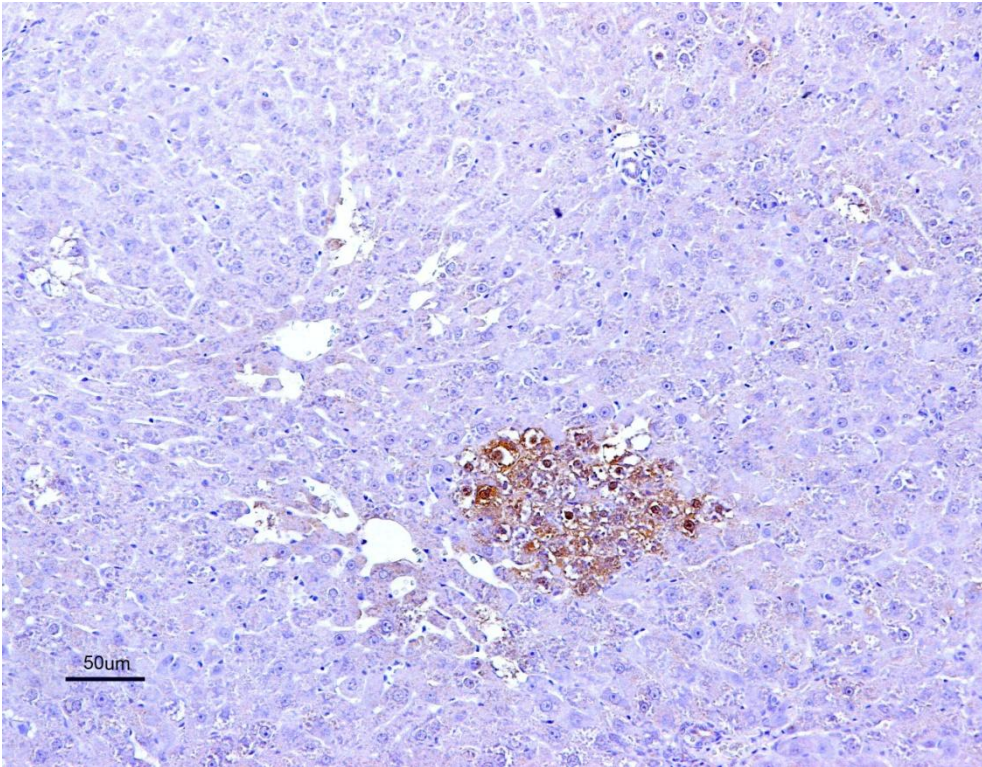
Şekil 11. Grup B (AFB₁): Peribronşiyal, peribronşiyoler ve perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu ile muskuler tabakada hiperplazi ve interalveoler septumlarda kalınlaşma. H. E. Bar=100µ.



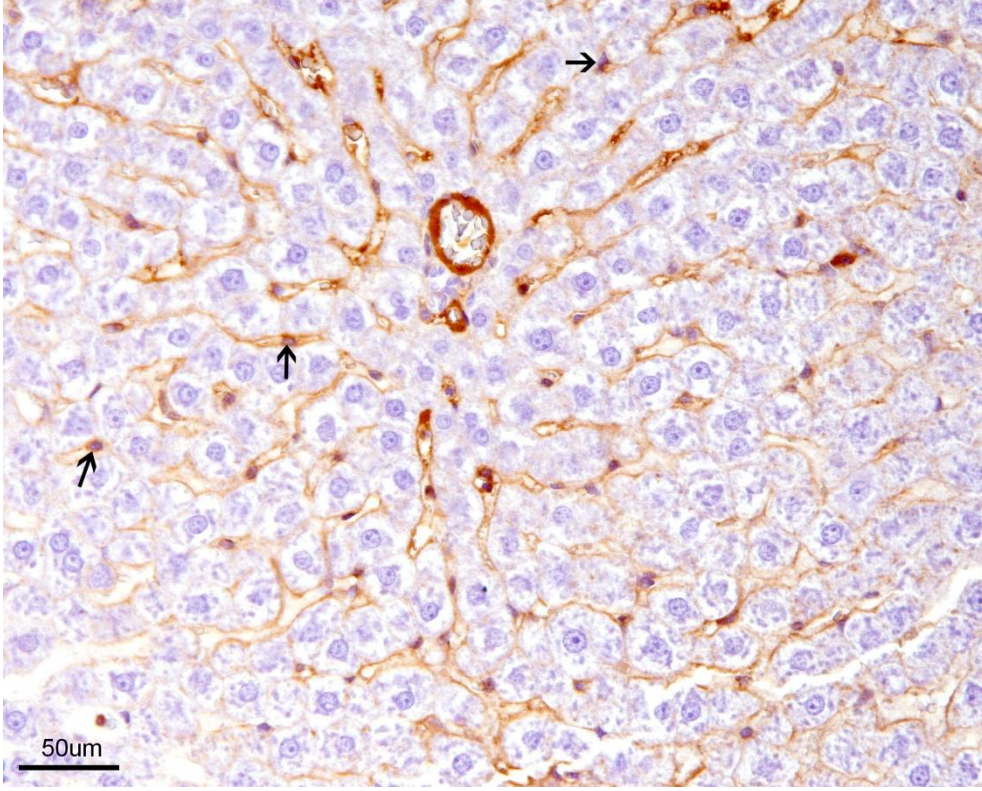
Şekil 12. Grup A (Kontrol): ASMA negatif normal karaciğer dokusu. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen. Bar=100µ.



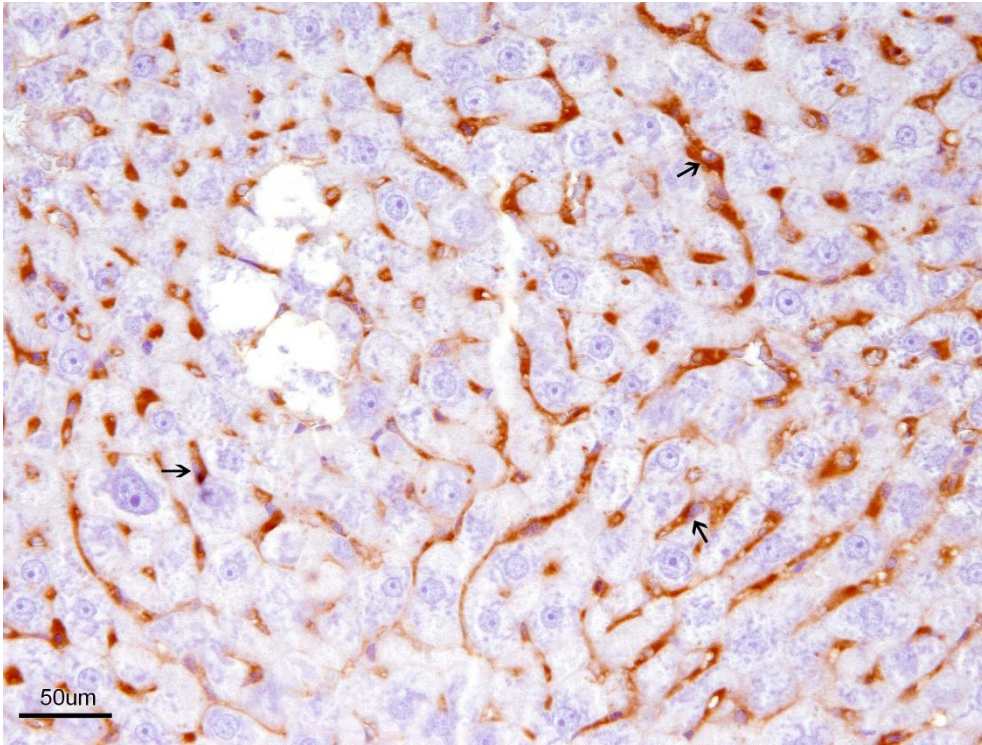
Şekil 13. Grup B (AFB₁): Dejeneratif ve nekrotik hücrelerin bulunduğu odaklarda ASMA pozitif immunreaksiyon. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen. Bar=50µ.



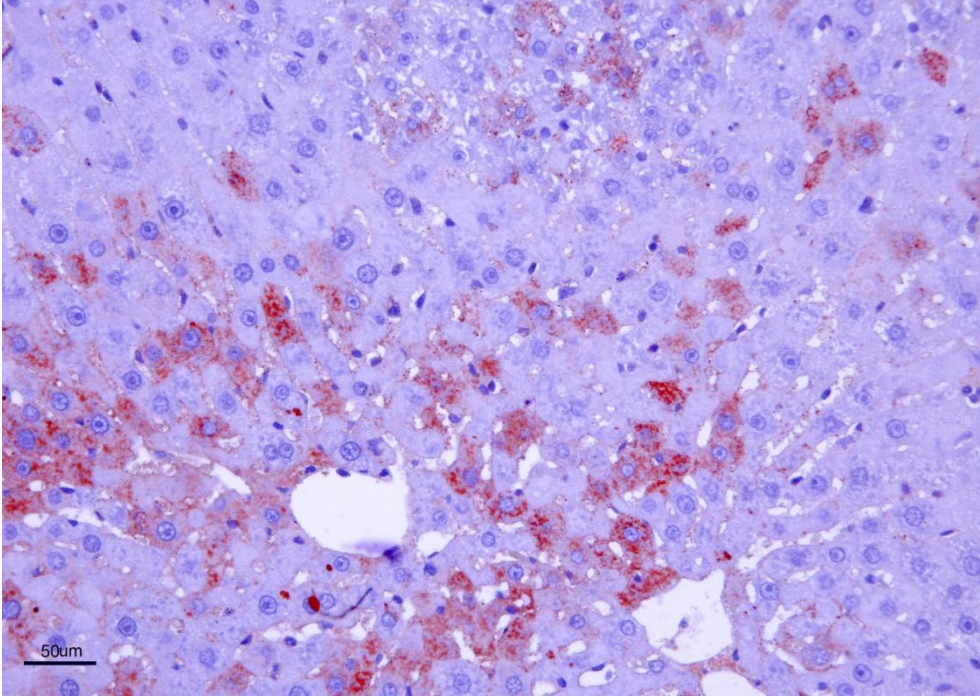
Şekil 14. Grup C (AFB₁ + Bal): Periasiner bölgede dejeneratif ve nekrotik hücre odağında ASMA pozitif immunreaksiyon. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen. Bar=50µ.



Şekil 15. Grup A (Kontrol): CD68 pozitif Kupffer hücreleri (oklar). İmmunoperoksidaz-Hematoksilen. Bar=50µ.



Şekil 16. Grup B (AFB₁): CD68 pozitif kupffer hücreleri (oklar). İmmunoperoksidaz-Hematoksilen. Bar=50µ.



Şekil 17. Grup B (AFB₁): Hepatositlerin sitoplazmasında alpha-fetoprotein antijenleri. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen. Bar=50µ.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Canlı Ağırlık Artışları

Yapılan çalışmalar, AFB₁ alan ratların canlı ağırlıklarında azalma meydana geldiğini göstermiştir (Theumer ve ark., 2003; Yener ve ark., 2009). Farelerde doz ve süreye bağlı olarak %37-55 arasında canlı ağırlıklarda azalmanın gözlemlendiği belirtilmektedir (Tuzcu, 1999). Aflatoksikozis sonucu protein sentezinin engellendiği ve hipoproteineminin şekillendiği, böylece canlı ağırlıkta azalma meydana geldiği vurgulanmıştır (Huff ve ark., 1986). Sunulan bu çalışmada, tablo 1’de gözlemlendiği gibi, 0. gün ile 90. günlerdeki canlı ağırlık ortalamaları dikkate alındığında, grup A’da (kontrol) canlı ağırlık artışı görülürken ($P<0.05$), diğer deneme gruplarından grup B (AFB₁)’de canlı ağırlıkta azalmanın gerçekleştiği ($P<0.05$), grup C (AFB₁ + Bal)’de ise ağırlıkların arttığı görülmektedir. Tablo 1’deki canlı ağırlık ortalamaları dikkate alındığında, aflatoksikozis sonucu grup B (AFB₁)’deki ratların karaciğerlerinde histopatolojik olarak saptanan şiddetli dejenerasyon ve nekroz nedeniyle karaciğer fonksiyonlarının engellenmesi sonucu canlı ağırlık kaybının şekillendiği; grup C (AFB₁ + Bal)’de ise ilave edilen balın karaciğer hasarını önlemesine bağlı olarak canlı ağırlık kaybının önlemlendiği düşünülmektedir. Ayrıca bal, alınan gıdaların sindirim sisteminde emilimini arttırması yanında uzun ve karmaşık sindirim işlemlerine gerek kalmadan hemen kullanılabilir kalori sağlamasından dolayı da (Krell, 1996) canlı ağırlık artışı meydana gelmiş olabilir.

5.2. Biyokimyasal Sonuçlar

Kuantum kimyasına göre ancak iki elektron bir bağın yapısına girebilir ve oluşan elektron çiftleri oldukça kararlıdır. Yeterli bir enerji kaynağı veya genelde kimyasal etkiler ile bu bağ kopabilir. Bir bağ koptuğunda elektronlar ya birlikte kalır ya da ayrılırlar. Eğer birlikte kalırlarsa oluşan atom bir iyon olur. Eğer ayrılırlarsa da serbest radikal olarak adlandırılan bir veya daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip kısa ömürlü, kararsız, kimyasal reaktifleri yüksek molekül veya atomlar oluşur (Akkuş, 1995). Bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjilidir ve eşleşmiş elektronları ayırıp fonksiyonlarına engel olurlar. Sonuçta, serbest radikal kendine bir çift elektron alarak elektron çifti

haline geçer, diğer elektron serbest radikale dönüşür (Aydemir ve Sarı, 2009). Serbest radikaller, oksidatif reaksiyonlar sonucu lipid, protein ve nükleik asitler gibi vücutta bulunan bileşiklere zarar vermekle birlikte (Halliwell ve Gutteridge 1986), en zararlı etkilerini, en hassas bileşikler olan lipitler üzerinde gösterirler. Hücresel membranların yapısında yer alan doymamış fosfolipidler ve kolesterol, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu meydana getirir (Niki, 1987). Doymamış yağ asitlerinin bir tip oksidatif yıkımlanma şekli olan lipid peroksidasyonu, membran yapısında değişiklikler ve enzim inhibisyonu ile ilişkilidir (Ravi ve ark., 2001). Bununla birlikte lipid peroksidasyonu; karsinogenezis, mutagenesis, yaşlanma ve arteriosklerozis gibi hastalıkların oluşumundan sorumlu tutulmaktadır. Bu gibi hastalıklarda aktif oksijen ve serbest radikallerin doku hasarında önemli role sahip oldukları bilinmektedir (Yagi, 1994).

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada antioksidan olarak ifade edilen koruyucu mekanizmalar vardır. Organizmada bulunan endojen ve eksojen antioksidanlar reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Endojen kaynaklı antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. SOD, GSH-Px, GR, GST, CAT ve mitokondriyal sitokrom oksidaz başlıca enzimatik endojen antioksidanlardır. GSH, transferrin, sistein ve ürik asit ise enzimatik olmayan endojen antioksidanlardır. Eksojen antioksidanlar ise; vitaminler ve ilaç antioksidanları olarak sınıflandırılır (Akkuş, 1995).

Bu koruyucu mekanizmaların bir kısmı serbest radikal oluşumunu önlerken, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemektedir (Akkuş, 1995). Antioksidanlar, serbest radikaller için kolay bir elektron hedefi oluşturarak serbest radikallere uygun elektronun bağlanmasını sağlayarak stabil yapı oluşumunu sağlar (Aydemir ve Sarı, 2009). Bu dengenin bozulması, serbest radikallerin artmasına ve hücre hasarı oluşturmalarına yol açar. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Fakat çeşitli nedenlerle daha fazla radikal meydana gelmesi oksidatif stres olarak tanımlanır (Akkuş, 1995). Birçok karsinojen maddenin hücre etrafındaki oksidan stresi artırarak kansere sebep olduğu anlaşılmıştır. Bu maddeler GSH, SOD ve CAT aktiviteleri dahil hücrenin antioksidan savunmasında ani ve sürekli bir azalmaya sebep olurlar (Akkuş, 1995).

Amstad ve ark. (1984)'nın in vitro olarak yaptıkları çalışmada, AFB₁'in serbest radikallerin oluşumunu uyardığı saptanmıştır. Bu serbest radikaller kromozomlarda hasara neden olmaktadır. Aflatoksikozise ilişkin hücre ve dokularda oluşan hasara bağlı olarak biyokimyasal değişikliklerden ALT, AST, GGT ve MDA düzeyleri artarken; GR ve SOD enzim aktivitelerinde azalma meydana gelmektedir (Nixon ve ark., 1981). Nakae ve ark. (1987) SOD ve CAT'ın AFB₁'in rat karaciğer hücreleri üzerindeki öldürücü etkisini engellediklerini saptamışlardır. Bu bilgi, reaktif oksijen türlerinin AFB₁ tarafından oluşturulan hücre toksikasyonunda önemli bir role sahip olduklarını kanıtlamaktadır (Atalay, 2007).

Serum AST, ALT ve GGT değerlerinde meydana gelen artış karaciğerin yapısal bütünlüğünün bozulmasının bir göstergesidir. Hepatosellüler dejeneratif ve nekrotik değişikliklerin bulunduğu durumlarda, bu enzimler kan dolaşımına salınırlar (Nakae ve ark., 1987). Bu duruma bağlı olarak ALT, AST ve GGT düzeyleri artar. Karaciğer enzimleri ile ilgili elde edilen sonuçlarımız da bu düşüncüyü destekler niteliktedir. Serum enzimlerinden AST, ALT ve GGT düzeylerinin tablo 2'de incelenmesinde, kontrol grubuna göre grup B (AFB₁)'de istatistikî açıdan önemli yüksek değişimler görülmektedir. B grup (AFB₁) ve C grup (AFB₁ + Bal) ratların AST, ALT ve GGT düzeyleri arasında istatistiki olarak önemli farklar olduğu görülmektedir. Dolayısıyla bal katkılı C grubu (AFB₁ + Bal) ratların, AFB₁'in indüklediği AST, ALT ve GGT düzeylerinde belirgin azalma meydana geldiği görülmektedir. Bu azalmanın ise balın karaciğeri AF'nin zararlı etkilerine karşı koruması sonucu olduğu söylenebilir.

Membran lipidleri, reaktif oksijen türlerinin (ROS) zararlı etkilerine karşı oldukça duyarlıdır. Lipid peroksidasyonu, organizmada serbest radikallerin etkisi sonucu membran yapısında bulunan doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen uzaklaştırılmasıyla başlar ve MDA düzeyinin artmasına neden olur. MDA ise lipid peroksidasyonunun saptanmasında yaygın olarak kullanılır (Esterbauer ve ark., 1982; Yerer ve Aydoğan, 2000) ve artan MDA içeriği oksidatif membran hasarının önemli bir göstergesidir (Freeman and Crapo, 1981). Sunulan bu çalışmada MDA verilerinin tablo 3'te incelenmesinde, kontrol grubuna göre AFB₁ (B grubu) uygulanan grup ve bal katkılı C (AFB₁ + Bal) grubunun eritrosit, karaciğer, akciğer, böbrek ve kalp dokularının MDA düzeylerinin yüksek ve aradaki farkın istatistiksel olarak ($p < 0,05$)

önemli düzeyde olduğu görülmektedir. Fakat bal katkılı C (AFB₁ + Bal) grubunun eritrosit ve doku MDA düzeyleri AFB₁ (B grubu) uygulanan grup ile karşılaştırıldığında, C (AFB₁ + Bal) grubunun MDA değerlerinde istatistiki olarak önemli (p<0,05) derecede azalma meydana geldiği görülmektedir. Bu sonuçlar balın serbest radikalleri baskılamada başarılı olarak lipid peroksidasyonunu azalttığını ve ratların karaciğerlerinde membran lipidlerini oksidatif hasardan koruduğunu göstermektedir. Ayrıca bal flavanoitler gibi serbest radikallerin temizlenmesinde etkili olabilen fitokimyasallara sahiptir (Weng ve ark., 2005). Bu durum bal ilavesiyle MDA düzeylerindeki düşüşün sebebini daha da doğrular niteliktedir.

CAT esas olarak peroksizomlarda, daha az olarak da sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. CAT hidrojen peroksidi (H₂O₂) suya ve oksijene parçalar (Akkuş, 1995). Sunulan çalışmada karaciğer ve eritrosit CAT aktivite düzeylerinin, kontrol grubuna göre AFB₁ (B grubu) alan ratlarda istatistiksel (p<0,05) olarak önemli oranda azalma gösterirken, C grubu (AFB₁ + Bal) ratlarda AFB₁ (B grubu) alan gruba göre istatistiksel olarak önemli derecede artış gösterdiği saptandı.

Hücre içi antioksidantların en önemlilerinden biri olan SOD, süperoksiti (O₂⁻) oksijene (O₂) ve daha az reaktif olan H₂O₂'ye katalizler. AFB₁ kullanımının hücre içi antioksidanlarından SOD aktivitesini azalttığı gözlenmiştir (Eraslan ve ark., 2005). Sunulan çalışmada, karaciğer SOD aktivite düzeylerinin AFB₁ (B grubu) alan ratlarda istatistiki olarak önemli oranda azaldığı görülürken, bal verilen C (AFB₁+Bal) grup ratların SOD değerlerinin grup B (AFB₁)'ye oranla artış gösterdiği görülmektedir.

GSH karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç olmadan sentezlenebilen bir tripeptittir. GSH önemli bir intraselüler antioksidan olup serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur. Böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu da sağlar. Eritrositleri, lökositleri ve göz lensini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir (Akkuş, 1995). Okside edilmiş şekli, serbest radikallerin inhibisyonunda,

indirgenmiş sülfidril gruplarının stabilizasyonunda ve tokoferol ile askorbatın rejenerasyonunda görevlidir (Boehme ve ark., 1992). Sunulan çalışmada, doku GSH verilerinin tablo 3'te incelenmesinde karaciğer GSH verilerinin kontrol, (A) grubuna göre AFB₁ (B) verilen grupta istatistiki açıdan ($p < 0,05$) önemli oranda azaldığı, bal katkılı C (AFB₁ + Bal) grubunun karaciğer GSH değerinin ise AFB₁ verilen gruba göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre AFB₁ karaciğer toksisitesi meydana getirdiği, balın ise bu toksisiteyi engellediği sonucu ortaya çıkmaktadır.

GST hem detoksifikasyon yapar, hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak; ksénobiyotikleri GSH'daki sisteine ait -SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize eder ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlar. Oluşan bu GSH konjugatları organizmadan atılabilir veya daha ileri metabolize olurlar (Akkuş, 1995). Detoksifikasyon merkezinin karaciğer olması nedeniyle eritrositlerde böyle bir etkinin olması olağan sayılabilir niteliktedir. Sunulan çalışmada karaciğer GST aktivite düzeylerinin, tablo 3'te incelenmesinde tüm çalışma uygulamalarında kontrol grubuna göre artmadığı gözlemlendi. Bu sonuçlara göre; AFB₁'in sitotoksik ve karsinojenik etkilerinin özgün molekülden değil, 8,9-epoksit şekli ile muhtemelen de aflatoksin Q₁, P₁, M₁ ve aflatoksikolun 8,9-epoksit metabolitlerinden kaynaklandığı söylenebilir (Karenlampi, 1987). Epoksit şeklindeki etkin metabolitlerin hepatik mikrozomal sitokrom P-450'ye bağımlı karışık işlevli oksijenaz sistemi etkinliği ile özgün aflatoksinlerden sentezlendiği saptandı. Normal olarak epoksit şekilleri geçici ara ürün konumundadır. Karaciğerde GSH-S transferaz enziminin katalizlenen tepkimeler sonunda glutatyon-S-hidrolaz ile konjuge edilerek veya epoksit hidrataz enziminin aflatoksikole çevrilerek nispeten zehirsiz metabolitlere çevrilir (Karenlampi, 1987; Hatch, 1988). Ancak uzun süre veya fazla miktarda aflatoksin alınması halinde açıklanan detoksifikasyon mekanizması yetersiz kalır. Aynı enzim sistemlerince detoksifiye edilebilen besinsel kaynaklı diğer maddelerin fazlaca alınması halinde çok yönlü etkileşimlerin gerçekleşmesi ve enzimatik detoksifikasyon eşiğinin aşılması nedeniyle epoksit türevleri şekillenme oranı ve toksisite riski daha da artar (Hatch, 1988).

GR değerlerinin incelenmesinde anlamlı sonuçlara rastlanmadı.

Sonuç olarak C (AFB₁ + Bal) grup ratlardaki değerler, balın koruyucu etkisiyle organları onardığı ve normal aktivitelerine dönmelerinde yardımcı olduğu şeklinde

yorumlanabilir. Balın, organ fonksiyon aktivitelerini arttırdığı, MDA düzeyinde ve serum AST, ALT ve GGT aktivite düzeylerinde de azalmaya sebep olduğu gösterilerek koruyucu etkisi ve antioksidan rolü olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bal ilavesinin etki mekanizması AFB₁'in neden olduğu ROS oluşumunu önlemekten ya da bu grupları temizlemek yoluyla etkisini gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu yüzden bal hem gıda takviyesi olarak hem de ilaç endistürisi için erişilebilir doğal, antioksidan bir potansiyele sahiptir denilebilir.

5.3. Makroskopik Bulgular

Deneyssel aflatoksikozis olgularında karaciğerde büyüme, kenarlarında kütleşme ve renginde solgunluk (Ortatatlı ve Oğuz, 2001), yüksek dozlu toksikasyonlarda ayrıca karaciğerde peteşiyal ve/veya ekimotik kanamalar bildirilmiştir (Bilgiç, 1992). Böbreklerde ise büyüme ve kesit yüzlerinde kanamalar kaydedilmiştir (Sahoo ve ark., 1991). Sunulan çalışmada, organlardaki makroskopik değişimlere sadece AFB₁ verilen (Grup B) ratların karaciğerlerinde rastlandı. Bu değişimler hafif olarak büyüme ve solgunluk şeklindeydi. Sunulan çalışmada ratlara verilen AFB₁ miktarı (25 µg/rat/gün) düşük toksik doz olduğundan ve ratların diğer hayvanlara göre daha az duyarlı olması nedeniyle daha şiddetli lezyonlar oluşmadığı düşünülmektedir. Grup C (AFB₁ + Bal)'deki ratların karaciğerlerinde makroskopik olarak bir değişikliğin bulunmaması, ratlara verilen balın koruyucu etkisiyle grup B (AFB₁)'deki kadar karaciğerlerde şiddetli dejeneratif ve nekrotik değişimlerin şekillenmediğini göstermektedir.

5.4. Histopatolojik Bulgular

Karaciğer: AF kaynaklı hepatotoksisiteye yol açan ana mekanizmanın AF'nin neden olduğu reaktif oksijen türleri (ROS) ve buna bağlı olarak oluşan peroksidatif hasarın olduğu kabul edilmektedir (Preetha ve ark., 2006). AFB₁, fosfolipid A₂'yi uyararak hücrelerde lipid peroksidasyonunu başlatır ve hücre zarlarının bütünlüğünü bu yolla bozar (Amstad ve ark., 1984). Ayrıca AFB₁, ROS oluşumunu (Shen ve ark., 1995), lipid peroksidasyonunu ve 8-hydroxydeoxyguanosine oluşumunu indükleyebilir (Shen ve ark., 1994). AFB₁'in toksisite ve karsinogenik etkilerinin ortaya çıkışında, özellikle hepatik mikrozomal stokrom P-450'ye bağımlı kompleks fonksiyonlu oksijenaz enzim sisteminde özgün aflatoksin moleküllerinin metabolize edilmesiyle oluşan epoksit

türevlerinin çok önemli rol oynadığı belirtilmektedir (Wong ve Hsieh, 1980). Bu epoksit metabolitlerin hücresel nükleoproteinler ve nükleik asitler gibi makromoleküllere bağlanarak RNA, enzim ve protein sentezinin inhibe edilmesi, sonuçta hücre bütünlüğünün bozulmasının gerçekleştiği kaydedilmektedir (Wong ve Hsieh, 1980; Hatch, 1988). Bu enzim sistemlerinin (hepatik mikrozomal stokrom P-450) karaciğerde en yüksek konsantrasyonda periasiner bölgedeki hepatositlerde lokalize olduğu belirtilmiştir (Jubb ve ark., 1993). Çalışmada deneme gruplarından özellikle grup B (AFB₁)’de saptanan bulanık şişkinlik, hidropik dejenerasyon ve fokal nekrozlar gibi histopatolojik değişikliklerin özellikle periasiner bölgede, daha sonra da intermediyer bölgelerde ortaya çıktığı gözlemlendi. Bu bulgular, yani aflatoksikozis olgularında lezyonların özellikle periasiner ve intermediyer ağırlıklı yerleşim göstermesi, diğer araştırmacılar tarafından da vurgulanmıştır (Moorthy ve ark., 1985; Bilgiç, 1992). Aflatoksikoziste karaciğerdeki hepatoselüler dejenerasyon üç şekilde derecelendirilmiştir. Sadece periasiner alanda hidropik dejenerasyon ve yağ değişikliklerinden dolayı hepatoselüler şişkinlik şeklindeki hafif lezyonlar, periasiner ve midzonal bölgede açık hepatoselüler şişkinlik şeklinde gözlenen orta dereceli lezyonlar ve diffuz-şiddetli hepatoselüler şişkinlik, sitoplazmik solgunluk ve ruptur da şekillenen şiddetli bulgular olarak bildirilmiştir (Ortatatlı ve ark., 2005). Sunulan çalışmada da tablo 4’te görüldüğü gibi benzer şekilde lezyon dağılımlarının bulunduğu saptanmıştır.

Aflatoksikozis sonucu karaciğerde sitomegali, çekirdeklerinde büyüme, çekirdekçiğin belirginleşmesi ve çok sayıda olması, marjinal hiperkromazi, hepatositlerin çift çekirdekli olması gibi birçok mikroskopik değişikliğin meydana geldiği bildirilmiştir (Bilgiç, 1992; Ortatatlı ve Oğuz, 2001). Sunulan çalışmada özellikle grup B’de (AFB₁) benzer şekilde hepatositlere rastlandı ve bu durum muhtemelen Gabliks ve ark. (1965) ’nın da belirttiği gibi aflatoksinin hücre bölünmesini baskılaması sonucu oluşan RNA ve DNA artışıyla ilgili olabilir.

Yapılan çalışmalarda aflatoksikozis sonucu karaciğerde safra kanallarında proliferasyon ve epitellerinde hiperplazinin görüldüğü (Slowik ve ark., 1985; Yakışık, 1992), bu değişikliklerin verilen AFB₁’in dozu ve süresi ile ilgili olduğu, ayrıca karaciğerdeki nekrotik değişiklikleri takiben geliştiği ve hasara karşı karaciğerin gösterdiği reaksiyonlardan biri olduğu belirtilmektedir (Jubb ve ark., 1993). Sunulan bu

çalışmada, grup B (AFB₁)’de beş, grup C (AFB₁ + Bal)’de ise iki olguda safra kanallarında proliferasyon ve epitellerinde hiperplazi meydana geldiği saptandı.

İncelenemediği kadarıyla, ratlarda oluşturulan aflatoksikoziste organ hasarının engellenmesine ilişkin balın koruyucu etkinliğinin ayrıntılı olarak araştırılmadığı, sadece farelerde yapılan bir çalışma olduğu (Ezz el-arab ve ark., 2006) belirlenmiştir. Söz konusu çalışmada araştırmacılar, balın antimikrobiyal koruyuculuk etkisinin yanı sıra, faydalı olan kolonik probiyotik bakterilerin çoğalmasında (bifidogenik etki) sağladığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada AF’nin etkisiyle organlarda meydana gelen bazı histopatolojik değişiklikler sunulmuş olmasına rağmen balın organları koruyucu etkinliğinden ya da bu bulguları azalttığına veya önlediğine dair detaylı bir bilgi verilmemiştir. Ayrıca bu araştırmacılar çalışmalarında biyokimyasal incelemelere de yer vermemişlerdir.

Sunulan bu çalışmada grup C (AFB₁ + Bal)’de, sadece AFB₁’in verildiği grup B’de gözlenen mikroskobik bulguların bir kısmının hiç oluşmadığı ya da az şekillendiği dikkati çekti. Dolayısıyla AFB₁ ile oluşturulan karaciğer hasarında balın engelleyici etkisinin gözlemlendiği, bu hepatoprotektif etki ile ilgili olarak; balın karaciğer hasarının önlenmesinde dejenerasyon ve nekrozu azaltma ve lipid peroksidasyonu engelleme özelliklerinin etkili olabileceği, ayrıca diğer terapötik özelliklerinin de bu hepatoprotektif etkilerine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Böbrek: Deneysel aflatoksikozis çalışmalarında böbreklerde proksimal tubulus epitellerinde başlangıçta dejeneratif ve daha sonra da nekrotik değişimler (Sahoo ve ark., 1991; Mayura ve ark., 1998; Tuzcu, 1999) ile tubulus lümenlerinde hiyalin silindirlerinin görüldüğü (Bilgiç ve Yeşildere, 1992; Tuzcu, 1999), glomeruluslarda ise şişkinlik, mezangiyal hücre hiperplazisi, glomerulus bazal membranlarında kalınlaşma ve sonuçta glomerulusların bowman boşluğunu tamamen doldurduğu kaydedilmektedir (Miller ve ark., 1984; Bilgiç ve Yeşildere, 1992; Mayura ve ark., 1998). Sunulan çalışmada grup B (AFB₁)’de bulunan bütün ratların böbreklerinde proksimal tubul epitel hücrelerinde dejenerasyon ve koagülasyon nekrozu (tubulonefroz) meydana geldiği görüldü. Ayrıca arterioller ile glomeruler ve intersitisyel kapıllarlarda belirgin hiperemi ve medullada bazı tubulusların lümeninde hiyalin silindirleri tespit edildi.

Epstein ve ark. (1969)'nın ratlarda oluşturdukları deneysel aflatoksikoziste, 147 günlük deneme süresince 1 ppm AFB₁ verilen ratların yarısının, 0.25 ppm AFB₁ verilen ratların ise ¼'ünün böbreklerinde sentral veya subsentral yerleşimli büyük bir çekirdeğe sahip hücreler olduğunu kaydetmişlerdir. Tuzcu (1999) farelerde yaptığı deneysel aflatoksikoziste tubul epitel çekirdeklerinin büyüdüğünü belidirmiştir. Eröksüz ve ark. (2001)'nın ratlara pirolizidin alkaloidleri ile deneysel olarak oluşturdukları toksikasyon sonucu renal tubuluslarda megalositozis şekillendiğini kaydetmişlerdir. Sunulan çalışmada aflatoksikozis sonucu tubul epitellerinde megalositik hücrelerin şekillendiği görüldü.

Grup C (AFB₁ + Bal)'de bulunan ratların böbrekleri kontrol grup ratların böbrekleri ile benzer histolojik görünüme sahip olduğu görülürken sadece bazı tubul epitel hücrelerinde dejeneratif ve nekrotik hücreler ile kapillar hiperemi şekillendiği görüldü. Sonuç olarak balın böbrek hasarını engelleyici etkisinin gözlendiği, bu etki ile ilgili olarak; balın böbrek hasarının önlenmesinde dejenerasyon ve nekrozu azaltarak ve tablo 3'n incelemesinde MDA düzeyini önemli miktarda düşürerek etkisini gösterdiği düşünülmektedir.

Akciğer: AFB₁'in biyotransformasyonu, akciğerlerdeki Clara hücrelerinde de gerçekleşmektedir. Akciğerlerdeki bu biyoaktivasyonun düzeyi hücre tipleri arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Bu olayda en önemli role ise makrofajlar sahiptir (Donnelly ve ark., 1996). Stubblefield ve ark. (1983) Holstein ırkı sığırılarda yapmış oldukları deneysel aflatoksikoziste (0.35 mg AFB₁/kg) eşitli organlar ile birlikte akciğerde de değişik düzeylerde AFB₁ ve AFM₁ tespit etmişlerdir. Ezz el-arab ve ark. (2006)'da farelerde histopatolojik olarak intersitisyel fibrozis ve yangısal hücre infiltrasyonu şekillendiğini bildirmişlerdir. Tuzcu (1999)'nun farelerde yaptığı deneysel aflatoksikoziste akciğerlerde interalveolar kapillarların hiperemik olduğunu ve alveol lümenlerinin pembe homojen bir sıvı ile dolu olduğunu bildirmiştir. Sunulan bu çalışmada grup B (AFB₁)'de bulunan bütün ratların akciğerlerinde intersitisyel pnömoni görüldü. Ancak henüz fibrozis şekillenmemişti. Bunun da toksikasyonun süresiyle ilgili olabileceği düşünülmektedir. Grup C (AFB₁ + Bal)'de ise iki olguda intersitisyel pnömoni bulguları saptandı. Diğer olgularda ise kontrol grubuyla benzer bulgulara

rastlandı. Sonuç olarak balın AFB₁'in akciğerdeki biyotransformasyonunu azalttığı ve akciğeri koruduğu şeklinde yorumlanabilir.

5.5. İmmunohistokimyasal Bulgular

Düz kas aktin (ASMA): Düz kas aktin (ASMA), miyofibroblast ve düz kas hücrelerinin bir işaretleyicisi olarak immunohistokimyada kullanılmaktadır. Miyofibroblastlar karaciğer hasarında baskın olarak görülen mezenkimal kökenli hücrelerdir. Karaciğerdeki miyofibroblastların kökeni tartışılan bir konu olmasına rağmen, morfolojik yapılarına göre yapılan tahminler bu hücrelerin liposit kökenli olduğunu göstermektedir (yağ depolayan hücreler-Ito cell) (Rockey ve ark., 1992). Normal karaciğerde sinüzoidlerin; endotelyal, Kupffer, Ito (stellate cells) ve pit hücreleri ile ekstrasellüler matriks komponentlerinden oluştuğu, Ito hücrelerinin ASMA pozitif olduğu kaydedilmiştir (Shiga ve ark., 1996). ASMA-pozitif perisinüzoidal hücrelerin myofibroblastik transformasyonlu stellate hücreleri olduğu immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir (Enzan ve ark., 1994). CCl₄ ile oluşturulan ilerleyici fibroziste, perisinüzoidal hücrelerin bulunduğu alanlarda, fibroz bantlarda ve rejeneratif nodüllerin çevresinde ASMA pozitif hücrelere rastlanmıştır (Nouchi ve ark., 1991). Türkoğlu ve ark. (2003) rat karaciğerlerinde CCl₄ ile oluşturulan fibroziste nekrotik ve fibrotik alanlarda ASMA-pozitif hücrelerin çok belirgin olarak arttığını saptamışlar ve karaciğer dokusundaki fibrotik değişimlerin immunohistokimyasal olarak ortaya konabildiğini belirtmişlerdir. Rockey ve ark. (1992) yaptıkları çalışmada safra kanalı tıkanıklığı ve CCl₄ ile oluşturulan deneysel fibroziste, fibroz bantlarda ve dejeneratif nodüllerde ASMA pozitif hücrelerin olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuca göre, karaciğer hasarı sırasında lipositlerin miyofibroblast özellik kazandığı ileri sürülmüştür (Rockey ve ark., 1992). Eunsil Yu ve ark. (1995) ASMA'nın karaciğer hastalıklarında çeşitli boyanma özellikleri gösterdiğini, kronik aktif hepatitlerde parçalı nekroz alanlarında ve bitişik lobüllerde çok şiddetli boyanma meydana geldiğini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada, kontrol (A) grubunda boyanmaya hiç rastlanmazken, grup B (AFB₁)'de belirgin olarak dejeneratif ve nekrotik hücrelerin olduğu bölgelerde boyanma saptandı. C grup (AFB₁ + Bal) ratlarda da bu boyanmaların grup B (AFB₁)'ye oranla dikkat çekici şekilde az olduğu görüldü. Sunulan çalışmada sadece dejenerasyon ve nekrozun şekillendiği alanlarda boyanmaların görülmesi, Eunsil

Yu ve ark. (1995)'nın bulgusuyla uyumlu olduğu görülmüştür. Sunulan çalışmada perisinüzoidal hücrelerinin (Ito ve damar düz kas hücreleri) boyanmaması kullanılan primer serum ya da deney hayvanı ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

CD68: Kupffer hücrelerinin fagositoz, sitokin üretimi, anti-tümör etki gibi çeşitli özellikleri bulunmaktadır (Toth ve Thomas, 1992). Karaciğer sinüzoidleri içerisinde çok değişik şekil ve yerleşimde bulunabilirler. Genelde ebatça büyük ve daha yüksek aktiviteye sahip olanlar lobül periferinde portal sahalara yakın yerleşim gösterirken, küçük ebatlı olanları central ven'e yakın lokalize olur. Kupffer hücreleri geniş spektrumdaki unsurları fagosit ederler. Hücre yüzeyinde fibronektin ile kaplı partiküllere, insülin ve glukagona ait özel reseptörler yanında bakteri, mantar ve virüs gibi yabancı hücreler için özel reseptörler de bulunmaktadır. Endositozla alınan unsurlar hızlıca lizozomlara doğru taşınmakta ve metabolize edilmektedir. Yoğun bir fagositoz gerektiği zaman Kupffer hücre salgısının hepatosit sitokrom P-450 mekanizmasını deprese ettiği ortaya konulmuştur (Azri ve Renton, 1987). Kupffer hücresinin tümör hücrelerini fagosit ettiği de gösterilmiştir (Kan ve ark., 1995).

CD68 bir antimakrofaj antikor olup Kupffer hücreleri dahil olmak üzere (Tanaka ve ark., 2003), bir dizi farklı kan hücrelerinin stoplazmik granüllerinde bulunan, düşük yoğunluklu lipoproteinlere bağlanan bir glikoproteindir. Özellikle monositler, histiyositler, dev hücreleri, osteoklastlar ve Kupffer hücreleri gibi makrofaj orjinli hücreler için marker olarak kullanılır (Holness ve Simmons, 1993; Remstein ve ark., 1996). Makrofajları boyamasından dolayı bu antikor, makrofajların çoğalması ya da makrofaj anormallikleri gibi durumlarda kullanım alanı bulmaktadır (Manduch ve ark., 2009). Itoshima ve ark. (1981) yaptıkları çalışmada 0.01 mm² alanda kronik persistant hepatitlerde 1.2, akut hepatitlerde 2.2-5.5, kronik aktif hepatitlerde 1.8 ve kronik karaciğer sirozunda 2.2 adet olarak elektron mikroskopunda tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada kontrol ve deneme gruplarında boyanmalara rastlandı. B (AFB₁) ve C (AFB₁ + Bal) gruplarında Kupffer hücrelerinin sayısında kontrol grubuna göre artış meydana geldiği tespit edildi. Her iki grup arasında ise istatistiki olarak anlamlı fark olmadığı görüldü. Bu da balın aflatoksikozise karşı karaciğer savunma (Kupffer) hücrelerinin proliferasyonda etkili olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

Alpha-fetoprotein (AFP): AFP sadece f3tal gelişim d3neminde karaciğer ve vitell3s kesesi tarafından 3retilir. Doğumdan sonra seviyesi hızla d3şer ve sonraki zamanlarda eser düzeyde serumda kalan, olgunlaşmış ve normal dokularda bulunmayan onkof3tal bir proteindir (Mulas ve ark., 1995). Karaciğer t3m3rlerine sahip çeşitli t3rlerdeki hayvanlarda ve insanlarda bir karsinoembriyogenik antijen olan AFP değeri serumda y3ksek olarak tespit edilmiştir (Adamson ve ark., 1973). AFP'nin değeri hepatosell3ler karsinomlu insanların çoğunda ve kimyasallara bağlı oluşan karaciğer t3m3rlerine sahip hayvanlarda da y3ksek oranda saptanmıştır (Becker ve Sell, 1974). Kroes ve ark. (1974) deneysel olarak yaptıkları çalışmada, aflatoksinin AFP d3zeyini arttırdığını bildirmişlerdir. Hepatokarsinogenezis s3recinde AFP sentezi gibi f3tal karaciğerin bazı tipik 3zelliklerinin saptanabileceği rapor edilmiştir (Bettini ve Marcato, 1992). Bu proteinin hepatosell3ler karsinomlar, germ h3cre t3m3r3, nadiren de metastatik karaciğer t3m3rleri ve hepatitlerde g3r3ld3ę3 (Mulas ve ark., 1995), ancak kan serumunda y3ksek seviyeye (5000ng/ml) ulaştığında immunohistokimyasal olarak belirlenebildiği kaydedilmiştir (Brumm ve ark., 1989). Sunulan çalışmada, yapılan immunohistokimyasal boyamalarda, sadece grup B (AFB₁)'deki ratların karaciğerlerinde bazı hepatositlerin sitoplazmasında boyanma saptandı. Boyanmalar 3zellike periasiner hepatositler ile bazen de hidropik dejenerasyonlu h3cre topluluklarının içindeki hepatositlerdeydi. Bu bulgular oldukça anlamlı bulundu. Ş3yle ki; grup C (AFB₁ + Bal)'de bulunan ratların karaciğerlerinde de, daha az olmakla birlikte, değişen oranlarda nekroz ve dejenarasyon g3zlenmesine rağmen AFP immunohistokimyasal olarak saptanmadı. Bu sonuçlar doğrultusunda; AFB₁ uygulamasının grup B (AFB₁) rat karaciğer hepatositlerinde kısmen de olsa AFP sentezini ind3klediği, AFB₁ + bal verilen grupta ise bu değişimin engellendiği d3ş3n3ld3.

p53 gen proteini: p53, h3cre akıbetinin belirlenmesinde 3nemli rol oynayan h3cre d3ng3s3n3n durdurulması veya programlı h3cre 3l3m3ne y3nlendirilmesi gibi h3creesel birçok yolağın d3zenlenmesinde g3rev alan bir transkripsiyon fakt3r3d3r. p53 proteini DNA tamiri, h3cre d3ng3s3n3n kontrol3, genomik kararlılığın sağlanması, kromozom ayrılmasının d3zenlenmesi, gen ifadesinin d3zenlenmesi, yaşlanma ve programlı h3cre 3l3m3 gibi birçok h3creesel olayda rol almaktadır (Haris, 1996). p53, bu işlevlerini ya transkripsiyon fakt3r3 olarak ilgili genlerin transkripsiyonlarını

düzenleyerek ya da diğer proteinler ile veya doğrudan DNA ile fiziksel olarak etkileşerek gerçekleştirmektedir (Haris, 1996). p53 aracılığı ile programlı hücre ölümünün başlatılması veya hücre çoğalmasının durdurulması, hasarlı DNA replikasyonunu ve genetik olarak normal olmayan hücrelerin çoğalmasını engellemektedir. Bu nedenle p53 işlevlerinin mutasyon ya da delesyon ile engellenmesi hücre homeostasisin sağlanmasında da ayrıca önemlidir. Tümörlerde anormal hücre siklusu DNA tamirine zarar verip, potansiyel mutasyonları arttırarak karsinogeneze yol açmaktadır. p53 (wild tip) gerek normal, gerekse tümör (mutant) hücrelerinde bulunmaktadır (Taylor ve Cote, 1994). Mutant p53 geni taşıyan hücreler, artık genom içeriğini garanti edemez. Çünkü onlar artık hücre döngüsünün durma sinyallerini alamazlar. Sonuç olarak hücre genomu stabil değildir ve bütün hücreler potansiyel olarak tümör oluşturabilir (Joza ve ark., 2011). Mutant p53 proteininin hücrede birikimine p53 gen alterasyonları neden olmaktadır (Davidoff ve ark., 1991). Normal hücrelerde bulunan p53 wild tipinin yarılanma ömrü çok kısadır (6-30 dk), bu nedenle immunohistokimyasal olarak saptanabilecek kadar protein birikiminin olmadığı belirtilmektedir. Mutant p53 proteinin ise yarılanma ömrü uzundur ve daha fazla birikir, bu nedenle hücre çekirdeğinde kolaylıkla saptanabilmektedir. Sunulan çalışmada bütün gruplarda immunohistokimyasal olarak bu protein saptanamadı. p53 gen proteinin saptanamaması; denemede uygulanan AFB₁ dozu ile deneme süresi içinde hepatositlerde immunhistokimyasal düzeyde bu antijenlerin üretiminin henüz olmayışıyla ya da boyamada kullanılan primer serumlarla ilgili olabilir.

Sonuç olarak; AFB₁ ile deneysel olarak oluşturulan aflatoksikoziste, balın koruyucu etkisinin araştırıldığı bu çalışmada; histopatolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal bulgular doğrultusunda, balın antioksidan etkisi sayesinde lipid peroksidasyonunun, dolayısıyla başta karaciğer olmak üzere dokularda hasarın engellendiği gözlemlendi. Ancak gerçekleştirilen bu çalışmanın, bir ön çalışma olarak kabul edilmesi, aynı çalışmanın deneme süresini, ratlarda 100-150 mikrogram/kg/gün AFB₁ doz ile kanser oluşturma süresi olarak bildirilen 12-24 ay kadar geniş planlayarak ve balın farklı dozları kullanılarak yapılmasının, balın antikanserojen etkisinin de daha net bir şekilde ortaya konabileceği kanısındayız. Bu çalışmanın, bu konuda daha sonraki yapılacak çalışmalara büyük katkısının olacağı ve temel oluşturacağı düşüncesindeyiz.

ÖZET

YAMAN T, Ratlarda deneysel olarak oluşturulan aflatoksikoziste balın koruyucu etkisinin ve antioksidan kapasitesinin histopatolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal olarak araştırılması, Y.Y.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Patoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, Van, 2013. Aflatoksikozis, insan ve hayvanlarda aflatoksinler tarafından oluşturulan akut veya kronik seyirli bir mikotoksikozisdir. Hayvanlarda önemli ekonomik kayıplara neden olan ve insan sağlığını tehdit eden toksikasyon özellikle geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak görülmektedir. Kronik zehirlenmeler, hayvan ve insanlarda özellikle bağışıklık sisteminin baskılanmasına yol açarak birçok hastalığın ön plana çıkmasına sebep olmaktadır. Karaciğer aflatoksikozisten etkilenen ana organdır ve histopatolojik olarak nekrozis, fibrozis ve hepatokarsinogenezis gözlenen bulgulardır. Aflatoksinlerden ileri gelen toksikasyonlarda etkili bir korunma bilinmemektedir. Ancak bazı vitamin ve mineraller ile proteinlerin koruyucu etkilerinin olduğu belirtilmektedir. Yapılan son çalışmalardan balın immunomodülatör, antioksidan ve antikanserojenik gibi birçok farmakolojik etkilerinin olduğu bilinmektedir. Ancak balın aflatoksikozise karşı hepatoprotektif etkileri konusunda detaylı çalışma bulunmamaktadır. Gerçekleştirilen bu çalışmada, ratlarda deneysel olarak oluşturulan aflatoksikoziste karaciğerde meydana gelen kronik lezyonların oluşumunda, balın engelleyici etkisi; biyokimyasal, histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak araştırıldı. Bu amaçla, 18 rat, 6'şarlı 3 (A,B,C) gruba ayrıldı. Gruplardan biri kontrol grup (A) AFB₁ içermeyen standart rat yemi ile beslendi. Diğer 2 grup ise çalışma grubu olarak belirlendi. Çalışma grubundaki ratlardan B grubu sadece aflatoksinli yem (yaklaşık olarak 25 µg AF/rat/gün) alırken, C grubu ratlara aflatoksinli yemle birlikte aynı zamanda 10 ml içme suyuna 1 ml bal ilave edilerek deneme süresince oral olarak verildi. Çalışma 90 gün sürdü. Biyokimyasal analizler için kan örnekleri ve histopatolojik incelemeler için organlardan doku örnekleri alındı. Bu çalışmanın sonucunda B grubunda AFB₁'in sebep olduğu yaygın hidropik dejenerasyon, displastik hepatositler, safra kanalı proliferasyonu ve periportal fibrozis gibi histolojik bozuklukların bal ilave edilen C grupta önemli ölçüde azalarak organların korunduğu gözlenmiştir. Biyokimyasal olarak ta B grubunda AFB₁ nedeni ile AST, ALT ve GGT oranlarının yükseldiği ve lipid peroksidasyonunun arttığı, ancak bal ilavesi ile bu değerlerin anlamlı ölçüde düştüğü, lipid peroksidasyonunun da azaldığı ve antioksidan (GSH, GR, SOD, GST, CAT) düzeylerin arttığı gözlenmiştir. Sonuç olarak histopatolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal bulgulara göre lipid peroksidasyonun ve doku hasarının önemli ölçüde engellendiği, dolayısıyla balın koruyucu etkiye sahip olduğu saptandı.

Anahtar Sözcükler: Aflatoksikozis, Bal, Lezyonlar, Rat

SUMMARY

YAMAN T, Histopathological, immunohistochemical and biochemical investigations of protective role and antioxidant capacity of honey in rats with experimental aflatoxicosis, Yuzuncu Yıl University, Institute of Health Sciences MVS Thesis in Department of Pathology, Van, 2013.

Aflatoxicosis is a mycotoxicosis developing acute or chronic, caused by aflatoxins in domestic animal and humans. Aflatoxicosis is a widespread problem especially in the underdeveloped and the developing countries. Aflatoxins are potential threat to humans and animal. The chronic toxications especially suppress the immune system which facilitates the occurring of many diseases. Liver is main organ affected by aflatoxicosis, and are histopathologically observed necrosis, fibrosis and hepatocarcinogenesis. It is not well known the effective protection in aflatoxicosis. However, it is reported that some vitamins, proteins and inorganic substances have a protective effect. It was indicated that honey had many pharmacologic effects as such antioxidant, immunomodulatory and anticancer. However, there is not any study about it protective effect on aflatoxicosis. This study was planned to investigate the effect of honey on the prevention of aflatoxin-induced liver lesions in rats in term of histopathological, Immunohistochemical and biochemical methods. This purpose, a total of 18 rats was allotted into one of three (A,B,C) experimental groups: A (Control, with the basal diet without AFB₁), B (only a diet with AFB₁), and C (a diet with AFB₁+honey), each containing 6 animals. B and C groups rats fed with a diet containing AF approximately received 25 µgr of AF/rat/day. C group also received 1ml of honey for every initial 10ml of water for each rat daily. The experiment lasted 90 days. Blood samples for the biochemical analysis and tissue samples from tissues for histopathological examination were taken. The results of the present study demonstrated that honey-treated animals had significantly less histologic abnormalities including hydropic degeneration, dysplastic hepatocytes, bile-duct proliferation and periportal fibrosis, as compared with AF-treated rats, thereby highlighting its protective role in countering the toxicity induced by AF. These phenomenons were also confirmed by biochemical observations. Treatment with honey effectively protected the rat against AF-induced toxicity, as evidenced by decreased AST, ALT and GGT levels and lipid peroxidation and elevated the antioxidants (GSH, GR, SOD, GST, CAT) levels. On the basis of biochemical and histopathological findings, it is concluded that treated honey decrease the lipid peroxidation and liver enzymes, increase the antioxidant defence system activity, and prevent the tissue damage in the AFB₁-treated rats.

Key Words: Aflatoxicosis, Honey, Lesions, Rat.

KAYNAKLAR

- Acay HN (2006). Bıldırcınlarda (*coturnix coturnix japonica*) aflatoksikozise karşı biyolojik korunma yöntemleri üzerine bir araştırma, Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Adamson RH, Correa P, and Dalgard DW (1973). Occurrence of a primary liver carcinoma in a rhesus monkey fed aflatoxin B₁, *J Natl Cancer Inst*, 50, 549-553.
- Agag BI (2004). Mycotoxins in foods and feeds, *Ass Univ Bull Environ Res*, 7, 1, 173-205.
- Ağırbaş (özmen) Ç (2001). Trakya yöresi ballarının bileşimlerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Akkuş İ (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya.
- Alagwu EA, Nneli RO, Ekwurugwu JN and Osim EE (2011). Gastric cytoprotection and honey intake in Albino Rats, *Niger J Physiol Sci*, 26, 1, 39-42.
- Allen KL, Molan PC and Reid GM (1991). A survey of the antimicrobial activity of some New Zealand honeys, *J Pharm Pharmacol*, 43, 814-822.
- Al-Waili NS (2003a). Intrapulmonary administration of natural honey solution, hyperosmolar dextrose or hypoosmolar distill water to normal individuals and to patients with type-2 diabetes mellitus or hypertension: their effects on blood glucose level, plasma insulin and C-peptide, blood pressure and peaked expiratory flow rate, *Eur J Med Res*, 8, 295-303.
- Al-Waili NS (2003b). Intravenous and intrapulmonary administration of honey solution to healthy sheep: effects on blood sugar, renal and liver function tests, bone marrow function, lipid profile, and carbon tetrachloride-induced liver injury, *J Med Food*, 6, 231-247.
- Amstad P, Levy A, Emerit I and Cerutt IP. (1984). Evidence for membrane mediated chromosomal damage by aflatoxin B₁ in human lymphocytes, *Carcinogenesis*, 5, 719-723.
- Angsubhakorn S, Poomvises P, Romruen K and Newbern PM (1981). Aflatoxicosis in horses, *Am Vet Med Assoc*, 178, 274-278.
- Anklam E (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey, *Food Chem*, 63, 4, 549-562.
- Anonim (1990). Bal Standardı, Türk Standartları Enstitüsü, TS3036/Nisan, Ankara.

Atalay B (2007). Japon bildircinlarında (*coturnix coturnix japonica*) deneysel olarak oluşturulan aflatoksikozis'te yeme katılan maya glukomannanının bazı biyokimyasal parametreler ve antioksidan enzimler üzerine olan etkileri, Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Attia WY, Gabry MS, El-Shaikh KA and Othman GA (2008). The anti-tumor effect of bee honey in Ehrlich ascite tumor model of mice is coincided with stimulation of the immune cells, *Egypt J Immunol*, 15, 2, 169-183.

Aydemir B ve Sarı KE (2009). Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi, *Kocatepe Vet J*, 2, 2, 56-60.

Azri S and Renton KW (1987). Depression of murine hepatic mixed function oxidase during infection with *listeria monocytogenes*, *J Pharmacol Exp Ther*, 243, 1089-1091.

Ball DW (2007). The chemical composition of honey, *J Chem Comp anal*, 84, 10, 1643-1645.

Başaran A, Güneş HV, Başaran N, Erdem S ve Kalkandelen G (1986). Eskişehirde bazı gıda maddeleri ve yemlerde aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ araştırılması, *Anadolu Tıp Derg*, 8, 51-60.

Becker FF and Sell S (1974). Early elevation of α_1 -Fetoprotein in N-2-Fluorenylacetamide hepatocarcinogenesis, *Cancer Res*, 34, 2489-2494.

Beretta G, Caneva E and Facino RM (2007). Kynurenic acid in honey from arboreal plants: MS and NMR evidence, *Planta Med*, 73, 1592-1595.

Bettini G and Marcato PS (1992). Primary hepatic tumours in cattle, a classification of 66 cases, *J Comp Pathol*, 107, 19-34.

Beutler E (1984). A manual of biochemical methods, in "Red Cell Metabolism", 3th Edition, 105-106, New York.

Bilgiç HN ve Yeşildere T (1992). Cıvcıvlerde deneysel aflatoksikoziste böbrek lezyonları, *İÜ Vet Fak Derg*, 18, 102-108.

Bilgiç N (1992). Akut aflatoksikozis olaylarında patolojik bulgular, *Türk Vet Hek Derg*, 4, 38-40.

Boehme DS, Hatchkiss JA and Handerson RF (1992). GSH and GSH dependent enzymes in bronchoalveolar lavage fluid cells in response to ozone, *Exp Mol Pathol*, 56, 37-48.

Bogdanov S, Jurendic T and Sieber R (2008). Honey for nutrition and health: a review, *J Am Coll Nutr*, 27, 677-689.

Bogdanov S, Ruoff K and Oddo LP (2004). Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review, *Apidologie*, 35, 4-17.

- Brumm C, Schulze C, Charels K, Morohoshi T and Klöppel G (1989). The significance of alpha-fetoprotein and other tumour markers in differential immunocytochemistry of primary liver tumours, *Histopathology*, 14, 503-513.
- Bukan N (1999). Glibenklamidin streptozotosin diabetik ratlarda kalp dokusu süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerine etkisi, Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Bullerman LB (1978). Significance of mycotoxins to food safety and human health, *J Food Protec*, 42, 1, 65-83.
- Busbee DL, Norman JO and Ziprin RL (1990). Comparative uptake, vascular transport and cellular internalization of aflatoxin B₁ and benzo(a)pyrene, *Arch Toxicol*, 64, 285-290.
- Campbell TC and Hayes JR (1976). The role of aflatoxin metabolism in toxic lesion, *Toxic Appl Pharm*, 35, 199-222.
- Candlish AAG, Haynes CA and Stimson WH (1988). Detection and determination of aflatoxins using affinity chromatography, *JFST*, 23, 479-485.
- Cassand P, Decoudu S, Leveque F, Daubeze M and Narbonne JF (1993). Effect of vitamin e dietary intake on in vitro activation of aflatoxin B₁, *Mutat Res*, 319, 309-316.
- Cassel EK, Campbell B, Draper M and Epperson B (2001). Aflatoxins, Hazards in Grain, Aflatoxicosis and Livestock, South Dakota State University, Cooperative Extension Service, College Of Agriculture & Biological Sciences, Usda Fs 907.
- Cavin C, Hoızhıhıser D, Constable A, Huggett AC and Schilter B (1998). The coffeespesific diterpem cafestol and kahweol protect against aflatoxin B₁-induced genotoxicity through a dual mechanism, *Carcinogenesis*, 19, 1396-1375.
- Chen J, Goetchius M, Combs G and Campbell T (1982). Effects of dietary selenium and vitamin E on covalent binding of aflatoxin to chick liver cell macromolecules, *J Nutrition*, 112, 350-355.
- Chick H, Shin HS and Ustunol Z (2001). Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria grown in skim milk containing honey, *J Food Sci*, 66, 478-481.
- Ciegler A (1975). Mycotoxins, occurence, chemistry biological activity, *Lab Invest*, 24, 206.
- Cilievisi O, Cordos Ö, Ghiduş E and Moldovan A (1980). The toxic and teratogenic effect of aflatoxin B₁ on the chick embryo development, *Morphol Embryol*, 26, 309-313.
- Cotte JF, Casabianca H, Giroud B, Albert M, Lheritier J and Grenier-Loustalot MF (2004). Characterization of honey amino acid profiles using high- pressure liquid chromatography to control authenticity, *ABC*, 378, 5, 1342-1350.

Cullen JM, Ruebner BH, Hsieh LS, Hyde DM and Hsieh DPH (1987). Carcinogenicity of dietary aflatoxin M₁ in male Fischer rats composed to aflatoxin B₁, *Cancer Res*, 47, 7, 1913–1917.

Çelik A (2007). Ratlarda deneysel olarak oluşturulan aflatoksikoziste çörek otunun (*Nigella sativa*) karaciğer lezyonlarını engelleyici etkisinin araştırılması, Y.Y.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Patoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van.

Çelik K (2001). Küf toksinleri ve hayvan beslemedeki önemleri, *Ekin Derg*, 17, 62-66.

Dafalla R, Yagi AI and Adam SEI (1987). Experimental aflatoxicosis in hybro type chicks: sequential changes in growth and serum constituents and histopathological changes, *Vet Hum Toxicol*, 29, 222-226.

Dalvi RR and McGowan C (1984). Experimental induction of chronic aflatoxicosis in chickens by purified aflatoxin B₁ and its reversel by activated charcoal, phenobarbital, and reduced glutation, *Poultry Sci*, 63, 485-491.

Davidoff AM, Humphrey PA, Iglehart JD and Marks JR (1991). Genetic basis for p53 over expression in human breast cancer, proceedings of the national academy sciences of the USA, 88, 5005-5010.

Davila J, Edds G, Osuna O and Simpson C (1983). Modification of the effects of aflatoxin B₁ and warfarin in young pigs given selenium, *Am J Vet Res*, 44, 1877-1883.

Doner LW (1977). The sugars of honey, *J Sci food Agric*, 28, 443-456.

Donnelly PJ, Stewart RK, Ali SL, Conlan AA, Reid KR, Petsikas D, Massey TE (1996). Biotransformation of aflatoxin B₁ in human lung, *Carcinogenesis*, 17, 11, 2487-2494.

Eaton DL and Gallagher EP (1994). Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 34, 135–172.

Ellis WO, Smith JP, Simpson BK and Oldham IH (1991). Aflatoxins in food: occurence, biosynthesis, effects on organisms, detection and methods of control, *Critical Rev Food Sci Nutr*, 30, 3, 403-439.

Enzan H, Himeno H, Iwamura S, Saibara T, Onishi S, Yamamoto Y and Hara H (1994). Immunohistochemical identification of ito cells and their myofibroblastic transformation in adult human liver, *Virchow Arch*, 424, 249-256.

Epstein SM, Bartus B and Farber E (1969). Renal epithelial neoplasms induced in male wistar rats by oral aflatoxin B₁, *Cancer Res*, 29, 1045-1050

Eraslan G, Akdoğan M, Yarsan E, Sahindokuyucu F, Essiz D and Altıntaş L (2005). The Effects of Aflatoxins on Oxidative Stress in Broiler Chickens, *Turk J Vet Anim Sci*, 29, 701–707.

- Erejuwa OO, Gurtu S, Sulaiman SA, Wahab MS Ab, Sirajudeen KN and Salleh MS (2010). Hypoglycemic and antioxidant effects of honey supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats, *Int J Vitam Nutr Res*, 80, 74-82.
- Erejuwa OO, Sulaiman SA, Wahab MS, Sirajudeen KNS, Salleh MS and Gurtu S (2012). Hepatoprotective effect of tualang honey supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats, *Int J Appl Res Nat Prod*, 4, 37-41.
- Erguder İB, Kılıçoğlu S, Namuslu M, Kılıçoğlu B, Devrim E, ismet K and İlker İ (2008). Honey prevents hepatic damage induced by obstruction of the common bile duct, *World J Gastroenterol*, 14, 23, 3729-3732.
- Eröksüz Y, Eröksüz H, Ozer H, Sener B, Tosun F and Akyüz C (2001). Toxicity of dietary *Heliotropium dolosum* seed to mice, *Vet Hum Toxicol*, 43, 3, 152-155.
- Eser SR, Kumova B ve Sivas S (1978). Bulgurlara aflatoksin bulaşması ve karaciğer kanseri ile ilişkisi, *Cerrahpaşa Tıp Fak Derg*, 9, 222-228.
- Esterbauer H, Cheeseman KM, Dianzani MU, Poli G and Slater TF (1982). Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidations stimulated in rat liver microsomes, *Biochem J*, 129-140.
- Eunsil Yu MD, Gheeyoung Choe MD, Gyungyub Gong MD and Inchul Lee MD (1993). Expression of α -smooth muscle actin in liver diseases, *Journal of Korean medical science*, 8, 5, 367-373
- Ezz El-Arab AM, Girgis SM, Hegazy EM and Abd El-Khalek AB (2006). Effect of dietary oney on intestinal microflora and toxicity of mycotoxins in mice, *BMC Complementary and Altern Med*, 14, 6, 6-10.
- FAO/WHO (2002). Aflatoksin M₁. Fifty-sixth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives: Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series, 906, 8-16.
- Feas X and Estevinho ML (2011). A survey of the in vitro antifungal activity of heather (*erica* sp.) organic honey, *J Med Food*, 14, 1284-1288.
- Freeman BA and Crapo JD (1981). Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lung and lung mitochondria, *J Biol Chem*, 256, 10986-10992.
- Fukayama MY and Hsieh PDH (1985). Effect of butylated hydroxy toluene pretreatment on the excretion, tissue distribution and DNA binding of (¹⁴C) aflatoxin B₁ in the rat, *Fd Chem Toxic*, 23, 6, 567-573.
- Fukuda M, Kobayashi K and Hirono Y (2011). Jungle honey enhances immune function and antitumor activity, *Evid Based Complement Alternat Med*, Article ID 908743 1-8.
- Gabliks J, Schaeffer W, Friedman L and Wogan G (1965). Effect of aflatoxin B₁ on cell cultures, *J Bacteriol*, 90, 720-723.

Genç F ve Dodoloğlu A (2003). Arıcılığın Temel Esasları, AÜ Zir Fak Ders Yayınları, 166, 233.

Gheldof N and Engeseth NJ (2002). Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of vitro lipoprotein oxidation in human serum samples, *J Agr Food Chem*, 50, 3050–3055.

Giray B, Girgin G, Engin AB, Aydın S and Şahin G (2007). Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey, *Food Control*, 18, 23-29.

Glavitis R and Salyi G (1998). Mycotoxicosis in poultry, *Poult Int*, 37, 26-40.

Gonzalez-Miret ML, Terrab A, Hernanz D, Fernandez-Recamales MA and Heredia FJ (2005). Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin, *J Agr Food Chem*, 53, 7, 2574-2580.

Hafez AH, Megalla SE, Abdel-Fattah HM and Kamel YY (1982). Aflatoxin and aflatoxicosis, II. effects of aflatoxin on ovaries testicles in mature domestic fowl, *Mycopathol*, 77, 137-139.

Haffejee IE and Moosa A (1985). Honey in the treatment of infantile gastroenteritis, *BMJ*, 290, 1886-1887.

Halliwell B and Gutteridge JM (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine. Some Problems and Concepts, *Arch Biochem Biophys*, 246, 501-514.

Hamilton PB (1982). Mycotoxins and farm animals, *Refush Vet*, 39, 1-2, 17-45.

Haris CC (1996). Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies, *J Nat Can Inst*, 88, 20 1442-1455.

Harvey RB, Phillips TD, Kubena LF, Huff WE and Peterson HD (1991). Effects on aflatoxin M₁ residues in milk by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to aflatoxin-contaminated diets of dairy cows, *Am J Vet Res*, 52, 1556-1559.

Hatch RC (1988). Poison causing abdominal distress of liver or kidney damage, in "Veterinary Pharmacology and Therapeutics" Editors, NH Both and Le Mc Donald, 6th edition, 1102-1125, The Iowa State University Press.

Haworth SR, Lavvlor, TE, Zeiger E, Lee LS and Park DL (1989). Mutagenic potential of ammonia-related aflatoxin reaction products in a model system, *JAOCS*, 66, 1, 102-104.

Holness CL and Simmons DL (1993). Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins, *Blood*, 81, 6, 1607–1613.

Hong WG and Sporn MB (1997). Recent advances in chemoprevention of cancer, *Science*, 278, 1073-1077.

Huff WE, Kubena RB, Harvey RH, Corrier DE and Mollenhaur HH (1986). Progression of aflatoxicosis in broiler chickens, *Poult Sci*, 65, 1891-1899.

Huwing A, Freimund S, Kappeli O and Dutler H (2001). Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbants, *Toxicol Lett*, 122, 179.

IARC (1993). Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines, and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, IARC, 56, 571, Lyon, France.

Itoshima T, Kiyotoshi S, Kawaguchi K, Ogawa H, Ohta W, Ito T, Hirakawa H, Shimada Y and Nagashima H (1981). Kupffer cell hyperplasia in liver diseases. Demonstration by scanning electron microscopy of biopsy samples, *Gastroenterol Jpn*, 16, 3, 223-321.

Iwaki M, Kitagawa T, Akamatsu Y and Aibara K (1990). Cytotoxic effects aflatoxin B₁ and its association with cellular components in chicken embryo primary cultured cells, *Biochem Biophys Acta*, 1035, 146-153.

Jaimez J, Fente CA, Vazquez BI, Franco CM, Cepeda A, Mahuzier G and Prognon P (2000). Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis, *J Chromatography A*, 882, 1-2, 1-10.

Jain SK, McVie R, Duett J and Herbst JJ (1989). Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycolylated hemoglobin in diabetes, *Diabetes*, 38, 1539-1543.

Jarvis B (1971). Factors affecting the production of mycotoxins, *J Appl Bact*, 34, 199-213.

Jeddar A, Kharsany A, Ramsaroop UG, Bhamjee A, Hafejee IE and Moosa A (1985). The antibacterial action of honey, *South Afri Med J*, 67, 257-258.

Jeffery FH, Morton JG and Miller JK (1984). Effects of some clinically significant mycotoxins on the incorporation of DNA, RNA and protein precursors in cultured mammalian cells, *Res Vet Sci*, 37, 30-38.

Jelinek R and Peterka M (1985). Chick embryotoxicity screening test-130 substances tested, *Ind J Exp Biol*, 23, 588-595.

Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G and Penninger JM (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis inducing factor in programmed cell death, *Nature*, 41, 549-594.

Jubb KVF, Kennedy PC and Palmer N (1993). Pathology of domestic animals, 3th Ed, Academic Press, San Diego, USA.

Kan Z, Ivancev K, Lunderquist A, McCuskey PA, McCuskey RS and Wallace S (1995). In vivo microscopy of hepatic metastases: dynamic observation of tumor cell invasion and interaction with Kupffer cells, *Hepatology*, 21, 487-494.

- Karaali A (1986). Gıdalarda küf ve mikotoksin gelişmesini önleyici ve giderici yöntemler ve bunların gıdalar üzerine etkileri, İÜ Cerrahpaşa Tıp Fak Diyabet Yıllığı, 291-296.
- Karakaya Y (2006). Mısır silajında aflatoksin b₁ varlığının ve süte geçme durumunun araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Karaman M, Basmacıoğlu H, Ortatatlı M and Oğuz H (2005). Evaluation of detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology, *Br Poultry Sci*, 46, 394-400.
- Karenlampi OS (1987). Mechanism of cytotoxicity of aflatoxin B₁, *Bioch Biophysical Res Com*, 145, 854-860.
- Kasprzak KS (2002). Oxidative DNA and protein damage in metal induced toxicity and carcinogenesis, *Free Radical Bio Med*, 32, 10, 958-967.
- Kassim M, Achoui M and Mustafa MR (2010). Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity, *Nutr Res*, 30, 650-659.
- Kassim M, Mansor M, Al-Abd N and Yusoff KM (2012). Gelam honey has a protective effect against lipopolysaccharide (LPS)-induced organ failure, *Int J Mol Sci*, 13, 6370-6381.
- Kaya S (1982). Süt yemi ve çiğ sütte aflatoksin kalıntılarının kromatografik yöntem ile araştırılması, *AÜ Vet Fak Derg*, 29, 3-4, 443-457.
- Kaya S (2002). Mikotoksinler, "Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji", Ed. Kaya S, Pirinççi İ ve Bilgili A, 2. Baskı, 537-637, Medisan Yayınevi, Ankara.
- Khanafari A, Soudi H and Miraboulfathi M (2007). Biocontrol of aspergillus flavus and aflatoxin B₁ production in corn, *Iran J Environ Health Sci*, 4, 163-168.
- Kılınç K (1985). Oksijen Radikalleri, Üretilmeleri, Fonksiyonları, Toksik Etkileri, *Biyokimya Dergisi*, 10, 60-89.
- Krell R (1996). Value-Added Products From Beekeeping, Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome FAO Agricultural Services Bulletin, No.124, 16-32
- Kroes R, Sontag JM, Sell S, Williams GM, and Weisburger JH (1975). Elevated concentrations of serum A-Fetoprotein in rats with chemically induced liver tumors, *Cancer Res*, 35, 1214-1217.
- Kuyucuoğlu N (2007). Afyonkarahisar ilindeki anne sütü örneklerinde aflatoksin M₁ düzeylerinin belirlenmesi, Doktor Tezi, Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü, Afyon.

Ladas SP, Haritos DN and Raptis SA (1995). Honey may have a laxative effect on normal subjects because of incomplete fructose absorption, *AJCN*, 62, 1212-1215.

Leeson S, Diaz G and Summers JD (1995). Aflatoxins, in "Toultry Metabolic Disorders and Mycotoxins", Editors, S Leeson, JDG Gonzala and JD Summers, 249-298, University Books, Ontario, Canada.

Mabee MS and Chipley JR (1973) Tissue distribution and metabolism aflatoxin B₁-¹⁴C in broiler chickens, *Appl Microbiol*, 25, 5, 763-769.

Madhusudhanan N, Kavinthalakshmi SN, Radha Shanmugasundaram K and Shanmugasundaram ERB (2004). Oxidative damage to lipids and proteins induced by aflatoxin B₁ in fish (*Labeo rohita*) protective role of Amrita Bindu, *Environ Toxicol Phar*, 17, 73-77.

Manduch M, Dexter DF, Jalink DW, Vanner SJ and Hurlbut DJ (2009). Undifferentiated pancreatic carcinoma with osteoclast-like giant cells: Report of a case with osteochondroid differentiation, *Pathol Res Pract*, 205, 5, 353–359.

Mannervik B and Guthenberg C (1981). Glutathione S-transferase (Human Placenta), *Method Enzymol*. 77, 231–235.

Masoero F, Gallo A, Moschini M, Piva G and Diaz D (2007). Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts, *Animal*, 1, 9, 1344–1350.

Mayura K, Abde-Wahhab MA, McKenzie KS, Sarr AB, Edwards JF, Naguib K and Philips TŪ (1998). Prevention of maternal and developmental toxicity in rats viadietary inclusion of common aflatoxin sorbents, Potential for hidden risks, *Toxicol Sci*, 41, 175-182.

McCord JM and Fridovich I (1969). Superoxide dismutase, anenzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein), *J Bio Chem*, 244, 6049–6053.

McClean M and Dutton MF (1995). Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: An Update, *Pharmac Ther*, 65, 163-192.

Miller DM, Clark JD, Hatch RC and Jain AV (1984). Caprine aflatoxicosis, Serum electrophoresis and pathologic changes, *Am J Vet Res*, 45, 6, 1136-1141.

Molan PC (1992). The antibacterial activity of honey, 1.The nature of the antibacterial activity, *Bee World*, 73, 1, 5-28.

Moorthy AS, Mahendar M and Rao PR (1985). Hepatopathology in experimental aflatoxicosis in chickens, *Indian J Anim Sci*, 55, 8, 629-632.

Moss EJ, Neal GE and Judah DJ (1985). The mercapturic acid pathway metabolites of a glutathione conjugate of aflatoxin B₁, *Chem Biol Interactions*, 55, 139-155.

- Mulas JM, Monteros AE, Carrasco L, Niel M Fernandez A, Mulas JM, Monteros AE and Van M (1995). Immunohistochemical distribution pattern of intermediate filament proteins in 50 feline neoplasms, *Vet Pathol*, 32, 692-701.
- Nakae D, Konishi Y and Farber JL (1987). A role for oxygen radicals in the hepatotoxicity of aflatoxin B₁ and dimethyl nitrosamine, *Proc Jap Cancer Assoc*, 38.
- Netke S, Roomi M, Tsao C and Niedzwiecki A (1997). Ascorbic acid protects guinea pigs from acute aflatoxin toxicity, *Toxicol Appl Pharmacol*, 143, 429-435.
- Niki E (1987). Antioxidant in relation to lipid peroxidation, *Chem Phys Lipids*, 44, 227-253.
- Nixon JE, Hendrick JD, Pawlowski NE, Loveland PW and Sinnhuber RO (1981). Carcinogenicity of aflatoxin in Fisher 344 rats, *J Natl Cancer Inst*, 66, 1159-1163.
- Nizamlioğlu F (1996). Mikotoksin şüphesiyle laboratuara getirilen yem ve yem hammaddelerinde aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ araştırılması, *Veterinarium*, 7, 42-44.
- Nouchi T, Tanaka Y, Tsukada T, Sato C and Marumo F (1991). Appearance of alpha-smooth-muscle-actin-positive cells in hepatic fibrosis, *Liver*, 112, 100-105.
- O'Brien M, Nielsen KF, Okiely P, Forristal PD, Fuller HT and Frisvad JC (2006). Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland, *J Agric Food Chem*, 54, 9268-9276.
- Oğuz H (1997). Broyler yemlerine katılan polivinilpolipirrolidon (pvpp)'un ve diğer bazı adsorbanlarla karışımlarının aflatoksikozise karşı koruyucu etkinliklerinin belirlenmesi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Oğuz H and Kurtoğlu V (2000). Effect of clinoptilolite on fattening performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis, *Brit Poult Sci*, 41, 512-517.
- Oğuz H, Kurtoğlu V and Coşkun B (2000). Preventive efficiency of clinoptilolite in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb exposure), *Res Vet Sci*, 69, 197-201.
- Ortatatlı M and Oğuz H (2001). Ameliorative effects of dietary clinoptilolite on pathological changes in broiler chickens during aflatoxicosis, *Res Vet Sci*, 71, 59-66.
- Ortatatlı M, Oğuz H, Hatipoğlu F and Karaman M (2005). Evaluation of pathological changes in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure, *Res Vet Sci*, 78, 61-68.
- Oruç HH (2005). Mikotoksinler ve tanı yöntemleri, *Uludağ Üniv Vet Fak Derg*, 24, 105-110.
- Özkarlı M (2003). Yer fıstıklarında AFB₁ üzerine geleneksel kavurma ve mikrodalgada kavurmanın etkisi, yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Pereyra MLG, Alonso VA, Sager R, Morlaco MB, Magnoli CE, Astoreca AL, Rosa CAR, Chiacchiera, Dalcerro AM and Cavaglieri LR (2008). Fungi and selected mycotoxins from pre- and posfermented corn silage, *J Appl Microbiol*, 104, 1034-1041.

Perez RA, Iglesias MT, Pueyo E, Gonzalez M and De Lorenzo C (2007). Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys, *J Agr Food Chem*, 55, 2, 360-365.

Pey Wen CT, Hussein SZ, Abdullah S, Abdul Karim N, Makpol S and Yusof YAM (2012). Gelam and nenas honeys inhibit proliferation of HT 29 colon cancer cells by inducing DNA damage and apoptosis while suppressing inflammation, *Asian Pacific J Cancer Prev*, 13, 1605-1610.

Pons WA, Cucullu AF, Lee LS, Janssen H and Goldblatt LA (1972). Kinetic study of acid, catalyzed conversion of aflatoxins B₁ and G₁ to aflatoxins B_{2a} and G_{2a}, *J Am Oil Chem Soc*, 49, 124.

Popek S (2003). Identification of honey types, *Nahrung/Food*, 47, 1, 39-40.

Postmes THJ, Bosch MMC, Dutrieux R, Van Baare J and Hoekstra MJ (1997). Speeding up the healing of burns with honey, An experimental study with histological assessment of wound biopsies, in "Bee Products: Properties, Applications and Apitherapy", Editors Mizrahi A, Lensky, 27-37, Plenum Press, New York.

Preetha SP, Kanniappan M, Selvakumar E, Nagaraj M and Varalakshmi P (2006). Lupeol ameliorates aflatoxin B₁-induced peroxidative hepatic damage in rats, *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 143, 333-339.

Radwan S El- Essawy A and Sarhan MM (1984) Experimental evidence for the occurrence in honey of specific substances active against Microorganisms, *Zentral Microbiol*, 139, 249- 255.

Rakha MK, Nabil ZI and Hussein AA (2008). Cardioactive and vasoactive effects of natural wild honey against cardiac malperformance induced by hyperadrenergic activity, *J Med Food*, 11, 91-98.

Ravi R, Kumar S and Kumar R (2001). Biochemical changes induced in liver and serum of aflatoxin B₁-treated male wistar rats, preventive effect of picroliv, *Pharmacol Toxicol*, 88, 53-58.

Remstein ED, Arndt CA and Nascimento AG (1999). Plexiform fibrohistiocytic tumor: clinicopathological analysis of 22 cases, *Am J Surg Pathol*, 23, 662-670.

Richard E, Heutte N, Sage L, Pottier D, Bouchart V, Lebailly P and Garon D (2007). Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage, *Food and Chem Toxicol*, 45, 2420-2425.

Robb J (1993). Mycotoxins, in Practice, November, 278-279.

- Rockey DC, Boyles JK, Gabbiani G and Friedman SL (1992). Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture, *J Submicr Cytol Path*, 24, 2, 193-203.
- Rodricks JV and Stoloff L (1977). Aflatoxin residues from contaminated feed in edible tissues of food-producing animals, in "Mycotoxin in Human and Animal Health", Pathotox Publ Inc, 67-79, Pork Forest South, Illinois.
- Rustom IYS (1997). Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and nactivation by physical methods, *Food Chem*, 59, 1, 57-67.
- Sahoo PK, Chattopadhyay SK, Johrp TS, Charan K and Sıkdar A (1991). Pathology of experimental aflatoxicosis in rabbits, *Ind J Anim Sci*, 63, 268-273.
- Salmanoğlu B (2002). Broyler civcivlerde aflatoksin B₁'in karaciğerin vitamin A depolanması üzerine etkisi, *Turk J Vet Anim Sci*, 26, 1341-1344.
- Salwa MH, Hegazi SM, Demet Ö and Oğuz H (2000). Comparative study on the influence of aflatoxin and ochratoxin performance of broiler chicks, *J Egyptian Vet Med Ass*, 60, 201-212.
- Samarajeewa U, Sen AC, Cohen MD and Wei CI (1990). Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods, *J Food Prot*, 53, 6, 489-501.
- Schell TC, Lindemann MD, Kornegay ET and Blodgett DJ (1993). Effects of feeding aflatoxin-contaminated diets with and without clay to weanling and growing pigs on performance, liver function, and mineral metabolism, *J Anim Sci*, 71, 1209-1218.
- Seven A ve Candan G (1995). Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu, *Klinik Gelişim*, 8, 3906-3911.
- Shamala TR, Shri Jyothi Y and Saibaba P (2000). Stimulatory effect of honey on multiplication of lactic acid bacteria under in vitro and in vivo conditions, *Lett Appl Microbiol*, 30, 453-455.
- Sharby TF (1978) Kanatlılarda mikotoksikozis, *Vet Hekim Derg*, 48, 2, 47-51.
- Shen HM, Ong CN and Shi CY (1995). Involvement of reactive oxygen species in aflatoxin B₁-induced cell injury in cultured rat hepatocytes, *Toxicology*, 9, 115-123.
- Shen HM, Shi CY, Lee HP and Ong CN (1994). Aflatoxin B₁ induced lipid peroxidation in rat liver, *Toxicol Appl Pharm*, 127, 145-150.
- Shenoy VP, Ballal M, Shivananda P and Bairy I (2012). Honey as an antimicrobial agent against pseudomonas aeruginosa isolated from infected wounds, *J Glob Infect Dis*, 4, 2, 102-105.
- Shiga A, Shirota K and Nomura Y (1996). Immunohistochemical and ultrastructural studies on the sinusoidal lining cells of canine hepatocellular carcinoma, *J Vet Med Sci*, 58, 509-514.

- Sibanda L, De Saeger S and Peteghem CV (1999). Development of a portable field immunoassay for the detection of aflatoxin M₁' in milk, *Int J Food Microbiol*, 48, 3, 203–209.
- Siddiqui IR (1970). The sugars of honey advances in Carbohydrate, Chemistry and Biochemistry, 25, 285-309.
- Singh DK and Lippman SM (1998). Cancer chemoprevention, Part 1 retinoids and carotenoids and other classic antioxidants, *Oncology*, 12, 1643-1659.
- Slowik J, Graczyk S and Madej JA (1985). The effect of a single dose of aflatoxin B₁ on the value of nucleolar index of blood lymphocytes and on histological changes in the liver, bursa Fabricii, suprarenal glands and spleen in ducklings, *Folia Histochem Cytobiol*, 23, 71-81.
- Smith JE (1997). Handbook of Plant and Fungal Toxicants, In Aflatoxins Fungal Toxicants, Ed, JD F D Mello, 269-285, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Soyöz M ve Özçelik N (2002). Okratoksin A'nın toksik etkileri ve eliminasyonu, *T Klin J Med Sci*, 22, 421.
- Steyn PS and Stander MA (1999). Mycotoxins with Special Reference to the Carcinogenic Mycotoxins: Aflatoxins, Ochratoxins and Fumonisin, in “General and Applied Toxicology“, Editors, Ballantyne B, Marrs TC, Syversen TLM, 2nd ed, 2145-2176, Macmillan Reference Ltd, United Kingdom.
- Stubblefield RD, Pier AC, Richard JL and Shotwell OL (1983). Fate of aflatoxins in tissues, fluids and excrements from cows dosed orally with aflatoxin B₁, *Am J Vet Res*, 44, 1750-1752.
- Sur E (2001). Yumurtaya verilen aflatoksin b₁ (afb₁)'in tavukların lenfoid organlarının embriyonal gelişimi üzerindeki etkilerinin enzim histokimyasal yöntemlerle araştırılması, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Sweeney MJ and Dobson ADW (1999). Molecular biology of mycotoxin biosynthesis, *FEMS Microbiol Lett*, 175, 149-163.
- Şanlı Y (1995). Mikotoksinler, “Özel Toksikoloji Kitabı“, Editor, Sezai Kaya, 283-328.
- Tan HT, Rahman RA and Gan SH (2009). The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey, *BMC Complement Altern Med*, 9, 1-8.
- Tanaka M, Nakashima O, Wada Y, Kage M, And Kojiro M (2003). Pathomorphological study of kupffer cells in hepatocellular carcinoma and hyperplastic nodular lesions in the liver, *Hepatology*, 24, 4.
- Taormina PJ, Niemira BA and Beuchat LR, (2001). Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power, *Int J Food Microbiol*, 69, 217-225.

Taylor CR and Cote RJ (1994). *Immunomicroscopy, A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist* 2nd Ed, Saunders Company Philadelphia, USA.

Terzi E (2009). Bilecik ve çevresinde üretilen ballarda bulunan polenlerin araştırılması, Doktora tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

Theumer MG, Lopez AG, Masih DT, Chulze SN and Rubinstein HR (2003). Immunobiological effects of AFB₁ and AFB₁-FB₁ mixture in experimental subchronic mycotoxicoses in rats, *Toxicology*, 186, 159-170.

Topal S, Aran N ve Pembeci C (1999). Türkiye'nin tarımsal mikroflorasının mikotoksin profilleri, *Gıda*, 24, 129-137.

Toth CA and Thomas P (1992). Liver endocytosis and Kupffer cells, *Hepatology*, 16, 255-266.

Tuncer N (1987). Ankara çevresinde üretilen yumurta örneklerinde aflatoksin rezidülerinin araştırılması, *Etlik Vet Mik Derg*, 6, 101-116.

Tuzcu M (1999). *Aspergillus parasiticus* NRLL 2999 susu ile küflendirilmiş bulgurlarla beslenen beyaz farelerdeki patolojik bulgular, Doktora Tezi, SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Tuzen M, Silici S, Mendil D and Soylak M (2007). Trace element levels in honeys from different regions of Turkey, *Food Chem*, 103, 325-330.

Türkdoğan MK, Özbek H, Yener Z, Tuncer İ, Uygan İ and Ceylan E (2003). The role of *Urtica dioica* and *Nigella sativa* in the prevention of carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats, *Phytotherapy Res*, 17, 942-946.

Varga J and Toth B (2005). Strategies to control mycotoxins in feeds, *Acta Vet Hung*, 53, 189-203.

Veldman A (1992). Effect of sorbentia on carry-over of aflatoxin from cow feed to milk, *Milchwissenschaft*, 47, 2, 777-780.

Verma RJ and Nair A (2001). Ameliorative effect of vitamin E on aflatoxin induced lipid peroxidation in the testis of mice, *Asian J Androl*, 3, 217-221.

Wagner H, Willer F and Kreher B (1989). Biologically active compounds from the aqueous extract of *Urtica dioica*, *Planta Medica*, 55, 452-454.

Wang J and Groopman JD (1999). DNA damage by mycotoxins, *Mutat Res*, 424, 167-181.

Wellford TE, Eadie T and Llewellyn GC (1978). Evaluating the inhibitory action of honey on fungal growth, sporulation, and aflatoxin production, *Z Lebensm Unters Forsch*, 166, 5, 280-283.

- Weng MS, Soon HOY and Lin JK (2005). Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21 expression: Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase, *Biochem Pharmacol*, 69, 1815-1817.
- White JW (1975). Composition of honey, in “Honey, A Comprehensive survey“, Editors, Crane, E, 157-206, Heinemann Edition, London.
- Whitlow LW and Hagler WM (2002). Mycotoxin in feed, *Feedstuffs*, 74, 1-10.
- Whitlow LW and Hagler WM (2005). Mycotoxins in dairy cattle: occurrence, toxicity, prevention and treatment, *Proc Southwest Nutr Conf*, 124-138.
- Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM and Aggarwal D (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions, *Am J lin Nutr*, 80, 1106-1122.
- Wong ZA and Hsieh DPH (1980). The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin B₁ in the monkey, rat and mouse, *Toxicol Appl Pharmacol*, 55, 115-125.
- Yagı K (1994). Lipid peroxides in hepatic, gastrointestinal, and pancreatic disease, in “free radicals in diagnostic medicine“, Editor, Armstrong D Plenum, 65-169.
- Yakışık M (1992). Aflatoxin B₁ verilmiş Newcastle'la aşıllı civcivlerde karaciğer paranzimi üzerinde ışık mikroskopik incelemeler, *UÜ Vet Fak Derg*, 11, 43-51.
- Yaroğlu T (2002). Türk silahlı kuvvetlerine bağlı birliklerde tüketime sunulan peynirlerde aflatoksin M₁ düzeylerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi SağlıkBilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Yener Z, Çelik İ, İlhan F and Bal R (2009). Effects of *Urtica dioica* L. Seed on lipid peroxidation, antioksidants and liver pathology in aflatoxin-injury in rats, *Food Chem Toxicol*, 47, 418-424.
- Yerer MB ve Aydoğan S (2000). Oksidatif stres ve antioksidantlar, *Erciyes Üniv Sağlık Bil Derg*, 9, 1, 49-53.
- Yiannikouris A and Jouany JP (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review, *Anim Res*, 51, 81-99.
- Zeina B, Othman O and al-Assad S (1996). Effect of honey versus thyme on Rubella virus survival in vitro, *J Altern Complement Med*, 2, 345-348.
- Zhao J, Wang J, Chen Y and Agarwal R (1999). Anti-tumor -promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seed in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3-gallate as the most effective antioxidant constituent, *Carcinogenesis*, 20, 1737-1745.
- Zumi AA and Luto A (1989). Honey - a remedy rediscovered, *J Roy Soc Med*, 82, 384-385.

ÖZGEÇMİŞ

Turan YAMAN, 1982 yılında Ağrı’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ağrı’da tamamladı. 2004 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nde öğrenime başladı. 2009 yılında aynı fakülteden mezun oldu. Aynı yıl Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı’nda doktora’ya başladı. 2010 yılında Gıda Tarım ve Hayvancılık bakanlığında veteriner hekim olarak çalıştı. 2011 yılında Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı’na öğretim görevlisi olarak atandı. Halen Dicle Üniversitesinde öğretim görevlisi olarak göreve devam etmektedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.