

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI

**DENEYSEL OLARAK AFLATOKSİN B1'E MARUZ BIRAKILAN
RATLARDA PROPOLİS TAKVİYESİNİN OKSİDATİF STRES VE
BAĞIRSAK MİKROBİYOTASI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Hazırlayan
Sevtap KABALI

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Neslihan ÖNER

İkinci Danışman
Doç. Dr. Mehtap ÜNLÜ SÖĞÜT

Doktora Tezi

Aralık 2024
KAYSERİ

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI

**DENEYSEL OLARAK AFLATOKSİN B1'E MARUZ BIRAKILAN
RATLARDA PROPOLİS TAKVİYESİNİN OKSİDATİF STRES VE
BAĞIRSAK MİKROBİYOTASI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Doktora Tezi

Hazırlayan
Sevtap KABALI

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Neslihan ÖNER

İkinci Danışman
Doç. Dr. Mehtap ÜNLÜ SÖĞÜT

**Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TDK-2023-12487 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

Aralık 2024
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Sevtap KABALI

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Deneyisel Olarak Aflatoksin B1'e Maruz Bırakılan Ratlarda Propolis Takviyesinin Oksidatif Stres ve Bağırsak Mikrobiyotası Üzerine Etkileri” adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Sevtap KABALI

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Neslihan ÖNER

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Betül ÇİÇEK

Dr. Öğr. Üyesi Neslihan ÖNER danışmanlığında Sevtap KABALI tarafından hazırlanan “Deneyssel Olarak Aflatoksin B1'e Maruz Bırakılan Ratlarda Propolis Takviyesinin Oksidatif Stres ve Bağırsak Mikrobiyotası Üzerine Etkileri” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

.../.../.....

JÜRİ

İmza

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Neslihan ÖNER

Üye : Prof. Dr. Nurhan ERTAŞ ONMAZ

Üye : Doç. Dr. Zeynep UZDİL

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Yasemin ERTAŞ ÖZTÜRK

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Armağan AYTUĞ YÜRÜK

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez projemin planlanması, yürütülmesi ve yazılması aşamalarında göstermiş olduğu destek ve yardımlarından dolayı birinci danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Neslihan ÖNER'e,

Beni daha başarılı olmaya ve yapabileceğimin en iyisini yapmaya teşvik eden, tezimin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda benden desteğini esirgemeyen ikinci danışmanım Doç. Dr. Mehtap ÜNLÜ SÖĞÜT'e,

Deneysel prosedürlerin gerçekleştirilmesinde ve analizlerde çok önemli katkıları olan, laboratuvar deneyimlerini benimle paylaşan ve iyi ki yolumun kesiştiği Öğr. Gör. Dr. Ayça KARA'ya,

Doktora eğitimim sürecinde tecrübelerini ve güzel dileklerini benimle paylaşan, tez projemin planlanmasında bana destek veren Prof. Dr. Nalan Hâkime NOĞAY'a,

Deneylein gerçekleştirilmesi aşamasında bana yardımcı olan Divan VESEK ve Leyla Gül ŞAHİN'e ve tez projemde kullandığım propolisin temin edilmesi ve ekstraksiyon aşamalarına katkı veren Dr. Öğr. Üyesi Selim BIYIK'a,

Maddi açıdan zorlu geçen eğitim sürecimde 2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında beni destekleyen TÜBİTAK'a ve tez projemin finansal kaynağı olduğu için Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve motivasyonumun en önemli kaynakları canım annem, babam ve kardeşlerime,

Yoğun geçen bu süreçte, gösterdiği sabır, anlayış ve sevgisini asla unutmadığım, bana her zaman inanan, yanımda olan ve hayallerimi gerçekleştirebilmem için beni cesaretlendiren sevgili eşim Orhan Seyfettin KABALI'ya en derin duygularla teşekkür ederim.

Sevtap KABALI

Aralık 2024, Kayseri

DENEYSEL OLARAK AFLATOKSİN B1'E MARUZ BIRAKILAN RATLARDA PROPOLİS TAKVİYESİNİN OKSİDATİF STRES VE BAĞIRSAK MİKROBİYOTASI ÜZERİNE ETKİLERİ

Sevtap KABALI

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Aralık 2024

Danışmanlar: Dr. Öğr. Üyesi Neslihan ÖNER, Doç. Dr. Mehtap ÜNLÜ SÖĞÜT

ÖZET

Aflatoksin B1 (AFB1) insanların ve hayvanların sık tükettiği besinlerde uygun olmayan koşullarda oluşarak sağlık üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Güçlü antioksidan aktiviteye sahip olan propolis, oksidatif stresi azaltabilir ve bağırsak mikrobiyota kompozisyonunu modüle edebilir. Ancak, propolisin AFB1 kaynaklı intestinal bariyer hasarını hafifletmesinin altında yatan mekanizma net değildir. Bu çalışma, AFB1'e maruz kalan ratlarda oral propolis takviyesinin koruyucu etkilerini araştırmak üzere tasarlanmıştır. Otuz iki adet erkek Sprague Dawley rat dört gruba ayrılmıştır: Kontrol (CON), Aflatoksin B1 (AFB1) (25 µg/kg/gün AFB1), Propolis (PRO) (250 mg/kg/gün propolis) ve Aflatoksin B1 + Propolis (AFB1 + PRO) (25 µg/kg/gün AFB1 + 250 mg/kg/gün propolis). Dört haftanın sonunda, serum glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT), malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD) ve toplam antioksidan kapasite (TAS) düzeyleri incelenmiş ve 16S rRNA sekanslama yoluyla bağırsak mikrobiyotası analiz edilmiştir. Buna göre, ratların GSH ve MDA düzeylerinin gruplar arasında istatistiksel olarak farklı olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). AFB1 grubunda GSH-Px düzeyinin KON grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ($p=0,030$), propolis verilen gruplarda (PRO ve AFB1+PRO) ise anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Deney gruplarında SOD ve CAT düzeyleri incelendiğinde AFB1 grubunun en düşük enzim aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır (sırasıyla $p=0,039$ ve $p=0,059$). Propolis verilen gruplarda CAT düzeyi KON grubuna kıyasla azalma eğilimi göstermiştir, ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). PRO grubunun TAS düzeyi KON ve AFB1 gruplarından anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p=0,043$). Bray-Curtis benzeşmezlik indeksine göre, KON ve AFB1+PRO gruplarındaki ratlarda bakteriyel topluluklarının, AFB1 ve PRO gruplarındaki ratlara göre birbirine daha benzer olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, alfa çeşitlilik analizi PRO grubunda bakteriyel topluluk çeşitliliğinin diğer gruplara göre daha fazla olduğunu ortaya koymuştur. Ratların dışkı örneklerinde toplamda on bakteri filumu tespit edilmiştir. Bu filumlar arasında *Firmicutes*, *Bacteroidetes* ve *Proteobacteria* deney gruplarında en bol bulunan filumlardır. *Firmicutes* bolluğu PRO grubunda KON grubundan önemli ölçüde yüksek bulunmuştur, sırasıyla bakteri bolluğunun yaklaşık %73,51 ve %71,01'ini oluşturmaktadır. Deney gruplarında *Bacteroidetes* ve *Proteobacteria* bollukları benzer bulunmuştur. Aynı zamanda, propolis takviyesi *Lactobacillus*, *Roseburia* ve *Phascolarctobacterium* göreceli bolluklarındaki azalmayı önleyerek bağırsak mikrobiyotasını yeniden yapılandırmıştır. Sonuç olarak, propolis takviyesinin AFB1'e maruz kalan ratlarda oksidatif stresi hafifletici etki göstererek, bağırsak mikrobiyotasının modülasyonuna katkı sağladığı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Aflatoksin B1; Bağırsak bariyer hasarı; Bağırsak mikrobiyotası; Oksidatif stres; Propolis

EFFECTS OF PROPOLIS SUPPLEMENT ON OXIDATIVE STRESS AND GUT MICROBIOTA IN RATS EXPERIMENTALLY EXPOSED TO AFLATOXIN B1

Sevtap KABALI

Erciyes University, Graduate School of Healthy Sciences Department of Nutrition and Dietetics P.h.D. Thesis, December 2024

Supervisors: Asst. Prof. Neslihan ÖNER, Assoc. Prof. Mehtap ÜNLÜ SÖĞÜT

ABSTRACT

Aflatoxin B1 (AFB1) occurs under unfavorable conditions in foods commonly consumed by humans and animals, causing adverse health effects. Propolis, which has strong antioxidant activity, can reduce oxidative stress and modulate gut microbiota composition. However, the underlying mechanism by which propolis attenuates AFB1-induced intestinal barrier damage is not clear. This study was designed to investigate the protective effects of oral propolis supplementation in AFB1-exposed rats. Thirty-two male Sprague Dawley rats were divided into four groups: Control (CON), Aflatoxin B1 (AFB1) (25 µg/kg/day AFB1), Propolis (PRO) (250 mg/kg/day propolis) and Aflatoxin B1 + Propolis (AFB1 + PRO) (25 µg/kg/day AFB1 + 250 mg/kg/day propolis). At the end of four weeks, serum glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and total antioxidant capacity (TAS) levels were examined and intestinal microbiota was analyzed by 16S rRNA sequencing. Accordingly, GSH and MDA levels of rats were not statistically different between the groups ($p>0.05$). In the AFB1 group, GSH-Px level was significantly decreased compared to the CON group ($p=0.030$), while there was no significant change in the propolis groups (PRO and AFB1+PRO) ($p>0.05$). When SOD and CAT levels were analyzed in the experimental groups, it was found that AFB1 group had the lowest enzyme activity ($p=0.039$ and $p=0.059$, respectively). CAT level showed a tendency to decrease in the propolis-treated groups compared to the CON group, but this decrease was not statistically significant ($p>0.05$). TAS level of the PRO group was found to be significantly higher than the KON and AFB1 groups ($p=0.043$). According to the Bray-Curtis dissimilarity index, the bacterial communities in the KON and AFB1+PRO groups were more similar to each other than in the AFB1 and PRO groups. However, alpha diversity analysis revealed that bacterial community diversity was higher in the PRO group than in the other groups. A total of ten bacterial phyla were detected in the fecal samples of the rats. Among these phyla, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *Proteobacteria* were the most abundant phyla in the experimental groups. Firmicutes abundance was significantly higher in the PRO group than in the CON group, accounting for approximately 73.51% and 71.01% of the bacterial abundance, respectively. *Bacteroidetes* and *Proteobacteria* abundances were similar in the experimental groups. At the same time, propolis supplementation restored the gut microbiota by preventing the decrease in the relative abundances of *Lactobacillus*, *Roseburia* and *Phascolarctobacterium*. In conclusion, propolis supplementation may contribute to the modulation of gut microbiota by alleviating oxidative stress in AFB1-exposed rats.

Keywords: Aflatoxin B1; Gut microbiota; Intestinal barrier damage; Oxidative stress; Propolis

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Mikotoksinler	4
2.2. Aflatoksinler.....	7
2.3. Aflatoksin B1	9
2.3.1. Aflatoksin B1'in Kimyasal Yapısı ve Metabolizması.....	9
2.3.2. Aflatoksin B1'in Sağlık Üzerine Etkileri	10
2.3.2.1. Aflatoksin B1'in Karaciğer Üzerine Etkileri.....	12
2.3.2.2. Aflatoksin B1'in Böbrek Üzerine Etkileri.....	12
2.3.2.3. Aflatoksin B1'in Gastrointestinal Sistem ve Bağırsak Mikrobiyotası Üzerine Etkileri	13
2.3.2.4. Aflatoksin B1'in Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkileri	14
2.4. Oksidatif Stres	14
2.4.1.Serbest Radikallerin Özellikleri ve Kaynakları.....	15
2.4.2. Serbest Radikallerin Neden Olduğu Hasarlar.....	16
2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri	17
2.5.1. Enzimatik Antioksidanlar	18

2.5.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	18
2.5.3. Doğal Antioksidanlar.....	19
2.5.4. Propolisin Yapısı ve Özellikleri	20
2.5.4.1. Propolisin Sağlık Üzerine Etkileri	21
2.5.4.1.1. Propolisin Bağırsak Mikrobiyotasına Etkileri ..	22
2.5.4.2. Propolisin Aflatoksin B1 Detoksifikasyonundaki Rolü ..	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Çalışmanın Yeri, Zamanı ve Örneklem Seçimi	25
3.2. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı	25
3.3. Çalışma protokolü	26
3.3.1. Aflatoksin B1 Uygulaması	27
3.3.2. Propolis Ekstraksiyonu	27
3.3.3. Gaita Numunelerinin Toplanması	28
3.3.4. Ötenazi ve Dokuların Alınması	29
3.4. Kimyasallar ve Analiz Kitleri	29
3.5. Biyokimyasal Analizler	30
3.6. Bağırsak Mikrobiyotasının Analizi	30
3.6.1. Bakteriyel DNA İzolasyonu	31
3.6.2. Numune Kalite Kontrolü	31
3.6.3. Kütüphane Hazırlığı	31
3.6.4. Yeni Nesil Dizileme	32
3.6.5. Taksonomik Sınıflandırma ve Veri Analizi	32
3.6.6. Biyoinformatik Analiz	33
3.7. İstatistiksel Analizler	34
4. BULGULAR	35
4.1. Ratlarda Vücut Ağırlığı Değişimi ile İlgili Bulgular.....	35
4.2. Biyokimyasal Bulgular.....	37
4.3. Mikrobiyota Analizi	39

5.TARTIŞMA	55
5.1.Ratlarda Vücut Ağırlığı Değişimi ile İlgili Bulguların Değerlendirilmesi ...	56
5.2.Biyokimyasal Bulguların Değerlendirilmesi.....	58
5.3.Mikrobiyota Analizi ile İlgili Bulguların Değerlendirilmesi	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
7.KAYNAKLAR	75
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	



KISALTMALAR ve SİMGELER

µL	: Mikrolitre
16S rRNA	: 16S ribozomal RNA
8-OHdG	: 8-Hidroksi-2-deoksiguanozin
AFB1	: Aflatoksin B1
AFBO	: AFB1-8,9 epoksit
AFM1	: Aflatoksin M1
AFP1	: Aflatoksin P1
AFQ1	: Aflatoksin Q1
ALP	: Alkalın fosfataz
ANOVA	: Tek yönlü varyans analizi
ARE	: Antioksidan cevap elemanı
AST	: Aspartat amino transferaz
ATA	: Alimentary Toxic Aleukia
Bax	: Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	: B hücreli lenfoma 2
BHA	: Bütilhidroksianisol
BHT	: Bütilhidroksitoluen
BKİ	: Beden kütle indeksi
Caco-2	: Kolon kanser hücre hattı
CAT	: Katalaz
cm	: Santimetre
CYP450	: Sitokrom P450
Cyt-c	: Sitokrom c oksidaz
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DON	: Deoksinivalenol
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority)
ELISA	: Enzim bağlı immünosorbent analizi
ER	: Endoplazmik retikulum
ETS	: Elektron taşıma sistemi

FADD	: Fas ile ilişkili ölüm alanı proteini
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)
FAS	: Hücre ölüm reseptörü
FasL	: Fas ligandı
FB1	: Fumonisin 1
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
g	: Gram
GGT	: Gama-glutamil transferaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GST	: Glutasyon-S-transferaz
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HCC	: Hepatosellüler karsinoma
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (International Agency for Research on Cancer)
kg	: Kilogram
L	: Litre
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi
LD50	: Letal doz
LEfSe	: Doğrusal diskriminant analizi etki boyutu
LPS	: Lipopolisakkarit
LOOH	: Yüksek lipofilik peroksitler
Mcg	: Mikrogram
MDA	: Malondialdehit
mL	: Mililitre
NF-κB	: Nükleer faktör-kappa B
Ng	: Nanogram
Nrf2	: Nükleer faktör eritroid 2
OTA	: Okratoksin A
OTU	: Operasyonel taksonomik birim

PAT	: Patulin
PCA	: Temel bileşenler analizi (Principal component analysis)
PCoA	: Temel koordinat analizi (Principal coordinate analysis)
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PPARγ	: Peroksizom Proliferatör Aktive Edici Reseptör Gama
Ppb	: Milyarda bir
Ppm	: Milyonda bir
RASFF	: Gıda ve Yem için Hızlı Alarm Sistemi (Rapid Alert System for Food and Feed)
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAS	: Toplam antioksidan kapasite
TBHQ	: Terbütilhidrokinon
TLR4	: Toll benzeri reseptör 4
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
ZEA	: Zearalenon

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Mikotoksin türleri, kontamine olduğu besinler ve sağlığa zararları.....	6
Tablo 3.1. Standart pelet yemin bileşimi.....	26
Tablo 3.2. Alfa ve beta çeşitlilik indekslerinin kullanım amaçları.....	34
Tablo 4.1. Deney gruplarının başlangıç ve son vücut ağırlığı ortalamaları	35
Tablo 4.2. Deney gruplarının ortalama vücut ağırlıkları, vücut ağırlığı kazanımları ve BKİ değerlerinin karşılaştırılması	36
Tablo 4.3. Deney gruplarının serumlarında çeşitli oksidatif stres parametreleri düzeylerinin karşılaştırılması	38
Tablo 5.1. Ratlarda antioksidan uygulamalarının AFB1 toksisitesi üzerindeki etkilerini gösteren çalışmalar	62

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Aflatoksinlerin kimyasal formülleri	8
Şekil 2.2.	AFB1'in toksisite mekanizması.	11
Şekil 2.3.	Mitokondriyal elektron transport sistemindeki ROS oluşumu	16
Şekil 2.4.	Antioksidanların sınıflandırılması	17
Şekil 2.5.	Propolisin kimyasal bileşimi (%)	21
Şekil 2.6.	Propolisin biyolojik ve terapötik özellikleri.....	22
Şekil 3.1.	Çalışma planı.....	27
Şekil 3.2.	Oral gavaj ile AFB1 uygulaması (b) ve propolis uygulaması (a).	28
Şekil 3.3.	Derin anestezi sonrası kardiyak ponksiyon ile kan alınması (a) ve ileum dokusunun diseksiyonu (b).....	29
Şekil 3.4.	ELISA testi aşamaları ve kullanılan malzemeler (ELISA test solüsyonları ve mikropalak	30
Şekil 4.1.	Deney gruplarının ortalama vücut ağırlıkları (a) ve haftalık vücut ağırlığı değişimleri (b).	37
Şekil 4.2.	Deney gruplarının bakteriyel taksonomik OTU ağacı. Taksonlar dıştan içe doğru sıralanmıştır. Takson halkalarının büyüklüğü baskın türlere ait göreceli bolluğu göstermektedir. OTU ağacındaki farklı renkler farklı filumları temsil etmektedir.	40
Şekil 4.3.	Deney gruplarının alfa çeşitlilik indeksleri	42
Şekil 4.4.	Beta çeşitlilik ağırlıklı Unifrac uzaklık matriksi	43
Şekil 4.5.	Ağırlıksız Unifrac uzaklıklarına dayalı olarak deney gruplarından alınan bağırsak mikrobiyotasının temel koordinat analizi (PCoA). PC1 ve PC2 tarafından açıklanan varyasyon yüzdesi eksenlerde belirtilmiştir. Gruplar renklerle ayırt edilmiştir. Her bir renkli sembol tek bir örneğe karşılık gelmektedir.....	44
Şekil 4.6.	Ağırlıklı Unifrac uzaklıklarına dayalı olarak deney gruplarından alınan bağırsak mikrobiyotasının temel koordinat analizi (PCoA). PC1 ve PC2 tarafından açıklanan varyasyon yüzdesi eksenlerde belirtilmiştir. Gruplar renklerle ayırt edilmiştir. Her bir renkli sembol tek bir örneğe karşılık gelmektedir.....	44

Şekil 4.7.	Bray-Curtis benzeşmezlik indeksine dayalı olarak deney gruplarından alınan bağırsak mikrobiyotasının temel koordinat analizi (PCoA). AFB1 ve PRO uygulamasına göre örneklerde bir kümelenme gözlenmiştir. PC1 ve PC2 tarafından açıklanan varyasyon yüzdesi eksenlerde belirtilmiştir. Gruplar renklerle ayırt edilmiştir. Her bir renkli sembol tek bir örneğe karşılık gelmektedir.....	45
Şekil 4.8.	Operasyonel taksonomik birimleri (OTU) temsil eden Venn diyagramı.	46
Şekil 4.9.	Deney gruplarına göre bağırsak mikrobiyotasının filum düzeyindeki göreceli bollukları.	47
Şekil 4.10.	Deney gruplarına göre bağırsak mikrobiyotasının filum düzeyindeki göreceli bolluklarının ısı haritası.	47
Şekil 4.11.	Deney gruplarına göre bağırsak mikrobiyotasının sınıf düzeyindeki göreceli bollukları.	48
Şekil 4.12.	Deney gruplarına göre bağırsak mikrobiyotasının takım düzeyindeki göreceli bollukları.	49
Şekil 4.13.	Deney gruplarına göre bağırsak mikrobiyotasının aile düzeyindeki göreceli bollukları.	50
Şekil 4.14.	Deney gruplarına göre bağırsak mikrobiyotasının cins düzeyindeki göreceli bollukları.	51
Şekil 4.15.	Deney gruplarına göre bağırsak mikrobiyotasının tür düzeyindeki göreceli bollukları.	52
Şekil 4.16.	Bağırsak mikrobiyotası ve oksidatif stres parametreleri arasındaki ilişkinin ısı haritası. Veriler Pearson's korelasyon testi kullanılarak analiz edilmiştir, * $p < 0.05$	52
Şekil 4.17.	Deney gruplarında bağırsak mikrobiyotasının LEfSe sonuçlarının karşılaştırması.....	54

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikotoksinler, filamentli mantarlar veya küfler tarafından üretilen toksik sekonder metabolitlerdir ve "gelişmiş omurgalılara ve diğer hayvanlara doğal bir yolla düşük konsantrasyonda verildiğinde toksik bir tepki uyandıran doğal ürünler" olarak tanımlanmaktadır (Bennett, 1987). Teknolojinin gelişmesi ile doğada yüzlerce mikotoksin keşfedilmiştir. Mikotoksinler arasında aflatoksin B1 (AFB1), deoksinivalenol (DON), zearalenon (ZEA), fumonisin B1 (FB1) ve okratoksin A (OTA) önemli etkileri ve yüksek tespit oranları nedeniyle en çok araştırılan mikotoksin türleri olmuştur (Pinotti ve ark., 2016). Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization, FAO) özellikle tahıllar ve sert kabuklu meyveler dahil olmak üzere dünya çapındaki tarımsal ürünlerin en az %25'inin mikotoksinlerle kontamine olduğunu tahminleri arasında belirtmiştir (Eskola ve ark., 2020).

AFB1, *Aspergillus spp.* mantar cinsinin özellikle *A. flavus*, *A. parasiticus* ve *A. nomius* türleri tarafından üretilen, sıcaklık ve nemin etkisi ile besinlerde ve yemlerde doğal olarak oluşan bir mikotoksindir (Ismail ve ark., 2018). Bu toksine uygun koşullarda hasat etme, taşıma ve depolama işlemleri uygulanmayan tahıllar, kuru baklagiller, sert kabuklu meyveler ve baharat türlerinde sıklıkla rastlanmaktadır (Canavar ve Kaynak, 2013; Wang ve ark., 2020).

Mikotoksinler arasında en toksik özelliğe sahip olan AFB1, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından insanlarda Grup IA kanserojen olarak kabul edilmektedir (WHO ve IARC, 1993). AFB1, başlıca hepatosellüler karsinoma ile ilişkilendirilmektedir (Zhou ve ark., 2019) ancak yapılan güncel çalışmalar AFB1'in biyoaktivasyonu ve potansiyel toksik etkilerinin gastrointestinal sistem gibi ekstra-hepatik dokularda da gerçekleştiğini ortaya koymuştur (Liew ve Mohd-Redzwan, 2018;

Xue ve ark., 2023). AFB1'e maruziyet sonucunda dokularda inflamatuvar yanıt ve oksidatif stres meydana gelmektedir (Limaye ve ark., 2018).

Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda AFB1 sitotoksikite mekanizmasının, hücre bütünlüğüne ve DNA hasarına neden olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşması ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Huang ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2015). Dolayısıyla bağışıklık sisteminin aktive olması, apoptozun indüklenmesi ve hücre proliferasyonu intestinal bariyer hasarına neden olmaktadır (Robert ve ark., 2017). AFB1 maruziyeti bağırsak disbiyozuna, faydalı bakterilerin azalması veya patojenik bakteri popülasyonunun artması sonucu bağırsak mikrobiyota kompozisyonunda değişikliğe sebep olabilir (Wang ve ark., 2015). Ancak, AFB1'in bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkisi ve oksidatif stres yolları ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Liew ve Mohd-Redzwan, 2018; Sui ve ark., 2022).

Önemli sağlık sorunlarına neden olan AFB1'in eliminasyonu ve inaktivasyonu için çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler geliştirilmiştir (Nazhand ve ark., 2020). Geliştirilen yöntemlerin yüksek maliyetli olması, besinin organoleptik özelliklerine zarar vermesi, kabul edilebilirliğinin düşük olması ve besin ögesi kaybına neden olması gibi nedenlerden dolayı AFB1'in detoksifikasyonunda etkili ve yenilikçi yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (Kabak ve ark., 2006).

Doğal biyoaktif maddeler arasında yer alan ve bal arıları tarafından üretilen propolis, AFB1'i detoksifiye etmek için umut verici bir yöntem olabilir (Mahmoodzadeh-Hosseini ve ark., 2020). Dahası, propolisin *Aspegillus spp.* mantarının üremesini ve aflatoksin biyosentezinde görev alan genlerin ekspresyonunu inhibe ederek besinlerden aflatoksin kontaminasyonunu önlediği çalışmalarda gösterilmiştir (Hamzeh-Pour ve ark., 2020; Hassanien ve ark., 2021; Ventura-Aguilar ve ark., 2022).

Propolis 300'den fazla polifenol, monoterpen, amino asit, steroid, fenolik aldehit ve diğer inorganik bileşikler yapılarında bulundurmaktadır (Zeighampour ve ark., 2014). Bu fenolik bileşiklerin etki mekanizmasının serbest radikalleri inhibe ederek güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Bae ve ark., 2022; Tsamesidis ve ark., 2022). Bununla birlikte, propolisin oksidatif strese karşı koruyucu ve bağırsak mikrobiyota kompozisyonunu düzenleyici etkilerini araştırmaya yönelik bazı araştırmalar yapılmıştır (Chien ve ark., 2023; Okamura ve ark., 2022).

Dekstran sülfat sodyum ile indüklenen oksidatif stres modelinde propolisin antioksidan enzimlerin aktivitesini, toplam antioksidan kapasiteyi, bağırsak mikrobiyotası çeşitliliğini ve zenginliğini arttırdığı belirlenmiştir (Wang ve ark., 2018). Ratlarda yapılan benzer bir çalışmada propolis takviyesinin bağırsak mikrobiyota kompozisyonunu iyileştirdiği ve intestinal bariyerde bulunan sıkı bağlantı (tight junction) proteinlerinin düzeyini arttırdığı saptanmıştır (Xue ve ark., 2019).

Propolisin bağırsak mikrobiyomunu modüle ettiği ve oksidatif hasarı azalttığı araştırılmasına rağmen AFB1 maruziyetinin verdiği bağırsak hasarını önlenmesi konusunda bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte, AFB1'in neden olduğu disbiyoz ve bağırsak dokusundaki oksidatif hasar durumunda uygulanan propolis takviyesine ilişkin herhangi bir çalışma olmaması literatürdeki eksiklikler arasındadır. Aynı zamanda, düşük doz AFB1 uygulamasının etkilerini araştıran çalışmalar sınırlı düzeydedir.

Yapılan bu çalışmada ilk kez düşük doz AFB1 uygulaması sonucu propolis takviyesinin koruyucu etkisi kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Bu çalışmanın amacı, AFB1'e maruz kalan ratlarda propolis takviyesinin oksidatif stres ve bağırsak mikrobiyota kompozisyonuna etkilerinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinler

Besinler ve tarımsal ürünler mikrobiyal üreme için elverişli bir ortama sahiptir. Bu nedenle küresel olarak mikrobiyal kontaminasyon önemli bir sorun haline gelmiştir. Toprak mahsulleri, yemler ve diğer besinlerin hasat öncesi, hasat sonrası ve depolama gibi aşamalarda uygun koşullarda işlenmemesi nedeniyle, bu ürünler mikrobiyal üreme açısından yatkın hale gelmektedir. *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium* gibi fırsatçı mantar türleri uygun çevresel koşullar altında hızla çoğalmaktadır ve “mikotoksin” adı verilen sekonder metabolitleri üretmektedir. Mikotoksin kelimesi mantar anlamına gelen “mykes” veya “mukos” ile zehirlenme anlamına gelen “toxikon” veya “poison” ifadelerinden türetilmiştir. Mikotoksinler, zehirli metabolitler olup insan ve hayvan sağlığı için karsinogenik, teratojenik ve mutajenik gibi çeşitli toksik etkilere neden olmaktadır (Pitt, 2013).

Gıda güvenliği ve sağlık açısından önemli tehdit oluşturan mikotoksinlerin oluşumunda kimyasal, fiziksel ve biyolojik faktörler etkilidir. Hasat öncesi bitkiye uygulanan gübreleme ve ilaçlama işlemleri, mantarın substrat kaynağı, karbondioksit ve oksijen miktarı kimyasal faktörler arasındadır. Besinin su aktivitesi, ortamın nem oranı, sıcaklık ve besinin mekanik özellikleri gibi etkenler fiziksel faktörlere örnek olarak verilebilir. Bunun yanı sıra mikotoksin üreten mantar sayısı, mantarların genetik yapısı ve üreme yeteneği, bitki veya besinin dayanıklılığı mikotoksin üretimini biyolojik olarak etkilemektedir (Tiryaki ve ark., 2011).

Teknolojik gelişmeler ve ileri analiz teknikleri sayesinde doğada insan ve hayvanlar üzerinde toksik etkiye sahip 500’den fazla mikotoksin keşfedilmiştir (Dey ve ark., 2022). Tarih boyunca “mikotoksikozis” vakaları görülse de kayıtlara giren ilk mikotoksin vakası II. Dünya Savaşı sırasında Rusya’da görülen “Alimentary Toxic Aleukia (ATA)” dır. ATA, kanda lökosit sayısının azalması sonucu görülen lösemi

olarak tanımlanmaktadır. Savaşın etkisiyle hasadı uygun zamanda ve koşullarda yapılmayan mısırların *Fusarium*, *Mucor* ve *Penicillium* gibi küfler ve metabolitleri ile kontamine olduğu belirtilmektedir. Kontamine olan bu mısırların ekmek yapımında kullanılması ile birlikte ATA vakalarına yol açtığı bildirilmiştir (Lu ve ark., 2023). Benzer şekilde Bosna Hersek, Bulgaristan, Romanya, Yugoslavya, Hırvatistan, Sırbistan ve Slovenya’da OTA ile kontamine tahılların tüketimine bağlı olarak “Balkan Endemik Nefropatisi” vakaları görülmüştür. Bu derecede ölümcül sonuçlara neden olan mikotoksikozis vakalarına rağmen mikotoksinler ile ilgili ilk bilimsel çalışmalar 1960’larda yapılmıştır (Abouzied ve ark., 2002).

Besinlerde ve yemlerde sıklıkla karşılaşılan mikotoksinler aflatoksin türleri, OTA, DON, ZEA, FB1 ve patulindir (PAT). İklim değişikliğine bağlı olarak gelişen yüksek sıcaklıklara ve kuraklığa karşı dayanıklı olan mikotoksinler başta tahıllar olmak üzere kuru meyveler, sert kabuklu meyveler, kuru baklagiller, baharat türleri, kahve ve kakao gibi besinlerde bulunabilmektedir. Aynı zamanda hayvanların mikotoksinler ile kontamine yemleri tüketmesi sonucu et, süt ve yumurtada mikotoksinlere rastlanmaktadır (Çelik, 2022).

Doğada çok sayıda türü bulunan mikotoksinler, düşük dozlarda bile önemli sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Kontamine besinler veya yemlerin tüketimi sonucu mikotoksinler canlı tarafından sindirildiğinde akut veya kronik hastalıklara neden olabilmektedir. Mikotoksinlerin kanser türleri, karaciğer ve böbrek hastalıkları, bağışıklık sisteminin baskılanması, nörolojik bozukluklar, hemorajik sendromlar, sitotoksisite, genotoksisite ve birçok teratojenik semptomlar ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Yang ve ark., 2020). Tablo 2.1’de bazı mikotoksin türleri, kontaminasyon kaynakları ve olası sağlık etkileri verilmiştir.

Tablo 2.1. Mikotoksin türleri, kontamine olduğu besinler ve sağlığa zararları

Mikotoksin türleri	Kontamine olan besinler	Sağlığa zararları	Kaynak
AFB1	Buğday, mısır, yulaf, arpa, pirinç	Kanser, bağışıklık sisteminin baskılanması, oksidatif stres ve büyümede gerilik	(McMillan et al., 2018)
ZEA	Buğday, mısır, yulaf, arpa, pirinç	Erken ergenlik, meme kanseri	(Wan et al., 2021)
FB1	Mısır, üzüm	Teratojenik, nefrotoksik ve hepatotoksik	(T. Wang et al., 2022)
OTA	Tahıllar, kabuklu yemişler, kuru meyveler, kahve, kakao	Nefrotoksik (böbrek tümörleri), karsinojenik	(L. Wang et al., 2022)
DON	Buğday, mısır, yulaf, arpa, pirinç	Protein sentezinin inhibisyonu, inflamatuvar yanıt, kusma, abdominal ağrı, diyare, baş ağrısı, bağışıklık sisteminin baskılanması	(Sumarah, 2022)
PAT	Meyveler (elma), silajlar	İntestinal bariyer fonksiyonunun bozulması, fizyolojik işlevlerin baskılanması	(Q. Zhai et al., 2019)

Kısaltmalar: AFB1, Aflatoksin B1, DON, Deoksinivalenol, OTA, Okratoksin A, PAT, Patulin, ZEA, Zearalenon.

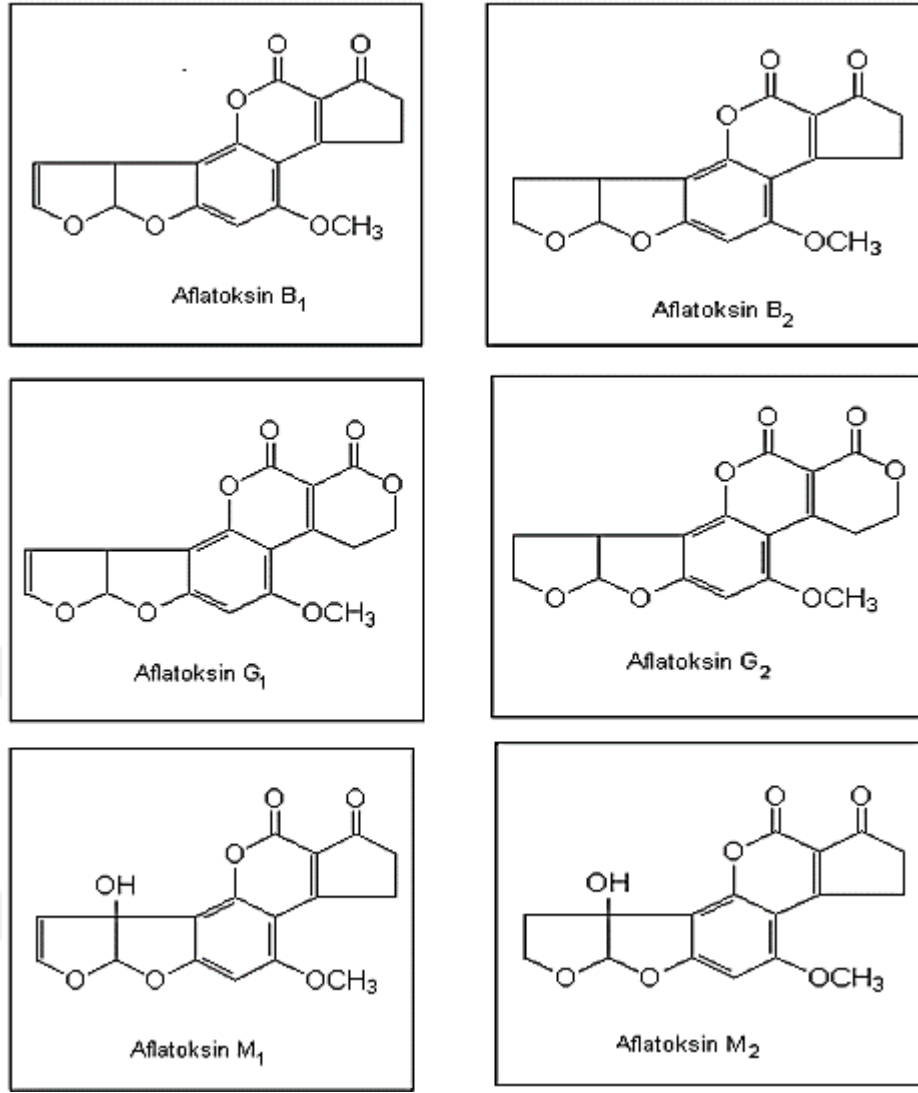
Besin ve yem örneklerinde mikotoksin varlığı ve türünün araştırıldığı BIOMIN Dünya Mikotoksin Çalışması 2020 sonuçlarına göre, 59 ülkeden toplanan örneklerin %67'sinde mikotoksine rastlanmıştır (BIOMIN, 2020). Aynı yöntemler kullanılarak 2021'de tekrarlanan çalışma sonuçlarında bu oran %65 olarak açıklanmıştır. Asya bölgesi her iki çalışmada da mikotoksin kontaminasyonunun en yoğun olduğu bölge olarak rapor edilmiştir. Asya bölgesinde karşılaşılan mikotoksinlerin başında ise AFB1 (%92) gelmektedir. Bununla birlikte, mikotoksin görülme oranı en düşük olan bölge %24 ile Kuzey Avrupa olarak belirlenmiştir (BIOMIN, 2021).

Benzer şekilde besinlerde veya yemlerde sağlığa yönelik risk durumunda o ürünlerin geri toplatılması, alıkonulması ve dağıtımının durdurulması gibi aksiyonları yerine getiren Gıda ve Yem için Hızlı Alarm Sistemi (Rapid Alert System for Food and Feed-RASFF), mikotoksinleri ilk 10 tehlike arasında değerlendirmektedir. RASFF raporlarında aflatoksinlerin besinlerde en yaygın görülen mikotoksin türü olduğuna yer verilmiştir (Agriopoulou ve ark., 2020).

2.2. Aflatoksinler

Aflatoksinler *A. flavus*, *A. nomius* ve *A. parasiticus* mantarları tarafından üretilen ve en toksik metabolit grubunda yer alan mikotoksin türüdür (Nodoushan ve ark., 2019). Tarihteki ilk aflatoksikoz vakası 1960 yılında İngiltere’de bir hindi çiftliğinde görülmüştür. Burada, 100.000’den fazla hindinin aflatoksin ile kontamine yemleri tüketilmesi sonucu karaciğer nekrozu ve intestinal inflamasyona bağlı olarak öldüğü bildirilmiştir (Bullerman, 1979). Aflatoksinler su aktivitesi 0,98-0,99, sıcaklığı 12-42°C ve pH’ı 3,5-8,0 arasında olan ortamlarda üreyebilmektedir. Aflatoksin açısından başlıca riskli besinler; tahıl ürünleri (buğday, arpa, yulaf, mısır vb.), kuru baklagiller, sert kabuklu meyveler (yer fıstığı, fındık, ceviz, badem, Antep fıstığı vb.), kuru meyveler (kuru incir, kuru kayısı, kuru üzüm vb.), baharat çeşitleri, süt ve ürünleridir (Erginkaya ve Kabak, 2010).

Doğada aflatoksinlerin yaklaşık 18 çeşidi bulunmaktadır. Bunlardan Aflatoksin B1, B2, M1, M2, G1 ve G2 en yaygın olanlarıdır. Aflatoksin ifadesinin yanında yer alan “1” ifadesi majör grubu, “2” ifadesi ise minör grubu temsil etmektedir. Harflendirmeler ise aflatoksinlerin ultraviyole ışık altındaki görüntülerine göre belirlenmiştir. Aflatoksin B1 ve B2 türlerinin ultraviyole ışık altında mavi (blue) görünmesi, G1 ve G2 türlerinin yeşil (green) görünmesi, M1 ve M2 türlerinin süt ürünlerinde bulunması nedeniyle süt (milk) aflatoksini olarak adlandırılmaktadır (Adeyeye, 2016). Şekil 2.1’de aflatoksinlerin kimyasal formülü verilmiştir.



Şekil 2.1. Aflatoksinlerin kimyasal formülleri (Özkaya ve Temiz, 2003).

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO), Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA), Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority, EFSA) ve Avrupa Birliği Komisyonu (European Commission) aflatoksinlerin besinlerde bulunabilecek üst limitlerine dikkat çekmiştir (European Commission, 1881). Aynı şekilde Türkiye’de Tarım ve Orman Bakanlığı’nın Türk Gıda Kodeksi Gıdalarda Bulaşanların Maksimum Limitleri Yönetmeliği’nde riskli besinlerde aflatoksin üst limitleri belirlenmiştir. Avrupa Komisyonu ve Türk Gıda Kodeksi’ne göre aflatoksinlerin en yaygın olduğu tahıl ve ürünlerinde AFB1 miktarı maksimum 2 mcg/kg; AFB1+AFB2+AFG1+AFG2 miktarı maksimum 4 mcg/kg olarak sınırlandırılmıştır (Türk Gıda Kodeksi, 2011).

2.3. Aflatoksin B1

Aflatoksinler arasında en güçlü kanserojen olan AFB1 insan beslenmesinde kullanılan çeşitli tarım ürünlerine kontamine olmaktadır (Matsuda ve ark., 2013). Besinlerdeki AFB1 miktarları 1 mcg/kg (1 ppb) ile 12.000 mcg/kg (12 ppm) arasında değişebilir. Gelişmekte olan ülkelerde yaşayan bireylerin besinlerde 0,03 ila 0,45 mg/kg (30-450 ppb) aralığında AFB1'e maruz kaldıkları bildirilmiştir (Wang ve ark., 2016a). Bununla birlikte, Kenya'da birçok insanı öldüren bir aflatoksikoz salgınında, AFB1'e maruz kalma, günde kişi başına neredeyse 50 mg'dan fazla bulunmuştur (Probst ve ark., 2007). RASFF'nin 2009-2018 yılları arasında Türkiye menşeli bildirimlerinin yaklaşık yarısını mikotoksinler oluşturmaktadır. Bu yıllarda toplam 1236 aflatoksin bildirimi yapılmıştır. En yüksek aflatoksin tespiti 2009 yılında (174 bildirim), en düşük tespit ise 2014 yılında (87 bildirim) yapılmıştır (Masatcioğlu ve Mustafa, 2023). RASFF'nin 2022 Türkiye menşeli ürün bildirimlerinde 46'sı kuru incirde ve 24'ü Antep fıstığında olmak üzere toplamda 70 aflatoksin bildirimi yapılmıştır (European Commission, 2023).

2.3.1. Aflatoksin B1'in Kimyasal Yapısı ve Metabolizması

AFB1, furofuran ve lakton halkalarından oluşmaktadır. DNA ve proteinlerin furfuran halkası ile etkileşime girdiğinde biyokimyasal yapılarında bozulmalar olduğu belirtilmektedir. Kumarin parçasında yer alan lakton halkası ise alkalilere karşı hassas bir yapıya sahiptir ve kolaylıkla hidrolize olmaktadır. AFB1 suda çözünmezken, alkol ve kloroform gibi çözücülerde çözünmektedir. AFB1'in aktivite gösterebilmesi için uygun pH aralığı 3-10'dur. Optimum pH'ı dışında AFB1 stabil özellik göstermemektedir. Ultraviyole ışık altında parçalanabilen AFB1, 100°C gibi yüksek sıcaklıklara karşı dirençli bir yapıya sahiptir. Dolayısıyla besinlere uygulanan düşük sıcaklıktaki pişirme yöntemleri ve pastörizasyon işlemleri toksinin elimine edilmesinde yetersiz kalmaktadır (Karatekeli, 2021).

AFB1 direkt olarak karsinojenik etkiye sahiptir ve metabolizma üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkilere neden olmaktadır. Ağız yoluyla alınan AFB1'in metabolizması oldukça karmaşıktır. Esas olarak alınan AFB1'in yaklaşık yarısı pasif difüzyon yoluyla duodenumdan emilmektedir. Emilmeyen AFB1 ise fekal yolla vücuttan atılmaktadır (Lin ve ark., 2012). Bağırsaklardan emilen AFB1, portal ven aracılığıyla karaciğere

taşınmaktadır. Buradan başta böbrekler olmak üzere mezenterik ven ile diğer dokulara dağıtılmaktadır (Cao ve ark., 2022).

Karaciğere ulaşan AFB1, sitokrom P450 (CYP450) enzimleri tarafından biyotransformasyona uğramaktadır. CYP450 enzimlerinin yanı sıra alkol dehidrojenazlar, aldehit redüktazlar, epoksit-hidrolazlar ve keton redüktazlar AFB1 metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. Bu enzimlerin gerçekleştirdiği reaksiyonlar sonunda AFM1, aflatoksin Q1 (AFQ1), aflatoksin P1 (AFP1) ve AFB1-8,9 epoksit (AFBO) gibi metabolitler oluşmaktadır. Biyotransformasyon yoluyla oluşan ara ürünler dışkı, idrar, meni, süt, yumurta ve safra ile vücuttan atılmaktadır. AFB1 metabolitlerinin kalan kısmı ise özellikle AFBO, glutatyon (GSH) ile konjugasyon oluşturarak detoksifiye olmaktadır veya DNA ve protein yapılarına zarar vererek karsinojenik etki göstermektedir (Cao ve ark., 2022; Karatekeli, 2021).

2.3.2. Aflatoksin B1'in Sağlık Üzerine Etkileri

AFB1'in toksik etkileri alım miktarına ve maruziyet süresine bağlı olarak değişmektedir. AFB1'in ölümcül dozu (LD50) insanlarda ve hayvanlarda farklıdır. Orta ve yüksek miktarda AFB1 alımına bağlı olarak gelişen akut aflatoksikozis durumunda kusma, kanlı ishal, öksürük, ödem, akut karaciğer hasarı, anemi, iştahsızlık, ciltte sararma, abortus ve hatta ölüm görülebilir. Orta veya düşük miktarda uzun süre AFB1 maruziyeti kronik komplikasyonlara neden olabilir. Kronik aflatoksikozis büyümede gerilik, karaciğer enzimlerinin aktivitelerinin artması, konjenital bozukluklar, bağışıklık sisteminin baskılanması, DNA hasarı ve çeşitli mutasyonlara yol açabilir (Benkerroum, 2020).

AFB1 potansiyel bir karsinojendir ve Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (International Agency for Research on Cancer, IARC) tarafından insanlar üzerinde grup 1A karsinojen olarak sınıflandırılmaktadır. Zehirlenme türüne bağlı olarak dokularda ve organlarda (karaciğer, böbrek, dalak, pankreas, testis, ovaryum vb.) hasarlar ortaya çıkabilir ve hastalıklara neden olabilir. Vücuda alınan AFB1'in toksik etki mekanizması oldukça karmaşıktır (Hua ve ark., 2021). AFB1 maruziyetinden sonra CYP450 enzimi AFB1'i ROS ve AFBO'ya dönüştürmektedir. Oluşan ROS mitokondriyal hasara, endoplazmik retikulum (ER) stresine ve DNA hasarına neden olabilmektedir. Mitokondriyal disfonksiyon sonucunda sitoplazmaya sitokrom c oksidaz (Cyt-c)

toksik etkilere neden olabilmektedir. Bu durumda AFBO ve ROS üretiminin inhibe edilmesi veya vücuttan atılması AFB1'in zararlı etkilerinin önlenmesi açısından oldukça önemlidir (Wang ve ark., 2022).

2.3.2.1. Aflatoksin B1'in Karaciğer Üzerine Etkileri

AFB1 başlıca biyotransformasyonunun gerçekleştiği karaciğeri doğrudan etkilemektedir. Karaciğer dokusunda meydana gelen oksidatif stres ve detoksifiye işlemleri karaciğer enzimlerinin yükselmesine neden olmaktadır. Aflatoksikozis alkalın fosfataz (ALP), aspartat amino transferaz (AST), gama-glutamil transferaz (GGT) ve sorbitol dehidrogenaz (SDH) aktivitelerini arttırmaktadır (Coppock ve ark., 2012). Karaciğerde AFB1'in detoksifikasyonu sonucu oluşan AFBO, AFB1 guanin eklentilerini oluşturan DNA'ya ve AFB1-albumin ve diğer protein eklentilerini oluşturan proteine kovalent olarak bağlanabilir. Hepatik DNA'da AFB1-guanin eklentilerinin oluşumu, AFB1'in hayvanlarda anahtar genlerde mutasyonlara neden olan kanserojen etkileri için kritik öneme sahiptir. Yüksek maruziyet sonucu incelenen karaciğer dokularında p53 geni ve kodon 249'da mutasyonlar gözlemlenmiştir. AFB1-guanin eklentileri ve karaciğer hasarına yol açan ROS oluşumu kanserojenik mekanizmalara zemin hazırlamaktadır. Böylece AFB1 maruziyeti hepatosellüler karsinoma (HCC) riskini arttırmaktadır (Wu ve Santella, 2012). Dünya genelinde AFB1'in HCC vakalarının %4,6-28,2'sinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Cao ve ark., 2022). Buna ek olarak, AFB1 ile kontamine olmuş besinlerin tüketimine bağlı olarak özellikle Hindistan, Afrika ve Güneydoğu Asya'da HCC insidansının arttığı belirlenmiştir (Manda ve ark., 2018).

2.3.2.2. Aflatoksin B1'in Böbrek Üzerine Etkileri

AFB1 ile kontamine besinlerin veya yemlerin tüketilmesi sonucu insanların ve hayvanların böbrek dokularında birikim meydana gelmektedir. Bu birikim böbrekte bazı patolojik ve fizyolojik değişikliklere neden olabilmektedir. Kümes hayvanları ile yapılan çalışmalarda AFB1 ile kontamine yemlerin verilmesi renal tübüler epitelyal hücre dejenerasyonuna, böbrek/vücut ağırlığı oranında artışa, glomerüler filtrasyon hızının azalmasına, renal tübülerden glukoz reabsorbsiyonunun azalmasına, idrarda sodyum ve potasyum atımında artışa neden olmuştur (Quezada ve ark., 2000; Tung ve ark., 1973; Wei ve ark., 2014). Nijeryalı çocuklar (Adelusola ve Oyelese, 1998) ve Sri

Lankalı kronik böbrek yetersizliği olan hastaların (Desalegn ve ark., 2011) böbrek otopsislerinde yüksek oranda AFB1 (%60) ve diğer mikotoksin (%93,5 OTA) türleri tespit edilmiştir. Bu kanıtlar ile böbreklerde AFB1 birikimi olduğu ve AFB1'in kronik böbrek hastalıklarına zemin hazırladığı vurgulanmaktadır. Ancak AFB1 maruziyeti ve renal disfonksiyon arasındaki ilişkiyi araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

2.3.2.3. Aflatoksin B1'in Gastrointestinal Sistem ve Bağırsak Mikrobiyotası Üzerine Etkileri

İntestinal sağlık bağırsak dokusunun yapısal bütünlüğü, bakteriyel çeşitliliği ve inflamatuvar durumu ile yakından ilişkilidir. Bağırsak mikrobiyotası besinlerin sindirimi, besin öğelerinin emilimi, metabolizması ve immünolojik fonksiyonlarında önemli bir role sahiptir (Fang ve ark., 2020). Patojenik bakteriler, virüsler, antibiyotikler, diyet bileşimi ve toksinler gibi birçok faktör bağırsak mikrobiyotasını değiştirebilir, konağın fizyokimyasal aktivitelerinin disfonksiyonuna ve hastalıklara neden olabilir. Dolayısıyla, intestinal fizyolojik fonksiyonların yönetimi konağın sağlığı ve gelişimi açısından oldukça önemlidir. Bağırsak mikrobiyotasının ekzojen stresörlere duyarlılığı göz önüne alındığında, bağırsak mikrobiyotasının disbiyozu ile ilgili araştırmalar, konağın sağlığını iyileştirmek için bir odak noktası haline gelmiştir (Bischoff, 2011; Qi ve ark., 2017).

AFB1, bağırsak mikrobiyotasını ve bağırsak aktivitesini değiştiren ekzojen faktörler arasında yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda bağırsak mikrobiyotasının AFB1 ve diğer mikotoksinlerin degradasyonunu ve transformasyonunu sağladığı bildirilmiştir. Bu nedenle, özellikle AFB1 bağırsak sağlığı ve bağırsak mikrobiyotası açısından önemli bir kaygı sebebi olarak addedilmektedir (Tao ve ark., 2023; Xue ve ark., 2023). Bağırsakta AFB1'in toksik etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılan *in vitro* bir çalışmada kolon kanser hücre hattı (Caco-2) kullanılmıştır. Buna göre, AFB1'in hücre büyümesini inhibe ettiği, laktat dehidrojenaz aktivitesini arttırdığı ve genetik hasara neden olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda AFB1 sitotoksikite mekanizmasının, hücre zarı ve DNA hasarına yol ROS oluşumu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Zhang ve ark., 2015).

AFB1'in bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkileri yoğun olarak araştırılmasına rağmen elde edilen veriler oldukça sınırlıdır. Bağırsak mikrobiyotası ve AFB1 etkileşiminin araştırıldığı bir çalışmada AFB1 maruziyeti sonunda filogenetik

çeşitliliğin azaldığı ancak mikrobiyota kompozisyonunun düzenlendiği saptanmıştır. Bununla birlikte, filum düzeyinde özellikle laktik asit bakterilerinde ise değişiklik gözlenmemiştir (Wang ve ark., 2016a).

Çalışmalarda kullanılan AFB1 dozu, maruziyet süresi, hayvan türü ve çalışmanın *in vitro* olarak dizayn edilmesi gibi değişkenler toksinin mikrobiyota üzerindeki etkilerinde farklılığa neden olmaktadır (Liew ve Mohd-Redzwan, 2018).

2.3.2.4. Aflatoksin B1'in Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkileri

AFB1 inert bir bileşiktir ve CYP450 enzimi ile biyoaktif edilerek AFBO'ya dönüşmektedir. Daha sonra AFBO, DNA ve proteinlerle kovalent bağ oluşturarak DNA lezyonlarına ve mutasyonlara neden olmaktadır. Buna ek olarak, oluşan ROS sitotoksositeye, genotoksositeye ve immünosupresyona yol açmaktadır (Zhao ve ark., 2019). AFB1'e uzun süre maruziyet konağın humoral ve hücrel bağışıklığını etkilemektedir ve immünolojik yanıtı neden olmaktadır. Toksin maruziyeti lenfositler, dentritik hücreler ve bağışıklık hücrelerinin proliferasyonunu, farklılaşmasını ve olgunlaşmasını olumsuz etkileyerek immünotoksik etki göstermektedir. Böylelikle makrofaj, sitokin ve antikor üretim mekanizması değişmekte ve metabolizma patojenlere (bakteri, virüs, parazitler) karşı duyarlı hale gelmektedir (Sun ve ark., 2023).

Antioksidanlar, bazı enzim sistemlerini uyararak AFB1'in neden olduğu oksidatif stresi inhibe etmektedir (Guarisco ve ark., 2007). AFB1 lipid peroksidasyonunu artırarak oksidatif stresi derinleştirmektedir. Enzimatik olmayan antioksidanlar GSH ve enzimatik antioksidanlar (glutasyon peroksidaz (GSH-Px), glutasyon-S-transferaz (GST), glutasyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT)) hücrelerin savunma mekanizmasının ana belirleyicileridir. AFB1'in neden olduğu oksidatif stresin, immünotoksitenin ve immünosupresyonun azaltılmasında bu enzimler oldukça önemli bir role sahiptir (Ravinayagam ve ark., 2012).

2.4. Oksidatif Stres

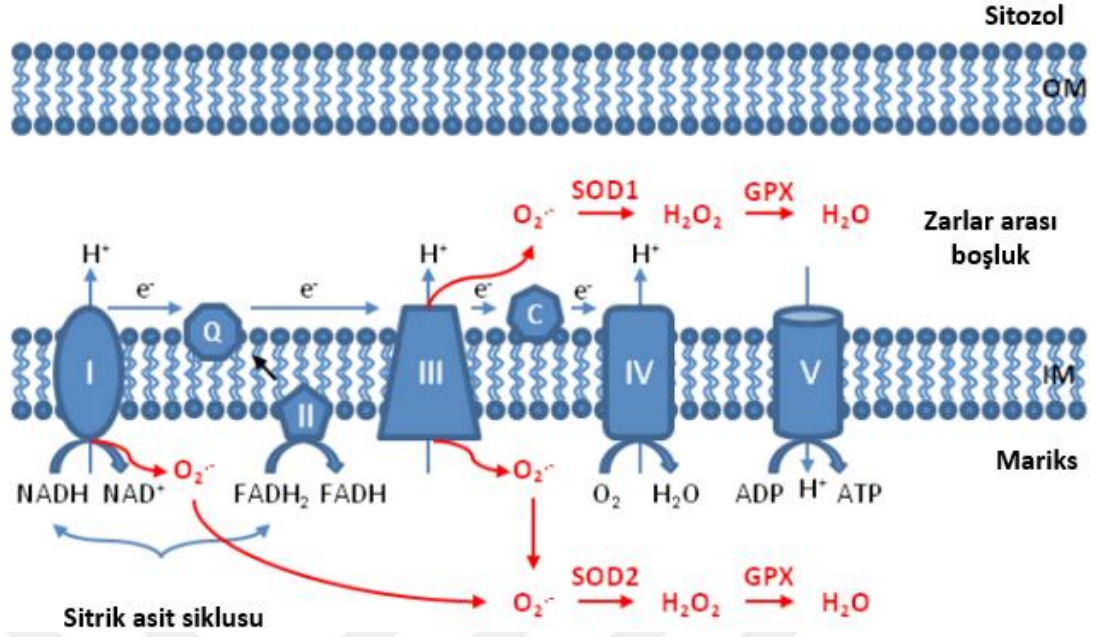
Normal fizyolojik koşullarda hücrelerde gerçekleşen reaksiyonlar sonucunda ROS oluşmaktadır. Oluşan ROS'nin inhibe edilmesi için antioksidanlar devreye girmektedir. Böylece ROS ve antioksidanlar arasındaki denge sağlanmaktadır. Hücrede süperoksit radikallerinin birikmesi ve antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kalması dengenin

ROS tarafına bozulmasına neden olmaktadır. Bu durum oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır (Aslankoç ve ark., 2019). Serbest radikallerin organizmada yüksek seviyede olması protein, lipit, DNA ve diğer nükleik asitlerin yapılarına zarar vermekte, hücre içi ve hücre dışı sinyal yollarını bozmaktadır. Artan oksidatif stres bağışıklık sisteminin baskılanması, kanser, yaşlanma, gastrointestinal hastalıklar ve diyabet gibi hastalıklara zemin hazırlamaktadır (Percival, 1997; Pisoschi ve Pop, 2015).

2.4.1.Serbest Radikallerin Özellikleri ve Kaynakları

Serbest radikaller, son orbitalinde bir veya daha fazla sayıda eşlenmemiş elektron bulunan kararsız moleküller olarak ifade edilmektedir. Kararsız ve yüksek reaktif yapıdaki bu moleküller kararlı yapıya dönüşmek için eşlenmemiş elektronunu aktarma eğilimindedir. Serbest radikaller yüksek reaktif özellikte olmaları nedeniyle lipit, protein, nükleotid koenzimlere ve diğer hücresel yapılara zarar vermektedir (Nordberg ve Arnér, 2001). Serbest radikallerin yapısında genellikle oksijen, nitrojen, sülfür gibi bileşikler veya bunların reaktif türleri (reaktif oksijen, reaktif nitrojen ve reaktif sülfür) bulunmaktadır. Biyolojik sistemlerde serbest radikaller aktivitelerine göre ROS, reaktif nitrojen türleri ve diğer reaktifler olarak üç grupta incelenmektedir (Yu, 1994). Bu reaktif türler, etkileşime girdikleri moleküllerden ya bir elektron alma ya da verme eğilimindedir. Böylece serbest radikaller elektron aldıkları veya verdikleri molekülleri kararsız hale getirmektedir (Sen ve ark., 2010).

Serbest radikallerin oluşumunda ekzojen ve endojen faktörler etkili olmaktadır. Sağlıksız beslenme, alkol, sigara, uyuşturucu, hava kirliliği, toksinlere ve radyoaktivite maruziyet gibi durumlar ekzojen serbest radikal kaynaklarıdır. Travma, peroksizom enzimleri, katekolaminler, ER enzimleri ve mitokondriyal elektron taşıma sistemi (ETS) endojen serbest radikal kaynaklarındandır (Wang ve ark., 2021). Oksijenli solunum ile enerji üretilmesi aşamasında mitokondride bir dizi reaksiyon gerçekleşmektedir. ETS’de özellikle kompleks I’dan (NADH dehidrojenaz) kompleks III’e (sitokrom c redüktaz) elektron aktarımı sırasında serbest radikaller oluşmaktadır. ETS basamakları ve serbest radikal oluşumu Şekil 2.3’te gösterilmiştir (Erol, 2020a).



Şekil 2.3. Mitokondriyal elektron transport sistemindeki ROS oluşumu (Erol, 2020a).

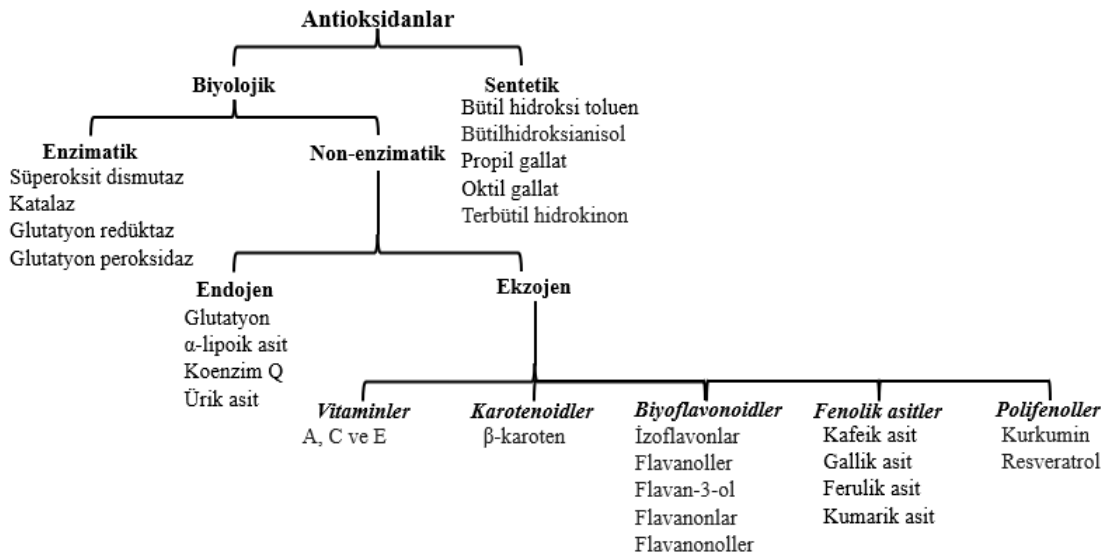
2.4.2. Serbest Radikallerin Neden Olduğu Hasarlar

Çevresel faktörler ve antioksidan savunma mekanizmasının gücüne bağlı olarak serbest radikallerin etkinliği değişmektedir. Antioksidan savunma sistemi serbest radikallere karşı yetersiz kaldığında başta hücre zarında bulunan lipitler olmak üzere, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler zarar görmektedir (Chen ve ark., 2021).

Serbest radikaller, hücre zarının yapısındaki doymamış yağlar ile tepkimeye girerek lipit peroksidasyonuna neden olmaktadır. Peroksidasyon düzeyi serbest radikalın tepkimeye girdiği yağın doymamışlık derecesi ile doğru orantılıdır. Doymamış yağ asitlerinin oksitlenmesi ile yüksek lipofilik peroksitler (LOOH) ve yağ asidi radikalleri oluşur. Lipit peroksidasyonunun son basamağında hücre hasarının bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) meydana gelir (Ertaş, 2005). Lipit peroksidasyonu ile serbest glukozun oksidasyonu, DNA'nın yapısında bulunan pürinlerin oksidasyonu, hücre transport sistemleri ve enzimlerin zarar görmesi serbest radikallerin diğer zararlı etkileri arasında sayılabilir. Serbest radikallerin bu etkileri sonucu inflamatuvar hastalıklar, kalp hastalıkları, iskemi, nörolojik bozukluklar ve enfeksiyonlara yatkınlık gibi birçok durumla karşılaşılabılır (Kehrer ve Klotz, 2015).

2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri

Biyolojik bir antioksidan, bir substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya engelleyen bir madde olarak tanımlanabilir. Potansiyel hastalık etkisi bulunan serbest radikallerin nötralize edilmesinde antioksidan savunma sistemi görev almaktadır. Antioksidan savunma sistemi yerine serbest radikal süpürücü, antioksidanlar, zincir terminatörü ve redükthanlar gibi farklı ifadeler de kullanılmaktadır. Günümüzde çok sayıda antioksidan bulunmakla birlikte antioksidanların etkilerine yönelik araştırmalar yapılmaktadır (Borek, 2004). Antioksidanlar, oksidatif stresini önleyerek hücre hasarını engellemekte ve bağışıklık sistemini desteklemektedir. Çalışma mekanizmaları benzerlik göstermekle birlikte antioksidanlar, biyolojik ve sentetik olarak ikiye ayrılmaktadır. Bütildihidroksitoluen (BHT), bütildihidroksianisol (BHA), propil gallat, ostil gallat, 4-heksiresorsinol ve terbütildihidrokinon (TBHQ) günümüzde sentetik olarak üretilen antioksidanlardır (Kotha ve ark., 2022). Canlılarda antioksidan savunma sistemleri dışarıdan besinlerle veya takviyelerle alınan antioksidanlar (ekzojen) ve metabolizma tarafından üretilen antioksidanlar (endojen) olarak ikiye ayrılmaktadır. Endojen olarak üretilen antioksidanlar enzim yapısında veya molekül yapısında olabilir (Özyurt ve ark., 2021). Antioksidan savunma sistemi Şekil 2.4'te şematize edilmiştir (Kotha ve ark., 2022).



Şekil 2.4. Antioksidanların sınıflandırılması (Kotha ve ark., 2022).

2.5.1. Enzimatik Antioksidanlar

SOD, CAT, GSH-Px ve GR enzimatik savunma mekanizmasını oluşturan temel antioksidanlardır. Bu enzimler serbest radikalleri detoksifiye ederek oksidatif hasarı önlemektedir. İmmünolojik reaksiyonların yoğun olarak gerçekleştiği karaciğer, böbrek, dalak, kırmızı kan hücreleri ve adrenal bezlerde antioksidan enzimler aktif olarak görev almaktadır (Sen ve ark., 2010).

SOD, mitokondride ve sitoplazmada hem intraselüler hem de ekstraselüler aktivite göstermektedir. SOD aktivitesi ile süperoksit radikalleri (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) katalizlenmektedir. Çinko, bakır ve manganez gibi elementler enzimin yapısına katılarak farklı formlar oluşturur. Bu sayede enzimin aktivite göstereceği mitokondriyal veya sitozolik ortam belirlenir. Örneğin çinko ve bakır içeren SOD sitozolde, manganez içeren SOD mitokondriyal ortamda bulunur (Talat ve ark., 2022).

Antioksidan savunma sisteminin en önemli enzimlerinden olan CAT enzimi aerobik organizmaların neredeyse tamamında bulunmaktadır. CAT, dört porfirin zinciri ve bir hem grubundan oluşmaktadır. Tetramer yapıdaki bu enzim detoksifikasyon ara ürünü olan hidrojen peroksidi su ve oksijen molekülüne indirgemektedir (Nandi ve ark., 2019).

GSH-Px aktivitesi CAT ile benzer özellik göstermektedir. GSH-Px, elektron kaynağı olan glutasyonu okside ederek H_2O_2 ve organik hidroperoksitleri metabolize etmektedir. Okside glutasyonun yeniden glutatyona indirgenmesi GR tarafından gerçekleştirilmektedir. GSH-Px'in selenyum bağımlı ve bağımsız iki ana formu bulunmaktadır. Selenyum bağımlı GSH-Px hem lipid peroksitleri hem de H_2O_2 'nin indirgenmesinde; selenyum bağımsız GSH-Px sadece hidroperoksitlerin indirgenmesinde faaliyet göstermektedir (Kaya, 2014; Kurum ve ark., 2016).

2.5.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Enzim yapısında olmayan endojen antioksidanlar arasında başta glutasyon olmak üzere koenzim Q10, ürik asit ve alfa-lipoik asit sayılabilir. Glutasyon hücre içinde önemli antioksidan aktiviteye sahip bir moleküldür. Aminoasitlerin transportu, hücre sinyalizasyonu, apoptoz, eikosanoitlerin sentezlenmesi ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu sırasında önemli fonksiyonlara sahiptir (Erol, 2020b).

Koenzim Q10, oksidatif fosforilasyon aşamasında mitokondriyal ETS'de elektron transferini (kompleks I'den kompleks III'e) sağlamakta ve hücrel vital fonksiyonlarda görev almaktadır. Bununla birlikte koenzim Q10 mitokondriyal geçirgenlik, sülfid, pirimidin ve yağ asitlerinin metabolizmasını düzenlemektedir (Crane, 2001). Yağda çözünen bir antioksidan olarak mitokondri ve diğer organellerin (ER, golgi cisimciği, lizozom, peroksizom) membranını oksidatif strese korumaktadır. Böylece inflamatuvar yanıtın kontrolünde önemli rol oynamaktadır (Hargreaves, 2003).

Ürik asit, adenin ve guanin metabolizmasının son ürünüdür. *İn vitro* çalışmalar ürik asidin singlet oksijen, peroksil radikal ve hidroksil radikalleri üzerinde potansiyel bir süpürücü olduğunu göstermektedir. Ayrıca metal iyonlarını şelatlayarak hücreyi oksidatif hasara karşı koruduğu bildirilmiştir. Bu etkileri nedeniyle ürik asit önemli bir antioksidan olarak kabul edilmektedir ve plazmanın antioksidan kapasitesinin yarısından fazlasını oluşturduğu tahmin edilmektedir (Mijailovic ve ark., 2022).

Alfa-lipoik asit yapısında disülfid bağı bulunan hem yağda hem de suda çözünen bir bileşiktir. Alfa-lipoik asit hücrede, asetilkolin üretimi için asetil koenzim-A sağlayarak mitokondride glukoz kullanımını artırır (Packer ve Cadenas, 2010). Bunun yanı sıra sitrik asit döngüsü, nükleik asitlerin sentezi, enerji üretimi, glutatyon ve diğer antioksidan enzimlerin sentezinde kofaktör olarak görev almaktadır. Hücrede hidroksil radikali, hipokloröz asit, hidrojen peroksit, singlet oksijen, nitrik oksit radikali ve peroksinitrit radikallerini süpürerek antioksidan aktivite göstermektedir (Dragomanova ve ark., 2021).

2.5.3. Doğal Antioksidanlar

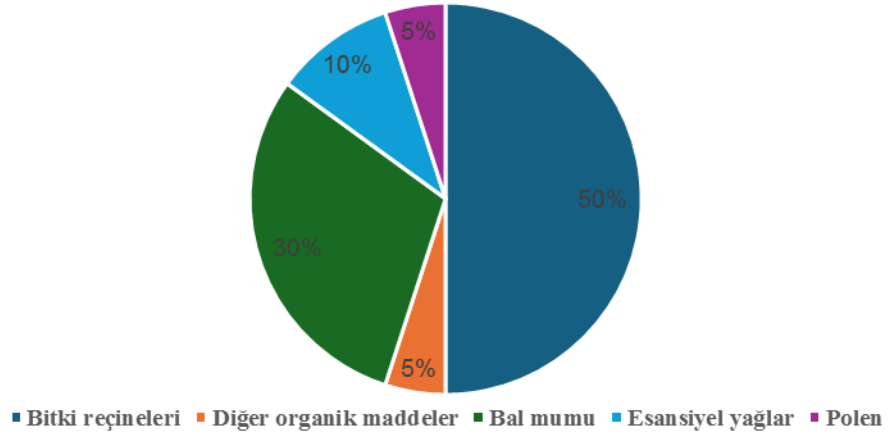
Doğal antioksidanlar, patojenleri ve serbest radikalleri etkisiz hale getirme özelliği nedeniyle dikkat çeken araştırma konuları arasında yer almaktadır. Bu bileşikler besinlerin yapısında veya doğada serbest halde bulunabilir (Mozaffarian, 2016). Fenolik asitler, flavonoidler, liganlar, kurkuminoidler, karotenoidler, kapsaisinler, kateşinler, resveratrol, likopen, kuersetin, sinnamaldehit, gallik asit, propolis, E, C ve A vitaminleri doğal antioksidanlara örnek verilebilir (Kopeck ve ark., 2010; Malaguarnera, 2019; Pérez-Torres ve ark., 2021). Doğal antioksidanların çalışma mekanizması genel olarak, inflamatuvar yanıt oluşturan serbest radikallerin süpürülmesini, gen transkripsiyonu boyunca transkripsiyon faktörlerinin aktifleşmesini veya inhibisyonunu içermektedir

(Pérez-Torres ve ark., 2021). Bir diğer mekanizma ise doğal antioksidanların hücre sinyalizasyonunda yer alan nükleer transkripsiyon faktörü eritroid-2 (Nrf-2) üzerindeki kontrolüdür. Bu sayede doğal antioksidanlar faz II enzimleri ve detoksifikasyon enzimlerinin (GSH-Px, SOD, CAT, GR) transkripsiyonu etkilemektedir (Bellezza ve ark., 2018).

2.5.4. Propolisin Yapısı ve Özellikleri

Propolis, arıların kovanlarını korumak için ürettikleri reçine benzeri bir maddedir ve “arı tutkalı” olarak da bilinir. Bu madde kovan duvarındaki boşlukları doldurur ve soğuk havanın kovan içine girmesini önleyerek ısı dengesini sağlar (Kędzia, 2008). Propolis Yunanca kökenli bir kelimedir ve “şehrin girişi” anlamına gelir. Geçmişten günümüze propolis kaynağı ve içeriği bakımından önemli bir tartışma konusu olmuştur. Teknolojinin gelişmesi ve farklı analitik yöntemler sayesinde propolisin bileşimi ve bunu etkileyen faktörler bilinmektedir (Toreti ve ark., 2013; Wagh, 2013).

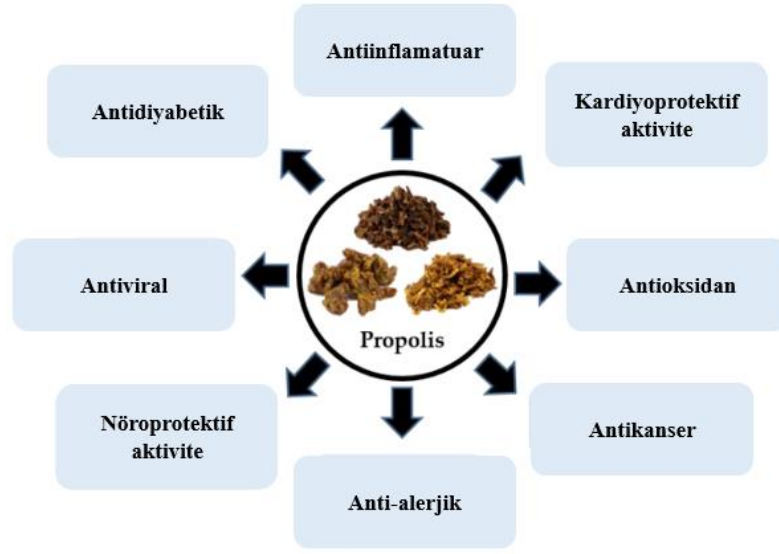
Arıların bal mumu ve bitki özlerini kullanarak hazırladıkları propolis yapışkan, renkli ve karakteristik kokulu bir maddedir (Chen ve ark., 2004). Propolisin rengi daha çok bitkinin türü ve toplama zamanına bağlıdır. Koyu kahverengi propolis en yaygın olmakla birlikte yeşil ve kırmızı propolis türleri de mevcuttur (Kasote, 2017). Propolis türlerinin kimyasal kompozisyonu oldukça karmaşık ve değişkendir. Coğrafi bölge, botanik türler, mevsim ve arı türü propolisin kimyasal bileşimini etkilemektedir (Bankova, 2005). Propolis genellikle yüksek oranda bitki reçinesi, bal mumu, uçucu organik bileşikler, polen, alifatik asitler ve esterleri, aromatik asitler ve esterleri, flavonoidler (krisin, kafeik asit, pinosembren, apigenin, galangin, kamferol, kuarsetin, pinostrobin, tetokrisin), fenolik bileşikler, terpenoidler, karbonhidrat, aminoasitler, vitaminler (B₁, B₂, B₆, C ve E) ve mineralleri (alüminyum, antimon, kalsiyum, bakır, selenyum, demir, lantanyum, manganez, nikel, vanadyum, çinko ve gümüş) içermektedir (Anjum ve ark., 2019; Salatino ve Salatino, 2021). Propolisin kimyasal bileşimi Şekil 2.5’te özetlenmiştir.



Şekil 2.5. Propolisin kimyasal bileşimi (%) (Almuhayawi, 2020).

2.5.4.1. Propolisin Sağlık Üzerine Etkileri

Propolis, potansiyel bir koruyucu ve tedavi edici ajan olmasını sağlayan bileşenleri nedeniyle son yıllarda dikkatleri üzerine çekmiştir (Braakhuis, 2019). Propolisin biyolojik aktivitesini değerlendirmek için çok sayıda preklinik ve klinik çalışma yapılmaktadır. İlaç teknolojisindeki gelişme ve ilerlemeyle birlikte, propolis ve çeşitli bileşenlerinin araştırılmasına yönelik ilgi artmaktadır (Huang ve ark., 2014). Yapılan araştırmalar sonunda propolisin yapısında bulunan bileşenlerin potansiyel antikanser, antiapoptotik, antidiyabetik, antiinflamatuvar, antibakteriyel, antiviral ve antioksidan özellikte olduğu belirtilmiştir (Abd-Jamil ve Zhari, 2016; Chavda ve ark., 2023; Kustiawan ve ark., 2017). Propolis, diyabet, yanıklar, yaralar, jinekolojik problemler, kardiyovasküler, laringolojik, dermatolojik, nörodejeneratif, gastrointestinal ve solunum yolu hastalıkları gibi çeşitli kronik hastalıkların tedavisinde etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Anjum ve ark., 2019). Şekil 2.6’da propolisin potansiyel sağlık ve hastalıklar üzerindeki etkileri şematize edilmiştir (Zullkiflee ve ark., 2022).



Şekil 2.6. Propolisin biyolojik ve terapötik özellikleri (Zullkiflee ve ark., 2022).

Propolisin yapısında bulunan polifenoller antioksidan aktiviteyi arttırmaktadır (Georgieva ve ark., 2019). Özellikle galangin ve pinosembrin derinin epidermis ve dermis tabakasını serbest radikallere karşı koruyarak deriyi radyasyona ve yaşlanmaya karşı direnç göstermesini sağlamaktadır (Król ve ark., 2013). Propolisin temelde antioksidan mekanizması, fenolik bileşiklerin hücresel oksidasyona ve besinlerde oksidasyon yoluyla toksin üretimine neden olan serbest radikalleri etkisiz hale getirmesine dayanmaktadır. Böylece propolis lipidlerin, nükleik asitlerin ve proteinlerin oksidasyonunu önlemektedir (Chandna ve ark., 2014). Özellikle Portekiz propolisi antioksidan özelliğe sahiptir ve kırmızı kan hücrelerinde lipid peroksidasyonunu önlemektedir (Zabaiou ve ark., 2017).

2.5.4.1.1. Propolisin Bağırsak Mikrobiyotasına Etkileri

Bağırsak mikrobiyotasının gastrointestinal bağışıklığın düzenlenmesi, bağırsak bütünlüğünün sağlanması ve bağırsağın patojenik mikroorganizmalardan korunması gibi pek çok fizyolojik yararı bulunmaktadır (Thursby ve Juge, 2017). Bağırsak mikrobiyotasında başlıca üç grup bakteri türü bulunmaktadır. Bunlar zorunlu anaerob, fakültatif anaerob ve fakültatif aeroblardır. Günümüzde en yaygın bakteri filumları *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* olmakla birlikte toplamda 50 bakteri filumu tanımlanmıştır. Daha düşük oranlarda bulunan bakteri filumlarına *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria* ve *Cyanobacteria* örnek verilebilir (Sekirov ve ark.,

2010). Sağlıklı bir bağırsak mikrobiyotasında faydalı ve patojenik bakteriler arasında homeostatik bir denge vardır. Faydalı bakterilerin azalması, patojenik bakterilerin artması veya her iki bakteri grubunun da azalması mikrobiyota kompozisyonunun bozulmasına neden olur (DeGruttola ve ark., 2016). Bağırsak disbiyozu olarak adlandırılan bu durum inflamatuvar yanıt, sistemik inflamasyona, bağırsak geçirgenliğine, otoimmün reaksiyonlara ve enfeksiyonlara yatkınlığa neden olabilir (Ullah ve ark., 2021). Antibiyotikler, toksinler, sigara, alkol, gluten içeren besinler, tuzlu beslenme ve diyetle yüksek doymuş yağ asidi alımının artması disbiyozu yol açabilir (Huang ve ark., 2023; Myers ve Hawrelak, 2004; Ullah ve ark., 2021).

Yapılan çalışmalarda, propolis ekstraktlarının mikrobiyal modülasyon üzerindeki pozitif etkinliği ortaya konmuştur (Cai ve ark., 2020; Roquette ve ark., 2015; Xue ve ark., 2019). Çölyak hastası ve obez bireylerde yapılan bir çalışmada propolisin toplam antioksidan kapasiteyi arttırdığı ve bağırsak mikrobiyotasını modüle ettiği rapor edilmiştir (Garzarella et al., 2022). Yüksek yağlı diyet ile beslenen farelerde etanolde çözdürülmüş propolisin vücut ağırlığını, proinflamatuvar sitokinleri, insülin direncini azalttığı ve lipid metabolizmasında etkili olan bakterilerin modülasyonunu sağladığı bildirilmiştir (Cai ve ark., 2020). Benzer bir çalışmada Brezilya propolisinin mikrobiyota üzerinde olumlu etkileri rapor edilmiştir. Buna göre, propolis takviyesinden sonra *Bacteroides* ve *Helicobacter* sayısının arttığı; *Oscillopsira* ve *Blautia* sayısının ise azaldığı belirlenmiştir (Roquette ve ark., 2015). Yapılan çalışmalarda, propolisin mikrobiyota üzerindeki modülasyonu ve oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin içerdiği fenolik bileşiklerden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Wang ve ark., 2018). Bununla birlikte, mikotoksin ve kimyasallar gibi çeşitli toksik maddeler ile indüklenmiş hastalık modellerinde propolisin etkinliği araştırılmaktadır. Dekstran sülfat sodyum ile indüklenmiş kolit modelinde propolis takviyesinin mikrobiyota çeşitliliğini, *Proteobacteria* ve *Acidobacteria* filumlarını arttırdığı belirlenmiştir (Wang ve ark., 2017). Benzer şekilde OTA tarafından indüklenen inflamasyon ve gram negatif bakterilerin ürettiği lipopolisakkarit (LPS) disbiyozu, instestinal bariyer hasarına ve toll benzeri reseptör 4 (TLR4) sinyal yolağının uyarılmasına neden olmaktadır. Bu yolağın aktivasyonu bağırsakta proinflamatuvar sitokinlerin üretimini de beraberinde getirmektedir (Cani ve Delzenne, 2009). Cai ve ark. (2020) propolisin TLR4 yolağı aktivitesini düzenlediğini, bağırsak mikrobiyotasını modüle ederek LPS üretimini ve

inflatuar yanıtı azalttığını yüksek yağlı diyet uygulanan fare modelinde göstermiştir. Diğer taraftan AFB1 maruziyetinin bağırsak hasarına (Liu ve ark., 2023) ve disbiyozuna (Subramaniam ve ark., 2022) neden olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak AFB1'in neden olduğu intestinal bariyer hasarı, inflamasyon ve disbiyoz durumunda uygulanan propolis uygulanmasına ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

2.5.4.2. Propolisin Aflatoksin B1 Detoksifikasyonundaki Rolü

Besinleri ve diğer tarım ürünlerini zararlı mikroorganizmalardan korumak amacıyla çeşitli ajanlar kullanılmaktadır. Esansiyel yağlar, limon ekstraktı (Smith-Palmer ve ark., 2001), organik asitler (salisilik asit) (Rasooli ve Owlia, 2005), organik tuzlar (potasyum tuzu) (Tomaszewski, 2017), bal mumu ve propolis (Buchta ve ark., 2011) antifungal özelliği ile bilinmektedir. *Aspergillus flavus* ve mantarın AFB1 üretimini inhibe etmek amacıyla karanfil, limon yağı, salisilik asit, potasyum sorbat ve propolis ekstraktları kullanılan bir çalışmada propolisin diğer bileşiklere göre daha yüksek antifungal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Abd Elfatah ve ark., 2021). Propolisin antifungal aktivitesi yapısındaki fenolik bileşikler, flavonoidler, alkol, ester, aminoasit, terpen ve inorganik bileşiklerden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Ghasem ve ark., 2007; Yang ve ark., 2010). Doğal antioksidan olarak propolis, CYP450 enzim aktivitesini artırarak AFB1 detoksifikasyonunu sağladığı gösterilmiştir (Niu ve ark., 2011). Yapılan bir çalışmada saf ve nanoemülsiyon haldeki propolisin insan balgamından ve süt tozundan elde edilen *Aspergillus flavus* büyümesi ve mantarın AFB1 üretimini azalttığı bulunmuştur (Hassanien ve ark., 2021). Gelişen teknoloji ile *Aspergillus* türlerinin AFB1 üretimi gen ekspresyonu düzeyinde araştırılmaktadır. Yapılan bir çalışmada propolisin *Aspergillus parasiticus* büyümesini, aflatoksin üretimini ve aflatoksin üreten *afIR* gen ekspresyonunu anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir (Hamzeh-Pour ve ark., 2020). Benzer şekilde, propolisin aflatoksin biyosentezinden sorumlu *nor-1*, *ver-1* ve *omtA* gen ekspresyonları üzerinde inhibitör etkisi tespit edilmiştir (Mahmoodzadeh-Hosseini ve ark., 2020). Bu bağlamda, propolis besinler ve tarım ürünlerindeki aflatoksin kontaminasyonunu kontrol etmek için potansiyel bir ajan olarak değerlendirilebilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma için Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'ndan (ERÜ-HADYЕК) 02.11.2022 tarih ve 22/234 karar numaralı etik kurul onayı alınmıştır (EK-1). Çalışmanın bütçesi TDK-2023-12487 kodu ile Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından karşılanmıştır.

3.1. Çalışmanın Yeri, Zamanı ve Örneklem Seçimi

Çalışma 01.03.2023-04.04.2023 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar ve Uygulama Merkezi'nde (DEKAM) yürütülmüştür. Çalışmada kullanılacak rat sayısı ve grup planlaması güç analizi ($\alpha=0,05$ ve $\beta=95\%$) ile belirlenmiştir. Buna göre aynı jenerasyondan seçilen, grup başına 8 rat olacak şekilde toplamda 32 rat kullanılmıştır (Yılmaz, Kandemir, Kaya, & Ozkaraca, 2020). Deney hayvanlarının bakımı, çalışma protokolünün uygulanması, gaita örneklerinin toplanması, derin anestezi altında ötenazi işlemleri ile doku ve organların diseksiyonu DEKAM'da gerçekleştirilmiştir. İleri analizler için gaita ve doku örnekleri Erciyes Üniversitesi Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi'nde (GENKÖK) muhafaza edilmiştir.

3.2. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı

Çalışmada kullanılmak üzere 6-8 haftalık (200-250 g) 32 adet erkek Sprague Dawley rat DEKAM'dan temin edilmiştir. Hayvanlar araştırma amacıyla 3R kuralına (azaltma, yerine koyma ve iyileştirme) uygun olacak şekilde seçilmiştir. Tüm hayvanlar rastgele dağıtılmıştır ve herhangi bir işlemten önce kafesler rastgele seçilmiştir. Hayvanlar standart pelet diyetine ve normal musluk suyuna *ad libitum* erişimi olan paslanmaz çelik kapaklı polikarbonat kafeslerde barındırılmıştır. 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsünde nem ($55 \pm 10\%$) ve sıcaklık (22 ± 2 °C) sabit olacak şekilde çevresel

koşullar ayarlanmıştır. Hayvanların beslenmesinde kullanılan standart pelet yemin bileşimi Tablo 3.1’de verilmiştir.

Bir hafta süren adaptasyon periyodunun ardından hayvanlar rastgele 4 gruba ayrılmıştır. Çalışmanın başlangıcından sonlandırılmasına kadar olan süreçte hayvanlar her gün 0.1 g’a duyarlı hassas terazi kullanılarak tartılmıştır.

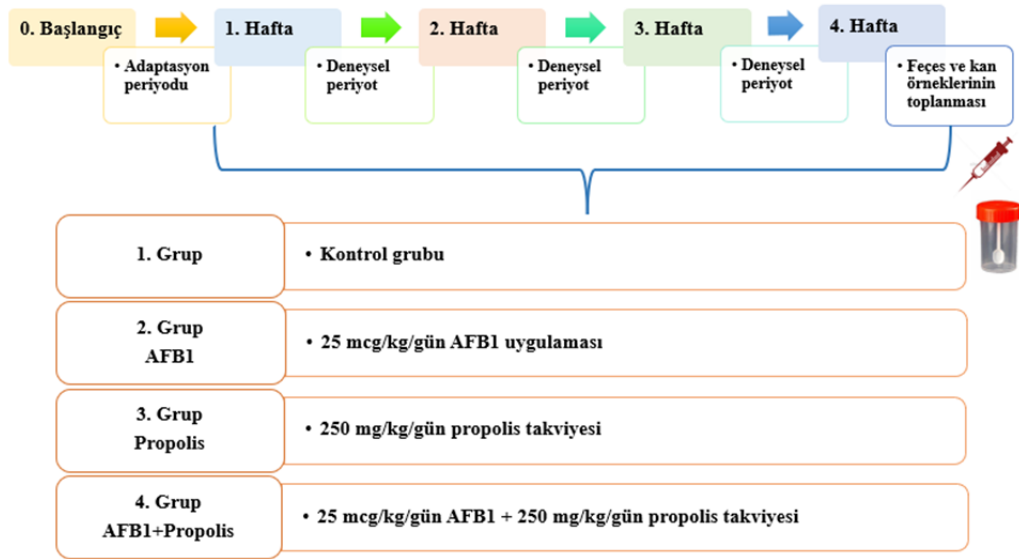
Tablo 3.1. Standart pelet yemin bileşimi

Besin öğeleri	Birim	Miktar
Ham protein	%	24
Ham selüloz	%	4
Ham yağ	%	5,54
Ham kül	%	8,63
Lizin	%	1,45
Metiyonin	%	0,61
Kalsiyum	%	1,14
Fosfor	%	0,87
Sodyum	%	0,76
İyot	mg/kg	1,3
Kobalt	mg/kg	0,15
Bakır	mg/kg	16
Mangan	mg/kg	155
Çinko	mg/kg	130
Selenyum	mg/kg	0,35
A vitamini	IU/kg	36000
D vitamini	IU/kg	6500

Not: Birim olarak ifade edilen yüzde değerleri besin ögesinin toplam ağırlık içindeki oranını göstermektedir.

3.3. Çalışma protokolü

Her grupta eşit sayıda rat (n=8) olacak şekilde, hayvanlar rastgele KON: Kontrol, AFB1: Aflatoksin B1, PRO: Propolis ve AFB1+PRO: Aflatoksin B1 ve Propolis olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Çalışma planı Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışma planı.

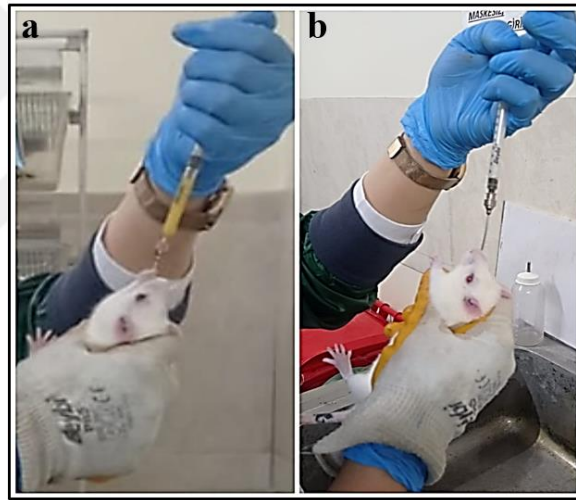
3.3.1. Aflatoksin B1 Uygulaması

Toz formundaki 5 mg AFB1 (CAS No: 1162-65-8) (CAYMAN Chemical Company, Michigan, USA) ticari olarak temin edilmiştir. Çalışmaya başlamadan önce ürün orijinal kutusunda belirtilen talimatlar doğrultusunda 2-8°C’de muhafaza edilmiştir. Çözücü olarak hayvanlar üzerindeki minimum etkisi nedeniyle dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak 5 mg/ml konsantrasyonunda (pH:7,2) AFB1 çözeltisi hazırlanmıştır. AFB1 miktarı günlük maruziyet dozu ve literatür göz önünde bulundurularak (Liew ve ark., 2022; Zhou ve ark., 2019), rat başına 25 mcg/kg/gün olacak şekilde oral gavaj yoluyla 4 hafta (28 gün) boyunca AFB1 ve AFB1+PRO gruplarına uygulanmıştır (Şekil 3.2.). Uygulanan bu doz, gıdalardaki 0,03 ila 0,45 mg/kg (30-450 ppb) AFB1’e eşdeğerdir. Gelişmekte olan ülkelerde yaşayan bireylerin bu doz aralığında AFB1’e maruz kaldıkları bildirilmiştir (Wang ve ark., 2016a). KON ve PRO gruplarına ise sadece DMSO verilmiştir.

3.3.2. Propolis Ekstraksiyonu

Bu çalışmada sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) yöntemiyle fenolik antioksidan analizi (EK-2) yapılan ve içinde resveratrol, gallik asit, siyanidin, klorojenik asit, kateşin, vanilik asit, hesperidin, ferulik asit, kuersetin, apigenin ve krisin gibi fitokimyasalları içeren Anadolu propolisi kullanılmıştır. Kullanılan bu propolis Türkiye’nin Samsun ilinden toplanan ham propolisten (*Populus sp.*) ekstrakte edilmiş

ve saflaştırılmıştır. Bu işlemler için küçük parçalara ayrılan ham propolisin üzerine ağırlığının 10 katı %95 etanol eklenmiştir. Bu karışım ultrasonik su banyosunda 45°C’de 3 saat bekletilmiştir. Sonikasyondan sonra karışım 0,45 mikropor membran ile filtre edilmiştir. Bu işlem üç kez tekrarlanmıştır. 50°C’de döner buharlaştırıcı (rotary evaporator) yardımıyla etanol çözeltiden uzaklaştırılmıştır. Elde edilen kuru formdaki propolis ekstraktı 2-4°C’de ışık görmeyen bir ortamda saklanmıştır (Cai ve ark., 2020; Wang ve ark., 2022; Zhang ve ark., 2015). Propolis takviyesinin bağırsak mikrobiyotası ve oksidatif stres parametreleri üzerindeki yararlı etkilerine ilişkin yapılan çalışmalar göz önünde bulundurularak, ekstrakte edilen propolis rat başına 250 mg/kg/gün dozunda oral gavaj yoluyla 4 hafta (28 gün) boyunca PRO ve AFB1+PRO gruplarına uygulanmıştır (Şekil 3.2.) (Abd-Elrazek ve ark., 2020; El Menyiy ve ark., 2016; Wang ve ark., 2022).



Şekil 3.2. Oral gavaj ile AFB1 uygulaması (b) ve propolis uygulaması (a).

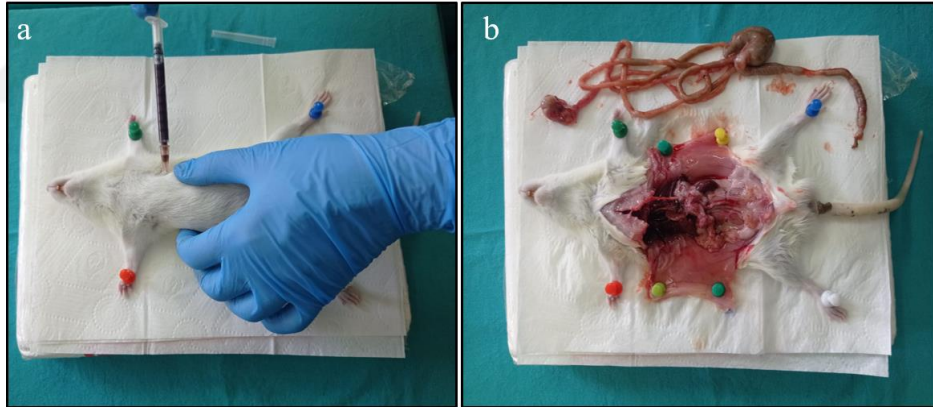
3.3.3. Gaita Numunelerinin Toplanması

AFB1 ve propolis uygulamaları tamamlandıktan bir gün sonra gaita numuneleri DEKAM Temel Bilimler Laboratuvarı’nda toplanmıştır. Hayvanlar öncesinde %70 etil alkol ile dezenfekte edilen kafeslere sırayla alınmıştır. Defekasyondan hemen sonra steril gaita numune kaplarına dışkı örnekleri aktarılmıştır. İdrar, tüy ve yabancı madde bulaşı durumunda kafesler yeniden dezenfekte edilerek defekasyonun tekrarlanması beklenmiştir. Alınan numuneler DEKAM’da bulunan -80°C’lik derin dondurucuya yerleştirilmiştir. Gaita numuneleri içinde 48 saate kadar dayanıklı kuru buz kütlesi

bulunan strafor köpük ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Kimya Laboratuvarı'na taşınmıştır. Bakteriyel DNA izolasyonu çalışmalarına kadar numuneler bu laboratuvardaki -80°C'lik derin dondurucuda bekletilmiştir.

3.3.4.Ötenazi ve Dokuların Alınması

Ötenazi işlemi için enjektabl (intraperitoneal) anestezikler olan ketamin (80 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) kombinasyonu kullanılmıştır. Bacak çekme ve göz kapağı hareketi gibi refleksler tamamen kaybolduğunda kardiyak ponksiyon ile maksimum kan alma işlemi gerçekleştirilmiştir. Ratlar daha sonra servikal dislokasyon yoluyla sakrifiye edilmiştir. Pıhtılaşmanın önlenmesi için kan örnekleri etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) eklenmiş tüplere konulmuştur. Kan örnekleri 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek serum elde edilmiştir. Eş zamanlı olarak, hayvanların ileum dokuları çıkarılmıştır (Şekil 3.3.). Disseke edilen dokular ve serum örnekleri biyokimyasal analizlerin yapılacağı güne kadar -80°C'lik derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.3. Derin anestezi sonrası kardiyak ponksiyon ile kan alınması (a) ve ileum dokusunun disseksiyonu (b).

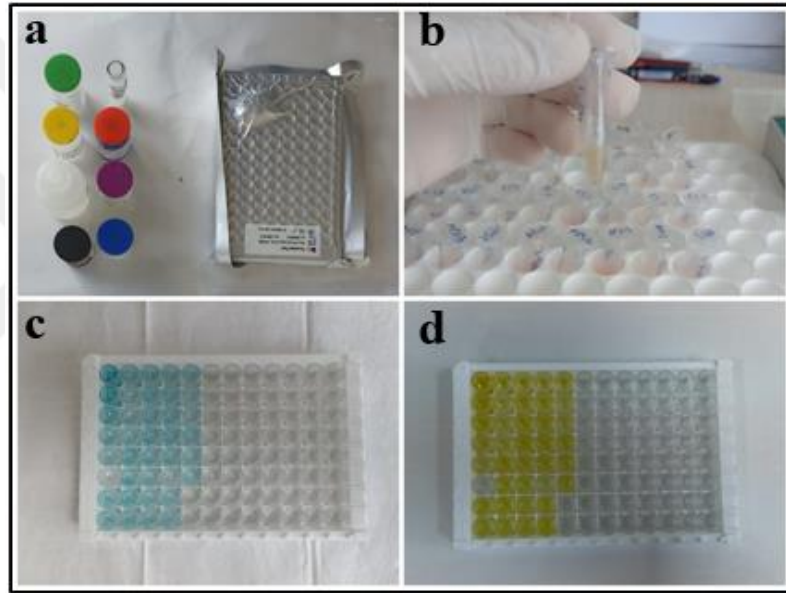
3.4. Kimyasallar ve Analiz Kitleri

Aflatoksin B1 ($\geq 99,5$) (CAS No: 1162-65-8) CAYMAN Chemical Company'den (Michigan, USA) satın alınmıştır. Dimetil sülfoksit ($\geq 99,5$) (CAS No: 67-68-5) Sigma Aldrich Chemical Company'den (St. Louis, USA) temin edilmiştir. SOD (Cat. No: E0168Ra), CAT (Cat. No: E0869Ra), GSH (Cat. No: EA0113Ra), GSH-Px (Cat. No: E1242Ra), MDA (Cat. No: E0156Ra) ve TAS (Cat. No: E1710Ra) enzim bağlı

immünosorbent analizi (ELISA) kitleri Bioassay Technology Laboratory'den (Shangai, China) temin edilmiştir.

3.5. Biyokimyasal Analizler

Ötenaziden sonra -80°C 'lik derin dondurucuda bekletilen serum örnekleri ELISA yöntemi ile SOD (Cat. No: E0168Ra), CAT (Cat. No: E0869Ra), GSH (Cat. No: EA0113Ra), GSH-Px (Cat. No: E1242Ra), MDA (Cat. No: E0156Ra) ve TAS (Cat. No: E1710Ra) analizleri yapılmıştır. Analiz basamakları üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda üç kez okutularak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.4. ELISA testi aşamaları ve kullanılan malzemeler (ELISA test solüsyonları ve mikropalak (a), serum örnekleri (b), substrat solüsyonları eklenen kuyucuklardaki renk değişimi (c), durdurma solüsyonu eklenen kuyucuklardaki renk değişimi (d)).

3.6. Bağırsak Mikrobiyotasının Analizi

Bağırsak mikrobiyotasında bulunan bakteri türlerinin değerlendirilmesi için 16S rRNA Amplikon Metagenom dizileme yöntemi kullanılmıştır. Öncelikle fekal örneklerden DNA izolasyonu, ticari olarak temin edilen izolasyon kitinin talimatları doğrultusunda yapılmış ve sonrasında metagenomik analiz aşamalarına geçilmiştir.

3.6.1. Bakteriyel DNA İzolasyonu

Gaita örneğinden DNA izolasyonu ticari kit kullanılarak yapılmış olup, izolasyon basamakları aşağıda özetlenmiştir: İlk olarak 100 mg dışkı örneği 2 mL'lik tüplere aktarılmıştır ve 600 µL NPB Buffer, 50 µL NLS Buffer ve 20 µL Proteinaz K eklenerek vortekslenmiştir. Sonrasında tüp 70°C'de termal çalkalayıcı blokta 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübe edilen tüp 11000xg'de 2 dk santrifüjlenmiştir. Ardından lizat (500 µL) yeni bir 2 mL'lik tüpe aktarılmıştır, 100 µL NDL Buffer eklenerek vortekslenmiş ve 11000xg'de 2 dk santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant yeni bir 2 mL'lik tüpe aktarılmıştır. Peletten ayrılan solüsyona 300 µL izopropanol eklenmiştir ve vortekslenerek 12000xg'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüjlemeden sonra süpernatantın tamamını dikkatli bir şekilde boşaltılmıştır, bu aşamada DNA bir pelet olarak tüpte kalmıştır. Tüpe 300 µL NTE Buffer eklenerek pelet kısmı tamamen çözdürülmüştür. Elde edilen solüsyon yeni bir 2 mL'lik tüpe aktarılmıştır, 300 µL NBB Buffer ve 300 µL etanol eklenip vortekslenmiştir. Sonrasında spin kolon toplama tüpüne yerleştirilip tüm sıvıyı spin kolona aktarılmıştır ve 12000xg'de 1 dk santrifüjlenmiştir. Daha sonra spin kolona 700 µL Wash Buffer I eklenip 12000xg'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. Aynı işlem Wash Buffer II için de tekrarlanıp spin kolon 12000xg'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. Spin kolonlar 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilerek üzerine önceden 70°C'ye ısıtılmış 50 µL NTE Buffer eklenmiştir ve kolonlar 12000xg'de 2 dk santrifüjlenerek DNA izolatu elde edilmiştir. Numuneler metagenomik analizin gerçekleştirileceği güne kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.6.2. Numune Kalite Kontrolü

DNA ekstraktlarının kalite kontrol işlemleri için jel elektroforezi ve florometrik yöntemler (NanoDrop™ 2000/2000c Spektrofotometre, Paisley, UK) kullanılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda her numunenin genomik DNA konsantrasyonu 10 ng/µL'dan fazla ve saflık (A260/A280) değeri 1,8-2,0 arasında bulunmuştur.

3.6.3. Kütüphane Hazırlığı

Ratların gaita örnekleri kullanılarak yapılan mikrobiyota analizleri 16S ribozomal RNA (16S rRNA) yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dizileme öncesi kütüphane hazırlık basamaklarında 16S rRNA V3-V4 bölgeleri barkodlu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) primerleri (16S Amplicon PCR Forward Primer= 5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCA G, 16S Amplicon PCR Reverse Primer= 5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCT AATCC) kullanılarak çoğaltılmıştır ve saflaştırılmıştır. Ara saflaştırma basamakları için Agencourt Ampure Magnetic Beads kullanılmıştır. Kütüphane hazırlık aşamaları tamamlandıktan sonra kütüphanelerin kalitesi florometrik yöntemler ile kontrol edilmiştir. Bunun yanı sıra, hazırlanan kütüphanelerin kantifikasyon ve normalizasyonu Applied Biosystem 7500 Real Time PCR sistemi kullanılarak optimize edilmiştir. Sonrasında kütüphane havuzu %20 PhiX kontrol eklenerek dizileme işlemi için hazırlanmıştır.

3.6.4.Yeni Nesil Dizileme

Dizileme Novogene tarafından Illumina Novaseq 6000 (San Diego, CA, USA) yeni nesil dizileme platformu kullanılarak yapılmıştır. Bu platform kullanılarak birleştirilmiş kütüphane akış hücresine (flow cell) eklenmiştir. Akış hücresi içinde, yüzeye yapışık halde bulunan oligolar, kütüphanedeki adaptör dizilerine tamamlayıcı dizilerdir. Köprü amplifikasyonu ile her fragment, ayrı ve klonlanmış kümeler halinde çoğalmaktadır. Kümelenme bittikten sonra, kalıp DNA dizilenmeye hazırlanmıştır. Illumina'nın "Sequencing by Synthesis" teknolojisiyle, her baz dizileme sırasında DNA kalıbı üzerinde eklenirken tespit edilmiştir. Dizilemede kullanılan dNTP'ler özel tersinir, terminatör bağlı dNTP'lerdir. Bu dNTP'ler her dizileme döngüsünde, özel kimyasal yapılarından dolayı hata payını ve yanlış baz eklenme olasılığını düşürmektedir. Böylece elde edilen sonuç her bazda yüksek doğruluğa sahiptir. Aynı zamanda, kalıp DNA üzerindeki tekrar eden bölgeler ya da homopolimer DNA dizileri, diğer dizileme tekniklerinde yanlış okumalara ya da okumanın bu noktalarda bitmesine yol açmaktadır. Sequencing by Synthesis teknolojisi ve bu özel dNTP'ler sayesinde homopolimer DNA dizileri ya da tekrar bölgeleri hatasız okunmaktadır.

3.6.5.Taksonomik Sınıflandırma ve Veri Analizi

İşlenmemiş ham okumaların kalitesi FastQC yazılımı (<https://www.novogene.com/eu-en/about/about-novogene/> Novogene Company, Cambridge, UK) kullanılarak değerlendirilmiştir. Ham okumalar üzerinde adapter trimming yapıldıktan sonra FastQC

ile kalite filtrelemesi yapılmıştır. Örneklerin her biri için dizilenen parçalar merkez bölgelerinde üst üste bindiğinden, 16S rRNA geninin V3-V4 bölgesi yaklaşık 550-630 bp'lik parçalar halinde kısmen yeniden yapılandırılmıştır. Taksonomik atama ve operasyonel taksonomik birimlerin (OTU) belirlenmesi için tam uzunluktaki V3-V4 16S rRNA gen bölgelerinin yeniden yapılandırılması, QIIME2dada2 aracı (Versiyon 3.2.0) ve R yazılımı (Versiyon 4.3.0) (Lin ve ark., 2022) ile %97 nükleotid özdeşliğinde gerçekleştirilmiştir. OTU'lar ile taksonomik analiz, seyreltme analizleri ve grupların karşılaştırmalı analizleri yine QIIME 2 içerisinde bulunan araçlarla yapılmıştır.

3.6.6.Biyoinformatik Analiz

Alfa çeşitlilik bir örnekteki türlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır ve altı farklı indeks türü bulunmaktadır. Bunlar; Shannon, Simpson, Chao1, ACE, Good's coverage ve Observed species indeksleridir. Çalışmada QIIME 2 (Versiyon 2.3.0) programı ve R (Versiyon 4.3.0) yazılımı kullanılarak indeks hesaplamaları ve gruplar arası karşılaştırmalı istatistiksel analizler yapılmıştır.

Beta çeşitlilik ağırlıklı ve ağırlıksız Unifrac analizleri QIIME 2 (Versiyon 2.3.0) programı ve R (Versiyon 4.3.0) yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Çok boyutlu bileşenleri göstermek amacıyla Bray-Curtis farklılığına dayalı temel koordinat analizi (principal coordinate analysis-PCoA) ve temel bileşenler analizi (principal component analysis-PCA) R (Versiyon 4.3.0) yazılımı kullanılarak yapılmıştır (Zhai ve ark., 2023). Çalışmada kullanılan alfa ve beta çeşitlilik indekslerinin özelliklerine ilişkin açıklamalar Tablo 3.2'te gösterilmiştir (Hagerty ve ark., 2020; Karadayı ve Karadayı, 2021).

Tablo 3.2. Alfa ve beta çeşitlilik indekslerinin kullanım amaçları

İndeks türleri	Kullanım amaçları
Alfa çeşitlilik indeksleri	
Gözlemlenen türler	Örnek başına düşen farklı OTU'ların sayısını belirlemek için kullanılır.
ACE	Tür zenginliğinin tahmin edilmesinde kullanılır.
Chao1	ACE'den farklı olarak örnek içindeki nadir türlerin bolluğunu belirlemek için kullanılır.
Shannon	Örnekteki mevcut taksonların hem göreceli bolluğunu (çeşitlilik) hem de dengeli dağılımını (düzensizlik) açıklamak için kullanılır.
Simpson	Örnek zenginliğini oluşturan farklı türlerin göreceli bolluk ölçümü; hem zenginliği hem de dağılım dengesini tespit etmek için kullanılır.
Good's coverage	Örnekte yer alan türlerin grubu temsil edip etmediğinin anlaşılmasında kullanılır.
Beta çeşitlilik indeksleri	
Ağırlıksız Unifrac uzaklıkları	Farklı örneklerde bulunan türlerin var/yok ayrımının yapılmasını sağlar.
Ağırlıklı Unifrac uzaklıkları	Türlerin göreceli bolluklarını ölçer ve genellikle baskın türler arasındaki farkların vurgulanmasını sağlar.

3.7.İstatistiksel Analizler

Çalışma verilerinin istatistiksel analizinde IBM SPSS 26.0 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM Corp., Armonk, NY, USA) paket programı kullanılmıştır. Analiz sonuçları GraphPad Prism programı 9.5 (San Diego, CA, USA) kullanılarak görselleştirilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılımlı değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma ($\bar{x} \pm SS$) ile sunulmuştur.

Deney gruplarının vücut ağırlığı, ağırlık kazanımları ve beden kütle indeksi (BKİ) ortalamaları ile biyokimyasal analizler sonunda elde edilen veriler Tek Yönlü Varyans Analizi (One-way ANOVA) kullanılarak değerlendirilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark çıkan değişkenlerde post-hoc testleri (Tukey testi) uygulanmıştır. Benzer şekilde, çalışma gruplarının OTU bolluk karşılaştırması Kruskal-Wallis veya Mann-Whitney U testleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Ratlarda Vücut Ağırlığı Değişimi ile İlgili Bulgular

Deney gruplarının başlangıç ve son vücut ağırlığı ortalamaları Tablo 4.1’de verilmiştir. Buna göre, başlangıç ($p=0,001$) ve son vücut ağırlığı ($p<0,001$) ortalamaları gruplar arasında farklı bulunmuştur. Başlangıç vücut ağırlığı ortalamaları grup bazında incelendiğinde KON ve AFB1+PRO grupları arasındaki farkın anlamlı olduğu; AFB1 ve PRO gruplarının ise hem KON hem de AFB1+PRO grupları ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmanın sonunda KON grubundaki vücut ağırlığı ortalaması diğer gruplara kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). AFB1, PRO ve AFB1+PRO gruplarının ise son vücut ağırlığı ortalamaları arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.1. Deney gruplarının başlangıç ve son vücut ağırlığı ortalamaları

Ölçümler	KON ($\bar{x}\pm SS$)	AFB1 ($\bar{x}\pm SS$)	PRO ($\bar{x}\pm SS$)	AFB1+PRO ($\bar{x}\pm SS$)	F	p
Başlangıç vücut ağırlığı (g)	167,70 $\pm$ 3,81 ^a	149,25 $\pm$ 4,52 ^{ab}	155,87 $\pm$ 5,74 ^{ab}	137,12 $\pm$ 5,54 ^b	7,221	0,001
Son vücut ağırlığı (g)	227,20 $\pm$ 4,56 ^a	202,00 $\pm$ 4,07 ^b	198,00 $\pm$ 4,15 ^b	194,25 $\pm$ 6,78 ^b	9,795	0,000

Verilerin analizinde Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve sonrasında Tukey Post-Hoc Testi kullanılmıştır.

Not: Farklı üs değerine (a, b) sahip parametreler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Tablo 4.2’de deney gruplarının ortalama vücut ağırlıkları, vücut ağırlığı kazanımları ve BKİ değerlerinin karşılaştırılması verilmiştir. KON grubunun ortalama vücut ağırlığı ve BKİ değeri diğer gruplara kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Buna ek olarak, AFB1+PRO grubunun ortalama vücut ağırlığının 2. haftadan itibaren diğer gruplara göre daha düşük; KON grubunun ise daha yüksek seyrettiği görülmüştür ($p<0,001$) (Şekil 4.1.a). Deney süresince vücut ağırlığı kazanımı en yüksek KON grubunda, en düşük ise PRO grubunda olmuştur. Ancak vücut ağırlığı kazanımı ve boy uzunluğu ortalamaları bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Bununla birlikte, ilk hafta PRO grubunun ortalama vücut ağırlığı kazanımı belirgin bir şekilde artmıştır ($p=0,011$), ancak diğer grupların ilk haftadan itibaren ortalama vücut ağırlığı kazanımları azalma eğilimi göstermiştir (Şekil 4.1.b).

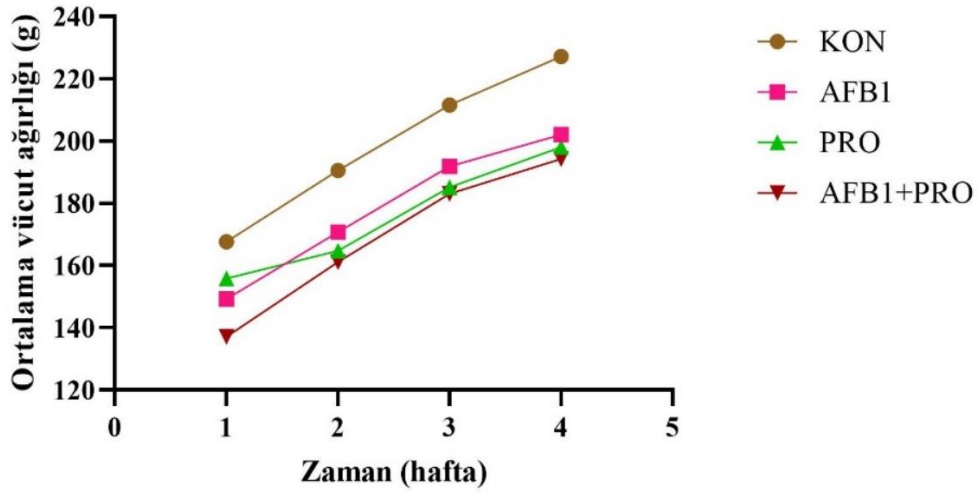
Tablo 4.2. Deney gruplarının ortalama vücut ağırlıkları, vücut ağırlığı kazanımları ve BKİ değerlerinin karşılaştırılması

Ölçümler	KON	AFB1	PRO	AFB1+PRO	F	p
Vücut ağırlığı (g)	199,25±12,93 ^a	178,46±12,01 ^b	175,93±16,17 ^b	168,87±14,39 ^b	8,181	0,000
Vücut ağırlığı kazanımı (g)	59,50±8,26	52,75±7,45	42,12±7,58	57,12±27,43	2,252	0,103
Boy uzunluğu (cm)	19,65±0,70	19,43±0,56	19,12±1,09	19,18±0,65	0,866	0,469
BKİ (g/cm ²)	0,58±0,02 ^a	0,53±0,30 ^b	0,54±0,03 ^b	0,52±0,2 ^b	8,906	0,000

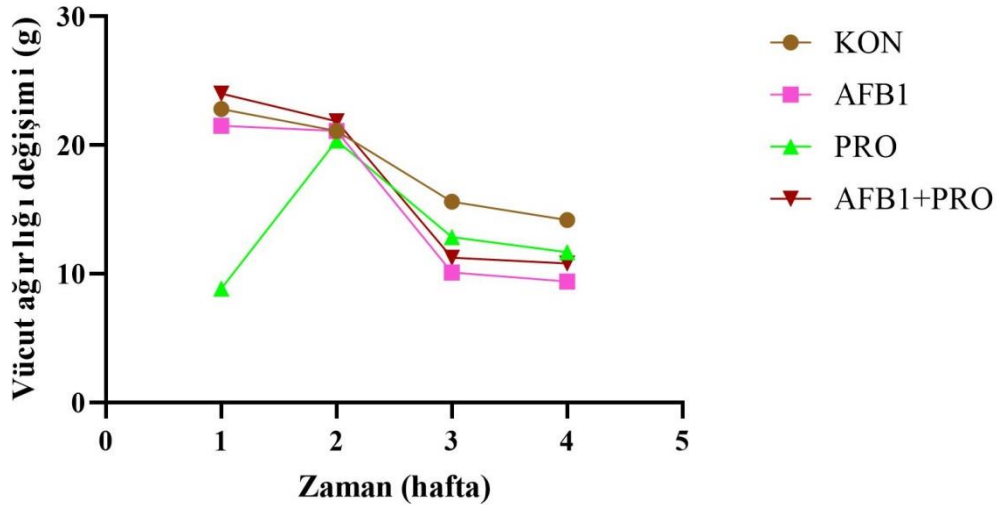
Verilerin analizinde Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve sonrasında Tukey Post-Hoc Testi kullanılmıştır. Kısaltma: BKİ, Beden kütle indeksi.

Not: Farklı üs değerine (a, b) sahip parametreler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

a



b



Şekil 4.1. Deney gruplarının ortalama vücut ağırlıkları (a) ve haftalık vücut ağırlığı değişimleri (b).

4.2.Biyokimyasal Bulgular

Dört haftalık süre boyunca takip edilen deney gruplarının serum örneklerinde araştırılan çeşitli oksidatif stres parametreleri düzeylerinin karşılaştırılması Tablo 4.3'te verilmiştir. Lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeyleri bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). PRO grubunun TAS düzeyi KON ve AFB1 gruplarından anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (KON: $22,54\pm1,3$, AFB1: $18,26\pm1,6$, PRO: $27,83\pm2,73$, $p=0,043$). AFB1+PRO grubunun TAS düzeyi ise diğer gruplarla benzerdir ($p>0,05$). AFB1 grubunda GSH-Px düzeyinin KON

grubuna göre anlamlı olarak azaldığı (KON: 34,18±3,59, AFB1: 21,60±1,84, p=0,030), propolis verilen gruplarda ise anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür (PRO: 28,89±1,94, AFB1+PRO: 35,28±3,09, p>0,05). Bunun aksine, AFB1 grubunun GSH düzeyinin artma eğiliminde olduğu ancak gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (p>0,05). Deney gruplarının SOD düzeyi incelendiğinde AFB1 grubunun en düşük enzim aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır (AFB1: 17,94±5,07, p=0,039). Buna ek olarak, propolis verilen grupların SOD düzeyi KON grubuna göre azalma eğilimi gösterse de bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (KON: 29,59±2,91, PRO: 25,67±0,97, AFB1+PRO: 26,91±0,93, p>0,05). Benzer şekilde en düşük CAT aktivitesine sahip grup AFB1 olmuştur (AFB1: 21,04±2,02, p=0,059). PRO ve AFB1+PRO gruplarında CAT düzeyi KON grubuna kıyasla azalma eğilimi göstermiştir, ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (KON: 27,44±1,05, PRO: 23,50±1,31, AFB1+PRO: 22,39±1,50, p>0,05).

Tablo 4.3. Deney gruplarının serumlarında çeşitli oksidatif stres parametreleri düzeylerinin karşılaştırılması

Biyokimyasal parametreler	KON (n=8)	AFB1 (n=8)	PRO (n=8)	AFB1+PRO (n=8)	F	p
MDA (nmol/mL)	14,69±1,62	11,62±1,13	14,96±1,41	15,91±2,61	1,049	0,387
TAS	22,54±1,3 ^a	18,26±1,6 ^a	27,83±2,73 ^b	24,96±2,31 ^{ab}	3,039	0,056
GSH-Px (ng/mL)	34,18±3,59 ^a	21,60±1,84 ^b	28,89±1,94 ^{ab}	35,28±3,09 ^a	4,587	0,015
GSH (mg/L)	152,76±15,98	171,73±9,35	142,55±10,81	144,76±11,59	1,184	0,334
SOD (ng/mL)	29,59±2,91 ^a	17,94±5,07 ^b	25,67±0,97 ^{ab}	26,91±0,93 ^{ab}	3,340	0,039
CAT (ng/mL)	27,44±1,05 ^a	21,04±2,02 ^b	23,50±1,31 ^{ab}	22,39±1,50 ^{ab}	3,017	0,059

Verilerin analizinde Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve sonrasında Tukey Post-Hoc Testi kullanılmıştır. Kısaltmalar: MDA, Malondialdehit; TAS, Toplam antioksidan kapasite; GSH-Px, Glutasyon peroksidaz; GSH, Glutasyon; SOD, Süperoksit dismutaz; CAT, Katalaz.

Not: Farklı üs değerine (a, b) sahip parametreler istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).

4.3.Mikrobiyota Analizi

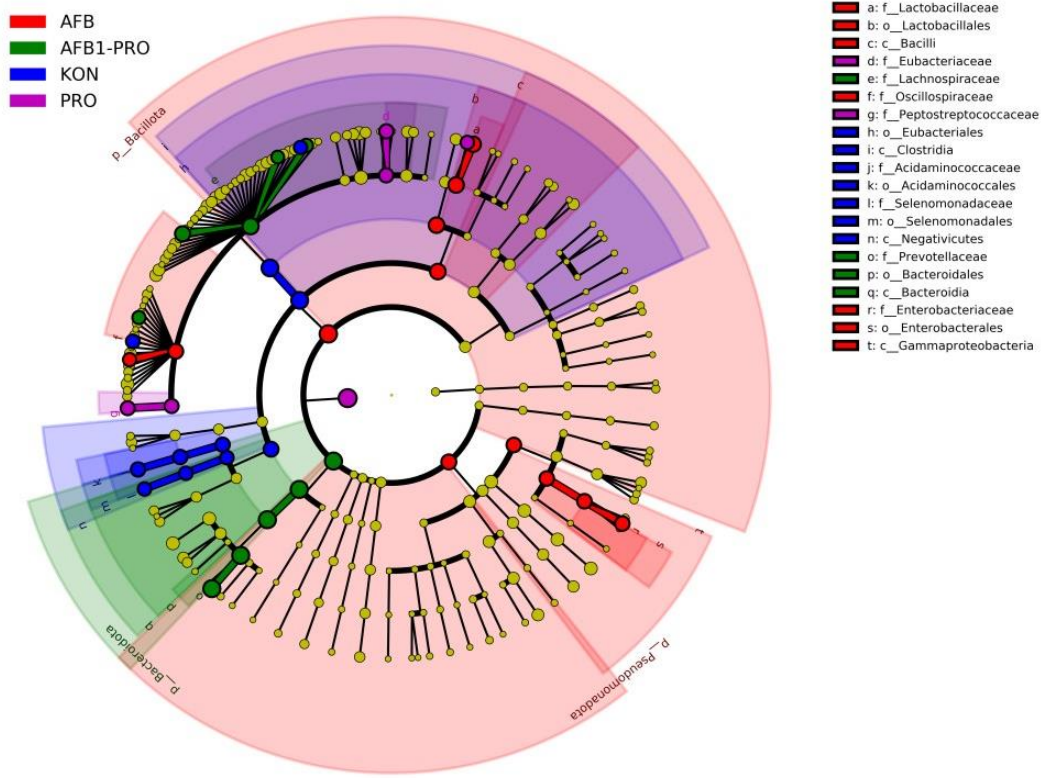
Deney gruplarının gaita örneklerinde yapılan bağırsak mikrobiyotası analizine ait açıklanabilir türleri gösteren OTU ağacı Şekil 4.2’de verilmiştir. Buna göre en baskın türlerin *Firmicutes*, *Proteobacteria* ve *Bacteroidetes* filumlarına ait olduğu görülmüştür.

KON grubunda filumların bu baskın türlere olan katkıları taksonomik düzeyleri göz önüne alınarak incelendiğinde; *Firmicutes* filumuna ait olan Clostridia ve Negativicutes sınıflarının; sırasıyla Eubacteriales, Acidaminococcales ve Selenomonadales takımlarından Acidaminococcales’e ait Acidaminococcaceae ailesi ve Selenomonadales’e ait Selenomonadaceae ailesinin yüksek göreceli bollukta olduğu saptanmıştır.

AFB1 grubunda filumların baskın türlere olan katkıları taksonomik düzeylerine göre incelendiğinde; *Firmicutes* ve *Proteobacteria* filumlarına ait olan Bacilli, Gammaproteobacteria ve Clostridia sınıflarının; sırasıyla Lactobacillales, Enterobacterales ve Eubacteriales takımlarından Lactobacillales’e ait Lactobacillaceae ailesi, Enterobacterales’e ait Enterobacteriaceae ailesi, Eubacteriales’e ait Oscillospiraceae ailesinin yüksek göreceli bollukta olduğu görülmüştür.

PRO grubunda filumların baskın türlere olan katkıları taksonomik düzeylerine göre incelendiğinde; *Firmicutes* filumuna ait olan Clostridia sınıfının Eubacteriales takımına ait olan Peptostreptococcaceae ve Eubacteriaceae ailelerinin baskın türlerin çeşitliliğine yüksek katkı verdikleri saptanmıştır.

AFB1+PRO grubunda filumların baskın türlere olan katkıları taksonomik düzeylerine göre incelendiğinde; *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* filumlarına ait olan Clostridia ve Bacteroidia sınıflarının; sırasıyla Eubacteriales ve Bacteroidales takımlarından Eubacteriales’e ait olan Lachnospiraceae ailesi ve Bacteroidales’e ait olan Prevotellaceae ailesinin baskın türlere katkı verdikleri belirlenmiştir.



Şekil 4.2. Deney gruplarının bakteriyel taksonomik OTU ağacı. Taksonlar dıştan içe doğru sıralanmıştır. Takson halkalarının büyüklüğü baskın türlere ait göreceli bolluğu göstermektedir. OTU ağacındaki farklı renkler farklı filumları temsil etmektedir.

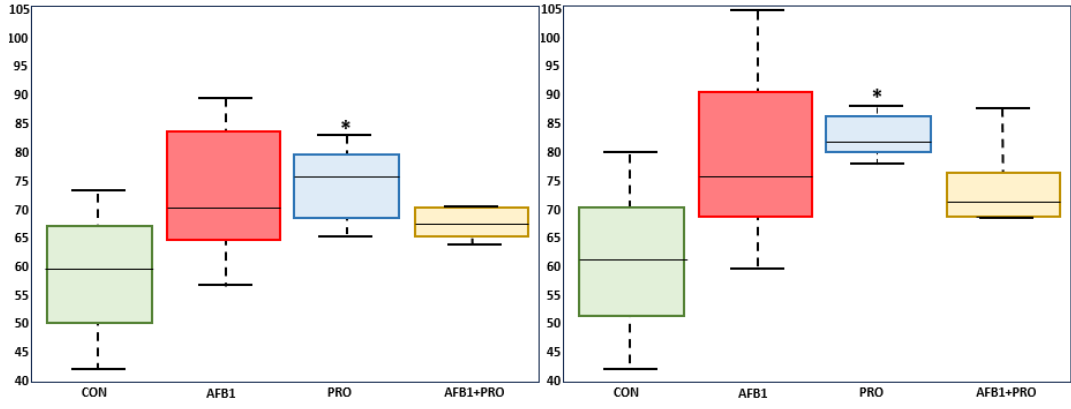
Deney gruplarının grup içi topluluk zenginliği ve çeşitliliğinin karşılaştırılması amacıyla hesaplanan alfa çeşitlilik indekslerine ait kutu grafikleri Şekil 4.3'te verilmiştir. Şekil 4.3a'da gözlemlenen türlere ait kutu grafiği gösterilmiştir. Buna göre; grup içerisinde gözlemlenen türlerin sayısı PRO grubunda KON grubuna göre anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur ($p=0,010$). AFB1 ve AFB1+PRO grubunda gözlemlenen türlerin sayısı KON grubuna göre daha fazla olsa bu fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Topluluğun zenginliğini gösteren Chao 1 ve ACE indekslerine ait kutu grafikleri Şekil 4.3b ve Şekil 4.3c'de verilmiştir. Chao 1 indeksine göre; deney gruplarının tür bollukları arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p=0,037$). PRO grubunda KON grubuna göre tür bolluğunun daha fazla olduğu saptanmıştır ($p=0,011$). Bununla birlikte AFB1 ve AFB1+PRO gruplarının tür bolluğu KON grubuna göre daha fazla olmasına rağmen bu fark anlamlı değildir ($p>0,05$). ACE indeksine göre; deney gruplarının tür bollukları arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p=0,013$). PRO ve AFB1 grupları KON grubuna

göre tür bolluğunun daha fazla olduğu saptanmıştır. Diğer taraftan, AFB1+PRO grubu ve KON grubunun birbirine benzer olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$).

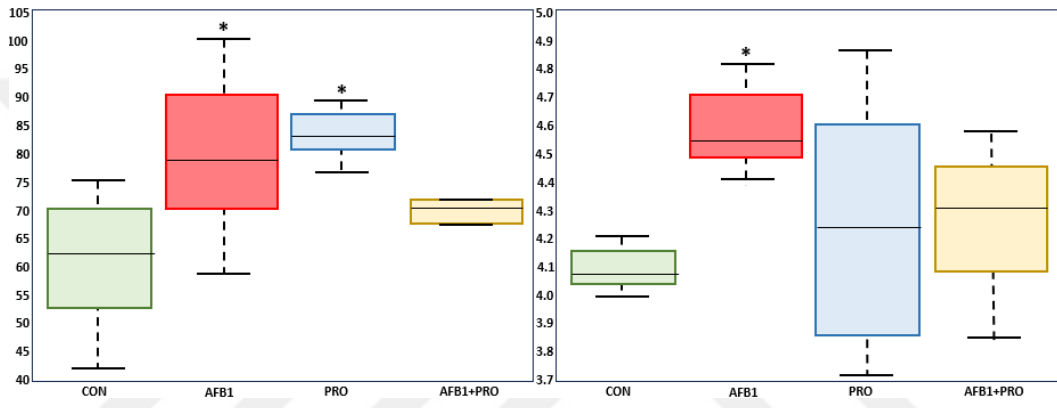
Grup içi türlerin çeşitliliğini belirlemede kullanılan Shannon ve Simpson indekslerine ait kutu grafikleri Şekil 4.3d ve Şekil 4.3e’de gösterilmiştir. Shannon indeksinde AFB1 grubunun KON grubuna göre tür çeşitliliği daha yüksek bulunmuştur ($p=0,006$). Simpson indeksine göre ise PRO grubunun KON grubuna göre tür çeşitliliği daha yüksektir ($p=0,018$). Diğer deney gruplarının tür çeşitliliği KON grubundan daha yüksek olmasına rağmen bu fark anlamlı değildir ($p>0,05$).

Grup içi türlerin grubu temsil edip etmediğinin araştırılmasında kullanılan Good’s coverage indeksine ait kutu grafiği Şekil 4.3f’de verilmiştir. Buna göre; deney gruplarının ait olduğu grubu temsil ettiği belirlenmiştir ($p>0,05$).



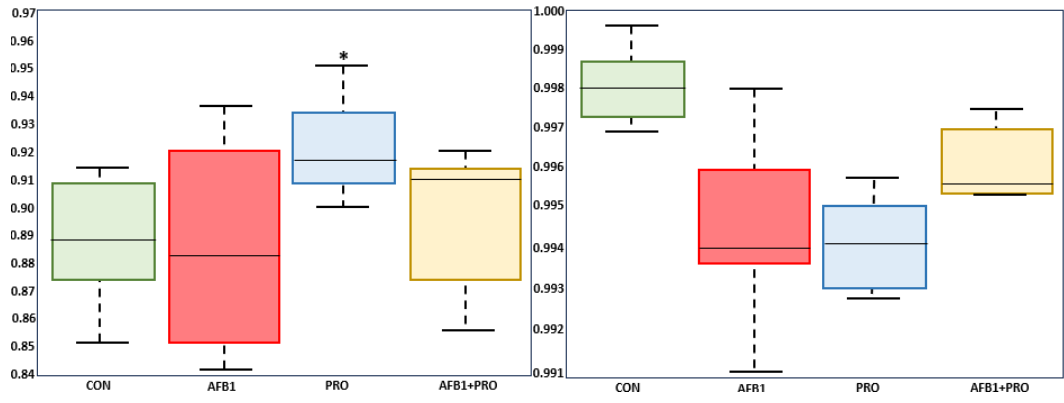
a. Gözlemlenen türler kutu grafiği ($p>0,05$)

b. Chao 1 indeksi kutu grafiği ($p=0,037$)



c. ACE indeksi kutu grafiği ($p=0,013$)

d. Shannon kutu grafiği ($p>0,05$)

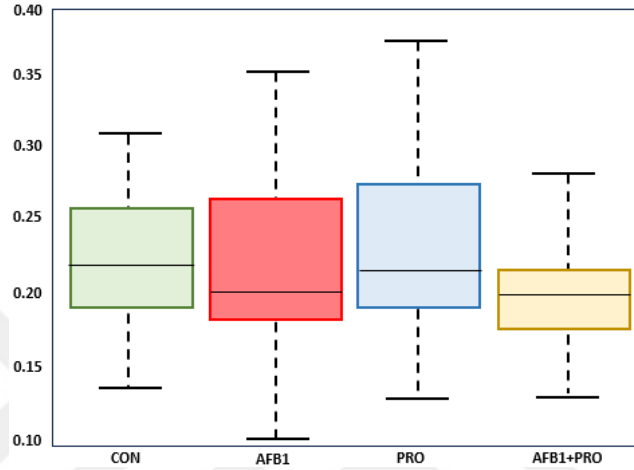


e. Simpson kutu grafiği ($p>0,05$)

f. Good's coverage indeksi ($p>0,05$)

Şekil 4.3. Deney gruplarının alfa çeşitlilik indeksleri

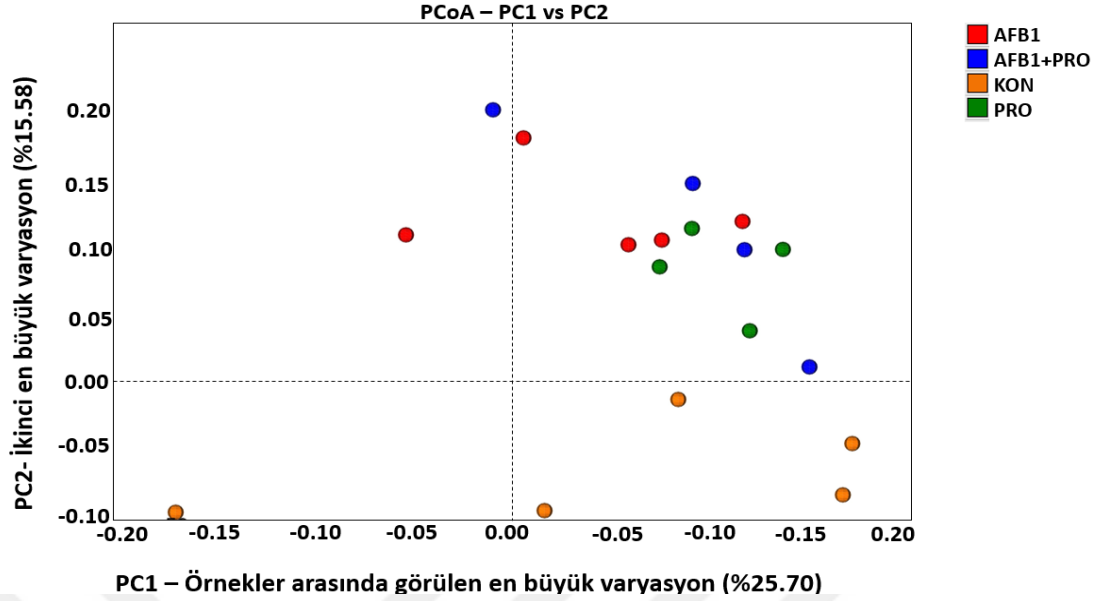
Beta çeşitlilik örnekler arasındaki mikrobiyal toplulukların varyasyonlarını göstermektedir. Deney grupları arasındaki beta çeşitlilik Unifrac uzaklık matrisi grafiği Şekil 4.4'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında; KON grubuna göre AFB1 ve PRO gruplarında çeşitliliğin azaldığı, AFB1+PRO grubunda ise çeşitliliğin arttığı görülmüştür. Ancak beta çeşitlilik açısından deney grupları arasındaki bu fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).



Ağırlıklı Unifrac uzaklık matrisi kutu grafiği ($p>0,05$)

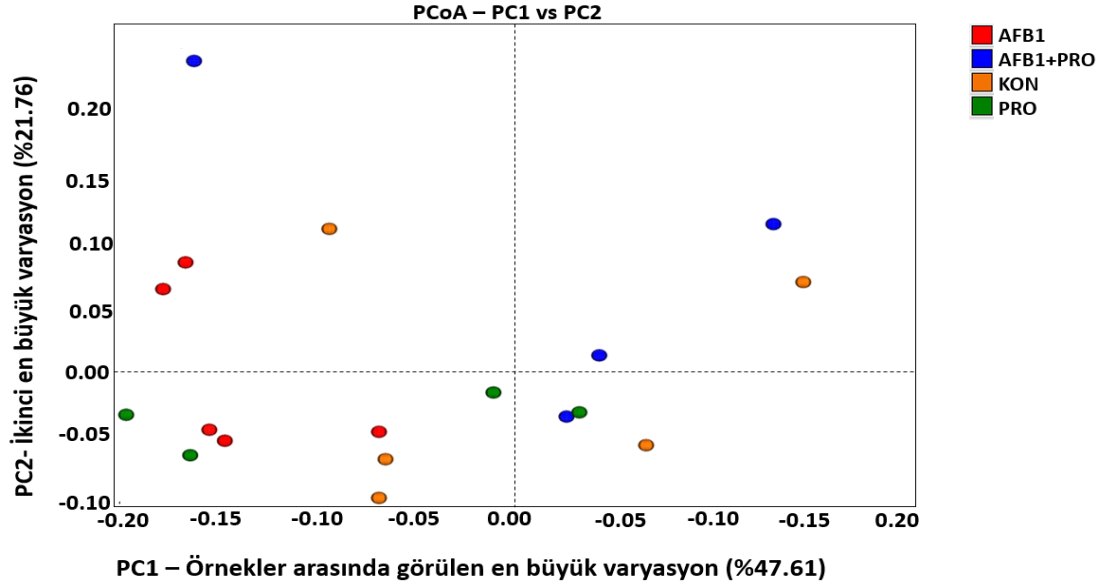
Şekil 4.4. Beta çeşitlilik ağırlıklı Unifrac uzaklık matrisi

Ağırlıksız Unifrac uzaklıkları için temel koordinat grafiği Şekil 4.5'te verilmiştir. Buna göre; KON grubunda KON_8 numaralı örnek hariç diğer tüm örneklerin PRO, AFB1 ve AFB1+PRO gruplarından ayrılarak kümelendiği görülmüştür. AFB1+PRO grubunda ise AFB1+PRO_8 numaralı örnek hariç diğer tüm örneklerin KON, PRO ve AFB1 gruplarından ayrılarak kümelendiği saptanmıştır.



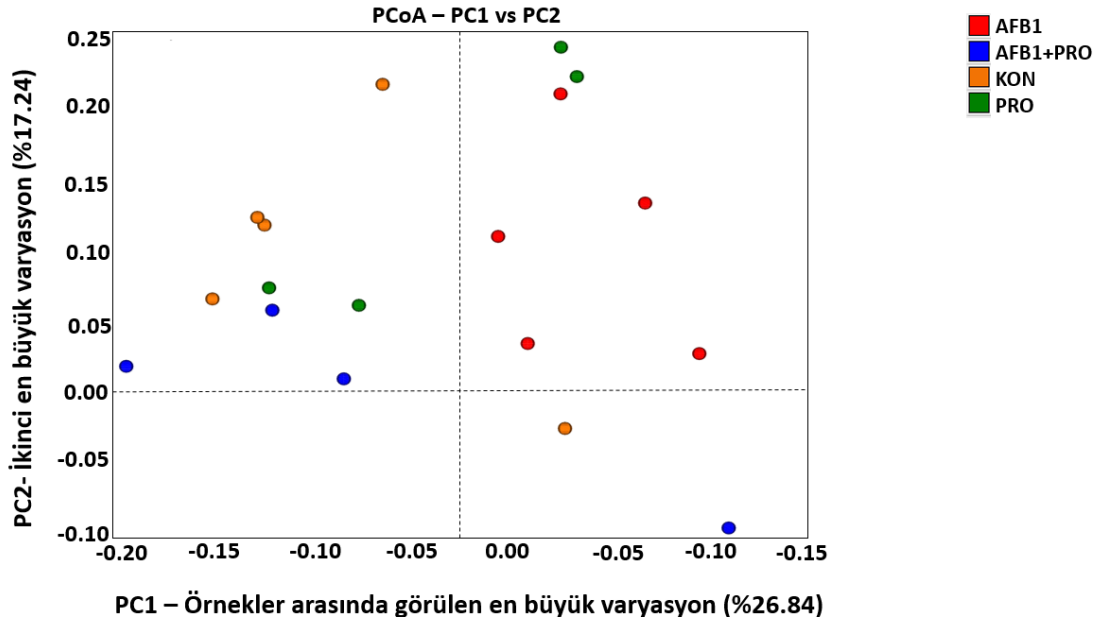
Şekil 4.5. Ağırlıksız UniFrac uzaklıklarına dayalı olarak deney gruplarından alınan bağırsak mikrobiyotasının temel koordinat analizi (PCoA). PC1 ve PC2 tarafından açıklanan varyasyon yüzdesi eksenlerde belirtilmiştir. Gruplar renklerle ayırt edilmiştir. Her bir renkli sembol tek bir örneğe karşılık gelmektedir.

Ağırlıklı UniFrac uzaklıkları için temel koordinat grafiği Şekil 4.6’da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; deney grupları arasında türlere ait göreceli bollukların birbirinden ayrılmadığı ve benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.



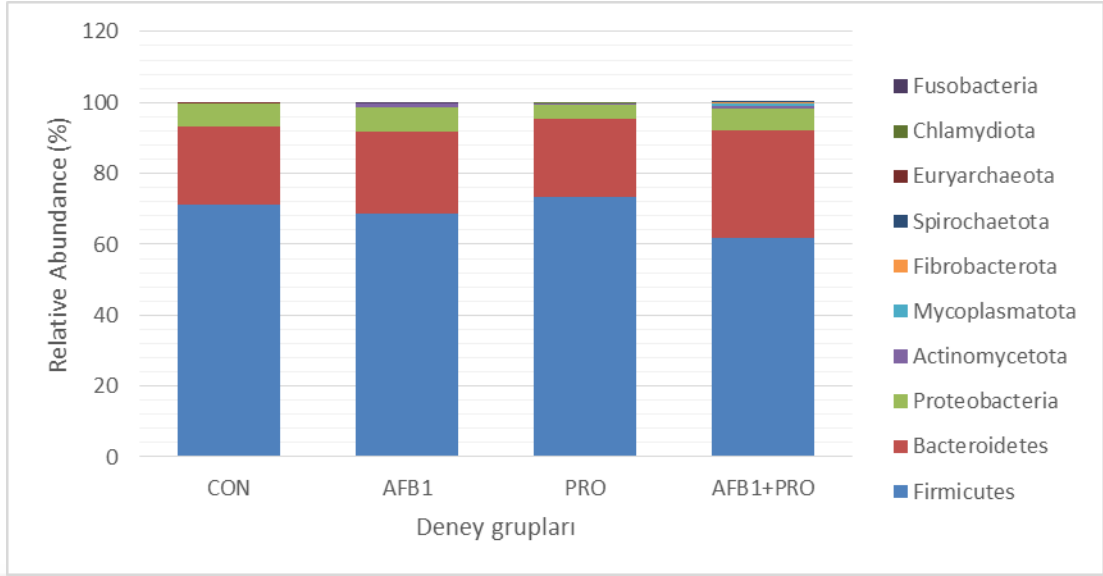
Şekil 4.6. Ağırlıklı UniFrac uzaklıklarına dayalı olarak deney gruplarından alınan bağırsak mikrobiyotasının temel koordinat analizi (PCoA). PC1 ve PC2 tarafından açıklanan varyasyon yüzdesi eksenlerde belirtilmiştir. Gruplar renklerle ayırt edilmiştir. Her bir renkli sembol tek bir örneğe karşılık gelmektedir.

Bray-Curtis benzeşmezlik indeksine dayanan temel koordinat analizi grafiği Şekil 4.7'de verilmiştir. KON ve AFB1+PRO gruplarındaki ratlarda gaita mikrobiyal topluluklarının, AFB1 ve PRO gruplarındaki ratlara göre birbirine daha benzer olduğu görülmüştür. Ayrıca, bu gruplar, PC2 ile gösterildiği gibi, açıkça farklı kümelere ayrılmıştır. Dolayısıyla, AFB1 uygulaması ve propolise takviyesi ratlarda bağırsak mikrobiyotası topluluk yapısını değiştirmiştir.



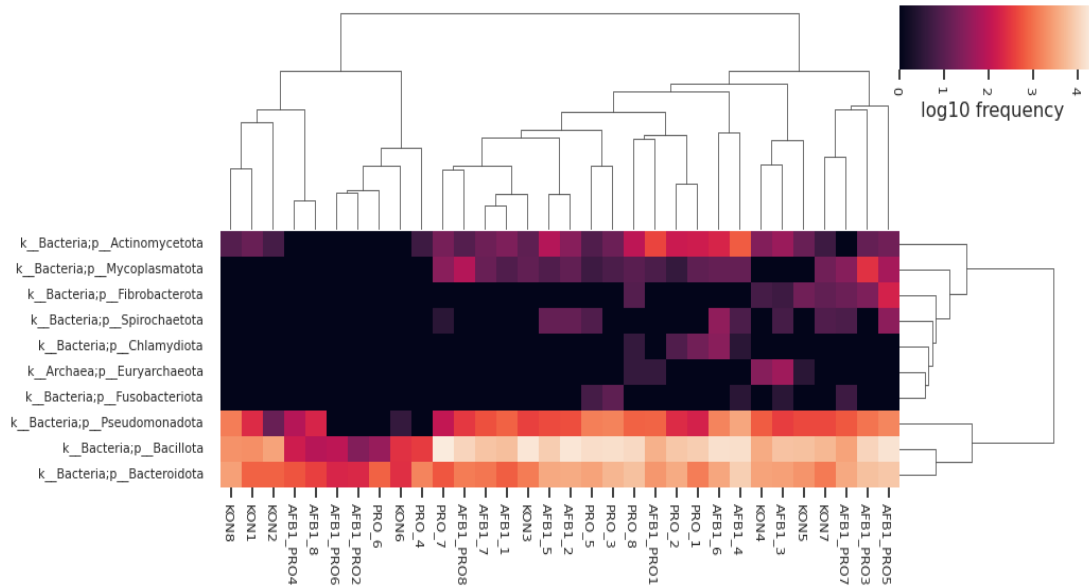
Şekil 4.7. Bray-Curtis benzeşmezlik indeksine dayalı olarak deney gruplarından alınan bağırsak mikrobiyotasının temel koordinat analizi (PCoA). AFB1 ve PRO uygulamasına göre örneklerde bir kümelenme gözlenmiştir. PC1 ve PC2 tarafından açıklanan varyasyon yüzdesi eksenlerde belirtilmiştir. Gruplar renklerle ayırt edilmiştir. Her bir renkli sembol tek bir örneğe karşılık gelmektedir.

Deney gruplarındaki bağırsak mikrobiyal topluluğunu araştırmak için Venn diyagramı kullanılarak ortak ve benzersiz OTU'ların analizi yapılmıştır (Şekil 4.8). OTU'ların çoğu dört deney grubu arasında paylaşılmıştır (%46,7). KON, AFB1, PRO ve AFB1+PRO gruplarının OTU sayıları sırasıyla 9 (%4,2), 20 (%9,4), 17 (%8) ve 16 (%7,5) olarak bulunmuştur.



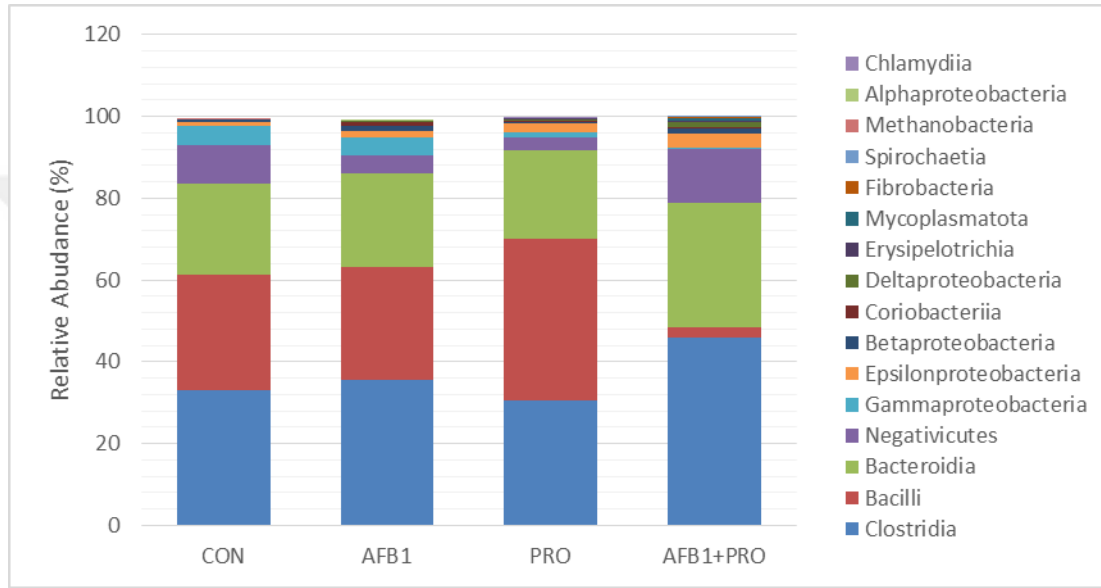
Şekil 4.9. Deney gruplarına göre bağırsak mikrobiyotasının filum düzeyindeki göreceli bollukları.

Deney gruplarına göre bağırsak mikrobiyotasının filum düzeyindeki göreceli bolluklarının ısı haritası Şekil 4.10'da verilmiştir. Isı haritası gruplar arasında baskın veya baskın olmayan filumların ayırt edilmesini sağlamaktadır. Buna göre; *Firmicutes* filumunun en yoğun olduğu PRO_7 numaralı örnektir. Proteobacteria ve Bacteroidetes filumlarını en yoğun içeren örnek AFB1_4 numaralı örnektir.



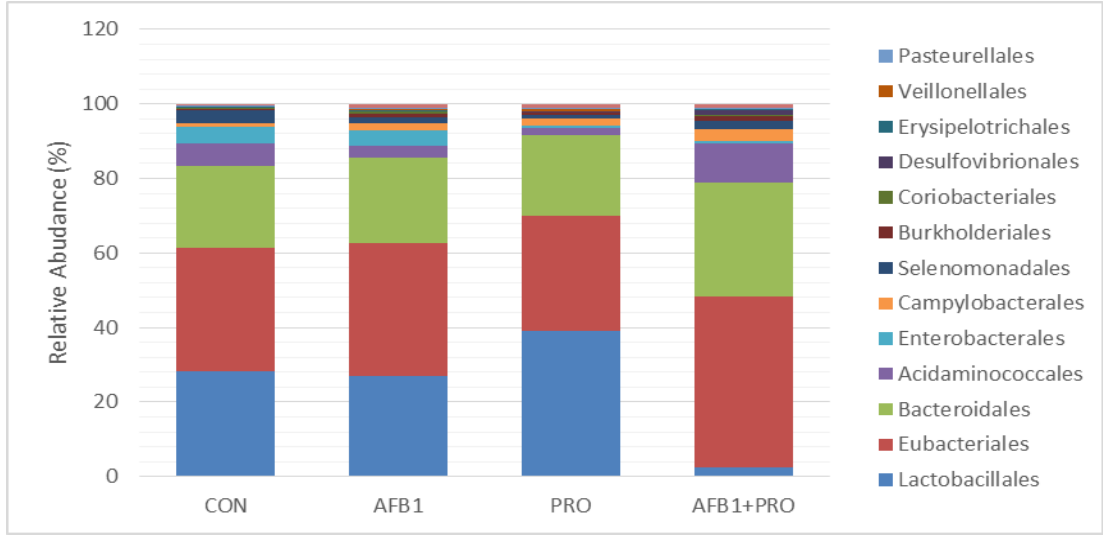
Şekil 4.10. Deney gruplarına göre bağırsak mikrobiyotasının filum düzeyindeki göreceli bolluklarının ısı haritası.

Deney gruplarına göre bağırsak mikrobiyotasının sınıf düzeyindeki göreceli bollukları Şekil 4.11’de verilmiştir. Buna göre; tüm gruplarda en yüksek göreceli bolluğa sahip sınıflar sırasıyla Clostridia, Bacteroidia, Bacilli, Negativicutes ve Gammaproteobacteria’dır. Deney grupları karşılaştırıldığında; Clostridia (%45,865), Bacteroidia (%30,595) ve Negativicutes (%12,962) göreceli bolluklarının en yüksek AFB1+PRO grubunda olduğu belirlenmiştir. Bacilli sınıfının en yüksek göreceli bolluğa sahip olduğu grup PRO (%39,264), en düşük grup AFB1+PRO (%2,514) grubudur.



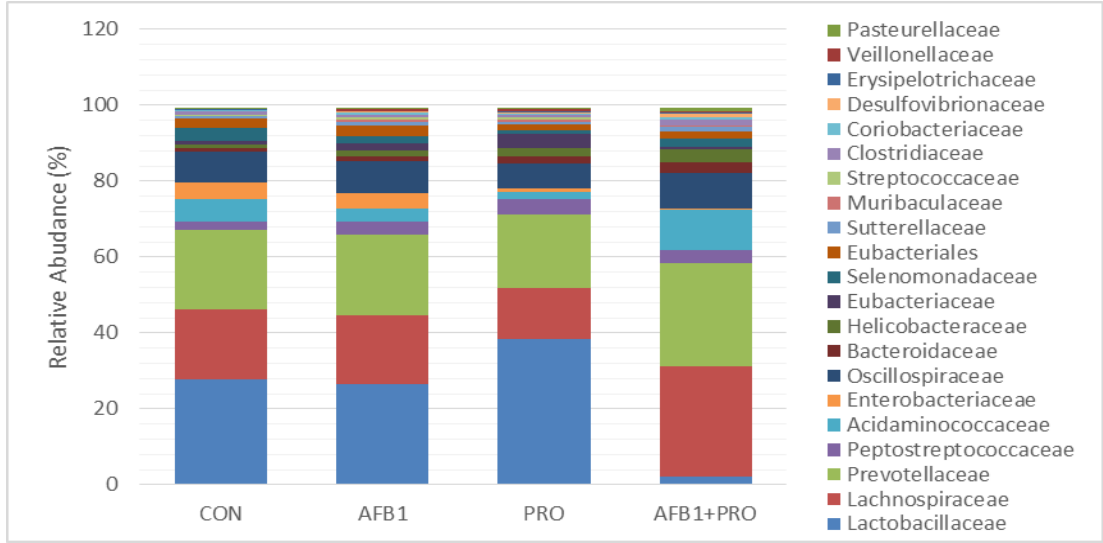
Şekil 4.11. Deney gruplarına göre bağırsak mikrobiyotasının sınıf düzeyindeki göreceli bollukları.

Deney gruplarına göre bağırsak mikrobiyotasının takım düzeyindeki göreceli bollukları Şekil 4.12’de verilmiştir. Buna göre; tüm gruplarda en yüksek göreceli bolluğa sahip takımlar sırasıyla Lactobacillales, Eubacteriales, Bacteroidales ve Acidominococcales’tir. Lactobacillales takımının en yüksek göreceli bolluğa sahip olduğu grup PRO (%39,218), en düşük grup AFB1+PRO’dur (%2,504). Eubacteriales, Bacteroidales ve Acidominococcales göreceli bolluklarının en yüksek olduğu grup AFB1+PRO (sırasıyla %45,865, %30,595 ve %10,48), en düşük grup PRO’dur (sırasıyla %30,672, %21,772 ve %1,925).



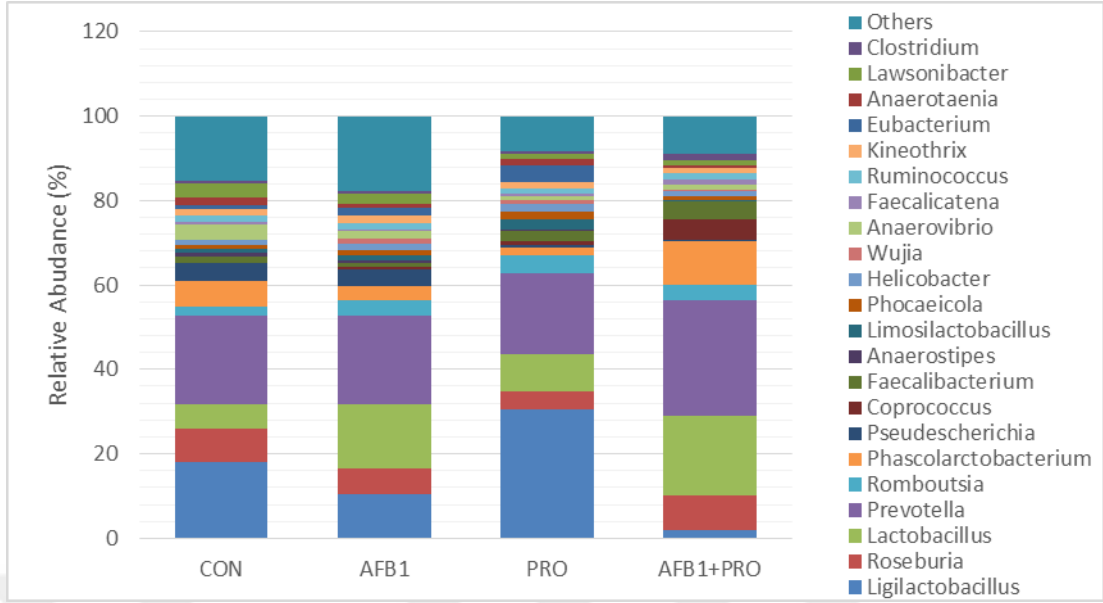
Şekil 4.12. Deney gruplarına göre bağırsak mikrobiyotasının takım düzeyindeki göreceli bollukları.

Deney gruplarına göre bağırsak mikrobiyotasının aile düzeyindeki göreceli bollukları Şekil 4.13’de verilmiştir. Buna göre; tüm gruplarda en yüksek göreceli bolluğa sahip aileler Lactobacillaceae, Lachnospiraceae, Prevotellaceae, Acidaminococcaceae, Oscillospiraceae, Peptostreptococcaceae ve Enterobacteriaceae’dir. Lactobacillaceae ailesinin en yüksek göreceli bolluğa sahip olduğu grup PRO (%38,556), en düşük grup AFB1+PRO’dur (%2,287). Lachnospiraceae, Prevotellaceae, Oscillospiraceae ve Acidaminococcaceae göreceli bolluklarının en yüksek olduğu grup AFB1+PRO (sırasıyla %28,774, %27,344, %9,255 ve %10,48), en düşük grup PRO’dur (sırasıyla %13,396, %19,155, %6,79 ve %1,925). Enterobacteriaceae göreceli bolluğu KON ve AFB1 grubunda benzer olup sırasıyla %4,262 ve %4,226’dır.



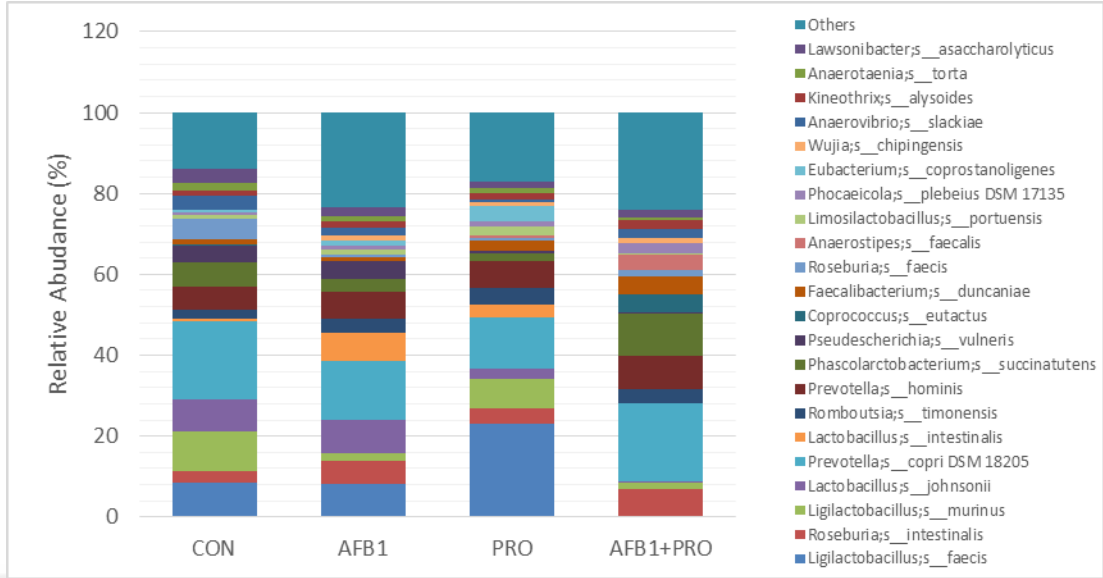
Şekil 4.13. Deney gruplarına göre bağırsak mikrobiyotasının aile düzeyindeki göreceli bollukları.

Deney gruplarına göre bağırsak mikrobiyotasının cins düzeyindeki göreceli bollukları Şekil 4.14’de verilmiştir. Buna göre; KON grubunda en yüksek göreceli bolluğa sahip cinsler sırasıyla *Prevotella* (%20,914), *Ligilactobacillus* (%18,059), *Roseburia* (%7,904), *Phascolarctobacterium* (%5,963) ve *Lactobacillus*’tur (%5,79). AFB1 grubunda en yüksek göreceli bolluğa sahip cinsler sırasıyla *Prevotella* (%21,143), *Lactobacillus* (%15,239), *Ligilactobacillus* (%10,305), *Roseburia* (%6,167) ve *Pseudescherichia* (%4,211)’dir. PRO grubunda en yüksek göreceli bolluğa sahip cinsler sırasıyla *Ligilactobacillus* (%30,372), *Prevotella* (%19,155), *Lactobacillus* (%8,748), *Roseburia* (%4,45) ve *Romboutsia* (%3,518)’dir. AFB1+PRO grubunda en yüksek göreceli bolluğa sahip cinsler sırasıyla *Prevotella* (%27,344), *Lactobacillus* (%19,169), *Phascolarctobacterium* (%10,48), *Roseburia* (%8,125), *Coprococcus* (%4,92) ve *Faecalibacterium* (%4,346)’dur.



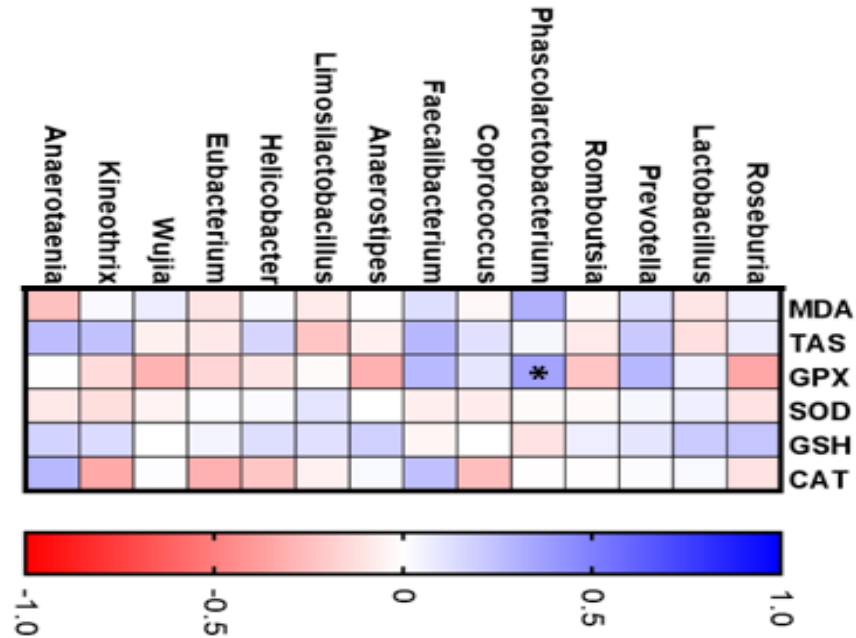
Şekil 4.14. Deney gruplarına göre bağırsak mikrobiyotasının cins düzeyindeki göreceli bollukları.

Deney gruplarına göre bağırsak mikrobiyotasının tür düzeyindeki göreceli bollukları Şekil 4.15’de verilmiştir. Buna göre; KON grubunda en yüksek göreceli bolluğa sahip türler sırasıyla *Prevotella copri* DSM 18205 (%19,313), *Ligilactobacillus murinus* (%9,62), *Ligilactobacillus faecis* (%8,439), *Lactobacillus johnsonii* (%8,073) ve *Phascolarctobacterium succinatutens* (%5,963)’tir. AFB1 grubunda en yüksek göreceli bolluğa sahip türler sırasıyla *Prevotella copri* DSM 18205 (%14,429), *Ligilactobacillus faecis* (%8,189), *Lactobacillus johnsonii* (%8,159), *Prevotella hominis* (%6,714) ve *Roseburia intestinalis* (%5,525)’tir. PRO grubunda en yüksek göreceli bolluğa sahip türler sırasıyla *Ligilactobacillus faecis* (%23,112), *Prevotella copri* DSM 18205 (%12,564), *Ligilactobacillus murinus* (%7,26), *Prevotella hominis* (%6,59) ve *Romboutsia timonensis* (%4,273)’tür. AFB1+PRO grubunda en yüksek göreceli bolluğa sahip türler sırasıyla *Prevotella copri* DSM 18205 (%19,313), *Phascolarctobacterium succinatutens* (%10,48), *Prevotella hominis* (%8,031), *Roseburia intestinalis* (%6,73) ve *Coprococcus eutactus* (%4,747)’tur.



Şekil 4.15. Deney gruplarına göre bağırsak mikrobiyotasının tür düzeyindeki göreceli bollukları.

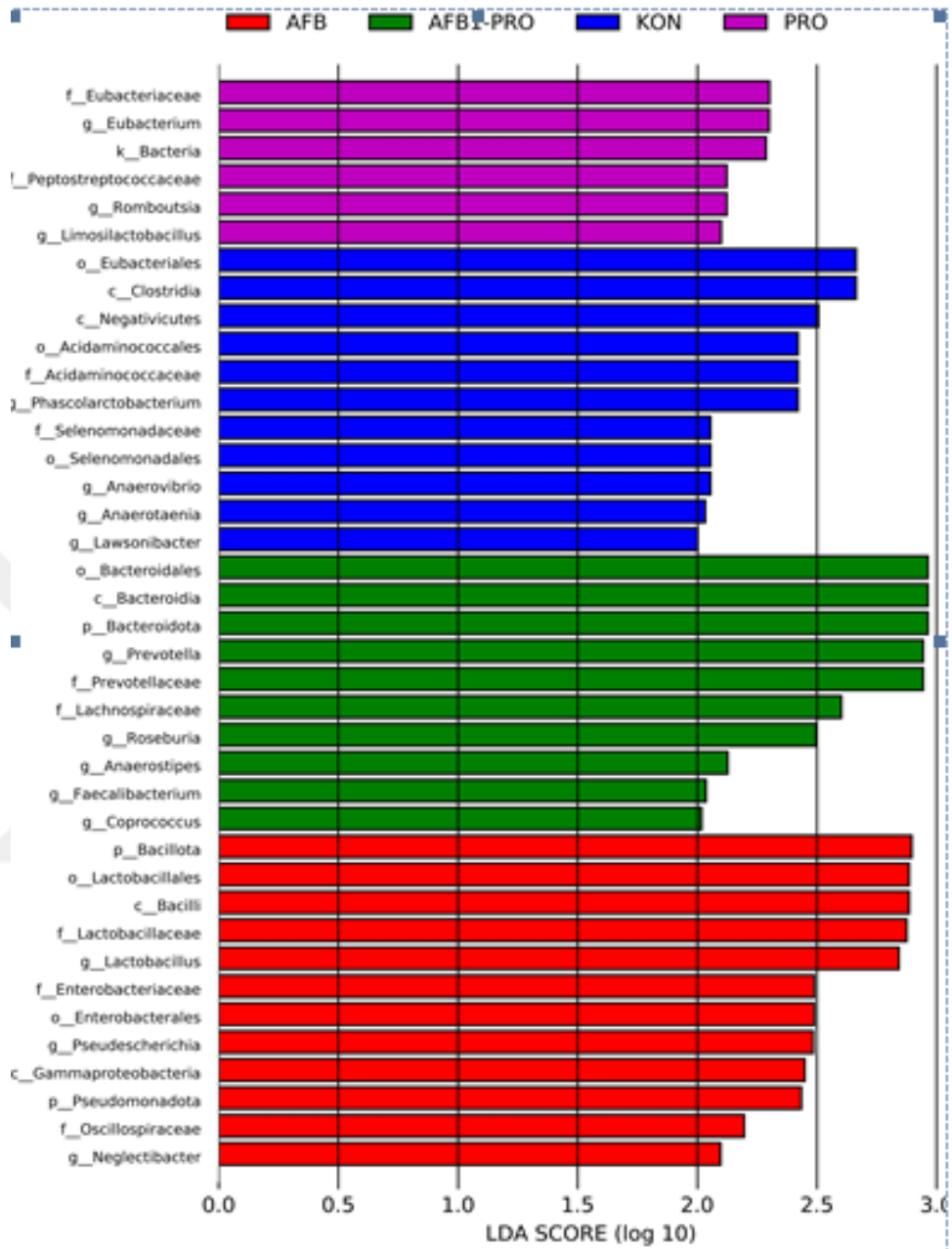
Yapılan Pearson's korelasyon analizi sonucunda bağırsak mikrobiyotası (cins düzeyinde) ve oksidatif stres parametreleri arasındaki ilişki Şekil 4.16'da verilmiştir. Buna göre, *Phascolarctobacterium* ve GSH-Px düzeyi arasında pozitif yönde ilişki bulunmuştur (Pearson's $r = 0.355$, $p = 0.048$).



Şekil 4.16. Bağırsak mikrobiyotası ve oksidatif stres parametreleri arasındaki ilişkinin ısı haritası. Veriler Pearson's korelasyon testi kullanılarak analiz edilmiştir, * $p < 0.05$.

Propolis ve AFB1 uygulamasından sonra bakteriyel taksonomideki spesifik değişiklikleri tanımlamak için doğrusal diskriminant analizi etki boyutu (LEfSe) analizi yapılmıştır. Kontrol grubunda baskın bakteri filumunun Clostridia olduğu Şekil 4.17’de gösterilmiştir. PRO, AFB1 ve AFB1+PRO gruplarında bazı cinsler belirgin olarak artmıştır (LDA skoru>2, $p<0,05$). Bunlar; sırasıyla *Eubacterium*, *Romboutsia*, *Limosilalactobacillus*; *Lactobacillus*, *Pseudescherichia*, *Neglectibacter*; *Roseburia*, *Anaerostipes*, *Faecalibacterium* ve *Coprococcus* bakteri cinsleridir.





Şekil 4.17. Deney gruplarında bağırsak mikrobiyotasının LEfSe sonuçlarının karşılaştırması.

5. TARTIŞMA

AFB1 buğday, mısır ve kuruyemiş gibi çeşitli tarım ürünlerinde bulunmakta, kontamine besinlerin tüketimi sonucu insanlar ve hayvanlar üzerinde birçok yan etkiye neden olabilmektedir (Mohajer ve ark., 2021). Bu toksinin hepatotoksik (Gerdemann ve ark., 2023), nörotoksik (Adedara ve ark., 2023), mutajenik (Moore ve ark., 2018), teratojenik (Lauer ve ark., 2019), immünojenik (Wang ve ark., 2023), genotoksik (Budin ve ark., 2021) ve karsinojenik (Costa ve ark., 2021) etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir. Küresel çapta AFB1'in toksik etkilerinin yaygın olmasından kaynaklı olarak bu konuda yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Güncel çalışmalar ele alındığında, AFB1 maruziyetinin karaciğer hasarı, üreme sistemi ve fetal gelişim üzerindeki etkilerine odaklanılmıştır (da Silva ve ark., 2021; Fasihi-Ramandi ve ark., 2023). Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda AFB1 maruziyetinin oksidatif stresi, apoptozu ve inflamatuvar yanıtı indükleyerek (Limaye ve ark., 2018) hepatositler, kupffer ve karaciğer yıldız hücrelerin histolojik yapısına zarar verdiği belirlenmiştir (da Silva ve ark., 2021). Diğer taraftan, maruziyet dozuna bağlı olarak testislerde biriken AFB1'in spermatogenezin inhibisyonu, sperm anormallikleri ve testiküler atrofiye sebep olabileceği ifade edilmiştir (Ortatatli ve ark., 2002). Bununla birlikte, oositlerin matürasyonu ve embriyo oluşturma yeteneklerini azaltarak dişi üreme sistemi üzerinde olumsuz etkilere yol açabileceği ileri sürülmüştür (Jiang ve ark., 2019). İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalarda ise AFB1 ile kontamine besinlerin tüketimi sonucu karaciğer, böbrek, beyin ve üreme sistemi üzerinde toksik etkiler görülmüştür (Aljazzar ve ark., 2023; He ve ark., 2023). Fakat AFB1'in bağırsak dokusu ve metabolizması üzerindeki etkilerini araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Diğer taraftan, aflatoksikozis kaynaklı yan etkilerin azaltılması ve önlenmesi için biyolojik detoksifikasyon yöntemleri geliştirilmektedir. Bu çalışmalarda probiyotikler (Emadi ve

ark., 2022) ve antioksidan özelliğe sahip kurkumin, yeşil çay ekstraktı ve resveratrol gibi maddeler (Alm-Eldeen ve ark., 2015) detoksifikasyon ajanı olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar antioksidanların aflatoksikozisin yan etkilerini azalttığını gösterse de bağırsak dokusundaki metabolik değişikliklerin önlenmesine yönelik yeterli çalışma olmaması literatürdeki eksiklikler arasındadır. Buna ek olarak, yapısında çok sayıda antioksidan bileşiği bulunduran propolisin AFB1 maruziyetinin neden olduğu oksidatif stres, bağırsak doku hasarı ve disbiyozunu araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yapılan bu çalışmada ilk kez düşük doz AFB1 (25 mcg/kg/gün) uygulaması sonucu propolis takviyesinin koruyucu etkisi kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Bu çalışmada öncelikle düşük doz AFB1 uygulaması ve propolis takviyesinin oksidatif stres üzerine etkileri biyokimyasal yöntemler ile bağırsak mikrobiyota kompozisyonuna etkileri ise 16S rRNA metagenom dizileme yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır.

5.1.Ratlarda Vücut Ağırlığı Değişimi ile İlgili Bulguların Değerlendirilmesi

AFB1 lipogenezi ve protein sentezini inhibe ederek karaciğer disfonksiyonuna ve anoreksiyaya neden olabilmektedir (Abbasi ve ark., 2018). AFB1'in leptin seviyesini düşürerek, kortizol ve interlökin-6 üretimini azalttığı gösterilmiştir. Çalışmalarda, günlük 200 mcg/kg (Wang ve ark., 2010) ve 4 mg/kg (Hernandez-Mendoza ve ark., 2011) AFB1 uygulanan ratların daha düşük leptin seviyesine sahip olduğu, bunun da besin alımını azaltarak enerji dengesini ve vücut ağırlığını modüle ettiği ortaya koyulmuştur. Ayrıca, AFB1 sindirim enzimlerinin aktivitelerini etkileyerek malabsorbsiyona neden olduğu ifade edilmiştir (He ve ark., 2019). Bununla birlikte, propolisin vücut ağırlığı, leptin seviyesi ve adipozite üzerine etkileri araştırılmaktadır (Cardinault ve ark., 2020). Yüksek yağlı diyetle beslenen deney hayvanlarında propolisin (%0.5 propolis/yem oranı) Peroksizom Proliferatör Aktive Edici Reseptör Gama (PPAR γ) aktivitesini inhibe edici ve trigliserit emilimini azaltıcı etkiler gösterdiği ve böylece ağırlık kaybı sağladığı belirtilmiştir (Ichi ve ark., 2009). Yapılan bir diğer çalışmada, Anadolu propolisi (%0.005 propolis/yem oranı) alan deney hayvanlarında kontrol grubuna kıyasla belirgin bir şekilde ağırlık kaybı gözlenmiştir (Seven ve Seven, 2008). Bunun aksine, diyabet modeli oluşturulan deney hayvanlarında propolis

takviyesinin (100 mg/kg vücut ağırlığı) ağırlık kazanıma önemli bir etkisi tespit edilmemiştir (Kitamura ve ark., 2013).

Bu çalışmada rastgele grup dağılımı yapılan ratlara oral gavaj yoluyla 28 gün boyunca günlük 25 mcg/kg AFB1 uygulaması ve 250 mg/kg propolis takviyesi yapılmıştır. Çalışmanın başında KON grubunun ortalama vücut ağırlığı AFB1+PRO grubundan ($p=0,001$); çalışmanın sonunda ise diğer tüm gruplardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). AFB1, PRO ve AFB1+PRO gruplarının ise son vücut ağırlığı ortalamaları arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4.1). KON grubunun başlangıç vücut ağırlığı ortalamasının diğer gruplardan daha yüksek; AFB1+PRO grubunun daha düşük olmasına bağlı olarak çalışmanın sonunda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Mevcut çalışmada deney gruplarının ortalama vücut ağırlıkları, vücut ağırlığı kazanımları ve BKİ değerleri karşılaştırılmıştır. KON grubunun ortalama vücut ağırlığı ve BKİ değeri diğer gruplara kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$) (Tablo 4.2). Buna ek olarak, AFB1+PRO grubunun ortalama vücut ağırlığının diğer gruplara göre daha düşük; KON grubunun ise daha yüksek seyrettiği görülmüştür ($p<0,001$) (Şekil 4.1.a). Deney süresince vücut ağırlığı kazanımı en yüksek KON grubunda, en düşük ise PRO grubunda kaydedilmiştir. KON grubunda ağırlık kazanımının diğer gruplara göre daha fazla olması, AFB1 ve propolisin ağırlık kazanımını azalttığını göstermektedir. Bu da AFB1 ve propolisin açlık-tokluk sinyalleri ve metabolik yollar üzerinde olası etkinliğini akla getirmektedir. Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada haftada bir kez 300 mcg/kg AFB1 uygulaması sonucu oreksijenik özelliğe sahip bir nöropeptit olan sekretogranin II ekspresyonunda ve vücut ağırlığı kazanımında azalma kaydedilmiştir (Trebak ve ark., 2015). Ancak, propolisin iştah üzerindeki etkilerine ilişkin spesifik bir bilgi mevcut değildir. Deneysel olarak meme kanseri modeli oluşturulan ratlarda propolis takviyesi (200 mg/1 ml mısır yağı) yem tüketimini arttırarak vücut ağırlığı profilini iyileştirmiştir (Kusnul ve ark., 2019). Diğer taraftan, non-alkolik karaciğer yağlanması olan bireylere uygulanan propolis takviyesinin (510 mg/gün) hastalarda serum lipit profilini düzenlediği, inflamatuvar sitokin seviyesini azalttığı ve vücut ağırlığı kaybı sağladığı görülmüştür (Nikbaf-Shandiz ve ark., 2022). Bu çalışmada AFB1 uygulaması ve propolis takviyesi vücut ağırlığı kazanımını azaltmıştır ancak bu azalma istatistiksel açıdan anlamlı değildir ($p>0,05$) (Tablo 4.2). Literatürdeki çalışmalardan yola çıkarak daha yüksek dozlarda

AFB1 ve propolisin uygulanmasının vücut ağırlığı kazanımı üzerinde belirgin bir azalma sağlayabileceği düşünülmektedir. Buna ek olarak, aflatoksin intoksikasyonu ve propolisin açlık tokluk metabolizmasına etkileri oreksijenik ve anoreksijenik faktörler açısından araştırılmalıdır.

5.2.Biyokimyasal Bulguların Değerlendirilmesi

AFB1 memelilerde ve kümes hayvanlarında bağışıklık sistemini olumsuz yönde etkilemekte ve bunun sonucunda inflamasyona, apoptoza, kanser türlerine ve mutasyona neden olabilmektedir (Diaz ve Murcia, 2019; Zhou ve ark., 2019). Besinlerle veya solunum yoluyla alınan AFB1, metabolize edilmesi için karaciğere taşınmaktadır. Burada faz I enzimleri olarak bilinen CYP450 enzim ailesi (CYP1A2, CYP3A4, CYP2A6 vb.) tarafından bir dizi oksidasyon reaksiyonları gerçekleştirilmektedir (Dohnal ve ark., 2014). Reaksiyonlar sonunda ROS oluşumuna neden olan ve oksidatif özelliğe sahip AFQ1, AFB1a, AFP1, AFM1 ve AFBO metabolitleri oluşmaktadır. Bu metabolitler idrarla ve feçesle vücuttan atılmaktadır. Ancak AFBO'nun tamamı vücuttan uzaklaştırılmamaktadır. SOD, CAT, GSH-Px gibi çeşitli antioksidan enzimler kalan AFBO'yu inaktif hale getirmekte ve vücuttan atılmasını sağlamaktadır. Antioksidan enzim kapasitesinin yetersiz olması durumunda AFBO dokulardaki DNA ve protein yapısına zarar vererek toksisiteye neden olmaktadır (Cao ve ark., 2022).

Organizmada antioksidan savunma sistemlerinin zayıf olması AFB1 kaynaklı serbest radikallerin oluşumunu tetiklemektedir. Böylece AFB1, karaciğerde hasara ve lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır (Adedara ve ark., 2010; Eraslan ve ark., 2005). Diğer taraftan, hücre ve dokularda tiyollerin hücresel sülfidril formlarının eş zamanlı olarak tükenmesi ile bazı antioksidan enzim aktivitelerinde azalma olmaktadır (Gagliano ve ark., 2006). Yapısında sülfidril bulunan GSH, oksidatif stresin erken biyolojik belirteci olarak kabul edilen enzimatik olmayan bir antioksidandır (Liu ve ark., 2022). GST'nin aracılık ettiği aktif AFB1'in GSH ile konjugasyonu, bu toksinin detoksifikasyonunda ve atılımında çok önemli bir süreçtir (Murcia ve Diaz, 2021). Bununla ilgili olarak, AFB1'i aktive etmek için faz I karaciğer enzimleri; AFB1 ve toksik metabolitlerini detoksifiye etmek için zayıf faz II - GST enzim etkileşimine ihtiyaç vardır (Klein ve ark., 2002). Bununla birlikte, AFB1 temel olarak MDA

düzeylerinde bir artışa neden olmaktadır ve bu da CAT, GSH-Px ve SOD gibi enzimatik antioksidanlarda azalmaya yol açabilmektedir (Damiano ve ark., 2022).

AFB1 ile kontamine besinlerin ve yemlerin tüketilmesi hastalıklara karşı direncin azalması ve bağışıklık sisteminin zayıflamasına neden olmaktadır. İnsanlarda AFB1 ile kontamine besinlerin tüketilmesi sonucu karaciğerdeki oksidatif hasara bağlı olarak sarılık, abdominal ağrı, kusma ve asit gibi yan etkiler ve ölüm görülebilmektedir (Kamala ve ark., 2018; Lewis ve ark., 2005). Tanzanya’da 68 kişi ile yürütülen bir çalışmada ölümlerin %30’unun AFB1 ile kontamine mısır tüketimine bağlı olduğu belirlenmiştir (Kamala ve ark., 2018). Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda aflatoksinlerin oksidatif hasara yol açtığı rapor edilmiştir (Rotimi ve ark., 2019). Buna örnek olarak, dört hafta boyunca 100 mcg/kg AFB1’e maruz kalan broylerlerin vücut ağırlığında, antioksidan enzimlerin kapasitesinde (SOD, CAT, GST, GSH-Px) ve TAS düzeyinde azalma, MDA düzeyinde ise artış görülmüştür (Guo ve ark., 2021). Benzer bir çalışmada serum antioksidan kapasitesinin (CAT, GSH, GSH-Px) azaldığı, lipid peroksidasyonu (MDA) ve DNA hasarının (8-OHdG) arttığı belirlenmiştir (Sun ve ark., 2016). AFB1 ve metabolitleri karaciğerde metabolize edilmektedir ve bu sırada hücre fonksiyonları üzerinde bazı değişikliklere neden olmaktadır. Özellikle akut olarak AFB1’e maruziyet karaciğerde oksidatif mitokondriyal hasara yol açmaktadır (Rotimi ve ark., 2019). Akut olarak AFB1’e (1 mg/kg) maruz kalan ratlarda GSH, GST, GR, GSH-Px, MDA ve nitrik oksit düzeylerinde belirgin artış gözlenmiştir (Rotimi ve ark., 2019). Yedi gün boyunca çok yüksek dozlarda (9 mg/kg) AFB1 uygulanan farelerde kontrol grubuna kıyasla GSH, GST ve CAT düzeylerinde azalma, lipid peroksidasyonunda (MDA) artış görülürken; SOD ve C vitamini düzeylerinde ise değişiklik olmamıştır (Adedara ve ark., 2010).

Bu çalışmada ratlara uygulanan düşük doz AFB1’in oksidatif stres ve antioksidan kapasite üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktiviteleri ile MDA, TAS ve GSH düzeyleri incelenmiştir. Dört haftalık süre boyunca AFB1 uygulanan ratların serumlarında SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri KON grubuna kıyasla anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyi KON grubu ile benzerlik göstermiştir. Bununla birlikte en düşük TAS düzeyine sahip grubun AFB1 uygulanan grup olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.3). Çalışmada TAS düzeyinin ve antioksidan enzim aktivitelerinin düşük bulunması,

düşük doz AFB1 maruziyetine bağlı olarak hücrel savunma mekanizmalarının tehlikeye girdiğinin bir göstergesi olabilir. Antioksidan kapasitede ve savunma mekanizmalarındaki azalma AFB1 metabolitlerinin detoksifiye edilmesini geciktirebilir ve ROS oluşumuna yol açabilir (Cao ve ark., 2022). Bu da dokularda oksidatif hasarın artması ve metabolik işlevlerin bozulması ile sonuçlanabilir. Diğer taraftan, MDA düzeyinde anlamlı bir değişikliğin görülmemesi, uygulanan AFB1'in lipid peroksidasyonu üzerinde değişiklik yaratmayacak dozda olmasından kaynaklanabilir. İleri çalışmalarda oksidatif stres hasarına yönelik kapsamlı deney planları yapılarak AFB1'in oksidatif ve metabolik etkileri moleküler düzeyde araştırılmalıdır.

Aflatoksinleri elimine etmek için çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler keşfedilmiştir (Jobe ve ark., 2023). Deneysel modellerde aflatoksikozisi iyileştirmesi gerekçesiyle fitokimyasalların kullanımı önerilmektedir (Vipin ve ark., 2017). Fitokimyasallar gen ekspresyonunu, enzimatik aktiviteleri, aflatoksin aktivasyonunu ve detoksifikasyonunu düzenlemektedir (Kulanthaivel ve ark., 2012; Leone ve ark., 2017). Bunun yanı sıra, berberin, kuarsetin, kateşin ve kurkumin gibi fitokimyasallar antioksidan özellikleri nedeniyle oksidatif stres ile indüklenmiş hücre hasarına karşı koruyucu etki göstermektedir (Bratovcic, 2020). Antioksidan özelliği ile bilinen kurkumin (200 mg/kg/gün), siyah çayla (%2) birlikte AFB1'e (25 mcg/kg/gün) maruz kalan ratlara uygulandığında serumdaki SOD, CAT, GSH-Px ve TAS aktivitelerinin yükseldiği gözlenmiştir (El-Mekkawy ve ark., 2020). Benzer şekilde likopen (5 mg/kg/gün) (Karaca ve ark., 2021) ve resveratrol (60 mg/kg/gün) (Omur ve ark., 2019) takviyesinin AFB1'in neden olduğu lipid peroksidasyonunu (MDA) azalttığı; GSH, CAT, SOD ve GSH-Px aktivitesini ise arttırdığı belirlenmiştir. Yüksek doz AFB1 uygulamasının (1 mg/kg/gün) hepatosit hasarına etkisini araştıran bir çalışmada, astaksantin takviyesinin SOD ekspresyonunu arttırarak hepatositleri oksidatif hasara karşı koruduğu rapor edilmiştir (Monmeesil ve ark., 2019).

Bu çalışmada LC-MS/MS analizi yapılan ve içinde resveratrol, gallik asit, siyanidin, klorojenik asit, kateşin, vanilik asit, hesperidin, ferulik asit, kuarsetin, apigenin ve krisin gibi fitokimyasalları içeren Anadolu propolisi kullanılmıştır. Propolisin içerdiği antioksidan bileşikler sayesinde, nükleer faktör-kappa B (NF-κB) yolağını regüle ederek inflamasyonu ve oksidatif stresi azalttığı bilinmektedir (Malekahmadi ve ark., 2023). Propolisin antioksidan etkilerini değerlendirmek için bazı çalışmalar yapılmıştır.

Afsharpour ve ark. (2019) tarafından Tip 2 diyabetli (T2DM) hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada 8 hafta boyunca günlük 1500 mg/kg İran propolisi takviyesinin TAS düzeyini, GSH-Px ve SOD aktivitelerini arttırdığı belirlenmiştir. Çin’de yapılan başka bir çalışmada 18 hafta boyunca günlük 900 mg/kg alınan Brezilya propolisi takviyesinin GSH düzeyini yükseltmesine rağmen, MDA düzeyi, GSH-Px ve SOD aktiviteleri üzerinde önemli bir etkisi bulunmamıştır (Zhao ve ark., 2016). Çeşitli kimyasallar kullanılarak oksidatif stres modeli oluşturulan deneysel çalışmalarda, propolisin antioksidan enzim aktivitelerini arttırdığı ve lipid peroksidasyonunu azalttığı rapor edilmiştir (Demir ve ark., 2023; El-Amawy ve ark., 2023; Laaroussi ve ark., 2021). Mevcut çalışmada AFB1 ile indüklenen toksisite üzerinde propolisin oksidatif hasara karşı koruyucu etkisi incelenmiştir. Buna göre, dört hafta boyunca günlük 250 mg/kg propolis takviyesinin serumdaki TAS seviyesini KON ve AFB1 uygulanan gruba göre anlamlı olarak arttırdığı belirlenmiştir. Aynı zamanda AFB1+PRO grubunun GSH-Px aktivitesi KON grubu ile benzer olup, AFB1 grubundan önemli derecede yüksek bulunmuştur. Ratların SOD ve CAT aktiviteleri incelendiğinde propolis alan grupların (PRO ve AFB1+PRO) sonuçları AFB1 grubundan yüksek olmasına rağmen bu fark anlamlı değildir. Diğer taraftan, serum MDA ve GSH düzeyleri bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 4.3). Elde edilen sonuçlar, antioksidan kapasiteyi ve antioksidan enzimlerin aktivitesini artırması nedeniyle propolisin AFB1 kaynaklı oksidatif strese karşı koruyucu bir takviye olabileceğini destekler niteliktedir. Literatürde aflatoksikozis durumunda uygulanan propolis takviyesine ilişkin çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yılmaz ve ark. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada AFB1’e maruz kalan ratlarda propolis takviyesinin CAT aktivitesi ve GSH düzeyini arttırdığı, MDA düzeyini ve hepatotoksisiteyi azalttığı belirlenmiştir. Böylece propolisin AFB1 ile indüklenen oksidatif stresi ve hepatotoksisiteyi önleyici doğal bir ajan olabileceği ileri sürülmüştür. Bu sonuçlar, çalışmamızdan elde edilen bulgular ile uyumlu bulunmuştur.

Tablo 5.1. Ratlarda antioksidan uygulamalarının AFB1 toksisitesi üzerindeki etkilerini gösteren çalışmalar

No	Çalışma düzeni	Sonuç ölçütleri	Temel bulgular	Kaynak
1	Kontrol: DMSO AFB1: 1 mg/kg/gün Astaksantin+AFB1: 5 mg/kg ve 1 mg/kg/gün Astaksantin 2 +AFB1: 100 mg/kg ve 1 mg/kg/gün n=20 Süre: 7 gün	Amaç: AFB1 ile indüklenmiş toksisitede astaksantin hepatoprotektif ve oksidatif strese etkisinin incelenmesi. Yöntem: Histopatolojik-immünohistokimyasal analizler ve ROS kaynaklı hücre hasarına karşı antioksidatif etki gösteren SOD aktivitesinin belirlenmesi.	-AFB1 uygulanan grupta hepatositlerde vakuoler dejenerasyon, nekroz, megalositoz, binükleasyon saptanmıştır. -Astaksantin uygulanan gruplarda patolojik değişikliklerde azalma görülmüştür. -Yüksek doz astaksantin uygulanan grupta SOD ekspresyonu anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. -Yüksek doz astaksantin takviyesinin SOD ekspresyonunu artırarak AFB1'in neden olduğu hepatosit hasarını önlediği belirtilmiştir.	(Monmeesil ve ark., 2019)
2	G1: Kontrol G2: Zeytinyağı G3: Siyah çay G4: Kurkumin G5: Zeytinyağında çözdürülmüş AFB1 25 mcg/kg/gün G6: AFB1+siyah çay (%2) G7: AFB1+kurkumin (200 mg/kg/gün) G8: Siyah çay + kurkumin n=48 Süre: 90 gün	Amaç: Siyah çay ve kurkuminin AFB1'e karşı etkinliğinin değerlendirilmesi. Yöntem: Hepatorenal histopatoloji ve serum SOD, CAT, GSH-Px ve TAS düzeylerinin belirlenmesi.	-AFB1 karaciğer ve böbrekte histopatolojik değişikliklere neden olmuştur. -Siyah çay ve kurkumin birlikte uygulandığında SOD, CAT, GSH-Px ve TAS düzeyleri daha yüksek bulunmuştur.	(El-Mekkawy ve ark., 2020)
3	Kontrol: 7 rat Likopen: 7 rat, 15 gün boyunca 5 mg/kg/gün AFB1: 10 rat, 7 gün boyunca, 0,5 mg/kg/gün AFB1+likopen: 10 rat, 15 gün, 0,5 mg/kg/gün ve 5 mg/kg/gün n=34	Amaç: AFB1'e karşı likopen takviyesinin karaciğer hasarı ve oksidatif strese etkisinin belirlenmesi. Yöntem: Biyokimyasal analizler kullanılarak karaciğer dokusunda MDA, GSH, CAT, SOD, GSH-Px ve GST düzeylerinin araştırılması.	-AFB1'e maruz kalan grupta MDA yüksek; GSH, SOD ve CAT düzeyleri düşük bulunmuştur. -Oksidatif stres parametreleri likopen takviye edildiğinde kontrol grubuyla benzer bulunmuştur. -AFB1 maruziyeti doku hasarına neden olmuştur.	(Karaca ve ark., 2021)
4	Kontrol AFB1: 7,5 mcg/kg/gün Resveratrol: 60 mg/kg AFB1+Resveratrol: 7,5 mcg/kg/gün+ 60 mg/kg n=28 Süre: 16 gün	Amaç: AFB1'e karşı resveratrolün spermatolojik hasar üzerine etkilerinin araştırılması. Yöntem: Testislerde histopatolojik değişiklikler ve oksidatif stres parametreleri GSH, MDA, CAT, GPX ve SOD düzeylerinin araştırılması.	-AFB1 spermatogenik hücrelerde nekroza ve dejenerasyona neden olmuştur. -AFB1'e maruz kalan ratlarda MDA düzeyi yüksek, SOD, CAT, GSH-Px ve GSH düzeyleri düşük bulunmuştur. -Resveratrol takviye edildiğinde antioksidan enzimlerin aktivitesi yükselmiş ve kontrol grubuyla benzer bulunmuştur.	(Omur ve ark., 2019)

5.3.Mikrobiyota Analizi ile İlgili Bulguların Değerlendirilmesi

Bağırsak mikrobiyotasındaki biyoçeşitlilik, ekosistemin istikrarının yanı sıra ekolojik işlevine de katkıda bulunarak dengeli bir ekosistemin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (Gong ve ark., 2016). Bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun incelenmesinde yaygın olarak alfa çeşitlilik ve beta çeşitlilik indeksleri kullanılmaktadır. Alfa çeşitlilik indeksleri, tek bir mikrobiyal toplulukta (grup veya örnek) kaç türün bulunduğunu (zenginlik) ve bu türlerin ne kadar dengeli dağıldığını (düzgünlük) göstermektedir (Pennycook ve Scanlan, 2021). Diğer bir çeşitlilik türü olan beta çeşitlilik indeksleri, farklı mikrobiyal topluluklar (gruplar veya örnekler) arasındaki tür çeşitliliğinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu sayede, farklı deney gruplarına ait bağırsak mikrobiyotası örnekleri heterojenlik esas alınarak karşılaştırılmaktadır (Pennycook ve Scanlan, 2021).

Gözlemlenen OTU sayılarına göre bir örneğin zenginliği ve göreceli bollukları alfa çeşitlilik indeksleri kullanılarak hesaplanmaktadır. Alfa çeşitlilik indeksleri arasında yer alan Chao1 indeksi, bir topluluktaki türlerin sayısını tahmin etmek için kullanılır ve nadir olarak bulunan türlerin sayısı hakkında bilgi verir. Bu özellikleri ile Chao1 indeksi düşük bolluğa sahip türlerin belirlenmesine daha iyi olanak sağladığından, eksik türlerin sayısını tahmin etmek için kullanışlı bir biyoinformatik yöntemdir (Chao, 1984). Gözlemlenen baskın ve nadir türlerin toplamı ise ACE indeksi kullanılarak hesaplanmaktadır. Bu yöntem ile örnekte 10'dan fazla üye içeren türler bol tür, 10'dan az üye içeren türler ise nadir tür olarak tanımlanmaktadır (Hughes ve ark., 2001). Toplulukta bulunan türlerin sayısal olarak değerlendirilmesine ek olarak Shannon ve Simpson yöntemleri, topluluğun zenginliği ve dengeli dağılımı hakkında bilgi vermektedir. Göreceli bolluklar göz önüne alındığında, bu çeşitlilik indeksleri hem tür zenginliğini hem de farklı türler arasındaki dağılımının eşitliğini açıklamaktadır. Bununla birlikte, her iki çeşitlilik indeksinin de kendine özgü yanları vardır. Shannon indeksi tür zenginliğine daha fazla ağırlık verirken, Simpson indeksi ölçümünde tür zenginliğinden çok türlerin dengeli dağılımı ifade edilmektedir (Kim ve ark., 2017).

AFB1 maruziyetinin bağırsak mikrobiyotasında disbiyozu neden olarak bakteriyel tür çeşitliliğini azalttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Grosu ve ark., 2019; Wang ve ark., 2016a; Zeng ve ark., 2018). Bu çalışmada, standart diyet ile beslenip herhangi bir

müdahalenin yapılmadığı ve böylece disbiyoz tablosunun oluşmadığı KON grubuna ait tür zenginliğinin AFB1'e maruz kalan deney gruplarından daha fazla olması beklenen bir sonuçtur. Ancak AFB1 grubunda gözlemlenen tür sayısı istatistiksel öneme sahip olmasa da KON grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Literatürde bulunan güncel çalışmalarda AFB1'e maruz kalan deney hayvanlarında gözlemlenen tür sayısı ve zenginliğinin kontrol grubundan daha yüksek olduğu veya benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ye ve ark. (2023) çalışmasında 28 gün boyunca standart diyet alan farelere oral gavaj ile 0,05 ng/g AFB1 uygulanmıştır. Çalışma sonunda gözlemlenen bakteriyel tür sayısı ve ACE indeks değeri bakımından AFB1 uygulanan ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Liew ve ark. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada beş gün boyunca 25 mcg/kg/gün AFB1 uygulaması sonucu Chao1 ve Shannon indeks değerlerinde kontrol grubuna kıyasla önemli bir değişiklik görülmemiştir. AFB1 dozunun tür zenginliği ve çeşitliliğine etkisini araştıran başka bir çalışmada AFB1 dozu arttıkça (100 mcg, 500 mcg ve 1000 mcg/kg gün) tür zenginliğini gösteren Chao1 ve ACE indeksleri ile türlerin dağılımını gösteren Shannon ve Simpson indekslerinde artış kaydedilmiştir (Peng ve ark., 2022). Literatürdeki çalışmalarla uyumlu olarak bu çalışmada AFB1 grubunun ACE ve Shannon indeks değerleri KON grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek; Chao1 ve Simpson indeks değerleri ise benzer bulunmuştur (Şekil 4.3). AFB1 maruziyetinden sonra bakteriyel tür zenginlik ve çeşitlilik değerlerinin modülasyonu amacıyla bazı yöntemler geliştirilmiştir (Afshar ve ark., 2020). Bu yöntemler arasında şüphesiz probiyotikler önemli bir yere sahiptir (Huang ve ark., 2017). Probiyotik bakterilerin biyoadsorbsiyon ve biyodegradasyon yoluyla AFB1'in uzaklaştırılmasında görev aldığı belirtilmektedir (Afshar ve ark., 2020). Bu çalışmada ilk defa AFB1'e maruz bırakılan ratlara propolis takviyesi yapılarak bakteriyel çeşitlilik ve bağırsak mikrobiyota kompozisyonundaki değişim araştırılmıştır. Ratlara uygulanan propolis takviyesi (PRO) sonucu gözlemlenen tür sayısı, Chao1, ACE ve Simpson indeks değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır. Öte yandan, Shannon indeks değerinin KON grubuna göre yüksek olmasına rağmen bu fark anlamlı değildir (Şekil 4.3). Diyabetik ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada dört hafta boyunca günlük 240 mg/kg propolis uygulamasının bakteriyel zenginlik (Chao1 ve gözlemlenen tür sayısı) üzerinde etkili değilken, çeşitliliği (Simpson ve Shannon) arttırdığı saptanmıştır (Xue ve ark., 2019). Bunun aksine dokuz

hafta boyunca günlük 150 mg/kg Çin propolisi takviyesi yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde bakteriyel zenginliği ve çeşitliliği etkilememiştir (Zheng ve ark., 2020). Mevcut çalışmada, AFB1+PRO grubuna ait alfa çeşitlilik indeks değerleri KON grubu ile benzerlik göstermiştir. Bu durum propolis takviyesinin bakteriyel tür zenginlik ve çeşitlilik değerlerinde belirgin artış sağlayarak bağırsak mikrobiyotası üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan, AFB1 ile birlikte propolis takviyesi yapıldığında PRO grubuna kıyasla bakteriyel tür çeşitliliğinde azalma olsa da KON grubu ile benzer bulunmuştur. Dolayısıyla AFB1'e maruz kalan ratlara propolis takviyesi uygulandığında bakteriyel zenginliğin ve çeşitliliğin düzenlenmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

Deney grupları arasında bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun değerlendirilmesi için Bray-Curtis benzeşmezlik indeksi, Ağırlıksız ve Ağırlıklı Unifrac uzaklığı kullanılmaktadır. Beta çeşitliliğe ait olan bu yöntemler, bakteriyel tür çeşitliliğinin bir deney grubundan diğerine değişimini ölçmektedir. Bray-Curtis benzeşmezlik indeksi, deney grupları arasındaki filogenetik topluluk farkını belirleyebilmek için bakteri çeşitliliği ve göreceli bolluğu hakkında bilgi vermektedir. Unifrac uzaklığı, bakteriyel toplulukları mesafe ölçümüne göre karşılaştırmaktadır. UniFrac, gözlemlenen bakteriyel türler arasındaki filogenetik uzaklıkları hesaplayarak topluluk üyelerinin göreceli bolluğuna ilişkin verileri içermektedir. Ağırlıksız Unifrac filogenetik uzaklığı belirtirken, ağırlıklı Unifrac bolluk sayımlarıyla ağırlıklandırılmış baskın türlerin filogenetik uzaklığı gösterilmektedir. Filogenetik uzaklığa bağlı olarak geliştirilen bu yöntemler boyut indirgeme yöntemleri (PCoA) kullanılarak görselleştirilmektedir (Plantinga ve ark., 2019).

Bu çalışmada beta çeşitlilik Ağırlıksız Unifrac uzaklığı, Ağırlıklı Unifrac uzaklığı ve Bray-Curtis benzeşmezlik indeksi kullanılarak değerlendirilmiştir. Ağırlıksız Unifrac uzaklıklarına ilişkin temel koordinat analizine göre, KON ve AFB1+PRO grubunun diğer deney gruplarından ayrılarak küme oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.5). Ancak deney grupları arasında türlere ait göreceli bollukların birbirinden ayrıışmadığı ve benzerlik gösterdiği Ağırlıklı Unifrac uzaklıkları sonucunda belirlenmiştir (Şekil 4.6). Bununla birlikte Bray-Curtis benzeşmezlik indeksine dayanan temel koordinat analizi sonuçları Ağırlıksız Unifrac uzaklıklarına paralel olup, KON ve AFB1+PRO gruplarındaki ratlarda bakteriyel topluluklarının, AFB1 ve PRO gruplarındaki ratlara

göre birbirine nispeten daha yakın bulunmuştur (Şekil 4.7). Ayrıca, bu gruplar, PC2 ile gösterildiği gibi, farklı kümelerle ayrılmıştır. Dolayısıyla, aflatoxin maruziyeti ve propolis takviyesi ratlarda bağırsak mikrobiyotası topluluk yapısını değiştirmiştir. Çalışmamızın yöntemine benzer şekilde planlanan bir çalışmada dört hafta boyunca ratlara günlük 25 mcg/kg AFB1 ve probiyotik olarak *Lactobacillus casei* Shirota (10^9 kob/gün) oral gavaj ile uygulanmıştır. Bağırsak mikrobiyota kompozisyonundaki değişim Bray-Curtis benzeşmezlik indeksi ile incelenmiş ve probiyotik grubu ile kontrol arasındaki mesafeler AFB1'e maruz kalan gruba kıyasla daha yakın bulunmuştur. Buna ek olarak, hem probiyotik hem de AFB1 alan grup kontrol grubundan ayrılmıştır (Liew ve ark., 2022). Mevcut çalışmada bu çalışma ile uyumlu olarak AFB1 grubunun mikrobiyal topluluk yapısı KON grubundan uzaklaşmıştır. Böylece düşük doz AFB1 maruziyeti, bakteriyel tür çeşitliliğini ve bolluklarını değiştirmesi nedeniyle bağırsak mikrobiyota kompozisyonu üzerinde etkili bir faktör olarak nitelendirilebilir.

Wang ve ark. (2015) çalışmasında ratlara AFB1'i düşük (5 mcg/kg), orta (25 mcg/kg) ve yüksek (75 mcg/kg) dozlarda dört hafta boyunca uygulanmıştır. Ağırlıksız Unifrac uzaklığına ait PCoA grafiğinde deney gruplarının net bir şekilde ayrıldığı gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra, AFB1'in dozu arttıkça aynı doz grubundaki ratlara ait bakteriyel tür ve çeşitliliğin birbirine daha yakın olduğu belirtilmiştir. Mevcut çalışma ve bu çalışma dikkate alındığında AFB1'in 25 mcg/kg/gün (dört hafta) ve daha düşük dozlarda uygulanmasının bağırsak mikrobiyotasında bulunan bakteriyel tür ve çeşitliliği değiştirebileceğini göstermiştir.

Literatürde AFB1'e maruziyet sonrasında bakteriyel topluluk yapısını korumaya yönelik yapılan çalışma sayısı sınırlı düzeydedir. Çin propolisi ve Brezilya (300 mg/kg/gün, bir hafta) propolisinin karşılaştırıldığı bir çalışmada ratların bakteriyel topluluğu Ağırlıklı Unifrac uzaklığı ile görselleştirilmiştir. Buna göre, kontrol grubu, Çin ve Brezilya propolisi uygulanan grupların benzersiz bir bağırsak mikrobiyotası yapısına sahip olduğu ve farklı kadranda kümelendikleri rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2018). Bu çalışmada, boyut indirgeme yöntemleri kullanılarak Anadolu propolisinin bağırsak mikrobiyota kompozisyonuna etkisi araştırılmıştır. AFB1'e maruz kalan ratlara uygulanan propolis takviyesi sonucu bakteriyel toplulukların KON grubu ile benzer olduğu bulunmuştur (Şekil 4.7). Bu iki çalışma sonuçlarının farklı olmasının nedeni kullanılan propolisin bileşimindeki farklılıklardan kaynaklanabilir. Çünkü propolisin

içinde bulunan fenolik bileşiklerin çeşidi ve miktarı coğrafik bölge, bitki örtüsü, iklim, mevsim ve toplama zamanı gibi faktörlerden etkilenebilir (Aldemir ve ark., 2015).

Bu çalışmada deney gruplarındaki bakteriyel tür topluluğunu araştırmak için Venn diyagramı kullanılarak ortak ve benzersiz OTU'ların analizi yapılmıştır (Şekil 4.8). OTU'ların çoğu (%46,7) dört deney grubu arasında paylaşılmıştır. KON, AFB1, PRO ve AFB1+PRO gruplarının OTU sayıları sırasıyla 9 (%4,2), 20 (%9,4), 17 (%8) ve 16 (%7,5) olarak bulunmuştur. AFB1 maruziyeti ve propolis takviyesinin OTU sayısını arttırdığı belirlenmiştir. Benzer şekilde yapılan bir çalışmada AFB1 (1 mcg/mL) uygulanan farelerin OTU sayısı kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur (Tian ve ark., 2022). Bunun aksine düşük (2,5 mg/L), orta (4 mg/L) ve yüksek doz (10 mg/L) AFB1 uygulanan farelerde yüksek doz grubunun OTU'ları orta doz grubuna göre biraz daha yüksek olmasına rağmen, tüm deney gruplarındaki OTU'lar azalma eğilimi göstermiştir (Yang ve ark., 2017). Mevcut çalışma ve bu çalışmalar AFB1'in OTU sayısını azalttığı gibi arttırabileceğini de göstermektedir. Bu durumda bakteriyel topluluğun zenginlik ve çeşitlilik bakımından niceliksel olarak değerlendirilmesinin yanında niteliksel olarak araştırılmasının da faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Bağırsak mikrobiyotası besin ve ilaç metabolizması, immün sistemin regülasyonu ve bağırsak epitelinin korunması gibi birçok fonksiyonda görev alan kompleks ve dinamik bir ekosistemden oluşmaktadır (Jia ve ark., 2022; Lin ve ark., 2023). Yapılan çalışmalarda AFB1'in bağırsak mikrobiyota kompozisyonunu değiştirdiği ve faydalı bakterilerin sayısını azalttığı gösterilmiştir (Zhou ve ark., 2019). Şekil 4.9'da gösterildiği üzere, mevcut çalışmada tüm deney gruplarında *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* filumları baskın bulunmuştur. *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B) oranı sıklıkla hastalık durumunda konağın bağırsak mikrobiyotasındaki değişimi tespit etmek için kullanılmaktadır (Palkova ve ark., 2021). Bu orandaki artış, inflamatuvar belirteç düzeyleri ve intestinal metabolik homeostazının patolojik durumu ile ilişkilendirilmektedir (Lozupone ve ark., 2012). Mevcut çalışmada, istatistiksel olarak önemli olmasa da AFB1'in *Firmicutes* bolluğunu azalttığı ve *Bacteroidetes* bolluğunu arttırdığı ve böylece daha düşük F/B oranına neden olduğu görülmüştür (CON: 3,2; AFB1: 3). Bununla birlikte, AFB1'e maruz kalan ratlara propolis uygulandığında (AFB1+PRO) *Bacteroidetes* bolluğunun artmasına bağlı olarak F/B oranı azalmıştır (AFB1+PRO: 2,01). Benzer şekilde, AFB1 maruziyetinin deney hayvanlarında F/B

oranını kontrol grubuna göre azalttığı tespit edilmiştir (Lin ve ark., 2023; Tian ve ark., 2022). Bunun aksine, AFB1 maruziyetinin F/B oranını önemli derecede arttırdığı ve bu durumun intestinal metabolik homeostazı bozabileceği ve inflamatuvar değişikliklere neden olabileceği rapor edilmiştir (Cao ve ark., 2021; Sui ve ark., 2022). Bağırsak mikrobiyotasının modülasyonu için AFB1'e maruz kalan deney hayvanlarına uygulanan *Lactobacillus casei* Shirota (Liew ve ark., 2022) ve *Lactobacillus plantarum* T3 (Tian ve ark., 2022) suşlarının *Firmicutes/Bacteroidetes* oranını arttırdığı; flavonoidlerin ise azalttığı gösterilmiştir (Huang ve ark., 2023). Dolayısıyla zengin flavonoid içeriğine sahip propolis ve diğer flavonoid türlerinin AFB1 maruziyeti sonucu bağırsak mikrobiyotasındaki F/B oranını düzenlemede etkili olabileceği düşünülmektedir. Böylece flavonoidler, bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun modülasyonu ile intestinal epitel dokunun korunmasına ve inflamasyonun azaltılmasına katkı sağlayabilir.

Bu çalışmada bağırsak mikrobiyotasında göreceli bolluğu değerlendirilen; salgıladığı endotoksin özellikteki LPS nedeniyle bağırsak mikrobiyota disbiyozuna yol açan *Proteobacteria* (Huszczynski ve ark., 2019), tüm deney gruplarında göreceli bolluğu en yüksek üçüncü filum olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9). Fırsatçı patojen bakterileri içeren *Proteobacteria* filumunun (Shin ve ark., 2015) aşırı büyümesinin yüksek düzeyde bağırsak dokusunun inflamasyonu ve artan bağırsak geçirgenliği ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (Shin ve ark., 2015). Lümen pH değeri ve bağırsak yapısındaki değişiklikler gibi gastrointestinal faktörler *Proteobacteria* filumunun aşırı büyümesine neden olabilir (Wang ve ark., 2023). Ayrıca, AFB1'e maruziyetin de *Proteobacteria* filumunun göreceli bolluğunu arttırdığı bilinmektedir (Xue ve ark., 2023). Ancak, Lin ve ark. tarafından yapılan çalışmada AFB1 maruziyetinin *Proteobacteria* göreceli bolluğunu önemli düzeyde azalttığı gösterilmiştir (Lin ve ark., 2022). Mevcut çalışmada, en yüksek *Proteobacteria* göreceli bolluğuna sahip grubun AFB1; en düşük grubun ise PRO olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda propolis takviyesinin, intestinal mukozal bariyerin bozulmasına neden olan *Proteobacteria* filumunun göreceli bolluğunu düzenleyici etki gösterdiği söylenebilir.

AFB1'e maruziyet bağırsak mikrobiyota kompozisyonun aile düzeyinde bazı değişikliklere yol açabilir. Özellikle laktik asit bakterilerinin AFB1 varlığında azalma eğilimi gösterdiği bildirilmektedir (Sobral ve ark., 2022). Mevcut çalışmada, KON

grubuna göre *Firmicutes* filumuna mensup *Lactobacilloceae* ailesinin göreceli bolluğu AFB1 grubunda daha düşük, PRO grubunda ise daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamızdan elde edilen bu sonuç literatürle uyumlu bulunmuştur. Ishikawa ve ark. (2017) çalışmasında tek seferde 663 mcg/kg AFB1'e maruz kaldıktan sonra farelerin bağırsak mikrobiyotasında *Firmicutes* filumuna mensup *Lachnospiraceae* ailesinin bolluğunda bir artış da görülmüştür. Ratlarda yalnızca propolis takviyesinin *Lachnospiraceae* ailesinin göreceli bolluğunu arttırdığı belirlenmiştir (Xue ve ark., 2019). Mevcut çalışmada *Lachnospiraceae* ailesinin göreceli bolluğunun AFB1+PRO grubunda diğer gruplara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Buna göre, AFB1'e maruziyet sonrasında yapılan propolis takviyesinin *Lachnospiraceae* ailesinin göreceli bolluğunu daha çok arttırdığı çıkarımına varılabilir.

Bacteroidetes filumuna mensup *Prevotella* cinsi bakteriler ile ilgili yapılan çalışmalar, çeşitli türler ile beslenme örüntüleri, sağlık ve hastalıklar arasındaki ilişkilere odaklanmıştır. Yeni nesil dizileme yöntemleri kullanılarak *Prevotella* cinsinin bağırsak ekosistemindeki rolü ve mukozal yapıya etkileri ortaya konmuştur (Precup ve Vodnar, 2019). *Prevotella* cinsi bakteriler karbonhidrat ve protein içeren besinlerin metabolizmasına yardımcı olmaktadır (Flint ve Duncan, 2014). Bazı *Prevotella* suşlarının kardiyovasküler hastalık riskini azalttığı ve glukoz metabolizmasını iyileştirdiğine dair kanıtlar bulunmaktadır (Mancabelli ve ark., 2017; Wang ve ark., 2016b). Fakat patobiyont özelliğe sahip suşların inflamatuvar bağırsak hastalıkları, metabolik sendrom ve obezite gibi hastalıkları tetiklediği belirtilmiştir (Larsen, 2017). Sprague Dawley ratları üzerinde yapılan bir çalışmada AFB1'in (25 mcg/kg/gün 4 hafta) potansiyel patojenik özellikteki *Prevotellaceae* NK3831 ve *Prevotella* 9 bakterilerinin aşırı büyümesini indüklediği; probiyotik uygulamasının oluşan disbiyoz tablosunu iyileştirdiği belirtilmiştir (Liew ve ark., 2022). Koyunlarla yapılan bir çalışmada AFB1 maruziyeti *Prevotella* cinsinin göreceli bolluğunu anlamlı olarak arttırmıştır (Lin ve ark., 2023). Mevcut çalışmada AFB1'e maruz kalan gruplarda (AFB1 ve AFB1+PRO) *Prevotella* cinsinin göreceli bolluğu KON grubuna göre artmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir. Öte yandan propolis takviyesinin *Prevotella* cinsinin göreceli bolluğu üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır (Şekil 4.14).

Aflatoksinlerin detoksifikasyonu için en çok çalışılan bakteri türlerinden birisi de laktik asit bakterileridir (*Lactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Pediococcus*). Bu bakteri grubu besin işleme yöntemlerinde sıklıkla kullanılmakta ve toksinlere yüksek afinite göstermektedir (Adebo ve ark., 2017). Laktik asit bakterileri AFB1'in hücre duvarına bağlanmasını engelleyerek detoksifikasyonda rol oynamaktadır (Guan ve ark., 2008). Süt ürünlerinde kullanılan laktik asit bakterileri ve bifidobakteri suşlarının AFB1'e bağlandığı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Elsanhoty ve ark., 2014). Bağırsak mikrobiyotasında normal düzeyde bulunan *Lactobacillus* bağırsakta kolonize olan patojenik bakterilerin inhibisyonunu sağlamakta; kandaki amonyak ve kolesterol düzeylerini düşürmektedir (Khare ve Gaur, 2020; Li ve ark., 2018). Ancak *Lactobacillus* cinsinin aşırı büyümesi bağırsak mikrobiyotasında dengesizliğe ve bağırsağın peristaltik hareketlerinin bozulmasına yol açabilir. Bunun yanı sıra, uygulanan doza bağlı olarak AFB1 maruziyetinin bağırsak mikrobiyotasındaki *Lactobacillus* göreceli bolluğunu etkilediği belirtilmiştir (Wang ve ark., 2016a).

Huang ve ark. (2023) tarafından yapılan çalışmada AFB1'e maruziyet sonucu *Lactobacillus* göreceli bolluğu kontrol grubuna göre artma eğilimi göstermiştir. Fareler üzerinde yapılan başka bir çalışmada AFB1 uygulaması *Lactobacillus* göreceli bolluğunu belirgin olarak arttırmıştır ve farelere melatonin uygulandığında ise bolluk düzeyi kontrol grubu ile benzer bulunmuştur (Liu ve ark., 2022). Mevcut çalışmada deney grupları karşılaştırıldığında, AFB1+PRO grubunun *Lactobacillus* göreceli bolluğu KON grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p=0,049$) (Şekil 4.14). Bu grupta *Lactobacillus* göreceli bolluğunun yüksek olmasının nedeni AFB1'in çoğalmayı indükleyici etkisinden veya propolisin yapısındaki fenolik bileşiklerden kaynaklanabilir. Nitekim propolisin yapısında bulunan krisin flavonunun yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda *Lactobacillus* göreceli bolluğunu önemli düzeyde arttırdığı saptanmıştır (Yuvaraj ve ark., 2022). Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, *Lactobacillus* göreceli bolluğunun AFB1 maruziyeti ile uygulanan potansiyel iyileştirici tedavi yöntemi ve içeriğinden etkilenebileceği düşünülmektedir.

Roseburia cinsi bütirat üreten bakteriler arasında yer almakta ve genellikle kolonda bulunmaktadır (Nie ve ark., 2021). Prebiyotik özelliğe sahip besinlerin tüketilmesi sonucunda *Roseburia* göreceli bolluğunun arttığı bilinmektedir (Singh ve ark., 2017).

Roseburia'nın, bazı metabolitler üreterek inflamatuvar barsak hastalığı, T2DM ve ateroskleroz gibi çeşitli hastalıkların iyileştirilmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Nie ve ark., 2021). Zhou ve ark. (2018) çalışmasında ratlarda artan AFB1 maruziyetinin *Roseburia* göreceli bolluğunu ve KZYA üretimini azalttığı rapor edilmiştir. Mevcut çalışmada AFB1+PRO grubu daha yüksek *Roseburia* göreceli bolluğuna sahip olsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. AFB1+PRO grubunda *Roseburia* göreceli bolluğunun artması propolisin yapısındaki bazı bileşiklerin prebiyotik aktivitesi göstermesinden kaynaklanabilir (Alfarrayeh, Fekete, Gazdag, & Papp, 2021). Ek olarak, propolis takviyesinin farelerde anti-obeze ve anti-inflamatuvar etkiye sahip *Roseburia* göreceli bolluğunu arttırdığı ve bolluk düzeyinin inflamatuvar parametrelerle (TNF- α ve IL-6) negatif ilişkili olduğu belirlenmiştir (Cai ve ark., 2020). Mevcut çalışmada, prebiyotikleri metabolize ederek asetat ve propiyonat gibi KZYA üretimini sağlayan *Phascolarctobacterium* cinsi ile serum GSH-Px aktivitesi arasında pozitif ilişki bulunmuştur (Pearson's $r = 0,355$, $p = 0,048$). *Phascolarctobacterium* cinsi bakterilerin inflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltarak oksidatif stresi önlediği ileri sürülmüştür (Li ve ark., 2022; Samanta, 2022). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar bu bulguyu destekler niteliktedir.

Propolis ve AFB1 uygulamasından sonra bakteriyel taksonomideki spesifik değişiklikleri tanımlamak için LEfSe analizi yapılmıştır. Cins düzeyinde tarama yapılarak deney gruplarında dikkat çeken bazı cinsler belirlenmiştir. AFB1 grubunda yakın zamanda tanımlanan gram negatif *Pseudescherichia* cinsi belirgin olarak artmıştır. *Pseudescherichia* nadir görülen bir patojen olmakla birlikte sepsise neden olduğu tespit edilmiştir (İbrahim, 2021). Buradan yola çıkarak, AFB1 maruziyetinin patojenik bakteri popülasyonunu arttırdığı söylenebilir. Diğer taraftan, AFB1+PRO grubunda KZYA üreten ve oksidatif stresi azaltarak inflamatuvar bağırsak hastalıklarının tedavisinde kullanılan *Anaerostipes* (Lee ve ark., 2021) ve *Coproccoccus* (Nogal ve ark., 2021) bollukları açıkça artmıştır. Bu bağlamda, propolisin yapısında bulunan prebiyotik özellikteki fenolik bileşiklerin (Aabed ve ark., 2019) *Anaerostipes* ve *Coproccoccus* cinsi bakteriler için substrat sağlayarak büyümesini teşvik edebileceği tahmininde bulunulabilir.

Bu çalışmanın bazı güçlü yönleri ve sınırlılıkları bulunmaktadır. AFB1'e maruz kalan ratlarda propolis takviyesinin disbiyoz üzerindeki etkisinin (biyokimyasal ve amplikon

sekanslama) kapsamlı bir şekilde araştırılması bu çalışmanın güçlü yönlerinden biridir. Bununla birlikte, propolis takviyesinin AFB1 kaynaklı disbiyoz üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılması için çalışma süresinin uzatılması ve yapılan uygulamaların farklı dozlarda denenmesi ileriki çalışmalar için önerilebilir. Ayrıca, AFB1 maruziyeti sonucunda yapılan propolis takviyesinin bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilen KZYA üzerindeki etkileri değerlendirilebilir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, mevcut çalışmada AFB1'e maruz ratlara uygulanan propolis takviyesinin oksidatif stres tablosu ve bağırsak mikrobiyota kompozisyonu üzerine etkileri araştırılmış olup, aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Deney süresince vücut ağırlığı kazanımı en yüksek KON grubunda, en düşük ise PRO grubunda olmuştur. Ancak vücut ağırlığı kazanımı bakımından deney grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.
2. Yapılan biyokimyasal analizler ile deney gruplarında oksidatif stres durumu araştırılmıştır. Buna göre, GSH ve MDA düzeyleri bakımından deney grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. AFB1 grubunda GSH-Px düzeyinin KON grubuna göre önemli derecede azaldığı, propolis takviyesi yapılan gruplarda (PRO ve AFB1+PRO) ise belirgin bir değişiklik olmadığı görülmüştür. AFB1 grubunun en düşük SOD ve CAT enzim aktivitelerine sahip olduğu saptanmıştır. Ek olarak, propolis takviyesi yapılan gruplarda ise bu enzim aktivitelerinin KON grubu ile benzer olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, PRO grubunun TAS düzeyi KON ve AFB1 gruplarından anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.
3. Deney gruplarındaki bağırsak mikrobiyal topluluğu araştırmak için ortak ve benzersiz OTU'ların analizi yapılmıştır. AFB1 grubunun daha spesifik OTU'lar içerdiği, KON ve AFB1+PRO gruplarının mikrobiyal topluluk yapısının diğer gruplara göre daha benzer olduğu görülmüştür. Böylece AFB1 maruziyeti ve propolis takviyesi ratlarda bakteriyel topluluk yapısını değiştirmiştir.
4. Yapılan alfa çeşitlilik analizi (observed features, Chao1, Shannon ve Simpson) PRO grubunda bakteriyel topluluk çeşitliliğinin diğer gruplara göre daha fazla olduğunu ortaya koymuştur.

5. AFB1 maruziyeti ve propolis takviyesinin bağırsak mikrobiyotasında filum, sınıf, takım, aile, cins ve tür düzeyinde göreceli bollukları incelenmiştir. Buna göre *Firmicutes*, *Bacteroidetes* ve *Proteobacteria* filumlarının ratların gaitalarında en bol bulunan filumlar olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, *Ligilactobacillus*, *Roseburia*, *Lactobacillus*, *Prevotella* ve *Romboutsia* deney gruplarında farklı oranlarda olsa da bu cinsler bağırsak mikrobiyotasının çoğunluğunu oluşturmaktadır.
6. Mevcut çalışmada, prebiyotikleri metabolize ederek asetat ve propiyonat gibi KZYA üretimini sağlayan *Phascolarctobacterium* cinsi ile serum GSH-Px aktivitesi arasında pozitif ilişki bulunmuştur.
7. Spesifik olarak, AFB1 grubunda patojen olarak bilinen gram negatif *Pseudoscherichia* cinsi belirgin olarak artmıştır. AFB1+PRO grubunda ise KZYA üreten ve oksidatif stresi azaltarak inflamatuvar bağırsak hastalıklarının tedavisinde kullanılan *Anaerostipes* ve *Coproccoccus* bolluklarının arttığı belirlenmiştir.

Bu çalışma, düşük doz AFB1 uygulamasının neden olduğu disbiyozu karşı propolis takviyesinin koruyucu etkilerini gösteren ilk çalışmadır. Oral propolis takviyesinin, AFB1'e maruz kalan ratlarda oksidatif stresin hafifletilmesi ve bağırsak dokusunun korunması üzerine faydalı etkileri olabileceği, bunun da bağırsak mikrobiyotasının modülasyonuna katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, insanlarda AFB1 maruziyetinden kaynaklanan toksisite bulgularının propolis takviyesi ile azaltılabileceği öngörülmektedir. Ancak, propolisin AFB1 detoksifikasyonundaki potansiyel mekanizmaları literatürde hala belirsizliğini korumaktadır. Bu nedenle biyolojik ajan olarak kullanılan propolisin AFB1'i detoksifiye edici etkisi moleküler düzeyde araştırılmalıdır.

7.KAYNAKLAR

- Aabed K, Shafi Bhat R, Moubayed N, Al-Mutiri M, Al-Marshoud, M, Al-Qahtani, A, Ansary A. Ameliorative effect of probiotics (*Lactobacillus paracasei* and Protexin®) and prebiotics (propolis and bee pollen) on clindamycin and propionic acid-induced oxidative stress and altered gut microbiota in a rodent model of autism. *Cell Mol Biol*, 2019; 65(1): 1-7.
- Abbasi F, Liu J, Zhang H, Shen X, Luo X. Effects of feeding corn naturally contaminated with aflatoxin on growth performance, apparent ileal digestibility, serum hormones levels and gene expression of Na⁺, K⁺-ATPase in ducklings. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2018; 31(1): 91-97.
- Abd-Elrazek A, Mahmoud S, Abd ElMoneim A. The comparison between curcumin and propolis against sepsis-induced oxidative stress, inflammation, and apoptosis in kidney of adult male rat. *Future J Pharm Sci*, 2020; 6(1): 1-13.
- Abd Elfatah SI, Abdel-Kader M, El-Mougy N, Soliman K. Suppression of Aflatoxins Production in Artificially Infested Maize Grains With *Aspergillus flavus* During Storage Conditions. *J Microbiol Biotechnol Food Sci*, 2021; 10(5): e2243-e2243.
- Abd Jamil Z, Zhari I. Antibacterial and phenolic content of propolis produced by two Malaysian stingless bees, *Heterotrigona itama* and *Geniotrigona thoracica*. *Int J Pharmacogn Phytochem Res*, 2016; 8(1): 156-161.
- Abouzied MM, Horvath AD, Podlesny PM, Regina NP, Metodiev VD, Kamenova-Tozeva RM, Ganev VS. Ochratoxin A concentrations in food and feed from a region with Balkan Endemic Nephropathy. *Food Addit Contam*, 2002; 19(8): 755-764.

- Adebo O, Njobeh P, Gbashi S, Nwinyi, Mavumengwana V. Review on microbial degradation of aflatoxins. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017; 57(15): 3208-3217.
- Adedara IA, Owumi SE, Uwaifo AO, Farombi EO. Aflatoxin B1 and ethanol co-exposure induces hepatic oxidative damage in mice. *Toxicol Ind Health*, 2010; 26(10): 717-724.
- Adedara IA, Atanda OE, Sant'Anna Monteiro C, Rosemberg DB, Aschner M, Farombi EO, Emanuelli T. Cellular and molecular mechanisms of aflatoxin B1-mediated neurotoxicity: The therapeutic role of natural bioactive compounds. *Environ Res*, 2023; 237(1): 116869.
- Adelusola OOSMK, Oyelese TAA. Aflatoxins in autopsy kidney specimens from children in Nigeria. *J Toxicol Environ Health - A: Curr*, 1998; 55(5): 317-323.
- Adeyeye SA. Fungal mycotoxins in foods: A review. *Cogent Food Agric*, 2016; 2(1): 1213127.
- Afshar P, Shokrzadeh M, Raeisi SN, Ghorbani-HasanSaraei A, Nasiraii LR. Aflatoxins biotransformation strategies based on probiotic bacteria. *Toxicon*, 2020; 178: 50-58.
- Afsharpour F, Javadi M, Hashemipour S, Koushan Y, Haghighian HK. Propolis supplementation improves glycemic and antioxidant status in patients with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Complement Ther Med*, 2019; 43: 283-288.
- Agriopoulou S, Stamatelopoulou E, Varzakas T. Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: Prevention and detoxification in foods. *Foods*, 2020; 9(2): 137-184.
- Aldemir O, Yıldırım HK, Sözmen EY. Arılar ile Gelen Sağlık (1. Baskı). Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir 2015; s.: 8-9.
- Alfarrayeh I, Fekete C, Gazdag Z, Papp G. Propolis ethanolic extract has double-face in vitro effect on the planktonic growth and biofilm formation of some commercial probiotics. *Saudi J Biol Sci*, 2021; 28(1): 1033-1039.

- Aljazzar A, El-Ghareeb WR, Darwish WS, Abdel-Raheem SM, Ibrahim AM, Hegazy EE, Mohamed EA. Effects of aflatoxin B1 on human breast cancer (MCF-7) cells: cytotoxicity, oxidative damage, metabolic, and immune-modulatory transcriptomic changes. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2023; 30(5): 13132-13140.
- Alm-Eldeen AA, Mona MH, Shati AA, El-Mekkawy HI. Synergistic effect of black tea and curcumin in improving the hepatotoxicity induced by aflatoxin B1 in rats. *Toxicol Ind Health*, 2015; 31(12): 1269-1280.
- Almuhayawi MS. Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi J Biol Sci*, 2020; 27(11): 3079-3086.
- Anjum SI, Ullah A, Khan KA, Attaullah M, Khan H, Ali H, Ghramh HA. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi J Biol Sci*, 2019; 26(7): 1695-1703.
- Aslankoç R, Demirci D, Ümmahan İ, Yıldız M, Öztürk A, Çetin M, Yılmaz B. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü-Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2019; 26(3): 362-369.
- Bae IA, Ha JW, Choi JY, Boo YC. Antioxidant Effects of Korean Propolis in HaCaT Keratinocytes Exposed to Particulate Matter 10. *Antioxidants*, 2022; 11(4): 781.
- Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol*, 2005; 100(1-2): 114-117.
- Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018; 1865(5): 721-733.
- Benkerroum N. Chronic and acute toxicities of aflatoxins: Mechanisms of action. *Int J Environ Res Public Health*, 2020; 17(2): 423.
- Bennett JW. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and Mycopathologia. *Mycopathologia*, 1987; 100(1): 3-5.
- Bischoff SC. 'Gut health': a new objective in medicine? *BMC medicine*, 2011; 9(24): 1-14.

- BIOMIN (2020). Mycotoxin Survey Q1 2020 Results. Erişim: [https://www.biomin.net/science-hub/biomin-mycotoxin-survey-q1-2020-results/], Erişim tarihi: 12 Mayıs 2023.
- BIOMIN (2021). *World Mycotoxin Survey: Impact 2021*. Erişim: [https://www.biomin.net/science-hub/world-mycotoxin-survey-impact-2021/], Erişim tarihi: 12 Mayıs 2023.
- Borek C. Dietary antioxidants and human cancer. *Integr. Cancer Ther*, 2004; 3(4): 333-341.
- Braakhuis A. Evidence on the health benefits of supplemental propolis. *Nutrients*, 2019; 11(11): 2705.
- Bratovcic A. Antioxidant enzymes and their role in preventing cell damage. *Acta Sci Nutr Health*, 2020; 4(3): 1-7.
- Buchta V, Ćerný J, Opletalová V. In vitro antifungal activity of propolis samples of Czech and Slovak origin. *Open Life Sci*, 2011; 6(2): 160-166.
- Budin C, Man HY, Al-Ayoubi C, Puel S, van Vugt-Lussenburg BMA, Brouwer A, Soler L. Versicolorin A enhances the genotoxicity of aflatoxin B1 in human liver cells by inducing the transactivation of the Ah-receptor. *Food Chem Toxicol*, 2021; 153: 112258.
- Bullerman L. Significance of mycotoxins to food safety and human health. *J Food Prot*, 1979; 42(1): 65-86.
- Cai W, Xu J, Li G, Liu T, Guo X, Wang H, Luo L. Ethanol extract of propolis prevents high-fat diet-induced insulin resistance and obesity in association with modulation of gut microbiota in mice. *Int Food Res*, 2020; 130: 108939.
- Canavar Ö, Kaynak MA. Prevention of pre-harvest aflatoxin production and the effect of different harvest times on peanut (*Arachis hypogaea* L.) fatty acids. *Food Addit Contam*, 2013; 30(10): 1807-1818.
- Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des*, 2009; 15(13): 1546-1558.

- Cao Q, Lin L, Xu T, Lu Y, Zhang C, Yue K, Jian F. Aflatoxin B1 alters meat quality associated with oxidative stress, inflammation, and gut-microbiota in sheep. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021; 225: 112754.
- Cao W, Yu P, Yang K, Cao D. Aflatoxin B1: Metabolism, toxicology, and its involvement in oxidative stress and cancer development. *Toxicol Mech Methods*, 2022; 32(6): 395-419.
- Cardinault N, Tourniaire F, Astier J, Couturier C, Perrin E, Dalifard J, Bonnet L. Poplar Propolis Ethanolic Extract Reduces Body Weight Gain and Glucose Metabolism Disruption in High-Fat Diet-Fed Mice. *Mol Nutr Food Res*, 2020; 64(18): 2000275.
- Chandna P, Adlakha VK, Das S, Singh S. Complementary and Alternative Medicine (CAM): a review of propolis in dentistry. *Technology*, 2014; 4(6): 675-685.
- Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat*, 1984; 11(4): 265-270.
- Chavda VP, Chaudhari AZ, Teli D, Balar P, Vora L. Propolis and Their Active Constituents for Chronic Diseases. *Biomedicines*, 2023; 11(2): 259.
- Chen CN, Weng MS, Wu CL, Lin JK. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *J Evid Based Complementary Altern Med*, 2004; 1(2): 175-185.
- Chen X, Sun-Waterhouse D, Yao W, Li X, Zhao M, You L. Free radical-mediated degradation of polysaccharides: Mechanism of free radical formation and degradation, influence factors and product properties. *Food Chem*, 2021; 365: 130524.
- Chien YH, Yu YH, Chen YW. Taiwanese green propolis ameliorates metabolic syndrome via remodeling of white adipose tissue and modulation of gut microbiota in diet-induced obese mice. *Biomed Pharmacother*, 2023; 160: 114386.
- Costa J, Lima N, Santos C. An overview on possible links between aflatoxin B1 exposure and gallbladder cancer. *Mycotoxin Res*, 2021; 37(3): 205-214.

- Crane FL. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll Nutr*, 2001; 20(6): 591-598.
- Çelik D. *Kuru incirlerde aflatoksin ve oktaroksin a varlığının belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi*, Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çorum 2022; s.: 28-35.
- da Silva JVB, de Oliveira CAF, Ramalho LNZ. Effects of Prenatal Exposure to Aflatoxin B1: A Review. *Molecules*, 2021; 26(23): 7312.
- Damiano S, Jarriyawattanachaikul W, Girolami F, Longobardi C, Nebbia C, Andretta E, Schiavone A. Curcumin supplementation protects broiler chickens against the renal oxidative stress induced by the dietary exposure to low levels of aflatoxin B1. *Front Vet Sci*, 2022; 8: 822227.
- DeGruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflamm Bowel Dis*, 2016; 22(5): 1137-1150.
- Demir S, Kazaz IO, Kerimoglu G, Demir EA, Colak F, Biyik AF, Mentese A. Propolis ameliorates ischemia/reperfusion-induced testicular damage by reducing oxidative stress. *Rev Int Androl*, 2023; 21(3): 100364.
- Desalegn B, Nanayakkara S, Harada KH, Hitomi T, Chandrajith R, Karunaratne U, Koizumi A. Mycotoxin detection in urine samples from patients with chronic kidney disease of uncertain etiology in Sri Lanka. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2011; 87: 6-10.
- Dey DK, Kang JI, Bajpai VK, Kim K, Lee H, Sonwal S, Huh YS. Mycotoxins in food and feed: Toxicity, preventive challenges, and advanced detection techniques for associated diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022; 63(27): 8489-8510.
- Diaz GJ, Murcia HW. An unusually high production of hepatic aflatoxin B1-dihydrodiol, the possible explanation for the high susceptibility of ducks to aflatoxin B1. *Sci Rep*, 2019; 9(1): 8010.
- Dohnal V, Wu Q, Kuča K. Metabolism of aflatoxins: key enzymes and interindividual as well as interspecies differences. *Arch Toxicol*, 2014; 88: 1635-1644.

- Dragomanova S, Miteva S, Nicoletti F, Mangano K, Fagone P, Pricoco S, Tancheva L. Therapeutic Potential of Alpha-Lipoic Acid in Viral Infections, including COVID-19. *Antioxidants*, 2021; 10(8): 1294.
- El-Amawy AA, Zaahkouk SA, AbdelRasheed HG, Elarabi BE. The protective efficacy of propolis against multi heavy metals-induced oxidative stress and hepato-renal damage in the males of albino rats. *Egypt J Chem*, 2023; 66(3): 289-300.
- El-Mekkawy HI, Al-Kahtani MA, Shati AA, Alshehri MA, Al-Doaiss AA, Elmansi AA, Ahmed A. E. Black tea and curcumin synergistically mitigate the hepatotoxicity and nephropathic changes induced by chronic exposure to aflatoxin-B1 in Sprague–Dawley rats. *J Food Biochem*, 2020; 44(9): e13346.
- El Menyiy N, Al Waili N, Bakour M, Al-Waili H, Lyoussi B. Protective effect of propolis in proteinuria, crystaluria, nephrotoxicity and hepatotoxicity induced by ethylene glycol ingestion. *Arch Med Res*, 2016; 47(7): 526-534.
- Elsanhoty RM, Salam SA, Ramadan MF, Badr FH. Detoxification of aflatoxin M1 in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. *Food Control*, 2014; 43: 129-134.
- Emadi A, Eslami M, Yousefi B, Abdolshahi A. In vitro strain specific reducing of aflatoxin B1 by probiotic bacteria: a systematic review and meta-analysis. *Toxin Rev*, 2022; 41(3): 995-1006.
- Eraslan G, Essiz D, Akdogan M, Sahindokuyucu F, Altintas L, Hismiogullari S. Effects of dietary aflatoxin and sodium bentonite on some hormones in broiler chickens. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2005; 49: 93-96.
- Erginkaya Z, Kabak B. Fırsatçı patojenler, küfler, parazitler, virüsler, prionlar ve alg toksinleri. Kitap: Erkmen O (yazar), *Gıda Mikrobiyolojisi (1. Baskı)*. Efil Yayınevi, Ankara 2010; s.: 183-203.
- Erol HS. İnflamasyon ve Serbest Radikaller. Kitap: Goncagül G, Günaydin E (yazar), *Sağlık Bilimleri Alanında Güncel Araştırmalar (1. Baskı)*. Duvar Yayınları, Ankara 2020a; s.: 97-114.
- Erol C. Akut romatizmal ateşli hastalarda serum malondialdehit asit, superoksit dismutaz, katalaz, redükte glutatyon ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinin

incelenmesi, Uzmanlık Tezi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Van 2020b; s.: 48-51.

Ertaş M. *Koroner Kalp hastası Olan Bireylerde Lipid Perkosidasyon düzeyinin Tespiti, Yüksek Lisans Tezi*, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2005; s.: 17-28.

Eskola M, Kos G, Elliott CT, Hajšlová J, Mayar S, Krska R. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited ‘FAO estimate’ of 25%. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020; 60(16): 2773-2789.

European Commission (1881). 2006 of 19th December 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Erişim: [https://www.legislation.gov.uk/eur/2006/1881], Erişim Tarihi: 15 Mayıs 2023.

European Commission (2023). *RASFF Aflatoxin Notices*. Erişim: [https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search]. Erişim tarihi: 15 Mayıs 2023.

Fang H, Wang B, Jiang K, Liu M, Wang L. Effects of *Lactobacillus pentosus* HC-2 on the growth performance, intestinal morphology, immune-related genes and intestinal microbiota of *Penaeus vannamei* affected by aflatoxin B1. *Aquaculture*, 2020; 525: 735289.

Fasihi-Ramandi M, Bayat G, Kachuei R, Golmohammadi R. Effects of aflatoxin B1 exposure on sperm in rodents: a systematic review and meta-analysis. *Int J Environ Health Res*, 2023; 33(12): 1629-1639.

Flint HJ, Duncan S. *Bacteroides* and *Prevotella*. In: Carl AB, Richard KR (eds), *Encyclopedia of Food Microbiology* (2nd ed), Elsevier Inc, Aberdeen 2014; p.: 203-208.

Gagliano N, Donne ID, Torri C, Migliori M, Grizzi F, Milzani A, Gioia M. Early cytotoxic effects of ochratoxin A in rat liver: A morphological, biochemical and molecular study. *Toxicology*, 2006; 225(2): 214-224.

Garzarella EU, Navajas-Porras B, Pérez-Burillo S, Ullah H, Esposito C, Santarcangelo C, Daglia, M. Evaluating the effects of a standardized polyphenol mixture

- extracted from poplar-type propolis on healthy and diseased human gut microbiota. *Biomed Pharmacother*, 2022; 148: 112759.
- Georgieva K, Popova M, Dimitrova L, Trusheva B, Thanh LN, Phuong DTL, Bankova V. Phytochemical analysis of Vietnamese propolis produced by the stingless bee *Lisotrigona cacciae*. *PLoS One*, 2019; 14(4): e0216074.
- Gerdemann A, Cramer B, Degen GH, Veerkamp J, Günther G, Albrecht W, Hengstler JG. Comparative metabolism of aflatoxin B1 in mouse, rat and human primary hepatocytes using HPLC–MS/MS. *Arch Toxicol*, 2023; 97(12), 3179-3196.
- Ghasem YB, Ownagh A, Hasanloei M. Antibacterial and antifungal activity of Iranian propolis against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Pak J Biol Sci*, 2007; 10(8): 1343-1345.
- Gong D, Gong X, Wang L, Yu X, Dong Q. Involvement of reduced microbial diversity in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Res Pract*, 2016; 2016(1): 6951091.
- Grosu IA, Pistol GC, Taranu I, Marin DE. The Impact of Dietary Grape Seed Meal on Healthy and Aflatoxin B1 Afflicted Microbiota of Pigs after Weaning. *Toxins*, 2019; 11(1): 25.
- Guan S, Ji C, Zhou T, Li J, Ma Q, Niu T. Aflatoxin B1 degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and other microbes selected using coumarin medium. *Int J Mol Sci*, 2008; 9(8): 1489-1503.
- Guarisco J, Hall JO, Coulombe JRA. Butylated hydroxytoluene reduces aflatoxin B1 bioavailability and hepatic adduct formation in Turkeys. In: Panter KE, Wierenga TL, Pfister JA (eds), *Poisonous plants: global research and solutions (1 st ed)*, CABI, Wallingford 2007; p.: 197-202.
- Guo Y, Balasubramanian B, Zhao ZH, Liu WC. Marine algal polysaccharides alleviate aflatoxin B1-induced bursa of Fabricius injury by regulating redox and apoptotic signaling pathway in broilers. *Poult Sci*, 2021; 100(2): 844-857.
- Coppock RW, Christian RRG, Jacobsen BJ. Aflatoxins. In: Gupta RC (eds). *Veterinary toxicology: basic and clinical principles (2 nd eds)*, Academic press, London 2012; p.: 1181-1194.

- Hagerty SL, Hutchison KE, Lowry CA, Bryan AD. An empirically derived method for measuring human gut microbiome alpha diversity: Demonstrated utility in predicting health-related outcomes among a human clinical sample. *PLoS One*, 2020; 15(3): e0229204.
- Hamzeh-Pour S, Khodavaisy S, Mahmoudi S, Vaziri S, Soltan Dallal MM, Oliya S, Rezaie S. The effect of royal jelly and propolis alone and in combination on inhibition of *Aspergillus parasiticus* growth, aflatoxin production, and aflR gene expression. *J Food Saf*, 2020; 40(4): e12815.
- Hargreaves IP. Ubiquinone: cholesterol's reclusive cousin. *Ann Clin Biochem*, 2003; 40(3): 207-218.
- Hassanien AA, Shaker EM, El-Sharkawy EE, Elsherif WM. Antifungal and antitoxin effects of propolis and its nanoemulsion formulation against *Aspergillus flavus* isolated from human sputum and milk powder samples. *Vet World*, 2021; 14(9): 2306.
- He L, Liu Y, Guo Y, Xiao N, Tan Z. Influences of Aflatoxin B1 on main intestinal bacteria communities and enzyme activities in mice. *Toxin Rev*, 2019; 38(2): 121-126.
- He Z, Chen Z, Mo Y, Lu X, Luo Y, Lin S, Gong Y. Assessment of the Adverse Health Effects of Aflatoxin Exposure from Unpackaged Peanut Oil in Guangdong, China. *Toxins*, 2023; 15(11): 646.
- Hernandez-Mendoza A, González-Córdova AF, Vallejo-Cordoba B, Garcia HS. Effect of oral supplementation of *Lactobacillus reuteri* in reduction of intestinal absorption of aflatoxin B1 in rats. *J Basic Microbiol*, 2011; 51(3): 263-268.
- Hua Z, Liu R, Chen Y, Liu G, Li C, Song Y, Lu C. Contamination of aflatoxins induces severe hepatotoxicity through multiple mechanisms. *Front Pharmacol*, 2021; 11: 2144.
- Huang B, Chen Q, Wang L, Gao X, Zhu W, Mu P, Deng Y. Aflatoxin B1 Induces Neurotoxicity through Reactive Oxygen Species Generation, DNA Damage, Apoptosis, and S-Phase Cell Cycle Arrest. *Int J Mol Sci*, 2020; 21(18): 6517.

- Huang L, Duan C, Zhao Y, Gao L, Niu C, Xu J, Li S. Reduction of aflatoxin B1 toxicity by *Lactobacillus plantarum* C88: a potential probiotic strain isolated from Chinese traditional fermented food “tofu”. *PLoS One*, 2017; 12(1): e0170109.
- Huang S, Lin L, Wang S, Ding W, Zhang C, Shaukat A, Liu F. Total Flavonoids of *Rhizoma Drynariae* Mitigates Aflatoxin B1-Induced Liver Toxicity in Chickens via Microbiota-Gut-Liver Axis Interaction Mechanisms. *Antioxidants*, 2023; 12(4): 819.
- Huang S, Zhang CP, Wang K, Li GQ, Hu FL. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 2014; 19(12): 19610-19632.
- Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannon BJ. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl Environ Microbiol*, 2001; 67(10): 4399-4406.
- Huszczynski SM, Lam JS, Khursigara CM. The role of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in bacterial pathogenesis and physiology. *Pathogens*, 2019; 9(1): 6.
- Ibrahim AM, Shamsudin A, Olanrewaju J, Adebola TO. *Pseudodescherichia vulneris* causing sepsis: Challenges in identification in resource limited settings, 1st International E-conference on Microbiology: Covid 19 and Current Issues. Bangladesh February 2021; p.: 1-3.
- Ichi I, Hori H, Takashima Y, Adachi N, Kataoka R, Okihara K, Kojo S. The Beneficial Effect of Propolis on Fat Accumulation and Lipid Metabolism in Rats Fed a High-Fat Diet. *J Food Sci*, 2009; 74(5): 127-131.
- Ishikawa A, Weese J, Bracarense A, Alfieri A, Oliveira G, Kawamura O, Costa M. Single aflatoxin B1 exposure induces changes in gut microbiota community in C57Bl/6 mice. *World Mycotoxin J*, 2017; 10(3): 249-254.
- Ismail A, Gonçalves BL, de Neeff DV, Ponzilacqua B, Coppa CFSC, Hintzsche H, Oliveira CAF. Aflatoxin in foodstuffs: Occurrence and recent advances in decontamination. *Int Food Res*, 2018; 113: 74-85.
- Jia B, Han X, Kim KH, Jeon CO. Discovery and mining of enzymes from the human gut microbiome. *Trends Biotechnol*, 2022; 40(2): 240-254.

- Jiang Y, Hansen P, Xiao Y, Amaral T, Vyas D, Adesogan A. Aflatoxin compromises development of the preimplantation bovine embryo through mechanisms independent of reactive oxygen production. *J Dairy Sci*, 2019; 102(11): 10506-10513.
- Jobe MC, Mthiyane DM, Dlodla PV, Mazibuko-Mbeje SE, Onwudiwe DC, Mwanza M. Pathological Role of Oxidative Stress in Aflatoxin-Induced Toxicity in Different Experimental Models and Protective Effect of Phytochemicals: A Review. *Molecules*, 2023; 28(14): 5369.
- Kabak B, Dobson ADW, Var I. Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2006; 46(8): 593-619.
- Kamala A, Shirima C, Jani B, Bakari M, Sillo H, Rusibamayila N, Simba A. Outbreak of an acute aflatoxicosis in Tanzania during 2016. *World Mycotoxin J*, 2018; 11(3): 311-320.
- Karaca A, Yilmaz S, Kaya E, Altun S. The effect of lycopene on hepatotoxicity of aflatoxin B1 in rats. *Arch Physiol Biochem*, 2021; 127(5): 429-436.
- Karadayı Ş, Karadayı B. Tükürük mikrobiyomunun adli amaçlı kullanımı: Metagenomik analiz yöntemleri: Geleneksel derleme. *Türkiye Klinikleri J Foren Sci Leg Med*. 2021; 18(3): 260-273
- Karatekeli S. Aflatoksin B1 ile oluşturulan karaciğer hasarı üzerine borun koruyucu etkisinin erkek ratlarda araştırılması, Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar 2021; s.: 1-12.
- Kasote DM. Propolis: A neglected product of value in the Indian beekeeping sector. *Bee World*, 2017; 94(3): 80-83.
- Kaya TÖ. Melatonin uygulanan ratların testis dokusunda süperoksit dismutaz-1 (SOD-1), glutatyon peroksidaz-4 (GPX-4) ve katalaz enziminin immunohistokimyasal lokalizasyonu, Doktora Tezi, Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars 2014; s.: 3-25.
- Kędzia B. Pochodzenie propolisu w świetle teorii i badań naukowych. *Herba Polonica*, 2008; 54(4): 179-186.

- Kehrer JP, Klotz LO. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. *Crit Rev Toxicol*, 2015; 45(9): 765-798.
- Khare A, Gaur S. Cholesterol-lowering effects of *Lactobacillus* species. *Curr Microbiol*, 2020; 77: 638-644.
- Kim BR, Shin J, Guevarra RB, Lee JH, Kim DW, Seol KH, Isaacson RE. Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *J Microbiol Biotechnol*, 2017; 27(12): 2089-2093.
- Kitamura H, Naoe Y, Kimura S, Miyamoto T, Okamoto S, Toda C, Miyoshi I. Beneficial effects of Brazilian propolis on type 2 diabetes in ob/ob mice: Possible involvement of immune cells in mesenteric adipose tissue. *Adipocyte*, 2013; 2(4): 227-236.
- Klein PJ, Van Vleet TR, Hall JO, Coulombe JRA. Biochemical factors underlying the age-related sensitivity of turkeys to aflatoxin B1. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2002; 132(2): 193-201.
- Kopec RE, Riedl KM, Harrison EH, Curley JrRW., Hruszkewycz DP, Clinton SK, Schwartz SJ. Identification and quantification of apo-lycopenals in fruits, vegetables, and human plasma. *J Agric Food Chem*, 2010; 58(6): 3290-3296.
- Kotha RR, Tareq FS, Yildiz E, Luthria DL. Oxidative Stress and Antioxidants—A Critical Review on In Vitro Antioxidant Assays. *Antioxidants*, 2022; 11(12): 2388.
- Król W, Bankova V, Sforcin JM, Szliszka E, Czuba Z, Kuropatnicki AK. Propolis: properties, application, and its potential. *J Evid Based Complementary Altern Med*, 2013; 2013: 807578,
- Kulanthaivel L, Srinivasan P, Shanmugam V, Periyasamy BM. Therapeutic efficacy of kaempferol against AFB1 induced experimental hepatocarcinogenesis with reference to lipid peroxidation, antioxidants and biotransformation enzymes. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2012; 2(4): 252-259.

- Kurum A, Deprem T, Kocamis H, Karahan S. Immunohistochemical expression of anti-oxidants in bovine oviduct epithelial cells of estral and luteal phases. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2016; 63(2): 103-110.
- Kusnul Z, Suryono S, Tamsuri A. Ekstrak propolis memperbaiki profil berat badan tikus model kanker payudara yang diinduksi dengan 7, 12-dymethylbenz (a) anthracene (DMBA). *Media Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan*, 2019; 29(2): 135-142.
- Kustiawan PM, Lirdprapamongkol K, Palaga T, Puthong S, Phuwapraisirisan P, Svasti J, Chanchao C. Molecular mechanism of cardol, isolated from *Trigona incisa* stingless bee propolis, induced apoptosis in the SW620 human colorectal cancer cell line. *BMC Pharmacol and Toxicol*, 2017; 18 (32): 1-10.
- Laaroussi H, Bakour M, Ousaaid D, Ferreira-Santos P, Genisheva Z, El Ghouizi A, Lyoussi B. Protective Effect of Honey and Propolis against Gentamicin-Induced Oxidative Stress and Hepatorenal Damages. *Oxidative Med Cell Longev*, 2021; 2021(1): 9719906.
- Larsen JM. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*, 2017; 151(4): 363-374.
- Lauer JM, Duggan CP, Ausman LM, Griffiths JK, Webb P, Wang JS, Ghosh S. Maternal aflatoxin exposure during pregnancy and adverse birth outcomes in Uganda. *Matern Child Nutr*, 2019; 15(2): e12701.
- Lee JY, Kang W, Shin NR, Hyun DW, Kim PS, Kim HS, Bae JW. *Anaerostipes hominis* sp. nov., a novel butyrate-producing bacteria isolated from faeces of a patient with Crohn's disease. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2021; 71(12): 005129.
- Leone A, Diorio G, Sexton W, Schell M, Alexandrow M, Fahey JW, Kumar NB. Sulforaphane for the chemoprevention of bladder cancer: molecular mechanism targeted approach. *Oncotarget*, 2017; 8(21): 35412.
- Lewis L, Onsongo M, Njapau H, Schurz-Rogers H, Lubner G, Kieszak S, Rubin C. Aflatoxin Contamination of Commercial Maize Products during an Outbreak of Acute Aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya. *Environ Health Perspect*, 2005; 113(12): 1763-1767.

- Li W, Li L, Yang F, Hu Q, Xiong D. Correlation between gut bacteria *Phascolarctobacterium* and exogenous metabolite α -linolenic acid in T2DM: a case-control study. *Ann Transl Med*, 2022; 10(19): 1056.
- Li Z, Wang W, Liu D, Guo Y. Effects of *Lactobacillus acidophilus* on the growth performance and intestinal health of broilers challenged with *Clostridium perfringens*. *J Anim Sci Biotechnol*, 2018; 9(1): 1-10.
- Liew WPP, Mohd-Redzwan S. Mycotoxin: Its impact on gut health and microbiota. *Front Cell Infect Microbiol* 2018; 60(8): 1-17.
- Liew WPP, Mohd-Redzwan S, Than LTL. Gut Microbiota Profiling of Aflatoxin B1-Induced Rats Treated with *Lactobacillus casei* Shirota. *Toxins*, 2019; 11(1): 49.
- Liew WPP, Sabran MR, Than LTL, Abd-Ghani F. Metagenomic and proteomic approaches in elucidating aflatoxin B1 detoxification mechanisms of probiotic *Lactobacillus casei* Shirota towards intestine. *Food Chem Toxicol*, 2022; 160: 112808.
- Limaye A, Yu RC, Chou CC, Liu JR, Cheng KC. Protective and Detoxifying Effects Conferred by Dietary Selenium and Curcumin against AFB1-Mediated Toxicity in Livestock: A Review. *Toxins*, 2018; 10(1): 25.
- Lin L, Cao Q, Zhang C, Xu T, Yue K, Li Q, Huang S. Aflatoxin B1 causes oxidative stress and apoptosis in sheep testes associated with disrupting rumen microbiota. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022; 232(1), 113225.
- Lin L, Fu P, Zhang C, Xu T, Cao Q, Shaukat A, Huang S. Evaluation of gut microbiota composition to screening for potential biomarker in AFB1-exposed sheep. *Biotech*, 2023; 13(12): 409.
- Lin X, Hu X, Li F. Development of an in vitro digestion model for assessing the bioaccessibility of aflatoxin B group in foods. *Chin J Prev Med*, 2012; 46(10): 937-941.
- Lin Z, Wu J, Wang J, Levesque CL, Ma X. Dietary *Lactobacillus reuteri* prevent from inflammation mediated apoptosis of liver via improving intestinal microbiota and bile acid metabolism. *Food Chem*, 2023; 404(1): 134643.

- Liu S, Kang W, Mao X, Ge L, Du H, Li J, Liu Y. Melatonin mitigates aflatoxin B1-induced liver injury via modulation of gut microbiota/intestinal FXR/liver TLR4 signaling axis in mice. *J Pineal Res*, 2022; 73(2): e12812.
- Liu SP, Li JY, Kang WL, Li Y, Ge L, Liu DD, Huang KH. Aflatoxin B1 Induces Intestinal Barrier Dysfunction by Regulating the FXR-Mediated MLCK Signaling Pathway in Mice and in IPEC-J2 Cells. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023; 15(1): 867-876.
- Liu T, Sun L, Zhang Y, Wang Y, Zheng J. Imbalanced GSH/ROS and sequential cell death. *J Biochem Mol Toxicol*, 2022; 36(1): e22942.
- Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK., Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 2012; 489(7415): 220-230.
- Lu Q, Guo P, Wang X, Ares I, Lopez-Torres B, Martínez-Larrañaga MR, Martínez MA. MS4A3-HSP27 target pathway reveals potential for haematopoietic disorder treatment in alimentary toxic aleukia. *Cell Biol Toxicol*, 2023; 39(1): 201-216.
- Mahmoodzadeh Hosseini H, Hamzeh Pour S, Amani J, Jabbarzadeh S, Hosseinabadi M, Mirhosseini SA. The effect of Propolis on inhibition of *Aspergillus parasiticus* growth, aflatoxin production and expression of aflatoxin biosynthesis pathway genes. *J Environ Health Sci Eng*, 2020; 18, 297-302.
- Malaguarnera L. Influence of resveratrol on the immune response. *Nutrients*, 2019; 11(5): 946.
- Malekahmadi M, Pahlavani N, Heshmati J, Clayton ZS, Beigmohammadi MT, Navashenag JG, Alavi-Naeini A. Effect of propolis supplementation on oxidative stress markers: A systematic review of randomized controlled trials. *J Herb Med*, 2023; 40: 100679.
- Mancabelli L, Milani C, Lugli GA, Turrone F, Ferrario C, van Sinderen D, Ventura M. Meta-analysis of the human gut microbiome from urbanized and pre-agricultural populations. *Environ Microbiol*, 2017; 19(4): 1379-1390.
- Manda P, Adépo AJB, Kouassi M'bengue A, Konan M, Verdier N'gbe J, Doumbia M, Djédjé Dano S. Évaluation du rôle de l'aflatoxine B1 dans l'apparition du

- carcinome hépatocellulaire en Côte d'Ivoire : étude préliminaire. *Toxicol Anal Clin*, 2018; 30(2): 85-95.
- Masatcioğlu AS, Mustafa T. Avrupa Birliği ve Türkiye Kaynaklı Gıdalarda 2009–2018 Yılları Arasında RASFF Bildirimleri. *Gıda*, 2023; 45(4):623-634.
- Matsuda Y, Wakai T, Kubota M, Osawa M, Sanpei A, Fujimaki S. Mycotoxins are conventional and novel risk biomarkers for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2013; 19(17): 2587.
- McMillan A, Renaud JB, Burgess KM, Orimadegun AE, Akinyinka OO, Allen SJ, Sumarah MW. Aflatoxin exposure in Nigerian children with severe acute malnutrition. *Food Chem Toxicol*, 2018; 111: 356-362.
- Mijailovic NR, Vesic K, Borovcanin MM. The Influence of Serum Uric Acid on the Brain and Cognitive Dysfunction. *Front Psychiatry*, 2022; 13: 828476.
- Mohajer A, Seifi S, Rezaie S, Khaniki GJ, Samarghandian S, Farkhondeh T, Sadighara P. Effect of Aloe vera extract on reducing aflatoxin B1 in eggs of laying hen and egg yolk oxidative stability. *Biointerface Res Appl Chem*, 2021; 11: 12680-12688.
- Monmeesil P, Fungfuang W, Tulayakul P, Pongchairerk U. The effects of astaxanthin on liver histopathology and expression of superoxide dismutase in rat aflatoxicosis. *J Vet Med Sci*, 2019; 81(8): 1162-1172.
- Moore MM, Schoeny RS, Becker RA, White K, Pottenger LH. Development of an adverse outcome pathway for chemically induced hepatocellular carcinoma: case study of AFB1, a human carcinogen with a mutagenic mode of action. *Crit Rev Toxicol*, 2018; 48(4): 312-337.
- Mozaffarian D. Dietary and policy priorities for cardiovascular disease, diabetes, and obesity: a comprehensive review. *Circulation*, 2016; 133(2): 187-225.
- Murcia HW, Diaz GJ. Protective effect of glutathione S-transferase enzyme activity against aflatoxin B1 in poultry species: relationship between glutathione S-transferase enzyme kinetic parameters, and resistance to aflatoxin B1. *Poult Sci*, 2021; 100(8): 101235.

- Myers SP, Hawrelak J. The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern Med Rev*, 2004; 9(2): 180-197.
- Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative Med Cell Longev*, 2019; 2019: 9613090.
- Nazhand A, Durazzo A, Lucarini M, Souto EB, Santini A. Characteristics, Occurrence, Detection and Detoxification of Aflatoxins in Foods and Feeds. *Foods*, 2020; 9(5): 644.
- Nie K, Ma K, Luo W, Shen Z, Yang Z, Xiao M, Wang X. Roseburia intestinalis: a beneficial gut organism from the discoveries in genus and species. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021; 11: 757718.
- Nikbaf-Shandiz M, Tutunchi H, Khoshbaten M, Bonab HN, Ebrahimi-Mameghani M. Propolis supplementation in obese patients with non-alcoholic fatty liver disease: effects on glucose homeostasis, lipid profile, liver function, anthropometric indices and meta-inflammation. *Food Funct*, 2022; 13(22): 11568-11578.
- Niu G, Johnson RM, Berenbaum MR. Toxicity of mycotoxins to honeybees and its amelioration by propolis. *Apidologie*, 2011; 42: 79-87.
- Nodoushan SM, Nasirizadeh N, Kachuei R, Fooladi AAI. Electrochemical detection of aflatoxin B1: an aptasensor prepared using graphene oxide and gold nanowires. *Anal Methods*, 2019; 11(47): 6033-6042.
- Nogal A, Louca P, Zhang X, Wells PM, Steves CJ, Spector TD, Menni C. Circulating levels of the short-chain fatty acid acetate mediate the effect of the gut microbiome on visceral fat. *Front Microbiol*, 2021; 12: 711359.
- Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*, 2001; 31(11): 1287-1312.
- Okamura T, Hamaguchi M, Bamba R, Nakajima H, Yoshimura Y, Kimura T, Fukui M. Brazilian green propolis improves gut microbiota dysbiosis and protects against sarcopenic obesity. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2022; 13(6): 3028-3047.

- Omur A, Yildirim B, Saglam Y, Comakli S, Ozkaraca M. Activity of resveratrol on the influence of aflatoxin B1 on the testes of Sprague dawley rats. *Pol J Vet Sci*, 2019; 22(2): 313-320.
- Ortatatli M, Ciftci MK, Tuzcu M, Kaya A. The effects of aflatoxin on the reproductive system of roosters. *Res J Vet Sci*, 2002; 72(1): 29-36.
- Özkaya Ş, Temiz A. Aflatoksinler: Kimyasal yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2003; 1(1): 1-21.
- Özyurt M, Kopar H, Özyurt S, Demirhan İ, Kurutas EB. Menengiç, Işgın ve Çiriş Otu'nda Antioksidan Aktivitenin Araştırılması. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 2021; 24(4): 733-737.
- Packer L, Cadenas E. Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. *J Clin Biochem Nutr*, 2010; 48(1): 26-32.
- Palkova L, Tomova A, Repiska G, Babinska K, Bokor B, Mikula I, Soltys K. Evaluation of 16S rRNA primer sets for characterisation of microbiota in paediatric patients with autism spectrum disorder. *Sci Rep*, 2021; 11(1): 6781.
- Peng K, Chen B, Sun Y, Chen X, Wang Y, Huang W. Response of growth performance, serum metabolites, intestinal tight junction structure and bacterial microbiomes to the long-term intervention of aflatoxin B1 in *Lateolabrax maculatus* diets. *Aquac Rep*, 2022; 22: 101005.
- Pennycook JH, Scanlan PD. Ecological and evolutionary responses to antibiotic treatment in the human gut microbiota. *FEMS Microbiol Rev*, 2021; 45(5): 1-18.
- Percival M. Nutritional support for connective tissue repair and wound healing. *Clin Nutr Insight*, 1997; 6(98): 1-4.
- Pérez-Torres I, Castrejón-Téllez V, Soto ME, Rubio-Ruiz ME, Manzano-Pech L, Guarner-Lans V. Oxidative Stress, Plant Natural Antioxidants, and Obesity. *Int J Mol Sci*, 2021; 22(4): 1786.
- Pinotti L, Ottoboni M, Giromini C, Dell'Orto V, Cheli F. Mycotoxin Contamination in the EU Feed Supply Chain: A Focus on Cereal Byproducts. *Toxins*, 2016; 8(2): 45.

- Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*, 2015; 97: 55-74.
- Pitt JI. Chapter 30 - Mycotoxins. In: J. G. Morris JG, Potter ME (eds), *Foodborne Infections and Intoxications (4 th ed)*. Academic Press, San Diego 2013; p.: 409-418.
- Plantinga AM, Chen J, Jenq RR, Wu MC. Ecological dissimilarities for paired and longitudinal microbiome association analysis. *Bioinformatics*, 2019; 35(19): 3567-3575.
- Precup G, Vodnar DC. Gut Prevotella as a possible biomarker of diet and its eubiotic versus dysbiotic roles: a comprehensive literature review. *Br J Nutr*, 2019; 122(2): 131-140.
- Probst C, Njapau H, Cotty PJ. Outbreak of an Acute Aflatoxicosis in Kenya in 2004: Identification of the Causal Agent. *Appl Environ Microbiol*, 2007; 73(8): 2762-2764.
- Qi C, Wang L, Liu M, Jiang K, Wang M, Zhao W, Wang B. Transcriptomic and morphological analyses of *Litopenaeus vannamei* intestinal barrier in response to *Vibrio parahaemolyticus* infection reveals immune response signatures and structural disruption. *Fish Shellfish Immunol*, 2017; 70: 437-450.
- Quezada T, Cuellar H, Jaramillo-Juarez F, Valdivia A, Reyes J. Effects of aflatoxin B1 on the liver and kidney of broiler chickens during development. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2000; 125(3): 265-272.
- Rasooli I, Owlia P. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry*, 2005; 66(24): 2851-2856.
- Ravinayagam V, Jaganathan R, Panchanadham S, Palanivelu S. Potential antioxidant role of tridham in managing oxidative stress against aflatoxin-B1-induced experimental hepatocellular carcinoma. *Int J Hepatol*, 2012; 2012(1): 428373.
- Robert H, Payros D, Pinton P, Theodorou V, Mercier-Bonin M, Oswald IP. Impact of mycotoxins on the intestine: are mucus and microbiota new targets? *J Toxicol Environ Health B*, 2017; 20(5): 249-275.

- Roquetto AR, Monteiro NES, Moura CS, Toreti VC, De Pace F, Dos Santos A, Amaya-Farfan J. Green propolis modulates gut microbiota, reduces endotoxemia and expression of TLR4 pathway in mice fed a high-fat diet. *Int. Food Res*, 2015; 76(3): 796-803.
- Rotimi OA, Rotimi SO, Goodrich JM, Adelani IB, Agbonihale E, Talabi G. Time-course effects of acute aflatoxin B1 exposure on hepatic mitochondrial lipids and oxidative stress in rats. *Front Pharmacol*, 2019; 10: 467.
- Salatino A, Salatino MLF. Scientific note: often quoted, but not factual data about propolis composition. *Apidologie*, 2021; 52(2), 312-314.
- Samanta S. Chapter 27 - Prospective role of prebiotics and probiotics in gut immunity. In: D. Bagchi B, Downs BW (eds), *Microbiome, Immunity, Digestive Health and Nutrition (1 st ed)*, Academic Press, West Bengal 2022; p.: 387-404.
- Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*, 2010; 90: 859 –904.
- Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy Y, De B. Free radicals, antioxidants, diseases and phytochemicals: current status and future prospect. *Int J Pharm Sci*, 2010; 3(1): 91-100.
- Seven PT, Seven İ. Effect of Dietary Turkish Propolis as Alternative to Antibiotic on Performance and Digestibility in Broilers Exposed to Heat Stress. *J Appl Anim Res*, 2008; 34(2): 193-196.
- Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol*, 2015; 33(9): 496-503.
- Singh RK, Chang HW, Yan D, Lee KM, Ucmak D, Wong K, Zhu TH. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med*, 2017; 15(1): 1-17.
- Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol*, 2001; 18(4), 463-470.
- Sobral MMC, Gonçalves T, Martins ZE, Bäuerl C, Cortés-Macías E, Collado MC, Ferreira IM. Mycotoxin Interactions along the Gastrointestinal Tract: In Vitro

- Semi-Dynamic Digestion and Static Colonic Fermentation of a Contaminated Meal. *Toxins*, 2022; 14(1): 28.
- Subramaniam S, Sabran MR, Stanslas J, Kirby BP. Effect of aflatoxin B1 exposure on the progression of depressive-like behavior in rats. *Front Nutr*, 2022; 9: 1032810.
- Sui Y, Lu Y, Zuo S, Wang H, Bian X, Chen G, Dong H. Aflatoxin B1 Exposure in Sheep: Insights into Hepatotoxicity Based on Oxidative Stress, Inflammatory Injury, Apoptosis, and Gut Microbiota Analysis. *Toxins*, 2022; 14(12): 840.
- Sumarah MW. The Deoxynivalenol Challenge. *J Agric Food Chem*, 2022; 70(31): 9619-9624.
- Sun LH, Zhang NY, Zhu MK, Zhao L, Zhou JC, Qi DS. Prevention of Aflatoxin B1 Hepatotoxicity by Dietary Selenium Is Associated with Inhibition of Cytochrome P450 Isozymes and Up-Regulation of 6 Selenoprotein Genes in Chick Liver. *J Nutr*, 2016; 146(4): 655-661.
- Sun Y, Song Y, Long M, Yang S. Immunotoxicity of Three Environmental Mycotoxins and Their Risks of Increasing Pathogen Infections. *Toxins*, 2023; 15(3): 187.
- Talat A, Satyanarayana P, Anand P. Association of Superoxide Dismutase Level in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Obstet Gynaecol India*, 2022; 72(1): 6-12.
- Tao W, Zhu W, Nabi F, Li Z, Liu J. Penthorum chinense Pursh compound flavonoids supplementation alleviates Aflatoxin B1-induced liver injury via modulation of intestinal barrier and gut microbiota in broiler. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023; 255: 114805.
- Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*, 2017; 474(11): 1823-1836.
- Tian M, Zhang G, Ding S, Jiang Y, Jiang B, Ren D, Chen P. Lactobacillus plantarum T3 as an adsorbent of aflatoxin B1 effectively mitigates the toxic effects on mice. *Food Biosci*, 2022; 49: 101984.

- Tiryaki O, Seçer E, Temur C. Yemlerde mikotoksin oluşumu, toksisiteleri ve mikotoksin kalıntı analizleri. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2011; 21(1): 44-58.
- Tomaszewski R. Citations to chemical resources in scholarly articles: CRC Handbook of Chemistry and Physics and The Merck Index. *Scientometrics*, 2017; 112(3): 1865-1879.
- Toreti VC, Sato HH, Pastore GM, Park YK. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013(1): 697390
- Trebak F, Alaoui A, Alexandre D, El Ouezzani S, Anouar Y, Chartrel N, Magoul R. Impact of aflatoxin B1 on hypothalamic neuropeptides regulating feeding behavior. *NeuroToxicology*, 2015; 49: 165-173.
- Tsamesidis I, Egwu CO, Samara D, Vogiatzi D, Lettas A, Lymperaki E. Effects of Greek Honey and Propolis on Oxidative Stress and Biochemical Parameters in Regular Blood Donors. *J Xenobiot*, 2022; 12(1): 13-20.
- Tung HT, Wyatt R, Thaxton P, Hamilton P. Impairment of kidney function during aflatoxicosis. *Poult Sci*, 1973; 52(3): 873-878.
- Türk Gıda Kodeksi (2011). Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği. *Resmi Gazete*, 28157(3), 3-4.
- Ullah H, Tovchiga O, Daglia M, Khan H. Modulating gut microbiota: an emerging approach in the prevention and treatment of multiple sclerosis. *Curr Neuroparmacol*, 2021; 19(11): 1966.
- Ventura-Aguilar RI, González-Andrade C, Hernández-López M, Correa-Pacheco ZN, Teksür PK, Ramos-García MdL, Bautista-Baños S. Effect of biodegradable coatings on the growth of *Aspergillus flavus* in vitro, on maize grains, and on the quality of tortillas during storage. *Molecules*, 2022; 27(14): 4545.
- Vipin A, Rao R, Kurrey NK, Ka AA, Venkateswaran G. Protective effects of phenolics rich extract of ginger against Aflatoxin B1-induced oxidative stress and hepatotoxicity. *Biomed Pharmacother*, 2017; 91: 415-424.

- Wagh VD. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Adv Pharmacol Pharm Sci*, 2013; 2013(1): 308249
- Wan B, Yuan X, Yang W, Jiao N, Li Y, Liu F, Jiang S. The Effects of Zearalenone on the Localization and Expression of Reproductive Hormones in the Ovaries of Weaned Gilts. *Toxins*, 2021; 13(9): 626.
- Wang J, Tang L, Glenn TC, Wang JS. Aflatoxin B1 induced compositional changes in gut microbial communities of male F344 rats. *Toxicol Sci*, 2016a; 150(1): 54-63.
- Wang K, Jin X, Li Q, Sawaya ACHF, Le Leu RK, Conlon MA, Hu F. Propolis from different geographic origins decreases intestinal inflammation and *Bacteroides* spp. populations in a model of DSS-Induced colitis. *Mol Nutr Food Res*, 2018; 62(17): 1800080.
- Wang K, Jin X, You M, Tian W, Leu RKL, Topping DL, Hu F. Dietary Propolis Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis and Modulates the Gut Microbiota in Rats Fed a Western Diet. *Nutrients*, 2017; 9(8): 875.
- Wang L, Hua X, Shi J, Jing N, Ji T, Lv B, Chen Y. Ochratoxin A: Occurrence and recent advances in detoxification. *Toxicon*, 2022; 210: 11-18.
- Wang P, Guo P, Wang Y, Teng X, Zhang H, Sun L, Liang H. Propolis ameliorates alcohol-induced depressive symptoms in C57BL/6J mice by regulating intestinal mucosal barrier function and inflammatory reaction. *Nutrients*, 2022; 14(6): 1213.
- Wang Q, Yang Q, Wu W. Progress on Structured Biosensors for Monitoring Aflatoxin B1 From Biofilms: A Review. *Front Microbiol*, 2020; 11: 408.
- Wang SN, Lee KT, Ker CG. Leptin in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2010; 16(46): 5801.
- Wang T, Lei H, Zhou L, Tang M, Liu Q, Long F, Su J. Effect of Fumonisin B1 on Proliferation and Apoptosis of Intestinal Porcine Epithelial Cells. *Toxins*, 2022; 14(7): 471.
- Wang W, Wang Y, Yang J, Wagner KM, Hwang SH, Cheng J, Hammock BD. Aflatoxin B1 exposure disrupts the intestinal immune function via a soluble

- epoxide hydrolase-mediated manner. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023; 249: 114417.
- Wang XQ, Wang W, Peng M, Zhang XZ. Free radicals for cancer theranostics. *Biomaterials*, 2021; 266: 120474.
- Wang X, Wang T, Nepovimova E, Long M, Wu W, Kuca K. Progress on the detoxification of aflatoxin B1 using natural anti-oxidants. *Food Chem Toxicol*, 2022; 169: 113417.
- Wang Y, Ames NP, Tun HM, Tosh SM, Jones PJ, Khafipour E. High molecular weight barley β -glucan alters gut microbiota toward reduced cardiovascular disease risk. *Front Microbiol*, 2016b; 7: 129.
- Wang Y, Zhang M, Jiang L, Gong Y, Liu K, Zhang T. Alterations of gut microbiota in a mouse model with partial small intestinal obstruction. *Front Microbiol*, 2023; 14: 1242650.
- Wei W, Li R, He L, Wang X, Ji X, Zhou Y. Evaluation of toxicological impacts on Sprague–Dawley rat by successively low dose of aflatoxin B1. *J Sci Food Agric*, 2014; 94(14): 3017-3022.
- WHO, IARC (1993). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 56. Erişim: [file:///C:/Users/win10/Downloads/mono56.pdf], Erişim Tarihi: 26 Mayıs 2023.
- Wu HC, Santella R. The role of aflatoxins in hepatocellular carcinoma. *Hepat Mon*, 2012; 12(10): 7238.
- Xue M, Fu M, Zhang M, Xu C, Meng Y, Jiang N, Zhou Y. Aflatoxin B1 Induced Oxidative Stress and Gut Microbiota Disorder to Increase the Infection of Cyprinid Herpesvirus 2 in Gibel Carp (*Carassius auratus gibelio*). *Antioxidants*, 2023; 12(2): 306.
- Xue M, Liu Y, Xu H, Zhou Z, Ma Y, Sun T, Liang H. Propolis modulates the gut microbiota and improves the intestinal mucosal barrier function in diabetic rats. *Biomed Pharmacother*, 2019; 118: 109393.

- Yang S, Peng L, Cheng Y, Chen F, Pan S. Control of citrus green and blue molds by Chinese propolis. *Food Sci Biotechnol*, 2010; 19(5): 1303-1308.
- Yang X, Liu L, Chen J, Xiao A. Response of intestinal bacterial flora to the long-term feeding of aflatoxin B1 (AFB1) in mice. *Toxins*, 2017; 9(10): 317.
- Yang Y, Li G, Wu D, Liu J, Li X, Luo P, Wu Y. Recent advances on toxicity and determination methods of mycotoxins in foodstuffs. *Trends Food Sci* 2020; 96: 233-252.
- Ye L, Chen H, Tsim KWK, Shen X, Li X, Li X, Liu Y. Aflatoxin B1 Induces Inflammatory Liver Injury via Gut Microbiota in Mice. *J Agric Food Chem*, 2023; 71(28): 10787-10797.
- Yilmaz S, Kandemir FM, Kaya E, Ozkaraca M. Chemoprotective effects of propolis on aflatoxin b1-induced hepatotoxicity in rats: Oxidative damage and hepatotoxicity by modulating TP53, oxidative stress. *Curr Proteomics*, 2020; 17(3): 191-199.
- Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, 1994; 74(1): 139-162.
- Yuvaraj S, Sasikumar S, Puhari SSM, Ramprasath T, Baskaran N, Vasudevan V, Selvam GS. Chrysin reduces hypercholesterolemia-mediated atherosclerosis through modulating oxidative stress, microflora, and apoptosis in experimental rats. *J Food Biochem*, 2022; 46(11): e14349.
- Zabaiou N, Fouache A, Trousson A, Baron S, Zellagui A, Lahouel M, Lobaccaro JMA. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chem Phys Lipids*, 2017; 207: 214-222.
- Zeighampour F, Mohammadi SM, Shams E, Naghavi NS. Antibacterial activity of propolis ethanol extract against antibiotic resistance bacteria isolated from burn wound infections. *Zahedan J Res Med Sci*, 2014; 16(3): 25-30.
- Zeng Y, Zeng D, Zhang Y, Ni XQ, Wang J, Jian P, Jing B. Lactobacillus plantarum BS22 promotes gut microbial homeostasis in broiler chickens exposed to aflatoxin B1. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 2018; 102(1): e449-e459.

- Zhai J, Sun X, Lu R, Hu X, Huang Z. Bibliometric Analysis of Global Trends in Research on Seasonal Variations in Gut Microbiota from 2012 to 2022. *Microorganisms*, 2023; 11(8): 2125.
- Zhai Q, Gong X, Wang C, Zhao J, Zhang H, Tian F, Chen, W. Food-borne patulin toxicity is related to gut barrier disruption and can be prevented by docosahexaenoic acid and probiotic supplementation. *Food Funct*, 2019; 10(3): 1330-1339.
- Zhang H, Wang G, Dong J. Inhibitory properties of aqueous ethanol extracts of propolis on alpha-glucosidase. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015; 2015(1): 587383.
- Zhang J, Zheng N, Liu J, Li F, Li S, Wang J. Aflatoxin B1 and aflatoxin M1 induced cytotoxicity and DNA damage in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol*, 2015; 83: 54-60.
- Zhao L, Feng Y, Deng J, Zhang NY, Zhang WP, Liu XL, Sun LH. Selenium deficiency aggravates aflatoxin B1-induced immunotoxicity in chick spleen by regulating 6 selenoprotein genes and redox/inflammation/apoptotic signaling. *J Nutr*, 2019; 149(6): 894-901.
- Zhao L, Pu L, Wei J, Li J, Wu J, Xin Z, Guo C. Brazilian green propolis improves antioxidant function in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Environ Res Public Health*, 2016; 13(5): 498.
- Zheng Y, Wu Y, Tao L, Chen X, Jones TJ, Wang K, Hu F. Chinese Propolis Prevents Obesity and Metabolism Syndromes Induced by a High Fat Diet and Accompanied by an Altered Gut Microbiota Structure in Mice. *Nutrients*, 2020; 12(4): 959.
- Zhou J, Tang L. Wang JS. Assessment of the adverse impacts of aflatoxin B1 on gut-microbiota dependent metabolism in F344 rats. *Chemosphere*, 2019; 217: 618-628.
- Zhou J, Tang L, Wang J, Wang JS. Aflatoxin B1 Disrupts Gut-Microbial Metabolisms of Short-Chain Fatty Acids, Long-Chain Fatty Acids, and Bile Acids in Male F344 Rats. *Toxicol Sci*, 2018; 164(2): 453-464.

Zhou R, Liu MZ, Liang XL, Su M, Li R. Clinical features of aflatoxin B1-exposed patients with liver cancer and the molecular mechanism of aflatoxin B1 on liver cancer cells. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2019; 71: 103225.

Zhou Y, Jin Y, Yu H, Shan A, Shen J, Zhou C, Wang J. Resveratrol inhibits aflatoxin B1-induced oxidative stress and apoptosis in bovine mammary epithelial cells and is involved the Nrf2 signaling pathway. *Toxicon*, 2019; 164: 10-15.

Zullkiflee N, Taha H, Usman A. Propolis: Its role and efficacy in human health and diseases. *Molecules*, 2022; 27(18): 6120.



EKLER

EK-1: Etik kurul onayı



Tarih: 02.11.2022

Toplantı Sayısı: 11



Karar No:22/234

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 02.11.2022 tarihinde Prof. Dr. Füsun Ferda ERDOĞAN 'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi
Vehbi GÜNEŞ	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Füsun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Ahmet ÖZTÜRK	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
M. Betül AYCAN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Ayşe EKEN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Nurcan DURSUN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
İbrahim KARAMAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Sezer DEMİRBUĞA	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi
Selma BÜYÜKKILIÇ BEYZİ	Doç. Dr.	Ziraat Fakültesi
Zeynep CAFEROĞLU AKIN	Doç. Dr.	Sağlık Bilimleri Fakültesi
Ali İleriş AYKUN	Arş. Gör.	Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi ERÜTAM
Umut ALPMAN	Arş. Gör.	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)
Mustafa ERMİŞ	Veteriner Hekim	Deneyisel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.
Ali KOÇ	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Sivil Üye
Filiz ASAN	Avukat	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü'nden Dr.Öğr. Üyesi Neslihan ÖNER tarafından sunulan "Deneyisel Olarak Aflatoksin B1'e Maruz Bırakılan Ratlarda Propolis Takviyesinin Oksidatif Stres ve Bağırsak Mikrobiyotası Üzerine Etkisi" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 02.11.2022
Etik Kurul Başkanı Vekili : Prof. Dr. Füsun Ferda ERDOĞAN

EK-2: Propolisin fenolik antioksidan analizi (LC-MS/MS)

Quantitative Analysis Summary Report					
Batch Data Path	D:\MassHunter\Data\2023\06-Haziran\Phenolic_Compounds\QuantResults\Phenolic_Compounds_Propolis.batch.				
Analysis Time	6/16/2023 5:23 PM	Analyst Name	LCMS\ad min		
Report Time	6/16/2023 5:24 PM	Reporter Name	LCMS\ad min		
Last Calib Update	6/16/2023 5:23 PM	Batch State	Processed		
Quant Batch Version	B.07.01	Quant Report Version	B.07.01		
Sequence Table					
Data File	Acq Method File	Sample Name	Sample Type	Position	Volume
SK_Propolis-Num.d	Phenolic_Compounds.m	SK_Propolis-Num	Sample	P1-B5	-1.00
Quantitation Results					
Data File	Compound	Sample Type	Response	Final Conc	Unit
SK_Propolis-Num.d	Quinic Acid	Sample	7080	2683.9697	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Fumaric Acid	Sample	4028	2389.1864	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Gallic Acid	Sample	4919	147.9120	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Pyrogallol	Sample	5	0.0000	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Keracyanin Chloride	Sample	6171	1845.1999	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Cyanidin-3-o-glucoside	Sample	18030	1819.2552	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Chlorogenic Acid	Sample	45995	1718.2447	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Catechin	Sample	542	17.1751	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Peonidin-3-o-glucoside	Sample	741	148.2484	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	4-OH-Benzoic Acid	Sample	40668	2686.7663	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Epicatechin	Sample	145	0.0000	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Epigallocatechin Gallate	Sample	1	0.0000	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Caffeic Acid	Sample	2521239	49483.7460	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Vanillic Acid	Sample	1471	3004.1509	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Syringic Acid	Sample	11	0.0000	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Vitexin	Sample	8243	44.1778	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Naringin	Sample	74	0.0000	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Ellagic Acid	Sample	620	99.0671	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Hesperidin	Sample	3137	249.7517	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	p-Coumaric Acid	Sample	1566896	31124.9127	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Sinapic Acid	Sample	24	0.0000	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Taxifolin	Sample	94743	2204.5354	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Ferulic Acid	Sample	179250	41525.3079	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Rosmarinic Acid	Sample	3708	920.3959	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Vanillin	Sample	2229	329.2110	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Myricetin	Sample	999	0.0000	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Resveratrol	Sample	248632	8305.0615	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Luteolin	Sample	292993	2731.7785	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Quercetin	Sample	479234	57654.7720	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Apigenin	Sample	68693	589.8101	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Naringenin	Sample	16604	234.4466	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Isorhamnetin	Sample	677420	4778.3925	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Chrysin	Sample	5384	88.2617	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Galangin	Sample	48417	5075.5507	ng/mL
SK_Propolis-Num.d	Curcumin	Sample	4	0.0000	ng/mL
QuantReport_ESTD_Complete_B_06_00.xlsx			Printed at: 5:26 PM on: 6/16/2023		

ORJİNALLİK RAPORU

% **14**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **11**

İNTERNET KAYNAKLARI

% **8**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

% **5**

2

sagens.erciyes.edu.tr

İnternet Kaynağı

% **1**

3

avesis.erciyes.edu.tr

İnternet Kaynağı

% **1**

4

www.researchgate.net

İnternet Kaynağı

<% **1**

5

openaccess.hacettepe.edu.tr

İnternet Kaynağı

<% **1**

6

Çetinkaya, Seda. "Dietilnitrozamin İle hepatosellüler Karsinom Oluşturulmuş Ratlarda Resveratrolün Olası Koruyucu Etkilerinin Araştırılması", Necmettin Erbakan University (Turkey), 2024

Yayın

<% **1**

7

earsiv.hitit.edu.tr

İnternet Kaynağı

<% **1**

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Sevtap KABALI

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2020
Lisans	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi	2018

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2020-Halen	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi	Öğretim Görevlisi
2019-2020	Artvin Çoruh Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi	Araştırma Görevlisi
2018-2019	Kredi ve Yurtlar Kurumu	Diyetisyen

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

SCI, SCI ve AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Kabalı S, Çelik MN, Öner N. Associations of nutrition education with diet quality indexes and chronotype: a cross-sectional study. *International Journal of Environmental Health Research*, 2024; 1-13.
2. Ertaş Öztürk Y, Kabalı S, Açar Y, Ağagündüz D, Budan F. Adaptation of the Food Literacy (FOODLIT) Tool for Turkish Adults: A Validity and Reliability Study *Nutrients*, 2024; 16:1-10.
3. Semiz Z, Kabalı S, Ertaş Öztürk Y. Intuitive eating, diet quality, and nutritional status of vulnerable children living separated from their families: A pilot study. *Acta Alimentaria*, 2024; 2: 316-326.

Diğer Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Ayten Ş, Kabalı S. Strategies to Reduce Food Waste and Losses in Food Service. *Global Journal of Nutrition & Food Science*, 2024; 5(2): 1-6.
2. Kabalı S. Üniversite Öğrencilerinde Sürdürülebilir ve Sağlıklı Yeme Davranışları ile Fiziksel Aktivite Durumlarının Değerlendirilmesi. *Sağlık bilimlerinde değer*, 2024; 14(1): 39-45.
3. Açar Y, Küçükçankurtaran S, Sökülmez Kaya P, Ertaş Öztürk Y. Beslenme Eğitimi Alan ve Almayan Üniversite Öğrencilerinde Hedonik Açlığın Değerlendirilmesi. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2023; 32(3): 351-357.
4. Gedik T, Altun FN, Kabalı S, Ertaş Öztürk Y. The Relationship Between Exam Anxiety and Eating Attitudes in Young People Preparing for the Higher Education Institutions Exam: Cross-Sectional Study. *Türkiye Klinikleri Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2023; 8(3): 403-409.
5. Küçükçankurtaran S. Yetişkin Bireylerde Sosyal Medya Bağımlılığının Antropometrik Ölçümler ve Besin Tüketimi ile İlişkisinin Değerlendirilmesi. *Selçuk Sağlık Dergisi*, 2022; 3(3): 255-269.
6. Küçükçankurtaran S, Caferoğlu Z. D Vitamininin Maternal ve Fetal Sağlık Üzerine Etkisi: Fetal Programlama, Genetik ve Epigenetik Mekanizmalar. *Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2021; 8(4): 709-714.

7. K    cankurtaran S,   zdoĖan Y. Koronavirüs Hastalığı'nın Yetişkinlerin Beslenme ve Fiziksel Aktivite Durumuna Etkisi; COVID-19 ve Beslenme. Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 2021; 11(3): 318-324.

