

T.C
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN
AFLATOKSİKOZİSDE ÇÖREK OTU (*NIGELLA SATIVA*)’NUN
KARACİĞER LEZYONLARINI ENGELLEYİCİ ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Ahmet ÇELİK

PATOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEKLİSANS TEZİ

Jüri Başkanı

Doç. Dr. Zabit YENER

Üye

Doç. Dr. Ali ERTEKİN

Üye

Doç. Dr. Fatma İLHAN

TEZ KABUL TARİHİ

24. 07. 2007

TEŞEKKÜR

Bu çalıŐmayı projelendirip yüksek lisans tezi olarak veren ve çalıŐmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen danıŐman hocam Doç. Dr. Zabit YENER'e, çalışmanın tamamlanmasında çok büyük katkıları olan Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Fatma İLHAN'a, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. İsmail ÇELİK'e ve öğrenciliğim sırasında her türlü kolaylığı sağlayan Sağlık Bilimleri Enstitü yöneticilerine ve memurlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	I
Teşekkür.....	I
İçindekiler.....	III
Simgeler ve Kısaltmalar Listesi.....	V
Şekiller Listesi.....	VI
Çizelgeler Listesi	VII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Gıda ve Yemlerin Küflenmesi.....	2
2.2. Aflatoksinler	2
2.2.1. Aflatoksinlerin Metabolizması.....	3
2.2.2. Aflatoksinlerin Etkileri.....	3
2.2.2.1. Aflatoksikozis	3
2.2.2.2. Teratojenik Etki.....	4
2.2.2.3. Mutajenik Etki.....	5
2.2.2.4. Karsinojenik Etki.....	5
2.2.2.5. İmmunosupresif Etki.....	5
2.2.3. Aflatoksikozis’de Tanı	6
2.2.4. Aflatoksinlerden Korunma.....	6
2.4. Çörek Otu (<i>Nigella sativa</i>).....	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM	9
3.1. Aflatoksinin Yeme Katılması.....	9
3.2. Deney Hayvanları.....	9
3.3. Deneme Şeması.....	9
3.4. Yapılan Analiz ve İncelemeler.....	10
3.4.1. Biyokimyasal Analizler	10
3.4.2. İstatistiksel Analizler.....	10
3.4.3. Histopatolojik İnceleme.....	11
3.4.4. İmmunohistokimyasal İnceleme.....	11
4. BULGULAR.....	12

4.1. Biyokimyasal Bulgular.....	12
4.2. Ratların Canlı Ağırlık Sonuçları.....	13
4.3. Makroskopik Bulgular.....	14
4.4. Histopatolojik Bulgular.....	14
4.4.1. Grup A (Kontrol).....	14
4.4.2. Grup B (AFB1)	14
4.4.3. Grup C (AFB1+IOT)	15
4.5. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	15
4.5.1. Alpha-Smooth Muscle Actin (ASMA).....	15
4.5.2. Alpha-Fetoprotein (AFP).....	15
4.5.3. P53 Gen Proteini.....	16
4.5.4. Karsinoembriyonik Antijen (CEA).....	16
4.5.5. Mikroskopik Şekiller.....	17
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	21
5.1. Biyokimyasal Sonuçlar.....	21
5.2. Canlı Ağırlık Artışları.....	25
5.3. Makroskopik Bulgular.....	26
5.4. Mikroskopik Bulgular.....	26
5.5. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	29
5.5.1. Alpha-Smooth Muscle Actin (ASMA).....	29
5.5.2. Alpha-Fetoprotein (AFP)	30
5.5.3. P53 Gen Proteini.....	30
5.5.4. Karsinoembriyonik Antijen (CEA).....	31
ÖZET	32
SUMMARY	33
KAYNAKLAR	34
ÖZGEÇMİŞ	41

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AEC	: 3-amino-9-etil carbazol
AFB1	: Aflatoksin B1
AFP	: Alpha-fetoprotein
ALT	: Alanine transaminase
ASMA	: Alpha-smooth muscle actin
AST	: Aspartic transaminase
CCL4	: Karbontetraklörür
CEA	: Karsinoembriyonik antijen
GSH-px	: Glutathione peroxidase
GST	: Glutation-S-transferaz
ÇOT	: Çörek otu tohumu
MDA	: Malondialdehyde
PBS	: Phosphate buffer solution
SOD	: Süperoksit dismutaz
NS	: <i>Nigella sativa</i>
WHO	: Dünya Sağlık Teşkilatı

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1. Kontrol grubu: Karaciğerin normal histolojik görünümü, H.E. x100.....17
- Şekil 2. Grup B (AFB1): Geniş odaklar halinde hepatositlerde dejenerasyon ve nekroz. H.E. x 50.17
- Şekil 3. Grup B (AFB1): Hepatositlerde dejenerasyon ve nekroz. H.E. x 200.....18
- Şekil 4. Grup B (AFB1): Hepatositlerde dejenerasyon ve megalositik hücreler. H.E.x400.....18
- Şekil 5. Grup B (AFB1): Portal bölgede normal safra kanalları (bitişik oklar) ve proliferen safra kanalları (küçük oklar). H.E. x 320..... 19
- Şekil 6. Grup C (AFB1+ÇOT): Lobçuklarda dejeneratif hücre toplulukları ile parankimde bazı hepatositlerde nekroz ya da dejenerasyon. H.E. x 200.....19
- Şekil 7. Grup B (AFB1): Hepatositlerin sitoplazmasında alpha-fetoprotein antijenleri. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen x 320.....20

ÇİZELGELER LİSTESİ

- Çizelge 1. Alfatoksin ve çörek otu tohumu ekstraktının ratların kan ve karaciğer dokusu biyokimyasal parametreler üzerine etkileri.....12
- Çizelge 2. Grupların günlere göre canlı ağırlık ortalamaları ile standart hataları.....13

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 (Adams, 1983; Robb, 1993).

Aflatoksinlerin insanlarda ve hayvan türlerinde akut ve kronik zehirlenmelere neden olmaları 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).

Aflatoksikozis ülkemiz hayvancılığı açısından özellikle kanatlı sektöründe önemli bir sorundur, ayrıca hayvansal ürünlerdeki rezidülerinin varlığı yanında çeşitli gıdalarda da bulunabilmeleri nedeniyle halk sağlığını ilgilendirmektedir (Demirer ve ark., 1989).

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). Medikal bitkilerden olan çörek otuyla ilgili olarak son zamanlarda yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda, bu bitkinin bir çok terapötik etkilerinin yanında özellikle antikanserojen (Salomi ve ark., 1992), hepatoprotektif (Turkdogan ve ark., 2001; Turkdogan ve ark., 2003) ve immunomodülatör (EL-Kadı ve Kandıl, 1997) etkilerinin olduğu ortaya konmuştur

Bu çalışmada, ratlarda deneysel olarak oluşturulan aflatoksikozis'de özellikle karaciğerde meydana gelen lezyonların oluşumunda çörek otunun engelleyici etkisinin olup olmadığı biyokimyasal, histopatolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gıda ve Yemlerin Küflenmesi, Küflerin Sağlık Bakımından Önemi

Gıda ve yemlerin küf mantarlarıyla kontaminasyonu yetiştirme, hasat ve depolama esnasında olabilmektedir (Adams, 1983). Küf mantarlarıyla kontamine tahılların % 13'ün üzerindeki nem ve 15°C'lık bir sıcaklıkta küflenebildikleri saptanmıştır. Bu nedenle, nem ve depolama ısısının mümkün olduğunca düşük olması gerekmektedir. Küflenmiş tahılların şekil, renk ve kokusu değişmektedir (Miller, 1995). Bu değişim, küf mantarlarının, üzerinde üredikleri yem ve gıda maddelerindeki şeker, protein ve yağları parçalaması ve bozmasıyla meydana gelmektedir. Küflerle kontamine olmuş yem maddelerinin kuru madde ve su içeriklerinde azalma olmaktadır. En önemlisi de bu gıda maddelerinin mikotoksin içermesidir (Miller, 1995). Ancak, çoğu kez gıda ve yem maddelerinin makroskobik olarak küflenme belirtileri göstermeden de düşük toksik dozlarda mikotoksinlerle kirlenmiş olmaları muhtemeldir, bu da önemli sağlık riski oluşturmaktadır (Robb, 1993). Küflenmiş gıda ve yemlerdeki mikotoksinlerin çeşitli yöntemlerle tamamen uzaklaştırılmaları imkansızdır, ısıya ve dezenfektanlara karşı dayanıklı olan bu mikotoksinler yıllarca parçalanmadan toksik özelliklerini korumaktadırlar (Samarajeewa ve ark., 1990; Robb, 1993). Bu gıda ve yemlerin insan ve hayvan beslenmesinde kullanılmasıyla mikotoksikozis oluşabilmektedir (Hamilton, 1982; Adams, 1983). Kümülatif bir etkiye sahip olan bu mikotoksinlerin, alınan miktarlarına ve süresine bağlı olarak akut ölüm veya kronik zehirlenme ya da kanser oluşumuna kadar varabilen etkilerinin olduğu kaydedilmiştir (Ellis ve ark., 1991; Robb, 1993). Mikotoksikozisle ilgili zehirlenmeler evcil hayvanlarda çoğunlukla sporadik olarak ortaya çıkar, ancak özellikle kanatlılarda epidemik toksikasyonlar da belirlenmiştir (Okoye ve ark., 1988; Robb, 1993).

2.2. Aflatoksinler

Mikotoksinler grubu içinde yer alan aflatoksinler özellikle *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. Gıda ve yem maddelerinde en sık karşılaşılan ve yüksek oranlarda bulunan aflatoksin B1 (AFB1)'dir (Hatch, 1988). Aflatoksinler ancak 300°C'nin üzerindeki ısıda tamamen

yıkımlanmakta, 230 °C'de ise 25 dakika bu ısıda hazırlanan karma yemlerde aflatoksin içeriği yaklaşık %60 azalabilmektedir (Adams, 1983; Samarajeewa ve ark., 1990).

2.2.1. Aflatoksinlerin Metabolizması

Konatamine 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 çevrilir (Lindsay, 1981; Schell ve ark., 1993). Aflatoksinler karaciğerde oksidazlar tarafından metabolize edilir. Hidroksilasyonla detoksifiye edilen aflatoksin ana bileşiği glukuronik asit veya sülfatla konjuge edildikten sonra idrar ve çoğunlukla safra ile atılır (Campbell ve Hayes, 1976). Aflatoksinler karaciğerde mikrozomal enzim sistemiyle metabolize edilerek epoksit türevlerine çevrildikten sonra toksik özellik kazanırlar. Bu türevler toksikasyon ve karsinojenik etkilerden sorumlu olup öncelikle karaciğer hücrelerinde nükleoproteinler ve nükleik asitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerler. Böylece ribozomlarda bozukluk, DNA ve RNA polimeraz enzimleri ile protein sentezinde inhibisyona neden olurlar (Karenlampi, 1987; Ellis ve ark., 1991). Bu etkileri sonucunda hücresel bütünlüğün bozulması, hepatosellüler nekroz ve tümöral oluşumlar meydana gelmektedir (Sulman ve ark, 1970).

2.2.2. Aflatoksinlerin Etkileri

Aflatoksinlerin canlılar üzerindeki etkileri; akut ve kronik toksikasyon (aflatoksikozis), teratojenik, mutajenik, karsinojenik ve immunosupresyon etkisi olmak üzere 5 ana grupta incelenmektedir (Hamilton, 1982; Miller ve ark., 1984; Robb, 1993).

2.2.2.1. Aflatoksikozis

Aflatoksikozise ilişkin akut toksikasyonlara seyrek, kronik zehirlenmelere ise daha sıklıkla rastlanılmaktadır (Hamilton, 1982). Düşük toksik dozlarda ve uzun süre aflatoksin alımına bağlı olarak hayvanlarda canlı ağırlık artışında ve yem tüketiminde azalma, depresyon, kıllarda düzensizlik, anemi, sarılık ve ölüm oranlarında artış (Sahoo ve ark., 1991; Steward ve Larson, 1998), gebe hayvanlarda yavru atma, sağmal hayvanlarda süt veriminde azalma (Rajendran ve ark., 1992) ve tavuklarda yumurta veriminde azalma gibi

belirtiler görülür (Sharlin ve ark., 1981). Ancak, bu belirtiler spesifik olmadığından aflatoksikozisin klinik teşhisi çok zordur (Hamilton, 1982; Miller ve ark., 1984; Robb, 1993).

Akut ve kronik aflatoksikozise ilişkin en önemli patolojik değişiklikler karaciğerde oluşmaktadır (Slowik ve ark., 1985; Mollenhauer ve ark., 1989). Akut toksikasyonun başlangıcında karaciğerde büyüme, kenarlarında kütleşme, sarı-kırmızı mozaik görünüm saptanırken, daha sonraki dönemlerde karaciğerde cam macunu bir görünüm, safra kesesi duvarında kalınlaşma, ödem ve jelatini görünüş dikkati çekmektedir (Moorthy ve ark., 1985; Bilgiç, 1992; Nizamlıoğlu ve Gözün, 1996). Düşük toksik dozlarda ve uzun süre aflatoksin alınmasına bağlı kronik toksikasyonda ise sadece karaciğerde hafif büyüme gözlenmektedir. Büyüme hepatositlerde düz endoplazmik retikulum hipertrofisi ve yağlanma nedeniyle oluşmaktadır (Mollenhauer ve ark., 1989). Özellikle genç hayvanlarda ise mitotik inhibisyon nedeniyle karaciğer küçülebilir (Jubb ve ark., 1993). Yüksek dozlu kronik toksikasyonlarda karaciğerde büyüme, solgunluk, sarılık, kıvamda sertleşme ve küçük nodüler rejeneratif hiperplazi görülürken, daha yüksek dozların alınmasında ayrıca safra kesesinde ödem ve karın boşluğunda sıvı birikimi izlenmektedir (Moorthy ve ark., 1985; Mahalingam ve ark., 1989; Espada ve ark., 1992). Kronik aflatoksikozisde mikroskobik olarak hidropik ve yağ dejenerasyonu, safra kanalı proliferasyonu, fokal hepatosellüler nekroz, hepatositlerde ve çekirdeklerinde büyüme (Richard ve ark., 1983; Slowik ve ark., 1985) ile intrahepatik kolestazis görülebilmektedir (Jubb ve ark., 1993). Aflatoksinin yüksek dozlarda alınması durumunda periasiner hepatositler yıkımlanır ve yerlerinde yangısal hücreler, fibroblastlar ve primitif vasküler oluşumlar şekillenir (Jubb ve ark., 1993; Moorthy ve ark., 1985).

2.2.2.2. Teratojenik Etki

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 fötüs saptanmıştır. Bu malforme yavrularda anencephalie, ectopia cordis, büyümede gerilik, mikrosephali ve umbilical herni gibi gelişim bozuklukları belirlenmiştir (Ellis ve ark., 1991). Yapılan diğer bir çalışmada da 3-30 ng/yumurta dozunda aflatoksin verilen yumurtalarda mortalite %33, kalp anomalisi oranı %12 ve vücut anomalilerinin sıklığı %0.04 olarak saptanmıştır (Jelinek ve Peterka, 1985).

2.2.2.3. Mutajenik Etki

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 proteinlerle kovalent bağlar oluşturarak DNA ve RNA'da mutasyonlar meydana gelebilmektedir (Haworth ve ark., 1989).

2.2.2.4. Karsinojenik Etki

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 insidensisinin İstanbul ve Trakya bölgesindekinden yaklaşık 4 kat daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Eser ve ark., 1978).

2.2.2.5. İmmunosupresif Etki

Aflatoksinler, Bursa fabricius ve timus'da 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 hücreyel bağışıklığın baskılanmasıyla organizma çeşitli enfeksiyonlara karşı daha duyarlı hale gelmektedir (Traş ve Baş, 1992).

2.2.3. Aflatoksikozisde Tanı

Aflatoksikozisde tanı; klinik bulgular, laboratuvar analizleri ve diğer bazı faktörlerin birlikte değerlendirilmesiyle ancak yapılabilir. Hayvanların küflü yemleri almalarından sonra karaciğer hasarı ve kanda pıhtılaşma bozukluğunu gösteren belirtiler ortaya çıkması, aflatoksinin zehirlenmelerine işaret sayılabilir. Ancak, hayvanların süt ve diğer verimlerinde giderek azalma, yemden faydalanma ve ağırlık kazancında düşme, bağışıklık sisteminin baskılanması sonucu bazı hastalıkların ön plana çıkmasıyla seyreden kronik olaylar genellikle gözden kaçabilir. Bu nedenlerle, kronik zehirlenmelerin tanısında hayvanlara verilen yem ve yem hammaddelerinin analizi kesin tanı için gereklidir. Aflatoksikozis, kanın pıhtılaşmasındaki bozukluktan dolayı pıhtılaşmayı engelleyen maddeler (warfarin, dikumarol), karaciğere olan etkilerinden dolayı karbon tetraklorür, pirazolidin alkaloidleri ve kömür katranı zehirlenmeleriyle karışabilir (Kaya ve ark., 1998).

2.2.4. Aflatoksinlerden Korunma

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., 1994; Raina ve ark., 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).

2.3. Çörek Otu (*Nigella sativa*)

Modern ilaç üretiminin olmadığı dönemlerde, hastalıkların tedavisinde bitkilerin çeşitli kısımlarındaki etkin maddeler ayrıştırılmadan bütün olarak kullanılıyordu. Günümüzde ilaç, kozmetik ve gıda sektöründe bitki kaynaklı ürünler, saflaştırılarak ve her maddenin özellikleri bilinerek kullanılmakta ve hammaddesi bitki olan ürünlere talep sürekli artmaktadır. Dünya Sağlık Teşkilatı'nın (WHO) tahminlerine göre dünya üzerinde 20.000'den fazla bitki türü tıbbi amaçlı kullanılmaktadır (Wagner ve Fransworth, 1990). Tıbbi amaçla kullanılan bitkilerden biri olan çörek otu, Ranunculaceae (Düğün çiçekleri) familyasından *Nigella sativa* türüdür. Bitkinin kapsül içerisindeki tohumu, besin olarak kullanılır (Baytop, 1984). Bitki, ismini tohumlarının siyah renginden almıştır. 'Nigella' kelimesi Latince siyahımsı anlamına gelen 'nigellus'dan türetilmiştir. *Nigella sativa* bitkisinin Türkçe karşılığı olarak çörek otu; kara çörek otu ve siyah kimyon isimleri ile de anılmaktadır (Baytop, 1984). Çörek otunun anavatanı Doğu Akdeniz ülkeleri, Doğu ve Güney Avrupa'dır. Çörek otu diğer ülkelere buradan yayılmıştır. Bu bitkinin ikinci vatanının Kuzey Afrika, Hindistan ve Türkiye olduğu söylenebilir. Bu bitki, Türkiye'de bilhassa Afyon, Burdur, Isparta, Kütahya ve Konya yörelerinde üretilmektedir (Baytop, 1984). Günümüzde Güney Avrupa, Rusya, Kuzey Afrika, Ortadoğu ülkeleri ve Hindistan'da çörek otu büyük ölçüde üretilmekte ve tüketilmektedir (Türker ve ark., 1997). Çörek otu, bu bölgelerde doğal tıbbi ilaç olarak 2000 yılı aşkın bir süredir tedavi amacıyla kullanılmaktadır.

Çörek otu tohumları, uçucu yağ (% 0,38-0,49), sabit yağ (% 30-40), protein (% 20-30), saponin, melantin, nigellin ve tanen içermektedir. Çörek otu tohumunun kimyasal içeriği, bitkinin hasat mevsimine, çeşidine ve yetiştirildiği iklime göre değişmektedir. Kahire yakınlarında yetiştirilen çörek otu tohumlarından elde edilen uçucu yağın, 67 bileşik ihtiva ettiği ve bu bileşenlerin miktarca en önemlilerinin p-simen, timokinon, a-pinen ve β-pinen olduğu belirlenmiştir (Wagner ve Fransworth, 1990). Ülkemizde yapılan bir araştırmada, çörek otu tohumlarında % 6,4 su, % 4 kül, % 32 yağ, % 20,2 ham protein, % 6,6 ham lif ve % 37,4 karbonhidrat bulunduğu; sabit yağın % 1,2 miristik, % 8,4 palmatik, % 2,9 stearik, % 17,9 oleik, % 60,8 linoleik, az miktarda araşidik ve % 1,7 eikosadienoik asitlerden

oluştugu bildirilmiştir (Nergiz ve Ötleş, 1993). Çörek otu tohumunda ayrıca az miktarda B1, B2 ve B6 vitamini; proteinlerin yapı taşı olan aminoasitler; iz elementler olarak bilinen ve organizmada pek çok önemli metabolik faaliyetlerde rol alan, besin ve su ile dışarıdan alınması gereken demir, kalsiyum, magnezyum, çinko ve selenyum gibi mineraller de vardır. Çörek otu tohumlarındaki etkin madde (kristal halinde) nigellon ancak 1959'da izole edilebilmiştir (Mahfouz ve EL-Dakhkhny, 1960).

Son zamanlarda yapılan klinik ve deneysel çalışmalar; çörek otu ekstraktlarının insektisid, bronkodilatör, immunomodülatif, antibakteriyel, hipotensif, koleretik, antitümöral, antifungal, antelmantik, antiastmatik gibi bir çok terapötik etkilerinin olduğunu göstermiştir (Aqel ve Shaheen, 1996; Hanafy ve Hatem, 1991; Mahfouz ve EL-Dakhkhny, 1960; Salomi ve ark., 1992). Çörek otunun etkin maddesi olan *Timokinon*'un aynı zamanda izole rat hepatositlerinde tetr-bütül hidroperoksid ile indüklenmiş oksidatif hasara karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu ve intrasellüler glutasyon üretimini artırdığı kantitatif olarak saptanmıştır (Daba ve Abdel-Rahman, 1998). Yapılan araştırmalarda, çörek otunun çeşitli kanser hücrelerini öldürdüğü ve tümöre özel antikörlerin üretimini uyardığı, ayrıca makrofaj hücrelerinin sayısı ve aktivasyonunda da artışa neden olduğu saptanmıştır (Swamy ve Tan, 2000; Medenica ve ark., 1993). Çörek otu ekstraktının kemik iliğinde bağışıklık sistemi ile ilgili hücrelerin sayılarında artışa neden olduğu, ayrıca myelopoezisi uyardığı gösterilmiştir (Medenica ve ark., 1993). Çörek otunun normal hücrelere toksik etkisinin olmadığı da belirlenmiştir (Medenica ve ark., 1993). Çörek otu tohumunda bulunan β -sitosterol'un vücutta salgı aktivitesini artırdığı ve kandaki kolesterol seviyesini düşürdüğü, prostat büyümesinde tedavi edici özellikte olduğu belirtilmiştir (Şener ve ark, 1985). Çörek otunun uçucu yağ asitlerinin; bakteri, mantar ve halk arasında şerit olarak bilinen sestodlara karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Rathee ve ark., 1982; Akhtar ve Riffat, 1991). Çörek otu tohumunun hastalığa yol açan mikroorganizmalara karşı etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, bu bitkinin farklı yoğunluklardaki (100, 200, 400 ug/disk) ekstraktlarının; *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *E. Coli* ve *Candida albicans* gibi hastalık etkeni mikroorganizmalar üzerinde denenmiş ve çörek otunun *Staphylococcus aureus*'un gelişimini durdurduğu, ancak diğer mikroorganizmalar üzerinde etkili olmadığı tespit edilmiştir (Ağaoğlu ve ark., 1999).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Aflatoksinin Yeme Katılması

Aflatoksin bulundurmadığı belirlenen ticari yeme AFB1 karıştırılarak pelet yem hazırlandı ve kurutuldu. Bu amaçla hayvanların günlük yem tüketimleri belirlendi. Bir ratın günlük olarak yaklaşık 20gr yem tükettiği saptandı. Dolayısıyla projenin çalışma grubunda kullanılan 50 rat günlük olarak 1kg yem tüketmektedir. 10 gündeki toplam yem tüketimi 10kg'dır. AFB1'in yeme karıştırılması, pelet yem hazırlanması ve kurutulması işlemlerinin daha kolay gerçekleştirilmesi için 10'ar gün arayla, aynı bir dönemde 10kg yeme AFB1 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 belirlendi. Şöyle ki; ratlarda karaciğer kanseri oluşması için en az 100-150 mikrogram/kg/gün dozda AFB1 verilmesinin gerektiği belirtilmektedir (Ellis ve ark., 1991). Dolayısıyla bir ratın günlük olarak alması gereken en düşük toksik doz yaklaşık olarak 30-40 mikrogramdır. Bu nedenle 10kg yeme, bir ratın günlük olarak yaklaşık 20gr yem tükettiği dikkate alınarak, 20mg AFB1 katıldı. Bitki materyali olarak çörek otu tohumları kullanıldı. Tohumların uçucu yağı ekstraksiyon cihazında elde edildi (Akbay ve ark., 1993).

3.2. Deney Hayvanları

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

3.3. Deneme Şeması

Deneme 3 ay olarak uygulandı. 30 adet rat, A, B ve C olmak üzere 10'arlı 3 gruba ayrıldı. Graplardan biri kontrol grubu (A) olarak sadece standart rat pelet yemle beslendi. Diğer 2 grup ise çalışma grubu olarak belirlendi ve çalışma grubundaki bütün ratlar, yaklaşık olarak 100-150 mikrogram/kg/gün dozda AFB1 alacak şekilde, AFB1 katılarak hazırlanmış pelet yemle beslendiler. Çalışma grubundaki ratlardan B grubu

(AFB1) sadece AFB1’li yem alırken, C grubuna (AFB1+ÇOT) çörek otu tohumlarının uçucu yağı 2 ml/kg/3 gün dozda intraperitoneal yolla verildi. Çalışmaya başlamadan önce bütün gruplardaki ratların canlı ağırlıkları belirlendi. Ayrıca çalışma süresi boyunca da 30’ar gün arayla ratların canlı ağırlıkları saptanarak kaydedildi.

3.4. Yapılan Analiz ve İncelemeler

3.4.1. Biyokimyasal Analizler

Denemenin 90. gününde ratlardan biyokimyasal analizler için usulüne uygun olarak tüplere kan alındı. Kan örneklerinde Malondialdehide (MDA), Glutathione peroxidase (GSH-px), Glutation-S-transferaz (GST), süperoksit dismutaz (SOD) ile Alanine transaminaze (ALT) ve Aspartat transaminaze (AST) enzim aktiviteleri kitlerle belirlendi. Ayrıca MDA, GSH-px, SOD ve GST’lerin karaciğer dokusundaki düzeyleri de belirlendi.

Serum enzimleri düzeylerinin analizi: Deneme sonunda, sıçanlar dietil eter solundurularak bayıltıldı ve 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 seviyeleri kit (DPC; Diagnostic Products Corporation, CA 90045, USA) kullanılmak suretiyle otoanalizörde (BM/HITACHI-911) ölçüldü.

3.4.2. 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.

3.4.3. Histopatolojik İnceleme

90. günde tüm ratların ötenazi sonrası nekropsileri yapılarak karaciğerde gözlenen makroskobik bulgular kaydedildi. Alınan doku örnekleri %10'luk tamponlu formalin'de tespit edildikten sonra parafin bloklara gömülerek mikrotomla 4µm'lik kesitler alındı. Kesitler hematoksilin-eozin, Masson's trichrom ve Sudan black boyaları ile boyanarak araştırma mikroskobunda incelendi.

3.4.4. İmmunohistokimyasal İnceleme

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, immunperoksidaz metoduna göre boyanarak araştırma mikroskobunda incelendi.

İmmunperoksidaz inceleme için parafin bloklardan hazırlanan kesitler adeziv lamalar üzerine alındıktan sonra, ksilol ve alkol serilerinden geçirildi. Antijen retrieval solüsyonuna (sitrata buffer) konulup üzeri kapatıldıktan sonra 20 dakika süreyle ikişer kez ısıya tabi tutuldu. Fırından çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi. Kesitler PBS (phosphate buffer solution) ile yıkandıktan sonra % 3'lük H₂O₂ de 10 dakika tutularak endojen peroksidaz inaktive edildi. Yeniden PBS ile yıkandıktan sonra 10 dakika protein bloking ile bloke edildi. Her bir doku kesitine p53, ASMA, AFP ve CEA serumundan (primer antikorlar) damlatılıp 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 karbazol) kromojen damlatılarak kromojeni almasına göre 5-10 dakika bekletildi. Zemin boyanması için Mayer's hematoksilinde 1-2 dk bekletilip zeminin boyayı almasından sonra musluk suyunda yıkandı. Sulu bir yapıştırıcı kullanılarak lamelle kapatıldı.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

Deneme sonrasındaki eritrosit GSH ve MDA seviyeleri, GST, SOD enzim aktiviteleri ile serum ALT ve AST enzim aktiviteleri kitlerle belirlendi. Çalışma sonuçları çizelge 1’de sunuldu. Çizelge 1’de görüleceği gibi farklı uygulamalar sonrası, kan GSH, MDA, GST, SOD ile serum enzim (ALT, AST) aktivite düzeylerinde önemli değişimler saptandı.

Çizelge 1. Alfatoksin ve çörek otu tohumu ekstraktının ratların kan ve karaciğer dokusu biyokimyasal parametreler üzerine etkileri

Parametreler	KONTROL	AFB1	AFB1 AFB1+ÇOT
	X ± SD	X ± SD	X ± SD
AST U/L Serum	161,5±39,2	248,5±66,6*	273,5±78,8*
ALT U/L Serum	43,0±9,1	115,5±27,7*	102,3±48,5*
GSH mg/ml Eritrosit	39,5±0,84	38,8±1,0	39,2±1,3
MDA nmol/ml Eritrosit	0,39±0,08	0,69±0,2	0,49±0,2
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	428,2±12,8
GSH mg/g Doku	27,5±2,1	21,8±0,5*	27,04±1,6
MDA nmol/ g Doku	35,4±3,04	73,7±13,8*	60,2±9,6
GST U/ g Doku	8,8±1,2	8,7±2,7	9,7±1,1
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

Kan GSH verilerinin, çizelge 1’in incelenmesinde grup B (AFB1)’nin karaciğer dokusu dışında, kontrol grubuna göre tüm uygulama gruplarında istatistiki açıdan önemli oranda değişmediği (p>0.05) görülmektedir. Kan MDA verilerinin, çizelge 1’in

incelenmesinde, kontrol grubuna göre AFB1 (B grubu) uygulanan grupta MDA'nın hem kan hem de karaciğer dokusunda daha yüksek düzeye sahip olduğu ve aradaki farkın istatistiksel olarak $p < 0,02$ düzeyinde önemli olduğu görülmektedir. AFB1+ÇOT, kontrol grubuyla karşılaştırılmasında, kan MDA düzeyi kontrollere göre biraz daha yüksek olmasına rağmen istatistiki bakımdan önemli bir düzeye ($p > 0,05$) ulaşmadı. Kan GST aktivite düzeylerinin, çizelge 1'in incelenmesinde, tüm çalışma uygulamalarında kontrol grubuna göre önemli oranda artmadığı görülmektedir. Kontrol grubuna göre AFB1 grubunun kan GST enzim düzeyi yüksek çıkmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Serum enzimlerinden AST ve ALT düzeylerinin çizelge 1'in incelenmesinde, kontrol grubuna göre bütün uygulama gruplarında istatistiki açıdan önemli yüksek değişimler görülmektedir.

4.2. Ratların Canlı Ağırlık Sonuçları

Kontrol ve deneme gruplarının günlere göre canlı ağırlık ortalamaları ile standart hataları çizelge 2' de verildi.

Çizelge 2: 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 (AFB1) 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 (AFB1+ÇOT) X ± SD	330±4.2 a A	329±2.4 a AB	320±2.9 bc B	322±4.0 bc AB	324±2.9 b AB

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 ($P < 0,05$).

4.3. Makroskopik Bulgular

Kontrol ve deneme gruplarında AFB1 verilmeye başlanmasından 90. güne kadarki sürede ratlarda ölüm görülmedi.

Çalışmada, bütün gruplardaki ratların nekropsisinde, makroskopik değişimlere sadece grup B (AFB1)'de rastlandı. Bu gruptaki ratların nekropsisinde karaciğerlerin yer yer hafif solgun renkli olduğu, diğer organlarda ise belirgin bir değişikliğin olmadığı saptandı.

4.4. Histopatolojik Bulgular

4.4.1. Grup A (kontrol): Mikroskopik olarak karaciğerin normal histolojik görünümü saptandı (Şekil 1).

4.4.2. Grup B (AFB1): Histopatolojik incelemede, bu gruptaki bütün ratların karaciğerlerinde hemen hemen benzer değişimler gözlemlendi. Karaciğer lobçuklarının çoğunluğunda olmak üzere, özellikle periasiner ve intermedier bölgelerde, geniş odaklar halinde hepatositlerin sitoplazmasının granüler bir hal almasıyla karakterize bulanık şişkinlik ya da hidropik dejenerasyon belirlendi. Bu hepatositlerin genellikle çekirdekleri koyu boyanmış ve piknotikti. Çoğunlukla çevresindeki hepatositlerden belirgin bir şekilde ayrılan bu dejeneratif odakların genişliği lobçuğun 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 olduğu belirlendi. Kısmen normal görümlü hepatositlere genellikle periportal bölgelerde ve dejeneratif odaklar arasında kalan parankimde rastlandı, ancak bu bölgelerde de sıklıkla fokal nekrozlar şekillenmişti (Şekil 2-3). Bu alanlarda bazı hücrelerin çekirdekleri piknotik ya da karyoreksize, sitoplazmaları ise koyu eozinofilik boyanmış ya da lizize olmuştu. Genel olarak hepatositlerin çekirdeklerinin farklı büyüklüklerde olduğu ve farklı derecelerde boya aldığı, bazı hepatositlerin çift çekirdekli, kimi hepatositlerin ise belirgin 2-4 çekirdekçiğe sahip olduğu dikkati çekti. Ayrıca kimi dejeneratif hepatositlerin nükleuslarında marjinal hiperkromazi ve çekirdek içinin boş olduğu görüldü. Özellikle periportal bölgelerde olmak üzere dejeneratif bazı hepatositlerin hem sitoplazma hem de çekirdeğinin çok büyük ve anormal şekilli olduğu (megalositozis) gözlemlendi (Şekil 4). Ayrıca bazı dejeneratif hepatositlerde mitotik figürlere de rastlandı. Şiddetli dejenerasyonlar sonucu remark kordonlarının dizilişi bozulmuş, ayrıca bazı şiddetli

dejeneratif hücre odaklarının çevresindeki parankimde de kompressif atrofi şekillenmişti. Bazı venalarda ve sinüzoidlerde hiperemi, perisinüzoidal hücrelerde artış ve intrahepatik kolestazis gözlemlendi. 2 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. Grub C (AFB1+ÇOT): Bu gruptaki histopatolojik bulgular, AFB1 verilen grup B ile benzerlik göstermekteydi, ancak lezyonların şiddeti ve yaygınlığı belirgin olarak daha azdı. Şöyle ki, gruptaki hemen bütün ratların karaciğerlerinde, fakat bu karaciğerlerin çok daha az sayıdaki lobçuklarında dejenerasyonlu hücre topluluklarına rastlandı. Ayrıca bu odakların genişliği grup B'de olduğu gibi lobçuğun tümünü kapsayacak kadar yaygın değildi. Bu dejeneratif odaklar bazen lobçuğun yarısını etkileyecek kadar yaygın olmakla birlikte, çoğunlukla 10-15 ya da 20-30 hücreli dejeneratif hepatosit gruplarından oluşmaktaydı. Bu hücre gruplarında granüler dejenerasyon ya da şiddetli hidropik dejenerasyon oluşmuştu. Bu dejeneratif hepatosit grupları daha çok intramedier ve periportal bölgelerde lokalize olmuştu. Bu odaklar arasında yer alan kısmen normal görünümlü hepatositlerle birlikte bazen tek tük koyu eozinofilik sitoplazmalı ve piknotik çekirdekli nekrotik hepatositler ya da ince granüler dejenerasyonlu açık renkli dejeneratif hepatositler de gözlemlendi (Şekil 6). Ayrıca, çekirdekleri farklı büyüklüklerde ve marjinal hiperkromazi gösteren hepatositlerin varlığıyla birlikte, hem çekirdeği hem de sitoplazması büyük olan hepatositlere (megalositozis) 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.

4.5. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.5.1. Alpha-smooth Muscle Actin (ASMA): Özellikle çalışma gruplarında perisinüzoidal hücrelerde tek tük boyanmalar saptandı. Ancak bu hücrelerin sayısı özellikle grup B (AFB1)'de biraz daha belirgindi.

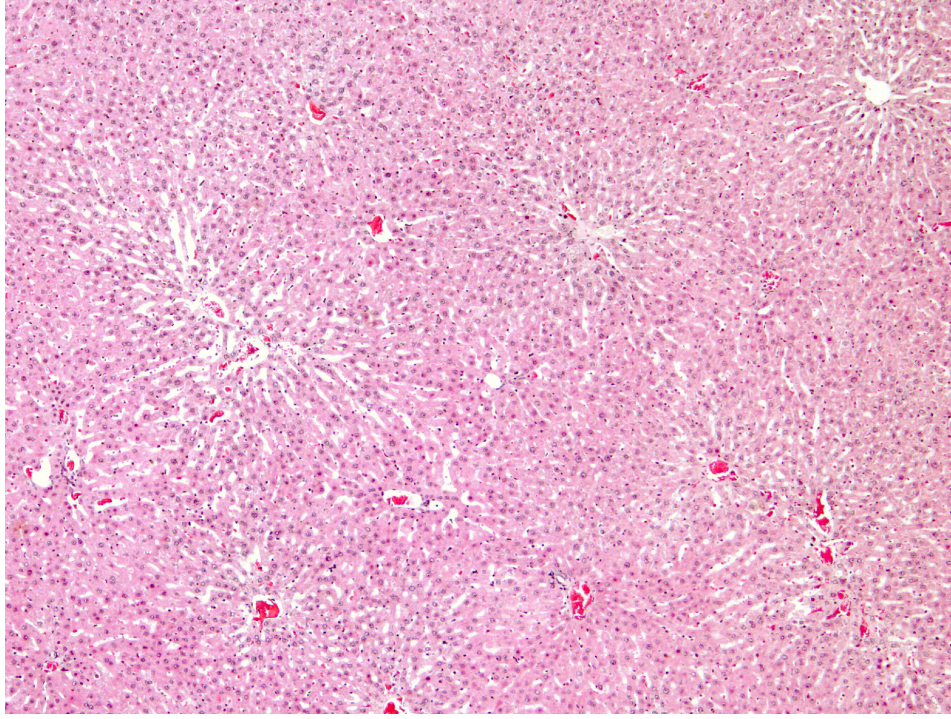
4.5.2. Alpha-fetoprotein (AFP): Fokal olarak, hepatositlerin sitoplazmasında, genellikle ince granüller şeklinde boyanma sadece grup B (AFB1)'de saptandı.

Boyanmalar zellike periasiner bölgedeki normal görünümlü hepatositlerde, bazen de hidropik dejenerasyonlu hücre topluluklarının içindeki hepatositlerde gözlendi. Ancak dejeneratif hücrelerdeki boyanmalar daha zayıftı (Şekil 7).

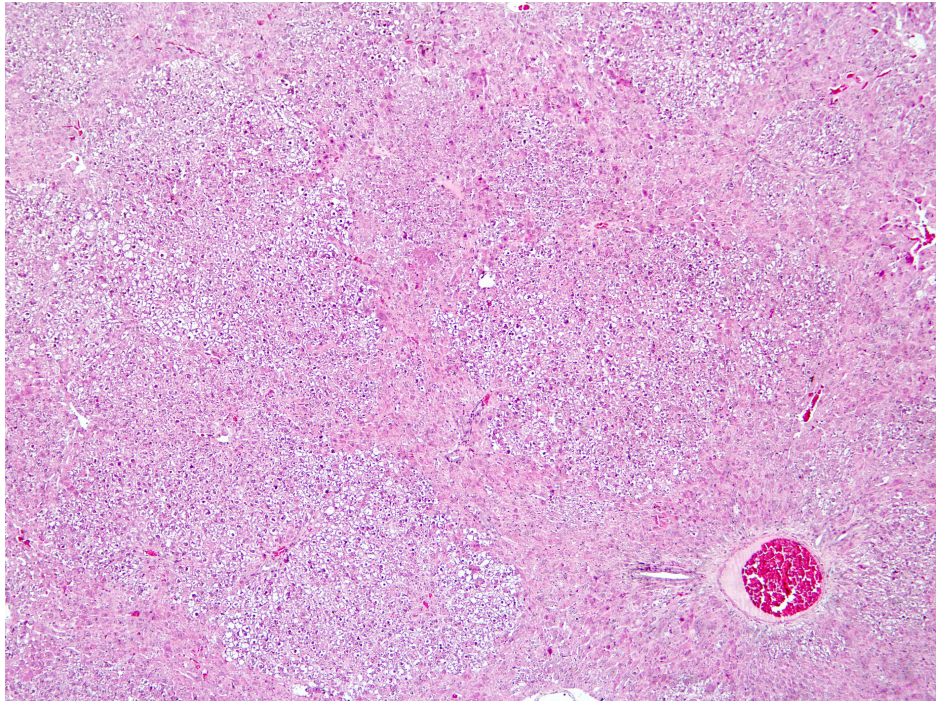
4.5.3. p53 Gen Proteini: Bütün grupta boyanma saptanmadı.

4.5.4. Karsinoembriyonik Antijen (CEA): Bütün grupta boyanma saptanmadı.

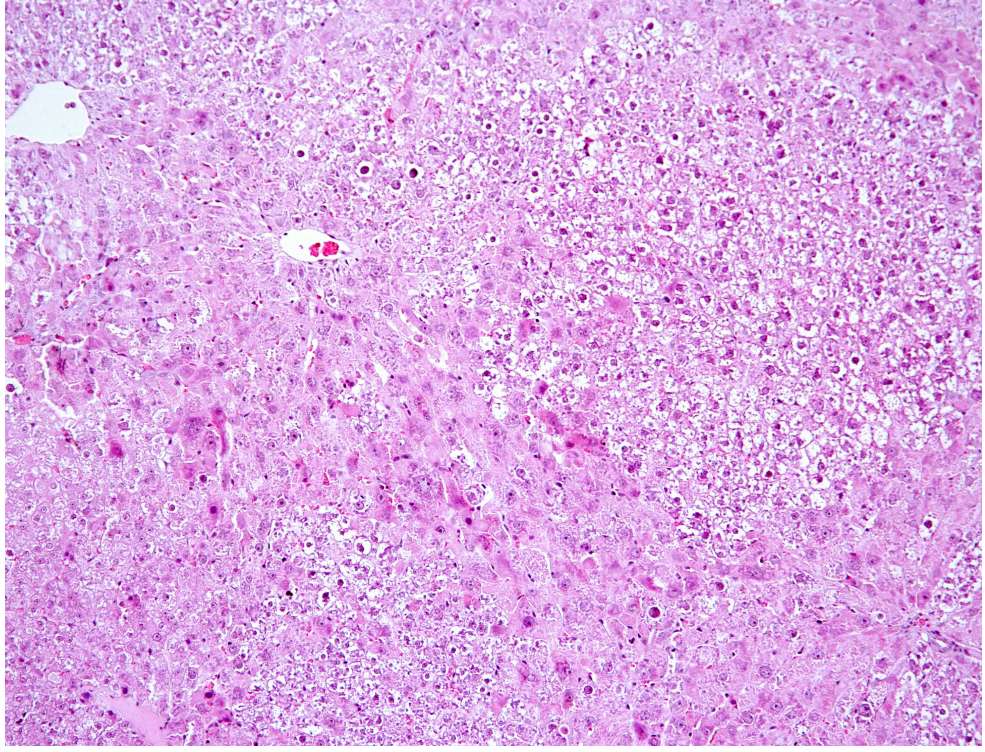
4.5.5. Mikroskopik Şekiller



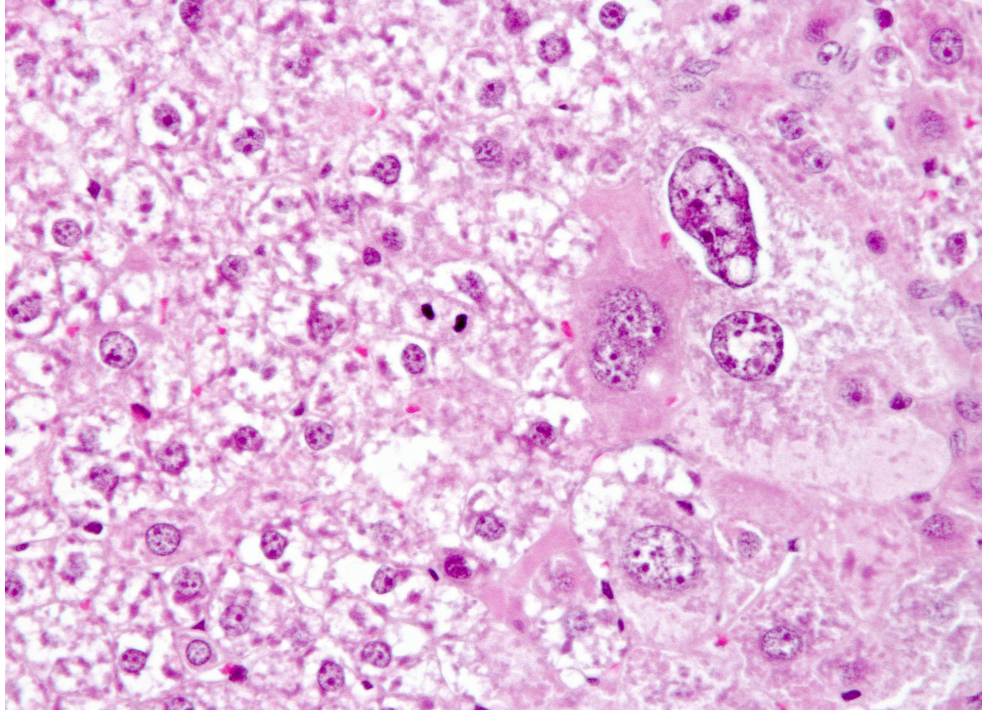
Şekil 1. Grup A (Kontrol): Karaciğerin normal histolojik görünümü, H.E. X 100.



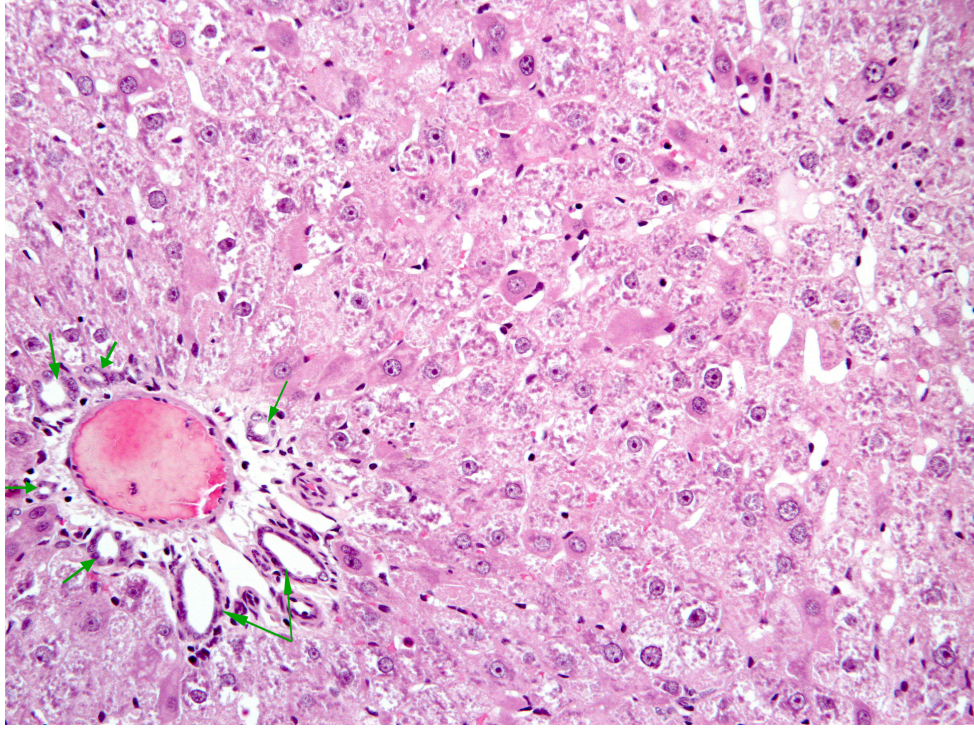
Şekil 2. Grup B (AFB1): Geniş odaklar halinde hepatositlerde dejenerasyon ve nekroz. H.E. x 50.



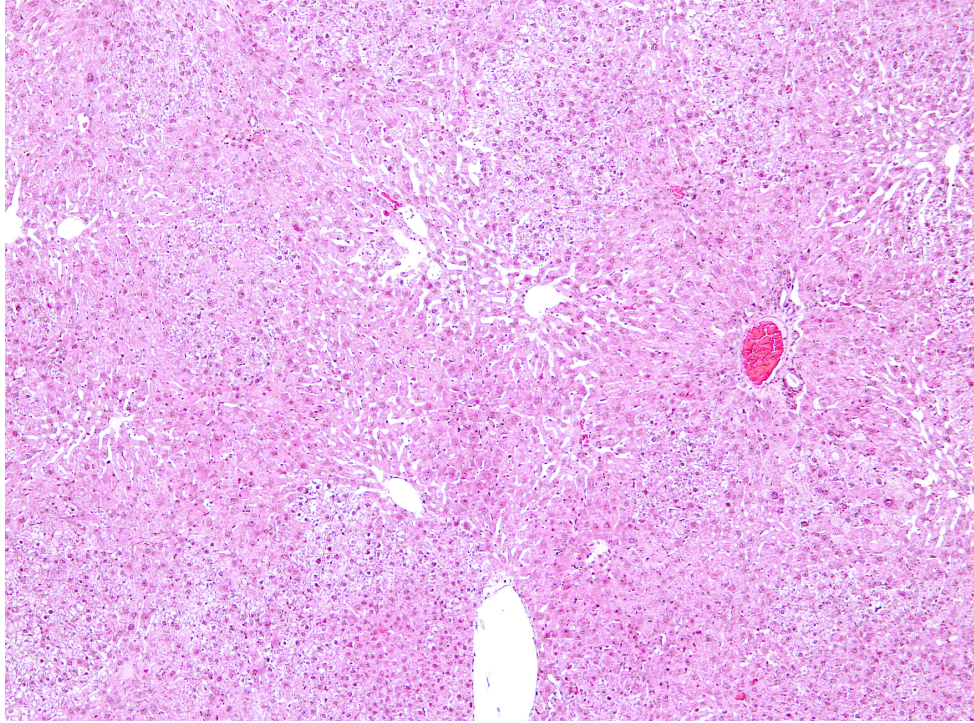
Şekil 3. Grup B (AFB1): Hepatositlerde dejenerasyon ve nekroz. H.E. x 200.



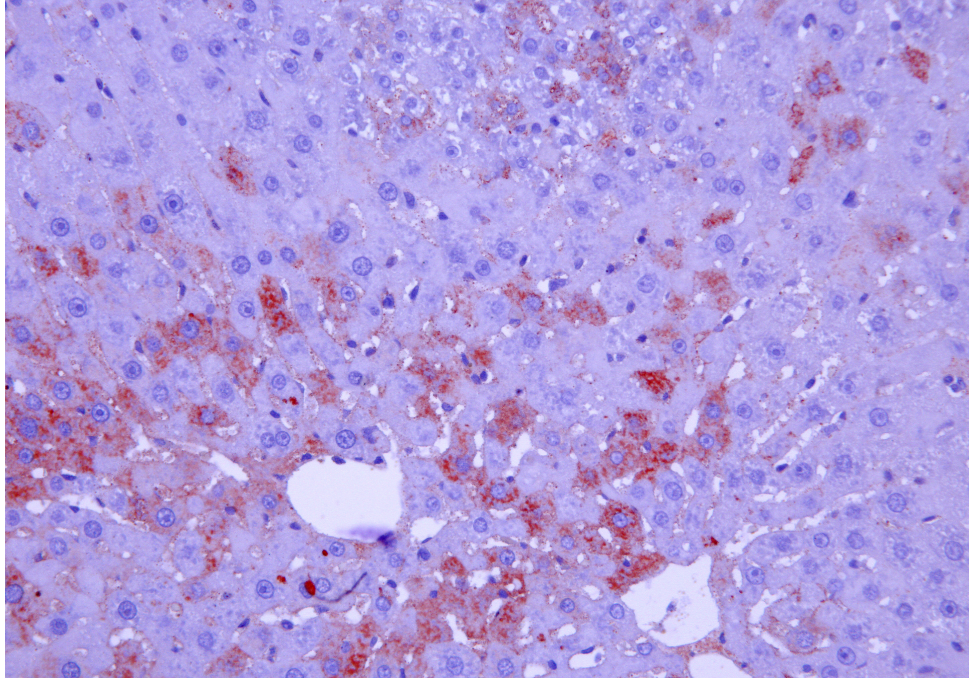
Şekil 4. Grup B (AFB1): Hepatositlerde dejenerasyon ve megalositik hepatositler. H.E. x 400.



Şekil 5. Grup B (AFB1): Portal bölgede normal safra kanalları (bitişik oklar) ve proliferatif safra kanalları (küçük oklar). H.E. x 320.



Şekil 6. Grup C (AFB1+ÇOT): Lobçuklarda dejeneratif hücre toplulukları ile parankimde bazı hepatositlerde nekroz ya da 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. Biyokimyasal Sonuçlar

Çeşitli faktörlerin etkisi (Radyasyon, ilaç toksikasyonları, kimyasal maddeler) veya çeşitli hastalıkların oluşumu ile birlikte serbest radikal üretiminde artış, buna bağlı olarak hücresel bileşiklerde çeşitli zararlı etkiler oluşmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Serbest radikaller, hücre savunma sisteminin koruyucu etkisini aşacak şekilde fazla meydana gelmeleri sonucunda metabolizmada zararlı etkilerini en hassas bileşikler olan lipitler üzerinde gösterirler. Hücresel membranların yapısında yer alan doymamış fosfolipidler ve kolesterol, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu meydana getirir (Niki, 1987). 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 (Yağı, 1994). Bu nedenlerle aktif oksijen ve serbest radikaller tarafından oluşturulan doku hasarını azaltmak amacıyla antioksidant supplementler ve antioksidantlar 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 salınımını uyardığı, bu serbest radikallerin kromozomlarda hasara neden olduğu saptandı (Amstad ve ark., 1984). Aflatoksikozise ilişkin olarak hücre ve dokularda görülen hasara bağlı olarak biyokimyasal değişikliklerden ALT, AST ve lipit peroksidasyon 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 ilişkili hepatotoksitede enzimatik olmayan lipid peroksidasyonunun yüksek

düzye gerçekteşmesi hücre membranlarında hassasiyet artışına ve hasara neden olmaktadır (Ravi ve ark., 2001; Shen ve ark., 1994). 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 ortamdaki 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, kan GSH verilerinin, çizelge 1'in incelenmesinde B (AFB1) grubunun karaciğer dokusu dışında, kontrol grubuna göre tüm uygulama gruplarında istatistiki açıdan ($p>0.05$) önemli oranda değişmediği görüldü. Bu sonuçlara göre AFB1 karaciğer toksisitesi meydana getirdiği, katkı maddelerinin ise bu toksisiteyi engellediği sonucu ortaya çıkmaktadır. Çünkü GSH düşüşü kronik toksisitenin önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Yagi, 1994).

Kan MDA verilerinin, çizelge 1'in incelenmesinde kontrol grubuna göre AFB1 (B grubu) uygulanan grubun, hem kan hem de karaciğer dokusunda daha yüksek MDA düzeyine sahip olduğu ve aradaki farkın istatistiksel olarak $p<0,02$ düzeyinde önemli olduğu saptandı. C grubu'nun (AFB1+ÇOT), kontrol grubuyla karşılaştırılmasında, kan MDA düzeyi kontrollere göre biraz daha yüksek olmasına rağmen istatistiki bakımdan önemli bir düzye ($p>0.05$) ulaşmadı. Aflatoksikozis'de, ÇOT'nun etkisinin araştırıldığı

çalışmada, kan ve karaciğer MDA düzeylerinde artışa bağlı olarak glutatyon düzeyindeki artış önemli bir düzeyde ($p>0.05$) olmadı.

Kan GST aktivite düzeylerinin, çizelge 1'in incelenmesinde, tüm çalışma gruplarında kontrol grubuna göre önemli oranda artmadığı gözlemlendi. Kontrol grubuna göre B (AFB1) grubunun kan 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 1'in incelenmesinde tüm çalışma uygulamalarında kontrol grubuna göre önemli oranda artmadığı gözlemlendi. Kontrol grubuna göre, B (AFB1) grubunun kan GST enzim düzeyi yüksek çıkmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bu sonuçlara göre; AFB1'in sitotoksik ve karsinogenik etkilerinin özgün molekülden değil, 2-3 epoksit şekli ile muhtemelen de aflatoksin Q1, P1, M1 ve aflatoksikolun 2-3 epoksit metabolitlerinden kaynaklandığı söylenebilir (Karenlampi, 1987). Epoksit şeklindeki etkin metabolitlerin hepatik mikrozomal sitokrom P450'ye bağımlı karışık işlevli oksijenaz sistemi etkinliği ile özgün aflatoksinlerden sentezlendiği saptandı. Normal olarak epoksit şekilleri geçici ara ürün konumundadır, karaciğerde GSH-S transferaz enziminin katalizlenen tepkimeler sonunda glutatyon-S-hidrolaz ile konjuge edilerek veya epoksit hidrataz enziminin aflatoksikole çevrilerek nispeten zehirsiz metabolitlere çevrilir (Karenlampi, 1987; Hatch ve ark., 1988). Ancak uzun süre veya fazla miktarda aflatoksin alınması halinde açıklanan detoksifikasyon mekanizması yetersiz kalır. Aynı enzim sistemlerince detoksifiye edilebilen besinsel kaynaklı diğer maddelerin fazlaca alınması halinde çok yönlü etkileşimlerin gerçekleşmesi ve enzimatik detoksifikasyon eşiğinin aşılması nedeniyle epoksit türevleri şekillenme oranı ve toksisite riski daha da artar (Hatch ve ark., 1988).

Aflatoksinlerin 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 düşünceyi destekler niteliktedir. Diğer yandan; bir kısım araştırmacılar (Karenlampi, 1987; Hatch, 1988; Oğuz, 1997) tarafından aflatoksinlerin karaciğerde GSH-S transferaz enziminin katalizlenen tepkimeler sonunda GSH ile konjuge edilerek veya epoksit hidrataz enziminin katalizlediği aflatoksikole çevrilerek nispeten zehirsiz metabolitlere dönüştürüldüğü, fakat uzun süre veya fazla miktarda aflatoksin alınması halinde açıklanan detoksifikasyon mekanizmasının yetersiz kaldığı ve enzimatik detoksifikasyon eşliğinin aşılması sonucu detoksifiye edilemeyen aflatoksin metabolitlerinin toksikasyonu oluşturduğu kaydedilmektedir.

Karaciğer SOD aktivite düzeylerinin, çizelge 1'in incelenmesinde; çalışma uygulamalarından B grubu (AFB1) kontrol grubuna göre önemli oranda azalırken $P < 0.05$), kan SOD aktivitesi ise B ve C gruplarında arttığı görülmekte ve fakat SOD enzim düzeyi farkı istatistiksel olarak 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 sayılabilir. SOD aktivitesindeki artış ise süperoksit radikalının aşırı üretiminden dolayı bu enzimin inaktif formlarının aktivasyonundan kaynaklandığını düşünebiliriz. Diğer gruplarda ise antioksidant etkileri sonucunda süperoksit radikal oluşumunun baskılandığı söylenebilir.

Serum enzimlerinden AST ve ALT düzeylerinin çizelge 1'de incelenmesinde kontrol grubuna göre bütün uygulama gruplarında istatistiki 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 seruma 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 (Yağı, 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 ise AFB1'in toksik etkileri sonucu karaciğerin metabolizma faaliyetinde meydana gelen değişmelerin bir sonucu olabilir.

Bu biyokimyasal verilerin doğrultusunda, sonuç olarak, AFB1'in rat karaciğerlerinde meydana getirmiş olduğu hasara bağlı olarak serum enzimlerinin arttığı ve serbest radikal üretimi sonucu lipid peroksidasyonun meydana geldiği, fakat uygulanan ÇOT'nun antioksidant etkisi sayesinde lipid peroksidasyonun, dolayısıyla karaciğer hasarının kısmen de olsa engellendiği söylenebilir.

5.2. 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), farelerde de doz ve süreye bağlı olarak % 37-55 arasında canlı ağırlıklarda azalmanın gözlemlendiği belirtilmektedir (Tuzcu, 1999). Bu çalışmada da, çizelge 2'de 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+ÇOT)'de ise başlangıca göre anlamlı bir değişikliğin olmadığı ($P>0.05$) belirlendi. Çizelge 2'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+ÇOT)'de ise uygulanan bitki ekstraktının karaciğer hasarını kısmen de olsa önlemesine bağlı olarak, başlangıç canlı ağırlıklarını muhafaza ettikleri söylenebilir. Deneme başlangıcında canlı ağırlıkları genelde birbirine yakın olan grupların deneme süresince yapılan farklı uygulamalara bağlı olarak canlı ağırlıklarının farklılaştığı ve deneme sonunda çörek otu ekstraktı verilen grup C'nin grup A (kontrol) ve grup B (AFB1) arasında bir aralıkta yer aldığı belirlendi. Ancak grup C (AFB1+ÇOT)'ye ait deneme başı canlı ağırlık değerinin düşük oluşu, deneme sonu ağırlıklarını da etkilemiş olma ihtimalinden dolayı bu sonuç daha dikkatli bir şekilde yorumlanması gerekmektedir.

5.3. Makroskobik 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). Çalışmada sadece AFB1 verilen (Grup B) ratlarda makroskobik lezyonların hafif olarak sadece karaciğerlerde saptanması, diğer organlarda herhangi bir makroskobik lezyonun görülmemesi uygulanan AFB1'in dozu ve süresiyle ilgili olabileceği kanısındayız. Nitekim çalışmamızda ratlara verilen AFB1 miktarı (100-150 mikrogram/kg/gün) düşük toksik dozdur. Bu doz ratlarda 12 ile 24 ay içinde karaciğer kanseri oluşturulması için önerilen AFB1 dozudur (Ellis ve ark., 1991). Grup C (AFB1+ÇOT) rat karaciğerlerinde makroskobik olarak bir değişikliğin bulunmaması, ratlara verilen ÇOT ekstraktının koruyucu etkisiyle grup B'deki kadar karaciğerlerde şiddetli dejeneratif ve nekrotik değişimlerin oluşmadığına yorumlanabilir.

5.4. Mikroskobik Bulgular

AFB1'in toksisite ve karsinojenik etkilerinin ortaya çıkışında, özellikle hepatik mikrozomal stokrom P450'ye bağımlı kompleks fonksiyonlu oksijenaz enzim sisteminde özgün aflatoksin mleküllerinin metabolize edilmesiyle oluşan epoksit türevlerinin çok önemli rol oynadığı belirtilmektedir (Zachary ve ark., 1980). Bu epoksit metabolitlerin hücresel nükleoproteinler ve nükleik asitler gibi makromoleküllere bağlanarak RNA, enzim ve protein sentezinin inhibe edilmesi, ve sonuçta hücre bütünlüğünün bozulmasının gerçekleştiği kaydedilmektedir (Zachary ve ark., 1980; Hatch, 1988). Bu enzim sistemlerinin (hepatik mikrozomal stokrom P450) 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 sentrilobüler bölgede, daha sonra da intermedier bölgelerde ortaya çıktığı gözlemlendi. Bu bulgular, yani aflatoksikozis olgularında lezyonların özellikle sentrilobüler 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), 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 (Tuzcu, 1999; 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), ve ayrıca sentrilobuler venlerin bağ doku üremesiyle tıkandığı 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 ve böbreklerin mikroskopik incelenmesinde yukarıda belirtilen bulgular saptanmadı, bunun da deney hayvanlarına verilen AFB1'in dozu ve süresiyle ilgili olabileceği kanısındayız.

Sunulan bu çalışmada; AFB1 ve ÇOT 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 ÇOT'nun 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 terapötik özelliklerinin de bu hepatoprotektif etkilerine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Nitekim bu bitkinin, bu özellikleriyle ilgili olarak aşağıda görüleceği gibi son yıllarda birçok çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

İncelenemediği kadarıyla, ratlarda aflatoksikozisle oluşturulan karaciğer hasarının engellenmesine ilişkin çörek otu'nun koruyucu etkinliği sadece bir çalışmada (Abdel-Wahhab ve Aly, 2005) ve biyokimyasal olarak araştırılmıştır. Söz konusu çalışmada araştırmacılar, aflatoksikozisle oluşan serbest radikalleri, çörek otu'nun antioksidant özelliğiyle temizleyerek karaciğer hasarını engellediğini belirtmişlerdir.

Ratlarda CCl_4 ile oluşturulan fibrozisde, çörek otu ve ısırgan otu tohum ekstraktlarının fibrozisi engellediğini, antifibrotik etkinin bu bitkilerin antioksidant ve immunomodulator özellikleriyle ilgili olabileceği belirtilmiştir (Türkdoğan ve ark., 2003). Yine ratlarda CCl_4 ile oluşturulan fibrozisde, çörek otu ve ısırgan otu tohum ekstraktlarının lipid peroksidasyonu ve karaciğer enzimlerini (AST, ALT) azalttığı, antioksidant savunma sistemi aktivitesini ise artırdığı kaydedilmiş ve bu bitkilerin hepatoprotektif etkiye sahip oldukları belirtilmiştir (Kanter ve ark., 2005). Meral ve ark. (2001) deneysel olarak tavşanlarda oluşturdukları diabette, çörek otu uygulamasının, antioksidant savunma sistemi aktivitesini artırarak ve lipid peroksidasyonu ise azaltarak, karaciğer hasarını engellediğini kaydetmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada da, izole rat hepatositlerinde çörek otu'nun oksidatif hasara karşı koruyucu özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Daba ve Abdel-Rahman, 1998). Houghton ve ark (1995) çörek otu tohumu ekstraktının lipid peroksidasyonu ve lökositlerde eicosanoid (yangının bir lipid mediatörü) generasyonu inhibe ettiğini, dolayısıyla bu bitkinin yangısal ve romatizmal hastalıklarda etkili olabileceğini kaydetmişlerdir. Çörek otunun antikanserojen özellikleriyle ilgili olarak yapılan çalışmalarda da; ratlarda deneysel olarak 1,2-dimethylhydrazine ile indüklenen kolon kanseri için preneoplastik lezyonların, çörek otu tohumu ekstraktının oral olarak verilmesiyle engellendiği (EL-Sayed ve Salim, 2003), çörek otu tohumlarının uçucu yağında bulunan ve önemli aktif komponent olan "*Thymoquinone*" kolon kanseri hücreleri üzerinde kemoterapötik etkinliğinin olduğu (Norwood ve ark., 2006), ayrıca ratlarda 7,12-di-methylbenz(a)anthracene (DMBA) ile

indüklenen meme karsinomunda, DMBA'nın karsinogenezis etkisini azalttığı ve koruyucu bir rôle sahip olduğu (El-Aziz ve ark., 2005) kaydedilmiştir.

Çörek otunun immun sistemi aktive etmesiyle ilgili yapılmış bir araştırmada, insanlarda günde 2g çörek otu alımının natural killer (NK) hücre aktivitesini ortalama %74 oranında artırdığı ve T helper (T₄) hücrelerin T suppressor (T₈) hücrelere oranını da %72 oranında artırdığı bildirilmiştir (Elkadı ve Kandıl, 1987). Türkdogan 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 ekstraktlarının verildiği gruplarda 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

5.5.1. 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). Türkdogan 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 (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.

5.5.2. Alpha-fetoprotein (AFP)

AFP, normal olarak sadece fetal karaciğerlerin sitoplazmasında bulunan, olgunlaşmış ve normal dokularda bulunmayan bir 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 hepatitlerde 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 B (AFB1) dışındaki çalışma grupların karaciğerlerinde de, daha az olmakla birlikte, değişen oranlarda nekroz ve dejenerasyon gözlenmesine rağmen AFP immunohistokimyasal olarak saptanmadı. Bu sonuçlar doğrultusunda; AFB1 uygulamasının Grup B (AFB1) rat karaciğer hepatositlerinde kısmen de olsa AFP sentezini indüklediği, AFB1+ÇOT ekstraktı verilen grupta ise bu değişimin engellendiği söylenebilir, ancak daha sağlıklı bir sonuca ulaşmak için bu konu üzerinde daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

5.5.3. p53 Gen Proteini

p53, hücre siklusunun kontrolünde önemli rol oynayan nükleer nonhiston bir proteindir. Bu protein DNA yıkımlanması durumlarında, DNA tamir aktivitesini kolaylaştırır. Tümörlerde anormal hücre siklusu DNA tamirine zarar verip, potansiyel mutasyonları artırarak 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 immunhistokimyasal olarak bu protein saptanamadı.

5.5.4. Karsinoembriyonik Antijen (CEA)

CEA, fötüsün gelişmesi sırasında normal olarak üretilen ve vücudun yeni hücreler yapması için ihtiyaç duyulan bir glikoproteindir. Bu protein fötüste birçok 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 saptanamadı.

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, ÇOT ekstraktının hepatoprotektif etkisinin araştırıldığı bu çalışmada; biyokimyasal ve histopatolojik bulgular doğrultusunda, ÇOT'nun antioksidant etkisi sayesinde lipid peroksidasyonun, dolayısıyla karaciğer hasarının kısmen de olsa engellendiği gözlemlendi. Ayrıca immunohistokimyasal olarak AFP'nin, ÇOT ekstraktı verilen grupta belirlenememesi, fakat sadece AFB1 verilen grupta saptanması oldukça anlamlı bulunmuş ve bu bitkinin antikanserojen etkisi konusunda bir fikir oluşturmuştur. 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 etkisinin varlığı daha net bir şekilde ortaya konabileceği kanısındayız. Bu nedenlerle, bu çalışmanın, bu konuda daha sonraki yapılacak çalışmalara büyük katkısının olacağı ve temel oluşturacağı düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

- Abdel-Wahhab M, Aly SE (2005). Antioxidant property of *Nigella sativa* (black cumin) and *Syzygium aromaticum* (clove) in rats during aflatoxicosis. *J Appl Toxicol.*, 25, 218-23.
- Adams AC (1983). Moulds mycotoxins. *The feed compounder*, 5, 24-27.
- Ağaoğlu S, Berktaş M, Güdücüoğlu H (1999). Çörek Otu (*Nigella sativa*) Tohumunun Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Bir Araştırma, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bil. Derg.*, 5, 15-17.
- Akhtar MS, Riffat S (1991). Field Trial of *Saussurea lappa* Roots Against Nematodes and *Nigella sativa* Seeds Against Cestodes in Children. *J. Pak. Med. Assoc.*, 41, 185-187.
- Akkuş İ (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza Yayınları*, Konya.
- Amstad P, Levy A, Emerit I, Cerutti P (1984). Evidence for membrane mediated chromosomal damage by aflatoxin b₁ in human lymphocytes. *Carcinogenesis*, 5, 719-723.
- Baytop T (1984). Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, İ.Ü. Yayınları No:3255, İstanbul,
- Bettini G, Marcato P S (1992). Primary hepatic tumours in cattle: A Classification of 66 Cases. *J. Comp. Pathol*, 107, 19-34.
- Bilgiç N (1992). Akut aflatoksikosis olaylarında patolojik bulgular. *Türk Vet. Hek. Derg.*, 4, 38-40.
- Bilgiç N, Yeşildere T (1992). Cıvcivlerde deneysel aflatoksikosisde böbrek lezyonları. *İ Ü. Vet. Fak. Derg.*, 18, 102-108.
- Brumm C, Schulze C, Charels K, Morohoshi T, Klöppel G (1989). The significance of alpha-fetoprotein and other tumour markers in differential immunocytochemistry of primary liver tumours. *Histopathology*, 14, 503-513.
- Campbell TC, Hayes JR (1976). The Role of aflatoxin metabolism in toxic lesion. *Toxic Appl. Pharm.*, 35,199-222.
- Cassand P, Decoudu S, Leveque F, Daubeze M, Narbonne JF (1993). Effect of vitamin e dietary intake on in vitro activation of aflatoxin B1. *Mutat. Res.*, 319, 309-316.
- Chen J, Goetchius M, Combs G 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, Kuhajda FP. (1989). Immunoperoxidase staining as a diagnostic aid for hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol*, 2, 8-12.

Daba MH, Abdel-Rahman MS (1998). Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Lett*, 95, 23-29.

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

Davila J, Edds G, Osuna O, Simpson C (1983). Modification of the effects of aflatoxin b1 and warfarin in young pigs given selenium. *Am. J. Vet. Res*, 44, 1877-1883.

Demirer AM, Dinçer B, Kaymaz Ş, Yalçın S, Özer E (1989). Bazı gıda maddelerinde mycoflora ve mycotoxin araştırmaları. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg*, 36, 85-107.

EL-Aziz MA, Hassan HA, Mohamed MH, Meki AR, Abdel-Ghaffar SK, Hussein MR (2005). The biochemical and morphological alterations following administration of melatonin, retinoic acid and *Nigella sativa* in mammary carcinoma: an animal model. *Int J Exp Pathol*. 86, 383-96.

El-kadi A, Kandil O (1997). The Black Seed (*Nigella sativa*) As a Natural Immune Enhancer (Abstract) First International Conference on Scientific Miracles of Quran and Sunnah, Islamabad, Pakistan.

Ellis OW, Smith JP, Simpson BK (1991). Aflatoxin in food: occurrence, biosynthesis, effects on organism, detection, and methods of control. *Crit. Rev.Food Sci.Nut*, 30, 403-439.

El-sayed I, Salim SF (2003). Chemopreventive Potential of Volatile Oil From Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Seeds Against Rat Colon Carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, 45, 195-202.

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

Eser SR, Kumova B, Sivas S (1978). Bulgurlara aflatoksin bulaşması ve karaciğer kanseri ile ilişkisi. *Cerrahpaşa Tıp Fak. Derg*, 9, 222-228.

Espada Y, Domingo M, Gomez J, Calvo MA (1992). Pathological lesions following and experimental intoxication with aflatoxin b1 in broiler chickens, *Res. Vet. Sci*, 53, 275-279.

Gablík J, Schaeffer W, Friedman L, Wogan G (1965). Effect of Aflatoxin B1 on Cell Cultures. *J.Bacteriol*, 90, 720-723.

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.

Glahn RP, Beers KW, Bottje WG, Wideman RF, Thomas W (1991). Aflatoxicosis alters avian renal function, calcium and vitamin d metabolism. *J. Tox. Env. Health*, 34, 309-321.

- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989). Free radicals in biology and medicine. 2nd Reprint. Clarendon Pres, Oxford, Pp: 543, USA.
- Hamilton PB (1982). Mycotoxins and farm animals. *Refush Vet*, 39, 17-45.
- Hanafy MS, Hatem ME (1991). Studies on the Antimicrobial Activity of *Nigella sativa* Seed (Black cumin). *J. Ind. State Med. Assoc.*, 34, 275-278.
- Harvey R, Kubena L, Elissalde M (1994). Influence of vitamin e on aflatoxicosis in growing swine. *Am. J. Vet. Res*, 55, 572-577.
- Hatch RC (1988). Poison Causing Abdominal Distress of Liver or Kidney Damage, In: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Ed, Booth, N.H., McDonald, L.E., 6th Ed, Iowa State Univ. Press, Pp: 1114-1119. USA.
- Haworth SR, Lawlor TE, Zeiger E, Lee LS, Park DL (1989). Mutagenic potential of ammonia-related aflatoxin reaction products in a model system, *JAOCS*, 66, 102-104.
- Houghton PJ, Zarka R, De las Heras B, Hoult JRS (1995). Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Medica*, 61, 33-36.
- Hsieh D, Wong ZA, Wong JJ, Michas C, Rueber BH (1977). Comparative metabolism of aflatoxin, in: *mycotoxin in human and animal health*. Pathotox Publ. Inc. Pork Forest South, Illinois, Pp: 37-50, USA.
- Jelinek R, Peterka M (1985). Chick embryotoxicity screening test-130 substances tested. *Indian J. Exp. Biol*, 23, 588-595.
- Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N (1993). *Pathology of Domestic Animals*, Third Ed., Academic Press, San Diago, USA.
- Kaya S, Piriñçi İ, Traş B, Bilgili A, Baydan E, Akar F, Doğan, A (1998). Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji, *Medisan Yayınları*, Ankara, Türkiye, S: 341-375.
- Karenlampi OS (1987). Mechanism of cytotoxicity of aflatoxin B1. *Bioch. Biophys. Res. Com*, 145, 854-860.
- Lindsay DG (1981). Aflatoxin Residues in Animal Products, In: *Recent Advances in Animal Nutrition*, The Camelaff Press, Southampton, USA, ,1Pp: 53-165.
- Mahalingam RJ, Balachandran C, Punniamurhy N, Govinda S (1989). Pathology of Feeding Aflatoxin Detoxified Feed in Broiler Chickens. *Indian Vet. J*, 66, 1013-1015.
- Mahfouz M, El-dakhkhny M (1960). Isolation of a Crystalline Active Principle from *Nigella sativa* L. Seeds, *J. Pharmaco. Sci. U.A.R.*, 1, 1.

Marquez RN, Monroy-Basillo JN, Gonzalez-Salazar D, Hernandez IT (1993). Evaluation of the inactivation by ammonia of aflatoxin b₁ in maize using weight gain and histological studies in mice. *Tecnica-Pecuaria en Mexico*, 31,112-116.

Mayura K, Abdel-Wahhab AM, McKenzie SK, Sarr BA, Edwards FJ, Naguib K, Phillips DT (1998). Prevention of maternal and developmental toxicity in rats via dietary inclusion of common aflatoxin sorbets: potential for hidden risks. *Toxicol. Sci*, 41, 175-182.

Medenica R, Mukerjee S, Huschart T, Koffskey J, Corbit W (1993). Nigella sativa Plant Extract Increases Number and Activity of Immune Component Cell in Humans, *Exper. Hematol.*, 21, 1186.

Mehmetoğlu İ, Gürbilek M, Çağlayan O, Koçyiğit A (2002). *Klinik biyokimya laboratuvar el kitabı. İnci Ofset II. Baskı S:160. Ankara.*

Meral İ, Yener Z, Özbek H, Ustun R (2003). Effects of Nigella sativa L.on serum concentrations of thyroid hormones, thyroid stimulating hormone and glucose in alloxan-induced diabetic rabbit” *Irish Vet. J.*, 56, 462-464.

Miller JD (1995). Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product. *Res. J. Stored Prod. Res*, 31, 1-16.

Mollenhauer HH, Corrier DE, Huff WE, Kubena LF, Harvey RB, Droleskey RE (1989). Ultrastructure of hepatic and renal lesions in chickens fed aflatoxin. *Am. J. Vet. Res*, 50, 771-777.

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

Mulas JM, Monteros AE, Carrasco L, Niel M Fernandez A, Mulas JM, Monteros AE Van M (1995). Immunohistochemical distribution pattern of intermediate filament proteins in 50 feline neoplasms. *Vet. Pathol*, 32, 692-701.

Nakae D, Konishi Y, Farber JI (1987). A Role for oxygen radicals in the hepatotoxicity of aflatoxin b₁ and dimethyl nitrosamine. *Proc. Jap. Cancer Assoc*, 38.

Nergiz C, Ötleş S (1993). Chemical Composition of Nigella sativa L. Seeds, *Food Chem.*, 48, 259-261.

Netke S, Roomi M, Tsao C, 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, Sinnhuber RO (1981). Carcinogenicity of aflatoxin in Fisher 344 rats. *J. Natl. Cancer Inst*, 66, 1159-1163.

Nizamliöglu F, Gözün H (1996). Yemlerinde aflatoksin tespit edilen kanatlıların karaciğer ve böbreklerinde meydana gelen patolojik değişiklikler, Veterinarum, 7, 46-49.

Norwood AA, Tan M, May M, Tucci M, Benghuzzi H (2006). Comparison of potential chemotherapeutic agents, 5-fluoruracil, green tea, and thymoquinone on colon cancer cells. Biomed Sci Instrum, 42, 350-6,

Oğuz H (1997). Broiler yemine katılan polivinilpoliprolidon (pvpp)'un ve diğer bazı adsorbanlarla karışımlarının aflatoksikozise karşı koruyucu etkilerinin belirlenmesi. S. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim dalı Doktora Tezi, Konya.

Okoye JAO, Asuzu IU, Gugnani HC (1988). Paralysis and lameness associated with aflatoxicosis in broilers. Avian Pathol, 17, 731-734.

Raina V, 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.

Rajendran MP, Sundararajan S, Chennakesavalu M, Charles YS, Sundararaj A (1992). Clinico-pathology of aflatoxin toxicity in cattle. Indian Vet. J, 62, 115-117.

Rathee PS, Mishra SH, Kaushal R (1982). Antimicrobial Activity Essential Oil, Fixed Oil and Unsaponifiable Matter of Nigella sativa L, Indian J. Pharma. Sci., 44, 8-10.

Ravi R, Kumar S, 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.

Richard JL, Pier AC, Stubblefield RD, Shotwell OL, Lyon RL, Cuttlip RC (1983). Effect of feeding corn naturally contaminated with aflatoxin on feed efficiency, on physiologic, immunologic, and pathologic changes, and on tissue residues in steers. Am. J. Vet. Res, 44, 1294-1299.

Robb J (1993). Mycotoxins. In: *Practice*, November, 278-279.

Sahoo PK, Chattopadhyay SK, Johrp TS, Charan K, Sıkdar A (1991). Pathology of Experimental Aflatoxicosis in Rabbits. Indian J. Anim. Sci, 63, 268-273.

Salomi NJ, Nair SC, Jayawarahanan KK, Varghese C.D (1992). Antitumor Principles from Nigella sativa Seeds. Johns Hopkins Alumni, 63, 33-36.

Samarajeewa U, Sen AC, Cohen MD, Wei CI (1990). Detoxification of Aflatoxins in Foods and Feeds by Physical and Chemical Methods. J. Food. Prot, 53, 489-501.

Schell TC, Lindemann MD, Kornegay ET, Blodgett DJ (1993). Effects of Feeding Aflatoxin-Contaminated Diets with and Without Clay to Weanling and Growing Pigs on Performance, Liver Function, and Mineral Metabolism. J. Anim. Sci, 71, 1209-1218.

Sharlin SJ, Howarth JR, Thompson FN, Wyatt RD (1981). Decreased reproductive potential and reduced feed consumption in mature white leghorn males fed aflatoxin. *Poultry Sci*, 60, 2701-2708.

Shen H, Shi C, Lee H, Ong C (1994). Aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 127, 145-150.

Shiga A, Shiota K, Nomura Y (1996). Immunohistochemical and ultrastructural studies on the sinusoidal lining cells of canine hepatocellular carcinoma. *J. Vet. Med. Sci*, 58, 509-514.

Slowik J, Graczyk S, 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. *Felio. Histochem. Cytobiol*, 23, 71-81.

Steward D, Larson E (1998). Aflatoxicosis in Wildlife, [http:// ext.msstate.edu:806pups/is1582](http://ext.msstate.edu:806pups/is1582).

Suliman BH, Mohame A, Awadelsied AN, Shommein MA (1987). Acute mycotoxicosis in sheep: Field Cases. *Vet. Hum. Toxicol*, 29, 241-243.

Sulman SF, Armstrong SJ, Zuckerman AJ, Rees KR (1970). Further studies on the toxicity of the aflatoxins on human cell cultures. *Br.J.Exp. Pathol*, 51, 314-316.

Swamy SM, Tan BK (2000). Cytotoxic and Immunopotentiating Effects of Ethanolic Extract of *Nigella sativa* L. Seeds, *J. Ethnopharmacol.*, 70, 1-7.

Şener B, Küsmenoğlu S, Mutlugil A, Bingöl F (1985). A Study with the Seed Oil of *Nigella sativa*. *Gazi Ecz. Fak. Derg.*, 2, 1-8.

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

Traş B, Baş AL (1992). Mikotoksinlerin immun sistem üzerindeki etkileri. *Türk Vet.Hek.Derg*, 4, 17-19.

Tuzcu M (1999). *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 Suşu ile küflendirilmiş bulgurlarla beslenen beyaz farelerdeki patolojik bulgular, S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Patoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, Konya.

Türkdoğan MK, Özbek H, Yener Z, Tuncer İ, Uygan İ, 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.

Türkdoğan MK, Ağaoğlu Z, Yener Z, Şekeroğlu R, Akkan HA, Avcı ME (2001). The Role of Antioxidant Vitamins (C and E), Selenium and *Nigella Sativa* in the Prevention of Liver Fibrosis and Cirrhosis in Rabbits: New Hopes. *Dtsch. Tierartzl. Wschr.*, 108, 71-73.

Türker L, Bayrak A (1997). Çörek Otu (*Nigella sativa* L)'nun Sabit ve Uçucu Yağ Kompozisyonunun Araştırılması. *Standart*, 430, 128-137.

Venkata K, Gopalakrishna R, 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, Fransworth NR (1990). *Economic and medicinal plant research*, vol. 4, plants and traditional medicine, Academic Press, London, England.

Yağı 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 aşıli civcivlerde karaciğer parankimi üzerinde ışık mikroskopik incelemeler. *U.Ü.Vet.Fak.Derg*, 11, 43-51.

Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, M. Oren M (1991). Wilder-Type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*, 352, 345-347.

Zachary A, Wong H, Dennis PH (1980). The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin b1 in the monkey, rat, and mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 55, 115-125.

ÖZGEÇMİŞ

Ahmet ÇELİK, 1980 yılında Diyarbakır'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Diyarbakır'da tamamladı. 1999 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesine kayıt yaptırdı. 2004 yılında bu Fakültenin Patoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Halen Batman İl Tarım Müdürlüğünde Veteriner Hekim olarak çalışmaktadır.