

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALBİNO FARELERDE AFLATOKSİN B₂
TOKSİSİTESİNE KARŞI RESVERATROLÜN
KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Öğrencinin Adı SOYADI : ALPEREN GÜNDÜZ
ORCID :
Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : .../.../2021

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : PROF. DR. EMİNE YALÇIN
ORCID :

Şubat 2021
GİRESUN

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALBİNO FARELERDE AFLATOKSİN B₂
TOKSİSİTESİNE KARŞI RESVERATROLÜN
KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ALPEREN GÜNDÜZ

Enstitü Anabilim Dalı

:

BİYOLOJİ

Bu tez 19/02/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr.
Kültiğın ÇAVUŞOĞLU
Jüri Başkanı

Prof. Dr.
Emine YALÇIN
Üye

Dr. Öğretim Üyesi
Fatih KUTLUER
Üye

Doç. Dr.
Bahadır KOZ
Enstitü Müdürü

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Alperen GÜNDÜZ

19/02/2021

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın her aşamasında bilimsel alandaki kıymetli birikimlerini büyük bir fedakarlık ile paylaőan Danıőmanım Sayın Prof. Dr. Emine YALÇIN'a,

Engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Sayın Prof. Dr. Kùltigin ÇAVUŞOĞLU'na,

Eđitimim sırasında ellerini her daim omuzumda hissettiğim, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
TABLolar LİSTESİ	VI
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
BÖLÜM 1. GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Aflatoksinler.....	3
2.1.1. Aflatoksin maruziyeti ve metabolizası	5
2.1.2. Aflatoksinlerin toksik etkileri	6
2.1.3. Aflatoksin B ₂	9
2.2. Resveratrol	9
2.2.1. Resveratrolün biyosentezi	11
2.2.2. Resveratrol metabolizması	12
2.2.3. Resveratrolün koruyucu özelliği	13
BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1. Test Materyali ve Hayvanların Bakımı	15
3.2. Deneysel grupların oluşturulması	15
3.3. Canlı ağırlık, karaciğer ve böbrek ağırlıklarının ölçümü.....	16
3.4. Biyokimyasal analizler	16
3.5. Antioksidan/Oksidan denge.....	16
3.6. Sitogenetik analizler.....	17
3.6.1. Mikronukleus testi.....	17
3.6.2. Kromozomal anormallik testi.....	18

3.7. İstatistiksel Analiz.....	18
BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	19
4.1. Fizyolojik parametreler	19
4.2. Biyokimyasal parametreler	22
4.3. Antioksidan/Oksidan denge.....	25
4.4. Genotoksik etki.....	28
BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER	34
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	46

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AFB ₀	: Aflatoksin B ₁ -8-9-epoksit
AFB ₁	: Aflatoksin B ₁
AFB ₁ -N ₇ -Gua	: Aflatoksin B ₁ -N ₇ -guanin
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
AMPK	: AMP ile aktive olan protein kinaz
ALT	: Alanin transaminaz
AST	: Aspartat transaminaz
BUN	: Kan üre azotu
GSH	: Glutatyon
KA	: Kromozomal anormallik
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
MDA	: Malondialdehit
MN	: Mikronukleus
ROS	: Reaktif oksijen türleri

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Aflatoksin türleri ve kimyasal yapıları	4
Şekil 2.2.	AFB ₁ 'in metabolizması ve toksisitesi	6
Şekil 2.3	AFB ₁ 'in metabolik aktivasyonu ve DNA ile etkileşimi	7
Şekil 2.4.	Aflatoksinin hücre ve kontrol noktası üzerine etkileri	8
Şekil 2.5.	Cis ve trans resveratrolün kimyasal ve 3D yapıları	10
Şekil 2.6.	Resveratrol biyosentez reaksiyonları	12
Şekil 4.1.	ALT ve AST düzeyleri üzerine AFB ₂ ve resveratrolün etkisi	23
Şekil 4.2.	Karaciğer ve böbrek organlarındaki MDA düzeyleri üzerine AFB ₂ ve resveratrolün etkisi	26
Şekil 4.3.	Karaciğer ve böbrek organlarındaki MDA düzeyleri üzerine AFB ₂ ve resveratrolün etkisi	28
Şekil 4.4.	Yanak epiteli, eritrosit ve lökosit hücrelerinde oluşan MN'ler ve MN oluşum sıklıkları	30

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Aflatoksinlerin kimyasal ve fiziksel özellikleri.....	3
Tablo 2.2. AFB ₂ 'nin kimyasal ve fiziksel özellikleri.....	9
Tablo 2.3. Resveratrolün kimyasal ve fiziksel özellikleri.....	11
Tablo 3.1. Gruplar ve grup oluşturma prensibi.....	16
Tablo 4.1. Fizyolojik parametreler üzerine AFB ₂ ve resveratrol uygulamasının etkileri.....	21
Tablo 4.2. BUN ve kreatinin düzeyleri üzerine AFB ₂ ve resveratrolün etkisi.....	24
Tablo 4.3. AFB ₂ 'nin genotoksik etkileri.....	32

ALBİNO FARELERDE AFLATOKSİN B₂ TOKSİSİTESİNE KARŞI RESVERATROLÜN KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışmada aflatoksin B₂'nin albino farelerde toksik etkileri ve bu toksik etkilere karşı resveratrolün koruyucu etkisi araştırılmıştır. Toksik etkinin belirlenmesinde fizyolojik, biyokimyasal ve sitogenetik parametreler kullanılmıştır. Bu amaçla her bir grupta 6 albino fare olmak üzere 6 deneysel grup oluşturulmuştur. Çalışma süresince I. grup kontrol grubu olarak pellet yem ve su, II. grup : 10 mg/kg resveratrol, III grup 20 mg/kg resveratrol, IV. grup 20 µg/kg aflatoksin B₂, V. grup 10 mg/kg resveratrol+20 µg/kg aflatoksin B₂, VI. grup 20 mg/kg resveratrol+20 µg/kg aflatoksin B₂ ile muamele edilmiştir. Uygulama öncesi ve sonrasında farelerin canlı ağırlık, karaciğer ve böbrek ağırlıkları ölçülerek fizyolojik değişimler araştırılmıştır. Serum örneklerinde alanin transaminaz, aspartat transaminaz, kan üre azotu ve kreatinin parametreleri, böbrek ve karaciğer dokularında malondialdehit ve glutatyon düzeyleri incelenerek biyokimyasal parametrelerdeki değişimler araştırılmıştır. Yanak epiteli, eritrosit ve lökosit hücrelerinde mikronukleus sıklığı, kemikiliği hücrelerinde ise kromozomal anormalliklerin frekansı belirlenerek genotoksik etkiler incelenmiştir.

Sonuç olarak aflatoksin B₂ uygulanan grupta canlı ağırlığı, böbrek ve karaciğer ağırlıklarında önemli azalmalar tespit edilirken aflatoksin B₂+resveratrol uygulanan gruplarda bu azalmaların gerilediği belirlenmiştir. Aflatoksin B₂ uygulanan grubun serum alanin transaminaz, aspartat transaminaz, kan üre azotu ve kreatinin parametreleri düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla yüksek olduğu, böbrek ve karaciğerde malondialdehit ve glutatyon düzeyinde ciddi anormalliklerin olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar aflatoksin B₂ uygulamasının karaciğer ve böbrek hasarına neden olduğuna ve bu hasarın oksidatif stresten kaynaklandığına işaret etmektedir. Aflatoksin B₂ ile birlikte 20 mg/kg resveratrol uygulanan grupta biyokimyasal parametrelerde gözlenen anormalliklerde önemli iyileşmeler gözlenmiştir. Aflatoksin B₂'nin yanak epiteli, eritrosit ve lökosit hücrelerinde mikronukleus oluşumunu, kemik iliği hücrelerinde ise kırık, fragman, asentrik kromozom, disentrik kromozom, gap ve ring gibi kromozomal hasarları indüklediği belirlenmiştir. Aflatoksin B₂ ile birlikte 20 mg/kg resveratrol uygulamasının mikronukleus ve kromozomal anormalliklerin sıklığını azalttığı gözlenmiştir.

Bu çalışmada ile bir mikotoksin olan aflatoksin B₂'nin albino farelerde seçili biyokimyasal ve fizyolojik parametrelerde ciddi değişimlere ve genotoksik etkiye neden olduğu, resveratrolün ise antioksidan özelliği ile bu toksik etkilere karşı koruyucu bir rol sergilediği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Aflatoksin B₂, antioksidan, kromozomal anormallik, mikronukleus, oksidatif stres, resveratrol

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE ROLE OF RESVERATROL AGAINST AFLATOXIN B₂ TOXICITY IN ALBINO MICE

SUMMARY

Physiological, biochemical and cytogenetic parameters were used to determine the toxic effects. For this purpose, 6 experimental groups, including 6 albino mice in each group, were formed. In experimental period, group I was fed with pellet feed and water as the control group. 10 mg/kg resveratrol, 20 mg/kg resveratrol, 20 µg/kg aflatoxin B₂, 10 mg/kg resveratrol + 20 µg/kg aflatoxin B₂, 20 mg/kg resveratrol + 20 µg/kg aflatoxin B₂ were administered to the group II, III, IV, V and VI, respectively. Physiological changes were investigated by measuring the body weight, liver and kidney weight of the mice before and after the application. Biochemical parameters were investigated by measuring alanine transaminase, aspartate transaminase, blood urea nitrogen and creatinine levels in serum samples, malondialdehyde and glutathione levels in kidney and liver tissues. Genotoxic effects were investigated by determining the frequency of micronucleus in buccal epithelium, erythrocyte and leukocyte cells, and the frequency of chromosomal abnormalities in bone marrow cells.

As a result, while significant decreases were detected in body weight, kidney and liver weights in the aflatoxin B₂ applied group, it was determined that these decreases regressed in the aflatoxin B₂ + resveratrol groups. It was found that the serum alanine transaminase, aspartate transaminase, blood urea nitrogen and creatinine parameters levels of the aflatoxin B₂ treated group were higher than the control group, and there were serious abnormalities in the levels of malondialdehyde and glutathione in the kidney and liver. These results indicate that aflatoxin B₂ administration causes liver and kidney damage and this damage is caused by oxidative stress. Significant improvements in biochemical parameters were observed in aflatoxin B₂+20 mg/kg resveratrol treated groups. It has been determined that aflatoxin B₂ induces micronucleus formation in buccal epithelium, erythrocyte and leukocyte cells, and chromosomal damage such as fracture, fragment, ascentric chromosome, dicentric chromosome, gap and ring in bone marrow cells. It has been observed that administration of 20 mg/kg resveratrol together with aflatoxin B₂ decreases the frequency of micronucleus and chromosomal abnormalities.

In this study it was determined that aflatoxin B₂, a mycotoxin, caused serious changes in selected biochemical and physiological parameters and genotoxic effect in albino mice, while resveratrol has a protective role against these toxic effects with its antioxidant properties.

Keywords: Aflatoxin B₂, antioxidant, chromosomal abnormality, micronucleus, oxidative stress, resveratrol

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Mikotoksinler çok çeşitli tarım ürünlerinde ekolojik şartlara bağlı olarak mantarlar tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir. Bu toksinler, belirli sıcaklık ve nem şartlarında *Penicillium*, *Aspergillus* ve *Fusarium* gibi bazı küfler tarafından üretilmekte ve tarımsal ürünlerde bozulmaya neden olmaktadır. Bugüne kadar 400'ün üzerinde farklı yapılarda mikotoksin türü tanımlanmış olup fumonisin, okratoksin, aflatoksin, zeranol, trikotesenler ve patulin sık rastlanan ve iyi bilinen mikotoksin türleridir. Aflatoksinler pek çok tarımsal ürünü tehdit eden ve insan sağlığı açısından da toksik etkilere neden olan bir mikotoksin türüdür [1]. İnsanlar tarafından tüketilen çeşitli gıdalarda, yemlerde, tahıllarda ve kuru yiyeceklerde yüksek rutubet ve sıcaklığa bağlı olarak *Aspergillus* türleri hızla çoğalmakta ve aflatoksin üretmektedirler. Yer fıstığı, fındık, antep fıstığı gibi yağlı gıdalar; kuru incir, kuru üzüm gibi meyveler; karabiber, kırmızıbiber gibi baharatlar, yağlı tohumlar ve tahıllar aflatoksin oluşumunun sıkça rastlandığı ürünlerin başında gelmektedir. Hayvanların aflatoksin içeren yemlerle beslenmesi sonucu peynir, süt, yumurta ve çeşitli et ürünlerinde de aflatoksin varlığı saptanmıştır [2,3].

Aspergillus flavus, *Aspergillus nomius* ve *Aspergillus parasiticus* küfleri tarafından üretilen aflatoksinler, floresans özellikleri ve kromatogramdaki hareketlerine göre B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ ve M₂ olmak üzere altı grupta sınıflandırılmaktadır [1,4]. Aflatoksin içeren gıdaların uzun süre tüketimi insan sağlığı açısından ciddi sağlık problemlerine neden olmaktadır. Aflatoksinlerin mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkiye sahip olduğu, özellikle böbrek ve karaciğerde akut ve kronik toksisiteye neden olduğu bilinmektedir. Aflatoksinler toksik etkilerinin gücüne göre aflatoksin B₁>aflatoksin G₁>aflatoksin B₂>aflatoksin G₂ şeklinde sıralanmaktadır. Bugüne kadar en iyi tanımlanan ve araştırılan aflatoksin türü B₁'dir [1,5]. Bu tez çalışmasında aflatoksin türleri arasında hakkında daha az bir bilgiye sahip olduğumuz aflatoksin B₂'nin toksik etkileri araştırılmıştır. Yaygın bir toprak mantarı olan *Aspergillus flavus* tarafından üretilen ve önemli bir gıda kontaminantı olan aflatoksin B₂, B₁'in dihidro türevidir. Aflatoksin B₂ hepatotoksik, teratojenik ve kanserojen etkilere neden olabilmektedir [6].

İnsanların çok sayıda ve çeşitte karsinojenik ve mutajenik özellikte kimyasala maruz kalması sağlık açısından pek çok olumsuz etkilere ve çok çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Tüm bu olumsuz etkilerin azaltılabilmesi, kanser, diyabet ve kalp hastalıklarına karşı korunmanın sağlanabilmesi için günlük diyetle doğal aktif bileşenlerin düzenli olarak tüketilmesi gereklidir. Epidemiyolojik çalışmalar, doğal ve aktif bileşiklerin düzenli tüketimi ile insanların pek çok hastalığa karşı korunabileceğini ortaya koymuştur. Özellikle oksidatif stres ile ilişkili pek çok hastalığın antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin tüketimi ile önlenebildiği rapor edilmektedir [7,8]. Vücuttaki oksidatif stres yükü ve endojen antioksidan savunma sistemi bir denge halindedir ve bu dengenin bozulması oksidatif hasara neden olmaktadır. Bu nedenle endojen antioksidanlara ilave olarak diyetle dışardan alınan ekzojen antioksidanlar, bu dengenin yeniden kurulmasına katkı sağlamaktadır. Baklagiller, çam ağacı ve özellikle üzümde yoğun bir şekilde sentezlenen resveratrol, diyetle alınan antioksidan özellikte bir fitoaleksindir. Resveratrol serbest radikalleri temizleyerek ve antioksidan enzim ekspresyonunu artırarak koruyucu bir aktivite sergilemektedir. Ayrıca oksidatif stres sonucu oluşan DNA hasarını ve hücre zarı lipidlerinin oksidasyonunu da azaltmaktadır [9,10]. Resveratrol antioksidatif, antiinflamatuvar aktivite sergilemekte, mitokondriyal biyogenez ve otofaji gibi mekanizmaları aktive ederek sitotoksik etkileri de önlemektedir. Resveratrol diyabet, nörodejeneratif bozukluklar, bilişsel bozukluklar, kanser, böbrek hastalıkları ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalığa karşı da koruyucu bir özellik sergilemektedir [11,12].

Bu çalışmada aflatoksin B₂'in albino farelerde potansiyel toksik etkileri ve bu toksik etkilere karşı resveratrolün koruyucu özelliği araştırılmıştır. Toksik etkiler canlı ağırlık ve organ ağırlığı, kan parametreleri, oksidan/antioksidan denge, mikronukleus ve kromozomal anormalliklerin oluşum sıklığı kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışma ile bir aflatoksin türü olan aflatoksin B₂ toksisitesi ve resveratrolün bu toksisiteye karşı koruyuculuğu hakkında literatüre veri girişi sağlanmıştır. Ayrıca çalışma kapsamında fizyolojik, biyokimyasal ve sitogenetik parametreler kullanılarak toksisite ve koruyucu özellik çok yönlü olarak araştırılmıştır. Seçili her bir parametredeki değişim birbiri ile ilişkilendirilmiş ve bu yolla toksisite ve koruyucu rolün mekanizması da aydınlatılmıştır.

BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Günümüzde önemli sağlık sorunlarına neden olan mikotoksinler insan ve hayvanlara çeşitli temas yolları ile bulaşmaktadır. Aflatoksinler, mikotoksinler içerisinde en güçlü biyolojik karsinogen madde bilinmekte ve canlılarda oluşturduğu toksik etkileri nedeniyle pek çok çalışmanın konusunu oluşturmaktadır. Aflatoksinlerin toksik etkileri maruziyet süresi ve dozu, tür, yaş, cinsiyete göre değişiklik göstermekle birlikte aflatoksin türünün de toksisite üzerinde önemli bir etkisi vardır. Aflatoksin türleri ile çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen bu çalışmalar daha çok aflatoksin B₁ ile gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle toksik etkiler, maruziyet, kalıntı analizleri ve insanlardaki metabolizması en iyi aydınlatılan tür aflatoksin B₁'dir.

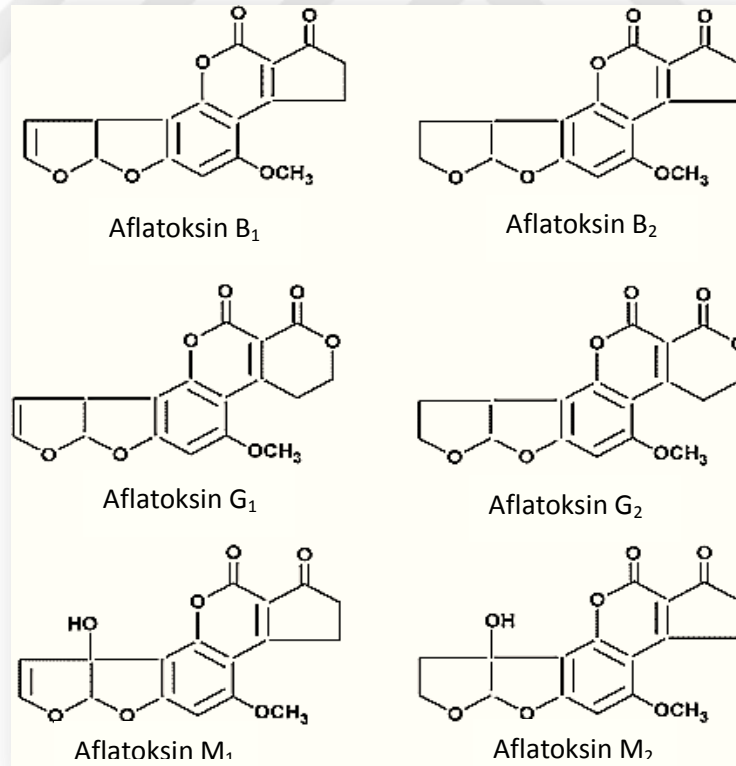
2.1. Aflatoksinler

Aflatoksinler, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus flavus* mantarları tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir. *A. flavus*'a ait bazı suşlar ve *A. parasiticus*'un ise büyük bir kısmı aflatoksin üretmektedir. Ancak yapılan bazı çalışmalarla *Aspergillus nomius* ve *Aspergillus pseudotamarii*'nin de aflatoksin ürettikleri ortaya konmuştur. Aflatoksinler UV ışığı altında verdiği renk esas alınarak aflatoksin B₁ (AFB₁), aflatoksin B₂ (AFB₂), aflatoksin G₁ (AFG₁), aflatoksin G₂ (AFG₂), aflatoksin M₁ (AFM₁) ve aflatoksin M₂ (AFM₂) olmak üzere başlıca altı grupta sınıflandırılmaktadır [13-15]. Aflatoksin türlerinin kimyasal ve fiziksel özellikleri Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Aflatoksinlerin kimyasal ve fiziksel özellikleri [16]

	Moleküler formül	Moleküler ağırlık (g/mol)	Erime sıcaklığı (°C)	Maksimum floresans emisyonu (nm)
AFB ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269	425
AFB ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	425
AFG ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	450
AFG ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	450
AFM ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	425
AFM ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	425

AFB₁ ve AFB₂, UV ışığı altında mavi; AFG₁ ve AFG₂ ise yeşil floresan renk vermektedir. Aflatoksin içeren yemlerle beslenen memeli hayvanların sütlerinde saptanan AFM₁ ve AFM₂ ise UV ışığı altında B türü aflatoksinler gibi mavi floresan renk vermekte fakat B toksinlerine kıyasla daha düşük Rf değerlerinden dolayı kolaylıkla ayırt edilebilmektedirler [13,15]. Tüm aflatoksin türlerinin ultraviyole soğurma spektrumları çok benzerdir ve 223-363 nm aralığında maksimum soğurma sergilemektedirler. Yapısal benzerlikler nedeniyle, aflatoksin türlerinin kızılötesi absorpsiyon spektrumları da çok benzerdir. Aflatoksinler, “difurokumarosiklopentenon” ve “difurokumarolakton” yapılarına sahiptirler ve yapısal olarak birbirine benzemektedirler. AFB₂, AFB₁'in dihidro türevidir ve in vivo B₁'e okside olmadığı sürece inaktif haldedir. AFG₂ ise AFG₁'in dihidro türevidir ve benzer şekilde biyolojik olarak aktif olabilmesi için G₁ türüne okside olmalıdır [13,17]. AFM₁ ve AFM₂ sırasıyla AFB₁ ve AFB₂'nin hidroksi türevleridir. Her bir aflatoksin türünün kimyasal yapısı Şekil 2.1'de verilmiştir.



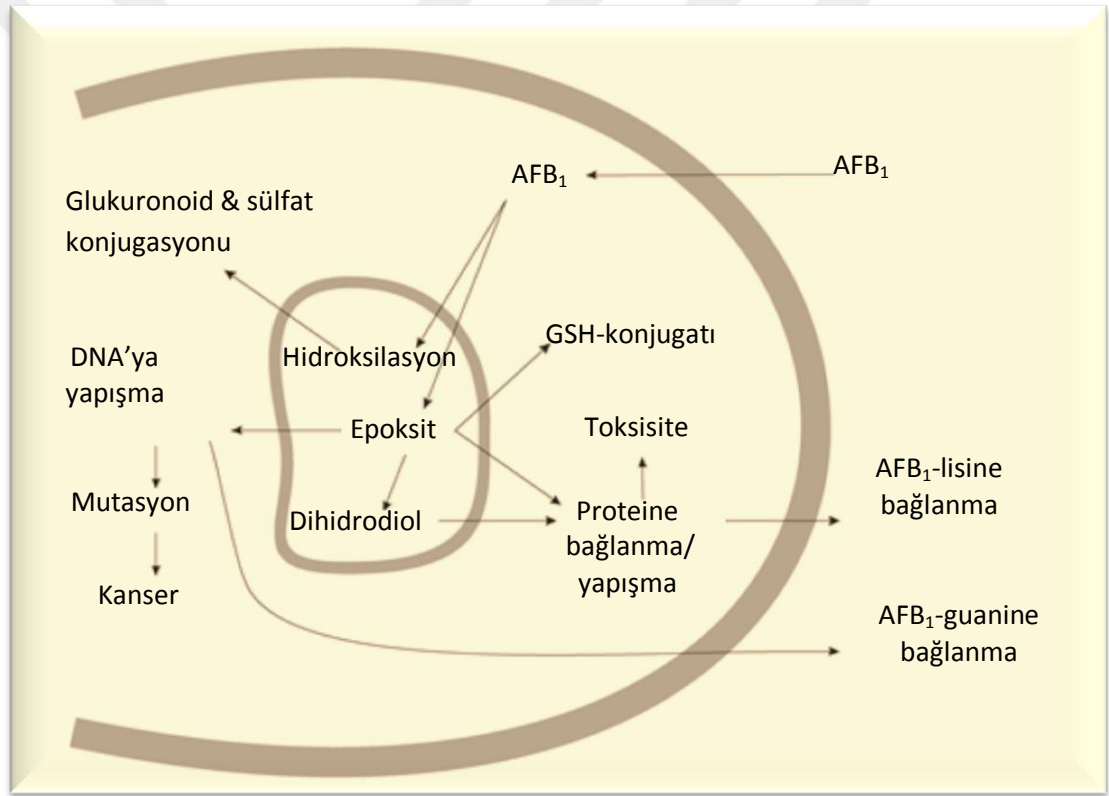
Şekil 2.1 Aflatoksin türleri ve kimyasal yapıları [18]

2.1.1. Aflatoksin maruziyeti ve metabolizması

Aflatoksinlere maruziyet farklı yollarla gerçekleşmektedir. Aflatoksinle kontamine gıdaların doğrudan yutulması, kontamine olmuş yem ile beslenen hayvanlardan elde edilen süt, peynir gibi ürünlerin tüketilmesi ya da endüstrilerde ve fabrikalarda kontamine gıdalarda aflatoksin toz parçacıklarının solunması yoluyla gerçekleşen maruziyet bu yollardan bazılarıdır. Aflatoksinler yüksek oranda yağda çözünür bileşiklerdir ve maruziyet yerinden genellikle gastrointestinal sistem ve solunum yoluyla kan dolaşımına kolayca geçmektedir [19-21]. Kan dolaşımıyla ulaşabildikleri hücreler tarafından absorbe olmaktadır. Kana geçen aflatoksin farklı dokulara ve ksenobiyotiklerin metabolizmasının ana organı olan karaciğere dağılmaktadır. Canlılara kontamine olan aflatoksin, memelilerde stoplazmik ve mikrozomal enzim sistemleri tarafında çeşitli şekillerde metabolize edilmektedir. Aflatoksinler içerisinde en yüksek toksisiteyi AFB₁ göstermektedir. Tüm aflatoksin türleri arasında AFB₁ toksisitesi ve metabolizması yeterince araştırılmış ve aydınlatılmıştır. AFB₁ hidroksilasyona uğramakta ve oluşan ara metabolit daha sonra glukuronik asit ve sülfat kojugasyonu ile suda çözünebilir özellikteki sülfat veya glukuronid esterlerine dönüşmektedir. Sitozol ve mikrozomlarda bulunan reaktif glutatyon S-transferaz sistemi, aktiveleştirilmiş aflatoksinlerin indirgenmiş glutatyon ile konjugasyonunu katalize ederek aflatoksinlerin atılmasını sağlamaktadır [6,22]. Suda çözünür özelliği artmış olan metabolitler, idrar ve safra ile dışarı atılarak vücuttan uzaklaştırılmaktadır (Şekil 2.2).

AFB₁, esas olarak faz I metabolizmasında yer alan sitokrom P450 bağımlı monooksijenaz tarafından aktive edilmektedir. Bu sırada oluşan AFM₁, AFQ₁ ve AFP₁ gibi ara metabolitlerin çoğu AFB₁'den daha az toksiktir, ancak AFB₁-8-9-epoksit (AFB_O) en toksik metabolittir. AFB₁'in kanserojen ve mutajenik etkisi, elektrofilik ve oldukça reaktif olan AFB_O'nun DNA gibi makromoleküllerin nükleofiller için yüksek afinite sergilemesinden kaynaklanmaktadır [14,23]. AFB₁ kendi başına mutajen olarak aktif değildir fakat biyotransformasyon sonrasında aktive edilen AFB₁, DNA'da guanil kalıntılarına bağlanmakta ve aflatoksin B₁-N₇-guanin eklentisi (AFB₁-N₇-Gua) oluşmaktadır. AFB_O içeren DNA eklentileri genellikle nükleotid eksizyon onarım yolu ile uzaklaştırılmaktadır. Tamirin

gerçekleşemediği durumlarda GC'nin TA'ya dönüşümü gibi nokta mutasyon oluşmakta ve ardından toksik düzeyde hücresel değişiklikler ortaya çıkmaktadır [23,24]. DNA'da AFB₁ maruziyeti sonrasında oluşabilecek alkilasyon, baz kaybına yol açarak bir "apurinik bölge" oluşumuna neden olmaktadır. AFB₁'in alkilleyici özelliği yanında reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu da indüklediği bilinmektedir [23,25]. Guindon vd. [26], aflatoksin maruziyeti ile oluşan DNA hasarının, DNA bazlarının oksidasyonuna yol açan AFB₁ aracılı ROS oluşumundan kaynaklanabileceğini öne sürmüştür. AFB₁'in toksik ve kanserojen etkileri, hem aktivasyon hızı hem de metabolizmanın birincil ve ikincil düzeylerdeki detoksifikasyon hızı ile yakından bağlantılıdır [27].

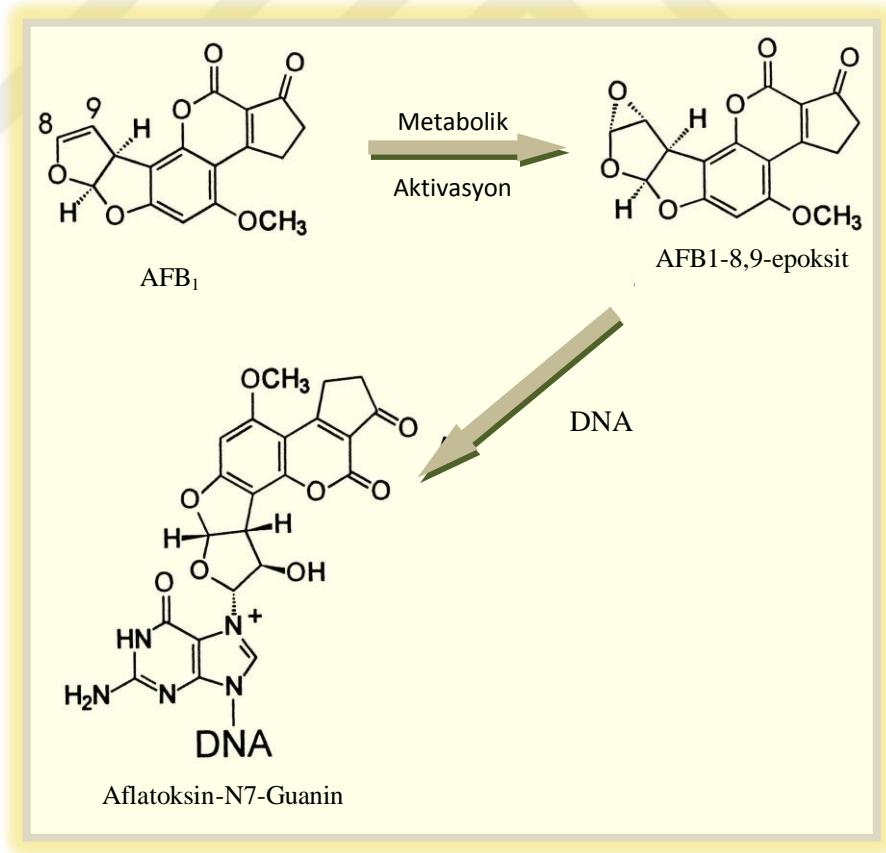


Şekil 2.2 AFB₁'in metabolizması ve toksisitesi [22]

2.1.2. Aflatoksinlerin Toksik Etkileri

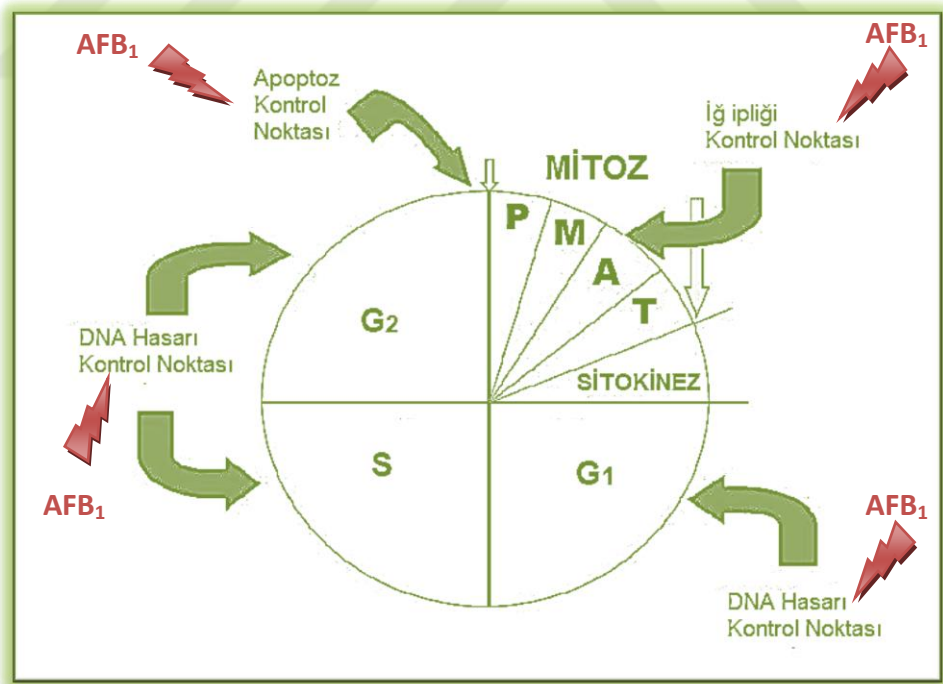
Aflatoksinler biyolojik aktiviteleri nedeniyle kanserojenik, teratojenik ve/veya mutajenik etki gösterebilmektedir. Aflatoksinlerin biyolojik etkilerini uzun sürede gözlenen ve kısa sürede gözlenen etkiler olmak üzere iki grupta sınıflandırmak

mümkündür. Uzun süreli maruziyette kronik toksisite, kanser ve genetik kusurlar gözlenirken, kısa süreli etkiler akut toksisite ve doğum kusurları olarak ortaya çıkmaktadır [28]. Aflatoksinler esas olarak karaciğer tarafından reaktif bir epoksit ara ürününe metabolize edilir veya daha az zararlı AFM₁ haline gelmek için hidroksile edilir [29,30]. İnsanlarda aflatoksinler, sitokrom P450 mikrozomal enzimler tarafından, DNA'ya ve albümin gibi proteinlere bağlanan reaktif bir form olan AFB₀ metabolize edilmektedir. Epoksit oldukça kararsızdır ve aflatoksin-N7-guanin oluşturmak için DNA'daki guanin bazlarına yüksek afinite ile bağlanır. AFB₁-N₇-Gua, DNA'da guanin-timin transversiyon mutasyonlarını oluşturabildiği ve hücre döngüsünde p53 baskılayıcı genini etkilediği gösterilmiştir. Epoksit hidrolaz ve glutatyon-S-transferaz aktif AFB₁'in hepatik detoksifikasyonunda rol oynamaktadır. Glutatyon-S-transferaz tarafından glutatyonun AFB₁-8,9-epoksitlere konjugasyonunun, DNA'ya bağlanmayı önlemede önemli role sahiptir [31-33]. AFB₁'in metabolik aktivasyonu ve DNA ile etkileşimi Şekil 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.3 AFB₁'in metabolik aktivasyonu ve DNA ile etkileşimi [34]

AFB₁ ve ara metabolitleri DNA'ya bağlanarak gen mutasyonlarına, telomer uzunluğunda değişime ve hücre döngüsündeki kontrol noktalarında değişikliklere yol açmaktadır. AFB₁'in karaciğer hücrelerinde DNA'da guanin bazına bağlanarak hücre büyümesini düzenleyen genlerde anormalliğe ve sonuç olarak tümör oluşumuna yol açtığı bilinmektedir. Aflatoksin maruziyeti mitokondriyal DNA'da hasara yol açmakta, mitokondrilerde membran bütünlüğünü bozmakta, apoptotik yollarda ve ATP sentez mekanizmasında anormalliklere neden olabilmektedir. Reaktif AFB₀ hücrelerde mitotik fazı, G₁ ve G₂ fazlarını, hücre döngüsündeki DNA sentezini ve döngüdeki çeşitli kontrol noktalarını bozarak hücrenin anormalleşmesine ve potansiyel kanserojenik etkiye neden olmaktadır (Şekil 2.4) [18,35,36]. AFB₁'den en ciddi şekilde etkilenen organ karaciğerdir ve birincil lezyonlar arasında hemorajik nekroz, yağ asidi infiltrasyonu ve safra kanalı proliferasyonu bulunmaktadır. Aflatoksin tüketiminden kaynaklanan hastalıklar aflatoksikoz olarak bilinir. Kronik aflatoksikoz kansere, immün baskılanmaya ve çeşitli patolojik durumlara yol açarken, akut aflatoksikoz ölüme yol açabilmektedir (6).

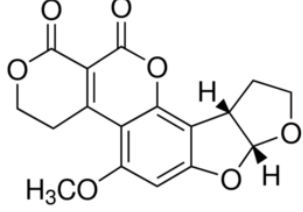


Şekil 2.4 Aflatoksinin hücre ve kontrol noktası üzerine etkileri [18]

2.1.3. Aflatoksin B₂

AFB₂ genel olarak *A. flavus*, *A. arachidicola*, *A. nomius*, *A. minisclerotigenes* ve *A. parasiticus* türleri tarafından üretilmektedir. Bir alt tür olan ve kimyasal olarak AFB₂'den ayırt edilebilen Aflatoksin B_{2a} ise *A. flavus* tarafından üretilmektedir (18). AFB₂, karaciğerde mikrozomal monooksijenazlar tarafından daha az toksik reaktif metabolit AFM₂'ye metabolize edilmektedir. AFB₂'nin bazı durumlarda B₁'e metabolize edilmesi de mümkündür [37,38]. AFB₂ bir hepatokarsinojendir. İnsan sağlığı üzerine toksik etkileri ve metabolizması hakkında çok fazla çalışma bulunmamakla birlikte AFB₂'nin çeşitli çiftlik hayvanları üzerinde tehlikeli hepatotoksik, teratojenik ve kanserojenik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir [39,40]. AFB₂'nin kimyasal ve fiziksel özellikleri Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

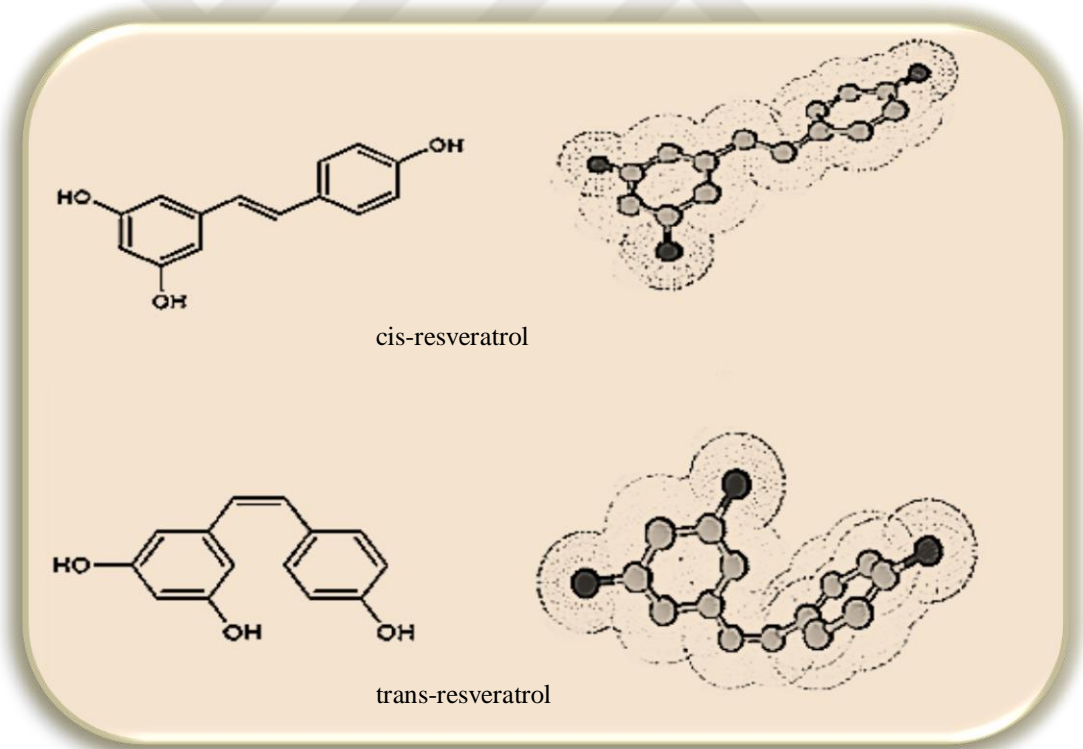
Tablo 2.2. AFB₂'nin kimyasal ve fiziksel özellikleri [41]

Kimyasal yapı (Dihydroaflatoksin B1)	
Kimyasal formülü	C ₁₇ H ₁₄ O ₆
CAs numarası	7220-81-7
Moleküler ağırlık	314.29 g/mol
Renk	Renksiz-soluk sarı kristaller
Erime ısısı	286-289 °C
Çözünürlük (suda)	24.9 mg/L, 25 °C

2.2. Resveratrol

Baklagiller, çam ağacı ve özellikle üzüm tarafından yoğun bir şekilde sentezlenen resveratrol en az 72 farklı bitki türleri tarafından da çeşitli stres faktörleri varlığında üretilmektedir. Resveratrolün en zengin kaynaklarından biri, geleneksel Çin ve Japon ilaçlarında kullanılan bir yabani ot olan *Polygonum cuspidatum*'dur. Yenilebilir bitki türlerinde varlığı düşük olan resveratrolün okaliptüs ve ladin gibi

ağaçlarda da bulunduğu bilinmektedir. İnsan diyetinde resveratrolün kaynakları yer fıstığı, fıstık ezmesi, üzüm ve şaraptır. Üzüm suyu ve kırmızı şarap yüksek oranda resveratrol içermektedir [42,43]. Resveratrolün ilk izolasyonu *Veratrum grandiflorum*'dan 1940'lı yıllarda gerçekleştirilmiş olmakla birlikte resveratrol içeren üzüm ekstraktının insan sağlığı amacıyla kullanımı M.Ö. 2500'e kadar uzanmaktadır [44,45]. Resveratrol (3,4',5-trihidroksi-stilben), stilben grubu bir fitoaleksindir. Fitoaleksinler bitkiler tarafından çeşitli uyarılara karşı üretilen ve antioksidan, antimikrobiyal, antifungal ve antitümör gibi pek çok biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerdir. Resveratrol, bitkilerde susuzluk, enfeksiyon, ultraviyole ve ozon maruziyeti gibi stres koşullarına cevap olarak sentezlenmektedir. Bir çift stiren bağı ile birbirine bağlanmış iki fenolik halkadan oluşmaktadır. Bu çift bağ, resveratrolün izomerik formlarının oluşumundan sorumludur [46-49]. Resveratrolün cis- ve trans- olmak üzere iki izomeri mevcuttur (Şekil 2.5).



Şekil 2.5.Cis ve trans-resveratrolün kimyasal ve 3D yapıları [50]

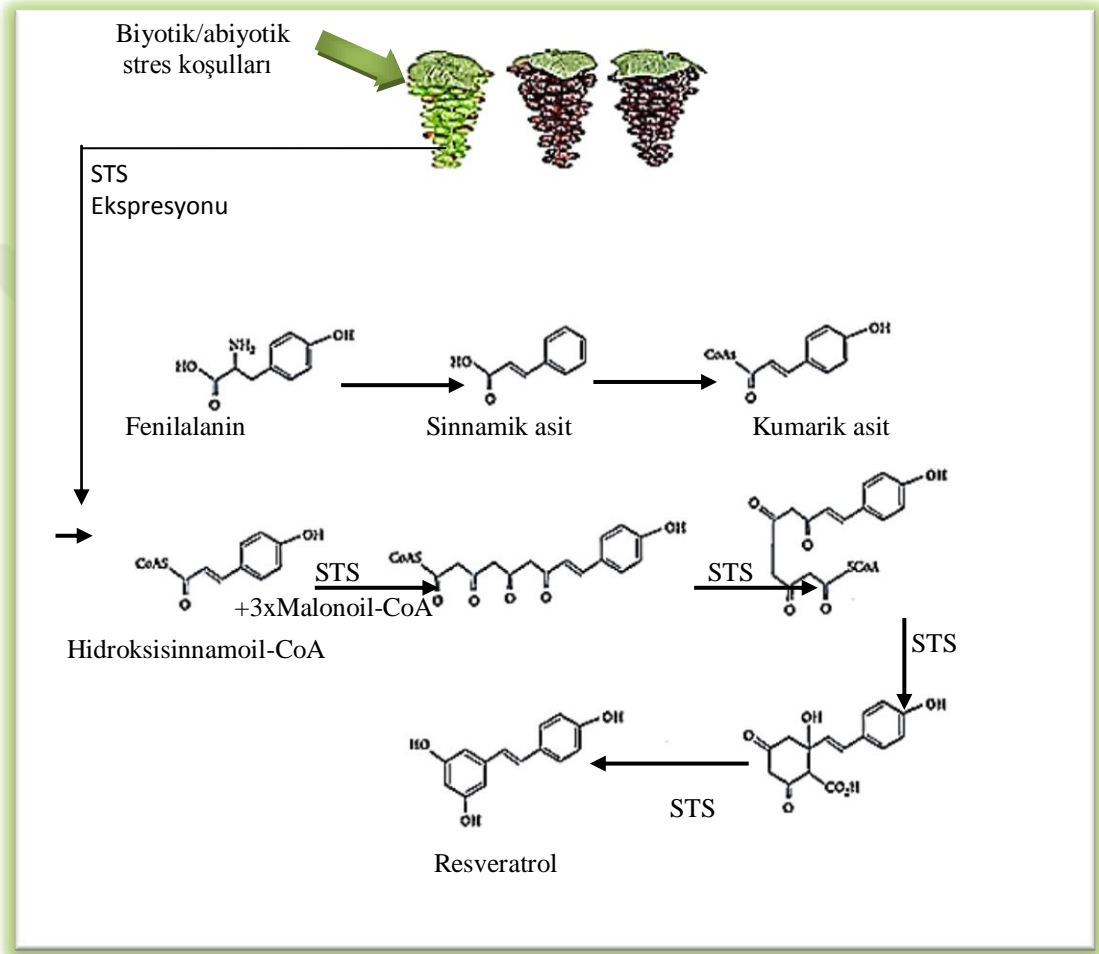
Bazı bitkilerde ve şarapta iki izomer bir arada bulunurken üzüm ekstraktında cis-resveratrol varlığına rastlanmamıştır. Trans-izomerin 254 veya 366 nm dalga boyunda güneş ışığına veya ultraviyole radyasyona maruz kalması durumunda cis izomerizasyon meydana gelmektedir. Trans-izomer, cis izomere kıyasla daha baskın ve kararlı bir yapıdadır [48,49]. Resveratrolün kimyasal ve fiziksel özellikleri Tablo 2.3’de özetlenmiştir.

Tablo 2.3. Resveratrolün kimyasal ve fiziksel özellikleri	
Sistemik adı	5-[E-2-(4-hidroksifenil)-etil]benzen-1,3-diol
CAs	501-36-0
Moleküler formül	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
Moleküler ağırlık	228.247 g/mol
Erime noktası	254°C
Çözünürlük (Su)	0.03g/L
Çözünürlük (DMSO)	16 g/L
Çözünürlük (Etanol)	50 g/L
PKa	8.99-10.64
Uv-Vis (λ _{max}) cis resveratrol	286 nm
Uv-Vis (λ _{max}) trans resveratrol	304 nm

2.2.1. Resveratrolün Biyosentezi

Resveratrol yüksek yapılı bitkilerde biyotik ve abiyotik stres koşulları varlığında fenilpropanoid yolu üzerinden sentezlenmektedir. Resveratrol, fenilalanin ile tirozin aminositinden köken alan bir metabolik yolla iki farklı şekilde sentezlenebilmektedir. Fenilalanin yolunda fenilalanin amonyak liyaz ve sinamat hidroksilaz enzimleri görev alırken, tirozin aminoasidinden köken alan yolda tirozin amonyak liyaz enzimi görev almaktadır ve her iki yol para-kumarik asit noktasında kesişmektedir. Para-kumarik asit koenzim A ligaz enzimi ile para-kumaroil-CoA'ya dönüştürülmektedir. Stilben sentaz veya kalkon sentaz enzimleri ile 4-kumaril-CoA'ya üç malonil KoA molekülü ekleyerek poliketid bileşiği sentezlenmektedir. Stilben sentaz ile poliketid bileşiğinde aromatik halkaların oluşumu katalizlenir ve kararsız bir ara metabolit olan stilben-2-

karboksilik asit sentezlenir. Bu bileşikden dekarboksilasyon, dehidrasyon ve enolizasyon gibi ard arda gerçekleşen reaksiyonlar ile resveratrol sentezlenmektedir (Şekil 2.6). Oluşan resveratrol bazı biyokimyasal reaksiyonlarla viniferin, t-piceid, t-piceatannol ve t-pterostilbene gibi yeni ürünlere de dönüşebilmektedir [50-52].



Şekil 2.6. Resveratrol biyosentez reaksiyonları STS:Stilben sentaz [52]

2.2.2. Resveratrol Metabolizması

Günlük diyetle alınan resveratrol cis ve trans olmak üzere iki farklı şekilde bulunmaktadır. Ayrıca glikolize formu olarak 3-O-β-D-glukozid şeklinde de bulunabilmektedir. Resveratrolün glikolize hali enzimatik oksidasyona direnç

göstermekte ve biyolojik etkinliği koruyarak biyoyararlanım ve kararlılığın artmasını sağlamaktadır. Resveratrol emilimi yüksek oranda jejunumda, daha düşük oranlarda ise ileumda gerçekleşmektedir. İnce barsaktan emilim sonrasında resveratrol kan dolaşımına geçerek albümin ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) gibi lipoproteinele bağlanarak hedef hücrelere taşınmaktadır. Albümin ve LDL'yi tanıyan reseptörler resveratrol taşıyan yapılarla etkileşmekte ve sonuç olarak resveratrol hedef hücreye ulaşmaktadır [48,53-55].

Yüksek bir metabolizmaya sahip olan resveratrol, karaciğerde resveratrol monosülfat, resveratrol monoglukuronid, monosülfat dihidroresveratrol ve monoglukuronid dihidroresveratrol gibi çeşitli konjuge formlara dönüşmektedir. Resveratrol, faz II detoksifikasyon enzimlerinin aktivitesini artırarak kendi metabolizmasını da indüklemektedir. Cis-formunun glukuronidasyonu, trans-formuna kıyasla 5-10 kat daha hızlıdır ve bu durum cis-formun daha düşük biyoyararlanımına yol açmaktadır [48,56]. İnsan idrar örnekleri ile yapılan çalışmalarda cis-resveratrolün cis-resveratrol-3-O-glukuronid, cis-resveratrol-4'-sülfat ve cis-resveratrol-4'-O-glukuronid metabolitleri saptanmıştır [57]. Resveratrolün biyoyararlanımı düşük olmasına rağmen in vivo etkinliğinin oldukça yüksek olduğu rapor edilmektedir. Bu yüksek etkinlik sülfat ve glukuronid konjugatlarının karaciğer gibi organlarda tekrar resveratrole dönüşümü ile açıklanabilir. Başka bir olası açıklama ise resveratrol metabolitlerinin enterohepatik resirkülasyonu, ince bağırsakta dekonjugasyonu ve yeniden emilimidir. İn vivoda oluşan resveratrol metabolitlerinin aktivitesi de bu yüksek etkinliğe katkı sağlamaktadır [48,58,59].

2.2.3. Resveratrolün Koruyucu Özelliği

Resveratrolün koruyucu özelliği antioksidan aktivitesi ile yakından ilişkilidir. Reaktif oksijen türleri çeşitli hastalıkların ortaya çıkışında, yaşlanma sürecinde ve çok sayıda hücreyel yanıt yolağında rol oynamaktadır. Serbest radikaller, hücreyel proteinlere ve DNA'ya saldırarak oksidatif stres oluşumuna neden olmaktadır. Vücuttaki serbest radikal yükü ve endojen antioksidan savunmalar arasındaki bir dengesizlik oksidatif

hasara neden olmaktadır. Bu nedenle endojen antioksidanlara ilave olarak diyetle alınacak eksojen antioksidanlar, oksidatif stresin etkilerini azaltabilmektedir. Diyetle alınan resveratrol $O_2^{\cdot -}$, OH^{\cdot} ve $ONOO^{\cdot}$ gibi serbest radikalleri doğrudan temizleyerek, glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu ve aktivitesini transkripsiyonel olarak ya da enzimatik modifikasyon yoluyla düzenleyerek koruyucu bir aktivite sergilemektedir [10,60,61]. Resveratrolün Fe^{2+} ile ilişkili lipid peroksidasyonunu ve LDL oksidasyonunu önlediği, hidroksil süperoksit ve metal-radikalleri üzerinde etkili bir süpürücü etkiye sahip olduğu da gözlenmiştir. Ayrıca serbest radikallerin sebep olduğu DNA hasarını ve hücre zarı bütünlüğündeki bozulmaları da önlediği bildirilmektedir [9].

Resveratrol, sirtuin 1 ($SIRT_1$) aktivatörü olarak da bir koruyucu rol sergilemektedir. $SIRT_1$, asetil gruplarını diğer proteinlerden ayıran NAD^+ bağımlı bir deasetilazdır. $SIRT$ genlerinin iltihaplanmayı, yağ sentezi ve depolanmasını, diyabeti ve yaşa bağlı gelişen pek çok hastalığı geciktirdiği rapor edilmektedir. $SIRT_1$ 'in aktivasyonu sonucunda antiapoptotik, antioksidatif, antiinflamasyon, mitokondriyal biyogenez ve otofaji gibi birçok mekanizma yoluyla sito-koruyucu etkiler ortaya çıkmaktadır. Resveratrol uygulamasının, $SIRT_1$ aktivasyonu yoluyla diyabet, nörodejeneratif bozukluklar, bilişsel bozukluklar, kanser, böbrek hastalıkları ve kardiyovasküler hastalıklar gibi pek çok hastalığı önleyebileceğini gösterilmiştir. Resveratrol, $SIRT_1$ 'i birden fazla mekanizma aracılığıyla etkinleştirebilmektedir. Resveratrol'ün AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK)'ın da dahil olduğu bir yol üzerinden $SIRT_1$ 'i allosterik etki yoluyla aktive ettiği rapor edilmektedir. Pek çok çalışma $SIRT_1$ aktivasyonu ile resveratrolün koruyucu özelliğinin yakından ilişkili olduğunu rapor etmiştir. Resveratrol uygulamasının $SIRT_1$, karaciğer kinaz B ve AMPK aktivasyonuna yol açarak mitokondriyal biyogenezini arttırdığı da rapor edilmektedir [11,12]. Resveratrol, $SIRT_1$ aktivasyonu yolu ile çeşitli ajanlarla ya da hastalık sonucu indüklenen böbrek hasarlarını da azaltmaktadır. Resveratrol uygulamasının diyabet ve yüksek kan glukozu tarafından indüklenen böbrek hasarını da geriletmediği, diyabete bağlı glomerüler hipertrofiyi iyileştirdiği, üriner albümin atılımını düzenlediği, glomerüler bazal membran kalınlığını da azalttığı rapor edilmiştir [62,63].

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Test Materyali ve Hayvanların Bakımı

Çalışma kapsamında denek olarak 36 adet *Mus musculus* var. *albinos* kullanılmıştır. Albino fareler deney süresince 12 saat ışık/12 saat karanlık döngüde, 26x15x50 ebatlarında çelik paslanmaz kafeslerde, 22±3°C sıcaklıkta ve %55±5 bağıl nem ortamlı laboratuvarında bakımları sağlanmıştır. Bu çalışmada, deneysel işlemlerde uygulanan tüm yöntemler Giresun Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu ve Dünya Sağlık Örgütü ve tarafından belirlenen esas ve izine (2017/02) göre yürütülmüştür.

3.2. Deneysel Grupların Oluşturulması

AFB₂ ve resveratrol uygulamalarının etkilerini gözlemleyebilmek için fareler her bir grupta 6 fare olacak şekilde rastgele 6 gruba ayrılmıştır. Sadece çeşme suyu ve standart pellet yem ile beslenen grup kontrol grubu olarak kabul edilmiş ve grup I olarak kodlanmıştır. Resveratrolün tek başına toksik etkiye sahip olup olmadığının değerlendirilebilmesi için 10 mg/kg ve 20 mg/kg resveratrol uygulanan gruplar; Grup II ve III olarak kodlanmıştır. AFB₂'nin tek başına oluşturduğu toksik etkilerin belirlenebilmesi amacıyla 20 µg/kg AFB₂ uygulanmış ve bu grup Grup IV olarak numaralandırılmıştır. AFB₂'nin potansiyel toksik etkilerine karşı resveratrolün doza bağlı koruyucu özelliğini belirlemek için AFB₂ ve artan dozlarda resveratrol birlikte uygulanmış, bu gruplar ise Grup V ve Grup VI olarak kodlanmıştır. Gruplar ve grup oluşturma prensibi Tablo 3.1'de verilmiştir. Ardışık 28 gün süresince günlük olarak hayvanların su, yem ve uygulama solüsyonları kontrol edilmiştir. Fareler uygulama periyodundan 7 gün önce deneyin yürütüleceği laboratuvara getirilerek, ortam şartlarına adaptasyonları sağlanmıştır. 28 günlük uygulama periyodunun sonunda tüm fareler sakrifiye edilmiştir. Ayrıca yem ve su alımları da not edilmiştir. AFB₂ ve

resveratrol uygulama dozları literatür çalışmalarında belirtilen ve net etkilerin gözlemlendiği dozlara göre belirlenmiştir [64,65].

Tablo 3.1. Gruplar ve grup oluşturma prensibi

Gruplar	Uygulama
Grup I	Çeşme suyu + standart pellet yem
Grup II	10 mg/kg c.a Resveratrol
Grup III	20 mg/kg c.a Resveratrol
Grup IV	20 µg/kg c.a. Aflatoksin B ₂
Grup V	10 mg/kg c.a Resveratrol + 20 µg/kg c.a. Aflatoksin B ₂
Grup VI	20 mg/kg c.a Resveratrol + 20 µg/kg c.a. Aflatoksin B ₂

3.3. Canlı Ağırlık, Karaciğer ve Böbrek Ağırlıklarının Ölçümü

Uygulama öncesinde ve 28 günlük uygulama periyodunun sonunda her bir gruba ait albino farelerin ağırlıkları anestezi madde verilerek bayıldıktan sonra hassas terazi yardımıyla ölçülmüştür. 28. günün sonunda farelerin sakrifiye işlemlerinin gerçekleştirilmesinden sonra karaciğer ve böbrek organları alınarak ağırlıkları hassas terazi yardımıyla ölçülmüştür.

3.4. Biyokimyasal Analizler

Uygulama süresi sonunda her bir gruba ait farelerden kan örnekleri alınarak serumları elde edilmiş ve alanin transaminaz (ALT), aspartat transaminaz (AST), kan üre azotu (BUN) ve kreatinin analizlerinde kullanılmıştır. Teco Diagnostic kitleri kullanılarak AST (Catalog Number: A559–150) ve ALT (Catalog Number: A524–150) enzim aktiviteleri ile BUN (Catalog Number: B549–150) ve kreatinin (Catalog Number: C513–480) düzeyleri Medispec 99 M marka otoanalizörde ölçülmüştür [66].

3.5. Antioksidan/Oksidan Denge

Deney gruplarındaki her bir fare Haloten anestezi altında kalp eksangunasyon yöntemiyle sakrifiye edilmiş, karaciğer ve böbrekleri çıkarılarak yıkanmış ve biyokimyasal analizler için homojenize edilmiştir. Homojenizasyon soğuk 0.15 M KCl banyosunda 16.000 rpm'de homojenizatör ile gerçekleştirilmiş (Ultraturrax Type T25-B, IKA Labortechnik), homojenatlar 4 °C'de 5000 g de 1 saat santrifüj edilmiş ve süpernatantlarda malondialdehit (MDA) ve glutasyon (GSH) analizleri gerçekleştirilmiştir [67]. Doku MDA düzeyi Yoshiko ve arkadaşlarının [68], GSH düzeyi ise Beutler [69] tarafından önerilen kolorimetrik yöntemle belirlenmiştir.

3.6. Sitogenetik Analizler

Sitogenetik analizler için mikronukleus (MN) ve kromozomal anormallikler (KA) testi kullanılmıştır.

3.6.1. Mikronukleus Testi

AFB₂ ve resveratrol uygulamalarının sitogenetik etkilerini belirlemek amacıyla yanak mukoza epitel hücresi, eritrosit ve lökositlerde MN oluşum sıklığı belirlenmiştir. Yanak mukoza epitel hücrelerinde MN varlığının tespiti için haloten anestezisi yardımıyla bayıltılmış farelerin ağızları distile su ile yıkanmış, sağ ve sol yanak mukoza epitel hücrelerinden örnek alınmıştır. Hücreler, steril lamalar üzerine konularak, 3:1 metanol/asetik asit solüsyonu ile fikse edilmiştir. Fast Green ile boyanan preparatlar IM-450 TI model araştırma mikroskobu ile incelenmiş ve x500 büyütmede fotoğraflandırılmıştır [70].

Eritrositlerde uygulanan MN testi Te-Hsiu ve arkadaşlarının [71] önerdiği yöntemle göre gerçekleştirilmiş, anestezi altındaki farelerin kuyruk venlerinden enjektör yardımıyla alınan kan örnekleri MN analizine tabii tutulmuştur. 5 µL kan örneği % 3'lük EDTA çözeltisi ile karıştırılarak, steril lamalar üzerine yayılmış ve kuruma sonrasında %70'lik etanolde fiksasyon uygulanmıştır. Fiksasyon sonrasında %5'lik Giemsa ile 15 dakika boyanan preparatlar MN sıklığının tayini için araştırma mikroskobunda incelenmiştir.

Lökosit hücrelerinde MN sıklığının belirlenmesi amacıyla her bir gruba ait farelerden alınan kan örnekleri 5.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş, pellet üzerine 0.075 M KCl çözeltisi eklenerek, 20 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler 5.000 rpm'de 10 dakika tekrar santrifüj edilmiş, pellet 3:1 metanol:glasial asetik asit ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda lökosit hücreleri steril lamlar üzerine yayılarak, %5'lik Giemsa ile boyanmış ve araştırma mikroskopunda incelenmiştir [72].

MN oluşumunu belirlemek için Fenech ve ark. [73] tarafından önerilen kriterler dikkate alınmış, her üç hücre tipinde de, MN varlığını tespit etmek amacıyla, her grupta 1.000 hücre sayılmıştır.

3.6.2. Kromozomal Anormallik Testi

Sitogenetik etkilerin belirlenmesinde kullanılan diğer bir test kromozomal anormallik testidir. AFB2 ve resveratrol uygulamasının indükleyebileceği kromozomal hasarların belirlenmesinde kemik iliği hücreleri kullanılmıştır. Kromozomal anormallik testi için deney gruplarındaki farelere sakrifikasyon öncesinde interperitoneal yolla %0.025 oranında kolşisin uygulanmış ve deneysel aşamaların sonunda sakrifiye edilen farelerin femurlarından kemik iliği aspirasyonu yapılmıştır. KCl (0.075 M) ile muamele edilen hücreler Carnoy's çözeltisi ile fikse edilmiştir. Fikse edilen hücreler Giemsa (%5) ile boyanmış ve preparatlar araştırma mikroskopunda Savage [74] tarafından önerilen kriterlere göre sınıflandırılmıştır.

3.7. İstatistiksel Analiz

Deneysel işlemler sonucunda elde edilen bulguların istatistiksel analizi SPSS for Windows V 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) programı kullanılarak gerçekleştirilmiş, deney grupları arasındaki istatistiksel olarak önemli sayılan farklılıkların değerlendirilmesi amacıyla Duncan ve One-way ANOVA testleri kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm SD olarak verilmiş ve p değerleri <0.05 olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu çalışmada AFB₂'nin albino farelerde potansiyel toksik etkileri canlı ağırlık ve organ ağırlığı, kan parametreleri, oksidan/antioksidan denge ve sitogenetik parametreler kullanılarak araştırılmış ve bu toksik etkilere karşı resveratrolün koruyucu özelliği incelenmiştir.

4.1. Fizyolojik Parametreler

AFB₂ ve resveratrol uygulamalarının farelerde canlı ağırlık ve organ ağırlığı üzerine etkileri Tablo 4.1'de verilmiştir. Kontrol grubunda başlangıç canlı ağırlık ortalama 33,50±1,80 g olarak tespit edilmiş ve uygulama süresi sonunda yaklaşık olarak 12,40 g'lık bir ağırlık artış gözlenmiştir. Benzer bir artış 10 µg/kg ve 20 µg/kg resveratrol uygulanan Grup II ve III'te de gözlenmiştir. Bu sonuç tek başına resveratrol uygulamasının canlılarda ağırlık kazanımı üzerine herhangi bir toksik etkiye neden olmadığını göstermektedir. Canlı ağırlığı bakımından en belirgin azalma 20 µg/kg AFB₂ uygulanan grupta gözlenmiş ve bu gruptaki farelerin canlı ağırlığında kontrol grubuna kıyasla 1,3 kat bir azalma gözlenmiştir. AFB₂ uygulamasının canlı ağırlık üzerinde oluşturduğu anormallikler karaciğer ve böbrek ağırlıklarında da gözlenmiştir. Grup I, II ve III'e ait karaciğer ve organ ağırlıklarında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmezken (p>0,05), 20 µg/kg AFB₂ uygulanan grupta istatistiksel olarak önemli azalmalar belirlenmiştir (p<0,05). Grup IV'te karaciğer ve böbrek ağırlıklarının kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 1,89 ve 1,86 kat azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuç karaciğer ve böbrek ağırlıklarının AFB₂ toksisitesinden benzer düzeyde etkilendiğini göstermektedir.

AFB₂ uygulamasının canlılarda ağırlık kazanımı ve organ ağırlığı üzerine olumsuz etkileri iştahsızlık, halsizlik, protein/lipid kullanım mekanizmalarında bozulma, protein sentezi ve lipogenezin engellenmesi ile ilişkilendirilebilir. Lipoliz-lipogenez dengesi canlı ağırlığının artışında önemli bir role sahiptir ve canlılarda kilo alımı lipogenez ve yağ birikimi ile artmaktadır [75, 76]. Canlılarda lipid metabolizması

adipoz doku ve karaciğer ile yakından ilişkilidir. Genel olarak, yağ asidi sentezi (de novo lipogenez), trigliserit sentezi, lipid depolanması, lipoliz ve LDL salgılanması dahil olmak üzere pek çok lipid metabolizması karaciğer hepatositlerinde gerçekleşmektedir. Çoğu karaciğer hastalığında da lipid metabolizmasında bozukluk olduğu rapor edilmektedir [77]. Aflatoksinlerin hepatoksik etkileri ve diğer dokular üzerindeki olumsuz etkileri sonucu ortaya çıkabilecek lipid metabolizması bozukluğu canlılarda kilo alımını ve organ ağırlığını önemli derecede etkileyebilecektir. Literatürde AFB₂ uygulamasının canlılarda kilo alımı üzerine etkisi ile ilgili bir çalışma bulunmamakla birlikte diğer aflatoksin türleri ile ilgili veriler mevcuttur. Arvind ve Churchil, 6 hafta süre ile 1ppm AFB₁ ile beslenen piliçlerin ağırlık kazanımında %33.94'lük bir azalma olduğunu belirtmişlerdir [78]. Han ve arkadaşları, AFB₁ uygulamasının vücut ağırlığı ve besin alımında azalmaya neden olduğunu rapor etmiş ve özellikle kilo kazanımındaki azalmayı sindirim enzimlerinin aktivitesindeki anormallikle ilişkilendirmişlerdir. Aynı çalışmada bulgularımızın aksine 20 µg/kg ve 40 µg/kg AFB₁ uygulamasının böbrek ve karaciğer organların ağırlıklarında artış olduğu da rapor edilmiştir [79].

Canlı ağırlık ve organ ağırlıkları analizinde gözlenen önemli bir diğer sonuç ise AFB₂ ile birlikte resveratrol uygulamasını kilo kazanımında ve organ ağırlıklarında yeniden artışa neden olmasıdır. Resveratrol ile AFB₂'nin birlikte uygulandığı Grup V ve VI'ya ait canlı ağırlıklarında 20 µg/kg AFB₂ uygulanan gruba kıyasla bir artış gözlenmiş, bu artışa rağmen canlı ağırlık düzeyleri kontrol grubunun gerisinde kalmıştır. Bu iyileşme 20 mg/kg resveratrol uygulaması alan Grup VI'da daha belirgindir. Sadece AFB₂ alan grupta canlı ağırlığında 1,78 g'lık bir artış gözlenirken, AFB₂ ve 20 mg/kg resveratrolün birlikte uygulandığı grupta bu artış 7,5 g olarak belirlenmiştir. Resveratrolün canlı ağırlığı üzerine arttırıcı etkisi böbrek ve karaciğer organ ağırlıklarında da gözlenmiştir. 20 mg/kg resveratrol uygulanan Grup VI'da karaciğer ve böbrek ağırlıklarının AFB₂ uygulanan gruba kıyasla sırasıyla 1,46 ve 1,55 kat arttığı gözlenmiştir. Resveratrolün bu iyileştirici özelliği AFB₂ uygulaması ile oluşan toksik etkilerin bastırılması ile açıklanabilir. Resveratrol lipid peroksidasyonunu ve LDL oksidasyonunu önleyerek, plasmada total kolesterol, düşük dansiteli lipoprotein kolesterol seviyelerini azaltarak, plazma HDL düzeylerini artırarak lipid metabolizmasında önemli koruyucu bir rol sergilemektedir [9,80]. Bu

koruyucu rol AFB₂'nin lipid metabolizması üzerindeki olumsuz etkilerini azaltarak canlı ağırlığında yeniden artışa neden olmuştur. Aflatoksin kaynaklı oksidatif stres, canlı dokularında ciddi toksik etkilere neden olmaktadır ve oksidatif hasardan en ciddi şekilde etkilenen organların başında karaciğer ve böbrek gelmektedir. Aflatoksin maruziyeti sonucunda karaciğerde hemorajik nekroz, yağ asidi infiltrasyonu ve safra kanalı proliferasyonu görülmektedir [6]. Böbreklerde ise özellikle aflatoksin gibi kontaminatların oluşturduğu oksidatif hasar tubuler apoptozis, inflamasyon ve renal yetmezliğe neden olabilmektedir. Resveratrol özellikle oksidatif hasarı ve inflamasyonu azaltarak böbrek ve karaciğer gibi dokularda önemli bir koruyucu rol sergilemektedir [81]. AFB₂ uygulaması sonucunda böbrek ve karaciğer dokularının ağırlığında gözlenen azalmanın resveratrol ile yeniden artışa geçmesi bu koruyucu özellik ile açıklanabilir. Kim, farelerde proksimal tüplerde indüklenmiş apoptozis ve sitotoksitenin resveratrol uygulaması ile baskılandığını ve böbrekte koruyucu bir özellik sergilediğini rapor etmiştir [82]. Highab ve arkadaşları toksik maddeye maruz kalan sıçanların karaciğerinde gözlenen nekrotik hücre, hidropik dejenerasyon ve lipid profilinde değişim gibi histopatolojik bulguların resveratrol uygulaması sonrasında azaldığını, karaciğer hücreleri üzerinde resveratrolün koruyucu bir rol üstlendiğini belirtmişlerdir [83].

Tablo 4.1 Fizyolojik parametreler üzerine AFB₂ ve resveratrol uygulamasının etkileri

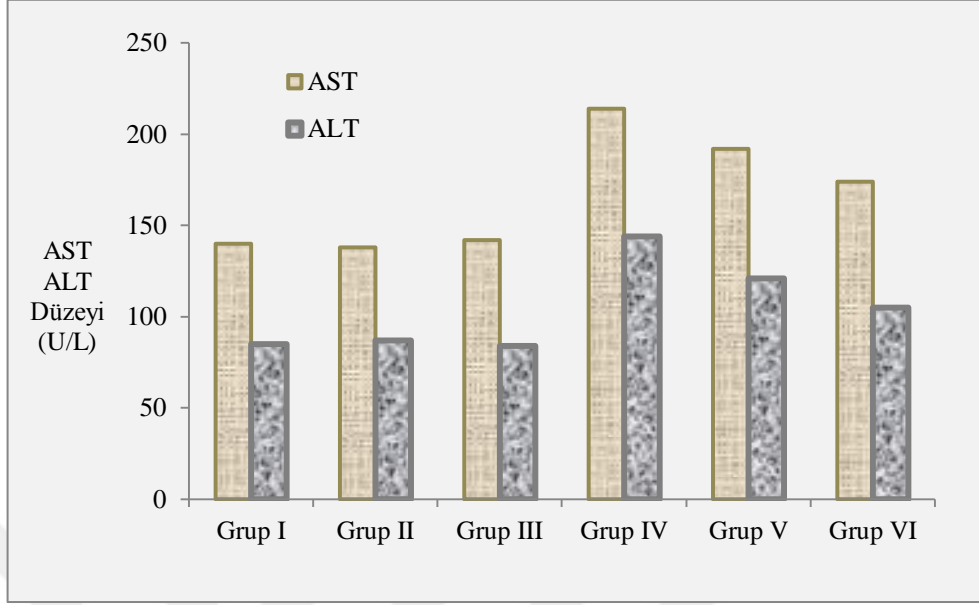
Gruplar	Uygulama öncesi canlı ağırlık (g)	Uygulama sonrası canlı ağırlık (g)	Karaciğer ağırlığı (g)	Böbrek ağırlığı (g)
Grup I	33,50±1,80 ^a	45,90±2,30	2,30±0,34 ^a	1,60±0,32 ^a
Grup II	33,76±1,88 ^a	45,72±2,25	2,24±0,32 ^a	1,57±0,30 ^a
Grup III	33,34±1,72 ^a	44,96±2,18	2,19±0,30 ^a	1,52±0,28 ^a
Grup IV	33,58±1,83 ^d	35,36±1,94	1,22±0,15 ^d	0,86±0,18 ^d
Grup V	33,89±1,87 ^c	37,90±2,11	1,50±0,18 ^c	1,10±0,21 ^c
Grup VI	33,66±1,86 ^b	41,16±2,16	1,78±0,25 ^b	1,34±0,24 ^b

Değerler ortalama ±SD olarak gösterilmiştir (n=6). Aynı sütunda farklı harfler^(a-d) ile gösterilen veriler istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).

4.2. Biyokimyasal Parametreler

AFB₂ ve resveratrol uygulamasının seçili biyokimyasal parametreler üzerine etkisi Tablo 4.2 ve Şekil 4.1'de verilmiştir. Kan parametrelerinden karaciğer markır enzimleri olan ALT ve AST ile böbrek hasar indikatörü olan BUN ve kreatinin düzeyleri incelenmiştir. Grup I, II ve III'te incelenen ALT ve AST düzeylerinde herhangi bir anormallik belirlenmemiş ve gruplar arasında belirlenen farklılığın istatistiksel olarak önemsiz olduğu tespit edilmiştir ($p>0,05$). 20 µg/kg uygulanan AFB₂ uygulanan grupta ALT ve AST seviyelerinde önemli derecede artış olduğu saptanmıştır. Karaciğer markır enzimleri olan AST ve ALT düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 1,53 ve 1,70 kat arttığı belirlenmiştir. ALT ve AST düzeylerindeki istatistiksel olarak önemli olan bu artışlar, AFB₂ uygulamasının karaciğerde ciddi hasarlara neden olduğuna işaret etmektedir.

Aflatoksinlerin karsinojenik ve mutajenik etkileri yanında hepatoksik ve nefrotoksik etkileri de bilinmektedir. Aflatoksinler hepatositlerde polimeraz aktivitesini inhibe etmekte, karaciğerde biyokimyasal ve histopatolojik değişimlere sebep olmakta ve hepatosellüler nekroza neden olmaktadır [84]. Aflatoksin tarafından indüklenen tüm bu etkiler karaciğer dokularında hasara neden olmakta, hücre harabiyeti ve organ yetmezliği ile sonuçlanabilmektedir. Hepatositlerde gözlenen bu anormallikler, bu hücrelerde bulunan enzimlerin kana geçişine ve kandaki düzeylerinin artmasına neden olmaktadır. AST, karaciğer, beyin, pankreas, kalp, böbrek, akciğer ve iskelet kası dahil olmak üzere çeşitli dokularda bulunmaktadır. Bu dokularda hasar oluşumu sonrasında AST doku hücrelerinden kan dolaşımına geçmekte ve kan düzeyi artmaktadır. Artmış AST seviyeleri doku hasarının göstergesi olmakla birlikte tek başına karaciğer harabiyetine işaret etmemektedir. ALT ise yoğunluklu olarak karaciğerde bulunmakta ve ALT'nin kan düzeyindeki herhangi bir yükselme, karaciğer hasarının doğrudan bir göstergesi olarak kabul edilmektedir [85]. AFB₂ uygulanan grupta her iki enzimde birlikte gözlenen artış karaciğer harabiyetinin bir kanıtıdır. Benzer şekilde, Han ve arkadaşları 20 µg/kg or 40 µg/kg AFB₁ uygulamasının ALT ve AST enzimlerinde önemli artışa neden olduğunu, bu artışın ise AFB₁'den kaynaklanan karaciğer hasarı sonucunda hepatositlerden kana enzim geçişinden kaynaklandığını rapor etmişlerdir [79].



Şekil 4.1. ALT ve AST düzeyleri üzerine AFB₂ ve resveratrolün etkisi

AFB₂ uygulamasının böbrek indikatörü olan BUN ve kreatinin düzeylerinde de artışa neden olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla 20 µg/kg uygulanan AFB₂ uygulanan grupta BUN ve kreatinin düzeylerinin sırasıyla 1,34 ve 2,33 kat arttığı belirlenmiştir. Aflatoksinler, böbrek dokusunda glomerüler kılcal damarlarda hasar, kortikal kan damarlarında tıkanıklık, pıhtılaşma nekrozu, inflamasyon gibi etkilere, uzun süreli maruziyette fokal kanama ve tıkanıklık alanlarına neden olmaktadır [86]. Böbreklerde oluşabilecek potansiyel hasarların tahmininde BUN ve kreatinin kullanılmaktadır. Kreatinin, kastaki kreatin fosfatın parçalanma ürünüdür ve genellikle vücut tarafından kas kütlelerine bağlı olarak sabit bir oranda üretilmekte ve böbrekler yardımıyla dışarıya atılmaktadır. Böbrek hasarı ya da yetmezliğinde kreatinin yeterince filtre edilemediğinden kandaki düzeyi de artmaktadır. Böbrek harabiyetinde kullanılan diğer bir indikatör de BUN'dur. Böbrek hastalığı veya yetmezliği, idrar yolunun böbrek taşı nedeniyle tıkanması, ateş, şok gibi durumlarda BUN düzeylerinde artış olduğu bilinmektedir [87]. Bu çalışmada gözlenen 20 µg/kg AFB₂ uygulamasının BUN ve kreatinin düzeylerinde ciddi artışlara neden olması böbrek harabiyetine işaret etmektedir. Bu bulgularımızı destekler biçimde Eraslan ve

arkadaşları da 500 µg/kg aflatoksin uygulamasının albino ratlarda ürik asit, BUN ve kreatinin düzeylerinde önemli artışlara neden olduğunu ve bu artışların böbrek hasarına işaret ettiğini rapor etmişlerdir [88].

Tablo 4.2. BUN ve kreatinin düzeyleri üzerine AFB₂ ve resveratrolün etkisi

	BUN (mg/L)	Kreatinin (mg/L)
Grup I	280,00±8,75 ^d	6,15±1,80 ^d
Grup II	282,00±8,92 ^d	6,10±1,74 ^d
Grup III	277,00±8,54 ^d	6,12±1,76 ^d
Grup IV	375,00±11,46 ^a	14,38±2,96 ^a
Grup V	342,00±10,51 ^b	12,25±2,42 ^b
Grup VI	308,00±9,73 ^c	9,56±2,15 ^c

Değerler ortalama±SD olarak gösterilmiştir (n=6). Aynı satırda farklı harfler^(a-d) ile gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).

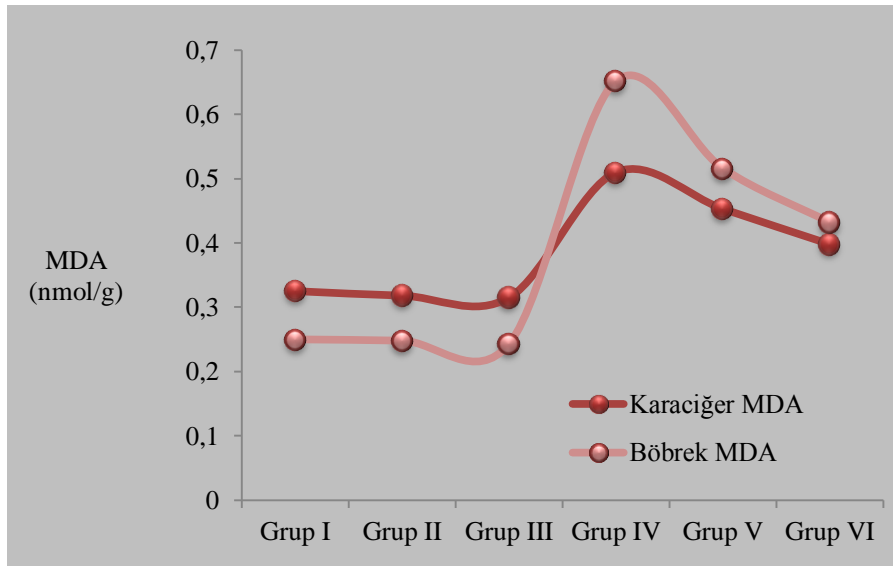
Kan analizlerinden AFB₂ uygulamasının tek başına karaciğer ve böbrek indikatör parametrelerinde önemli bir artışa neden olduğu gözlenirken, AFB₂ ile birlikte resveratrol uygulamasının bu parametrelerdeki artışı yeniden azalttığı da belirlenmiştir. 20 mg/kg resveratrol uygulanan Grup VI'da ALT ve AST düzeylerinin sadece AFB₂ uygulanan gruba kıyasla sırasıyla 1,37 ve 1,23 kat azaldığı gözlenmiştir. Bu azalmaya rağmen AST ve ALT düzeylerinin kontrol grubuna göre hala yüksek seyrettiği belirlenmiştir. Böbrek markır parametrelerine bakıldığında, sadece AFB₂ uygulanan gruba göre BUN ve kreatinin düzeylerinin 1,21 ve 1,5 kat azaldığı tespit edilmiştir. AFB₂ uygulaması ile artan ALT, AST, BUN ve kreatinin düzeylerinin resveratrol uygulaması ile azalması, resveratrolün koruyucu özelliği ile açıklanabilir. Resveratrol özellikle oksidatif hasara bağlı olarak gelişen makromolekül oksidasyonunu, lipid peroksidasyonunu ve inflamasyonu azaltarak böbrek ve karaciğer gibi dokularda önemli bir koruyucu rol sergilemektedir [81]. Literatürde resveratrolün AFB₂ kaynaklı hasarlara karşı koruyucu etkisi üzerine çalışma bulunmamakla birlikte pek çok kimyasal tarafından indüklenen karaciğer ve böbrek hasarlarını azalttığı rapor edilmektedir. Şener ve arkadaşları asetoaminofen tarafından indüklenen karaciğer hasarına karşı 100 mg/kg resveratrol uygulamasının sıçanlarda indüklenmiş oksidatif hasarı azaltarak antioksidan bir koruma sergilediğini ve karaciğer hasarını azalttığını rapor etmişlerdir [89]. Palsamy ve

Subramanian 5 mg/kg resveratrol uygulamasının kreatinin kleransında düzelmeye neden olduğunu, oksidatif stresi ve inflamasyonu azaltarak böbrek üzerinde koruyucu özellikte olduğunu belirlemişlerdir [90].

4.3. Antioksidan/Oksidan Denge

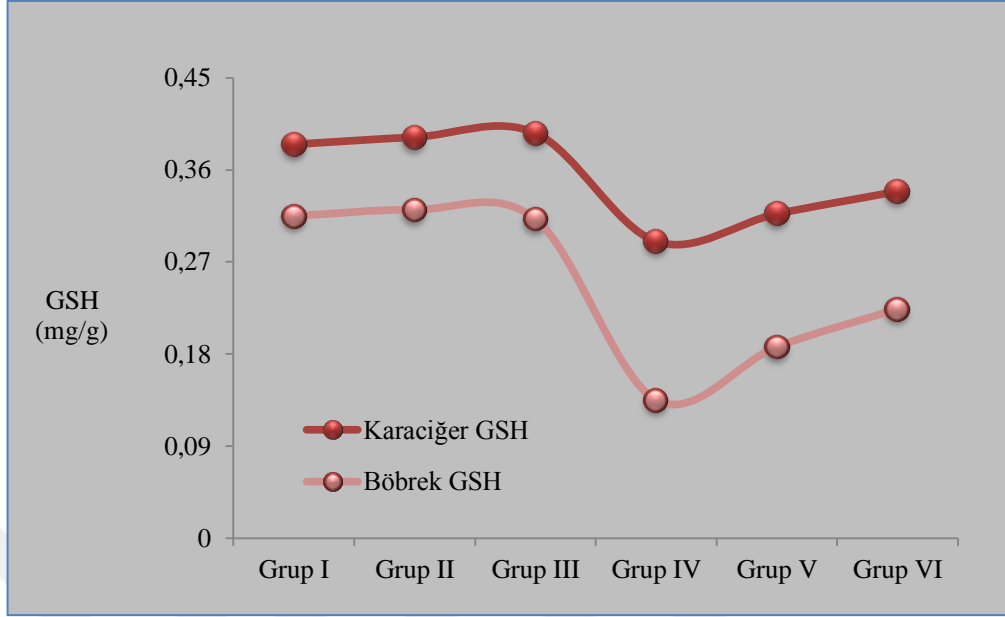
AFB₂ uygulamasının fizyolojik parametrelerdeki ve seçili kan parametrelerindeki olumsuz etkilerine benzer bir toksik etki antioksidan/oksidan denge üzerinde de görülmüştür. Vücuttaki eksojen/endojen oksidan moleküllerin etkisi antioksidanlarla nötralize edilmektedir. Eksojen oksidan moleküllerin artışı ve endojen antioksidanların yetersiz kalması, antioksidan/oksidan dengenin bozulmasına neden olmaktadır. AFB₂'nin bu denge üzerindeki etkilerini incelemek için karaciğer ve böbrek organlarında MDA ve GSH düzeyleri incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.2 ve 4.3'te verilmiştir. Kontrol grubu ve sadece resveratrol uygulanan gruplarda MDA düzeylerinin birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. 20 µg/kg AFB₂ uygulamasının böbrek ve karaciğer dokularının MDA düzeylerinde önemli bir artışa neden olduğu saptanmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında AFB₂ uygulamasının karaciğer ve böbrek dokularında MDA düzeylerini sırasıyla 1,5 ve 2,6 kat arttırdığı gözlenmiştir. Aflatoksin türlerinin oksidatif strese neden olduğu pek çok çalışma ile ortaya konmuştur [18,29,30,35,36]. Oksidatif stres hücrelerde hasara ve lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır. Ökaryotlarda lipid peroksidasyonundan en çok etkilenen hücresel yapı, pek çok doymuş ve doymamış lipid türleri içeren hücre zarıdır. MDA ise membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucunda oluşan mutajenik bir üründür [91,92]. Normal biyokimyasal süreç sonunda hücrelerde MDA düşük düzeylerde oluşabilmekte ve antioksidan sistem ile giderilebilmektedir. Artan MDA düzeyi hücrede oksidatif strese ve lipid peroksidasyonuna işaret etmektedir. AFB₂ uygulanan grupta kontrol grubuna göre önemli derecede artan MDA düzeyi oksidatif hasara ve AFB₂'nin karaciğer ve böbrekte lipid peroksidasyonuna neden olduğuna işaret etmektedir. Benzer şekilde Shen ve arkadaşları AFB₁'e maruz kalan sıçanlarda birinci günün sonunda karaciğer MDA düzeylerinde artış olduğunu, üçüncü günde MDA'nın çok yüksek bir düzeye çıktığını, 14 gün süre ile yüksek seyrettiğini ve sonuç olarak AFB₁ uygulamasının karaciğerde hücre hasarına ve lipid peroksidasyonuna neden olduğunu belirtmişlerdir [93].

Bu çalışmada 20 µg/kg AFB₂'ye maruz kalan farelerde artan MDA düzeyinin resveratrol uygulaması ile azalma eğilimi gösterdiği de saptanmıştır. 10 mg/kg ve 20 mg/kg resveratrol uygulanan Grup V ve VI'da sadece AFB₂ alan gruba kıyasla karaciğer MDA düzeylerinin 1,12 ve 1,28 kat azaldığı belirlenmiştir. Böbrek MDA düzeylerindeki azalma ise sırasıyla 1,26 ve 1,50 kat olarak bulunmuştur. Karaciğer ve böbrek MDA düzeylerinde en belirgin düzelme 20 mg/kg resveratrol uygulanan grupta gözlenmiş ve fakat bu gruptaki MDA düzeylerinin hala kontrol grubundan daha yüksek olduğu da saptanmıştır. MDA düzeyinde gözlenen bu azaltıcı etki resveratrolün antioksidan rolü ile açıklanabilir. Resveratrol oksidan molekülleri doğrudan temizleyerek, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu ve aktivitesini arttırarak koruyucu bir aktivite sergilemektedir [10,60,61]. Resveratrol lipid peroksidasyonunu azaltmakta, DNA hasarını ve hücre zarı bütünlüğündeki bozulmaları da önleyebilmektedir [9]. Literatürde resveratrol uygulamasının AFB₂ ile indüklenen lipid peroksidasyonu üzerine koruyucu etkisini rapor eden bir çalışma bulunmamakla birlikte pek çok dokudaki lipid peroksidasyonunu azaltıcı etkisinden söz edilmektedir. Kasdallah-Grissa ve arkadaşları karaciğer, kalp, beyin ve testis dokularında indüklenmiş lipid peroksidasyonu sonucunda artan MDA düzeylerinin resveratrol uygulaması ile %72,7-40,5 oranlarında azaldığını ifade etmişlerdir [94].



Şekil 4.2 Karaciğer ve böbrek organlarındaki MDA düzeyleri üzerine AFB₂ ve resveratrolün etkisi

Resveratrol ve AFB₂ uygulamasının GSH düzeyleri üzerine etkisi Şekil 4.3'te verilmiştir. Kontrol grubu ve sadece resveratrol uygulanan gruplarda GSH düzeylerinin birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. Resveratrol uygulamasının GSH düzeyini düşük bir seviyede arttırdığı fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamsız olduğu gözlenmiştir (p>0,05). 20 µg/kg AFB₂ uygulamasının karaciğer ve böbrekte GSH düzeylerinde azalmaya neden olduğu, kontrol grubu ile kıyaslandığında AFB₂ uygulamasının karaciğer ve böbrek dokularında GSH düzeylerini sırasıyla 1,32 ve 2,3 kat azalttığı gözlenmiştir. AFB₂'nin karaciğer ve böbrek MDA düzeyindeki arttırıcı, GSH düzeylerindeki azaltıcı etkisi düşünüldüğünde oksidan/antioksidan dengenin bozulduğu söylenebilir. MDA seviyesindeki artış, oksidatif hasarın bir kanıtıdır ve bu hasarı nötralize etmek için enzimler ve enzimatik olmayan antioksidan moleküller rol oynamaktadır. GSH, enzimatik olmayan bir tripeptid antioksidandır ve serbest radikallerin uzaklaştırılmasında antioksidan savunmanın önemli bir parçasıdır. Hücredeki redükte GSH, serbest radikalleri nötralize ederek hücreyi oksidatif hasara karşı korumaktadır. Bu reaksiyonun bir sonucu olarak, GSH molekülleri oksitlenmiş GS-SG durumuna dönüşmekte ve redükte GSH miktarı azalmaktadır [95]. Kısaca, MDA oranındaki artış ve redükte GSH oranındaki azalma, AFB₂'nin neden olduğu oksidatif hasarı kanıtlamaktadır. Aflatoksin metabolizmasında glutatyon konjugasyonu da önemli bir yere sahiptir ve konjugasyon GSH miktarındaki azalmaya da katkı sağlamaktadır [6]. Literatürde de aflatoksin maruziyetinin antioksidan moleküllerin seviyelerinde değişime neden olduğu rapor edilmektedir. Kheir Eldin ve arkadaşları 250 µg/kg AFB₁ uygulanan sıçanlarda hepatoksik etkinin oluştuğunu, karaciğerde redükte glutatyon düzeyinin azaldığını ve lipid peroksidasyonunun arttığını rapor etmişlerdir [96]. Bu çalışma ile resveratrolün karaciğer ve böbrekte azalan GSH düzeylerinde iyileşme sağladığı, doz artışı ile birlikte gözlenen iyileşmesinin daha baskın olduğu da belirlenmiştir. 20 mg/kg resveratrol uygulamasının AFB₂ uygulanan grupta karaciğer ve böbrek GSH düzeylerinde gözlenen azalmayı 1,16 kat ve 1,65 kat geriletmediği belirlenmiştir. Benzer şekilde Şener ve arkadaşları farelerde 30 mg/kg resveratrol uygulamasının bozulmuş antioksidan dengeyi düzenlediğini ve azalan GSH düzeyinde iyileşmeye neden olduğunu rapor etmişlerdir [89].

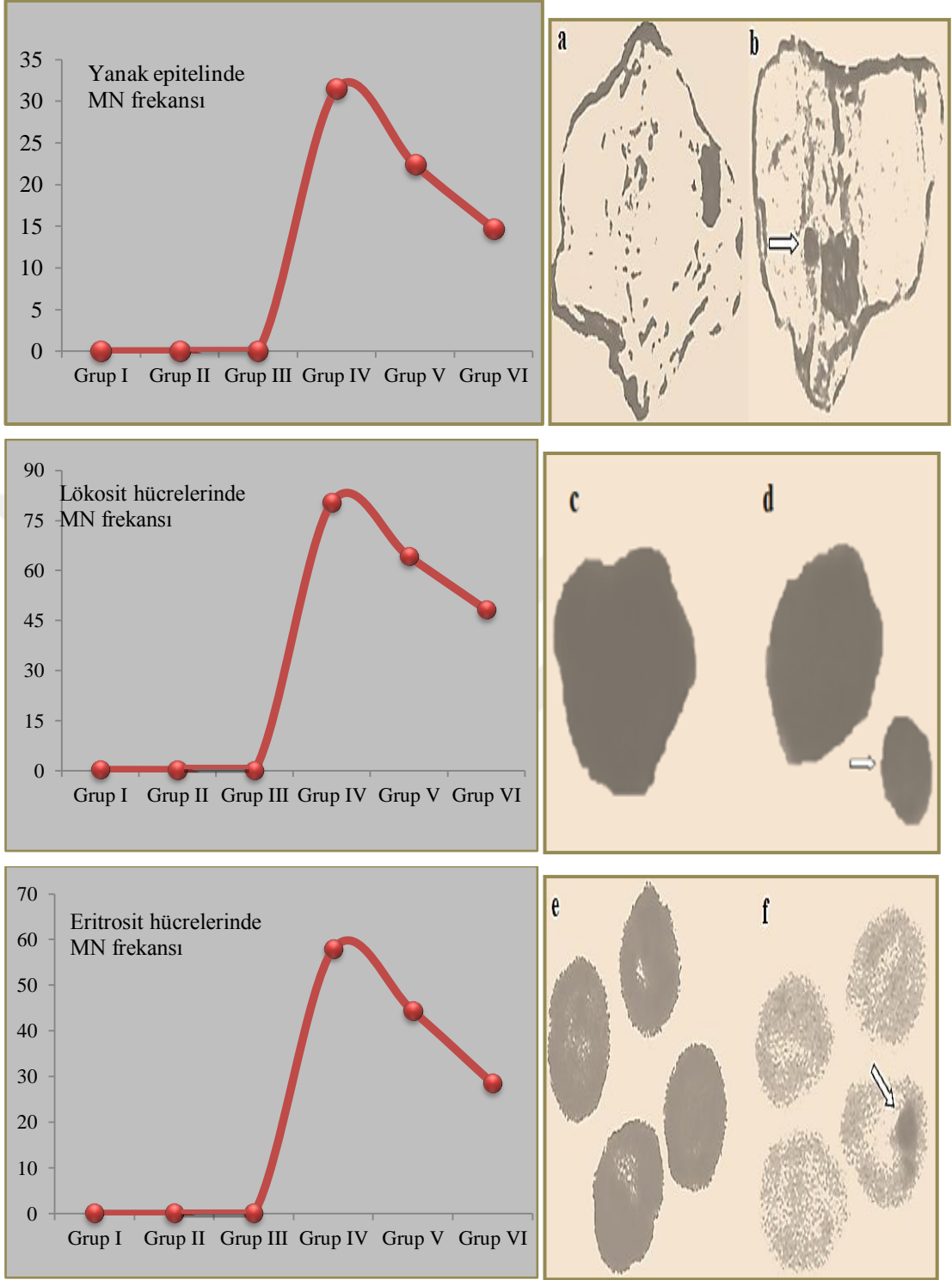


Şekil 4.3 Karaciğer ve böbrekteki GSH düzeyleri üzerine AFB₂ ve resveratrolün etkisi

4.4. Genotoksik Etki

AFB₂'nin genotoksik etkileri ve bu etkilere karşı resveratrolün koruyucu etkisi yanak epiteli, eritrosit ve lökosit hücrelerinde MN oluşumu ile kemikiliği hücrelerinde KA frekansları incelenerek değerlendirilmiştir. AFB₂ uygulanan grupta oluşan MN'ler ve tüm gruplara ait MN oluşum sıklıkları Şekil 4.4'te verilmiştir. Kontrol grubu ve sadece resveratrol uygulanan Grup I, II ve III'te istatistiksel olarak önemli düzeyde bir MN oluşumu gözlenmemiştir. Bu üç grupta yanak epiteli ve eritrosit hücrelerinde herhangi bir MN oluşumu gözlenmezken Grup I ve Grup II'ye ait lökosit hücrelerinde çok düşük ve istatistiksel olarak önemsiz düzeyde bir MN oluşumu gözlenmiştir ($p < 0,05$). Bu sonuçlar tek başına resveratrol uygulamasının MN oluşumunu indüklediğini göstermektedir. 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB₂ uygulanan grupta yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı MN sıklıkları elde edilmiş ($p < 0,05$) ve test edilen üç hücre grubu arasında en yüksek MN oluşumu Grup IV'e ait lökosit hücrelerinde gözlenmiştir. 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB₂ uygulanan grupta yanak epiteli, eritrosit ve lökosit hücrelerinde gözlenen MN değerleri sırasıyla $31,46 \pm 3,28$, $57,92 \pm 5,85$ ve $80,35 \pm 7,70$ olarak bulunmuştur.

MN'ler nükleus bölünmesi sırasında anafazda geride kalan, hasar gören ve ana nükleusta yer almayan kromozom fragmanlarından veya tam kromozomlardan kaynaklanmaktadır. Mitoz bölünmenin telofaz aşamasında geciken kromozomlar ve fragmanlar etrafında bir nükleer zarf oluşarak ana çekirdeğe benzeyen, daha küçük boyutlarda MN yapıları ortaya çıkmaktadır. Bir hücrede oluşan MN, kromozomal fragmanlardan, çift sarmallı DNA kırılmalarından, tek sarmallı kırılmalarından ya da geri kalmış, kutuplara çekilemeyen kromozomlardan kaynaklanmaktadır. MN oluşumu ve sıklığının artması hücrede oluşan toksik etkilerin varlığına işaret etmektedir. Bu nedenle MN testi, hücrelerin maruz kaldığı kimyasalların toksisitenin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır [97,98]. Bir hücrede oluşan MN'nin büyüklüğü toksisitenin mekanizması hakkında bilgi sağlamakta ve hücrenin maruz kaldığı kimyasalın anojenik ya da klastojenik etkisinin belirlenmesini de sağlamaktadır. Anojenik etki sonucu oluşan MN'ler sentromer bölünme hataları ve iğ iplikçığı bozukluklarından kaynaklandığı için daha büyük, klastojenik etki sonucunda oluşan MN'ler ise kromozom kırıklarından köken aldıkları için daha küçük boyutlara sahiptir. MN testi ile kimyasalların genotoksik etkisinin bulunup bulunmadığı belirlenebilirken, bu toksik etkinin hangi yolla gerçekleştiği de tahmin edilebilmektedir [97,99]. AFB₂ ile muamele edilen gruplara ait yanak mukoza, eritrosit ve lökosit hücrelerinde MN oluşumu AFB₂'nin genotoksik etkisinin olduğunu, hem büyük hemde küçük boyutlarda MN oluşumlarının gözlenmesi ise hem anojenik hemde klastojenik etkinin oluştuğunu göstermektedir. Bu sonuç, AFB₂'nin sentromer bölünme hatalarına, iğ iplikçığı bozukluklarına, kromozom kırıkları ya da kutuplara çekilmede anormalliklere neden olarak MN oluşumunu indükleyebileceğini göstermektedir. Benzer şekilde Ezekiel ve arkadaşları 7-35 gün süre ile diyetlerinde AFB₁ uygulanan farelerde beslenme süresinin artması ile eritrositlerde MN sıklığının arttığını ve AFB₁'in mutajenik ve genotoksik etkiye neden olduğunu rapor etmişlerdir [35]. Corcuera ve arkadaşları ise AFB₁ uygulanan sıçanlarda kemik iliği hücrelerinde toksik etkinin oluştuğunu ve 0.25 mg/kg dozda uygulanan AFB₁'in kemik iliği hücrelerinde MN oluşumunu indüklediğini gözlemlemişlerdir [100].



Şekil 4.4. Yanak epitel, eritrosit ve lökosit hücrelerinde oluşan MN'ler ve MN oluşum sıklıkları a. yanak epitel hücrelerinde normal çekirdek, b. yanak epitel hücrelerinde oluşan MN, c. lökosit hücrelerinde normal çekirdek, d. lökositte MN oluşumu, e. çekirdeksiz eritrosit hücresi, f. eritrositte MN oluşumu

AFB₂'nin genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla MN oluşumları ile birlikte kemik iliğinde KA oluşumları ve oluşum sıklıkları da incelenmiş ve sonuçlar Tablo 4.3'te verilmiştir. Grup I, II ve III'te düşük düzeyde gap oluşumu dışında herhangi bir kromozom anormalliğine rastlanmamış, bu anormalliklerin seviyesi de istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). Sadece resveratrol uygulanan Grup II ve III'teki anormallik düzeylerinin kontrol grubu ile paralel seyretmesi 10 mg/kg ve 20 mg/kg dozlarında resveratrolün genotoksik etkiye neden olmadığını göstermektedir. 20 µg/kg AFB₂ uygulanan grupta yüksek düzeyde ve istatistiksel olarak anlamlı kromozom anormallikleri tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu anormallikler arasında en yüksek oranda ve $53,18\pm 5,50$ düzeyinde kromozom kırıklarının olduğu belirlenmiştir. Tüm anormallikler birlikte değerlendirildiğinde oluşum sıklıklarına göre kromozom anormalliklerini kırık>fragman>asentrik kromozom>disentrik kromozom>gap>ring şeklinde sıralamak mümkündür. Bu anormalliklerin gözlenmesi AFB₂'nin genotoksik etkisini kanıtlamaktadır. Aflatoksinlerin genotoksik etkileri canlı sistemlerde oluşturduğu oksidatif stres ve hasarla yakından ilişkilidir. Aflatoksinler canlı sistemlerde, DNA'ya ve albümin gibi proteinlere bağlanan reaktif bir form olan aflatoksin-8,9-epoksite metabolize edilmekte ve bu metaobolit DNA'da guanin bazlarına yüksek afinite ile bağlanarak aflatoksin-N₇-guanin yapılarını oluşturmaktadır. Aflatoksin-N₇-guaninin DNA'da guanin-timin transversiyon mutasyonlarını oluşturmakta ve hücre döngüsünde p53 baskılayıcı genini de olumsuz yönde etkilemektedir [31-33].

Kemik iliği hücreleri oksidatif hasara ve klastojenik kimyasallara duyarlıdır, bu nedenle mutajenite ve/veya antimutajenite taraması için yaygın olarak kullanılmaktadır [46]. Kemik iliği hücrelerinde yüksek düzeyde kırık ve fragman oluşumu AFB₂'nin klastojenik etkisine işaret etmektedir. Klastojenik etki sonucu oluşan kromozom ve kromatidlerdeki kırılmalar fragmentlerin oluşumuna da neden olmaktadır [101, 102]. AFB₂ uygulanan grupta gözlenen yüksek MN düzeyi de kırıkların ve fragmentlerin oluşumu ile yakından ilişkilidir. Bu çalışma ile AFB₂ uygulaması sonucunda gözlenen yüksek düzeyde MN oluşumu ve yine yüksek düzeyde kırıkların oluşumu da birbirini desteklemektedir. Bir kromozom iki kırılmaya uğradığında ve kırık uçlar yeniden birleştiğinde ring kromozomlar ortaya çıkmaktadır. Mitozda bazı hücrelerin ring kromozomların kutuplara çekilememesi

durumunda hücrelerde kromozom kaybı/fazlalığı oluşabilmekte ve bu da genom kararsızlığına neden olabilmektedir [103]. Gap oluşumları ise bir veya her iki kromatitte bir kromatidin genişliğini aşmayan akromatik lezyonlar olarak tanımlanmakta ve gap oluşumu ve sıklığının artması önemli toksisite indikatörü olarak kabul edilmektedir [102]. Disentrik ve asentrik kromozomlar da kırılma sonucunda oluşmakta, disentrik kromozom daha çok kromozom kırıklarının yeniden düzenlenmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Disentrik kromozom, iki sentromere sahip anormal bir kromozomdur ve her biri bir sentromere sahip iki kromozom segmentinin füzyonu ve sonrasında sentromere sahip olmayan fragmanların kaybı oluşmaktadır [104]. Tüm bu etkiler birlikte değerlendirildiğinde; kromozomal anormalliklerin çoğunun kromozomlardaki kırıklardan köken aldığı ve AFB₂'nin baskın olarak kromozom kırığına neden olduğu ve kırıkların yeniden düzenlenmesi sonucunda diğer anormalliklerin gözlemlendiği söylenebilir. Literatürde diğer aflatoksin türlerinin özellikle AFB₁'in genotoksik etkisini rapor eden pek çok çalışma bulunmaktadır. Fetah ve arkadaşları, AFB₁'in sıçanlarda kemik iliğinde gap, kırık, delesyon, disentrik kromozom, yapışkanlık, hipopoliploidi, sentromerik düzenlemeler gibi makro-DNA hasarlarına neden olduğunu belirtmişlerdir [102]. Başka bir çalışmada Theumer ve arkadaşları aflatoksin uygulamasının ratlarda DNA ve RNA hasarlarına neden olduğunu ve bu genotoksik etkinin intrasellüler ROS oluşumundan kaynaklandığını rapor etmişlerdir [105].

Tablo 4.3. Aflatoksin B₂'nin genotoksik etkileri

Parametre	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
Kırık	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	53,18±5,50 ^a	40,10±4,32 ^b	26,94±3,51 ^c
Fragman	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	38,76±3,92 ^a	26,37±3,15 ^b	17,48±2,78 ^c
Asentrik	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	25,14±2,96 ^a	16,53±2,58 ^b	11,40±2,16 ^c
Disentrik	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	18,74±2,52 ^a	11,63±1,97 ^b	7,35±1,18 ^c
Gap	0,22±0,53 ^d	0,14±0,36 ^d	0,11±0,32 ^d	13,78±2,18 ^a	8,66±1,84 ^b	3,75±1,24 ^c
Ring	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	9,67±1,85 ^a	5,16±1,52 ^b	1,88±0,96 ^c

Değerler ortalama±SD olarak gösterilmiştir (n=6). Aynı satırda farklı harfler(a-d) ile gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).

AFB₂ ile indüklenen kromozomal hasarlara karşı resveratrol uygulamasının koruyucu özellik sergilediği ve resveratrol dozunun artması ile birlikte KA oluşum sıklığının da azaldığı belirlenmiştir. Resveratrolün en belirgin koruyucu özelliği gap oluşumuna karşı gözlenmiş, Grup VI'da 20 mg/kg resveratrol uygulamasının tüm kromozom anormalliklerini belirgin şekilde azalttığı saptanmıştır. 20 mg/kg resveratrolün AFB₂ tarafından indüklenen kromozom hasarlarını %49.34-80.5 aralığında azaltıcı bir etki sergilediği belirlenmiştir. KA oluşumuna karşı gözlenen bu koruyucu özellik resveratrolün multi-biyolojik özellikleri ile açıklanabilir.

Resveratrol serbest radikalleri temizleyen, glutatyon ve katalaz gibi antioksidanları indükleyen güçlü bir antioksidan aktiviyete sahiptir [105,106]. Resveratrol hücre siklusu üzerinde de düzenleyici bir role sahiptir. Hasarlı hücrelerde hücre döngüsünü baskılayarak hücrenin G₀/G₁ fazında yada S fazında kalmasını sağlamaktadır. Ayrıca siklin D₁, D₂ ve siklin E'nin ekspresyonunu inhibe ederek ve siklin bağlı kinazların ekspresyonunu azaltarak da hücre döngüsünü düzenleyebilmektedir [107-109]. Bu yolla hasarlı hücrelerin bölünmesini önleyerek DNA hasarı ve kromozom anormalliklerinin sıklığını da azaltabilmektedir. Macar ve arkadaşları [110] fragman, yapışkan kromozom, vagrant kromozom, eşit olmayan kromatin dağılımı, köprü, anormal polarizasyon gibi kromozomal anormalliklere karşı resveratrol uygulamasının azaltıcı etkisini rapor etmişlerdir. Carsten ve arkadaşları [112] radyasyon uygulanmış fare kemik iliği hücrelerinde oluşan kromozomal hasarlara karşı 100 mg/kg resveratrol uygulamasının özellikle 30 günde yüksek bir koruyucu özellik sergilediğini ve uygulama sonunda kromozomal anormalliklerin kontrol grubu düzeyine gerilediğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca tek başına 100 mg/kg resveratrolün herhangi bir kromozom hasarının oluşumunu indüklediğini de ifade etmişlerdir. Literatürdeki bu sonuçlar, çalışmamızda elde edilen sonuçları da destekler niteliktedir.

BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tarımsal ürünler hasat, işleme ve depolama gibi çeşitli aşamalarda ortam koşullarına bağlı olarak küflerle kontamine olmaktadır. Kontamine olan küfler, gıdalarda ve yemlerde insan ve hayvan sağlığı için ciddi tehlikeler oluşturan mikotoksin üretmektedir. Mikotoksinler içinde yüksek organizmalara en etkili olanlar aflatoksinlerdir ve insanlar üzerinde direk araştırmalar yürütülemediğinden aflatoksinlerin etkilerinin net olarak sınıflandırılabilmesi oldukça zordur. Hayvan denemelerinde kronik ve akut etkileri saptanan aflatoksin gibi pek çok kimyasalın insanlarda da toksisiteye neden olacağı bilinmektedir. Bu bakımdan aflatoksinin etkileri hayvanlarda pek çok çalışmada ile araştırılmış ve özellikle AFB₁'in toksik etkileri yeterince aydınlatılmıştır. Diğer aflatoksin türleri ile ilgili literatür çalışmaları henüz yeterli düzeyde değildir.

Bu çalışmada AFB₂'in albino farelerde potansiyel toksik etkileri ve bu toksik etkilere karşı resveratrolün koruyucu özelliği araştırılmıştır. AFB₂ uygulanan farelerde canlı ağırlık ile böbrek ve karaciğer organ ağırlıklarında önemli azalmalar tespit edilmiştir. Böbrek ve karaciğer dokularında antioksidan/oksidan dengedeki değişimler GSH ve MDA düzeyleri ile incelenmiş, her iki organda da GSH düzeylerinde azalma, lipid peroksidasyonu göstergesi olan MDA düzeylerinde artış oluştuğu saptanmıştır. Bu bulgular karaciğer ve böbrek dokusunda oluşan oksidatif hasara işaret etmektedir. AFB₂ uygulanan grupta böbrek hasar indikatörü olan BUN ve kreatinin ile karaciğer markır enzimleri olan ALT ve AST düzeyleri incelenmiş, bu parametrelerde kontrol grubuna kıyasla önemli artışlar belirlenmiştir. Karaciğer ve böbrek organ ağırlıklarındaki azalma, antioksidan/oksidan dengedeki bozulma ve ALT, AST, BUN ve kreatinin seviyelerindeki artışlar AFB₂'nin karaciğer ve böbrek organlarında hasara neden olduğunun bariz kanıtlarıdır. AFB₂ uygulanan grupta yanak epiteli, eritrosit ve lökosit hücrelerinde MN oluşumunun indüklenmesi ve kemik iliğinde kromozomal anormalliklerin gözlenmesi AFB₂'nin genotoksik etkilerini de ortaya koymaktadır. AFB₂'nin farelerde oluşturduğu bu toksik etkilerin temeli oksidatif hasara dayanmaktadır. AFB₂'nin oksidatif hasara neden olduğu özellikle MDA ve GSH oranlarındaki değişim ile kanıtlanmış ve karaciğer, böbrek organlarının bu

hasara karşı oldukça duyarlı olduğunda tespit edilmiştir. Oksidatif hasar öncelikli olarak hücre zarı bütünlüğünde ve devamında hücre fonksiyonunda bozulmalara yol açmaktadır. Çalışmadan elde edilen önemli bir diğer bulgu ise resveratrolun AFB₂'nin genotoksik, fizyolojik ve biyokimyasal hasarlarına karşı koruyucu özelliğinin saptanmasıdır. Bu koruyucu özellik doza bağlı olarak artmış fakat bu artışın doğru orantılı olmadığı da belirlenmiştir. Resveratrolün koruyucu özelliği antioksidan aktivitesi ile yakından ilişkilidir. AFB₂, hücrelerde oksidatif stres yaratarak toksik etki sergilemektedir. Antioksidan özelliği bulunan resveratrol bu toksik etkiyi oksidatif stresi azaltarak engellemekte ve koruyucu özellik sergilemektedir. Resveratrol özellikle hücre döngüsü, hücre sinyal mekanizmaları ve apoptoz gibi önemli süreçlerde de düzenleyici görev alarak hasarlı hücrelerin proliferasyonunu azaltarak iyileştirici etki göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile bir aflatoksin türü olan aflatoksin B₂'nin albino farelerde fizyolojik, biyokimyasal ve genetik yönden toksik etkilere neden olduğu, resveratrolün ise tüm bu toksik etkilere karşı azaltıcı/iyileştirici bir özellik sergileyerek koruyucu rolü olduğu belirlenmiştir. Literatürde aflatoksin türleri ile yapılmış pek çok çalışma bulunmakla birlikte AFB₂'nin detaylı araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada ise özellikle ağız yolu ile alınan AFB₂'nin yanak epitelinde MN oluşumunu indüklediği ile ilgili literatüre ilk veri girişi sağlanmıştır. Antioksidan özellikteki resveratrolün koruyucu özelliği ile ilgili literatürde pek çok veri bulunmaktadır. Fakat AFB₂ tarafından indüklenen toksisiteye karşı resveratrolün koruyucu özelliğini rapor eden bir çalışma da bulunmamaktadır. Bu bakımdan bu çalışma resveratrolün AFB₂ toksisitesine karşı doza bağlı bir koruyucu rol sergilediğini rapor eden ilk çalışma niteliği de taşımaktadır. Yüksek yaşam kalitesinin sürdürülebilirliğinde canlılara kontamine olan kimyasalların toksik etkilerinin aydınlatılması ve bu etkilerin azaltılması için araştırmaların yapılması oldukça önemlidir. Özellikle toksik etkilerin ve bu etkilere karşı doğal ürünlerin koruyucu rolünün çoklu parametre kullanılarak araştırıldığı ve her bir bulgunun birbiri ile ilişkilendirilerek toksisite mekanizmasının aydınlatıldığı çalışmalar oldukça değerlidir. Bu noktadan hareketle, bu çalışma toksisiteye karşı koruyucu maddelerin etki mekanizmalarını inceleyen pek çok araştırmaya yön verecek ve rehber olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Yentür G., Er B., Gıdalarda aflatoksin varlığının değerlendirilmesi. Türk Hij. Den. Biyol. Derg., 69(1), 41-52, 2011.
- [2] Şener S., Gıda güvenliği açısından mikotoksinler. Türkiye Klinikleri J. Surg. Med. Sci., 2(46), 135-139, 2006.
- [3] <https://www.stb.org.tr/Dosyalar/Arastirmalar/aflatoksin.pdf>, Erişim Tarihi: 28.01.2021.
- [4] O’Riordan M.J., Wilkinson M.G., A survey of the incidence and level of aflatoxin contamination in a range of imported spice preparations on the Irish retail market. Food Chem., 107(4), 1429-1435, 2008.
- [5] Hussein HS., Brasel J.M., Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology, 167(2), 101-134, 2001.
- [6] Santini, A., Ritieni, A., Aflatoxins: risk, exposure and remediation. In: Aflatoxins: Recent Advances and Future Prospects. UK, 343-376, 2013.
- [7] Süzer, Ö., Farmakoloji. 3. Baskı. Klinisyen Tıp Kitabevleri, 533, 2005.
- [8] Stein C.M., Are herbal products dietary supplements or drugs? An important question for public safety. Cli. Pharmacol. Therapeutics., 71, 411-423, 2002.
- [9] Leonard S.S., Xia C., Jiang B.H., Stinefelt B., Klandorf H., Harris G.K., Shi X., Resveratrol scavenges reactive oxygen species and affects radical-induced cellular responses. Biochem. Biophys. Res. Commun., 309(4):1017–1026, 2003.
- [10] Pervaiz S., Holme A.L., Resveratrol: its biologic targets and functional activity. Antioxid. Redox Signal., 11(11), 2851-2897, 2009.
- [11] Guarente L., Sirtuins, aging, and medicine. New Engl. J. Med., 364(23), 2235-2244, 2011.
- [12] Kitada M., Kume S., Takeda-Watanabe A., Kanasaki K., Koya D., Sirtuins and renal diseases: relationship with aging and diabetic nephropathy. Clin. Sci., 124(3), 153-164, 2013.
- [13] Bullerman L.B., Significance of mycotoxins to food safety and human health. J. Food Prot., 42(1), 65-86, 1979.

- [14] Scott P.M., Mycotoxins in feeds and ingredients and their origin. *J. Food Prot.*, 41(5), 385-398, 1978.
- [15] Betina, V., Mycotoxins, Chemical, Biological and Environmental Aspects, Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York, Tokyo, 437, 1989.
- [16] Groopman J.D., Cain L.G., Kensler T.W., Harris C.C., Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relationship to cancer. *Crit. Rev. Toxicol.*, 19(2), 113-145, 1988.
- [17] Wilson B.J., Hayes A.W., Microbial toxins. p. 391. In *Toxicants occurring naturally in foods*. Committee on Food Protection, Food and Nutr. Board, Natl. Res. Council, Nat. Acad. Sci., Washington, D.C, 1973.
- [18] Bbosa G.S., Kitya D., Lubega A., Ogwal-Okeng J., Anokbonggo W.W., Kyegombe D. B., Review of the biological and health effects of aflatoxins on body organs and body systems. *Aflatoxins-Recent Advances And Future Prospects*, 12, 239-265, 2013.
- [19] Agag B.I., Mycotoxins in foods and feeds : 1-aflatoxins. *Ass. Univ. Bull. Environ. Res.*, 7(1), 173-191, 2004.
- [20] Larsson P., Tjalve H., Intranasal instillation of Aflatoxin B1 in rats: Bioactivation in the nasal mucosa and neuronal transport to the olfactory bulb. *Toxicol. Sci.*, 55, 383-391, 2000.
- [21] Coulombe, R.A., Nonhepatic disposition and effects of aflatoxin B1. In: *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance Academic*, San Diego, 89–101, 1994.
- [22] [https://www.mdpi.com/journal/toxins/special_issues/aflatoxins.](https://www.mdpi.com/journal/toxins/special_issues/aflatoxins), Erişim Tarihi: 28.01.2021.
- [23] Do J.H., Choi D.K., Aflatoxins: detection, toxicity, and biosynthesis. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 12(6), 585-593, 2007.
- [24] Bennett J.W., Klich M., Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16, 497-516, 2003.
- [25] Chu Y.H., Saffhill R., Errors in DNA synthesis induced by aflatoxin B 1 modification of poly (dC-dG). *Carcinogenesis*, 4(5), 643-646, 1983.
- [26] Guindon K.A., Bedard L.L., Massey T.E., Elevation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA from isolated mouse lung cells following in vivo treatment with aflatoxin B1. *Toxicol. Sci.*, 98(1), 57-62, 2007.

- [27] Neal G.E., Nielsch U., Judah D.J., Hulbert P.B., Conjugation of model substrates or microsomal-activated aflatoxin B1 with reduced glutathione, catalysed by cytosolic glutathione-S-transferases in livers of rats, mice and guinea pigs. *Biochem. Pharmacol.*, 36(24), 4269-4276, 1987.
- [28] Hayes A.W., Biological activities of mycotoxins. *Mycopathologia*, 65, 29-41, 1978.
- [29] Wild C.P., Montesano R., A model of interaction: Aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention. *Cancer Lett.*, 286, 22-28, 2009.
- [30] Wu F., Khlangwiset P., Health economic impacts and cost-effectiveness of aflatoxin reduction strategies in Africa: Case studies in biocontrol and postharvest interventions. *Food Addit. Contam.*, 27, 496-509, 2010.
- [31] Guengerich F.P., Forging the links between metabolism and carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 488(3), 195-209, 2001.
- [32] Bailey E.A., Iyer R.S., Stone M.P., Harris T.M., Essigmann J.M., Mutational properties of the primary aflatoxin B1-DNA adduct. *PNAS.*, 93(4), 1535-1539, 1996.
- [33] Sherratt, P.J., Hayes, J.D., Glutathione S-transferase. In: *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and other Xenobiotics*. Chichester, England: John Wiley & Sons, Ltd., 319–352, 2002.
- [34] Kobertz W.R., Wang D., Wogan G.N., Essigmann J.M., An intercalation inhibitor altering the target selectivity of DNA damaging agents: synthesis of site-specific aflatoxin B1 adducts in a p53 mutational hotspot. *PNAS.*, 94(18), 9579-9584, 1997.
- [35] Ezekiel C.N., Alabi O.A., Anokwuru C.P., Oginni O., Studies on Dietary Aflatoxin-induced Genotoxicity using two In vivo bioassays. *Arch. Appl. Sci. Res.*, 3(2), 97-106, 2011.
- [36] Jacotot E., Ferri K.F., Kroemer G., Apoptosis and cell cycle: distinct check-points with overlapping upstream control. *Pathologie-biologie*, 48(3), 271-279, 2000.
- [37] Ide S., Minami M., Ishihara K., Uhl G.R., Sora I., Ikeda K., Mu opioid receptor-dependent and independent components in effects of tramadol. *Neuropharmacology*, 51(3), 651-658, 2006.

- [38] Santana L., Uriarte E., Roleira F., Milhazes N., Borges F., Furocoumarins in medicinal chemistry. Synthesis, natural occurrence and biological activity. *Curr. Med. Chem.*, 11(24), 3239-3261, 2004.
- [39] Yurdun T., Öz V., A study on aflatoxins in various foods, spices and feedstuffs by high performance liquid chromatography. *J. Fac. Pharm. Istanbul.*, 31, 11-16, 1995.
- [40] Santini, A., Ritieni, A., Aflatoxins: risk, exposure and remediation. In: *Aflatoxins: Recent Advances and Future Prospects*. In Tech Open, UK, 343-376, 2013.
- [41] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aflatoxin-B2>, Erişim Tarihi: 28.01.2021.
- [42] King R.E., Bomser J.A., Min D.B., Bioactivity of resveratrol. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 5(3), 65-70, 2006.
- [43] Hillis W.E., Hart J.H., Yazaki Y., Polyphenols of *Eucalyptus sideroxylon* wood. *Phytochemistry*, 13, 1591–1595, 1974.
- [44] Doğan, A.E., Türk Şaraplarındaki Resveratrol Miktarının HPLC ile Tayin Edilmesi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2005.
- [45] Paul B., Masih I., Deopujari J., Charpentier C., Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasava, *J. Ethnopharmacol.*, 68, 71–76, 1999.
- [46] Soleas G.J., Diamandis E.P., Goldberg D.M., Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone?. *Clin. Biochem.*, 30(2), 91- 113, 1997.
- [47] Pedras M.S.C., Ahiahonu P.W.K., Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogs by phytopathogenic fungi. *Phytochem*, 66, 391–411, 2005.
- [48] Gambini J., Inglés M., Olaso G., Lopez-Grueso R., Bonet-Costa V., Gimeno-Mallench L., Mas-Bargues C., Abdelaziz K.M., Gomez-Cabrera M.C., Vina J., Borrás C., Properties of resveratrol: in vitro and in vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2015, 2015, 837042.
- [49] Burns J., Yokota T., Ashihara H., Lean M.E., Crozier A., Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.*, 50(11), 3337-3340, 2002.

- [50] Berretta M., Bignucolo A., Di Francia R., Comello F., Facchini G., Ceccarelli M., Maurea N., Resveratrol in Cancer Patients: From Bench to Bedside. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(8), 2945, 2020.
- [51] Langcake P., Pryce R.J., The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry*, 16(8), 1193-1196, 1977.
- [52] Gomes B.A.Q., Silva J.P.B., Romeiro C.F.R., Dos Santos S.M., Rodrigues C.A., Gonçalves P.R., Monteiro M.C., Neuroprotective mechanisms of resveratrol in Alzheimer's disease: role of SIRT1. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2018, 2018, 8152373.
- [53] Vitaglione P., Sforza S., Galaverna G., Ghidini C., Caporaso N., Vescovi P.P., Marchelli R., Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49(5), 495-504, 2005.
- [54] Delmas D., Aires V., Limagne E., Dutartre P., Mazué F., Ghiringhelli F., Latruffe N., Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1215(1), 48-59, 2011.
- [55] Lancon A., Delma D., Osman H., Thénot J.P., Jannin B., Latruffe N., Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 316(4), 1132-1137, 2004.
- [56] Walle T., Hsieh F., DeLegge M.H., Oatis J.E., Walle U.K., High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab. Dispos.*, 32(12), 1377-1382, 2004.
- [57] Urpi-Sarda M., Zamora-Ros R., Lamuela-Raventos R., Cherubini A., Jauregui O., De La Torre R., Andres-Lacueva C., HPLC-tandem mass spectrometric method to characterize resveratrol metabolism in humans. *Clin. Chem.*, 53(2), 292-299, 2007.
- [58] Wenzel E., Somoza V., Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49(5), 472-481, 2005.
- [59] Marier J.F., Vachon P., Gritsas A., Zhang J., Moreau J. P., Ducharme M.P., Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 302(1), 369-373, 2002.
- [60] Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 82(1), 47-95, 2002.

- [61] Romano A.D., Serviddio G., De Matthaëis A., Bellanti F., Vendemiale G., Oxidative stress and aging. *J. Nephrol.*, 23, 29-36, 2010.
- [62] Ding D.F., You N., Wu X.M., Xu J.R., Hu A.P., Ye X.L., Lu Y.B., Resveratrol attenuates renal hypertrophy in early-stage diabetes by activating AMPK. *Am. J. Nephrol.*, 31(4), 363-374, 2010.
- [63] Chen K.H., Hung C.C., Hsu H.H., Jing Y.H., Yang C.W., Chen J.K., Resveratrol ameliorates early diabetic nephropathy associated with suppression of augmented TGF- β /smad and ERK1/2 signaling in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chem. Biol. Interac.*, 190(1), 45-53, 2011.
- [64] Acar A., Yalçın E., Cavusoglu K., Protective effects of β -carotene against ammonium sulfate toxicity: biochemical and histopathological approach in mice model. *J. Med. Food.*, 21(11), 1145-1149, 2018.
- [65] Çavuşoğlu K., Yalçın E., Yapar K., Oruç E., Gür B., The effects of grape seed extract against toxicity of benzene on liver and kidney tissues of albino mice: biochemical evaluation. *Turkish J. Biochem.*, 40(1), 66-73, 2015.
- [66] Cavusoglu K., Yapar K., Yalçın E., Oruc E., Protective effect of Royal Jelly on some biochemical parameters in cadmium-treated albino mice. *Fresenius Environ. Bull.*, 19(10), 2164-2169, 2010.
- [67] Yalçın E., Oruc E., Cavusoglu K., Yapar K., 2010. Protective effect of grape seed extract on doxorubicin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity in albino mice. *Fresenius Environ. Bull.*, 19(10), 2151-2158, 2010.
- [68] Yoshioka T., Kawada K., Shimada T., Mori M., Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 135(3), 372-376, 1979.
- [69] Beutler E., Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.*, 61: 882-888, 1963.
- [70] Taşlı B., Çiçek F., Yalçın E., Demirtaş G., Çavuşoğlu K., Formaldehit toksisitesine karşı yeşil çay özütünün koruyucu etkisi: swiss albino farelerde genotoksik değerlendirme. *Cumhuriyet Sci. J.*, 36(2), 63-73, 2015.
- [71] Te-Hsiu M.A., Zhou X., Loarco G.F., Arreola G.G., Lecona S.U., Mouse erythrocyte micronucleus (MUS-EMN) assay on the clastogenicity of industrial wastewater. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 11, 95-98, 1995.
- [72] Acar, A., Yalçın, E., Yapar, K., Çavuşoğlu, K., Lambda sihalotrin tarafından teşvik edilen fizyolojik ve genetik yapıdaki değişimlere karşı arı sütünün

koruyucu etkisi. Karadeniz 1. Uluslararası Multidisipliner Bilimsel Çalışmalar Kongresi (ss. 463-469), Giresun, 2019.

- [73] Fenech M., Chang W.P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S., Zeiger E., HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 534(1-2), 65-75, 2003.
- [74] Savage J.R., Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J. Med. Genet.*, 13, 103–122, 1976.
- [75] Oguz H., Kurtoglu V., Effect of clinoptilolite on performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. *Br. Poult. Sci.*, 41(4), 512-517, 2000.
- [76] Davies, M.J., Role of Lipolysis and Lipogenesis in the Development of Diet-Induced Obesity, Old Dominion University, Eastern Virginia Medial School, PhD Thesis, 2000.
- [77] Enjoji, M., Kohjima, M., Nakamuta, M., Lipid metabolism and the liver. In: *The Liver in Systemic Diseases*. Springer, Tokyo, 105-122, 2016.
- [78] Arvind M.N., Churchil R.R., Effect of dietary esterified glucomannan on performance of broilers exposed to aflatoxin. *Indian J. Anim. Res.*, 49(5), 658-661, 2015.
- [79] Han X.Y., Huang Q.C., Li W.F., Jiang J.F., Xu Z.R., Changes in growth performance, digestive enzyme activities and nutrient digestibility of cherry valley ducks in response to aflatoxin B1 levels. *Livest. Sci.*, 119(1-3), 216-220, 2008.
- [80] Jeon S.M., Lee S.A., Choi M.S., Antiobesity and vasoprotective effects of resveratrol in apoE-deficient mice. *J. Med. Food.*, 17(3), 310-316, 2014.
- [81] Do Amaral C.L., Francescato H.D.C., Coimbra T.M., Costa R.S., Darin J.D.A.C., Antunes L.M.G., Bianchi M.D.L.P., Resveratrol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Arch. Toxicol.*, 82(6), 363–370, 2008.
- [82] Kim D.H., Jung Y.J., Lee J.E., Lee A.S., Kang K.P., Lee S., Kim W., SIRT1 activation by resveratrol ameliorates cisplatin-induced renal injury through deacetylation of p53. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 301(2), 427–435, 2011.
- [83] Highab S.M., Aliyu M., Muhammad B.Y., Effect of resveratrol on liver histopathology of lead-induced toxicity in wistar rats. *J. Pharm. Res. Int.*, 20(6), 1-8, 2017.

- [84] Karaca A., Yilmaz S., Kaya E., Altun S., The effect of lycopene on hepatotoxicity of aflatoxin B1 in rats. *Arch. Physiol. Biochem.*, 8(5), 1-8, 2019.
- [85] Anderson F.H., Zeng L., Rock N.R., Yoshida E.M., An assessment of the clinical utility of serum ALT and AST in chronic hepatitis C. *Hepatol. Res.*, 18(1), 63-71, 2000.
- [86] Bakeer A.M., Farid A.S., GadElKarim M.F., The hepatotoxic and nephrotoxic effects of mycotoxin in broiler chickens. *BVMJ.*, 25, 29-45, 2013.
- [87] Gowda S., Desai P.B., Kulkarni S.S., Hull V.V., Math A.A., Vernekar S.N., Markers of renal function tests. *N. Am. J. Med. Sci.*, 2(4), 170, 2010.
- [88] Eraslan G., Sarica Z.S., Bayram L.Ç., Tekeli M.Y., Kanbur M., Karabacak M., The effects of diosmin on aflatoxin-induced liver and kidney damage. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 24(36), 27931-27941, 2017.
- [89] Şener G., Toklu H.Z., Şehirli A.Ö., Velioglu-Öğünç A., Çetinel S., Gedik N., Protective effects of resveratrol against acetaminophen-induced toxicity in mice. *Hepatol. Res.*, 35(1), 62-68, 2006.
- [90] Palsamy P., Subramanian S., Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2–Keap1 signaling. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 1812(7), 719-731, 2011.
- [91] Cuypers A., Plusquin M., Remans T., Jozefczak M., Keunen E., Gielen H., Opdenakker K., Nair A.R., Munters E., Artois T.J., Nawrot T., Vangronsveld J., Smeets K., Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*, 23(5), 927-940, 2010.
- [92] Nawrot T.S., Van Hecke E., Thijs L., Richart T., Kuznetsova T., Jin Y., Angronsveld J., Roels H.A., Staessen J.A., Cadmium-related mortality and long-term secular trends in the cadmium body burden of an environmentally exposed population. *Environ. Health Perspect.*, 116(12), 1620-1628, 2008.
- [93] Shen H.M., Shi C.Y., Lee H.P., Ong C.N., Aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 127(1), 145-150, 1994.
- [94] Kasdallah-Grissa A., Mornagui B., Aouani E., Hammami M., Gharbi N., Kamoun A., El-Fazaa S., Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Alcohol Alcohol.*, 41(3), 236-239, 2006.

- [95] Kerksick C., Willoughby D., The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, 2(2), 38, 2005.
- [96] Kheir Eldin A.A., Motawi T.M., Sadik N.A., Effect of some natural antioxidants on aflatoxin B1-induced hepatic toxicity. *EXCLI J.*, 7, 119-131, 2008.
- [97] Von Ledebur M., Schmid W., The micronucleus test methodological aspects. *Mutat. Res. Fund. Mol. M.*, 19(1), 109-117, 1973.
- [98] Maier P., Schmid W., Ten model mutagens evaluated by the micronucleus test. *Mutat. Res. Genet. Tox.*, 40(4), 325-337, 1976.
- [99] Högstedt B., Karlsson A., The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. *Mutat. Res.*, 156: 229–232, 1985.
- [100] Corcuera L.A., Vettorazzi A., Arbillaga L., Pérez N., Gil A.G., Azqueta A., González-Peñas E., Jose Antonio García J., de Cerain A.L., Genotoxicity of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A after simultaneous application of the in vivo micronucleus and comet assay. *Food Chem. Toxicol.*, 76, 116-124, 2015.
- [101] Kovalchuk O., Kovalchuk I., Arkhipov A., Telyuk P., Hohn B., Kovalchuk L., The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. *Mutat. Res.*, 415, 47–57, 1998.
- [102] Fetaih H.A., Dessouki A.A., Hassanin A.A., Tahan A.S., Toxopathological and cytogenetic effects of aflatoxin B1 (AFB1) on pregnant rats. *Pathol. Res. Pract.*, 210(12), 1079-1089, 2014.
- [103] [https://clinicalgate.com/chromosomes-and-chromosomal-abnormalities/.](https://clinicalgate.com/chromosomes-and-chromosomal-abnormalities/), Erişim Tarihi: 28.01.2021.
- [104] Nussbaum, R., McInnes, R., Willard, H., *Genetics in Medicine*, 7th Edition. Thompson & Thompson, 72, 2007. [https://en.wikipedia.org/wiki/ISBN_\(identifier\)](https://en.wikipedia.org/wiki/ISBN_(identifier))
- [105] Theumer M.G., Cánepa M.C., Lopez A.G., Mary V.S., Dambolena J.S., Rubinstein H. R., Subchronic mycotoxicoses in Wistar rats: assessment of the in vivo and in vitro genotoxicity induced by fumonisins and aflatoxin B1, and oxidative stress biomarkers status. *Toxicology*, 268(1-2), 104-110, 2010.
- [106] Li Y., Cao Z., Zhu H., Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacol. Res.*, 53(1), 6-15, 2006.

- [107] Losa G.A., Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. *Eur. J. Clin. Invest.*, 33(9), 818-823, 2003.
- [108] Delmas D., Lançon A., Colin D., Jannin B., Latruffe N., Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer. *Curr. Drug Targets.*, 7(4), 423-442, 2006.
- [109] Kundu J.K., Surh Y.J., Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF- κ B and AP-1 as potential targets. *Mutat. Res. Fund. Mol. M.*, 555(1-2), 65-80, 2004.
- [110] Macar T.K., Macar O., Yalçın E., Çavuşoğlu K., Resveratrol ameliorates the physiological, biochemical, cytogenetic, and anatomical toxicities induced by copper (II) chloride exposure in *Allium cepa* L. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 27(1), 657-667, 2020.
- [111] Carsten R.E., Bachand A.M., Bailey S.M., Ullrich R.L., Resveratrol reduces radiation-induced chromosome aberration frequencies in mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.*, 169(6), 633-638, 2008.

ÖZGEÇMİŞ

Alperen GÜNDÜZ, 2013 yılında N. Serap Ulusoy Denizcilik Lisesi'nden mezun oldu. 2013 yılında başladığı Giresun Üniversitesi Şebinkarahisar Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu Gıda Teknolojisi Bölümü'nü 2017 yılında bitirdi. 2018 yılında Giresun Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında başladığı yüksek lisans eğitimini Şubat-2021'de tamamladı.

