

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN
AFLATOKSİKOZİSTE ISIRGAN OTU (*URTICA DIOICA*) YAPRAĞI
EKSTRESİNİN KARACİĞER LEZYONLARINI ENGELLEYİCİ
ETKİSİNİN HİSTOPATOLOJİK, İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE
BİYOKİMYASAL OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Araş. Gör. Serkan YILDIRIM
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Zabit YENER

VAN-2011

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN
AFLATOKSİKOZİSTE ISIRGAN OTU (*URTICA DIOICA*) YAPRAĞI
EKSTRESİNİN KARACİĞER LEZYONLARINI ENGELLEYİCİ
ETKİSİNİN HİSTOPATOLOJİK, İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE
BİYOKİMYASAL OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Araş. Gör. Serkan YILDIRIM
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Zabit YENER

VAN–2011

Bu araştırma Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Tarım, Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Grubu tarafından desteklenen 104 V 139 nolu projeden özetlenmiştir.

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN AFLATOKSİKOZİSTE
ISIRGAN OTU (*URTICA DIOICA*) YAPRAĞI EKTRESİNİN KARACİĞER
LEZYONLARINI ENGELLEYİCİ ETKİSİNİN HİSTOPATOLOJİK,
İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE BİYOKİMYASAL OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Araş. Gör. Serkan YILDIRIM
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Jüri Başkanı

Üye

Üye

Üye

Üye

TEZ KABUL TARİHİ

30 /12/ 2011

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı projelendirip doktora tezi olarak veren ve çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Zabit YENER'e, çalışma süresince yardım ve desteklerinden dolayı Prof. Dr. İsmail ÇELİK, Doç. Dr. Fatma İLHAN, Yrd. Doç. Dr. Yusuf GÜL ve Yrd. Doç. Dr. Betül APAYDIN'a, ayrıca çalışmalarım süresince manevi desteklerini eksik etmeyen Anneme ve bütün aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	II
Teşekkür.....	III
İçindekiler.....	IV
Simgeler ve Kısaltmalar	VII
Şekiller	VIII
Çizelgeler	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Aflatoksinler.....	3
2.1.1. Aflatoksinlerin genel özellikleri.....	4
2.1.2. Aflatoksinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	4
2.1.3. Aflatoksinlerin toksikokinetiği.....	5
2.1.3.1. Aflatoksinlerin emilimi.....	5
2.1.3.2. Aflatoksinlerin dağılımı.....	6
2.1.3.3. Aflatoksinlerin biyotransformasyonu.....	6
2.1.3.4. Aflatoksinlerin atılımı.....	8
2.1.4. Aflatoksinlerin etki şekli ve metabolizması	8
2.1.5. Aflatoksinlerin biyolojik etkileri.....	10
2.1.5.1. Aflatoksin zehirlenmesi.....	10
2.1.5.2. Aflatoksinlerin karsinojenik etkileri.....	12
2.1.5.3. Aflatoksinlerin mutajenik etkileri.....	13
2.1.5.4. Aflatoksinlerin teratojenik etkileri.....	13

2.1.5.5. Aflatoksinlerin immunosupresif etkisi	13
2.1.5.6. Aflatoksinlerin embriyo toksik etkileri.....	14
2.1.5.7 Aflatoksinlerin verim ve büyüme üzerine etkileri.....	15
2.1.6. Yemlerde ve hayvansal ürünlerde aflatoksinler	15
2.1.7. Aflatoksikoziste tanı	17
2.1.8. Aflatoksikozisten koruma yöntemleri ve aflatoksinlerinin inaktivasyonu.....	18
2.1.8.1. Fiziksel inaktivasyon.....	19
2.1.8.2. Kimyasal inaktivasyon.....	19
2.1.8.3. Biyolojik inaktivasyon.....	19
2.2. Isırgan Otu (<i>Urtica dioica</i>).....	21
2.2.1. Isırgan otunun içeriği	21
2.2.2. Isırgan otunun etkileri ve kullanım alanları	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Deney Hayvanları	26
3.2. Aflatoksinin Yeme Katılması.....	26
3.3. Bitki Materyali.....	26
3.4. Deneme Şeması.....	27
3.5. Yapılan Analiz ve İncelemeler	27
3.5.1. Biyokimyasal analizler	27
3.5.2. İstatistiksel analizler	27
3.5.3. Histopatolojik incelemeler	28
3.5.4. İmmunohistokimyasal incelemeler	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. Ratların Canlı Ağırlık Sonuçları.....	29

4.2. Biyokimyasal Bulgular	29
4.3. Makroskopik Bulgular.....	31
4.4. Histopatolojik Bulgular.....	31
4.4.1. Grup A (Kontrol).....	31
4.4.2. Grup B (AFB ₁)	31
4.4.3. Grup C (AFB ₁ +IOY)	32
4.4.4. İmmunohistokimyasal bulgular.....	33
4.4.5. Mikroskopik şekiller.....	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	38
5.1. Canlı Ağırlık Artışları	38
5.2. Biyokimyasal Sonuçlar	38
5.3. Makroskopik Bulgular	42
5.4. Histopatolojik Bulgular	43
5.5. İmmunohistokimyasal Bulgular	45
ÖZET	48
SUMMARY	49
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

AF	: Aflatoksin
AFB ₁	: Aflatoksin B ₁
AFB ₂	: Aflatoksin B ₂
AFG ₁	: Aflatoksin G ₁
AFG ₂	: Aflatoksin G ₂
AFM ₁	: Aflatoksin M ₁
AFM ₂	: Aflatoksin M ₂
AFP	: Alpha-fetoprotein
ALT	: Alanin transaminase
ASMA	: Alpha-smooth muscle actin
AST	: Aspatat transaminase
CEA	: Karsinoembriyonik antijen
GSH-px	: Glutathione peroxidase
GST	: Glutation-S-transferaz
H.E	: Hematoksilen-eosin boyama
IOY	: Isırgan otu yaprağı
MDA	: Malondialdehyde
SOD	: Süperoksit dismutaz

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Grup A (Kontrol): Karaciğerin normal histolojik görünümü. H.E x 100.

Şekil 2. Grup B (AFB₁): Geniş odaklar halinde hepatositlerde dejenerasyon ve nekroz. H.E x 50.

Şekil 3. Grup B (AFB₁): Hepatositlerde dejenerasyon ve nekroz. H.E x 200.

Şekil 4. Grup B (AFB₁): Hepatositlerde dejenerasyon ve megalositik hepatositler. H.E x 400.

Şekil 5. Grup B (AFB₁): Portal bölgede normal safra kanalları ve proliferen safra kanalları. H.E x 320.

Şekil 6. Grup C (AFB₁+IOY): Periasiner bölgede fokal dejeneratif hücre topluluğu (oklar) ve parankimde tek tük nekrotik hepatositler. H.E x 200.

Şekil 7. Grup B (AFB₁): Hepatositlerin sitoplazmasında alpha-fetoprotein antijenleri. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen x 320.

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 1: Farklı türlerde AFB₁'in toksisitesi

Çizelge 2: Tarım ve Köyişleri Bakanlığınca yem ve yem hammaddelerinde bulunabilecek maksimum AFB₁ düzeyleri

Çizelge 3: Türkiye’de gıdalarda kabul edilebilir en yüksek aflatoksin değerleri

Çizelge 4: Grupların günlere göre canlı ağırlık ortalamaları ile standart hataları

Çizelge 5: Aflatoksin ve çeşitli katkı maddelerin ratların kan ve karaciğer dokusu biyokimyasal parametreler üzerine etkiler.

1. GİRİŞ

Aflatoksinler, yem veya besinlerde mantarlar tarafından sentezlenen metabolitlerdir. İnsan ya da hayvanlar tarafından bu yem veya besinlerdeki metabolitlerin alınmasından sonra akut veya kronik toksikasyon ve kanser oluşabilmektedir (Robb, 1993). Aflatoksinlerin insanlarda ve hayvan türlerinde akut ve kronik zehirlenmelere yol açması ve bilinen en güçlü doğal karsinojenlerden biri olmaları nedeniyle konu üzerinde çok sayıda araştırma yapılmıştır (Hamilton, 1982; Miller ve ark., 1984; Ellis ve ark., 1991; Robb, 1993). Çeşitli yem ve gıda ürünlerinin mikotoksinlerle kontaminasyonu yaygın bir problemdir. Şimdiye kadar 300'den fazla mikotoksin karakterize edilmiş olup bu sayı zamanla artmaktadır. Özellikle *Aspergillus* cinsi mantarların ürettikleri toksik metabolitlerden aflatoksinler (AF), sahada en sık izole edilen ve hem insan hem de hayvan sağlığı açısından oldukça zararlı olan mikotoksinlerdir. Bunların yol açtığı toksikasyonlara aflatoksikozis denilmektedir. AF'ler hayvanlarda; büyüme hızının gerilemesi, ölüm oranının artması, yumurta veriminin azalması, iştahsızlık, enfeksiyonlara karşı direncin azalması, karaciğer hasarı, kanın pıhtılaşma süresinin uzaması, immun sistemin baskılanması, anemi ile yağ, karbonhidrat ve protein metabolizmasının bozulması gibi olumsuz etkilere yol açmaktadır. Yemde bulunan AF'nin bir kısmı yumurtaya da geçebilmektedir. Yemlerde ve dolayısıyla yumurtalarda bulunacak düşük düzeydeki AF kalıntıları damızlık tavuk veya kanatlı işletmeleri bakımından son derece önemlidir (Atalay, 2007). Hayvansal ürünlerle insanlara yansıyan AF, başta karaciğer tümörü olmak üzere diğer birçok bozuklukların nedenini oluşturur (Oğuz, 1997).

Yemde bulunan AF'lerin detoksifikasyonu (eliminasyonu), insan ve hayvan sağlığı ile ekonomik açıdan da gerekli ve önemli görülmektedir. Eliminasyonda kullanılan yöntemlerin başında, yemde bulunan AF'nin bazı kimyasal maddelerle bağlanarak etkisiz hale getirilmesi gelmektedir. 1990'lı yıllarda alüminyum silikatlar yeme katılarak yaygın olarak kullanılmışlardır. 2000'li yıllardan sonra eliminasyon metodlarına olan ilgi artmış ve bu amaçla laktobasiller gibi bakteriler, ekmek mayası, bakteri ve maya hücresi komponentleri denenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Bunların yanı sıra çeşitli doğal bitki kullanarak organ ve dokulardaki hasar oluşumunu en aza indirmeyi sağlamışlardır (Karaman ve ark., 2005; Atalay, 2007; Yener, 2008).

Günümüzde çeşitli medikal bitkiler, destekleyici tıbbi yardım olarak yaygın bir şekilde kullanılmakta ve “Alternatif Tıp” gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Dünya Sağlık Teşkilatı'nın (WHO) tahminlerine göre dünya üzerinde 20.000'den fazla bitki türü tıbbi maksatlı kullanılmaktadır (Wagner ve Fransworth, 1990). Kansere dünyada en önemli ölüm sebeplerinden biridir (Zhao ve ark., 1999). Bu nedenle kanserin kimyasal bileşiklerle önlenmesi konusu geniş bir araştırma konusu olmaktadır. Bu amaçla doğal veya sentetik bazı kimyasal bileşiklerle kanser oluşumunun engellenmesi konusunda araştırmalar yapılmaktadır (Singh ve Lippman, 1998), bunun yanı sıra meyve, sebze ve bazı medikal bitkilerin değişik kanser türlerinin önlenmesinde etkili kimyasal bileşiklere sahip oldukları gösterilmiştir (Singh ve Lippman, 1998; Hong ve Sporn, 1997).

Bu çalışmanın amacı, ratlarda deneysel olarak oluşturulan aflatoksikozis’de karaciğerde meydana gelen lezyonların oluşumuna karşı ısırgan otu yaprağı ekstraktının hepatoprotektif etkisinin olup olmadığı histopatolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle araştırıp ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Aflatoksinler

Aflatoksinler ilk olarak 1960 yılında İngiltere'de 100.000 hindinin ölümüne yol açan ve "Turkey X Disease (Hindi Hastalığı)" olarak isimlendirilen bir toksikozis olayı ile gündeme gelmişlerdir. Bu olaydan kısa bir süre sonra benzeri ölümlere ördek palazları ve sülünlerde de rastlanmış, toksikasyona neden olan etken olarak, hayvanların yemlerinde yaygın olarak kullanılan Brezilya yerfıstığından şüphe edilmiştir. Daha sonra, rasyonlarında yine bu yem maddesi kullanılan sığır, koyun, domuz ve piliçlerde de hastalığın baş göstermesi sonucu yapılan toksikolojik analizler sonrasında toksinin yerfıstığından köken aldığı tespit edilmiştir. Yapılan daha detaylı çalışmalar sonucunda ise toksik madde izole edilmiş ve kaynağının *Aspergillus flavus* mantarı olduğu ortaya çıkarılmıştır. Söz konusu toksin 1962'de "aflatoksin" olarak isimlendirilmiştir (Sharby, 1978).

Mikotoksinler grubu içinde yer alan aflatoksinler özellikle *Aspergillus flavus* (*A.flavus*) ve *A. parasiticus* olmak üzere diğer bazı *Aspergillus*, *Penicilium* ve *Rhizopus* türleri tarafından üretilen toksik metabolitlerdir. Aflatoksin grubu içinde B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ ve M₂ olmak üzere altı çeşit toksin bulunmaktadır ve aflatoksinler bu toksinlerin ortak adıdır (Hatch, 1988). Aflatoksin kelimesi, *Aspergillus flavus*'m "A-" ve "-fia" hecelerinin birleştirilmesiyle oluşturulmuştur (Ellis ve ark., 1991). Bunlar içerisinde *Aspergillus flavus*'un bazı suşları ve *Aspergillus parasiticus*'un bütün suşlarınca sentezlenen AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ en tehlikelileridir (Sharby, 1978). Aflatoksinlerin morötesi (ultraviyole-UV) ışınlar verdikleri tepkilere göre, mavi floresan yayanlara İngilizce blue karşılığı olan B; yeşil floresan yayanlara da İngilizce green karşılığı olan G denilmiştir (Ellis ve ark., 1991). AFB₁ ve AFB₂ içeren rasyonlarla yemlenen süt sığırlarının sütlerinde AFB₁ ve AFB₂'nin M₁ ve M₂ [milk (süt) toksini] metabolitlerine rastlanılabilmektedir (Şanlı, 1995). Doğada, yem maddelerinde üreyen küflerin en yaygın ve önemlisi olan *Aspergillus* türlerinin ürettiği aflatoksinlerin çok büyük bir oranı (%75-83) AFB₁'dir ve bu nedenle aflatoksikozlardan da büyük oranda bu aflatoksin türü sorumludur (Hatch, 1988; Oğuz, 1997; Oğuz ve ark., 2000). Aflatoksinlerin en toksik metabolitleri AFB₁'den sentezlenen aflatoksikol (R₀), aflatoksin P₁ (AFP₁) ve aflatoksin Q₁ (AFQ₁)'dir (Hatch, 1988).

2.1.1. Aflatoksinlerin genel özellikleri

Aflatoksinler ancak 300°C'nin üzerindeki ısıda tamamen yıkımlanmakta, 230°C'de, 25 dakikada, hazırlanan karma yemlerde aflatoksin içeriği yaklaşık %60 azalabilmektedir (Samarajeewa ve ark., 1990). Aflatoksinler kloroform, aseton, metanol, etanol ve karbon tetraklorür gibi organik bileşiklerde çözünürler (Leeson ve ark., 1995). Yüksek sıcaklıklarda bile stabilitelerini koruyabilen aflatoksinler (300°C'a kadar); formaldehit, sodyum hipoklorit, amonyak ve potasyum permanganat gibi kuvvetli alkali ve yükseltgen bileşiklere karşı oldukça dayanıksızdırlar (Kaya ve ark., 2002; Acay, 2006). Aflatoksinler doğrudan toksik bileşikler olmayıp, onların karaciğer, akciğer veya böbreklerdeki metabolik ürünleri bu etkiye sahiptirler (Oğuz, 1997). Karaciğer ve böbrekler aflatoksikozis'den en çok etkilenen organlardır (Bullerman, 1978; Smith, 1997).

Aspergillus gelişimi için en uygun yem hammaddeleri sırasıyla yer fıstığı, fındık, mısır, soya, pamuk tohumu küspesi ve yoncadır. Ancak, yağlı tohum veya yağlı tohum yan ürünlerine bulaşmış *Aspergillusların* aflatoksikozis oluşturma riskleri, tahıl tanelerinde görülenlerden çok daha yüksektir (Acay, 2006).

2.1.2 Aflatoksinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Aflatoksinler difurokumarolakton'lardandır. Moleküler yapılarının omurgasını B ve M türlerinde bifuran halkası, G türlerinde ise lakton halkası oluşturmaktadır (Sur, 2001). Erime noktaları (°C), B₁, B₂, G₁ ve G₂ için sırası ile 269, 288, 245 ve 239'dur (Oğuz, 1997). Yüksek sıcaklıklara oldukça dayanıklı olan bu bileşiklerin özellikle sütle atılan türevlerinin pastörizasyon işleminden bile etkilenmedikleri ve yapılarında çok fazla bir değişiklik olmadığı bildirilmektedir (Kaya ve ark., 2002).

Mantarlar klorofil içermediklerinden, kendileri için gerekli olan lipid, karbonhidrat ve proteinleri sentezleyemezler ve bu nedenle de saprofit ya da parazit olarak yaşamak zorundadırlar (Cavalheiro, 1981). Ancak her mantarın çoğalabilmesi için belirli ortam koşullarının sağlanması gereklidir. *Aspergillus* türlerinin de gelişip aflatoksin üretebilmelerinde belirli çevresel koşulların optimum düzeyde olması gereklidir. Bu koşullar, depolanan yem maddesinin ve çevrenin nispi nem oranı, depolama sıcaklığı, ortam havasının oksijen oranı, depolama zamanı ve depolanan yemin

niteliğidir. Yem maddesinin nem oranının %12-14 (Reddy, 1992), ortamın nispi nem oranının %80-85 (Leeson ve ark., 1995), depolama sıcaklığının 24-25 °C (Hatch, 1988), ortam havasının oksijen oranının %20-90 arasında olması ve su aktivitesinin 0,95-0,99 aw. düzeylerinde olması (Ellis ve ark., 1991) durumunda 3-4 gün gibi kısa bir sürede küflenme gerçekleşir. Bununla birlikte pH'nın 4-5 arasında olması (Ellis ve ark., 1991) ve özellikle taneli yem maddelerinin kırılmış olması da (Reddy, 1992) küflenmeyi hızlandırmaktadır. Bu faktörler dikkate alındığında, yemlerin aflatoksinlerle kontaminasyonu açısından en riskli coğrafi bölgelerin, tropikal iklim şartlarının hüküm sürdüğü ılıman ve nemli bölgeler olduğu görülmektedir (Glavitis ve Salyi, 1998). Ülkemizde de özellikle Akdeniz, Marmara ve Karadeniz bölgelerinde bu koşullar sağlanabilmektedir (Sur, 2001).

2.1.3.Aflatoksinlerin toksikokinetiği

Vücuda giren tüm yabancı moleküller gibi aflatoksinlerin metabolize edilmesinde de emilim, dağılım, biyotransformasyon ve vücuttan atılım aşamaları bulunmaktadır (Sur, 2001). AF'ler, kimyasal olarak yüksek derecede reaktif bifuran halkası ile pentanon halkası (B serisine karakteristik) veya 6 karbonlu lakton halkası (G serisine karakteristik) arasında bulunan kumarin çekirdeğinden oluşan polisiklik doymamış bileşiklerdir. Bu nedenle difurocumarocyclopentanon derivatı olarak kabul edilmektedirler (Dalvi ve McGowan, 1984). AFB₁'in maksimal toksisiteye ulaşması için mikrozomal oksidaz enzim sistemi yoluyla AFB₁ 8,9-epoksite dönüştürülmesi gerekmektedir (Moss ve ark., 1985).

2.1.3.1. Aflatoksinlerin emilimi

Absorbsiyon, yabancı maddelerin deri ve mukozal membranlar yoluyla kan dolaşımına geçmesidir. Vücutta bulunan absorbsiyon bölgeleri gastro-intestinal kanal, akciğerler ve deridir. Kimyasal maddelerin vücut membranlarından geçiş oranı, onların yağda eriyebilirlikleri ile ilişkilidir. Aflatoksinler, yağda iyi çözünen bileşikler olduklarından, genellikle gastro-intestinal kanaldan kolaylıkla emilerek kan dolaşımına geçerler ve kan yoluyla karaciğere gelerek orada metobolize olarak toksik metabolitlere dönüştürülürler (Leeson ve ark., 1995).

2.1.3.2. Aflatoksinlerin dağılımı

Dolaşıma geçen toksinler kısa sürede plazmadan ayrılarak yoğun olarak karaciğer, böbrek, adipoz doku, kaslarda ve diğer yumuşak dokularda dağılım gösterirler (Mabee ve Chipley, 1973). Ancak asıl birikim yerleri, toksinin biyotransformasyonunun gerçekleştiği karaciğer ve böbrek gibi organlardır (Leeson ve ark., 1995). AF klirens zamanının sütte 3-6 gün, idrar ve dışkıda 6-9 gün (Kaya ve ark., 2002), yumurtada 7-8 gün, kasta 24 saat olduğu bildirilmektedir (Fernandez ve ark., 1994a). Tavuklarda AFB₁ dağılımı üzerine yapılan bir çalışmada radyoaktivitenin %6,2'sinin göğüs ve bacak kaslarında kaldığı belirlenmiştir (Mabee ve Chipley, 1973).

Yem ile alınan AF'in karaciğere geçiş oranı sığırdaki 1/14.000, domuzda 1/800, et-tipi civcivde 1/1200; sığırdaki süte geçiş oranı ise yaklaşık 1/300 olarak tespit edilmiştir (Rodricks ve Stoloff, 1977). Süte geçişle ilgili diğer çalışmalarda (Pastainer, 1994; Lindsay, 1981) hayvanlar arasında ferdi farklılık görülmekle birlikte bu oranın 1/300-1/1600 arasında olduğu bildirilmektedir. 3310 mcg AF/kg yem ile beslenen tavukların karaciğer, taşlık ve böbreklerinde beslemenin 4. haftasında 3 mcg/kg organ düzeyinde AF'in tespit edildiği kaydedilmektedir (Wolzack ve ark., 1985). Günde 500 mcg AFB₁'in yedi gün süreyle yumurtacı tavuklara verilmesiyle kırmızı kasta 0.14, karaciğerde 0.23 ve böbrekte 0.32 ng/g organ düzeyinde AFB₁'in saptandığı belirtilmektedir (Aldemir, 1993). 2.5 mg AFB₁/kg yem ile 2 hafta süreyle beslenen et-tipi civcivlerin serumlarında 9.89 ng/ml, karaciğerde 4.71 ve kasta 4.71 ng/gr organ düzeyinde AFB₁'in belirlendiği bildirilmektedir (Sahoo ve ark., 1991). İşaretlenmiş AF'in 14 gün süreyle civcivlere verildiği bir çalışmada (Tuncer, 1987), %90.64'ünün dışkı ile atıldığı, vücutta alıkonan kısmının da %11.04'ünün kanda, %9.83'ünün karaciğerde, %4.30'unun kalp kasında, %12.52'sinin kursakta, %31.66'sının göğüs kasında ve %30.63'ünün de bacak kasında tespit edildiği kaydedilmektedir (Oğuz, 1997).

2.1.3.3. Aflatoksinlerin biyotransformasyonu

Aflatoksinlerin biyotransformasyonu Faz-T ve Faz-T₁ reaksiyonları olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Faz-T reaksiyonları hidroksilasyon, O-demetilasyon, epoksidasyon ve redüksiyon olaylarını içerir. Bu olaylardan hidroksilasyon, O-demetilasyon ve epoksidasyondan sorumlu olan enzim, granülsüz endoplazmik retikulumda yer alan

sitokrom P-450 enzimi iken; redüksiyon olaylarından ise sitosolik redüktazlar sorumludurlar (Leeson ve ark., 1995; Geissler ve Faustman, 1988).

Faz-T reaksiyonları sonrasında AFB₁'den, AFM₁, AFQ₁, AFP₁ ve aflatoksikol (R_o) gibi suda çözünen metabolitler meydana gelir. Bunlardan AFM₁ ve AFQ₁ hidroksilasyon sonucu, özellikle maymun idrarında tespit edilen AFP₁ ise O-demetilasyon olaylarının sonrasında meydana gelirlerken; Ro olarak da bilinen aflatoksikol ise redüksiyon olayı sonucunda şekillenir. Ro, mikrozomal dehidrojenazlar tarafından tekrar AFB₁'e re-okside olabildiği için AFB₁'in "depo" formu olarak da bilinir. Epoksidasyon olayında ise DNA'nın nükleofilik bölgelerine yüksek oranda afifinite gösteren ve karsinojenik etkiden büyük oranda sorumlu olan 8,9-epoksid türevi oluşur (Leeson ve ark., 1995; Sur, 2001).

Yapılan çalışmalarla (Mayura ve ark., 1998, Karenlampi, 1987; Geissler ve Faustman, 1988; Neldon-Ortiz ve Qureshi, 1992a) AFB₁'in metabolizmasında, karaciğer kökenli karma işlevli monooksijenaz enzim sistemlerinin (Mixed function monooxygenase, MFO), sitokrom P-450 ve aril hidrokarbon hidroksilaz enzimlerinin rolleri ortaya konulmuştur.

AFB₁'in biyotransformasyonu, akciğerlerdeki *Clara* hücrelerinde de gerçekleşmektedir. Ancak insan akciğerlerinde söz konusu hücrelerin nispeten daha az sayıda olması ve bu hücrelerde biyotransformasyon için gerekli olan P-450 enziminin aktivite yeri olan granülsüz endoplazmik retikulum organelinin az gelişmiş olması farklı mekanizmaları akla getirmektedir. AFB₁'in insan akciğerlerindeki biyoaktivasyonunda P-450 enzimi çok az bir rol üstlenmekte iken, ko-oksidasyon olayı daha önemli bir role sahiptir. Ko-oksidatif biyoaktivasyonun insan akciğerlerindeki AFB₁ karsinojenitesi ile olan ilişkisi, AFB₁ 8,9-epoksid'i etkisiz hale getiren glutathion S-transferaz (GST) enziminin blokajı ile ortaya konulmuştur. Akciğerlerdeki bu biyoaktivasyonun düzeyi hücre tipleri arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Bu olayda en önemli role ise makrofajlar sahiptir (Sur, 2001). Aflatoksinlerin biyotransformasyonunda rol alan Faz-T₁ reaksiyonlarında ise, Faz-T reaksiyonlarında şekillenen metabolitlerin vücuttan atılımı kolaylaştırılır. Bu amaçla Faz-T reaksiyonlarında şekillenen metabolitler, glukuronik asit, sülfat, amino asitler, glutathion, metil ya da asetil grupları gibi endojen maddelerle birleştirilirler (Sur, 2001).

2.1.3.4. Aflatoksinlerin atılımı

Ağızdan alınan aflatoksinler sindirim sisteminden sınırlı düzeyde absorbe edilebilirler. Absorbe olan aflatoksinlerin yaklaşık olarak %85-90'ı ilk 24-48 saat içerisinde idrar, süt veya yumurta ile aflatoksin metabolitleri formunda dışarı atılır (Acay, 2006). Fakat metabolize olan aflatoksinlerin atılımı konusunda da çeşitli görüşler mevcuttur. Wilson ve ark. (1985) koyunlarda yaptıkları bir çalışmada, AFB₁'in idrardaki konsantrasyonunun maksimum plazma konsantrasyonundan 70 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Wong ve Hsieh (1980) ise, maymunlarda idrarla atılımın, fare ve ratlarda ise safra ile atılımın daha etkin olduğunu öne sürmektedirler. Aynı zamanda dışkı ile atılımın yanında süt ve yumurta ile de önemli oranda bir eliminasyon gerçekleşmektedir (Stubblefield ve ark., 1983; Obioha ve ark., 1986; Harvey ve ark., 1991; Galtier, 1998).

2.1.4. Aflatoksinlerin etki şekli ve metabolizması

Kontamine yem ve gıdalarla alınan aflatoksinler, sindirim kanalından absorbe edilerek kan dolaşımına geçer ve albüminlere bağlanarak taşınırlar. Kandaki aflatoksinin çoğu karaciğerde tutulur. Aflatoksinlerin bir kısmı hepatositlerde endoplazmik steroidler ve çeşitli enzimler gibi makromoleküllere bağlanırken bir kısmı da yağda ve suda çözünebilen metabolitlere (AFQ₁, P₁, B_{2a}, G_{2a}, aflatoksikol, M₁, M₂) çevrilir (Campbell ve Hayes, 1976; Schell ve ark., 1993). Aflatoksinler karaciğerde oksidazlar tarafından metabolize edilir. Hidroksilasyonla detoksifiye edilen aflatoksin ana bileşiği glukuronik asit veya sülfatla konjuge edildikten sonra idrar ve çoğunlukla safra ile atılır. Ağızdan alınan AF, bağırsaklardan emildikten sonra genellikle serum albumine bağlanır. Geviş getirenlerde emilmeden önce rumen mikroflorası tarafından konjugatlara çevrilseler de asidik mide ortamında yeniden özgün şekillerine dönerler (Campbell ve Hayes, 1976).

Mikotoksinler ve özellikle aflatoksinlerin genel etki mekanizmaları, DNA, RNA ve protein sentezinin inhibisyonu şeklindedir (Jeffery ve ark., 1984). Aflatoksin türleri içerisinde en toksik tür olarak bilinen AFB₁'in toksisitesinden ise kendisinin değil, sitokrom P-450 ve aril hidrokarbon hidroksilaz gibi bir takım enzimlerin etkileri sonucu ortaya çıkan metabolitlerinin sorumlu olduğu bildirilmektedir (Iwaki ve ark., 1990; Cavin ve ark., 1998). Kendisi etkisiz olan AF, karaciğerde P-450'ye bağlı (geviş getirenlerde p-448) karma işlevli oksidaz (MFO) enzim sistemiyle metabolik değişikliğe uğratarak

(okside edilerek) epoksit türevlerine (AFB₁ 8,9-epoksit gibi) dönüştürüldükten sonra sitotoksik, karsinojenik, mutajenik ve teratojenik etkinlik kazanır. AF'in bu etkileri, öncelikle hücrel nükleoproteinler ve nükleik asitler gibi makromoleküllerle kolayca ve hızla tepkimeye girerek, sonuçta protein sentezi ve hücrel bütünlüğün bozulmasına neden olmalarından kaynaklanır. Sitotoksik ve karsinojenik özelliğinin, AFB₁'in metabolitleri olan AFQ₁, P₁, M₁ ve AFR₀'ın 8,9-epoksit türevlerinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Haworth ve ark., 1989).

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

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

2.1.5. Aflatoksinlerin biyolojik etkileri

Aflatoksinlerin canlılar üzerindeki etkileri; akut ve kronik toksikasyon (aflatoksikozis), teratojenik, mutajenik, karsinojenik, immunosupresyon etkisi, verim ve büyüme üzerine etkisi ile embriyo toksik etkisi olmak üzere 7 ana grupta incelenmektedir.

2.1.5.1. Aflatoksin zehirlenmesi

Aflatoksikozis; küf mantarlarının ürettikleri aflatoksinlerin akut ya da kronik olarak alınması sonrasında vücutta metabolize olduktan sonra oluşturduğu hasara verilen isimdir. Aflatoksikozis, insan ve hayvanlarda doğrudan veya dolaylı olarak görülebilen bir mikotoksikozistir. Yem veya gıdalarla alınan aflatoksin, karaciğer hücrelerinde sitokrom P-450 monooksijenaz enzim sistemi tarafından metabolize edilir. Bu metabolik proses sonucu açığa çıkan bazı aflatoksin metabolitleri toksik, karsinojenik ve mutajenik etkilere sahiptirler (Salmanoğlu, 2002). Farklı bir sendrom olarak düşünülen aflatoksikozis primer ve sekonder aflatoksikozis olarak ikiye ayrılmaktadır.

Aflatoksikozis akut ve kronik olarak iki alt grup altında incelenmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda AF tüketilmesiyle akut primer aflatoksikozis meydana gelmekte ve duyarlılığa bağlı olarak genellikle hayvanların ölümü ile sonuçlanabilmektedir. Akut aflatoksikozisin semptomları; yağlı ve solgun karaciğer, kanamalarla sonuçlanan pıhtılaşma mekanizmasındaki düzensizlikler, karaciğerde sentezlenen proteinlerde azalma, bazı karaciğer enzimlerinin serum düzeylerinde artma ve gastrointestinal kanal ve akciğer konjesyonu ile glomerulonefriti içermektedir (Moss ve ark., 1985). Akut aflatoksikoziste iştahsızlık, solunum güçlüğü, burun akıntısı, durgunluk, kansızlık, öksürük, kanlı ishal, çarpınma, bitkinlik, karaciğer harabiyeti, kılcal damarlarda kanamalar ve ani ölüm görülebilir. Subakut (gizli) olgularda ise sarılık, hematoma, kanamalı bağırsak yangısı ve trombosit sayısında azalma dikkat çeker. Ayrıca, karaciğerde nekroz, kanın pıhtılaşma süresinin uzaması, sarılık ve serum proteinlerinde azalma da sık karşılaşılan bulgulardandır (Sur, 2001).

Kronik aflatoksikozis düşük konsantrasyonlarda AF tüketildiğinde görülmekte, hemorajili konjestif karaciğer, nekrotik odaklar, safra kanalı epitel hücreleri ve hepatik

parankimde proliferasyon, böbreklerde konjesyon ve nadiren hemorajik enterite yol açabilmektedir. Çoğu olayda büyüme ve üreme etkinliğinde azalma dikkati çekmektedir (Moss ve ark., 1985). Kronik zehirlenmede; büyümede gerileme, yem tüketimi ve yemden yararlanmanın düşmesi, anormal tüylenme, kansızlık, etlik piliçlerde karkas kalitesinde düşme, karnın sarkması, sarılık, iştahsızlık ve bağışıklık sisteminin bozulması karakteristik semptomlardandır. Keza, kanatlılarda yumurta veriminde gerileme ve damızlık yumurtacılar da çıkış gücünde düşme de görülebilir (Çelik ve ark., 2000). Ayrıca, kanatlılarda karaciğerin büyüyüp solgunlaşarak kenarlarının kütleşmesi, safra kesesinin dolgun bir hal alması, ödeme bağlı olarak böbreklerin irileşmesi, dalağın şişkin bir görünüm kazanması ve bağırsak içeriğinin koyulaşması tipik bulgulardandır (Sur, 2001).

İnsanlarda Aflatoksikozis: Aflatoksinler, çiftlik hayvanlarında oluşturduğu toksikasyonların dışında, çeşitli dokularda birikerek veya hayvansal ürünlere geçerek bu tip ürünleri tüketen insanlarda önemli sağlık sorunlarına yol açabilmektedirler (Acay, 2006). İnsan ya da hayvanlar tarafından bu yem veya besinlerdeki metabolitlerin alınmasından sonra akut veya kronik toksikasyon ve kanser oluşabilmektedir (Robb, 1993).

Gıda veya yemlerle vücuda alınan aflatoksinler, karaciğer enzimlerini inhibe ederek hepatik lipidlerin karaciğerden periferik dokulara taşınmasına engel olurlar. Bu durumda karaciğerde lipojenik enzim aktivitesinde herhangi bir azalma olmamasına rağmen, yağlanma görülebilmektedir. Aflatoksikozis sonucu karaciğerde ayrıca çeşitli histolojik değişiklikler, ödemler ve hemorajiler de ortaya çıkabilmektedir (Salmanoğlu, 2002).

Hayvanlarda Aflatoksikozis: Çiftlik hayvanlarının aflatoksinlere duyarlılığı farklı olup, en hassas türler ördek, tavşan ve hindi palazlarıdır. Bunu sırasıyla tavşan, kedi, alabalık, hindi, sülün, kaz, civciv, piliç, bıldırcın, tavuk, köpek, domuz, at, sığır, koyun ve keçi izlemektedir (Çizelge 1) (Acay, 2006). Çiftlik hayvanlarınca aflatoksinlerin yüksek dozda kısa süreli ya da düşük dozda uzun süreli tüketimi halinde akut aflatoksikozis oluşabilmekte, buna bağlı olarak depresyon, iştahsızlık, kansızlık, burun akıntısı, kanama, halsizlik, tüy veya kıl örtüsünde bozukluklar, solunum yetersizliği, kanlı ishal ve ölüm görülebilmektedir (Richard ve ark., 1983).

Çizelge 1. Farklı türlerde AFB₁'in toksisitesi (Edds, 1973).

Tür	Oral LD50 mg/kg vücut ağırlığı	Tür	Oral LD50 mg/kg vücut ağırlığı
Tavşan	0,3	Tavuk embriyosu	0,025
Kedi	0,6	Ördek	0,3
Domuz	0,6	Hindi	0,5
Kobay	1,4	Tavuk (New Hampshire)	2,0
Hamster	10,2	Tavuk (Rhode Island)	6,3
Fare	9,0	Koyun	5,0
Baboon	2,0	Rat (Erkek)	7,2
Alabalık	0.8	Rat (Dişi)	17,9
Köpek	0.5-10.0	Maymun	2.0

2.1.5.2. Aflatoksinlerin karsinojenik etkileri

Aflatoksinler bilinen en güçlü karaciğer karsinojenidirler. Çok sayıda hayvan grubunda bu etkilerini gösterirler. Deney hayvanlarında aflatoksinlerin karaciğer ve böbreklerde kanser oluşumuna sebep oldukları gösterilmiştir. Ratlara günlük olarak 100 µg/kg dozda 12-22 ay boyunca aflatoksin verildiğinde ratların %100'ünde kanser oluşmaktadır (Ellis ve ark., 1991). İnsanlarda aflatoksinlerin kansere neden oldukları doğrudan gösterilememiştir. Ancak aflatoksinle kontamine besinlerin tüketildiği bölgelerdeki (Afrika, Hindistan, Güneydoğu Asya) insanlarda karaciğer tümörleri insidensinin yüksek olduğu saptanmış ve bunun aflatoksinlerle ilgili olduğu ileri sürülmüştür (Hsieh ve ark., 1977). Ülkemizde yapılan çalışmalarda Doğu ve Orta Anadolu bölgelerimizde tüketilen bulgurların çoğunluğunda aflatoksinlerle kontaminasyon belirlenmiş, bu bölgelerde görülen karaciğer kanseri insidensinin İstanbul ve Trakya bölgesindekinden yaklaşık dört kat daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Eser ve ark., 1978). AFB₁'in karaciğer, kolon ve böbrek kanserlerine sebep olduğu belirtilmiştir (Madhusudhanan ve ark., 2004). Hayvanlarda AFB₂ ve

AFG₁'in de kanserojen oldukları bilinmesine rağmen AFB₁'in daha kuvvetli hepatokarsinojen olduğu ifade edilmektedir (Moss ve ark., 1985).

2.1.5.3. Aflatoksinlerin mutajenik etkileri

Aflatoksinlerin epoksit türevleri, hücrede DNA zincirinin oluşturulması sırasında, DNA zincirine bağlanarak DNA polimeraz enzimlerini inhibe etmek suretiyle mutasyona neden olmaktadır (Ellis ve ark., 1991). Hepatositlerin özellikle nukleus membranlarında ve endoplazmik retikulumlarında yerleşik P-450 monooksidaz sistemiyle aflatoksinler metabolize edilerek aşırı derecede reaktif olan epoksit türevler oluşmaktadır. Bu epoksit türevler DNA ve RNA gibi sellüler makromoleküller ile kovalent bağlar oluşturarak DNA ve RNA'da mutasyonlar meydana getirebilmektedir (Haworth ve ark., 1989). Oğuz (1997) ise *Salmonella typhimurium* TA 100 suşuyla yaptıkları Ames testi ile 0.005 mcg AFB₁'in mutajenik etkili olduğunu göstermişlerdir.

2.1.5.4. Aflatoksinlerin teratojenik etkileri

Hamsterlere gebeliğin 8. gününde 4 mg/kg dozunda intraperitoneal AFB₁ verilmiş, gebelik sonunda bu hayvanların % 52,9'u normal, % 29,4'ü malforme yavru doğurmuş, %17,6'sında ise ölü veya resorbe fetüs saptanmıştır. Bu malforme yavruarda anensefali, ektopiya kordis, büyümede gerilik, mikrosefali ve umblikal herni gibi gelişim bozuklukları belirlenmiştir (Ellis ve ark., 1991). Yapılan diğer bir çalışmada da 3-30 ng/yumurta dozunda aflatoksin verilen embriyolu yumurtalarda mortalite %33, kalp anomalisi oranı %12 ve vücut anomalilerinin sıklığı %0.04 olarak saptanmıştır (Jelinek ve Peterka, 1985). Cilievici ve ark. (1980)'nin çalışmasında 0,01 ve 0,002 ppm dozunda AFB₁ verilen gruplarda spina bifida ve anoftalmus gibi yapısal anomalilere ise sırasıyla %35 ve %13,3 oranında rastlanmıştır.

2.1.5.5. Aflatoksinlerin immunosupresif etkileri

Aflatoksinler, bursa Fabricius ve timus'ta atrofiye neden olarak lenfositlerde sayısal ve işlevsel yönden yetersizliğe neden olmaktadır (Ghosh ve ark., 1990). Ayrıca immunojenezisin de çeşitli basamaklarını etkileyerek antikor yapımını (özellikle IgG ve IgA) ve nonspesifik humoral maddelerin sentezini bozmakla immun sistemi

baskılamaktadırlar (Venkata ve ark., 1988). Humoral ve hücrel bağışıklığın baskılanmasıyla organizma çeşitli enfeksiyonlara karşı daha duyarlı hale gelmektedir (Traş ve Baş, 1992).

AF'in non-spesifik bağışıklık maddeleri (komponentler, interferonlar ve interleukinler gibi)'nin yapımını bozması sonucu vücut direncinin azalması nedeniyle kanatlılarda *salmonelloz*, *aspergilloz*, *koksidiyoz* ve *marek* gibi hastalıklara karşı duyarlılığın arttığı bildirilmektedir (Giambrone ve ark., 1978; Giambrone ve ark., 1985; Miller ve Wyatt, 1985; Slowik ve ark., 1985). Bağışıklık sisteminde görülen bu eksikliğin, bursa Fabricius ve timusun atrofsi sebebiyle lenfositlerin sayıca ve işlev yönünden yetersizliğinden ileri geldiği belirtilmektedirler (Campbell ve ark., 1983; Moorthy ve ark., 1985; Çelik ve ark., 1995; Keçeci ve ark., 1995). Giambrone ve ark. (1978), AF'in civciv serumundaki Ig G ve Ig A düzeyini azalttığını; Ig M düzeyi üzerinde bir etkisinin olmadığını; T ve B lenfositlerin kemotaktik işlevlerini ve heterofillerin fagositik etkinliğini azalttığını bildirmektedirler.

Tavuklarda aflatoksicozise bağlı immunosupressif etkiler lenfositopeni, T lenfosit sayısının azalması fagositlerin etkinliğinin ve genelde hücrel immünitenin baskılanması ve immunglobulinlerin üretiminin azalmasını içermektedir (Singh ve ark., 1987). Moon ve ark. (1996) oral yolla AFB₁ alınmasının granülosit makrofaj progenitor hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığını, Jakab ve ark. (1994) ise solunum sisteminde TNF- α üretimi ile alveolar makrofaj fagositozunu azalttığını bildirmektedirler.

2.1.5.6. Aflatoksinlerin embriyo toksik etkileri

Gerek memeli hayvanlar ve gerekse de kanatlılarda yapılan çalışma sonuçları aflatoksinlerin önemli derecede embriyotoksik etkilerinin olduğunu ortaya koymaktadır (Geissler ve Faustman, 1988; Mayura ve ark., 1998; Çelik ve ark., 2000a). Ratlara gebeliğin erken dönemlerinde verilen AFB₁'in büyük oranda embriyonal resorbsiyona neden olduğu, yaşayabilen fötüslerde de gelişme geriliklerinin meydana geldiği bildirilmektedir (Mayura ve ark., 1998). Rat embriyo kültür ortamına ilave edilen AFB₁ ise, embriyoda protein ve DNA sentezini önemli oranda inhibe etmekte ve sonuç olarak

özellikle nöral tüpte önemli malformasyonlara neden olmaktadır (Geissler ve Faustman, 1988). Yine hamsterlerde gebelik döneminde alınan AFB₁, şiddeti erken dönemlerde daha da artan fötal malformasyonlara neden olmaktadır (Elis ve Dipaolo 1967).

Kanatlılarda ise memelilerdeki gibi fötal-maternal ilişki olmamakla birlikte, yemlerle alınan aflatoksinlerin belirli oranlarda yumurtaya da geçmesi nedeniyle embriyonal gelişmede ciddi problemler ortaya çıkmaktadır. Yumurtaya geçen AFB₁, özellikle erken dönemlerde yüksek oranlarda embriyonal ölümlere yol açmakta; buna karşın yaşayabilen embriyolarda da gelişme geriliği ve çeşitli anomalilerle birlikte kabuğu kırıp çıkabilen civciv sayısı da önemli oranda düşmektedir (Stoloff, 1977; Çelik ve ark., 2000a). inkübasyon başlangıcında yumurtaya verilen 100 ng/yumurta dozundaki saf AFB₁'in %98 oranında erken embriyonik ölümlere yol açtığını bildirmişlerdir. Sur (2001) ise inkübasyonun 96. saatinde 0,01 ve 0,002 ppm olmak üzere iki farklı dozda uyguladıkları AFB₁'in neden olduğu embriyonik mortalitelerin, sırasıyla %35 ve %26 olduğunu tespit etmişlerdir.

2.1.5.7. Aflatoksinlerin verim ve büyüme üzerine etkileri

Yemle küçük miktarlardaki toksin alan hayvanlarda gelişme hızında yavaşlama, yemin değerlendirilmesinde azalma, yumurta verimi ve ağırlığında azalma, karkas kalitesi ve hastalıklara karşı dirençte düşme ve bağışıklık sisteminin baskılanması gibi başlıca etkileri vardır. Daha az tehlikeli görülen bu etkiler özellikle kanatlılar olmak üzere tüm hayvanlarda ekonomik yönden son derece önemlidir (Kaya ve ark., 2002).

2.1.6. Yemlerde ve hayvansal ürünlerde aflatoksinler

FAOAVHO/Unicef komitesinin Şubat 1985 tarihli genelgesiyle besinlerdeki aflatoksin düzeyi 20 ug/kg (0,02 ppm =20 ppb) olarak belirlenmiş olmakla birlikte; Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) ise 1966'dan beri bu sınırı 20 ppb olarak kabul etmiştir. Ülkemizde ise 16 Kasım 1997 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan tebliğe göre yumurtacı tavuk yemleri için müsaade edilen total aflatoksin üst sınırı 20 ppb, AFB₁ üst sınırı ise 10 ppb olarak belirlenmiştir (Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı Tebliği, 1997) (Çizelge 2).

Ülkemizde üretilen hayvan yemlerinin aflatoksin düzeylerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda oldukça farklı sonuçlar elde edilmektedir (Kaya ve ark., 2002), 106 süt ineği yemi örneğinin 21'inde (%19,6) 0,0125 ppm düzeyinde total AF tespit etmiş iken; Özpınar ve ark. (1988), Marmara bölgesindeki 15 yem fabrikasından topladıkları 74 adet kanatlı karma yemi ve yem hammaddesi örneğinin %44'ünde 0,2 ile 30,4 ppb arasında değişen AFB₁ düzeyleri tespit etmişlerdir. Çalışmada tespit edilen en yüksek AFB₁ düzeyi ise (30,4 ppb) bir yumurta tavuğu yemi örneğine aittir. Elazığ yöresinden temin edilen yem hammaddeleri ile karma yemler üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise üretim-yedirme-depolama zinciri göz önüne alındığında en büyük sorunun depolama aşamasında ortaya çıktığı, bu aşamada üreyen mantar türleri arasında ise %65,62 ile *Aspergillus* türlerinin birinci sırayı aldığı belirlenmiştir (Şahin ve Sarı, 1996).

Hayvanlardaki aflatoksikozis önemli sağlık problemlerine sebep olmasının yanı sıra büyük ölçüde verim kayıplarını da beraberinde getirmekte ve bu da önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Hafez ve ark., 1982). Ayrıca hayvan yemlerinde bulunan aflatoksinler, belirli oranlarda insan gıdası olarak kullanılan hayvansal ürünlere de geçmekte ve halk sağlığını da tehdit edebilmektedir. Zira aflatoksinler bilinen en önemli hepatokarsinogenlerdendir. (Hamilton, 1982). Bu yüzden ülkemizde gıdalarda kabul edilebilir AF düzeyleri belirlenmiştir (Çizelge 3).

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

Çizelge 2. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın 2005/3 no'lu "*Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğ*" yönetmeliğince karma yem ve yem hammaddelerinde bulunabilecek maksimum AFB₁ seviyeleri.

Materyal	Maksimum AFB ₁ seviyesi (KM'de) mg/kg (ppm)
Yem hammaddesi	20ppb
Sığır, koyun ve keçi karma yemleri (Besi)	20ppb
Sığır, koyun ve keçi karma yemleri (Süt)	5ppb
Buzağı ve kuzu karma yemleri	10ppb
Kanatlı ve domuz karma yemleri	20ppb
Diğer karma yemler	10ppb

Çizelge 3. Tarım ve Köyişleri Bakanlığınca Türkiye’de gıdalarda kabul edilebilir en yüksek aflatoksin değerleri

Gıda Türü	AFM ₁	AFB ₁	Toplam AF değeri
Süt ve Süt Ürünleri	0.05ppb	-	-
Peynir	0.25ppb	-	-
Bebek mamaları ve devam	0.02	-	-
Bebek gıdaları ve hazır karışımlar	-	-	0.01
Baharatlar	-	5 ppb	10 ppb
Hububatlar	-	2 ppb	10 ppb
Tüm gıda maddeleri	-	5 ppb	10 ppb

2.1.7. Aflatoksikozisde Tanı

Aflatoksikozisde tanı; klinik bulgular, laboratuvar analizleri ve diğer bazı faktörlerin birlikte değerlendirilmesiyle yapılabilir. Hayvanların küflü yemleri almalarından sonra karaciğer hasarı ve kanda pıhtılaşma bozukluğunu gösteren belirtilerin ortaya çıkması, aflatoksin zehirlenmelerine işaret sayılabilir. Ancak hayvanların süt ve diğer verimlerinde giderek azalma ile yemden faydalanma ve ağırlık kazancında düşme, bağışıklık sisteminin baskılanması sonucu bazı hastalıkların ön plana

çıkmasıyla seyreden kronik olaylar genellikle aflatoksikozisin gözden kaçmasına neden olabilir. Bu nedenlerle, kronik zehirlenmelerin tanısında hayvanlara verilen yem ve yem hammaddelerinin analizi kesin tanı için gereklidir. Aflatoksikozis, kanın pıhtılaşmasındaki bozukluktan dolayı pıhtılaşmayı engelleyen maddeler (varfarin, dikumarol), karaciğere olan etkilerinden dolayı karbon tetraklorür, pirazolidin alkaloidleri ve kömür katranı zehirlenmeleriyle karışabilir (Kaya ve ark., 2002; Çelik, 2007).

2.1.8. Aflatoksikozisten koruma yöntemleri ve aflatoksinlerin inaktivasyonu

Aflatoksikozisten kaçınabilmek için öncelikle ürünlerin tarlada küflenmelerinin önlenmesi gerekir. Sonraki süreçlerde, yani ürünün hasadı, kurutulması, nakli ve depolanması esnasında herhangi bir fungal kontaminasyona karşı gerekli önlemler mutlaka alınmalıdır. Günümüzde, aflatoksikozisin belli bir tedavisi yoktur. Bu nedenle, mümkün olduğunca sağlıklı yemler elde edilmesine yönelik uygulamalara önem verilmektedir. Herhangi bir nedenle yemler kontamine olmuşsa, aflatoksinlerin dolaşım sistemine absorpsiyonlarının önlenmesine çalışılmalıdır (Hatch, 1988).

Aflatoksinler de dahil, mikotoksinlerden ileri gelen zehirlenmelerde etkili bir sağaltım bilinmemektedir. Aflatoksinlerden ileri gelen zehirlenmelerde vitamin A ve D'nin, bazı mineraller ile proteinlerin koruyucu etkileri vardır. Yemlerin mineral madde, vitamin ve diğer besin unsurları bakımından desteklenmesi, özellikle kanatlılar olmak üzere, hayvanları orta dereceli aflatoksikozise karşı koruyabilir. Yemlere 1-2 ppm selenyum, 100 ppm bakır, %0.1-0.15 oranlarında kolin ve metiyonin katılması son derece yararlı olmaktadır. Aflatoksinler protein yapımını engelledikleri için yemlerin, özellikle kükürtlü aminoasitleri içeren proteinlerle desteklenmesi korunmada önemlidir (Ravi ve ark., 2001). A, C, E vitaminleri ve selenyum karaciğerin mikrozomal enzimlerini aktive ederek aflatoksikozise bağlı olarak şekillenen karaciğer kanseri oluşumunu engellemektedirler (Nakae ve ark., 1987; Netke ve ark., 1997). Mikrozomal enzimler, aflatoksinleri kanserojenik olmayan metabolitlere dönüştüren enzimlerdir (Davila ve ark., 1983). Vitamin E'nin antikanserojenik etkisi vitamin C'ye oranla daha yüksektir (Harvey ve ark., 1991; Raina ve Gurtoo, 1985). Vitamin A'nın öncül maddeleri olan karotenoitler de karaciğeri aflatoksinlerin kanser yapıcı etkilerine karşı koruma özelliğine

sahiptirler (Cassand ve ark., 1993). Selenyum ve vitamin E noksanlığı durumunda aflatoksinlerin *in vivo* olarak zararsızlaştırılmaları işlemlerinde aksamalar meydana gelmektedir. Bu tür vitamin ve mineral noksanlıkları bir bakıma aflatoksinlerin aktivasyonunu teşvik etmekte, zararlı etkilerinin daha şiddetli düzeylerde sonuçlanmasına olanak sağlamaktadır (Cassand ve ark., 1993; Chen ve ark., 1982).

2.1.8.1. Fiziksel inaktivasyon

Çeşitli solventlerle ekstraksiyon (Moss ve ark., 1985), yüksek ısıya maruz bırakılma ile inaktivasyon, çeşitli dalga boylarında UV ışık kullanımı ile radyasyon (Fennell, 1966) ve mikotoksinleri bağlama yeteneklerinden yararlanılarak kullanılan çeşitli maddeleri (adsorban) içeren adsorbsiyon metodu gibi işlemler fiziksel detoksifikasyon olarak sınıflandırılmaktadır (Ellis ve ark., 1991).

2.1.8.2. Kimyasal inaktivasyon

AF'lerin kimyasal yolla detoksifikasyonu amacıyla asitler, bazlar, okside edici ajanlar, aldehytler, gazlar ve bisülfidler gibi çok sayıda madde ile çalışılmıştır (Moss ve ark., 1985). Asitlerin AF'leri, özellikle de AFB₁ ve G₁'i yıkımlama yeteneği suyun inkorporasyonu ile hemiasetal formları olan B_{2a} ve G_{2a}'ya dönüşümüyle başarılmıştır (Pons ve ark., 1972). Kuvvetli asitler AF'leri etkili olarak bozundurmaya rağmen ürünün özelliğini değiştirebilmektedirler (Ellis ve ark., 1991). Başka bir çalışmada 60 mg/kg/bwt α -lipoik asit ilavesiyle (Karaman ve ark., 2010) ve yine farklı bir çalışmada Özen ve ark. (2009) melatonin 10 mg/kg/bwt oranda ilavesiyle aflatoksinlerin yol açtığı olumsuz etkilerinden koruduğunu bildirmişlerdir. Günümüzde aflatoksikozise karşı sıklıkla başvurulan yöntemler arasında rasyonlara zeolit, bentonit, polivinil pirrolidin (PVP), silikat, clinoptilolit ve oligosakkarid ilavesi gibi alternatif korunma yöntemleri üzerinde de durulmaktadır (Oğuz, 1997; Ortatlı ve ark., 2004).

2.1.8.3. Biyolojik inaktivasyon

Actinomyces spp, maya ve algleri içeren çoğu mikroorganizma AF'leri bozundurma yeteneğine sahiptir. En aktif organizmanın *Flavobacterium aurantiacum* NRLL B-184 olduğu ve sulu solüsyonlarda AFB₁, G₁ ve M₁'i bozundurma süretiyle irreverzibl olarak

metabolize ettiği ifade edilmektedir (Lillehoj ve ark., 1971). Shetty ve Jespersen (2006), bazı *Lactobasillus* türlerinin de mantar gelişmesini önleme ve detoksifiye etmek için kullanıldığını, bu bozundurma reaksiyonlarının enzimatik aktivite yoluyla olduğunu ve bu enzimlerin AF ile reaksiyona girerek çeşitli son ürün ya da ara ürünler oluşturduklarını ileri sürmüşlerdir (Atalay, 2007). Karaman ve ark.(2005), yaptıkları çalışmada glukomannon mayası 1g/kg ilavesinde aflatoksinlerin yol açtığı olumsuz etkilerinden koruduğu bildirilmiştir. Bunların dışında, aflatoksin içeren rasyonların enerji, protein ve yağda çözünebilen vitamin değerleri (özellikle D vitamini) artırıldığında, aflatoksikozisin yol açtığı bazı olumsuzlukların kısmen giderilebildiği bildirilmiştir (Hatch, 1988; Acay, 2006). Öte yandan, konuya ilişkin olarak araştırmacılar aflatoksikozise karşı alternatif doğal ve biyolojik mücadele yöntemleri geliştirmeye çalışmaktadırlar. Son yıllarda *in vivo* düzeyde laktik asit bakterileri, çeşitli baharat ve bitki ekstraktları ve tanen üzerinde durulmaktadır (Acay, 2006). Farklı bir çalışmada ısırgan otu tohumu yağı 2ml/rat/gün oranında oral olarak verilerek aflatokzise karşı karaciğeri koruduğunu bildirmişlerdir (Yener ve ark., 2008).

2.2. Isırgan Otu (*Urtica dioica*)

Urtica dioica L.'nin popüler adı ısırgan otudur ve Urticaceae familyasındandır (Wetherilt, 1989). Çok zengin bir familya olan Urticaceae familyasında toplam 42 cins bulunmaktadır (Tanker ve ark., 1993). Isırgan otu, dünyanın her yerinde yaygın bir dağılıma sahiptir. Kök ve tohumdan çoğalan, yavaş yayılan, yıl boyunca sürekli bulunan bir bitkidir. Türkiye’de ve dünyanın birçok yerinde insan sağlığı üzerine olan etkisi nedeniyle tedavi edici bir bitki olarak kabul edilmektedir (Wetherilt, 1989).

2.2.1. Isırgan otunun içeriği

Isırgan otunun yaprakları ve gövdesi yakıcı tüylerle kaplanmıştır. Bu tüylerde histamin ve asetilkolin bulunmaktadır (Baytop, 1999). Taze ısırgan otunun yakıcı tüylerine dokunulduğunda deride asetilkolin, histamin, 5-hidroksitriptamin ve serotonin salınımına sebep olarak yakıcı etki göstermektedir (Weber, 2003). Isırgan otu’nun kuru maddesi %18 protein, %14.5-17.0 albüminli maddeler, %2.5 yağlı maddeler ihtiva etmektedir. Bir kg taze bitki 130 mg C vitamini, 730 mg karoten ve oksalat ihtiva etmektedir. Yakıcı tüylerinin içerisinde asetilkolin, histamin ve formik asit bulunmaktadır. Bitkinin yaprakları; vitamin K, vitamin B1, provitamin A, urtisin glükoziti, sistosterin, ksantofil yanında aynı zamanda 14.4 mg/100gr tokoferol, 0.23 mg/100 g riboflavin, 13 mg/100 g demir, 0.95 mg/100 g çinko, 873 mg/100 g kalsiyum, 75 mg/100 g fosfor ve 532 mg/100 g potasyum içermektedir, külü ise %6.3 demirtrioksit, silisyum, magnezyum, potasyum ve kalsiyum içermektedir (Wetherilt, 1989; Koç, 2002). Drogun bileşiminde bunların dışında müsilağ ve tanen de bulunduğu bildirilmektedir (Erdemir, 2001).

Bitkinin köklerinden elde edilen aköz metanolik ekstraktta 7 tane flavonol glikozidleri (kaempferol-3-glukozid ve -3-O-rutinoside, kuersetin-3-O-glukozid, ve -3-O-rutinoside, isorhamnetin-3-O-glukozid, -3-O-rutinoside ve -3-O-neohesperidoside) izole edilmiştir. Bitkide isokuersitrin, kaffeoil ve klorogenik asitte mevcuttur (Weber, 2003). Isırgan otu; formik asit, yüksek oranlarda klorofil, flavonoidler, bitki steroller, bitki enzimleri, fenilpropanlar, kumarinler, terpenoidler, potasyum tuzları, vitamin C, polisakkaritler, bitki lignanları ve köklerinde küçük molekül ağırlıklı lektin (*Urtica dioica* aglutinin (UDA) içermektedir (Gözüm ve ark., 2003; Akbay ve ark., 2003). Yapılan bir

çalışmada ısırgan otundaki Ca miktarı, bulunması gereken referans değerden dört kat fazla bulunmuştur (Fijalek ve ark., 2003).

2.2.2. Isırgan otunun etkileri ve kullanım alanları

Anti-inflamatuvar etki: Deneysel çalışmalarda ısırgan otunun anti-inflamatuvar etkisi gösterilmiştir. Ekstrakt kısmen 5-lipooksijenazın aktivitesini inhibe etmekte ve siklooksijenaz sentez reaksiyonlarında doz bağımlı inhibisyon göstermektedir (Obertreis ve ark., 1996b). Isırgan otunun hem yaprakları hem de köklerinin, TNF- α , IL-1 β gibi proenflamatuvar sitokinlerin aşırı sitümulasyonunu önlediği gösterilmiştir. Sitokinler immun sistemin mesajcıları olarak düşünülebilir. Gerçektende hemen hemen bütün immun bozukluklarda (HIV'dan, kansere ve otoimmun hastalıklara kadar) alerjik durumlarda (astım gibi) ve obezite/insülin rezistansında metabolik düzeyde fonksiyonel düzensizliğin bir parçası olarak karakteristik olarak sitokin düzeylerinde dengesizlik vardır (Obertreis ve ark., 1996b).

Anti-viral ve immun denge: Isırgan otu kökünden *Urtica dioica* agglutinin (UDA) süper lektin denen küçük molekül ağırlıklı lektin elde edilmiştir. UDA Nasetilglukozamin spesifik lektin olarak kabul edilmektedir. Bu süper lektinin HIV, soğuk algınlığı ve İnfluenza'dan sorumlu virusleri inhibe ettiğine dair kanıtlar mevcuttur (Balzarini ve ark., 1992). Ayrıca UDA T hücre sitümulanıdır. CD4+ ve CD8+ T-hücrelerinin her birini ayırt edebildiği gibi T hücre aktivasyonu ve sitokin üretimine neden olabilme kapasitesinden dolayı diğer klasik T hücre stimülanlarından farklıdır. Isırgan otundaki süper lektin dengeyi korumak için immun sistemi stimüle etmektedir (Galelli ve ark., 1995). UDA süper lektinin deneysel oluşturulan sistemik lupus erimatosuslu ratlarda progresyonu önlediği gösterilmiş ve çalışmada UDA-lektinin lupus ve nefritin açık klinik belirtilerinin gelişmediği gözlenmiştir (Musette ve ark., 1996). Aköz kök ekstraktından izole edilen polisakkaritler *in vivo* olarak hem T lenfositleri hem de kompleman sistemi sitümulle etmektedirler. T lenfositler üzerine izolektin karışımının doz bağımlı immunmodülatör aktivitesi ve ısırgan otu aglutininin direkt hücre proliferasyonunu inhibisyonu antiprostatik aktivitenin görülmesine sebep olmaktadır (Fijalek ve ark., 2003).

Antioksidan etkileri: Isırgan otu yaprak ekstraktlarının lipid peroksidasyonu üzerine belirgin inhibitör etkileri gösterilmiştir. Isırgan otunun, serbest radikal oluşumunun bir

belirleyicisi olan MDA'nın, yükselmiş düzeylerini azaltması bir antioksidan adayı olabileceğini göstermiştir. Isırgan otu ekstraktının serbest radikal oluşumu üzerine etkili azaltıcı gücü ve metal şelatör aktivitesi olduğu gösterilmiştir (Cetinus ve ark., 2005). Linoleik asit peroksidasyonunda ısırgan otu ekstraktlarının ilaç olarak verilmesi α - tokoferolden daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Cetinus ve ark., 2005).

Isırgan otunun aköz ekstraktından çok sayıda flavanol glikozidler izole edilmiştir (Fijalek ve ark., 2003). Flavonoidler; antioksidan, antikanser (kuersetin p53 mutant geninde down regülasyon yapar), anti-inflamatuar, antibakteriyel, immunstimulan, antiallerjik, östrojenik, antifosfolipaz A2, siklooksijenaz ve lipooksijenaz inhibitör görevleri vardır (Tanakol, 1998). Bazı araştırmacılar birçok bitki türündeki total fenol ile antioksidan aktivite arasında pozitif bir bağlantı olduğunu açıklamışlardır. Fenoller hidroksil gruplarından dolayı temizleme yeteneğine sahiplerdir. Isırgan otu ekstraktında fenollere denk olan pirokatekol varlığı gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada fenolik komponentlerin antioksidan aktivitesinin olduğunu ve lipid peroksidasyonunu durdurduğunu belirtmişlerdir (Cetinus ve ark., 2005). Polifenollerin günlük 1gr'ın üzerinde sebze ve meyvelerden zengin diyetlerle alınmasının mutagenез ve karsinogenezi inhibe ettikleri savunulmaktadır (Gülçin ve ark., 2004).

Isırgan otu yaprak ekstraktı etkili bir şekilde transkripsiyon faktör NF- κ B'yı inhibe eder. Bunu, ısırgan otu ekstraktının T hücreleri, makrofajlar ve epitel hücreleri gibi değişik hücre tiplerindeki inhibitör etkilerinin NF- κ B yolundaki ortak hedefi engelleyerek ortaya çıkardığı sanılmaktadır. Isırgan otu ekstraktı lipooksijenazdan kaynaklanan enflamasyon ürünlerinin oluşumunu önleyerek inhibitör I κ B- α 'yı stabilize etmektedir. Ayrıca ısırgan otunun anti-inflamatuar etkilerinin NF- κ B aktivasyonunun üzerine inhibitör etkilerinden dolayı olduğu sanılmaktadır. Ek olarak NF- κ B aktivasyonunun önlenmesi antioksidan etkilerin ortaya çıkışından sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür (Riehemann ve ark., 1999).

Bening prostat hipertrofisi ve prostat kanseri: Isırgan otu köklerinin kaynatılması ile elde edilen çayın, bening prostat hipertrofili hastaların yaşam kalitesini arttırması, poliüri ve noktüri azaltmasına bağlı olduğu gösterilmiştir. UDA gibi kökteki bileşimler prostat hücrelerinde membran Na⁺-K⁺ ATPaz'ı inhibe ederek prostat hücre metabolizma ve büyümesini baskılamaktadır. Bu lektin immunstimulator aktivite

göstermekte ve epidermal büyüme faktör reseptörü ile etkileştiği varsayılmaktadır (Lichius ve ark., 1999). Isırgan otunun köklerinden elde edilen %20 metanolik ekstrakt, prostat büyümesini %51.4 inhibe ettiği görülmüştür. Bu ekstraktın prostat epitel hücre ve stromal hücrelerin proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Lichius ve Muth, 1997; Lindemann ve ark., 1999). Köklerden elde edilen aköz ekstrakt doz bağımlı olarak insan prostat epitel hücre membranlarındaki seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG) reseptörlerini inhibe edebilmektedir. Kökten elde edilen ligantları SHBG reseptörlerinin inhibisyonunu sağlayarak antitümöral aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Anti SHBG aktivitesi testesteron metabolizması üzerine pozitif etkiler göstermektedir (Lindemann ve ark., 1999).

Diğer etkiler; Isırgan otu yaprak ve kökleri kan temizleyicisi ve diüretik olarak, bitkinin infüzyonu ise nazal ve menstrual kanama, diabet, romatizma, egzema, anemi, saç kaybı, ekspektoran ve antidiyareal olarak kullanılmaktadır (Fijalek ve ark., 2003). Kuzeydoğu Morocco’da hipertansiyon tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır. Kardiovasküler etkileri, insan lenfosit proliferasyonunu stimüle ettiği, nötrofiller üzerine güçlü immun stimülatör etkileri gösterilmiştir (Cetinus ve ark., 2005). Ratlarda ısırgan otu ekstraktının antibakteriyel aktivite gösterdiği ve yine aynı çalışmada ülser insidansını famotidine göre daha etkili azalttığı ispatlanmıştır (Gülçin ve ark., 2004).

Farzami ve ark. (2003) tarafından, şifalı bir bitki olan ısırgan otu’nun kandaki glikoz düzeyini düşürdüğüne dair bilgilerin İbni Sina’nın yazılı eserlerinde bulunduğu bildirilmektedir. Bu araştırmacılar, ısırgan otunun antidiyabetik etki mekanizması üzerine yaptıkları araştırmada, ısırgan otunun kan glikoz düzeyini düşürücü etkisinin, ısırgan otunda bulunan aktif komponentlerin langerhans adacıklarındaki insülin sekresyonunu artırmasından kaynaklandığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Bnouham ve ark. (2003), tarafından yapılan bir çalışmada Oral Glikoz Tolerans Testi (OGTT) ile glikoz uygulanmasından 30 dakika önce ısırgan otu su ekstraktının 250 mg/kg dozunda uygulanmasıyla güçlü bir glikoz düşürücü etki gözlemlendiği ve bu durumun 3 saat boyunca sürekli şekilde devam ettiği; aksine, alloxan ile diabet oluşturulmuş ratlarda hipoglisemik etkinin oluşmadığı ve ısırgan otunun bu etkisinin intestinal glikoz emiliminin azalmasından kaynaklanabileceği bildirilmektedir. Petlevski ve ark. (2001)’da ısırgan otunun antidiyabetik etkiye sahip olduğunu bildirmektedir. Buna karşın Swatson ve ark. (2001),

Gülçin ve ark.(2004)'nın bildirdiğine göre ısırgan otunun hipoglisemik etkisi bulunmamaktadır.

Ratlar üzerinde yapılan deneysel bir çalışmada, furosemid ile oluşturulan arteriyel kan basıncı artışı üzerine, ısırgan otunun hava ile temas eden kısımları (toprak üstü) sulu ekstrelerinin etkisinin incelendiği, elde edilen bulgulara göre kardiyovasküler sistem üzerine direkt etkisi saptanan ısırgan otu'nun akut hipotansif etkisinin olduğu bildirilmektedir (Tahri ve ark.,2000). Bu bitkinin, insan lenfositlerinin proliferasyonunun uyarılmasında etkilerinin olduğu belirtilmektedir (Wagner ve ark.,1989). Testai ve ark.(2002) tarafından yapılan bir çalışmada ısırgan otu'nun kardiyovasküler sistem üzerine olan etki mekanizmasının araştırıldığı; KCl veya norepinefrinle önceden kasılmış olan, sağlam ve fonksiyonel halde bulunan aortun endotelial tabakası üzerine, ısırgan otu bitki köklerinin hem sulu hem de metanol ekstrelerinin vazodilatör etkisinin olduğunu, bu etkinin de endotelial nitrik oksit serbest kalması, potasyum kanallarının açılması ve negatif inotropik etki nedeniyle vazorelaksan etki oluşturarak hipotansif etki oluşturduğu bildirilmektedir.

Yapılan bir çalışmada, ısırgan otu bitkisinin kurutulmuş ve fermentasyona uğratılmış Türk sucuklarının mikrobiyolojik yapıları üzerine etkisinin incelendiği ve sonuçlara göre enterobakterler, maya ve küf miktarlarında azalma meydana geldiği bildirilmektedir (Aksu ve Kaya, 2004).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

250-300 gr ağırlığında, 5,5-6 aylık, 30 adet sağlıklı Sprague-Dawley ırkı erkek rat standart plastik rat kafeslerine yerleştirildi. Yapılan çalışmada parametrelere olumsuz etki edecek faktörlerin en aza indirilmesi için gerekli bütün önlemler alındı. Etik kurul raporu alındı. Kontrol ve tüm deneme grubundaki denekler aynı koşullarda tutuldu.

3.2. Aflatoksinin Yeme Katılması

Aflatoksin bulundurmadığı laboratuvar kontrolleri sonucu belirlenen ticari yeme 20 mg/kg dozda (sigma – aldrich A6636 from *A.flavus*) aflatoksin (AFB₁) karıştırılarak pelet yem hazırlandı ve kurutuldu. Bu amaçla hayvanların günlük yem tüketimleri belirlendi. Bir rat'ın günlük olarak yaklaşık 20 gr yem tükettiği saptandı. Dolayısıyla çalışma grubunda kullanılan 20 rat günlük olarak yaklaşık 0,4 kg yem tüketmektedir. 10 gündeki toplam yem tüketimi 4 kg'dır. Aflatoksinin yeme karıştırılması, pelet yem hazırlanması ve kurutulması işlemlerinin daha kolay gerçekleştirilmesi için ve kurutma esnasında tekrar küflenme oluşmaması için 10'ar gün arayla, yani bir dönemde 4 kg yeme aflatoksin katılarak pelet yem hazırlandı. Bu yem tükendiğinde tekrar yem hazırlandı. Yemlerin tekrar kontamine olmaması için hazırlanan karışımlar plastik kaplara doldurularak saklandı. Yeme katılacak aflatoksin miktarının belirlenmesi ise literatür bilgisine göre; ratlarda karaciğer kanseri oluşması için en az 100-150 mikrogram/kg/gün dozda aflatoksin (AFB₁) verilmesinin gerektiği belirtilmektedir (Ellis ve ark., 1991). Dolayısıyla bir rat'ın günlük olarak alması gereken en düşük toksik doz yaklaşık 20–40 mikrogram olarak belirlendi. Bu nedenle 1 kg yeme, bir rat'ın günlük olarak yaklaşık 20 gr yem tükettiği dikkate alınarak. Kilogram yeme 1.5 mg aflatoksin katıldı.

3.3. Bitki Materyali

Bitki materyali olarak, ısırgan otu (*Urtica dioica L*) yaprağı kullanıldı. Isırgan otu yaprağı elektrikli bir değirmende öğütüldükten sonra ekstraksiyonu metanol ile ekstraksiyon cihazında gerçekleştirildi (Akbay ve ark., 2003). Isırgan otu yapraklarının ekstraktı 2 ml/rat/gün dozda oral yolla verildi.

3.4. Deneme Şeması

Deneme 90 gün olarak planlandı. Ratlar 3 gruba (A, B ve C) ayrıldı. Gruplardan biri kontrol grup (A) olarak sadece standart rat yemi ile beslendi. Diğer 2 grup ise çalışma grubu olarak belirlendi. Çalışma grubundan (B) grup ratlar sadece aflatoksinli yem alırken, çalışma grubundaki (C) grup ratlara aflatoksinli yemle birlikte aynı zamanda ısırgan otu yaprağı ekstresi 2 ml/rat/gün oral olarak verildi. Bütün gruplardaki ratların denemenin başlangıcında, 10., 30., 60. ve 90. günlerde canlı ağırlıkları ile toplam yem tüketimleri belirlendi. Deneme sonunda nekropsi yapılarak histopatolojik ve biyokimyasal analizler için usulüne uygun olarak kan ve doku örnekleri alındı.

3.5. Yapılan Analiz ve İncelemeler

3.5.1. Biyokimyasal analizler:

Denemenin 90. gününde biyokimyasal analizler için dietil eterle anesteziye alınan ratlardan intra kardiyal olarak tüplere kan alındı. Kan örneklerinden eritrosit paketi çıkarılarak, malondialdehide (MDA), glutathione peroxidase (GSH-px), glutathione-S-transferaz (GST), süperoksit dismutaz (SOD) ile alanine transaminaz (ALT) ve aspartat transaminaz (AST) enzim aktiviteleri Randox-Ransod enzim kitleri ile Shimadzu UV/VIS-1201 spektrofotometrede ölçüldü (Randox Lab., 1996) Ayrıca karaciğer dokusu alınarak, MDA, GSH-px, SOD ve GST'lerin karaciğer dokusundaki düzeyleri de belirlendi.

Serum enzimleri düzeylerinin analizi: Deneme sonunda, ratlar dietil eter solundurularak bayıltıldı ve kalplerinden kan örnekleri alındı. Serum enzim analizleri için kan örnekleri, enjektör kullanılarak kalpten alındı. 3 ml kan santrifüj tüplerine alındı ve 3000 rpm 15 dak. +4 °C de santrifüj edilerek serumlar elde edildi. Serum enzim analizleri bu serumlarda yapıldı. Serum enzim aktiviteleri AST (EC2.6.1.1) ve ALT (EC2.6.1.2) kitleri (DPC; Diagnostic Products Corporation, CA 90045, USA) kullanılmak suretiyle otoanalizörde (BM/HITACHI-911) ölçüldü.

3.5.2. İstatistiksel analizler

Biyokimyasal analiz sonuçları, ortalama ve standart sapma ($X \pm SD$) hazır program (Minitab for Windows) kullanarak standart metotlara göre, grup ortalamaları arasındaki fark

Mann-Whitney U testine, grupların canlı ağırlıkları arasındaki farklar ise Duncan testine göre gerçekleştirilmiştir. Önem derecesi bütün testler için $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

3.5.3. Histopatolojik inceleme

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

3.5.4. İmmunohistokimyasal inceleme

Karaciğer dokusundaki fibrotik değişimlerin daha net olarak ortaya konması için, hazırlanan kesitler alpha-smooth muscle actin (ASMA) antikoruyla, ayrıca karaciğer dokusunda kronik aflatoksikasyona ilişkin olarak prekanserojen değişimlerin olup olmadığı alpha-fetoprotein (AFP), p53 gen proteini ve karsinoembriyonik antijen (CEA) tümör markırlarıyla, immunoperoksidaz metoduna göre boyanarak araştırma mikroskopunda incelendi. İmmunoperoksidaz inceleme için parafin bloklardan hazırlanan kesitler adezivli lamalar üzerine alındıktan sonra, ksilol ve alkol serilerinden geçirildi. Antijen retrieval solüsyonuna (sitrat buffer) konulup üzeri kapatıldıktan sonra 20 dakika süreyle ikişer kez ısıya tabi tutuldu. Fırından çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi. Kesitler PBS (phosphate buffer solution) ile yıkandıktan sonra %3'lük H_2O_2 de 10 dakika tutularak endojen peroksidaz inaktive edildi. Yeniden PBS ile yıkandıktan sonra 10 dakika protein bloking (nonimmun serum) ile bloke edildi. Her bir doku kesitine p53 (Dako Compartmentation, carpinteria, CA 93013 USA), ASMA (Dako Compartmentation, carpinteria, CA 93013 USA), AFP (Dako Compartmentation, carpinteria, CA 93013 USA) ve CEA (Dako Compartmentation, carpinteria, CA 93013 USA) serumundan (primer antikorlar) damlatılıp 37 °C de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Kesitler PBS ile yıkanıp biotinize sekonder antikor ile oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. PBS ile tekrar yıkanan kesitler, streptavidin-peroksidaz da 10 dakika bekletildikten sonra PBS ile aynı şekilde yıkandı. Yıkama işleminden sonra kesitlere AEC (3-amino-9-etil carbazol) kromojen damlatılarak kromojeni almasına göre 5-10 dakika bekletildi. Zemin boyanması için Mayer's hematoxilende 1-2 dk bekletilip zeminin boyayı almasından sonra musluk suyunda yıkandı. Sulu bir yapıştırıcı kullanılarak lamelle kapatıldı.

4. BULGULAR

4.1. Ratların Canlı Ağırlık Sonuçları

Kontrol ve deney gruplarının günlere göre canlı ağırlık ortalamaları ile standart hataları çizelge 4’ de verildi.

Çizelge 4. Grupların günlere göre canlı ağırlık ortalamaları ile standart hataları

Gruplar	0.Gün	10.Gün	30. Gün	60. Gün	90. Gün
A(kontrol) X ± Sd	322±2.9 ab C	325±2.8 ab BC	331±2.7 a AB	332±2.0 a AB	335±1.8 a A
B (AFB ₁) X ± SD	325±2.1 ab A	322±2.5 bc A	320±1.6 bc AB	314±2.2 d BC	312±1.9 c C
C(AFB ₁ +IOY) X ± SD	313±1.8 c BC	311±1.5 d C	320±1.8 bc A	317±2.0 cd AB	313±2.1 c BC

a,b: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar önemlidir (P<0.05).

A,B: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar önemlidir (P<0.05).

4.2. Biyokimyasal Bulgular

Deneme sonrasındaki eritrosit GSH ve MDA seviyeleri, GST, SOD enzim aktiviteleri ile serum ALT ve AST enzim aktiviteleri kitlerle belirlendi. Alınan kan örneklerinden eritrosit paketleri hazırlanarak GSH, MDA, GST, SOD aktiviteleri kitlerle belirlendi. Çalışma sonuçları çizelge 5’de sunuldu. Deneme sonunda uygun bir şekilde bütün grupların karaciğer dokularından alınan örneklerde GSH, MDA, GST, SOD aktiviteleri kitlerle belirlendi. Çizelge 5’de görüleceği gibi farklı uygulamalar sonrası, eritrosit ve doku GSH, MDA, GST, SOD ile serum enzim (ALT, AST) aktivite düzeylerinde önemli değişimler saptandı (Çizelge 5).

Çizelge 5. Aflatoksin ve çeşitli katkı maddelerin ratların kan ve karaciğer dokusu biyokimyasal parametreler üzerine etkileri

Parametre	Kontrol X ± SD	AFB ₁ X ± SD	AFB ₁ +IOY X ± SD
AST U/L Serum	161,5±39,2	248,5±66,6*	223,0±45,0
ALT U/L Serum	43,0±9,1	115,5±27,7*	73,2±17,8*
GSH mg/ml Eritrosit	39,5±0,84	38,8±1,0	42,5±0,5
MDA nmol/ml Eritrosit	0,39±0,08	0,69±0,2*	0,54±0,02
GST U/ml Eritrosit	0,62±0,16	0,75±0,39	0,61±0,19
SOD U/ml Eritrosit	428,6±10,5	443,5±3,5	444,5±6,8
GSH mg/g Doku	27,5±2,1	21,8±0,5*	24,1±2,2
MDA nmol/ g Doku	35,4±3,04	73,7±13,8*	35,5±6,9
GST U/ g Doku	8,8±1,2	8,7±2,7	8,5±2,04
SOD U/ g Doku	1879,7±36,8	1451,9±275*	1879,7±36,8

(*) Kontrollere göre istatistiki açıdan önemlidir (P<0.05) (Mann-Whitney U testine göre)

Eritrosit ve doku GSH verilerinin, çizelge 5'te incelenmesinde grup B (AFB₁)'nin karaciğer dokusu dışında, kontrol grubuna göre tüm uygulama gruplarında istatistiki açıdan (p>0.05) önemli oranda değişmediği görülmektedir. Eritrosit MDA verilerinin, Çizelge 5'de incelenmesinde, kontrol grubuna göre AFB₁ (B grubu) uygulanan grupta MDA'nın hem eritrosit hem de karaciğer dokusunda daha yüksek düzeye sahip olduğu ve aradaki farkın istatistiksel olarak p<0,05 önemli düzeyde olduğu görülmektedir. IOY katkılı grubun, kontrol grubuyla karşılaştırılmasında, eritrosit ve doku MDA düzeyi kontrollere göre biraz daha yüksek olmasına rağmen istatistikî bakımdan önemli bir düzeye (P>0.05) ulaşmamıştır. Eritrosit ve doku GST aktivite düzeylerinin, çizelge 5'de incelenmesinde, B ve C gruplarında kontrol grubuna göre önemli oranda farklılık görülmemektedir. Karaciğer SOD aktivite düzeylerinin, çizelge 5'de incelenmesinde, çalışma uygulamalarından AFB₁ (B grubu) grubu kontrol grubuna göre önemli oranda azalırken, eritrosit SOD aktivitesi ise B ve C gruplarında arttığı görülmesine rağmen SOD enzim düzeyi farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Serum enzimlerinden AST düzeylerinin çizelge 5’de incelenmesinde, kontrol grubuna göre B ve C gruplarında önemli artış gözlenirken yalnız grup B (AFB₁)’de istatistikî açıdan önemli yüksek değişimler görülmektedir. Serum enzimlerinden ALT düzeylerinin çizelge 5’de incelenmesinde ise kontrol grubuna göre B ve C gruplarında istatistikî açıdan önemli yüksek değişimler görülmektedir.

4.3. Makroskopik Bulgular

Kontrol ve deneme gruplarında aflatoxin verilmeye başlanmasından 90. güne kadarki sürede ratlarda ölüm görülmedi. Çalışmada, grup B (AFB₁)’de canlı ağırlık azalırken, grup C (AFB₁+IOY)’de canlı ağırlığın korunduğu, grup A’da ise canlı ağırlık artışının meydana geldiği tespit edildi. Organlardaki makroskopik değişimlere sadece grup B (AFB₁)’deki ratların karaciğerlerinde rastlandı. Bu karaciğerlerin yer yer hafif solgun renkli olduğu, diğer gruplarda ise karaciğerlerde makroskopik olarak belirgin bir değişikliğin olmadığı saptandı.

4.4. Histopatolojik Bulgular

4.4.1. Grup A(kontrol)

Mikroskopik olarak karaciğerin normal histolojik görünümü gözlemlendi (Şekil 1).

4.4.2. Grup B (AFB₁)

Histopatolojik incelemede, bu gruptaki bütün ratların karaciğerlerinde hemen hemen benzer değişimler gözlemlendi. Karaciğer lopçuklarının özellikle periasiner ve intermedier bölgelerde, odaklar halinde hepatositlerin sitoplazmasının granüler bir hal almasıyla karakterize bulanık şişkinlik ya da vakuoler-hidropik dejenerasyon belirlendi. Bu hepatositlerin genellikle çekirdekleri koyu boyanmış ve piknotikti. Çoğunlukla çevresindeki hepatositlerden belirgin bir şekilde ayrılan bu dejeneratif odakların genişliği bazen lopçuğun yarısını ya da tümünü kapsayacak kadar yaygındı. Özellikle dejenerasyonlu hücre topluluklarında olmak üzere, kimi hepatositlerin sitoplazmasında değişik büyüklüklerde vakuollerin olduğu, özel yağ boyamaları ile bu vakuollerin yağlanma ile ilgili olmadığı belirlendi. Kısmen normal görünümlü hepatositlere

genellikle periportal bölgelerde ve dejeneratif odaklar arasında kalan parankimde rastlandı, ancak bu bölgelerde de sıklıkla fokal nekrozlar şekillenmişti (Şekil 2-3). Bu alanlarda bazı hücrelerin çekirdekleri piknotik ya da karyoreksize, sitoplâzmaları ise koyu eozinofilik boyanmış ya da lize olmuştu. Genel olarak hepatositlerin çekirdeklerinin farklı büyüklüklerde olduğu ve farklı derecelerde boya aldığı, bazı hepatositlerin çift çekirdekli, bazı hepatositlerin ise belirgin 2-4 çekirdekçiğe sahip olduğu dikkati çekti. Ayrıca kimi dejenere hepatositlerin nükleuslarında marjinal hiperkromazi ve çekirdek içinin boş olduğu görüldü. Özellikle periasiner bölgelerde olmak üzere dejeneratif bazı hepatositlerin hem sitoplâzma hem de çekirdeğinin çok büyük ve anormal şekilli olduğu (megalositozis) gözlemlendi (Şekil 4). Bazı dejeneratif hepatositlerde mitotik figürlere de rastlandı. Şiddetli dejenerasyonlar sonucu remark kordonlarının dizilişi bozulmuş, ayrıca şiddetli dejeneratif hücre odaklarının çevresindeki parankimde de kompressif atrofi şekillenmişti. Bazı venalarda ve sinuzoidlerde hiperemi, perisinüzoidal hücre artışı ve intrahepatik kolestazis gözlemlendi. İki olguda bazı portal bölgelerde safra kanalları sayısında artış (Şekil 5) ve epitellerinde hiperplazi ile portal bölgelerde fokal mononükleer hücre infiltrasyonları görüldü. Portal aralıklarda bağdoku artışı gözlenmekle birlikte, bu bölgelerden parankime doğru yayılan bağdoku proliferasyonu saptanmadı.

4.4.3. Grup C (AFB₁+IOY)

Bütün olgularda karaciğerde dejenerasyonlu hücre topluluklarına rastlandı. Ancak bu odakların sayısı 2-4 adet arasında olduğu görüldü. Ayrıca bu dejeneratif odaklardaki hepatosit grupları genellikle 5-10 hücre ya da en fazla 20-30 hücreden oluşmaktaydı. Bu hücre gruplarında vakuoler dejenerasyon ya da şiddetli hidropik dejenerasyon oluşmuştu. Bu dejeneratif hepatosit grupları daha çok intermedier ve periasiner bölgelerde lokalize olmuştu. Bu odaklar arasında yer alan kısmen normal görünümlü hepatositler arasında da bazen tek tük koyu eozinofilik sitoplazmalı ve piknotik çekirdekli hepatositler ya da ince granüler dejenerasyonlu açık renkli hepatositler gözlemlendi (Şekil 6). Ayrıca, çekirdekleri farklı büyüklüklerde ve marjinal hiperkromazi gösteren hepatositlerin varlığıyla birlikte, hem çekirdeği hem de sitoplâzması büyük olan (megalositozis) hepatositlere de rastlandı. Ancak bu hücrelerin varlığı grup B (AFB₁) ile kıyaslandığında sayısal olarak belirgin bir

şekilde daha azdı. Perisinüzoidal hücrelerde belirgin bir proliferasyon ve hipertrofi dikkati çekti.

4.4.4. İmmunohistokimyasal bulgular

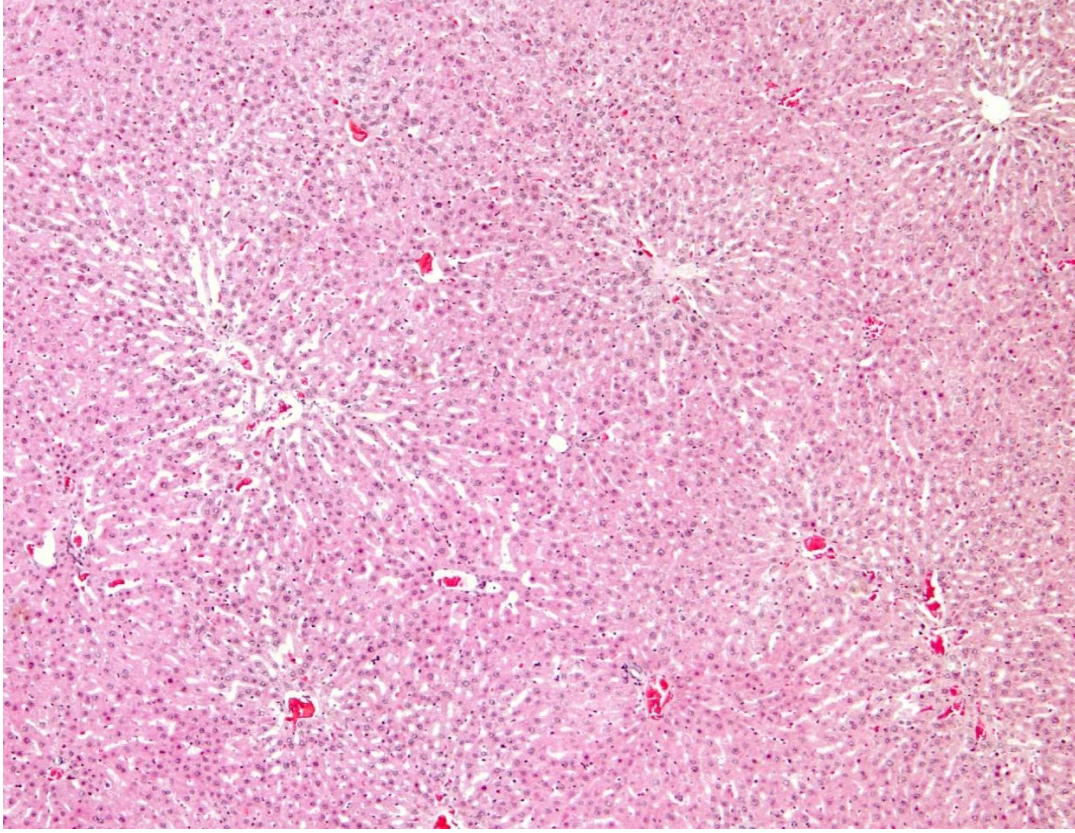
Alpha-smooth muscle actin (ASMA): Özellikle çalışma gruplarında periasiner hücrelerin stoplazmasında tek tük boyanmalar saptandı. Ancak bu hücrelerin sayısı özellikle grup B (AFB₁)’de biraz daha belirgindi.

Alpha-fetoprotein (AFP): Grup B (AFB₁)’de fokal olarak hepatositlerin sitoplazmasında, genellikle ince granüller şeklinde boyanma saptandı. Boyanmalar özellikle periasiner bölgedeki normal görünümlü hepatositlerde, bazen de hidropik dejenerasyonlu hücre topluluklarının içindeki hepatositlerde gözlendi. Ancak dejeneratif hücrelerdeki boyanmaların daha az olduğu görüldü (Şekil 7). Diğer gruplarda (A ve C) herhangi bir immunoreaksiyon saptanmadı.

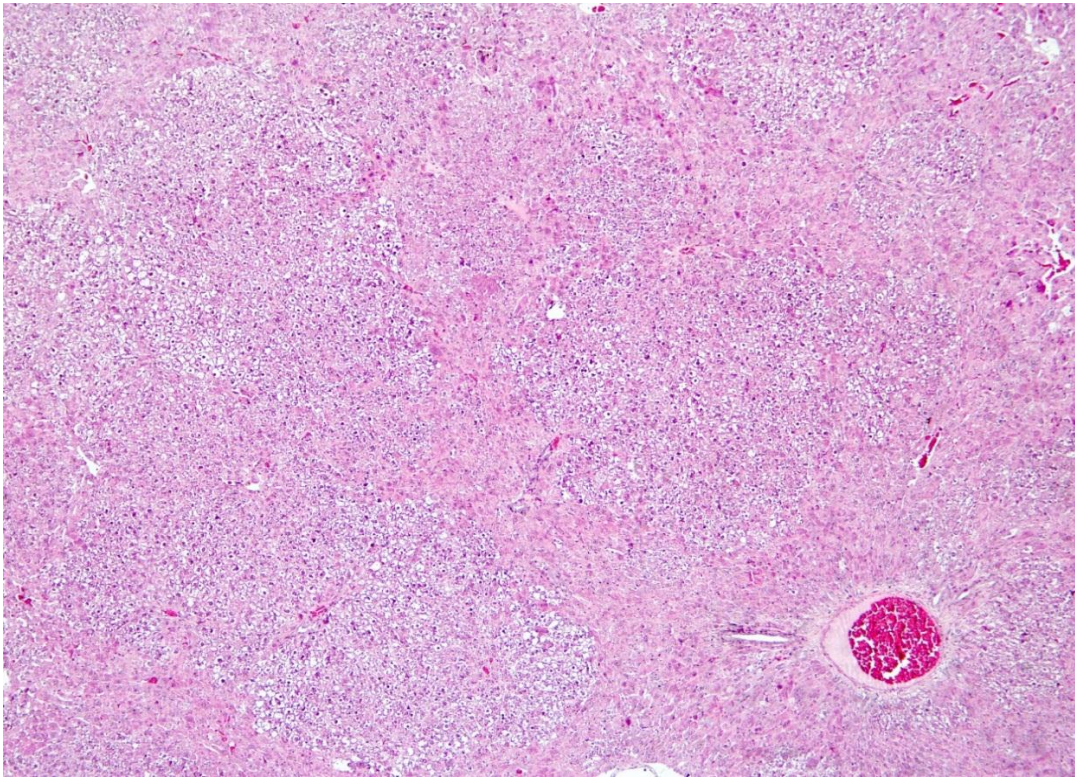
P53 gen proteini: Bütün gruplarda boyanma saptanmadı.

Karsinoembriyonik antijen (CEA): Bütün gruplarda boyanma saptanmadı.

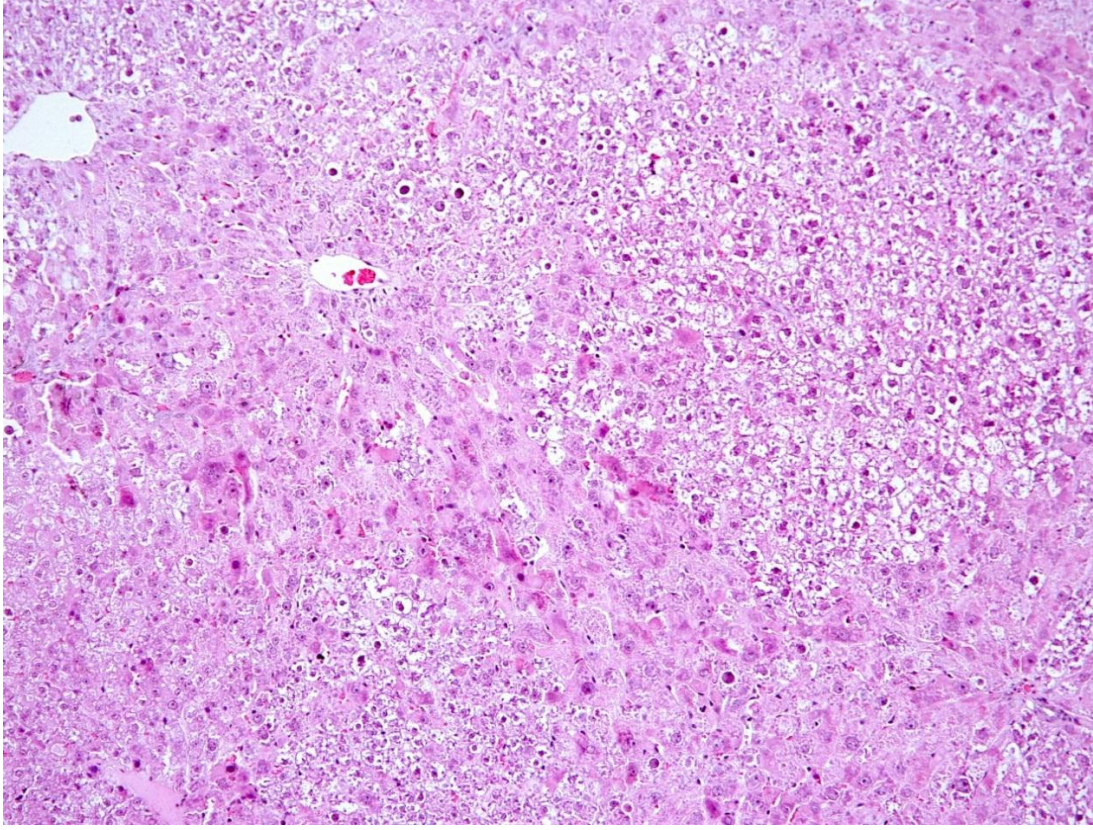
4.4.5. Mikroskopik şekiller



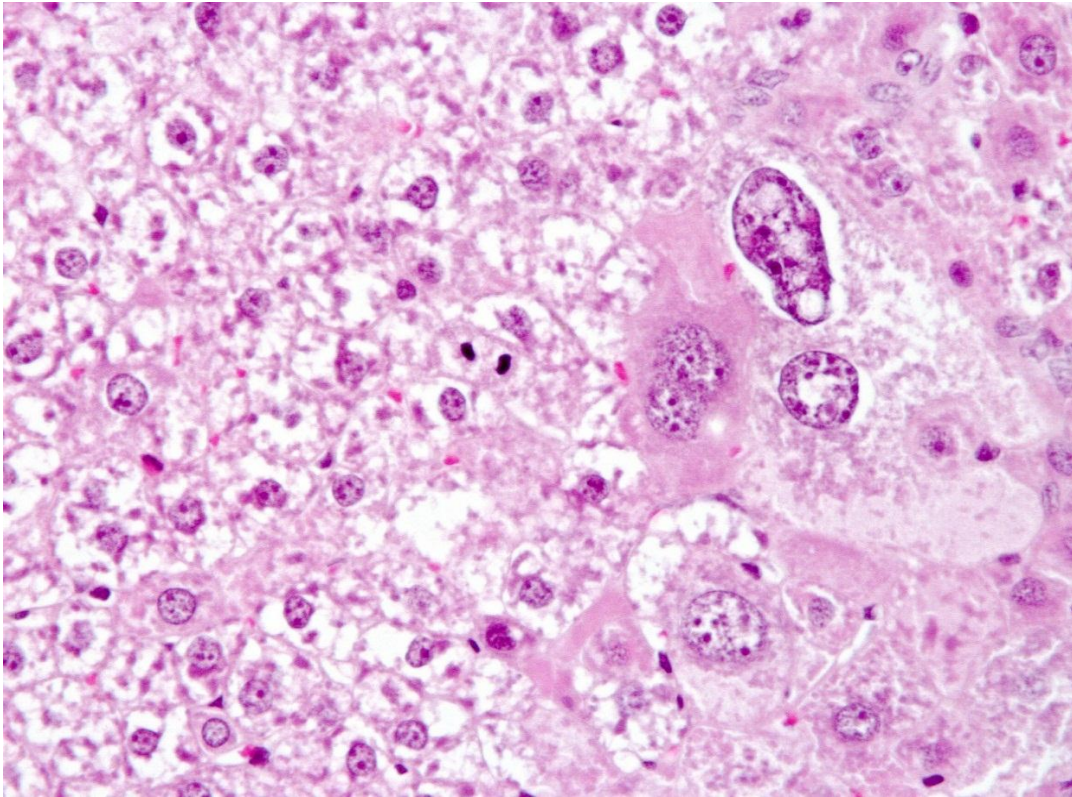
Şekil 1. Grup A (Kontrol) : Karaciğerin normal histolojik görünümü. H.E. X 100.



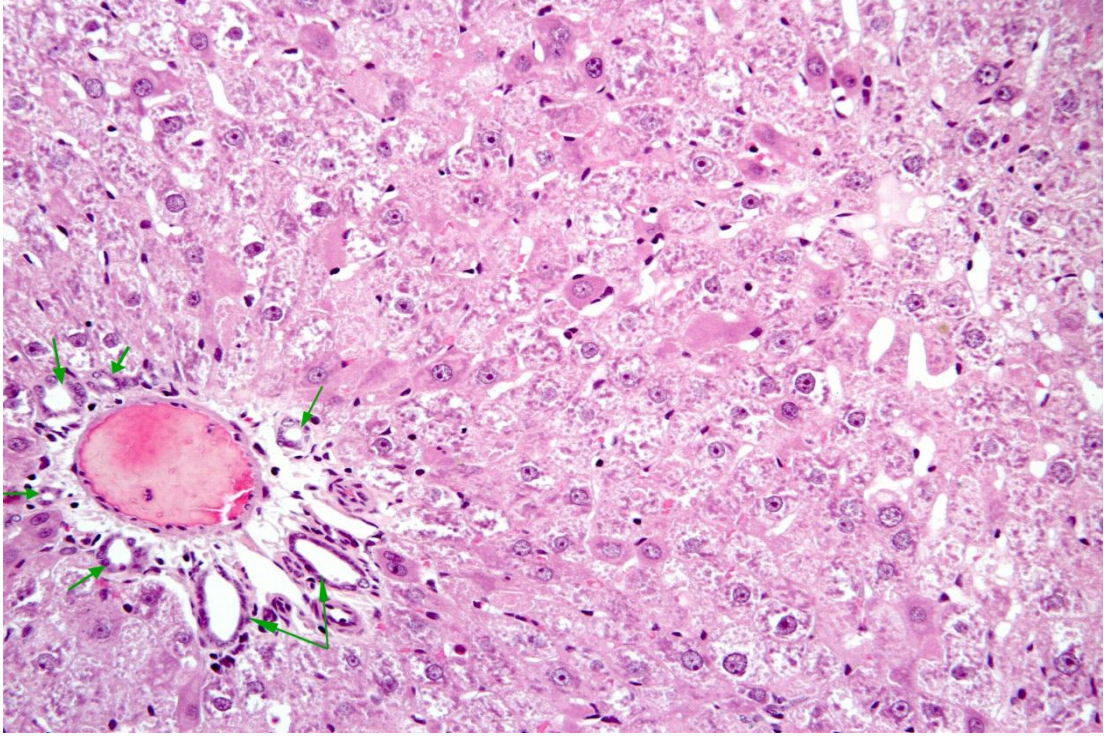
Şekil 2. Grup B (AFB₁): Geniş odaklar halinde hepatositlerde dejenerasyon ve nekroz. H.E. x 50.



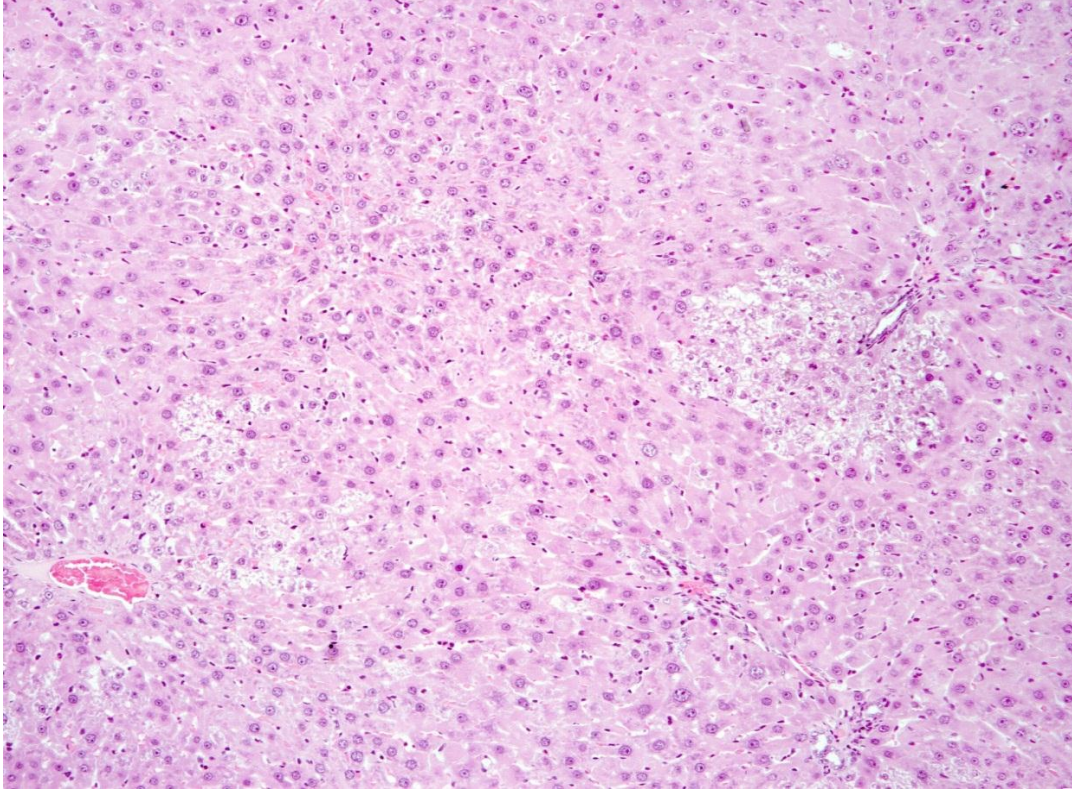
Şekil 3. Grup B (AFB₁): Hepatositlerde dejenerasyon ve nekroz. H.E. x 200.



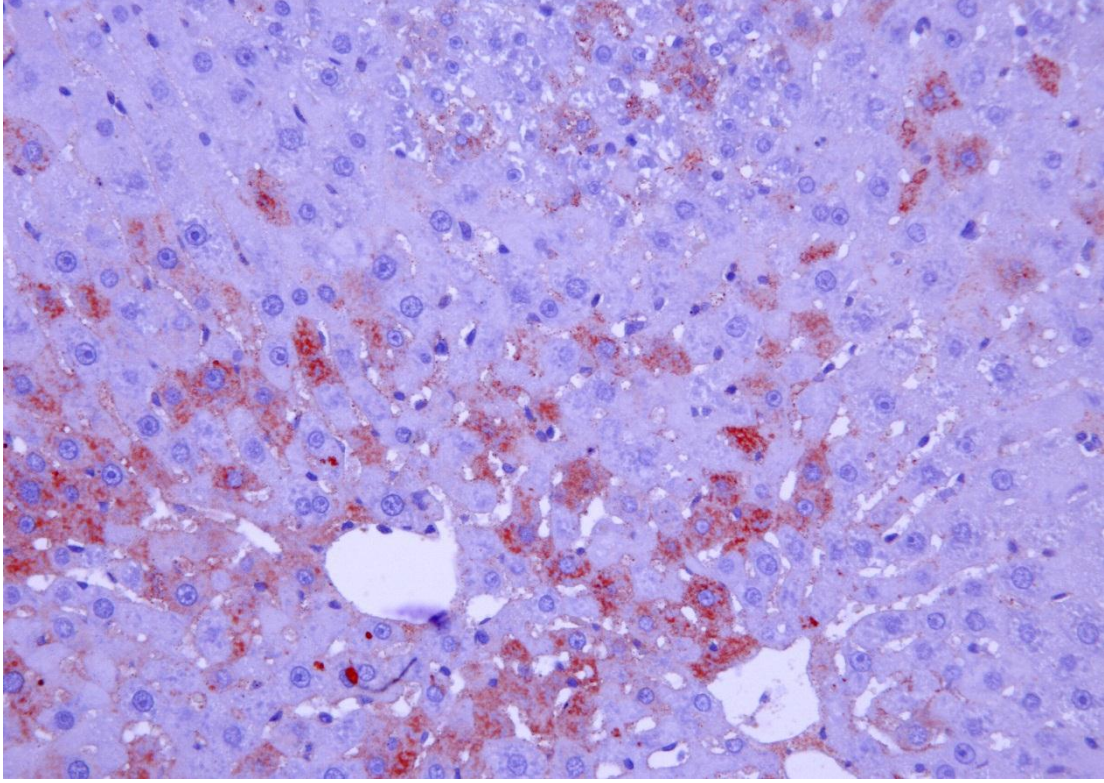
Şekil 4. Grup B (AFB₁): Hepatositlerde dejenerasyon ve megalositik hücreler. H.E. x 400.



Şekil 5. Grup B (AFB₁): Normal safra kanalları (bitişik oklar) ve proliferatif safra kanalları (küçük oklar). H.E.x320.



Şekil 6. Grup C (AFB₁+IOY): Periasiner ve intramedier bölgelerde dejeneratif hücre topluluğu, bazı hepatositlerde nekroz ve dejenerasyon. H.E. x 200.



Şekil 7. Grup B (AFB₁): Hepatositlerin sitoplazmasında alpha-fetoprotein antijenleri. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen x 320.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Canlı Ağırlık Artışları

Aflatoksinlerin canlı ağırlık artışları üzerine olan olumsuz etkileri konusundaki araştırmalara özellikle kanatlılarda, az olarak da farelerde rastlanmıştır. Bu çalışmalarda AFB₁'li yemle beslenen broiler civcivlerin canlı ağırlıklarında %12-57 arasında azalmaların meydana geldiği (Glahn ve ark., 1991; Ortatatl ve ark., 2004), farelerde de doz ve süreye bağlı olarak %37-55 arasında canlı ağırlıklarda azalmanın gözlemlendiği belirtilmektedir (Tuzcu, 1999). Bu çalışmada da, çizelge 4'te gözlemlendiği gibi, 0. gün ile 90. günlerdeki canlı ağırlık ortalamaları dikkate alındığında, kontrol grup A'da canlı ağırlık artışı görülürken ($P<0.05$), diğer deneme gruplarından grup B (AFB₁)'de canlı ağırlıkta azalmanın gerçekleştiği ($P<0.05$), grup C (AFB₁+IOY)'de ise ağırlıkların denemenin başlangıcıyla hemen hemen aynı olduğu dikkati çekti. Çizelge 4'deki canlı ağırlık ortalamaları dikkate alındığında, aflatoksikozis sonucu grup B'deki (AFB₁) ratların karaciğerlerinde histopatolojik olarak saptanan şiddetli dejenerasyon ve nekroz nedeniyle canlı ağırlık kaybının şekillendiği; grup C (AFB₁+IOY)'de ise uygulanan bitki ekstraktının karaciğer hasarını önlemesine bağlı olarak, başlangıç canlı ağırlıklarını muhafaza ettikleri şeklinde düşünülebilir.

5.2. Biyokimyasal Sonuçlar

Canlı hücrelerin yapı taşlarını oluşturan moleküllerin atomları, kovalent bağlarla birbirlerine bağlıdır. Bu tip bağlar, birbirine paralel olmayan yörüngelere sahip iki komşu atomun arasındaki elektronun ortaklaşa kullanılmasına dayanmaktadır. Yeterli bir enerji kaynağı veya genelde kimyasal etkiler ile bu bağ kopabilir. Bu tip bir veya daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip kısa ömürlü, kararsız, kimyasal reaktifleri yüksek molekül veya atomlar, serbest radikal olarak adlandırılır (Akkuş, 1995). Serbest radikaller, vücutta sürekli olarak oluşturulan ve antioksidan savunma sistemi tarafından ortadan kaldırılan moleküllerdir. Bu dengenin bozulması, serbest radikallerin artmasına ve hücre hasarı oluşturmalarına yol açar (Kökoğlu, 1998). Serbest radikaller, hücre savunma sisteminin koruyucu etkisini aşacak şekilde fazla meydana gelmeleri sonucunda metabolizmada zararlı etkilerini en hassas bileşikler olan lipidler üzerinde gösterirler. Hücresel

membranların yapısında yer alan doymamış fosfolipidler ve kolesterol, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu meydana getirir (Niki, 1987). Lipid peroksidasyon; karsinogenezis, mutagenesis, yaşlanma ve arteriosklerozis gibi hastalıkların oluşumundan sorumlu tutulmaktadır. Bu gibi hastalıklarda aktif oksijen ve serbest radikallerin doku hasarında önemli role sahip oldukları bilinmektedir (Yagi, 1994). Bu nedenlerle aktif oksijen ve serbest radikaller tarafından oluşturulan doku hasarını azaltmak amacıyla antioksidan supplementler ve antioksidanlar bakımından zengin gıdaların alınması gerektiği belirtilmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1989).

Aflatoksinlerin etki mekanizması konusunda yapılan *in vitro* çalışmalarda, AFB₁'in, reaktif oksijen türleri içinde bulunan serbest radikallerin oluşumunu arttırdığı, bu serbest radikallerin kromozomlarda hasara neden olduğu bildirilmiştir (Amstad ve ark., 1984). Aflatoksikozise ilişkin hücre ve dokularda oluşan hasara bağlı olarak biyokimyasal değişikliklerden ALT, AST ve MDA düzeyleri artarken; SOD ve glutatyon redüktaz enzim aktivitelerinde azalma meydana gelmektedir (Nixon ve ark., 1981). Nakae ve ark. (1987) süperoksit dismutaz, katalaz ve deforaximin'in, AFB₁'in rat karaciğer hücreleri üzerindeki öldürücü etkisini engellediklerini saptamışlardır. Bu bilgi, reaktif oksijen türlerinin AFB₁ tarafından oluşturulan hücre toksikasyonunda önemli bir role sahip olduklarını kanıtlamaktadır. Süperoksit dismutaz ve katalaz gibi enzimatik sistemler, oksijen radikallerini etkisiz hale getiren antioksidatif sistemlerdir (Nakae ve ark., 1987). Doymamış yağ asitlerinin bir tip oksidatif yıkımlanma şekli olan lipid peroksidasyonu, membran yapısında değişiklikler ve enzim inhibisyonu ile ilişkilidir. AFB₁ alınımı ile ilişkili olan lipid peroksidasyonunun yüksek düzeyde gerçekleşmesi hücre membranlarında hassasiyet artışına ve hasara neden olmaktadır (Ravi ve ark., 2001). Aflatoksinler, canlılarda enzimatik reaksiyonları ve safra salgısını inhibe ederek yağların sindirimini engellemekte, dolayısıyla rasyondaki yağdan yararlanma oranı düşmekte ve vücudun enerji metabolizmasını bozmaktadır (Hamilton, 1982). Aflatoksinler ayrıca yağda eriyen vitaminlerle de reaksiyona girmekte, dolayısıyla bu vitaminlerin vücutta eksikliği oluşmakta ve özellikle A, D ve K vitamin eksikliklerine bağlı lezyonlar oluşmaktadır (Glahn ve ark., 1991; Schell ve ark., 1993).

Serbest radikallerin detoksifikasyonunda önemli görevleri bulunan glutatyonun asıl kaynağı kükürt içeren aminoasitler, özellikle sistein ve metiyonindir. Glutatyon, serbest

radikal artışına ve lipid peroksidasyon oluşmasına bağlı olarak meydana gelen ürünlerle kolayca reaksiyona girerek metabolizma için zararlı olan bu ürünlerin ortamdan uzaklaştırılması için görev alan güçlü bir antioksidandır. Oksidatif hasardan kaynaklanan lipid peroksidasyon ürünleriyle reaksiyona girerek okside glutatyon dönüşür. Çeşitli araştırmalarda serbest radikal hasarı ve lipid peroksidasyon ile glutatyon düzeylerinin araştırıldığı çalışmalarda lipid peroksidasyon ürünlerinde artış, glutatyon düzeylerinde azalmalar bulunmuştur (Yagi, 1994).

Sunulan çalışmada, doku GSH verilerinin, çizelge 5’de incelenmesinde B (AFB₁) grubunun karaciğer dokusunda önemli oranda düştüğü, C grubu’nun (AFB₁+IOY) ise karaciğer GSH seviyesinin düştüğü, fakat istatistikî açıdan önem arz etmediği görülmektedir. Eritrosit ve doku GSH verilerinin kontrol grubuna göre tüm uygulama gruplarında istatistikî açıdan ($p>0.05$) önemli oranda değişmediği görüldü. Bu sonuçlara göre AFB₁ karaciğer toksisitesi meydana getirdiği, IOY’nın ise bu toksisiteyi engellediği sonucu ortaya çıkmaktadır.

Eritrosit MDA verilerinin, çizelge 5’de incelenmesinde kontrol grubuna göre AFB₁ (B grubu) uygulanan grubun, hem eritrosit hem de karaciğer dokusunda daha yüksek MDA düzeyine sahip olduğu ve aradaki farkın istatistiksel olarak $p<0,05$ önemli düzeyde olduğu saptandı. C grubu’nun (AFB₁+IOY), kontrol grubuyla karşılaştırılmasında, eritrosit MDA düzeyi kontrollere göre biraz daha yüksek olmasına rağmen istatistikî bakımdan önemli bir düzeye ($p>0.05$) ulaşmadığı görüldü. Aflatoksikozis’de, IOY’nın etkisinin araştırıldığı çalışmada AFB₁ grubu eritrosit ve karaciğer MDA düzeylerinde artış olmasına rağmen AFB₁+IOY grubunda bu artışın engellendiği ve normale yaklaştığı görülmüştür. Karaciğer hasarının önemli bir göstergesi olan MDA artışının engellendiğini görerek IOY’ nın karaciğeri koruduğu görülmektedir.

Eritrosit GST aktivite düzeylerinin, çizelge 5’de incelenmesinde, her iki çalışma gruplarında kontrol grubuna göre önemli oranda artmadığı gözlemlendi. Kontrol grubuna göre B (AFB₁) grubunun eritrosit GST enzim düzeyi yüksek çıkmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. GST’lar hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak; ksenobiyotikleri GSH’daki sisteine ait –SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize ederler ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlar. Oluşan bu GSH konjugatları organizmadan

atılabilir veya daha ileri metabolize olurlar (Akkuş, 1995). Detoksifikasyon merkezinin karaciğer olması nedeniyle eritrositlerde böyle bir etkinin olması olağan sayılabilir niteliktedir. Diğer yandan karaciğer GST aktivite düzeylerinin, çizelge 5’de incelenmesinde tüm çalışma uygulamalarında kontrol grubuna göre önemli oranda artmadığı gözlemlendi. Kontrol grubuna göre, B (AFB₁) grubunun eritrosit GST enzim düzeyi yüksek çıkmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bu sonuçlara göre; AFB₁’in sitotoksik ve karsinojenik etkilerinin özgün molekülden değil, 8,9-epoksit şekli ile muhtemelen de aflatoxin Q₁, P₁, M₁ ve aflatoksikolun 8,9-epoksit metabolitlerinden kaynaklandığı söylenebilir (Karenlampi, 1987). Epoksit şeklindeki etkin metabolitlerin hepatik mikrozomal sitokrom P-450’ye bağımlı karışık işlevli oksijenaz sistemi etkinliği ile özgün aflatoxinlerden sentezlendiği saptandı. Normal olarak epoksit şekilleri geçici ara ürün konumundadır, karaciğerde GSH-S transferaz enziminin katalizlenen tepkimeler sonunda glutatyon-S-hidrolaz ile konjuge edilerek veya epoksit hidrataz enziminin aflatoksikole çevrilerek nispeten zehirsiz metabolitlere çevrilir (Karenlampi, 1987; Hatch, 1988). Ancak uzun süre veya fazla miktarda aflatoxin alınması halinde açıklanan detoksifikasyon mekanizması yetersiz kalır. Aynı enzim sistemlerince detoksifiye edilebilen besinsel kaynaklı diğer maddelerin fazlaca alınması halinde çok yönlü etkileşimlerin gerçekleşmesi ve enzimatik detoksifikasyon eşiğinin aşılması nedeniyle epoksit türevleri şekillenme oranı ve toksisite riski daha da artar (Hatch, 1988).

Aflatoxinlerin sitotoksik etkilerine bağlı olarak ikincil nitelikteki değişiklikler de ortaya çıkar; bu duruma bağlı olarak ALT ve AST düzeyleri artar, bu enzimler karaciğer hasarının diagnostik göstergeleri olarak bilinir. Hepatosellüler dejeneratif ve nekrotik değişikliklerin bulunduğu durumlarda, bu enzimler kan dolaşımına salınırlar (Nakae, 1987). Serum enzimleri ile ilgili elde edilen sonuçlarımız da bu düşüncüyü destekler niteliktedir. Serum enzimlerinden AST ve ALT düzeylerinin çizelge 5’te incelenmesinde kontrol grubuna göre bütün uygulama gruplarında istatistikî açıdan önemli olan yüksek serum ALT düzeyi, AFB₁ (Grup B) dışında serum AST düzeylerine yakın olduğu görülmektedir. AST, karaciğer dışında dokularda da bulunmaktadır (kalp ve iskelet kası). ALT ise karaciğer ve böbreklerde bulunmaktadır. Hafif karaciğer hasarının olduğu ve mitokondrial membranın sağlam kalıp, hücre membran bütünlüğünün bozulduğu durumlarda sitoplazmik ALT ve AST serumda salınır. Ağır karaciğer hasarı yanında sitoplazmik ve mitokondrial membran hasar gördüyse mitokondrial AST de kana geçer. Yaygın doku

harabiyeti ile bu enzimler kana geçer ve kandaki konsantrasyonları artar (Yagi, 1994). Bu değerlendirmeden farklı olarak bazı yazarlara (Mehmetoğlu ve ark., 2002) göre, serum AST ve ALT aktivitesindeki azalma karaciğer hasarı ve normal karaciğer fonksiyonunun bozulmasını göstermektedir. Çalışmamızda AST ve ALT seviyelerindeki artış AFB₁'in toksik etkileri sonucu karaciğerin metabolizma faaliyetinde meydana gelen değişmelerin bir sonucu olabilir.

Karaciğer SOD aktivite düzeylerinin, çizelge 5'de incelenmesinde; çalışma uygulamalarından B grubunda (AFB₁) kontrol grubuna göre önemli oranda azalırken ($P<0.05$), eritrosit SOD aktivitesi ise B ve C gruplarında arttığı görülmekte ve fakat SOD enzim düzeyi farkı istatistiksel olarak ($p>0.05$) anlamlı bulunmadı. Süperoksit dismutaz aktivitesinde, ilk aşamada bu zararlı etkileri ortadan kaldırmak amacıyla artış gerçekleşmektedir. Ayrıca, stresörlerin dozlarına ve bundan dolayı oksidatif streslerin büyüklüğüne bağlı olarak gelişen adaptasyonla birlikte hücredeki SOD aktivitesi artmaktadır. Bu çalışmada antioksidan savunma enzimlerinden SOD aktivitesinde meydana gelen azalış, indüklenmiş süperoksit radikal oluşumunun dolaylı bir işareti sayılır. SOD aktivitesindeki artış ise süperoksit radikalının aşırı üretiminden dolayı bu enzimin inaktif formlarının aktivasyonundan kaynaklandığını düşünebiliriz. C grubunda ise antioksidan etkileri sonucunda süperoksit radikal oluşumunun baskılandığı söylenebilir.

Bu biyokimyasal veriler doğrultusunda, sonuç olarak, AFB₁'in rat karaciğerlerinde meydana getirmiş olduğu hasar nedeniyle serum enzimlerinin arttığı ve serbest radikal üretimi sonucu lipid peroksidasyonun meydana geldiği, fakat uygulanan IOY'nın antioksidan etkisi sayesinde lipid peroksidasyonun, dolayısıyla karaciğer hasarının engellendiği söylenebilir.

5.3. Makroskopik Bulgular

Deneysel aflatoksikozis olgularında karaciğerde büyüme, kenarlarında kütleşme ve renginde solgunlaşma (Marquez ve ark., 1993), yüksek dozlu toksikasyonlarda ayrıca karaciğerde peteşiyal ve/veya ekimotik kanamalar bildirilmiştir (Bilgiç, 1992). Böbreklerde ise büyüme ve kesit yüzlerinde kanamalar kaydedilmiştir (Sahoo ve ark., 1991). Organlardaki makroskopik değişimlere sadece AFB₁ verilen (Grup B) ratların iç organlarından karaciğerlerde hafif olarak lezyonlar saptandı. Nitekim çalışmamızda ratlara

verilen AFB₁ miktarı (40 µg/rat/gün) düşük toksik dozdur. 100-150 µg/kg/gün ratlarda 12 ile 24 ay içinde karaciğer kanseri oluşturulması için önerilen AFB₁ dozudur (Ellis ve ark., 1991). Grup C (AFB₁+IOY) rat karaciğerlerinde makroskopik olarak bir değişikliğin bulunmaması, ratlara verilen IOY ekstraktının koruyucu etkisiyle grup B'deki kadar karaciğerlerde şiddetli dejeneratif ve nekrotik değişimlerin engellendiğine yorumlanabilir.

5.4. Histopatolojik Bulgular

AFB₁'in toksisite ve karsinogenik etkilerinin ortaya çıkışında, özellikle hepatik mikrozomal stokrom P-450'ye bağımlı kompleks fonksiyonlu oksijenaz enzim sisteminde özgün aflatoksin mleküllerinin metabolize edilmesiyle oluşan epoksit türevlerinin çok önemli rol oynadığı belirtilmektedir (Wong ve Hsieh, 1980). Bu epoksit metabolitlerin hücresel nükleoproteinler ve nükleik asitler gibi makromoleküllere bağlanarak RNA, enzim ve protein sentezinin inhibe edilmesi, sonuçta hücre bütünlüğünün bozulmasının gerçekleştiği kaydedilmektedir (Wong ve Hsieh, 1980; Hatch, 1988). Bu enzim sistemlerinin (hepatik mikrozomal stokrom P-450) karaciğerde en yüksek konsantrasyonda periasiner bölgedeki hepatositlerde lokalize olduğu belirtilmiştir (Jubb ve ark., 1993). Çalışmada deneme gruplarından özellikle grup B (AFB₁)'de saptanan bulanık şişkinlik, hidropik dejenerasyon ve fokal nekrozlar gibi patolojik değişikliklerin özellikle periasiner bölgede, daha sonra da intermedier bölgelerde ortaya çıktığı gözlemlendi. Bu bulgular, yani aflatoksikozis olgularında lezyonların özellikle periasiner ve intermedier ağırlıklı yerleşim göstermesi, diğer araştırmacılar tarafından da vurgulanmıştır (Moorthy ve ark., 1985; Bilgiç, 1992).

Aflatoksikozis olgularında hepatosit çekirdeklerinde büyüme, çekirdekçiğin belirginleşmesi ve çok sayıda olması, marjinal hiperkromazi, hepatositlerin çift çekirdekli olması gibi bulguların gözlemlendiği bildirilmiştir (Bilgiç, 1992). Çalışmada özellikle grup B'de (AFB₁) benzer şekilde hepatositlere rastlandı ve bu durum muhtemelen Gabliks ve ark. (1965) 'nın da belirttiği gibi aflatoksinin hücre bölünmesini baskılaması sonucu oluşan RNA ve DNA artışıyla ilgili olabilir.

Yapılan çalışmalarda aflatoksikozis sonucu karaciğerde safra kanallarında proliferasyon ve epitellerinde hiperplazinin görüldüğü (Slowik ve ark., 1985; Yakışık, 1992; Ortatatl ve ark., 2004), bu değişikliklerin verilen AFB₁'in dozu ve süresi ile ilgili

olduğu, ayrıca karaciğerdeki nekrotik değişiklikleri takiben geliştiği ve hasara karşı karaciğerin gösterdiği reaksiyonlardan biri olduğu belirtilmektedir (Jubb ve ark., 1993). Çalışmada, sadece grup B (AFB₁)’de, 2 olguda safra kanallarında proliferasyon ve epitellerinde hiperplazi saptandı.

Aflatoksikozis sonucu karaciğerde retiküler hücre hiperplazisi ve mezenkimal hücreler ile histiyosit aktivasyonlarının oluşturduğu sinsityal yapıların görülebildiği (Jubb ve ark., 1993), ayrıca sentrilobuler venlerin bağ doku üremesiyle tıkanığı belirtilmektedir (Suliman ve ark., 1987). Deneysel aflatoksikozis çalışmalarında böbreklerde proksimal tubulus epitellerinde başlangıçta dejeneratif ve daha sonra da nekrotik değişimler (Sahoo ve ark., 1991; Mayura ve ark., 1998) ile tubulus lümenlerinde hiyalin silindirlerinin görüldüğü (Bilgiç ve Yeşildere, 1992), glomeruluslarda ise şişkinlik, mezangiyal hücre hiperplazisi, glomerulus bazal membranlarında kalınlaşma ve sonuçta glomerulusların bowman boşluğunu tamamen doldurduğu kaydedilmektedir (Bilgiç ve Yeşildere, 1992; Miller ve ark., 1984, Mayura ve ark., 1998). Sunulan çalışmada grup B (AFB₁)’de, karaciğer hariç diğer organların mikroskopik incelenmesinde yukarıda belirtilen bulgular saptanmadı, bunun da deney hayvanlarına verilen AFB₁’in dozu ve süresiyle ilgili olabileceği kanısındayız.

Sunulan bu çalışmada; AFB₁ ve IOY ekstraktının birlikte verildiği grup C’de, sadece AFB₁’in verildiği grup B’de gözlenen mikroskopik bulguların bir kısmının hiç oluşmadığı ya da az şekillendiği dikkati çekti. AFB₁ ile oluşturulan karaciğer hasarında IOY’nın engelleyici etkisinin gözlemlendiği, bu hepatoprotektif etki ile ilgili olarak; bitkinin karaciğer hasarının önlenmesinde daha çok lipid peroksidasyonu engelleme ve immun sistemi aktive etme özelliklerinin etkili olabileceği, ayrıca diğer terapotik özelliklerinin de bu hepatoprotektif etkilerine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Nitekim bu bitkinin, bu özellikleriyle ilgili olarak aşağıda görüleceği gibi son yıllarda birçok çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Isırgan otu’nun “*thiocyanate*” metoduyla in vitro olarak antioksidan özelliklerinin araştırıldığı çalışmada; Isırgan otu’nun yaprak ve saplarından elde edilen ekstraktının (250µg) lipid peroksidasyonu %98 gibi güçlü bir şekilde önlediği kaydedilmiş, bu bitkinin doğal antioksidan ve gıda supplementi olarak veya farmasötikal endüstride kullanılabileceği belirtilmiştir (Gülçin ve ark., 2002). Ratlarda CCl₄ ile oluşturulan karaciğer fibrozisinde,

çörek otu ve ısırgan otu tohum ekstraktlarının fibrozisi engellediğini, antifibrotik etkinin bu bitkilerin antioksidan ve immunomodulator özellikleriyle ilgili olabileceği belirtilmiştir (Türkdoğan ve ark., 2003). Yine ratlarda CCl₄ ile oluşturulan fibrozisde, çörek otu ve ısırgan otu tohum ekstraktlarının lipid peroksidasyonu ve karaciğer enzimlerini (AST, ALT) azalttığı, antioksidan savunma sistemi aktivitesini ise arttırdığı kaydedilmiş ve bu bitkilerin hepatoprotektif etkiye sahip oldukları belirtilmiştir (Kanter ve ark., 2005). Türkdoğan ve ark. (2003), rat karaciğerlerinde CCl₄ ile oluşturulan fibrozisde çörek otu ve ısırgan otunun perisinüzoidal hücrelerde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da özellikle bitki ekstraktının verildiği grupta perisinüzoidal hücrelerde belirgin bir proliferasyon gözlemlendi. Bu hücrelerin bir kısmının makrofaj aktivasyonu (Kupffer hücreleri) olabileceği düşünülmüş, ancak bunun desteklenmesi için daha ayrıntılı çalışmaya ihtiyaç vardır.

5.5. İmmunohistokimyasal Bulgular

Alpha-smooth muscle actin (ASMA): Normal karaciğerde sinüzoidlerin; endotelyal, Kupffer, Ito (stellate cells) ve pit hücreleri ile ekstrasellüler matriks komponentlerinden oluştuğu, Ito hücrelerinin ASMA pozitif olduğu kaydedilmiştir (Shiga ve ark., 1996). ASMA-pozitif perisinüzoidal hücrelerin myofibroblastic transformasyonlu stellate hücreleri olduğu immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir (Enzan ve ark., 1994). Türkdoğan ve ark. (2003), rat karaciğerlerinde CCl₄ ile oluşturulan fibrozisde nekrotik ve fibrotik alanlarda ASMA-pozitif hücrelerin çok belirgin olarak arttığını saptamışlar ve karaciğer dokusundaki fibrotik değişimlerin immunohistokimyasal boyama ile daha net olarak ortaya konabildiğini belirtmişlerdir. Sunulan çalışmada, grup B (AFB₁)’de diğer gruplara göre biraz daha belirgin olan perisinüzoidal hücrelerde boyanma saptandı, ancak bu dikkat çekici bir artış olarak değerlendirilmedi. Bu da, perisinüzoidal bölgeden orijin alan belirgin bir fibrozisin meydana gelmediğini, diğer bir ifadeyle myofibroblastic transformasyonlu Ito hücrelerinde proliferasyon şekillenmediğini göstermektedir. Sonuç olarak, çalışmada uygulanan AFB₁ dozunun kanserojen doz olması nedeniyle, deneme süresince uygulanan dozun ancak dejenerasyon ve nekroza neden olabildiği, denemenin daha uzun süre sürdürülmesi durumunda fibrozisin gelişebileceği kanısındayız.

Alpha-fetoprotein (AFP): AFP, normal olarak sadece fetal karaciğerlerin sitoplazmasında bulunan, olgunlaşmış ve normal dokularda bulunmayan onkofetal bir proteindir (Mulas ve ark., 1995). Hepatokarsinogenezis sürecinde AFP sentezi gibi fetal karaciğerin bazı tipik özelliklerinin saptanabileceği rapor edilmiştir (Bettini ve Marcato, 1992). Bu proteinin hepatosellüler karsinomlar, germ hücre tümörü, nadiren de metastatik karaciğer tümörleri ve hepatitislerde görüldüğü (Mulas ve ark., 1995), ancak, kan serumunda yüksek seviyeye (5000ng/ml) ulaştığında immunohistokimyasal olarak belirlenebildiği kaydedilmiştir (Brumm, 1989). Sunulan çalışmada, yapılan immunohistokimyasal boyamalarda, sadece grup B (AFB₁)’deki ratların karaciğerlerinde bazı hepatositlerin sitoplazmasında boyanma saptandı. Boyanmalar özellikle periasiner, bazen de hidropik dejenerasyonlu hücre topluluklarının içindeki hepatositlerdeydi. Bu bulgular oldukça anlamlı bulundu. Şöyle ki; grup C (AFB₁+IOY) ratların karaciğerlerinde de, daha az olmakla birlikte, değişen oranlarda nekroz ve dejenarasyon gözlenmesine rağmen AFP immunohistokimyasal olarak saptanmadı. Bu sonuçlar doğrultusunda; AFB₁ uygulamasının grup B (AFB₁) rat karaciğer hepatositlerinde kısmen de olsa AFP sentezini indüklediği, AFB₁+IOY ekstraktı verilen grupta ise bu değişimin engellendiği düşünüldü.

p53 gen proteini: p53, hücre siklusunun kontrolünde önemli rol oynayan nüklear nonhiston bir proteindir. Bu protein DNA yıkımlanması durumlarında, DNA tamir aktivitesini kolaylaştırır. Tümörlerde anormal hücre siklusu DNA tamirine zarar verip, potansiyel mutasyonları arttırarak karsinogenezise yol açmaktadır (Taylor ve Cote, 1994). p53 (wild tip) gerek normal, gerekse tümör (mutant) hücrelerinde bulunmaktadır. Ancak normal hücrelerde bulunan p53 wild tipinin yarılanma ömrü çok kısadır (6-30 dk), bu nedenle immunohistokimyasal olarak saptanabilecek kadar protein birikiminin olmadığı belirtilmektedir. Mutant p53 proteinin ise yarılanma ömrü uzundur ve daha fazla birikir, bu nedenle hücre çekirdeğinde kolaylıkla saptanabilmektedir (Taylor ve Cote, 1994). Mutant p53 proteininin hücrede birikimine p53 gen alterasyonları neden olmaktadır (Davidoff ve ark., 1991). Bu proteinin hücrelerde birikmesi, hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde, çeşitli organların karsinogenezisinde ve programlı hücre ölümünde önemli rol oynamaktadır (Yonish-Rouach ve ark., 1991). Sunulan çalışmada bütün gruplarda immunohistokimyasal olarak bu protein saptanamadı.

Karsinoembriyonik antijen (CEA): CEA, fötüsün gelişmesi sırasında normal olarak üretilen ve vücudun yeni hücreler yapması için ihtiyaç duyulan bir glikoproteindir. Bu protein fötüste bir çok hücre tipinde bulunmaktadır. CEA üretimi doğumdan hemen önce durmaktadır. Bu nedenle, genellikle sağlıklı erişkin insanlarda bulunmaz. CEA önemli bir kanser markırı olup, özellikle gastrointestinal, karaciğer, akciğer ve pankreas karsinomlarının tanısında kullanılmaktadır (Christensen ve ark., 1989). Sunulan çalışmada bütün gruplarda immunhistokimyasal olarak bu onkofötal antijen saptanmadı.

Sunulan çalışmada, incelenen rat karaciğerlerinde p53 gen proteini ve CEA antijenlerinin saptanamaması, denemede uygulanan AFB₁ dozu ile deneme süresi içinde, hepatositlerde immunhistokimyasal düzeyde bu antijenlerin üretiminin henüz olmayışıyla ya da boyamada kullanılan primer serumlarla ilgili olabilir.

Sonuç olarak; AFB₁ ile deneysel olarak oluşturulan karaciğer hasarında, IOY hepatoprotektif etkisinin araştırıldığı bu çalışmada; histopatolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal bulgular doğrultusunda, IOY'nın antioksidan etkisi sayesinde lipid peroksidasyonun, dolayısıyla karaciğer hasarının engellendiği gözlemlendi. Ayrıca immunohistokimyasal olarak AFP'nin, IOY verilen grupta belirlenememesi, fakat sadece AFB₁ verilen grupta saptanması oldukça anlamlı bulunmuş ve bu bitkinin antikanserojen etkisiyle ilgili olabileceği düşünülmüştür. Ancak, gerçekleştirilen bu çalışmanın, bir ön çalışma olarak kabul edilmesi, aynı çalışmanın deneme süresini, ratlarda 100-150 mikrogram/kg/gün AFB₁ doz ile kanser oluşturma süresi olarak bildirilen 12-24 ay kadar geniş planlayarak ve bitki ekstraktlarının farklı dozları kullanılarak yapılmasının, söz konusu bitkinin antikanserojen etkisini daha net bir şekilde ortaya konabileceği kanısındayız. Bu nedenlerle, bu çalışmanın, bu konuda daha sonraki yapılacak çalışmalara büyük katkısının olacağı ve temel oluşturacağı düşüncesindeyiz.

ÖZET

Yıldırım S, Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Aflatoksikozisde Isırgan Otu Yaprığı (*Urtica dioica* L) Ekstraktının Karaciğer Lezyonlarını Engelleyici Etkisinin Histopatolojik, İmmunohistokimyasal ve Biyokimyasal Olarak Araştırılması, Y.Y.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Patoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, Van, 2011. Aflatoksikozis, insan ve hayvanlarda aflatoksinler tarafından oluşturulan akut veya kronik seyirli bir mikotoksikozisdir. Hayvanlarda önemli ekonomik kayıplara neden olan ve insan sağlığını tehdit eden toksikasyon özellikle geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak görülmektedir. Karaciğer aflatoksinlerden etkilenen asıl organdır ve histopatolojik olarak nekroz, fibrozis ve hepatokarsinogenezis görülmektedir. Aflatoksinlerden ileri gelen toksikasyonlarda etkili bir korunma bilinmemektedir. Ancak bazı vitamin ve mineraller ile proteinlerin koruyucu etkilerinin olduğu belirtilmektedir. Yapılan son çalışmalardan ısırgan otunun immunomodülatör, antioksidan ve antikanserojenik gibi birçok farmakolojik etkilerinin olduğu bilinmektedir. Ancak, ısırgan otu yaprağı ekstraktının aflatoksikozise karşı hepatoprotektif etkisi konusunda çalışma bulunmamaktadır. Gerçekleştirilen bu çalışmada, ratlarda deneysel olarak oluşturulan aflatoksikozis’de karaciğerde meydana gelen lezyonların oluşumunda, ısırgan otu yaprağı ekstraktının engelleyici etkisi; biyokimyasal, histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak araştırıldı. Bu amaçla, toplam 30 rat, her biri 10’arlı 3 grub’a ayrıldı. Deneme gruplarından; A (kontrol) grubuna normal rat yemi, B (AFB₁) grubuna 25 µg AF/rat/gün yem verildi, C (AFB₁+IOY) grubuna ise 25 µg AF/rat/gün yem ile birlikte ayrıca 2ml/rat/gün dozda ısırgan otu yaprağı ekstresi oral olarak verildi. Üç aylık deneme sonunda, nekropsileri yapılan ratlardan histopatolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal analizler için kan ve doku örnekleri alındı. Sonuç olarak; histopatolojik ve biyokimyasal bulgulara göre sadece AFB₁ verilen ratların kan ve karaciğerlerinde lipid peroksidasyonun ve serum enzimlerinin artışının meydana geldiği ve önemli ölçüde doku hasarının olduğu, IOY ekstraksiyonu verilen deneme grubunda ise lipid peroksidasyonun ve karaciğer enzimlerinin azaldığı, antioksidan sistem aktivitesinin ise arttığı, dolayısıyla karaciğer hasarının engellendiği gözlemlendi.

Anahtar Sözcükler: Aflatoksikozis, Isırgan otu yaprağı ekstresi, Karaciğer lezyonları, Rat.

SUMMARY

Yıldırım S, Histopathological, Immunohistochemical and Biochemical Investigation of the Preventive Effects of *Urtica Dioica* Leaf Ekstracts on Liver Lesions induced by Experimental Aflatoxicosis in Rats. Yuzuncu Yıl University, Institute of Health Sciences MVS Thesis in Department of pathology, Van, 2011. Aflatoxicosis is a mycotoxicosis developing acute or chronic, caused by aflatoxins in animals and humans. Aflatoxicosis causes important economic losses in animals and threat human health are seen especially in underdeveloped and developing countries. Liver is the main organ affected by aflatoxins and necrosis, fibrosis and hepatocarcinogenesis are observed histopathologically. Aflatoxins are known especially with their hepatotoxic and hepatocarcinogenic effects, An effective protection in aflatoxin-caused toxications is not known well. But it's reported that some of vitamins, minerals and proteins have protective effects. According to studies it's known that *Urtica dioica* L has many pharmacologic effects including antioxidant, immunomodulatory and anticancerogenic. However there isn't any study about hepatoprotective effects of *Urtica dioica* leaf extract (UDLE) on aflatoxicosis. In this study, the effects of UDLE on prevention of aflatoxin-induced liver lesions in rats in terms of biochemical, histopathological and immunohistochemical were investigated. For this purpose; a total of 30 rats were allotted into 3 groups which have 10 rats in each group. Rats in control group were fed with a diet without AF. Rats in AF-treated group and AF+UDLE-treated group received approximately 25 µg of AF/rat/day. AF+UDLE groups also received 2 ml of UDLE extract/rat/day by gavage for 90 days. Experimental groups; group A (control group) was given normal rat food, group B (AFB₁) 1.5 mg/kg AF and group C (AFB₁ + UDLE) 1.5 mg/kg AF also received 2 ml of UDLE/rat/day by gavage for 90 days. At the end of 3 months of experiment period; blood and tissue samples were taken from rats applied necropsy for histopathologic, immunohistochemical and biochemical analysis. Administration of UDLE extract restored the AF-induced imbalance between MDA and antioxidant system towards near normal particularly in liver. Hepatoprotection by UDLE is substantiated by the histologic findings in AF+UDLE -treated group as against degenerative changes in the AF-treated rats. It is concluded that UDLE has a hepatoprotective effect in rats with aflatoxicosis, probably acting by promoting the antioxidative defense systems.

Key Words: Aflatoxicosis, Liver lesions, Rat, *Urtica dioica* leaf extraction

KAYNAKLAR

- Acay HN (2006). Bildircinlarda (*coturnix coturnix japonica*) Aflatoksikosisine Karşı Biyolojik Korunma Yöntemleri Üzerine Bir Araştırma, Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, KONYA.
- Akbay P, Basaran AA, Undeger U and Basaran N (2003). In vitro immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica* L, *Phytother Res*, 17, 34–37.
- Akkuş İ (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Mimoza Yayınları, Konya.
- Aksu M and Kaya M (2004). Effect of usage *Urtica dioica* L. on microbiological properties of sucuk, a Turkish dry-fermented sausage, *Food Control*, 15, 591–595.
- Aldemir C (1993). Aflatoksinlerin yumurta tavuklarının dokularına dağılım düzeyleri ve atılım sürelerinin tesbiti üzerine araştırma, *Veterinarium*, 4, 1, 16-22.
- Amstad P, Levy A, EmerIt I and Cerutti P (1984). Evidence for membrane mediated chromosomal damage by aflatoxin B₁ in human lymphocytes, *Carcinogenesis*, 5, 719-723
- Atalay B (2007). Japon bildircinlarında (*coturnix coturnix japonica*) deneysel olarak oluşturulan aflatoksikozis'te yeme katılan maya glukomannanın bazı biyokimyasal parametreler ve antioksidan enzimler üzerine olan etkileri, Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, KONYA.
- Balzarini J, Neyts J, Schols D, Hosoya M, Van Damme E, Peumans W and De Clercq E (1992). The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium hybrid* and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine) n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication in vitro, *Antiviral Res*, 18, 191–207.
- Baytop T (1999). Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Nobel Tıp Kitabevleri Yayını, 231 – 232.
- Bettini G and Marcato PS (1992). Primary Hepatic Tumours in Cattle, A Classification of 66 Cases, *J Comp Pathol*, 107, 19-34, (1992).

- Bilgiç N (1992). Akut aflatoksikosis olaylarında patolojik bulgular, *Türk Vet Hek Derg*, 4, 38-40.
- Bilgiç HN ve Yeşildere T (1992). Cıvcıvlerde deneysel aflatoksikoziste böbrek lezyonları, *İÜ Vet Fak Derg*, 18, 102-108.
- Bnouham M, Merhfouir FM, Ziyat A, Mekhfi H, Aziz M and Legssyer A (2003). Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*, *Fitoterapia*, 74, 677–681.
- Brumm C, Schulze C, Charels K, Morohoshi T and Klöppel G (1989). The significance of alpha-fetoprotein and other tumour markers in differential immunocytochemistry of primary liver tumours, *Histopathology*, 14, 503-513.
- Bullerman LB (1978). Significance of mycotoxins to food safety and human health, *J. Food Protec*, 42, 1, 65-83.
- Campbell ML, May ID, Huff WE and Doerr JA (1983). Evaluation of immunity of young broiler chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis, *Poultry Sci*, 62, 2138-2144.
- Campbell TC and Hayes JR (1976). The role of aflatoxin metabolism in toxic lesion, *Toxic Appl Pharm*, 35, 199-222.
- Cassand P, Decoudou S, Leveque F, Daubeze M and Narbonne JF (1993). Effect of vitamin E dietary intake on in vitro activation of aflatoxin B₁, *Mutat Res*, 319, 309-316.
- Cavalheiro ACL (1981). Aflatoxin and aflatoxicosis, *World's Poult Sci J*, 37, 34-38.
- Cavin C, Hoîzhîhîser D, Constable A, Huggett AC and Schilter B (1998). The coffee specific diterpene cafestol and kahweol protect against aflatoxin B₁-induced genotoxicity through a dual mechanism, *Carcinogenesis*, 19, 1396-1375.
- Cetinus E, Kilinc M, Inanc F, Kurutas EB and Buzkan N (2005). The role of *Urtica dioica* (urticaceae) in the prevention of oxidative stress caused by tourniquet application in rats, *Tohoku J Exp Med*, 205, 215–221.
- Chen J, Goetchius M, Combs G and Campbell T (1982). Effects of dietary selenium and vitamin E on covalent binding of aflatoxin to chick liver cell macromolecules, *J Nutrition*, 112, 350-355.

- Christensen WN, Boitnott JK and Kuhajda FP (1989). Immunoperoxidase staining as a diagnostic aid for hepatocellular carcinoma, *Mod Pathol*, 2, 8-12.
- Cilieveci O, Cordos Ö, Ghiduş E and Moldovan A (1980). The toxic and teratogenic effect of aflatoxin B₁ on the chick embryo development, *Morphol Embryol*, 26, 309-313.
- Çelik A (2007). Ratlarda deneysel olarak oluşturulan aflatoksikozisde çörek otu'nun (*Nigella sativa*) karaciğer lezyonlarını engelleyici etkisinin araştırılması, Y.Y.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Patoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van.
- Çelik K (2001). Küf toksinleri ve hayvan beslemedeki önemleri, *Ekin Derg*, 17, 62-66.
- Çelik İ, Demet Ö, Dönmez HH, Oğuz H ve Boydak M (1995). Aflatoksin ve aflatoksin bağlayıcısı olan polivinilpolipirrolidon (PVPP) verilen broiler civcivlerde peritoneal makrofajların fagositik ve mikrobisidal aktivitelerinin belirlenmesi, *Vet Bil Derg*, 12, 1, 145-151.
- Çelik İ, Oğuz H, Demet Ö, Boydak M, Dönmez HH, Sur E and Nizamlıoğlu F (2000a). Emhryotoxicity assay of aflatoxin produced by *Aspergillus parasiticus* NRLL 2999, *BrPoult Sci*, 41, 401-409.
- Çelik İ, Oğuz H, Demet Ö, Dönmez HH, Boydak M and Sur E (2000b). Efficiency of polyvinyl polypyrrolidone in reducing the immunotoxicity of aflatoxin in growing broilers, *Br Poult Sci*, 41, 430-439.
- Dalvi RR and McGowan C (1984). Experimental induction of chronic aflatoxicosis in chickens by purified aflatoxin B₁ and its reversal by activated charcoal, phenobarbital, and reduced glutathione, *Poultry Sci*, 63, 485-491.
- Davidoff AM, Humphrey PA, Iglehart JD and Marks JR (1991). Genetic basis for p53 over expression in human breast cancer, *proceedings of the national academy sciences of the USA*, 88, 5005-5010.
- Davila J, Edds G, Osuna O and Simpson C (1983). Modification of the effects of aflatoxin B₁ and warfarin in young pigs given selenium, *Am J Vet Res*, 44, 1877-1883.
- Edds GT (1973). Acute aflatoxicosis A review, *J Am Vet Med Assoc*, 162, 304-309

- Elis J and Dipaolo JA (1967). Aflatoxin B₁ and malformations, Arch Pathol, 83, 53-57.
- Ellis WO, Smith JP and Simpson BK (1991). Aflatoxins in food, Occurance, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 30, 3, 403-439.
- Enzan H, Himeno H, Iwamura S, Saibara T, Onishi S, Yamamoto Y and Hara H (1994). Immunohistochemical identification of ito cells and their myofibroblastic transformation in adult human liver, Virchow, Arch, 424, 249-256.
- Erdemir AD (2001). Şifalı Bitkiler – Doğal ilaçlarla geleneksel tedaviler, Alfa Yayınları, 928 (17), 211.
- Eser SR, Kumova B ve Sivas S (1978). Bulgurlara aflatoksin bulaşması ve karaciğer kanseri ile ilişkisi, Cerrahpaşa Tıp Fak Derg, 9, 222-228.
- Farzami B, Ahmadvand D, Vardasbi S, Majin FJ and Khaghani Sh (2003). Induction of insulin secretion by a component of Urtica dioica leave extract in perfused ıslets of Langerhans and its in vivo effects in normal and streptozotocin diabetic rats, J Ethnopharmacology, 89, 47–53.
- Fennell AJ (1966). Aflatoxin in grounduts. IV Problems of detoxifications, Trop Sci, 8, 61.
- Fernandez A, Verde MT, Gascon M, Ramos JJ and Gomez J (1994a). Aflatoxin and its metabolites in tissues from laying hens and broiler chickens fed a contaminated diet, J Sci Food Agric, 65, 407-414.
- Fijalek Z, Soltyk K, Lozak A, Kominek and Ostapczuk P (2003). Determination of some micro- and macroelements in preparations made from peppermint and nettle leaves, Pharmazie, 58, 480–482.
- Fukayama MY and Hsieh PDH (1985). Effect of butylated hydroxy tolüene pretreatment on the excretion, tissue distribution and DNA binding of ¹⁴C aflatoxin B₁ in the rat, Fd Chem Toxic, 23, 6, 567-573.
- Gablks J, Schaeffer W, Friedman L and Wogan G (1965). Effect of aflatoxin B₁ on cell cultures, J Bacteriol, 90, 720-723.

- Galelli A, Delcourt M, Wagner MC, Peumans W and Truffa-Bachi P (1995). Selective expansion followed by profound deletion of mature V beta 8,3+T cells in vivo after exposure to the superantigenic lectin *Urtica dioica* agglutinin, *J Immunol*, 154, 2600–2611.
- Galtier P (1998). Biological fate of mycotoxins in animals, *Revue Med Vet*, 149, 549-554.
- Geissler F and Faustman EM (1988). Developmental toxicity aflatoxin B₁ in the rodent embryo in vitro contribution of exogenous biotransformation systems to toxicity, *Teratology*, 37, 101-111.
- Ghosh RC, Chauhan HVS, Jha GJ (1990). Suppression of cell mediated immunity by purified aflatoxin B₁ in broiler chicks, *Vet Immun Immunopathol*, 8, 165-172.
- Giambrone JJ, Diener UL, Davis ND, Panangala VS and Hoerr FJ (1985a). Effects of aflatoxin in young turkeys and broiler chickens, *Poultry Sci*, 64, 1678-1684.
- Giambrone JJ, Ewerth DL, Wyatt RD and Eidson CS (1978). Effects of aflatoxin the humoral and cell-mediated immune systems of the chicken, *Am J Vet Res*, 39, 2, 305-308.
- Glahn RP, Beers KW, Bottje WG, Wideman RF and Thomas W (1991). Aflatoxicosis alters avian renal function, calcium and vitamin D metabolism, *J Tox Env Health*, 34, 309-321.
- Glavits R and Salyi G (1998). Mycotoxicosis in poultry, *Poult Int*, 37, 26-40.
- Gözüm S, Tezel A and Koç M (2003). Complementary alternative treatments used by patients with cancer in eastern Turkey, *Cancer Nurs*, 26, 230–236.
- Gülçin I, Küfrevioğlu OI, Oktay M and Büyükkuroğlu ME (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.), *J Ethnopharmacol*, 90, 205–215.
- Hafez AH, Megalla SE, Abdel-Fattah HM and Kamel YY (1982). Aflatoxin and aflatoxicosis, II. Effects of aflatoxin on ovaries testicles in mature domestic fowl, *Mycopathol*, 77, 137-139.
- Halliwell B and Gutteridge JMC (1989). *Free radicals in biology and medicine*, 2nd Reprint. Clarendon Press, Oxford, Pp, 543, USA.
- Hamilton PB (1982). Mycotoxins and farm animals, *Refush Vet*, 39, 1-2, 17-45.

- Harvey RB, Phillips TD, EU is JA, Kubena LF Huff WE and Peterson HD (1991). Effects on aflatoxin M₁ residues in milk by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to aflatoxin-contaminated diets of dairy cows, *Am J Vet Res*, 52, 1556-1559.
- Hatch RC (1988). Poison causing abdominal distress of liver or kidney damage, in "Veterinary Pharmacology and Therapeutics" Eds. by NH Both and Le Mc Donald, Sixth edition, The Iowa State University Press, 1102-1125.
- Haworth SR, Lavvlor, TE, Zeiger E, Lee LS and Park DL (1989). Mutagenic potential of ammonia-related aflatoxin reaction products in a model system, *JAOCs*, 66, 1, 102-104.
- Hong WG and Sporn MB (1997). Recent advances in chemoprevention of cancer, *Science*, 278, 1073-1077.
- Hsieh DPH, Wong ZA, Wong JJ, Michas C and Rueber BH (1977). Comparative Metabolism of Aflatoxin, in "Mycotoxin in Human and Animal Health", Pathotox Publ, Inc, Park Forest South, Illinois, pp, 37-50.
- Iwaki M, Kitagawa T, Akamatsu Y and Aibara K (1990). Cytotoxic effects aflatoxin B₁ and its association with cellular components in chicken embryo primary cultured cells, *Biochem Biophys Acta*, 1035, 146-153.
- Jakab GJ, Hmielecki RR, Zarba A, Hemenway DR and Groopman JD (1994). Respiratory aflatoxicosis, suppression of pulmonary and systemic host defense in rats and mice, *Toxicol Appl Pharma*, 125, 198-205.
- Jeffery FH, Morton JG and Miller JK (1984). Effects of some clinically significant mycotoxins on the incorporation of DNA, RNA and protein precursors in cultured mammalian cells, *Res Vet Sci*, 37, 30-38.
- Jelinek R and Peterka M (1985). Chick embryotoxicity screening test-130 substances tested, *Indian J, Exp, Biol*, 23, 588-595.
- Jubb KVF, Kennedy PC and Palmer N (1993). Pathology of domestic animals, Third Ed, Academic Press, San Diego, USA.

- Kanter M, Meral I, Dede S, Cemek M, Ozbek H, Uygan I and Gunduz H (2003). Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl₄- treated rats, *J Vet Med, A* 50, 264 – 268.
- Karaman M, Basmacıoğlu H, Ortatatlı M and Oğuz H (2005). Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology, *British Poultry Science*, 46, 394-400.
- Karaman M, Özen H, Tuzcu M, Çiğremiş Y, Önder F and Özcan K (2010). Pathological, biochemical and haematological investigations on the protective effect of α -lipoic acid in experimental aflatoxin toxicosis in chicks, *British Poultry Science*, 51, 1, 132-141.
- Karenlampi OS (1987). Mechanism of cytotoxicity of aflatoxin B₁, *Bioch Biophysical Res Com*, 145, 854-860.
- Kaya S (2002). Mikotoksinler, "Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji", Ed. Kaya S, Pirinççi İ ve Bilgili A, 2. Baskı, Medisan Yayınevi, 537-637, Ankara.
- Keçeci T, Demet Ö ve Oğuz H (1995). Broiler civcivlerde yeme yalnız ve kombine katılan aflatoksin ve adsorban (Mycofix^R Plus)'m bazı hematolojik ve serum biyokimyasal parametreler üzerine etkileri, *Vet Bil Derg*, 11, 2, 95-101.
- Kökoğlu E (1998). Oksidatif stres ve yaşlanma, Yaşlanmaya Biokimyasal Yaklaşım Uluslararası Sempozyumu, Ankara.
- Koç H (2002). Doğrudan, doğadan bitkilerle sağlıklı yaşama, 1. Baskı, Ümit Ofset 189–192 Tokat.
- Leeson S, Diaz G and Summers JD (1995). Aflatoxins, in "Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins", Eds. by S Leeson, JDG Gonzala and JD Summers, Published by, University Books, 249-298, PO Box 1326, Guelph, Ontario, Canada.
- Lichius JJ and Muth C (1997). The inhibiting effect of *Urtica dioica* root extracts on experimentally induced prostatic hyperplasia in the Mouse, *Planta Med*, 63, 307–310.
- Lichius JJ, Renneberg H, Blaschek W, Aumuller G and Muth C (1999). The inhibiting effects of components of stinging nettle roots on experimentally induced prostatic hyperplasia in mice, *Planta Med*, 65, 666–668.

- Lillehoj EB, Stubbiefield RD, Shannon G and Shotwell OL (1971). Aflatoxin M₁ removal from aqueous solutions by *Flavobacterium aurantiacum*, *Mycopathol Mycol Appl*, 45, 259.
- Lindemann P, Muller HH, Aumuller G and Konrad L (1999). Antiproliferative effect of a polysaccharide fraction of a 20% methanolic extract of stinging nettle roots upon epithelial cells of the human prostate (LNCaP), *Pharmazie*, 54, 768–771.
- Lindsay DG (1981). Aflatoxin residues in animal products, in: "Recent Advances in Animal Nutrition", Pp, 153-165. The camelaff press, Southampton.
- Mabee MS and Chipley JR (1973) Tissue distribution and metabolism aflatoxin B₁-¹⁴C in broiler chickens, *Appl Microbiol*, 25, 5, 763-769.
- Madhusudhanan N, Kavinthalakshmi SN, Radha Shanmugasundaram K and Shanmugasundaram ERB (2004). Oxidative damage to lipids and proteins induced by aflatoxin B₁ in fish (*Labeo rohita*)- protective role of Amrita Bindu, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 17, 73-77.
- Mayura K, Abde-Wahhab MA, McKenzie KS, Sarr AB, Edwards JF, Naguib K and Phülips TÛ (1998). Prevention of maternal and developmental toxicity in rats viadietary inclusion of common aflatoxin sorbents, Potential for hidden risks, *Toxicol Sci*, 175-182.
- Mehmetoğlu İ, Gürbilek M, Çağlayan O ve Koçyiğit A (2002). Klinik biyokimya laboratuvar el kitabı, İnci Ofset II. Baskı, S,160, Ankara.
- Miller BL and Wyatt RD (1985). Effect of dietary aflatoxin on the uptake and elimination of chlortetracycline in broiler chicks, *Poultry Sci*, 64, 1637-1643.
- Miller DM, Clark JD, Hatch RC and Jain AV (1984). Caprine aflatoxicosis, Serum electrophoresis and pathologic changes, *Am J Vet Res*, 45, 6, 1136-1141.
- Moon EY, Rhee DH and Pyo S (1996) Immunosuppressive effect of aflatoxin B₁, *J Appl Pharmac*, 4, 190-195.
- Moorthy AS, Mahendar M and Rao PR (1985). Hepatopathology in experimental aflatoxicosis in chickens, *Indian J Anim Sci*, 55, 8, 629-632.

- Moss EJ, Neal GE and Judah DJ (1985). The mercapturic acid pathway metabolites of a glutathione conjugate of aflatoxin B₁, *Chem Biol Interactions*, 55, 139-155.
- Mulas JM, Monteros AE, Carrasco L, Niel M Fernandez A, Mulas JM, Monteros AE and Van M (1995). Immunohistochemical distribution pattern of intermediate filament proteins in 50 feline neoplasms, *Vet Pathol*, 32, 692-701.
- Musette P, Galelli A, Chabre H, Callard P, Peumans W, Truffa-Bachi P, Kourilsky P and Gachelin G (1996). Urtica dioica agglutinin, a V beta 8,3-specific superantigen, prevents the development of the systemic lupus erythematosus-like pathology of MRL lpr/lpr mice, *Eur J Immunol*, 26, 1707–1711.
- Nakae D, Konishi Y and Farber JL (1987). A role for oxygen radicals in the hepatotoxicity of aflatoxin B₁ and dimethyl nitrosamine, *Proc Jap Cancer Assoc*, 38.
- Neldon-Ortiz DL and Ojiresi MA (1992a). The effect of direct and microsomal activated aflatoxin B₁ on chicken peritoneal macrophages in vitro, *Vet Immunol Immunopathol*, 31, 61-76.
- Netke S, Roomi M, Tsao C and Niedzwiecki A (1997). Ascorbic acid protects guinea pigs from acute aflatoxin toxicity, *Toxicol Appl Pharmacol*, 143, 429-435.
- Niki E (1987). Antioxidant in relation to lipid peroxidation, *Chem Phys Lipids*, 44, 227-253.
- Nixon JE, Hendrick JD, Pawlowski NE, Loveland PW and Sinnhuber RO (1981). Carcinogenicity of aflatoxin in Fisher 344 rats, *J Natl, Cancer Inst*, 66, 1159-1163.
- Obertreis B, Ruttkowski T, Teucher T, Behnke B and Schmitz H (1996b). In-vivo and in-vitro inhibition of lipopolysaccharide stimulated tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta secretion in human whole blood by extractum urticae dioicae foliorum. *Arzneimittel forschung*, 46 389–394.
- Obioha WI, Stahr HM and Kraft AA (1986). Distribution and effects of aflatoxin in chicken tissues after feeding radiolabeled 14C aflatoxin B₁, *J Food Protec*, 49, 799-805.
- Oğuz H (1997). Broyler yemlerine katılan polivinilpolipirrolidon (PVPP)'un ve diğer bazı adsorbanlarla karışımlarının aflatoksikozise karşı koruyucu etkinliklerinin belirlenmesi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, KONYA.

- Oğuz H, Keçeci T, Birdane YO, Önder F and Kurtoğlu V (2000). Effect of clinoptilolite on serum haematological characters of broiler chickens during aflatoxicosis, *Res Vet Sci*, 69, 89-93.
- Ortatalı M, Oğuz H, Hatipoğlu F ve Karaman M (2004). Evaluation of pathological changes in broilers during chronic (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure, *Res Vet Sci*, 78, 61-68.
- Özen H, Karaman M, Çiğremiş Y, Tuzcu M, Özcan K and Erdağ D (2009). Effectiveness of melatonin on aflatoxicosis in chicks, *Res Vet Sci*, 86, 485-489.
- Özpınar H, Özpınar A ve Şenel HS (1988). Marmara bölgesi yem fabrikalarından kanatlı karma yemi ve yem hammaddelerinin aflatoxin ve okratoksin A yönünden incelenmesi, *İÜ Vet Fak Derg*, 14, 11-18.
- Pasteiner S (1994). Mycotoxins in Animal Husbandry, Biomin GTI Ges (Ed) St. Pölten, Austria Biochem, Biophys, 8, 67-75.
- Petlevski R, Hadzija M, Slijepcevic M and Juretic D (2001). *J Ethnopharmacol*, 75, 181.
- Pons WA, Cucullu AF, Lee LS, Janssen H and Goldblatt LA (1972). Kinetic study of acid, catalyzed conversion of aflatoxins B₁ and G₁ to aflatoxins B_{2a} and G_{2a}, *J Am Oil Chem Soc*, 49, 124.
- Raina V and Gurtoo H (1985). Effects of Vitamins A, C, and E on Aflatoxin B₁-induced mutagenesis in salmonella typhimurium TA-98 and TA-100, *Teratog Carcinog Mutagen*, 5, 29-40.
- Ravi R, Kumar S ve Kumar R (2001). Biochemical changes induced in liver and serum of aflatoxin B₁-treated male wistar rats, preventive effect of picroliv, *Pharmacol, Toxicol*, 88, 53-58.
- Reddy CV (1992). Aflatoxins in feed. An enemy to poultry producers in the tropics, *Misset-World Poultry*, 8, 6, 19-20.
- Richard JL, Pier AC, Stubblefield RD, Shotvvell OL, Lyon, RL and Cutlip RC(1983). Effect of feeding corn naturally contaminated with aflatoxin on feed efficiency, on physiologic immunologic, pathologic changes, and on tissue residues in steers, *Am J Vet Res*, 44, 1294-1299.

- Riehemann K, Behnke B and Schulze-Osthoff K (1999). Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF-KB, *FEBS Lett*, 442, 89–94.
- Robb J (1993). Mycotoxins, in *Practice*, November, 278-279.
- Rodricks JV and Stoloff L (1977). Aflatoxin residues from contaminated feed in edible tissues of food-producing animals in "Mycotoxin in Human and Animal Health", pp, 67-79, Pathotox Publ Inc, Pork Forest South, Illinois.
- Sahoo PK, Chattopadhyay SK, Johrp TS, Charan K and Sıkdar A (1991). Pathology of experimental aflatoxicosis in rabbits, *Indian J Anim Sci*, 63, 268-273.
- Salmanoğlu B (2002). Broyler civcivlerde aflatoksin B₁'in karaciğerin vitamin A depolanması üzerine etkisi, *Turk J Vet Anim Sci*, 26, 1341-1344.
- Samarajeewa U, Sen AC, Cohen MD and Wei CI (1990). Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods, *J of Food Prot*, 53, 6, 489-501.
- Schell TC, Lindemann MB, Kornegay ET and Wyatt RD (1993). Effects of feeding aflatoxin contaminated diest with and growing pigs on performance, liver function and mineral metabolism, *J Anim Sci*, 71, 1209-1218.
- Sharby TF (1978). Kanatlılarda mikotoksikozis, Çeviren: Ersin İstanbulluoğlu, *Vet Hekim Derg*, 48, 47-51.
- Shetty PH and Jespersen L (2006). *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents, *Trends in Food Science & Technology*, 17, 2, 48-55.
- Shiga A, Shirota K and Nomura Y (1996). Immunohistochemical and ultrastructural studies on the sinusoidal lining cells of canine hepatocellular carcinoma, *J Vet Med Sci*, 58, 509-514.
- Singh DK and Lippman SM (1998). Cancer chemoprevention, Part 1 retinoids and carotenoids and other classic antioxidants, *Oncology*, 12, 1643-1659.
- Singh J, Tiwari RP, Singh G, Singh S and Vadehra DV (1987). Biochemical and immunological effects of aflatoxins in rabbits, *Toxicology Letters*, 35, 225-230.

- Slowik J, Graczyk S and Madej JA (1985). The effect of a single dose of aflatoxin B₁ on the value of nucleolar index of blood lymphocytes and on histological changes in the liver, bursa Fabricii, suprarenal glands and spleen in ducklings, *Folia Histochem, Cytobiol*, 23, 71-81.
- Smith JE (1997). Handbook of Plant and Fungal Toxicants, In *Aflatoxins Fungal Toxicants*, pp 269-285, Ed, JD F D Mello, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Stoloff L (1977). Aflatoxin-An overview, in: "Mycotoxin in Human and Animal Health", Pathotox Publ Inc Park Forest South Illinois, pp 7-28.
- Stubblefield RD, Pier AC, Richard JL and Shotwell OL (1983). Fate of aflatoxins in tissues, fluids and excrements from cows dosed orally with aflatoxin B₁, *Am J Vet Res*, 44, 1750-1752.
- Suliman BH, Mohame A, Awadelsied AN and Shommein MA (1987). Acute mycotoxicosis in sheep, Field Cases, *Vet Hum Toxicol*, 29, 241-243.
- Sur E (2001). Yumurtaya verilen Aflatoksin B₁ (AFB₁)'in tavukların lenfoid organlarının embriyonal gelişimi üzerindeki etkilerinin enzim histokimyasal yöntemlerle araştırılması, Doktora Tezi, SÜ Sağlık Bil Enst, Konya.
- Swatson SK, Day C, Flatt PR, Gould BJ and Bailey CJ (2001). *Diabetes Res* 1989, 10, 69, "Alıntıdır" Bnouham M, Merhfour FM, Ziyat A, Mekhfi H, Aziz M and Legssyer A (2003). Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*, *Fitoterapia* 74, 677-681.
- Şahin K ve Sarı M (1996). Elazığ yöresinde yaygın olarak kullanılan yemlerin bakteri ve mantar florası üzerine bir araştırma, *FÜ Sağlık Bil Derg*, 10, 251-258.
- Şanlı Y (1995). Mikotoksinler, Özel Toksikoloji Kitabı, Ed. Sezai Kaya, 283-328.
- Tahri A, Yamani S, Legssyer A, Aziz M, Mekhfi H, Bnouham M and Ziyat A (2000). Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat, *J Ethnopharmacol*, 73, 95-100.
- Tanakol R (1998). Antioksidan vitaminler, hastalıkta ve sağlıkta önemleri, *Klinik gelişim*, 11, 347-356.

- Tanker N, Koyuncu M ve Coskun M (1993). Farmasötik Botanik Ders Kitabı, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No 70, 236–237.
- Taylor CR and Cote RJ (1994). Immunomicroscopy, A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist 2.nd Ed Saunders Company Philadelphia, USA.
- Testai L, Chericoni S, Calderone V, Nencioni G, Nieri P, Morelli I and Martinotti E (2002). Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) roots extracts, In vitro and in vivo pharmacological studies, J Ethnopharmacology, 81, 105–109.
- Tıraş B ve Baş AL (1992). Mikotoksinlerin immun sistem üzerindeki etkileri, Türk Vet Hek Derg, 4, 17-19.
- Tuncer N (1987). Ankara çevresinde üretilen yumurta örneklerinde aflatoksin rezidülerinin araştırılması, Etlik Vet Mik Derg, 6, 101-116.
- Tuzcu M (1999). *Aspergillus parasiticus* NRLL 2999 susu ile küflendirilmiş bulgurlarla beslenen beyaz farelerdeki patolojik bulgular, Doktora Tezi, SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, KONYA.
- Türkdoğan MK, Özbek H, Yener Z, Tuncer İ, Uygan İ and Ceylan E (2003). The role of *Urtica dioica* and *Nigella sativa* in the prevention of carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats, Phytotherapy Research, 17, 942-946.
- Venkata K, Gapalakrishna R and Rama P (1988). Sequential gross and histological changes of bursa and thymus in acute and chronic experimental aflatoxicosis of broiler birds, Indian J Anim Sci, 58, 1011-1018.
- Wagner H and Fransworth NR (1990). Economic and medicinal plant research, Vol 4, Plants and traditional medicine, Academic press, London, England.
- Wagner H, Willer F and Kreher B (1989). Biologically active compounds from the aqueous extract of *Urtica dioica*, Planta Medica, 55, 452–454.
- Weber RW (2003). Stinging nettle, Ann Allergy Asthma, Immunol, 90, A6.
- Wetherilt H (1989). Isırgan otu yaprak ve tohumlarının besleyici özellikleri ve antitümoral Etkileri, PhD Thesis, (Turkish). Hacettepe Univ. Graduate Institute of Health Science, Ankara,

- Turkey. “Alıntıdır” Aksu M ve Kaya M (2004). Effect of usage *Urtica dioica* L. on microbiological properties of sucuk, a Turkish dry-fermented sausage, *Food Control*, 15, 591–595.
- Wilson R, Ziprin R, Ragsdale S and Busbee D (1985). Uptake and vascular transport of ingested aflatoxin, *Toxicol Letters*, 29, 169-176.
- Wolzak A, Pearson AM, Coleman TH, Pestka JJ and Gray JJ (1985). Aflatoxin deposition and clearance in the eggs of laying hens, *Fd Chem Toxic*, 23, 12, 1057-1061.
- Wong ZA and Hsieh DPH (1980). The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin B₁ in the monkey, rat and mouse, *Toxicol Appl Pharmacol*, 55, 115-125.
- Yagi K (1994). Lipid peroxides in hepatic, gastrointestinal, and pancreatic disease, free radicals in diagnostic medicine, Ed. Armstrong D Plenum, Pp, 65-169.
- Yakışık M (1992). Aflatoxin B₁ verilmiş Newcastle'la aşıllı civcivlerde karaciğer paranzimi üzerinde ışık mikroskopik incelemeler, *UÜ Vet Fak Derg*, 11, 43-51.
- Yener Z, Çelik İ, İlhan F ve Bal R (2009). Effects of *Urtica dioica* L. Seed on lipid peroxidation, antioksidants and liver pathology in aflatoxin-injury in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 47, 418-424.
- Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi AM and Oren M (1991). Wilder-Type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6, *Nature*, 352, 345–347.
- Zhao J, Wang J, Chen Y and Agarwal R (1999). Anti-tumor -promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seed in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3-gallate as the most effective antioxidant constituent, *Carcinogenesis*, 20, 1737-45.

ÖZGEÇMİŞ

Serkan YILDIRIM, 1981 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2001 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nde öğrenime başladı. 2006 yılında aynı fakülteden mezun oldu. Aynı yıl Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı’nda doktora’ya başladı. 2009 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı’na araştırma görevlisi olarak atandı. Halen araştırma görevlisi olarak göreve devam etmektedir. Evlidir.