

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRLERİNDE AFLATOKSİN B₁' İN NEDEN
OLDUĞU GENOTOKSİK VE BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE
A, C ve E VİTAMİNLERİNİN ANTAGONİSTİK ETKİSİ**

Lokman ALPSOY

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

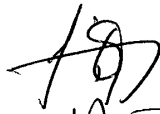
ERZURUM

2008

Her hakkı saklıdır

Doç.Dr. Güleray AĞAR ın danışmanlığında, Lokman ALPSOY tarafından hazırlanan bu çalışma 30.07.2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.


Başkan: Prof.Dr. Fatih AKÇAY

İmza : 

Üye: Doç.Dr. Güleray AĞAR

İmza : 

Üye: Doç.Dr. Mevlit İKBAL

İmza : 

Üye: Doç.Dr. Kamil HALİLOĞLU

İmza : 


Üye: Doç.Dr. Yusuf KAYA

İmza : 

Üye: Doç.Dr. H.Ramazan YILMAZ

İmza : 

Üye: Doç.Dr. Ö.Köksal ERMAN

İmza : 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

(imza)

Prof. Dr. Mehmet ERTUĞRUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRLERİNDE AFLATOKSİN B₁' İN NEDEN OLDUĞU GENOTOKSİK VE BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE A, C ve E VİTAMİNLERİNİN ANTAGONİSTİK ETKİSİ

Lokman ALPSOY

Atatürk Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Güleray AĞAR

Ortak-Danışman: Doç. Dr. Mevlit İKBAL

Bu çalışmada, insan lenfosit kültürlerinde kardeş kromatid değişimi ve biyokimyasal parametrelerdeki değişikliklere neden olan aflatoksin B₁'e (AFB₁) karşı A, C ve E vitaminlerinin antagonistik etkisini değerlendirmeyi amaçladık. Sonuçlar gösterdi ki, AFB₁ insan lenfosit kültürlerinde KKD frekansı önemli derecede artırdı. AFB₁ verilen grupla, AFB₁ ile birlikte A, C ve E vitaminlerinin 3 farklı konsantrasyonu verilen gruplar karşılaştırıldığında da KKD frekansında önemli derecede azalma görüldü. En etkili vitamin C vitamini olduğu, KKD frekansının azaltılmasında vitaminlerin etki sırasının C>E>A şeklinde olduğu tespit edildi.

Bu çalışmanın biyokimyasal sonuçlarında ise AFB₁'in önemli derecede glutatyon miktarı (GSH), süperoksid dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitelerini azaltıp, malondialdehit (MDA) seviyesini artırdığı ortaya konulmuştur. AFB₁ ile birlikte A, C ve E vitaminlerinin verilmesi GSH miktarı, SOD ve GPx aktivitesini artırırken, MDA miktarını azaltmıştır. Biyokimyasal parametreler üzerine etki gösteren vitaminlerden en önemlisinin E vitamini olduğu ve vitaminlerin etki sırasının E>C>A olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak A, C ve E vitaminleri reaktif oksijen türlerinin salınımını sağlayan AFB₁'e karşı koruyucu etki yaptığı tespit edilmiştir.

2008, 98 sayfa

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin B₁, Oksidatif stres, Kardeş kromatid değişimi, Antioksidan vitaminler

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

THE GENOTOXIC AND BIOCHEMICAL EFFECTS OF AFLATOXIN B₁ ON HUMAN LYMPHOCYTE CULTURES AND THE ANTAGONISTIC EFFECTS OF VITAMIN A, C AND E

Lokman ALPSOY

Ataturk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Güleray AGAR

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mevlit İKBAL

In this study, we aimed to evaluate the antagonistic effects of vitamin A, C and E against aflatoxin B₁ (AFB₁) to induce sister-chromatid exchange (SCE) and changes in biochemical parameters on human lymphocyte cultures. The results showed that the frequency of SCEs on human lymphocyte cultures was significantly increased by the mutagen AFB₁ (5 µM). There was a significant decrease in the SCE frequency in AFB₁-treated group compared with the groups receiving AFB₁ and also different three concentration of vitamins A, C and E. The most effective of the vitamins was vitamin C. The order of the decreasing effect of the SCE frequency of vitamins was: vitamin C>vitamin E>vitamin A.

The biochemical results of this experiment reveal that AFB₁ significantly decreased the level of GSH and the activities of SOD and GPx, and increased the level of MDA. Simultaneous supplementation with vitamin A, C and E restored these parameters to that of normal ranges. The most effective of the vitamins was vitamin E at 200 µM and the order of the decreasing effect of the level of MDA and increasing effect of level of GSH and the activities of SOD and GPx of vitamins were: vitamin E>vitamin C>vitamin A. In conclusion, vitamin A, C and E exhibited protective effects on human lymphocytes exposed to AFB₁ by inhibiting AFB₁-induced ROS generation.

2008, 98 pages

Keywords: Aflatoxin B₁, Oxidative stress, Sister chromatid exchange, Antioxidant vitamins.

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alışma, Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakóltesi Biyoloji Bölümü'nde yapılmıştır.

Bu tez konusunu çalışmamı sağlayan, çalışmalarımnda ve tezin hazırlanışında yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Güleray AĞAR'a, Sayın Doç. Dr. Mevlit İKBAL'e, Sayın Doç. Dr. Kamil HALİLOĞLU'na en içten teşekkürlerimi arz ederim.

Tezin hazırlanma sürecinde fikirlerinden istifade ettiğim ve biyokimyasal analizlerin yapılmasında yardımda bulunan Sayın Prof. Dr. Fatih AKÇAY'a ve Yrd. Doç. Dr. Abdulkadir YILDIRIM'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca kendilerinden görmüş olduğum destekten ve güvenden dolayı aileme teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Lokman ALPSOY

Temmuz 2008

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----------|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| SİMGELER DİZİNİ..... | vi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | viii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | ix |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. KURAMSAL TEMELLER..... | 10 |
| 2.1. Aflatoksinler..... | 10 |
| 2.1.1. Aflatoksinlerin özellikleri, çeşitleri ve ilk bulunması..... | 10 |
| 2.1.2. Aflatoksinlerin kimyasal yapısı..... | 11 |
| 2.1.3. Aflatoksinlerin konsantrasyonunun azaltılması..... | 16 |
| 2.1.4. Aflatoksinlerin canlılar üzerine etkileri | 16 |
| 2.2. Kardeş Kromatid Değişimi | 23 |
| 2.2.1. KKD yöntemini etkileyen faktörler | 24 |
| 2.2.2. KKD'nin oluş mekanizmaları | 26 |
| 2.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres..... | 30 |
| 2.3.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$)..... | 33 |
| 2.3.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) | 34 |
| 2.3.3. Hidroksil Radikali (OH^{\bullet}) | 34 |
| 2.3.4. Singlet Oksijen (1O_2)..... | 35 |
| 2.3.5. Peroksil (ROO^{\bullet}) ve Alkoksil (RO^{\bullet}) Radikalleri..... | 36 |
| 2.4. Antioksidanlar | 36 |
| 2.4.1. Enzimatik antioksidanlar..... | 39 |
| 2.4.1.a. Süperoksit Dismutaz (SOD)..... | 39 |
| 2.4.1.b. Glutasyon Peroksidaz (GPx) | 40 |
| 2.4.1.c. Katalaz (CAT) | 41 |
| 2.4.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar..... | 42 |
| 2.4.2.a. Glutasyon (GSH) | 42 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4.2.b. A Vitamini..... | 43 |
| 2.4.2.c. C Vitamini (Askorbik asit)..... | 44 |
| 2.4.2.d. E Vitamini | 44 |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM..... | 46 |
| 3.1. KKD Analizi | 46 |
| 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler | 46 |
| 3.1.2. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması | 47 |
| 3.1.3. Lenfosit besi yerlerinin hazırlanması ve saklanması | 49 |
| 3.1.4. Donör seçimi | 50 |
| 3.1.5. Deney düzeneğinin oluşturulması | 50 |
| 3.1.6. Lenfosit kültürü..... | 51 |
| 3.1.7. Floresan plus giemsa tekniği ile boyama | 52 |
| 3.1.8. KKD sayımı | 52 |
| 3. 2. SOD, GPx, MDA, GSH Ölçümü | 53 |
| 3. 2. 1. Superoxide Dismutase (SOD) ölçümü..... | 53 |
| 3. 2. 2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) ölçümü | 54 |
| 3. 2. 3. Total Glutasyon (GSH) ölçümü..... | 55 |
| 3. 2. 4. Malondialdehit (MDA) ölçümü | 55 |
| 3.3. İstatistiksel Değerlendirme | 56 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI..... | 57 |
| 4.1. KKD Bulguları | 57 |
| 4. 2. SOD, GPx, MDA ve GSH Sonuçları | 65 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ | 77 |
| 5.1. Öneriler... .. | 88 |
| KAYNAKLAR | 89 |
| ÖZGEÇMİŞ | 99 |

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|------------------|---|
| AFB ₁ | Aflatoksin B ₁ |
| BrdU | 5-Bromo-2' deoksiuridin |
| CA | 'Chromosomal aberrations' |
| CAT | Katalaz |
| CHO | Çin Hamster Ovaryum |
| CMA | Klormadinon asetat |
| Cu, Zn –SOD | Bakır-Çinko Bulunduran SOD |
| DHAA | Dihidroaskorbik asit |
| dL | Desilitre |
| DMSO | Dimetil sülfoksit |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| DXR | Dokсорubisin |
| EC-SOD | Ekstraseluler SOD |
| GPx | Gulutasyon peroksidaz |
| GR | Glutasyon redüktaz |
| gr | Gram |
| GS | İndirgenmiş glutasyon |
| GSSG | Yükseltgenmiş glutasyon |
| I.A.R.C. | International Agency for Research on Cancer |
| KA | Kromozomal anormallikler |
| kg | Kilogram |
| KKD | Kardeş kromatid değişimi |
| L | Litre |
| LPO | Lipid peroksidasyonu |
| M | Molarite |
| MC | Merkurik klorit |
| MDA | Malondialdehit |
| mg | Miligram |
| mL | Mililitre |

| | |
|------------------|---|
| mM | Milimolar |
| MN | Mikro nükleus |
| Mn-SOD | Mangan bulunduran SOD |
| NADH | Yükseltgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit |
| NADP | Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat |
| NADPH | Yükseltgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat |
| Nm | Nanometre |
| LD ₅₀ | Medyan letal doz |
| PCB | Poliklorinat bifenil |
| PUFA | Poliansature yağ asiti |
| RNA | Ribonükleik asit |
| ROS | Reaktif oksijen türleri |
| ROT | Reaktif oksijen türleri |
| SCE | Sister chromatid exchange |
| Se | Selenyum |
| SOD | Süperoksit dismutaz |
| mg | Mikrogram |
| µL | Mikrolitre |
| µM | Mikromolar |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 2.1.2.1. Aflatoksin B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ , M ₂ , B _{2A} , G _{2A} , P ₁ ve Q ₁ 'in yapısı | 12 |
| Şekil 2.2.2.2. Aflatoksinlerin sentez basamakları | 15 |
| Şekil 2.1.4.1. AFB ₁ 'in farklı metabolitlere dönüştürülmesi..... | 19 |
| Şekil 2.1.4.2. AFB ₁ -N7-Guanil kompleksi | 20 |
| Şekil 2.1.4.3. AFB ₁ 'in biyoaktivasyonu ve DNA ile etkileşimleri | 22 |
| Şekil 2.1.4.4. Memeli hücrelerinde meydana gelen hasarların onarım mekanizması..... | 23 |
| Şekil 2.2.2.1. Loveday ve Latt isimli araştırmacılara göre KKD oluş mekanizması..... | 27 |
| Şekil 2.3.1. Oksidatif stres seviyesinin hücrelerde meydana getirdiği etkiler | 31 |
| Şekil 2.3.5.1. ROT ve antioksidanlar | 37 |
| Şekil 3.1.7. KKD'lerin sayılmasında esas alınan kriterleri..... | 53 |
| Şekil 4.1.1. Donör 1'e ait elde edilen bir metafaz alanındaki 10 adet KKD değişimi..... | 58 |
| Şekil 4.1.2: Donör 1'e ait elde edilen bir metafaz alanındaki 4 adet KKD değişimi..... | 58 |
| Şekil 4.1.3. Donör 2'e ait elde edilen bir metafaz alanındaki 4 adet KKD değişimi..... | 59 |
| Şekil 4.1.4. Donör 1'e ait elde edilen bir metafaz alanındaki 16 adet KKD değişimi..... | 59 |
| Şekil 4.1.5. Donör 3'e ait elde edilen bir metafaz alanındaki 8 adet KKD değişimi..... | 60 |
| Şekil 4.1.6. Donör 3'e ait elde edilen bir metafaz alanındaki 5 adet KKD değişimi..... | 60 |
| Şekil 4.1.7. Donör 4'e ait elde edilen bir metafaz alanındaki 12 adet KKD değişimi..... | 61 |
| Şekil 4.1.8. Donör 4'e ait elde edilen bir metafaz alanındaki 11 adet KKD değişimi..... | 61 |
| Şekil 4.1.1. KKD üzerine AFB ₁ ve vitaminlerin etkisi..... | 64 |
| Şekil 4.2.1. AFB ₁ ile vitamin A, C ve E nin SOD aktivitesi üzerine etkileri..... | 73 |
| Şekil 4.2.2. GPx aktivitesi üzerine AFB ₁ ile vitamin A, C ve E nin etkileri | 74 |
| Şekil 4.2.3. AFB ₁ ile vitamin A, C ve E nin GSH seviyesi üzerine etkileri | 75 |
| Şekil 4.2.4. MDA seviyesi üzerine AFB ₁ ile Vitamin A, C ve E nin etkileri | 76 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Çizelge 2.1.2.1. Aflatoksinlerin formül ve özelliklerini gösteren çizelge | 14 |
| Çizelge 2. 3. 1. Papas (1999)'a göre ROT nin oluşumu | 32 |
| Çizelge 4.1.1. Vitamin A uygulandığında edilen KKD frekansları | 62 |
| Çizelge 4.1.2. Vitamin C uygulandığında elde edilen KKD frekansları..... | 63 |
| Çizelge 4.1.3. Vitamin E uygulandığında elde edilen KKD frekansları..... | 64 |
| Çizelge 4.2.1. AFB ₁ ve Vitamin A'nın SOD, GPx, GSH ve MDA üzerine etkileri | 70 |
| Çizelge 4.2.2. SOD, GPx, GSH ve MDA üzerine AFB ₁ ve Vitamin C'nin etkileri | 71 |
| Çizelge 4.2.3. AFB ₁ ve Vitamin E'nin SOD, GPx, GSH ve MDA üzerine etkileri..... | 72 |

1.GİRİŞ

Saccardo, mantarlar üzerinde 1880 yılına kadar yapılmış inceleme ve araştırmaları 25 cilt halinde "Sylloge Fungorum" adlı eserde toplamış, bu eserde 80.000 mantar türü olduğunu bildirmiştir (Yücel 1999). Doğada parazit, saprofit ve simbiyotik olmak üzere farklı şekillerde yaşarlar (Sharby 1977).

İnsanlar için yararlı ve zararlı mantar türleri vardır. Mantarlar besin olarak tüketildiği gibi, aynı zamanda alkol (mayalardan), antibiyotik (örneğin Penicilin antibiyotiği *Penicillium chrysogenum* türünden), yağ (*Penicillium* türlerinden), vitamin (mayalardan), enzim, ilaç ve peynir üretiminde de çok sık kullanılmaktadırlar (Algur 1992).

Mantarların bu faydaları yanında zararları da vardır. Mantarlar, özellikle de küfler, deri, ağaç, kumaşların küflenmesine, tarımda ürün kaybına yol açmaktadırlar. İnsanlar dahil çeşitli canlılar üzerinde yaşadıklarında onların hastalanmalarına, hatta ölümlerine neden olmaktadır. Tarımsal ürünler ve gıdalarda yaygın olarak zararlara yol açan küf cinslerinin *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Stachybotrys*, *Pithomyces*, *Phoma*, *Myrothecium*, *Phomopsis* ve *Diplodia* olduğu bilinmektedir (Sharby 1977).

Hayvansal dokularda ve insanlarda funguslarla oluşturulan yara ve lezyonlara mikoza, mantarların doğrudan tüketilmesi yolu ile oluşan zehirlenmelere miketismus, mantar toksinlerinin yenilmesiyle oluşan zehirlenmelere ise mikotoksikozis adı verilir (Algur 1992). Mantarların oluşturduğu toksinlere mikotoksin adı verilir. 1930–1940 lı yıllarda keşfedilen mikotoksinler, mantarların insan ve hayvanlarda hastalık oluşturabilen ve antijenik özellik göstermeyen sekonder metabolitleridir. Mikotoksinler, esas olarak protein yapısında ve antijen özellikte olan bakteriyel toksinlerin aksine, çok çeşitli kimyasal yapı ve biyolojik aktiviteye sahip maddelerdir. Karotenoidler, alkaloidler, siklopeptitler ve kumarinler olarak sınıflandırılan mikotoksinler, kimyasal yapı

bakımından birbirlerinden farklılık gösterirler. Mikotoksinlerin en toksik olanı aflatoksinlerdir (Wyllie and Morehouse 1977).

Küflerin hemen her yerde bulunabilmeleri ve birçok gıda ve yem maddesinde gelişerek toksinlerini oluşturabilmeleri nedeniyle, mikotoksinler çok önemli doğal toksinler olarak kabul edilmektedirler (Chu 1977; Pohland 1993). Aflatoksinler, *Aspergillus flavus*'un bazı suşları, *Aspergillus parasiticus*'un ise hemen hemen bütün suşları tarafından üretilmektedir (Scott 1978; Bullerman 1979). Ancak 1987 yılında *A. flavus*'a fenotipik olarak benzeyen *Aspergillus nomius* (Betina 1989) ve son olarak *Aspergillus pseudotamarii* olarak isimlendirilen türünde (Ito *et al.* 2001) aflatoksin ürettiği belirlenmiştir.

Aflatoksinler bakterilerde, kültüre edilmiş insan hücreleri ve deney hayvanlarında genetik hasarlara neden olurlar. Gen mutasyonları, Mikronukleus (MN), Kardeş Kromatid Değişimi (KKD=Sister Chromatid Exchange=SCE), Mitotik İndeks (MI) ve Kromozom Anormallikleri (KA=Chromosomal Aberration) üzerine etkileri vardır (IARC 1993, 2002). Özellikle insanlarda karaciğer kanserine neden olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Aflatoksin B₁'in (AFB₁) en büyük hedef organı karaciğerdir. Bununla birlikte akciğerler, böbrekler ve kalınbarsak üzerinde de etkisi vardır (Wang and Groopman 1999).

Aflatoksin B₁ (AFB₁) neden olduğu hücresel hasarın tam olarak mekanizması açık olmamasına rağmen, iki farklı mekanizma ile etkili olduğu düşünülmektedir. 1- DNA'daki Guanin bazının N-7 bölgesine bağlanarak mutajenik etki gösterirler. 2-AFB₁ reaktif oksijen türlerinin (ROT=reaktive oksijen species=ROS) içinde bulunduğu serbest oksijen türlerinin salınımını uyararak hücrelerde hasara neden olurlar. Ayrıca aflatoksinlerin serbest oksijen radikallerinin seviyesinde artmaya neden olduğu için lipid peroksidasyonunu ve buna bağlı olarak da lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarını artırdığı da bilinmektedir (Shen *et al.* 1994; Lee *et al.* 2005). Etlik piliçlerde aflatoksin kullanımına bağlı olarak eritrosit süperoksid dismutaz

(SOD) ve glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi azalırken, MDA seviyesinde artma gözlenmiştir (Eraslan vd. 2005).

Aflatoksinlerin de salınımına neden oldukları serbest radikallerin en önemli hasarları membran lipidleri, DNA (deoksiribo nükleik asit) ve proteinlere verdikleri hasarlardır.

Serbest radikallerin nukleusta ve DNA'daki etkileri genotoksik ve mutajeniktir. Serbest radikaller pürin ve pirimidin modifikasyonuna veya DNA iplikleri ve kromozom kırılmalarına, onkojen aktivasyonuna neden oldukları için karsinogeneziste önemlidirler (Seven ve Candan 1995; Barrington *et al.* 1996).

Serbest radikaller nükleik asit ve baz modifikasyonlarına bağlı olarak, nokta mutasyonları ve DNA zincir kırılmalarına neden olabilirler. DNA hasarına yol açan hidroksil radikallerinin, hidrojen peroksit (H₂O₂) ve süperoksitin geçiş metalleriyle reaksiyonu sonucu oluştuğu gösterilmiştir (Bukan 1999). Geçiş metalleri ve serbest radikallerin etkisiyle DNA'da oluşan majör oksidatif etkiler sarmal açılmaları, depürinasyon, çapraz bağlanma ve baz modifikasyonları olarak bilinmektedirler. Özellikle baz modifikasyonlarından timin bazı, timin glikol ve 5-hidroksimetil urasile, guanin bazı da 8-hidroksiguanine (8-OH-Gua) dönüşür (Kasprzak 2002). *In vivo* çalışmalarda ROT nin hasarının hassas birer göstergesi olan 8-OH-dGua (8-hidroksi-2-deoksiguanozin) ve 8-OH-Gua mutajenik olmaları nedeniyle potansiyel birer kanserojen olduğu gösterilmiştir (Lunec *et al.* 2002). Aflatoksin tüketimi hücrelerde 8-OH-Gua miktarında artışa neden olduğu için, özellikle p53 geninin 249. kodonunda mutajeniteye neden olarak kansere sebep olurlar (Wang and Groopman 1999).

Gerek aflatoksinlerin gerekse diğer mutajen maddelerin mutajenitelerinin tespit edilmesi için geliştirilen testlerden en yaygın olanları KKD, MN ve KA dir.

İç veya dış etkenlerin etkisiyle hücre DNA'sındaki değişikliklere bağlı olarak meydana gelen KKD'lerinin oluş mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Perry and Evans 1975). Ancak kolay ve çok hızlı sonuç verdiği için mutajenite testlerinden en

yaygın olarak kullanılanlardan bir tanesidir. Aflatoksinlerin KKD ni artırdığı yapılan birçok çalışmada ortaya konulmuştur. Çin hamster V79 hücrelerinde aflatoksinlere bağlı olarak KKD oranları çalışılmış, sonuç olarakta en toksik olandan en az toksik olana doğru $AFB_1 > G_1 > G_2 > B_2$ olduğu bildirilmiştir (Batt *et al.* 1980). İnsan, rat ve fare lenfositlerinde aflatoksinlerin KKD ni artırdığı belirtilmiştir (Thomson *et al.* 1979; Deng *et al.* 1988; Andrew *et al.* 1997; Geyikoğlu ve Türkez 2006).

Aflatoksinlerin ve diğer mutajenlerin mutajenik etkilerinin antioksidan vitaminlerle ve diğer besin komponentleri ile azaltıldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Mutajenik maddelerin KKD ve KA artırmasına karşılık olarakta vitamin A, C ve E ve bazı bitkisel ürünlerin bu mutajen maddelerin mutajenik ve genotoksik etkilerini azalttığı gösterilmiştir (Ahmad *et al.* 2004). AFB_1 'in KKD'ni artırmasına karşılık, AFB_1 ile A vitamininin beraber verilmesi aflatoksinin bu etkisini azalttığı tespit edilmiştir (Huang *et al.* 1982). Ayrıca yapılan benzer çalışmalarda KKD'ni artıran arsenik, hidrokortizon ve gama ışınlarının mutajenik etkisinin A vitamini kullanımı ile azaldığı bildirilmiştir (Avani and Rao 2007; Ahmad *et al.* 2004; Badr *et al.* 1998).

En önemli antioksidan vitaminlerden Vitamin C'nin mutajenik etkiye sahip olan hidrokortizon (Ahmad *et al.* 2004; Ahmad *et al.* 2002), mitomisin C (Krishnaja and Sharma 2003), merkurik klorit (MC; $HgCl_2$) (Rao *et al.* 2001), megestrol acetate (Siddique *et al.* 2005) ve klormadinon asetat (CMA) (Siddique and Afzal 2005) ın neden olduğu KKD üzerindeki etkisini azalttığı gözlenmiştir.

E vitamini ile ilgili yapılan çalışmalarda ise, E vitamininin hidrokortizon (Ahmad *et al.* 2002), karbontetraklorit (Sivikova *et al.* 2001) ve aflatoksininin (Chlopkiewicz *et al.* 1991) neden olduğu KKD üzerine olan mutajenik etkisini azalttığı gösterilmiştir.

Vitaminlerin dışında selenyum ve diğer bazı bitkisel ürünlerin de AFB_1 'in mutajenik etkisini azalttığına dair çalışmalar mevcuttur. AFB_1 'in 1, 5, 10 μM 'lık dozlarına karşı sodium selenitenin (Na_2SeO_3) (5×10^{-7} ve $1 \times 10^{-6} M$) antagonistik etkisi çalışılmış,

AFB₁'in KKD oranını artırdığı, buna karşın AFB₁ ile birlikte Na₂SeO₃ verildiğinde KKD'nin azaldığı belirlenmiştir (Ahmad *et al.* 2004; Geyikoğlu ve Türkez 2006).

Serbest radikaller DNA hasarlarının yanında aminoasitlerin oksidasyonu, peptid bağlarının parçalanması, disülfid bağlarının oluşumu ve çapraz bağlanmalara neden olarak proteinlere de etki ederek, enzimlerin fonksiyonlarının kaybolmasına neden olabilirler (Seven ve Candan 1995).

Serbest radikallerin etkiledikleri diğer bir hücre yapısı da membran lipidleridir. Membran lipidlerindeki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu olan lipid peroksidasyonunu başlatarak onların akışkanlıklarına ve geçirgenliklerine etki ederler. Bu şekilde lipidlerin yapısını da bozarlar (Ottino and Duncan 1997). Serbest radikaller yağ asitlerindeki doymamış bağlarla kolayca reaksiyona girerek lipidlerin peroksidasyonuna neden olurlar. Poliansature yağ asitlerinin (PUFA) diğer bir ifade ile doymamış yağ asitlerinin oksidatif hasarını başlatarak, kendi kendini devam ettiren zincirleme bir reaksiyona dönüştürüp geri dönüşümsüz olarak membran hasarlarına neden olurlar (Akkuş 1996). Bu reaksiyon doymamış yağ asitlerinin birinin yapısından bir hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla başlar. Böylece bu doymamış yağ asidi zinciri bir serbest radikale dönüşür. Lipid radikali moleküler oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksid radikalini (LOO[•]) oluşturur. LOO[•] de oksijen radikalleri gibi hücredeki moleküller üzerinde toksik etkiye neden olur. Lipid peroksidasyonu reaksiyonları sonucunda ortaya çıkan aldehitler en toksik olan ürünlerinden biridir. Toksik etkiye sahip olan aldehitlerin protein sentezini inhibe ettikleri bilinmektedir MDA ve 4-hidroksinoneal (HNA)'de lipid peroksidasyon seviyesini gösteren parametrelerdir (Hubel *et al.* 1989; Seven ve Candan 1995).

Mutajenik etkiye sahip AFB₁'in lipid peroksidasyon ürünü olan MDA miktarı üzerine artırıcı etkisi olduğu bilinmektedir (Shen *et al.* 1994; Porter *et al.* 1995; Eraslan vd. 2005). Yapılan araştırmalarda lipid peroksidasyonunun C vitamini (Muthuvel *et al.* 2006; Krishnamoorthy *et al.* 2007; Verma *et al.* 2007), E vitamini (Verma and Nair,

2001; Kashif *et al.* 2004; Banudevi *et al.* 2006; Krishnamoorthy *et al.* 2007; Verma *et al.* 2007) ve A vitamini (Kashif *et al.* 2004) tarafından azaltıldığı gösterilmiştir.

Hücrelerde serbest oksijen radikalleri ile savaşan antioksidan sistemler vardır. Hücre içi savunma sisteminin enzimatik antioksidanları, SOD, CAT ve GPx'tir. Enzimatik olmayan hücre içi antioksidanları ise; glutasyon (GSH), membranlara bağlanabilen vitamin A, C, E, transferin, seruloplazmin ve bilirubindir (Woods *et al.* 2002).

Hücre içi antioksidantların en önemlilerinden biri olan SOD, süperoksiti (O_2^-) oksijene (O_2) ve daha az reaktif olan H_2O_2 katalizler. AFB₁ kullanımının hücre içi antioksidanlarından SOD, aktivitesini azalttığı gözlenmiştir (Eraslan vd. 2005; Preetha *et al.* 2006). Ayrıca SOD aktivitesini C vitamini (Muthuvel *et al.* 2006; Krishnamoorthy *et al.* 2007; Verma *et al.* 2007), E vitamini (Verma and Nair 2001; Kashif *et al.* 2004; Banudevi *et al.* 2006; Krishnamoorthy *et al.* 2007; Verma *et al.* 2007) ve A vitamini (Kashif *et al.* 2004) kullanımı artırmaktadır.

GPx, antioksidan enzimlerin en etkin olanlarından biridir. Hücre içi hidroperoksitlerin yok edilmesinden sorumludur (Armstrong 1998). H_2O_2 'i suya çevirerek, methemoglobin oluşumunu engeller (Kalaycıoğlu vd. 1998). Yine AFB₁ kullanımı SOD da olduğu gibi GPx aktivitesini de azalttığı gözlenmiştir (Eraslan vd. 2005; Preetha *et al.* 2006). Yapılan diğer çalışmalarda oksidatif strese neden olan AFB₁ gibi maddelerin bu etkisinin C vitamini (Muthuvel *et al.* 2006; Krishnamoorthy *et al.* 2007; Verma *et al.* 2007), E vitamini (Verma and Nair 2001; Banudevi *et al.* 2006; Krishnamoorthy *et al.* 2007; Verma *et al.* 2007) ve A vitamini kullanımı ile azalttığı gözlenmiştir (Vandana *et al.* 2006).

GSH ise önemli bir intraselüler antioksidandır. Okside edilmiş şekli, serbest radikallerinin inhibisyonunda (Boehme *et al.* 1992), indirgenmiş sülfidril gruplarının stabilizasyonunda ve tokoferol ile askorbatın rejenerasyonunda görevlidir (Armstrong 1998). Ayrıca GPx'in kofaktörü olarak da görev yapar (Boehme *et al.* 1992). Yine AFB₁ kullanımını SOD ve GPx te olduğu gibi, GSH miktarını da azalttığı tespit

edilmiştir (Eraslan vd. 2005; Preetha *et al.* 2006). Yapılan bazı araştırmalarda GSH seviyesini C vitamini (Muthuvel *et al.* 2006; Krishnamoorthy *et al.* 2007; Verma *et al.* 2007), E vitamini (Verma and Nair 2001; Kashif *et al.* 2004; Banudevi *et al.* 2006; Krishnamoorthy *et al.* 2007; Verma *et al.* 2007) ve A vitamini (Kashif *et al.* 2004) kullanımı ile artırıldığı gözlenmiştir.

Diğer antioksidan özelliğe sahip grup ise vitaminlerdir. Özellikle A, C ve E vitaminleri birer antioksidan olarak görev yaparlar. A, C ve E vitaminleri karaciğerin mikrozomal enzimlerini aktive ederek aflatoksikozise bağlı olarak şekillenen karaciğerde kanser oluşumunu engellemektedirler. Vitamin E'nin antikanserojenik etkisi vitamin C'ye oranla daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Fridovich 1986).

A vitamini singlet oksijen temizliyicisi olması nedeniyle oksijen radikallerine karşı koruyucu etki yapar (Kılınç 1985). Vitamin A'nın öncül maddeleri olan karotenoidler de karaciğeri aflatoksinlerin kanser yapıcı etkilerine karşı koruma özelliğine sahiptirler (Cassand *et al.* 1993).

C vitamini indirgeyici aktiviteye sahip olduğu için güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girdiği için onların temizlenmesini sağlar (Akkuş 1996; Granado *et al.* 1998). Ayrıca singlet oksijen temizleyicisi olarakta bilinmektedir (Kılınç, 1985). C vitamininin hidrokortizon (Ahmad *et al.* 2002), mitomisin C (Krishnaja and Sharma 2003), doksorubisin (DXR) (Lusania *et al.* 1999), merkurik klorid (MC) (Rao *et al.* 2001), megestrol asetat (Siddique *et al.* 2005), pirimetamin (Egel *et al.* 2002) ve klormadinon asetatın (CMA) (Siddique and Afzal 2005) genotoksik ve mutajenik etkilerine karşı antimutajenik etki gösterdiği gözlenmiştir.

C vitamini Poliklorinat bifenile (PCB=Aroclor 1254) karşı H₂O₂ ve OH⁻ iyonu miktarını lipid peroksidasyonunu azaltıp, GSH miktarı ve GPx ve SOD aktivitesini artırdığı bildirilmiştir (Krishnamoorthy *et al.* 2007). Benzer bir çalışmada da yine C vitamini PCB'ye karşı çalışılmış ve PCB H₂O₂ ve MDA miktarını artırırken, SOD ve

GPx aktivitesini azalttığı gözlenmiştir. PCB ile birlikte C vitamini verilen gruplarda H₂O₂ ve MDA miktarı azalırken SOD ve GPx aktivitesi artmıştır (Muthuvel *et al.* 2006). Arsenikin neden olduğu oksidatif stresden dolayı GSH miktarı azalıp, MDA miktarının artmasına C vitamini muamelesinin antagonistik etki yaptığı gözlenmiştir (Chang *et al.* 2007).

Enzim ve bileşiklerin çoğu oksidatif stresin etkilerine karşı hücreleri korurken E vitamini antioksidan sistemin tamamında önemli rol oynar. E vitamini doymamış yağ asitlerini korumada ilk savunma elemanıdır (Zinten 1978). E vitamininin hidrokortizon (Ahmad *et al.* 2002), karbontetraklorit (Sivikova *et al.* 2001), aflatoksin ve adriamisinin (Chlopkiewicz *et al.* 1991) neden olduğu KA leri ve KKD miktarını azalttığı tespit edilmiştir.

E vitamininin aflatoksinin neden olduğu lipid peroksidasyonunu önemli derecede azalttığı belirtilmiştir (Shen *et al.* 1994). E vitamini ve aflatoksin ile yapılan diğer bir çalışmada ise aflatoksinin kontrole göre MDA miktarını artırdığı GSH miktarını, SOD, CAT ve GPx enzimlerinin aktivitesini ise azalttığı görülmüştür. Aflatoksinle birlikte vitamin E (2 mg/gün/hayvan) verildiğinde sadece aflatoksin verilen gruplara göre MDA miktarının azaldığı GSH miktarını, SOD, CAT ve GPx enzimlerinin aktivitesini ise artırdığı gözlenmiştir (Verma and Nair 2001). Selenyum ve vitamin E noksanlığı durumunda aflatoksinlerin *in vivo* olarak zararsızlaştırılmaları işlemlerinde aksamalar meydana gelmektedir. Bu tür vitamin ve mineral noksanlıkları bir bakıma aflatoksinlerin aktivasyonunu teşvik etmekte, zararlı etkilerinin daha şiddetli düzeylerde sonuçlanmasına olanak sağlamaktadır (Chen *et al.* 1982; Cassand *et al.* 1993).

Bu vitaminlerle ilgili yapılan ortak çalışmalarda vitaminlerin birlikte verilmesiyle etkileri karşılaştırılmıştır. En etkili vitaminin E vitamini olduğu, vitaminlerin etki sırasının E-C-A şeklinde gerçekleştiği, E ve C vitamini birlikte verilince antioksidan etkinin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Stres, kromium, PCB, deltametrin ve klorifirifosun neden olduğu oksidatif strese bağlı olarak, SOD ve GPx aktivitesi ile GSH miktarının azalıp, MDA miktarını artırdığı tespit edilmiştir. Fakat bu maddelerle birlikte

A, C ve E vitamini verilmesiyle verilen parametrelerin kontrole yaklaştığı belirlenmiştir (Kashif *et al.* 2004; Vandana *et al.* 2006; Banudevi *et al.* 2006; Yousef *et al.* 2006; Verma *et al.* 2007; Krishnamoorthy *et al.* 2007).

Bu çalışmanın amacı tüketici dernekleri ve yapılan bilimsel çalışmalarla piyasadaki birçok üründe bulunduğu belirlenen; hepatotoksik, hepatokanserojen, mutajenik ve teratojenik olan AFB₁'in insan lenfosit kültüründe;

1-Mutajenik etkisini mutajenite testlerinden olan genotoksik ve sitotoksik etkinin bir göstergesi olan KKD ile biyokimyasal parametrelerle (SOD, GPx, GSH ve MDA) belirlemek,

2-AFB₁'in KKD ve biyokimyasal parametreler üzerine olan bu etkisine karşı farklı dozlarda A, C ve E vitaminlerinin antagonistik etkiye sahip olup olmadıklarını tespit etmek ve etki derecesini belirlemektir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Aflatoksinler

2.1.1. Aflatoksinlerin özellikleri, çeşitleri ve ilk bulunması

Aflatoksinler yapısal olarak difurokumarinlere benzeyen, başta *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* olmak üzere çeşitli *Aspergillus* türleri ile *Penicillium* (*P. puberulum* gibi) ve *Rhizopus* türü mantarlar tarafından sentez edilen toksinlerdir. Bunlardan *A. flavus* AFB₁ ve AFB₂, *A. parasiticus*'da AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ toksinlerini üretirler. Aflatoksinlere bu isim *Aspergillus* cinsinin "A"sı *flavus*'un "fla"sı alınarak sonuna "toksin" eklenmesiyle oluşturulmuştur. Aflatoksinler ciddi problemlere yol açan kimyasal kanserojenlerdir. Özellikle bu son iki tür dünyanın her yerinde, toprak ve havada yaygın şekilde bulunurlar. Aflatoksin oluşturan mantarlar 12–40°C arasında ve %15'in üzerinde rutubet içeren başta mısır, pamuk tohumu ve yer fıstığı olmak üzere, hemen her çeşit tahıllar, yem ve yem hammaddeleri ile besinlerde kolayca ürerler ve mikotoksin sentezleyebilirler. *A. flavus*, %86–90 nisbi nemde 48 saat içinde önemli ölçüde mikotoksin oluşturur (Nixon *et al.* 1981). Yem ve besinlerle alınan aflatoksinler sindirim kanalından sınırlı ölçüde emilirler. Dolaşıma geçen aflatoksinler başlıca karaciğer ve kaslarda dağılım gösterirler. Vücuda giren aflatoksinin %75'lik kısmı ilk 24 saat içinde dışkı ile, %15-20'lik kısmı idrarla ve geri kalanı da değişmemiş ya da metabolitleri halinde sütle atılırken (Kaya vd. 1998) %5-6'lık kısmı karaciğerde tutulur. Süt ineklerine 10 gün boyunca %15 oranında aflatoksin içeren yemle uygulanan beslemede, 9. günde yapılan ölçümlerde AFB₁'in %23-67'lik kısmının idrar ve gaita ile %1.35'lik kısmının da sütle atıldığı saptanmıştır (Hoogenboom *et al.* 2001). Aflatoksinli yemlerle beslenen ineklerin süt ve etlerinde, tavukların da yumurtalarında aflatoksine rastlanmıştır. Sütle çıkarılması, et ve süt mamüllerinde bulunması insanlar için büyük bir tehlike oluşturmaktadır (Arda 1980). Mikotoksinler, akut toksikozisten uzun süreli kronik sağlık sorunlarına kadar varabilen geniş bir etki spektrumuna sahiptirler. Bazı

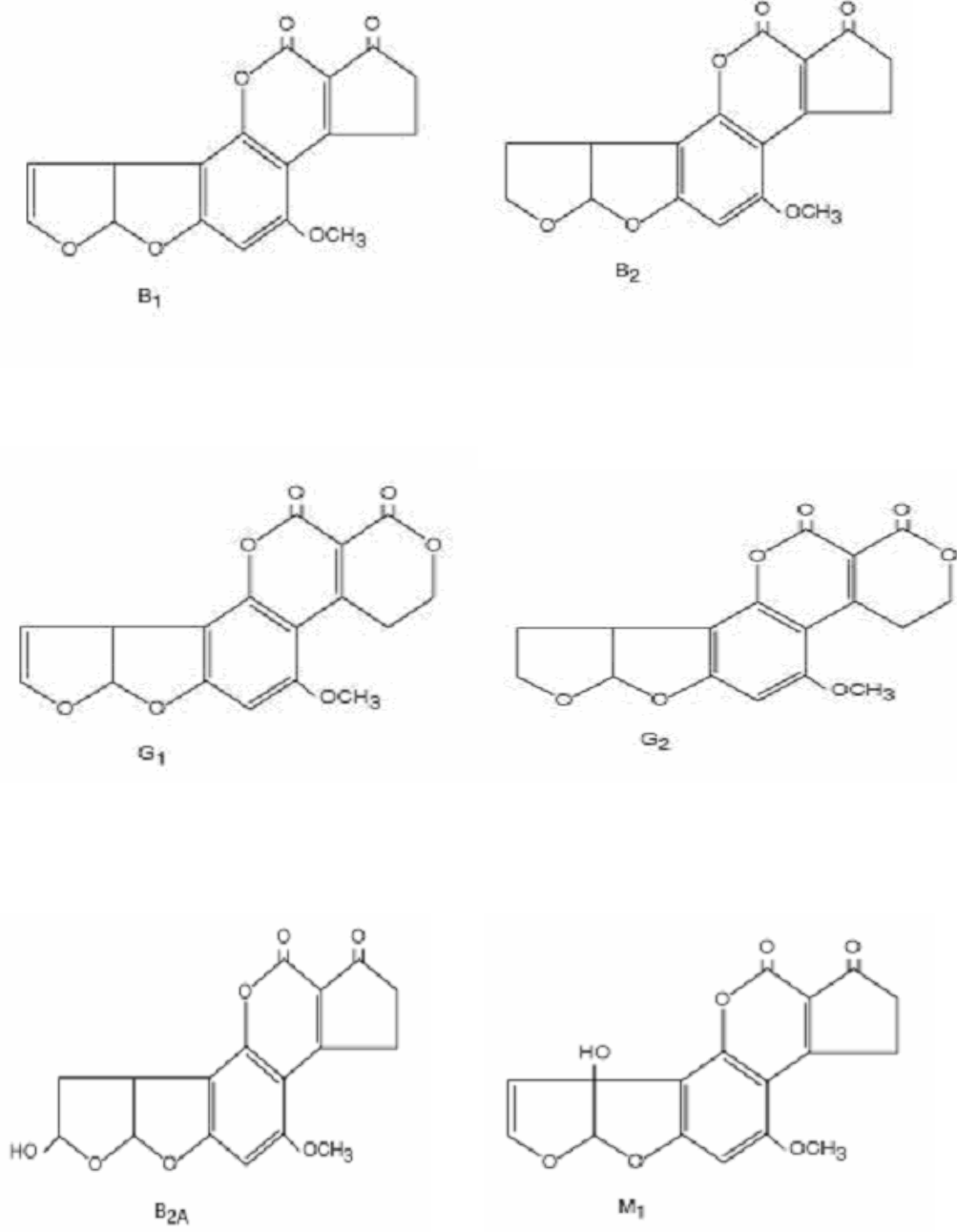
mikotoksinler insan toksikozlarının esas kaynağını oluşturabilir ki; en basit olarak AFB₁ insan karaciğer karsinojeni olarak bilinir (Coulombe 1993).

Evcil ve deney hayvanlarında aflatoksinlerin zehirliliği hayvanın cinsi, cinsiyeti, ırkı, yaşı, alınan toksinin çeşidi ve miktarı, maruz kalma süresi gibi birçok faktöre bağlıdır. Ayrıca zehirlilikleri riboflavin ve ışığa maruz kalmakla, vitamin B₁₂, karoten ve protein noksanlıklarında artar. Evcil hayvanlar içerisinde erkekler dişilerden daha duyarlıdır. Kanatlılar içerisinde de aflatoksinle en duyarlı olanları ördek ve hindi palazlarıdır (Kaya vd. 1998; Arda 1980).

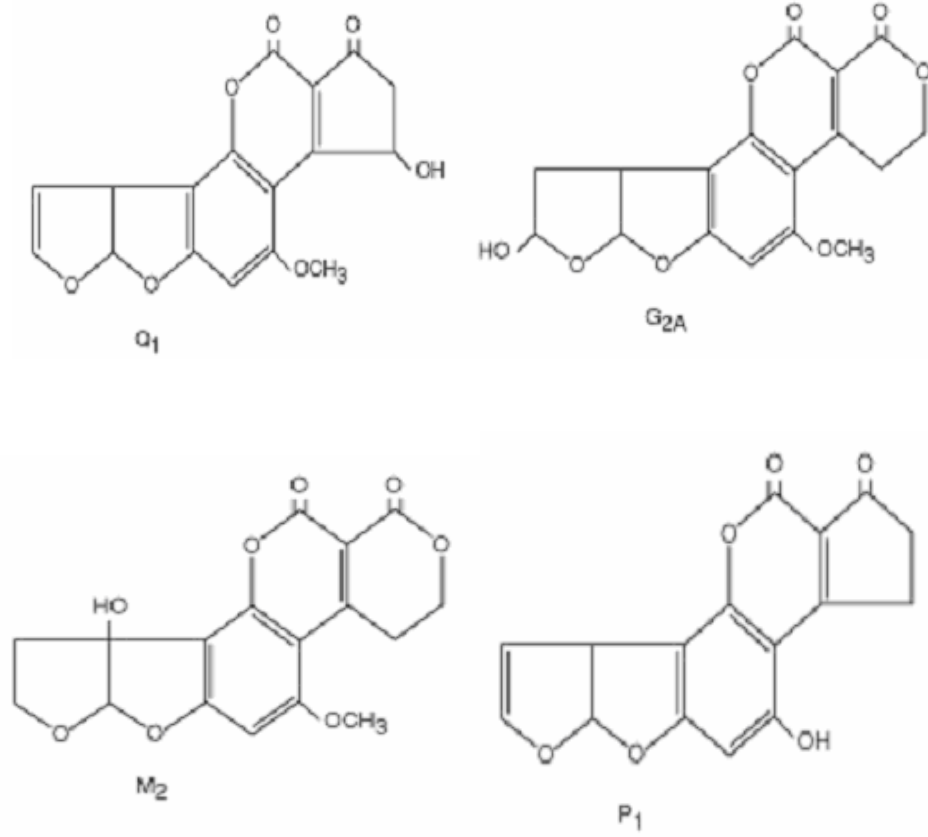
Aflatoksinler içerisinde zehirliliği en güçlü olanı AFB₁'dir. Bunu azalan sırayla AFG₁, AFB₂ ve AFG₂ izler. Hayvanların çoğunda AFB₁'in LD₅₀ değeri 0.5–10 mg/kg arasında değişir (LD₅₀: Aflatoksinin hayvanlara verildiğinde %50 oranında ölüme neden olan dozdur). Ördek, alabalık, kedi, köpek ve hindi gibi hayvanlar en duyarlı; at, sığır, koyun, keçi, rat, kobay ve bildircin gibi hayvanlar orta derecede duyarlı; fare ve maymun ise en az derecede duyarlı hayvanlar olarak bilinir (Kaya vd. 1998). Üzerinde en çok çalışılmış mikotoksin grubu olan aflatoksinler 1960 yılında keşfedilmiş ve 1962 yılında da güçlü bir “hepatotoksik” ve “hepatokarsinojen” etkisi olduğu anlaşılmıştır (Pohland 1993; Bullerman 1979).

2.1.2. Aflatoksinlerin kimyasal yapısı

Aflatoksinler, “difurokumarosiklopentenon” ve “difurokumarolakton” gruplarında sınıflandırılmıştır (Betina 1989). Aflatoksinlerin aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ olmak üzere dört ana fraksiyonu bulunmaktadır. Bu isimlendirme ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boyu UV ışığı altında aflatoksin B₁ ve B₂ 'nin mavi, aflatoksin G₁ ve G₂ 'nin ise yeşil floresan vermesiyle ilişkilidir (Bullerman, 1979; Groopman and Kensler 1988; Özkaya ve Temiz 2003). B toksinleri kumarin yapısındaki lakton halkasına eklenmiş siklopentenon halkası, G toksinleri ise ek bir lakton halkası içermektedir (Özkaya ve Temiz 2003) (Şekil 2.1.2.1.).



Şekil 2.1.2.1. Aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ ve B_{2A}, G_{2A} yapısı (Wyllie and Morehouse 1977)



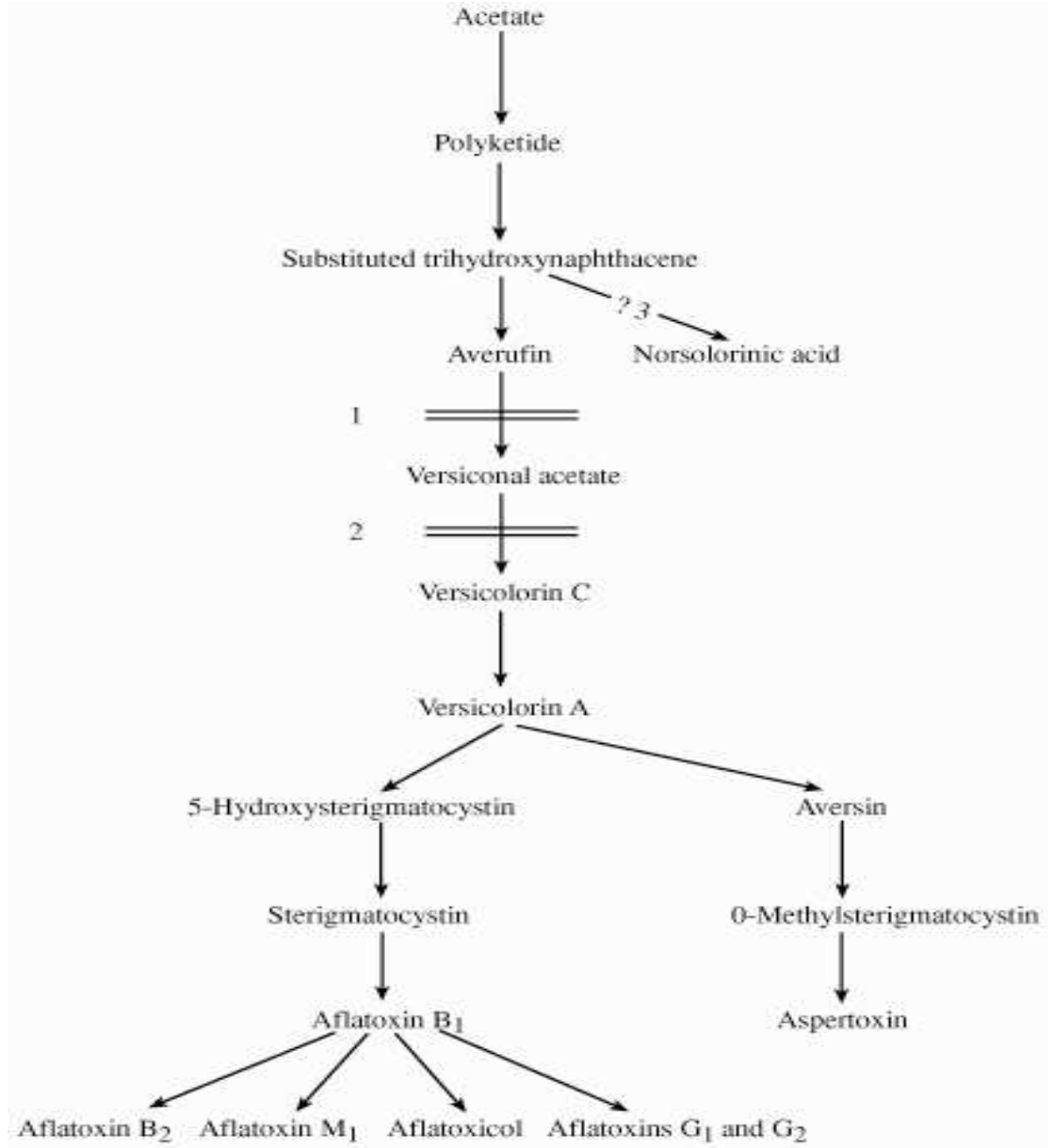
Şekil 2.1.2.1. Devam.

Aflatoxinler, metanol, kloroform ve diğ er birçok organik çözücüde çözünebilmektedir. Ancak sudaki çözünlükleri azdır (10–30 µg/mL). Toksinler, UV ışığını (362 nm) kuvvetle absorblarlar ve aflatoxin B₁ ve B₂ 425 nm de; aflatoxin G₁ ve G₂ ise 450 nm de floresan emisyonu oluştururlar. Aflatoxin çeşitlerinin molekül formülleri, molekül ağırlıkları, erime sıcaklıkları, floresan emisyonları, UV emilimleri Çizelge 2.1.2.1’de gösterilmiştir. Aflatoxinler gıda ve yem maddelerinde çok kararludur, ancak çok düşük veya yüksek pH’larda (3’den az ve 10’dan büyük), okside edici ajanlarla ve oksijen olan ortamda UV ışığına maruz kaldıklarında hızla aktivasyonlarını yitirirler (Stoloff 1977; Groopman and Kensler 1988).

Çizelge 2.1.2.1. Aflatoksinlerin formül ve özelliklerini gösteren çizelge (Wyllie and Morehouse 1977)

| Aflatoksin | Molekül Formülü | Molekül Ağırlığı | Erime Noktası | Ultraviyole Emilimi | Floresans Emisyonu |
|-----------------|--|------------------|---------------|---------------------|--------------------|
| B ₁ | C ₁₇ H ₁₂ O ₆ | 312 | 268-269 | 21.800 | 425 |
| B ₂ | C ₁₇ H ₁₄ O ₆ | 314 | 286-289 | 23.400 | 425 |
| G ₁ | C ₁₇ H ₁₂ O ₇ | 328 | 244-246 | 16.100 | 450 |
| G ₂ | C ₁₇ H ₁₄ O ₇ | 330 | 237-240 | 21.000 | 450 |
| M ₁ | C ₁₇ H ₁₂ O ₇ | 328 | 299 | 19.000(357 nm) | 425 |
| M ₂ | C ₁₇ H ₁₄ O ₇ | 330 | 293 | – | – |
| B _{2A} | C ₁₇ H ₁₄ O ₇ | 330 | 240 | 20.400 | – |
| G _{2A} | C ₁₇ H ₁₄ O ₈ | 346 | 190 | 18.000 | – |
| R ₀ | C ₁₇ H ₁₆ O ₆ | 314 | 230-234 | 14.100 | 425 |
| B ₃ | C ₁₆ H ₁₄ O ₆ | 302 | 233-234 | 9.700 | – |
| GM ₁ | C ₁₇ H ₁₂ O ₈ | 344 | 276 | 12.000(358 nm) | – |
| P ₁ | C ₁₆ H ₁₀ O ₆ | 298 | >320 | 14.900(342 nm) | – |

Toksijenik *A. flavus* kültürleri ve aflatoksin ile kontamine olmuş ürünlerdeki biyolojik aktiviteden AFB₁ ve daha az olarak da AFG₁ sorumludur. Bu durum, her iki toksinin terminal furan halkasınının 8, 9 karbon pozisyonunda bir doymamış bağa sahip olmasıyla ilişkilendirilmektedir (Groopman and Kensler 1988; Özkaya ve Temiz 2003). Aflatoksin B₂, B₁'in, aflatoksin G₂ de G₁'in dihidro türevleridir (Betina 1989; Özkaya ve Temiz 2003) ve “*in vivo*” koşullarda metabolik olarak B₁ ve G₁'e okside olmadıkları sürece biyolojik olarak inaktiftirler (Groopman and Kensler 1988; Özkaya ve Temiz 2003). Bu dört aflatoksin dışında aflatoksin M₁ ve aflatoksin M₂ olarak isimlendirilen önemli iki aflatoksin türevi daha bulunmaktadır. M toksinleri aflatoksinli yemle beslenen laktasyon devresindeki memeli hayvanların sütlerinden ve idrarlarından izole edilmiştir. Bu toksinler de ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boyu UV ışığı altında mavi floresan verirler ve B toksinlerinden daha düşük R_f değerlerine sahip olmalarıyla ayrılırlar (Bullerman 1979; Betina 1989; Özkaya ve Temiz 2003).



Şekil 2.2.2.2. Aflatoksinlerin sentez basamakları (Wyllie and Morehouse 1977)

Aflatoksin M_1 ve M_2 , aflatoksin B_1 ve B_2 'nin hidroksi türevleridir. Aflatoksin M_2 aynı zamanda, dihidro-aflatoksin M_1 'dir (Şekil 2.2.2.2.). Aflatoksin çeşitlerinin sentez basamakları Şekil 2.2.2.2'de gösterilmiştir. Aflatoksin B_1 ve G_1 'in hemiasetal türevleri olan aflatoksin B_{2a} ve G_{2a} da (Şekil 2.2.2.2.), *A. flavus*'un doğal metabolitleri olarak izole edilmişlerdir. Bu türevler, aflatoksin B_1 ve G_1 'in asitli ortamda hidroksillenmesi ile

de elde edilmektedir ve bu özellikten aflatoksin B₁ ve G₁'in doğrulanmasında yararlanılmaktadır (Betina 1989).

2.1.3. Aflatoksinlerin konsantrasyonunun azaltılması

Hayvanların yemlerine karnitin ilavesinin de faydalı olacağı bildirilmektedir. Bu yönde yapılan bir çalışmada, aflatoksinli yemlere karnitin ilavesi ile karaciğerde meydana gelen bozuklukların azaldığı, aflatoksin etkili yağlı karaciğer olgusunun karnitin tarafından engellendiği saptanmıştır (Sachan and Yatim 1992).

Aflatoksin içeren yemlere bağlı olarak safra kanalı hücre hiperplazisi, çekirdek büyümesi, karaciğer hücre büyümesi gibi bozukluklar mangan sülfat ilavesiyle önemli düzeyde engellenmiştir. Ayrıca hayvanlarda aflatoksikozise bağlı olarak şekillenen serum kolesterolü ve karaciğer glikojenindeki artışlar da mangan sülfat ilavesiyle azaltılmıştır (Hastings and Llewellyn 1987).

2.1.4. Aflatoksinlerin canlılar üzerine etkileri

Aflatoksinler, yüksek dozlarda akut, subletal dozlarda ise kronik toksisite göstermektedirler. Düşük dozda sürekli alımları, birçok hayvan denemesinde karsinojen etki ile sonuçlanmıştır. Aflatoksinler içerisinde en yüksek toksisiteyi AFB₁ göstermektedir. Aflatoksinlerden hayvanların birçoğu etkilenmektedir, ancak duyarlılık türden türe değişmektedir ve aynı türün genç olanları yaşlı olanlardan daha duyarlıdır. Ayrıca toksik etki, tüketilme miktarı ve sıklığına, hayvanın cinsine, yaşına, cinsiyetine, sağlık durumuna ve beslenmesine bağlı olarak değişmektedir (Hsieh *et al.* 1977; Bullerman 1979, 1986).

Civciv, piliç ve ördek yavruları en duyarlı olanlardır, bunları sırasıyla hindi yavrusu, sülün palazı, tavuklar ve bildircinlar izler. Memeliler arasında ise aflatoksinden etkilenme sırası; 3–12 haftalık domuzlar, hamile domuzlar, yetişkin domuz, sığır ve

koyunlar şeklindedir. Alabalıklar ve köpekler de aflatoksin'e duyarlı hayvanlardır. Alabalıklarda, ppb düzeyindeki çok düşük konsantrasyonda bile karaciğer kanseri etkisi görülmektedir (Bullerman 1979; Smith and Moss 1985).

Aflatoksinler, yüksek dozlarda akut toksisiteye neden olabilirler. Hayvanların çoğunda gözlenen akut aflatoksikozisin klinik bulguları; iştah azalması, ağırlık kaybı, nörolojik anormallikler, mukoz membranlarda sarılık, kasılma ve sonunda ölümdür. Karaciğerde rengin açılması veya tamamen renksizleşme ve yağ birikimi belirgin olarak görülür. Vücut boşluklarında sıvı birikimi ile böbrek ve bağırsaklarda kanama da meydana gelebilir (Bullerman 1979).

Aflatoksinler, subletal dozlarda, kronik etki göstermektedir. Subletal dozlarda aflatoksin uygulanan hayvanlarda, karkasın sararması ve karaciğerde siroz görülmüştür (Bullerman 1979). Düşük düzeyde ancak uzun süreli aflatoksin alımı ise, birçok deney hayvanında karaciğer kanseri ile sonuçlanmaktadır. Deney hayvanlarından alınan bu sonuçlara bağlı olarak aflatoksinin kuvvetli bir hepatokarsinojen olduğunun belirlenmesi üzerine, insanlar üzerindeki etkisini anlamak amacıyla çok sayıda etiyolojik çalışma yapılmıştır. Asya ve Afrika'nın çeşitli ülkelerinde yapılan bu çalışmalarda; karaciğer kanserine yakalanma sıklığı ile aflatoksinle kontamine olmuş gıdaların tüketim düzeyi arasında kuvvetli bir ilişki gözlenmiştir (Wilson 1978; Ueno 1985). Bu etiyolojik çalışmalarda bir dönem diğer hepatokarsinojenik etmen olan hepatit B virüsü enfeksiyonunun dikkate alınmadığı gerekçesiyle bir tartışma başlatılmıştır (Denizel 1989). Ancak son yıllarda yapılan moleküler genetik çalışmalarda, aflatoksinin insanlarda karaciğer kanserine neden olduğu konusunda önemli bulgular elde edilmiştir (Öztürk 1995). İnsan karaciğer kanseri, kanser türleri arasında dünyada 5. sırada sık gözlenen bir kanserdir. Ölümle sonuçlanan kanserler sıralamasında ise 3. sıradadır (Parkin *et al.* 2001). Uluslar arası kanser araştırmaları ajansına göre çinde görülen karaciğer kanserlerinin %54'ü aflatoksin ve hepatit B kaynaklıdır (IARC 1985). Uganda, Tayland, Kenya, Mozambik ve Çin'de yapılan araştırmalarda aflatoksin tüketimi ile karaciğer kanseri arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur. ABD'nin aflatoksin tahmini tüketimi daha fazla olan güneydoğusunda

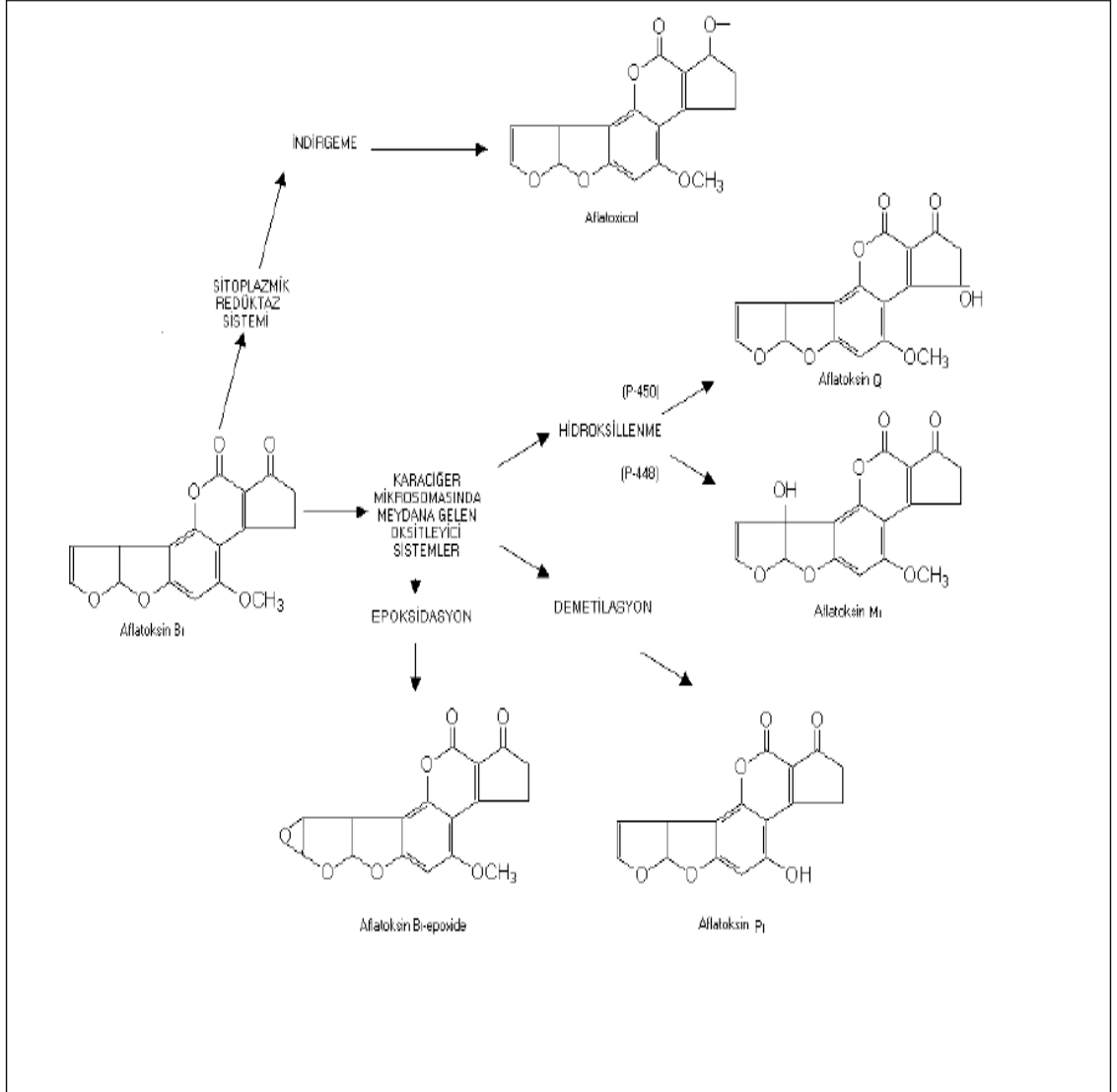
kuzey ve batısına göre %10 daha fazla karaciğer kanserine rastlanmaktadır. IARC'e göre aflatoksinlerin neden oldukları kanser oranları artmaktadır (IARC 1987). Daha sonraki raporlarda da bu tekrarlanmıştır (IARC 1993; 2002).

İnsan kromozomları üzerine AFB₁'in AFG₁'e göre daha toksik olduğu görülmüştür. Ayrıca insan kromozomlarından bazı kromozomların AFB₁'e daha dirençli, bazı kromozomların ise daha dirençsiz olduğu tespit edilmiştir. AFB₁'in özellikle 2, 11, 19 ve 20. kromozomları daha çok, AFG₁'in de 1, 2, 3, 4 ve 5. kromozomları daha çok etkilediği ortaya konulmuştur. Genel olarak boyca uzun olan kromozomların aflatoksinlerden daha çok etkilendikleri tespit edilmiştir (el-Zawahri *et al.* 1977;1990).

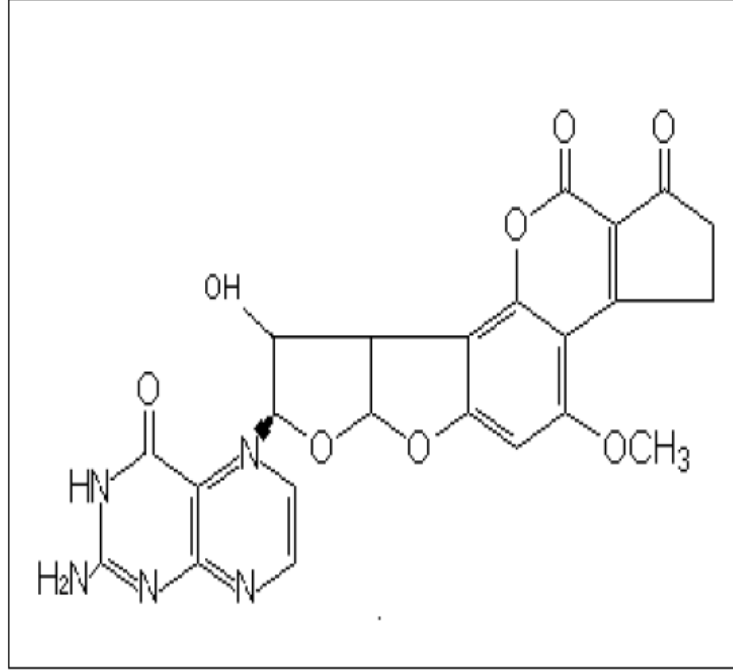
AFB₁'in karsinojenite ve mutajenitesi vücuttaki metabolizması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Aflatoksinler, hayvanlarda öncelikle mikrozomal ve sitoplazmik oksijenaz enzim sistemleri tarafından metabolize edilmektedir. Bu enzim sistemleri, esas olarak karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumunda bulunan, sitokromla ilişkili enzimlerle, O₂'ye ve NADPH'a bağımlı enzimlerin kompleks bir organizasyonudur. Bu enzimler, çeşitli hidroksillenmiş türevlerin ve yüksek reaktif özelliğe sahip epoksid metabolitin oluşmasıyla sonuçlanan AFB₁'in oksidatif metabolizmasını katalize etmektedir (Ueno 1985). Bu sistemlerle AFB₁'in metabolizma yolları ve AFB₁'in çeşitli metabolitlere biyotransformasyonu Şekil 2.1.4.1. de görülmektedir.

Aflatoksin M₁ daha önce de değinildiği gibi, AFB₁'in hidroksillenmiş türevlerinden biridir ve karsinojenik gücünün AFB₁'den 10 kat daha düşük olduğu belirtilmektedir. Mikrozomal hidroksilasyon ve dimetilasyon reaksiyonları sonucunda oluşan aflatoksin Q₁ ve P₁ metabolitleri de AFB₁'den çok daha az aktif olan maddelerdir. Bu nedenle bu reaksiyonlar, detoksifikasyon prosesi olarak kabul edilmektedir. Metabolizmada AFB₁ in detoksifikasyonu; hidroksillenmiş metabolitlerin sülfat ve glukuronik asitle birleşerek, suda çözünebilir sülfat veya glukuronid esterlerine dönüşmesi, ardından da idrar ve safra ile atılması ile tamamlanmaktadır. Bu biyotransformasyon olaylarında esas önemli olan proses, yine bu enzim sistemleriyle meydana gelen AFB₁'in

epoksidasyonu prosesidir. Burada, bifuran halkasındaki çift bağı epoksidasyonu sonucu çok reaktif bir form oluşmaktadır. Bu elektrofilik epoksid DNA, RNA ve protein gibi hücresel makromoleküllerdeki çeşitli nükleofilik merkezlere kovalent olarak bağlanabilmektedir (Ueno 1985).



Şekil 2.1.4.1. AFB₁'in farklı metabolitlere dönüştürülmesi (Ueno 1985)



Şekil 2.1.4.2. AFB₁-N7-Guanil kompleksi (Ueno 1985)

Bu bağlanmanın sonucu olarakta DNA sentezini, DNA'ya bağlı RNA polimeraz aktivitesini, mRNA ve protein sentezini inhibe edilmektedir (McLean and Dutton 1995). AFB₁'in epoksi formunun bu aktifleşme reaksiyonunun sonucunda DNA ile birleşerek AFB₁-N7-Gua kompleksini oluşturduğu bilinmektedir. Bu kompleks organizma veya hücreler için biyolojik bir tehlike oluşturmakta, karsinojenik ve genotoksik etkilerin sorumlusu olarak değerlendirilmektedir.

Şekil 2.1.4.2 de AFB₁-N7-Gua kompleksinin yapısı görülmektedir. AFB₁ alımı ile karaciğer kanseri arasında pozitif ilişki bulunan Kenyada bir bölgesinde hastalardan toplanan idrarlarda AFB₁-N7-Gua kompleksi belirlenmiştir (Ueno 1985).

İnsanlarda AFB₁ sitokrom P450 enzimi tarafından reaktif bir form olan aflatoksin-exo-8,9-epoksit formuna dönüştürülür. Bu formdaki AFB₁ DNA'ya ve serum albüminine bağlanabilir. Aflatoksinin endo epoksit formunun mutajenitesi yaklaşık 1000 kat kadar exo formuna göre daha düşüktür. AFB₁-exo-8,9-epoxid formu DNA'nın yapısında

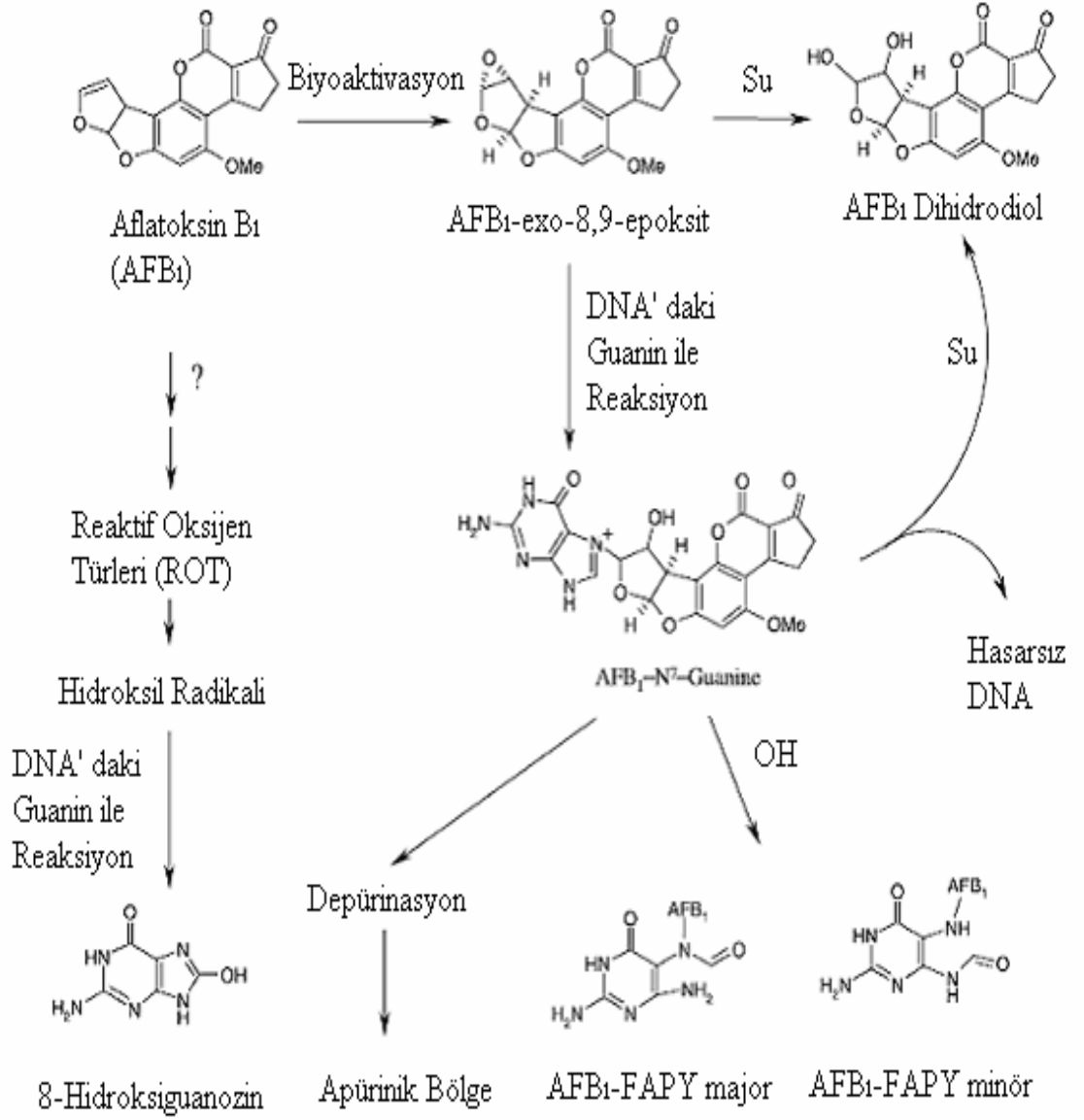
guanin nükleotidine bağlanarak transversiyon tipi mutasyona neden olurlar. AFB₁-N7-Gua nin formuda 3 farklı reaksiyona uğrar. Ya AFB₁-8,9-dihydrodiol forma dönüşür veya depürinasyona uğrar ya da imidazol halkasının açılması ile AFB₁-formamidopyrimidine (AFB₁-FAPY) minor ve major formlarına dönüşür (Şekil 2.1.4.3.) (Bedard and Massey 2006).

AFB₁'in karaciğer kanserine neden olmasının en önemli sebebi, DNA'daki N7-Guanine bağlanarak G-T transversiyona neden olmasıdır (Şekil 2.1.4.2.). Özellikle bu mutasyonlar tümör baskılayıcı gen olan p53 geninin 249 kodonunda meydana geldiğinde karaciğer kanserine sebep olur. İnsanlardaki kanser sayısı ve çeşitleri ile p53 geni arasında ilişki olduğu belirlenmiştir. Tahmini olarak aflatoksinli besinlerin daha çok tüketildiği Çin'de karaciğer kanseri olan hastaların yaklaşık %50'sinde p53 geninin 249. kodonunda G-T transversiyon olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık tahmini olarak aflatoksinli besinlerin daha az tüketildiği Avrupa ve Japonya da p53 geninin 249. kodonda mutasyon tespit edilmemiştir (Hsu *et al.* 1991). Yapılan başka bir arştırmada da Çin'deki karaciğer kanseri hastalardan aflatoksine yüksek oranda maruz kalınan Quidong bölgesinde 20 hastanın 9'unda (%45) 249. kodon mutasyonu görülürken, Shangai bölgesindeki 18 hastanın 3'ünde (%17) 3 te 1 hastada (%33) oranında 249. kodon mutasyonu tespit edilmiştir (Li *et al.* 1993).

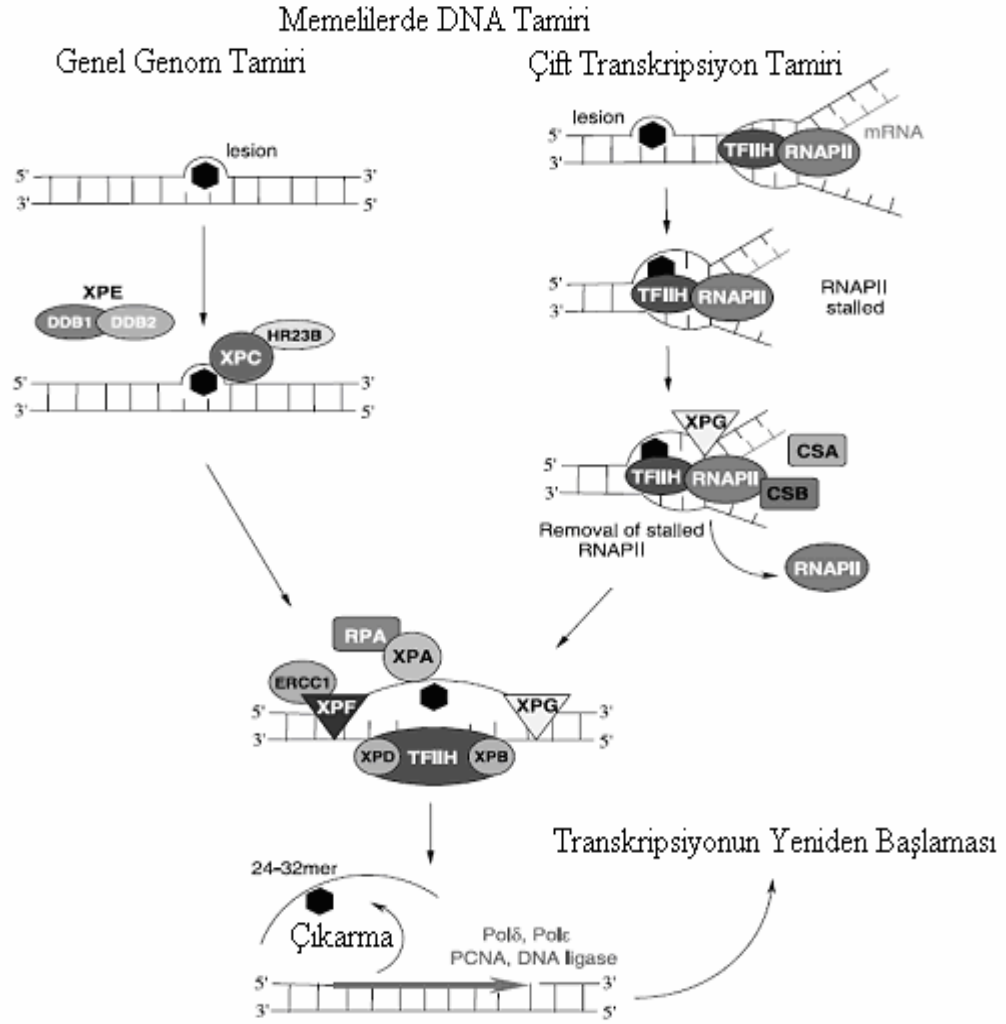
Tümör supressör geni olan p53 geni hücre siklusunun kontrol noktalarından DNA hasarı kontrol noktasında (G1/S) DNA'yı kontrol eder. Eğer DNA'daki hasar onarılacak düzeyde ise DNA tamir edilinceye kadar hücre döngüsünü durdurur, DNA tamir edilemeyecek düzeyde hasarlı ise hücreyi apoptosise yönlendirir (Jin and Levine 2001)

AFB₁'in neden olduğu DNA hasarları tamir edilebilir. Memelilerde DNA'daki hasarı tamir (nucleotide excision repair=NER) mekanizması vardır. Burada AFB₁ DNA'ya bağlanarak hasara neden olduğu için hasarlı olan nükleotid DNA'dan çıkarılarak tamiri gerçekleştirilebilir. NER iki şekilde gerçekleştirilir. İlk olarak transkripsiyona bağlı olmadan DNA'da nükleotidlerdeki hasar tespit edilerek genel genom tamiri (global genome repair=GGR) mekanizması ile tamir edilebilir. İkinci olarakta DNA'nın

transkripsiyonu sırasında hasarlı bölge bir dizi reaksiyon ve çift transkripsiyon tamiri (transcription coupled repair=TCR) sonunda çıkarılır. Daha sonrada transkripsiyon tekrar başlatılır (Şekil 2.1.4.4.) (Bedard and Massey 2006).



Şekil 2.1.4.3. AFB₁ in biyoaktivasyonu ve DNA ile etkileşimleri (Bedard and Massey 2006)



Şekil 2.1.4.4. Memeli hücrelerinde meydana gelen hasarların onarım mekanizması (Bedard and Massey 2006). DNA'daki hasarı tamir (nucleotide excision repair=NER) mekanizması, genel genom tamiri (global genome repair=GGR) ve çift transkripsiyon tamiri (transcription coupled repair=TCR) olmak üzere iki yolu vardır. CSA, CSB: Cockayne's sendromu proteini A ve B; DDB1, DDB2, hasarlı DNA bağlı proteinler; PCNA: bölünen hücre nükleer antijeni; Pol δ , Pol ϵ , DNA polimeraz; RNAPII, RNA polimeraz II; RPA, replikasyon protein A; XP, xeroderma pigmentosum.

2.2. Kardeş Kromatid Değişimi

Biyolojik varlıklarda bir kısım fiziksel, kimyasal veya farklı kaynaklardan oluşan mutajenlerin genom materyali üzerinde hasar oluşturabileceği uzun yıllardan beri bilinmektedir. Bu genotoksik etkileri gösterebilmek ve kantitatif olarak belirleyebilmek için bir çok test sistemleri geliştirilmiştir. Bu test sistemleri gerek *in vivo* gerekse *in*

vitro ortamlarda kullanılabilir. Bunlar içerisinde en sık kullanılanlardan biri olan KKD replikasyon esnasında bir metafaz kromozomunda kromozom morfolojisini değiştirmeden kardeş kromatidler arasında değişimi ifade etmektedir. KKD testi hızlı ve güvenilir olmasının yanında duyarlı ve basit bir testtir.

KKD testi, çevredeki atıkların etkisini araştırmak için 1957 yılında Taylor ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olup, kısa süreli mutajenite ve karsinojenite testleri arasında en hassas ve en fazla kabul edilen yöntem haline gelmiştir (Taylor *et al.* 1957). Mutajen ve kanserojenlerin KKD'yi artırdığını belirtmelerinden sonra KKD yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır (Perry and Evans 1975). KKD genetik hasarlar hakkında bilgi verebilen ve sitogenetikte oldukça yaygın bir kullanıma sahip olan hassas bir testtir (Öztürk 1995).

Mutajen ve kanserojenlerin toksik dozların altındaki dozlarda meydana getirdikleri genetik hasarların kısa zamanda, hassas bir şekilde ve nicel olarak gösterilmesinin KKD analizi ile mümkün olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar bir maddenin mutasyon meydana getirmesi ile KKD oluşumunun uyarılması arasında lineer bir ilişki olduğunu da belirtmişlerdir. Görüldüğü gibi bir maddenin mutajen ve kanserojen olup olmadığının belirlenmesi, bu maddenin KKD'ni uyarmadığının saptanması ile de mümkün olabilmektedir (Carrano *et al.* 1978). Ancak KKD'de ortaya çıkan artışların uzun süre sonra yapılan kontrollerinde ise KKD'deki bu artışın normale inmesi şeklinde düzelmelerin olduğu da tespit edilmiştir (Ikbali *et al.* 2003). Buradan da şu fikre varılabilmektedir ki, belli kimyasal veya fiziksel etkiler arasında genom materyalinin vermiş olduğu KKD'deki artış yönündeki tepki, yine genom içerisinde kalıcı olmadan da düzeltilebileceğidir. Şu da unutulmamalıdır ki, KKD artışlarının hangi durumda veya ortamda düzelebileceği ve hangi durumlarda kalıcı olacağı kesinlikle bilinmemektedir.

2.2.1. KKD yöntemini etkileyen faktörler

KKD frekansı sağlıklı insanlarda da belirli düzeyde görülmektedir. İnsan lenfositlerinde KKD'nin ve KA'nın temel sıklığında kişiden kişiye ve kişinin yaşına, cinsiyetine, sigara

alışkanlığına, yaşam şekline, mesleğine bağlı olarak arttığı gösterilmiştir (Latt and Schreck 1980). İnsanda oluşan KKD'ye, enfeksiyon, kimyasal maddeler, radyasyon ve virüsler de neden olabilmektedir (Garret *et al.* 1986). Tarım ile uğraşan ve pestiside maruz kalan insanlarla bu bileşiklere maruz kalmayan bireyler arasında yapılan çalışmalar, pestiside maruz kalan insanlarda, yapısal ve sayısal KA ler ile KKD'nin yüksek oranlarda tekrarlandığını göstermektedir (De Ferrari *et al.* 1991). Adriamycin ile Down sendromlu hastalarda yapılan çalışmalarda, adriamisinin KKD'yi önemli derecede artırdığı bulunmuştur (Gadhia *et al.* 1991). KKD oranları sigara içmeyenlere göre sigara içenlerde (bayanlarda, erkeklerde ve genel toplamda) daha yüksek olduğunu belirleyerek sigaranın KKD bazında genotoksik etkisini belirlemiştirler (Akbaş vd. 2001). Sigara ve tütün kullanımının KKD oranlarına etkisini incelediği çalışmada kontrol grubunda 5.48 olan KKD oranının sigara içenlerde 8.15'e ve pipo kullananlarda 10.12'ye yükseldiğini saptamıştır (Ghosh *et al.* 1987). KKD yi etkileyen faktörler aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir.

- a) Yaş: KKD sıklığında yaşın bir etkisi olmadığı şeklinde çalışmalar yanında, çocuklarda KKD sıklığının yetişkinlere göre daha az olduğunu gösteren yayınlar da vardır (Baysal *et al.* 2003).
- b) Genetik: Birçok kalıtsal hastalıkta (Bloom sendromu vs.) KKD oranının çok arttığı bilinmektedir (Baysal *et al.* 2003).
- c) Diyet: Sigara kullanımı ve kronik alkoliklerde KKD sıklığında artış bildirilmiştir (Gantt *et al.* 1978).
- d) İlaç kullanımı: Kullanılan birçok ilacın (Penisilin, Nitrofrontoin vs.) KKD sıklığını arttırdığı yönünde bulgular bulunmaktadır (Baysal *et al.* 2003).
- e) Hastalık ve Enfeksiyon: Behçet hastalığı, anklizon spondilit vb birçok kronik hastalıkta, viral enfeksiyonlarda KKD sıklığının arttığı gösterilmiştir (Baysal *et al.* 2003).
- f) Kanın çalışma zamanı: Alınan kanların 24 saat içerisinde çalışılması önerilmiştir (Baysal *et al.* 2003).

g) Diğer: İnektisitler, Peptiside, X-ray, UV ve petrol ürünü gibi kimyasal ajanların dahil olduğu çevresel faktörlerin KKD oranını arttırdığı bilinmektedir (Baysal *et al.* 2003).

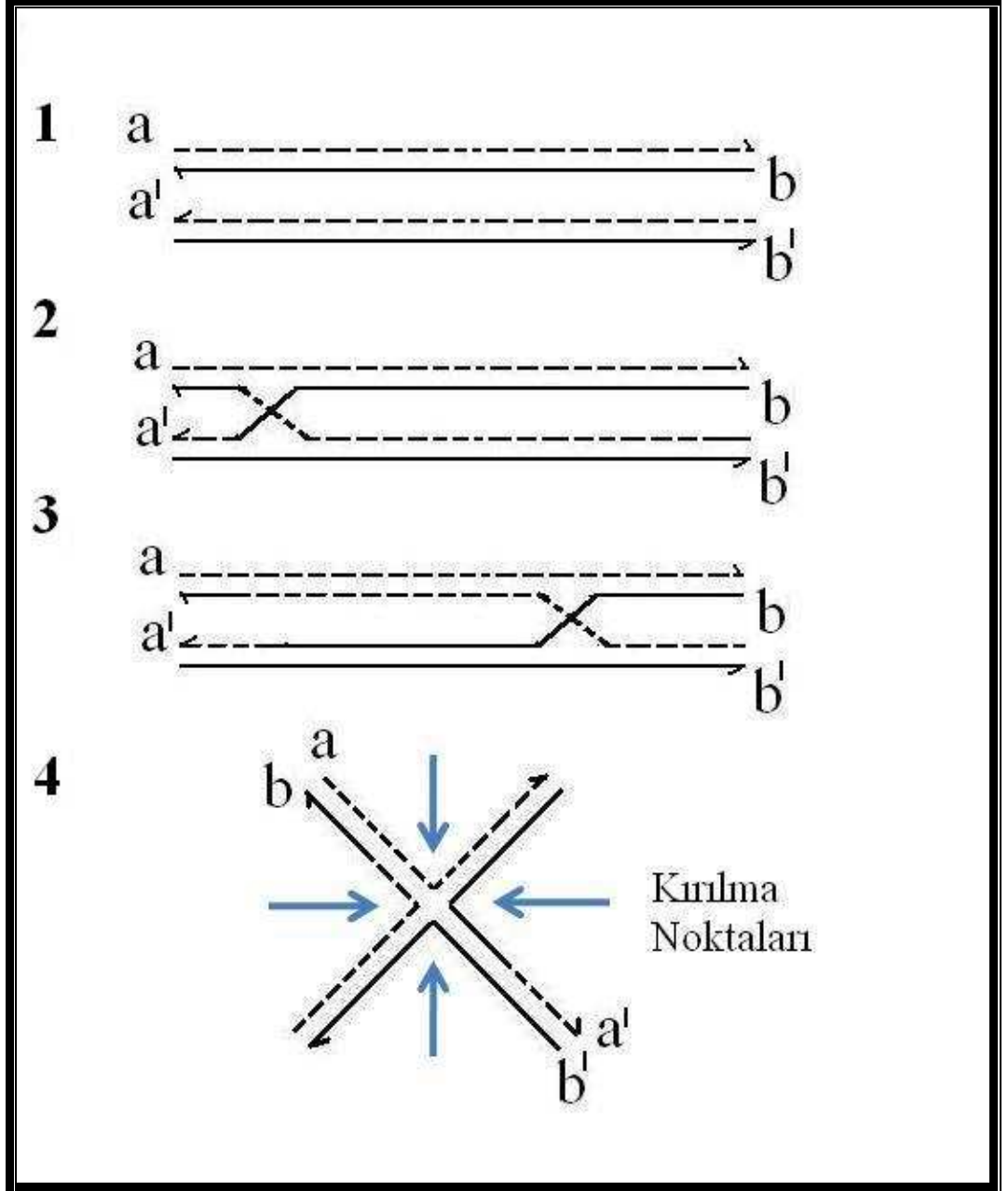
2.2.2. KKD'nin oluş mekanizmaları

İç veya dış etkenlerin etkisiyle hücre DNA'sındaki değişikliklere bağlı olarak meydana gelen KKD'lerin oluş mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Birçok araştırmacı tarafından değişik modeller öne sürülmüştür.

Loveday ve Latt tarafından öne sürülen modelde, her bir çift sarmalda tek zincir kırığı oluşmakta ve çiftlerden birindeki bir zincir ile karşı DNA'nın tamamlayıcı zinciri arasında gerçekleşmektedir. Kalıp DNA'dan timidin yerine 5-bromodeoksiüridine (BrdU) alınarak komplementer DNA zinciri sentezlenmektedir (Şekil 2.2.2.1). Rekombinant heterodubleks uçlar oluşmakta, sentezin ilerlemesiyle heterodubleks bölgeler uzamaktadır. DNA molekülünün kırılma ve tekrar tamir edilme noktası etrafındaki rotasyonu ile X formasyonu meydana gelmektedir. Bu yapıdaki çentiklerin oluşması ve bunların ligazla birleştirilmesi sonucu her iki zincirde BrdU ve her iki zincirde timin içeren iki rekombinant yapı oluşmaktadır (Şekil 2.2.2.2 ve Şekil 2.2.2.3). Bunlar farklı boyanarak KKD'lerin görünür hale gelmesini sağlar (Latt and Schreck 1980). Bu yöntemde timidin bazının analogu olan BrdU replikasyonu aksatmadan DNA'nın yapısına girer. BrdU mevcudiyetinde, replikasyonun ilk siklusunda iki kardeş kromatidden yalnızca birisi BrdU içerir, diğeri içermez. BrdU'nin timinin yerine girdiği kromatide boya bağlama kapasitesi azalmıştır. Giemsa ile boyanınca ayrı fizikokimyasal özellikler taşıyan BrdU ve timidin içeren DNA bölgeleri farklı affinite gösterdiğinden, iki kardeş kromatidden BrdU içeren DNA bölgeleri daha az ve daha açık tonda boyanmasıyla kardeş kromatidlerin ayrılması mümkün olmaktadır (Zakharov *et al.*, 1974).

1973'de Latt floresan bir boya olan Hoechst-33258 ile insan kromozomlarında kardeş kromatidlerin farklı tonlarda boyandığını göstermiştir (Allen and Latt 1976). Sonuçta

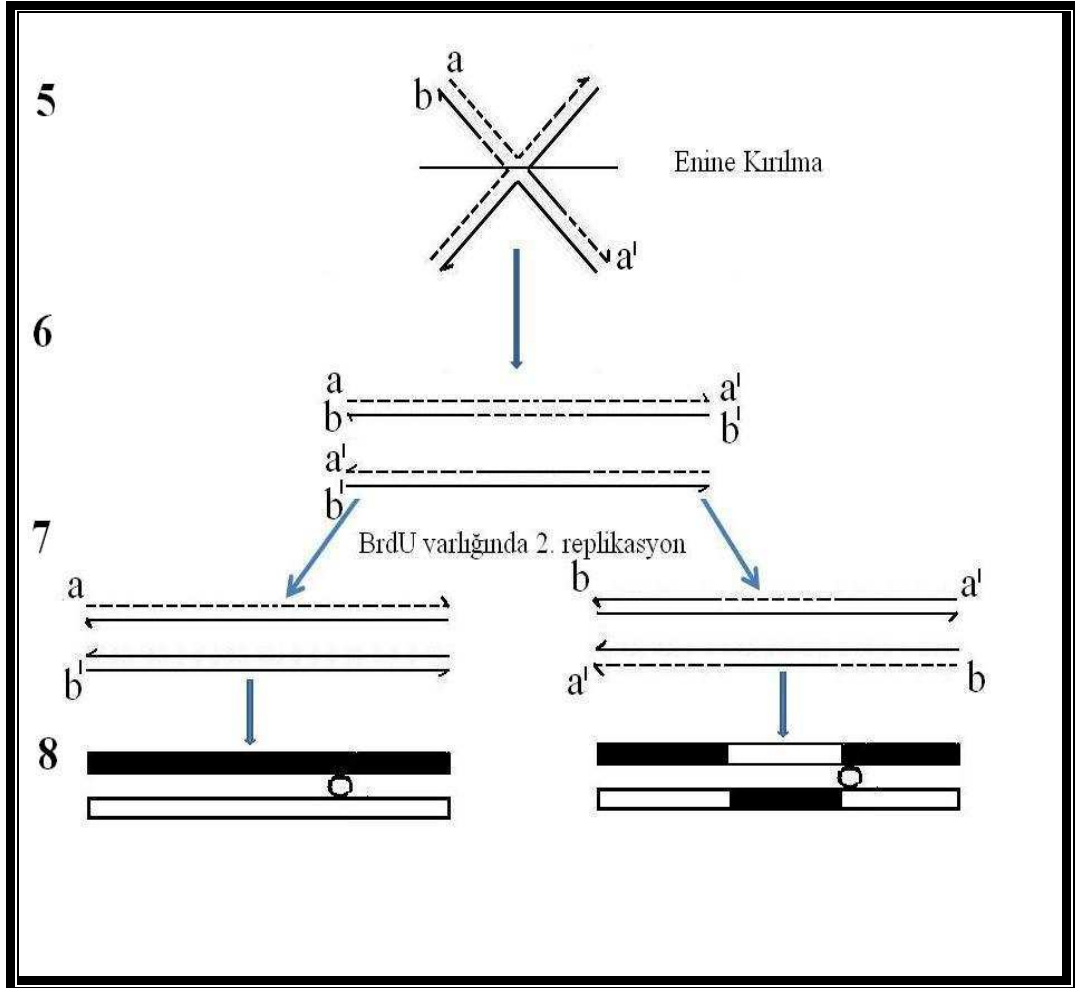
BrdU'li kromatid giemsa ile açık boyanırken, kardeş kromatidi koyu boyanmış olarak görülecektir.



Şekil 2.2.2.1. Loveday ve Latt isimli araştırmacılara göre KKD oluş mekanizması

1-Timin içeren kalıp DNA Timin yerine BrdU alınarak sentezlenen koplementer DNA,
 2-Her bir dublekste tek zincir kırığı oluşması ve zincirlerin krosing-over sonucu kardeş DNA dubleksinin zinciri ile birleşmesi,

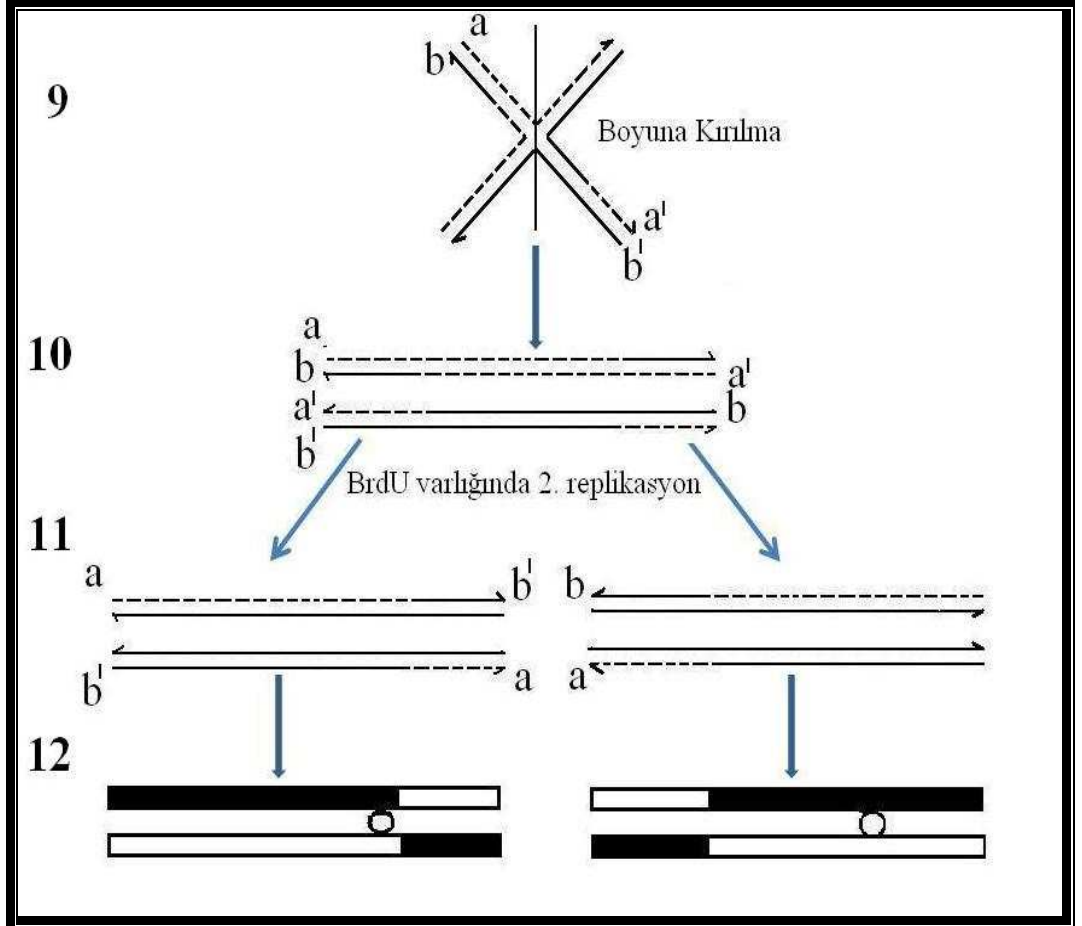
- 3-Sentezin ilerlemesi ile timin ve BrdU içeren heterodubleks zincirlerin oluşması,
 4-Molekülün krosing-over noktası etrafındaki rotasyonu ile X formunun meydana gelmesi,



Şekil 2.2.2.1. Loveday ve Latt isimli araştırmacılara göre KKD oluş mekanizması

- 5-Molekülün Krosing-over noktası etrafındaki rotasyonu ile oluşan X formunda enine kırılma meydana gelmesi,
 6-Krosing-over noktasında kırılmalarla oluşan kırık parçaların birbirleri ile değil de kardeşlerinin parçaları ile birleştirilmesi sonucu aynı dubleks üzerinde timin, diğerinde BrdU içeren bölgelerin oluşması,
 7-Ortamda BrdU mevcutken 2. replikasyonun geçirilmesi ve sadece BrdU içeren komplementer zincirlerin sentezlenmesi,

8-Her iki zincirinde BrdU içeren bölgelerin soluk, her iki zincirinde timin veya bir zincirinde BrdU, diğerinde timin içeren bölgelerin koyu boyanması sonucu KKD gözlenmesi bu mekanizmanın esasını oluşturmaktadır.



Şekil 2.2.2.1. Loveday ve Latt isimli araştırmacılara göre KKD oluş mekanizması

9-Molekülün krosing-over noktası etrafındaki rotasyonu ile oluşan X formunda boyuna kırılma meydana gelmesi,

10-Krosing-over noktasında kırılmalarla oluşan kırık parçaların birbirleri ile değil de kardeşlerinin parçaları ile birleştirilmesi sonucu aynı dubleks üzerinde timin, diğerinde BrdU içeren bölgelerin oluşması,

11-Ortamda BrdU mevcutken 2. replikasyonun geçirilmesi ve sadece BrdU içeren komplementer zincirlerin sentezlenmesi,

12-Her iki zincirinde BrdU içeren bölgelerin soluk, her iki zincirinde timin veya bir zincirinde BrdU, diğesinde timin içeren bölgelerin koyu boyanması sonucu KKD gözlenmesi bu mekanizmanın esasını oluşturmaktadır.

KKD oluşum yerleri aktif replikon veya replikon kümeleri (cluster) ile ilişkilidir. KKD, tahminen aynı kromatid üzerindeki homolog yerde bulunan DNA replikon ürünlerinin intrakromozomal alışverişidir. KKD ni oluşturan replikon kümeleri 10-100'er adetlik DNA replikasyon ünitelerinden (replikonlardan) oluşur. Bu replikonların her biri 100 kilobaz (1 kilobaz=1.000 bazlık DNA segmenti) uzunluğundadır (İkbal *et al.* 2003). Böylece bir clusterin büyüklüğü 1–10 megabaz (1 megabaz=1.000.000 baz) olarak hesaplanabilir, bu da yaklaşık olarak yüksek rezolusyonlu bir kromozom bandındaki DNA miktarına eşittir. Bu durumda clusterler ışık mikroskobu ile görülebilecek büyüklüğe ulaşmış olurlar (İkbal *et al.* 2003). Boya replikasyon kümeleri arasındaki birleşme çizgileri, KKD formasyonuna eğilimli kararsız yerler olduğunu belirtmektedir. DNA hasarları replikon kümelerindeki replikasyon çatalında bir engel oluşturarak o segmentte replikasyonu durdurabilir. Replikasyonun iki yöne doğru ilerlediği düşünülürse yeni sentezlenmiş bir segmentle eski bir segment uç uca gelebilir ve KKD gerçekleşebilir. Bu tür bileşimlere DNA'daki çift zincir kırıkları da neden olabilir, bunlar da KKD oluşumuna yol açar (İkbal *et al.* 2003).

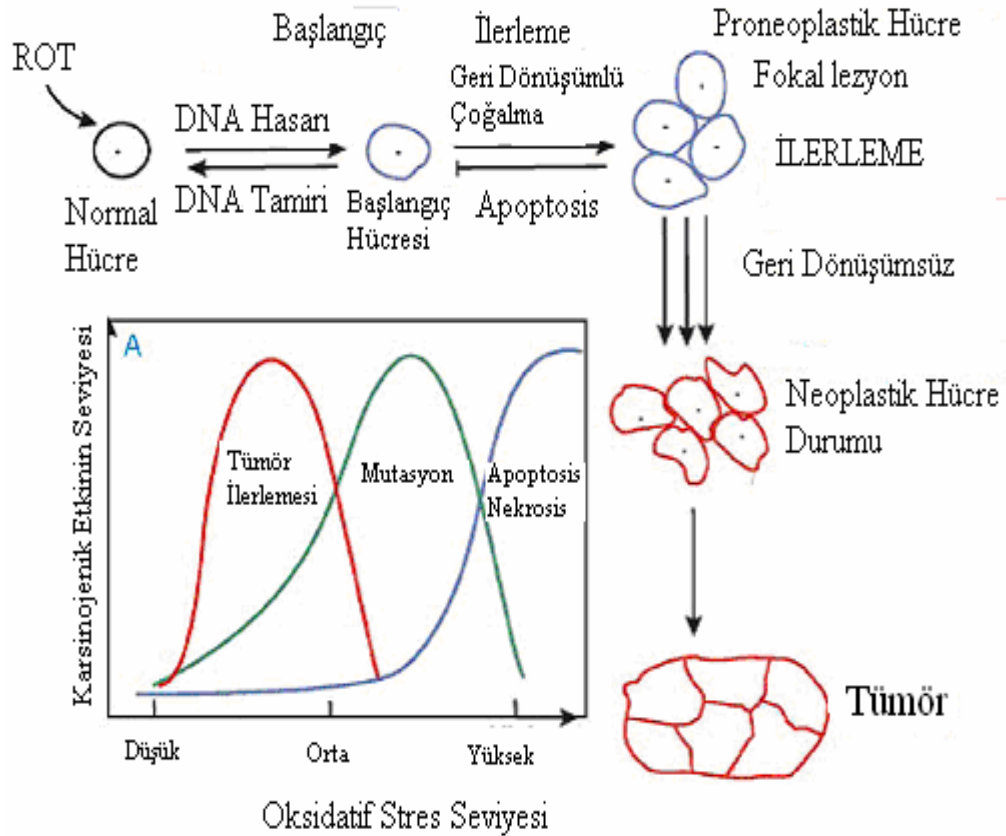
2.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller, son yörüngelerinde paylaşılmamış elektron içeren molekül ya da atomlardır (Woods *et al.* 2001). Elektronların bu dizilimi kararsız olduğundan radikaller hızlı bir şekilde diğere moleküllerle veya radikallerle reaksiyona girerek kararlı bir konfigürasyon oluşturmaya çalışırlar. Bu reaksiyonlar sonucunda oluşan en etkili serbest radikaller ROT'dir (Basu *et al.* 1999; Woods *et al.* 2001).

Organizmalardaki en aktif ROT üreticileri fagositoz hücreleridir. Çeşitli metabolik yangınlara uyarıldıklarında, oksijeni indirgeyerek hidroksil radikali (OH[•]), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve superoksit (O₂^{•-}) gibi ROT'ları oluştururlar. Diğere ROT kaynakları;

yine oksijenin katıldığı mitokondriyal elektron taşıma zinciri, doymamış yağ asitlerinin ve katesolaminlerin oksidasyonu ile NADPH bağımlı oksidazlardır (Basu *et al.* 1999; Thannickal and Fanburg 2000).

ROT üretimi hem ekzojen hem de endojen kaynaklı olabilmektedir. Ekzojen kaynaklar: Hava kirleticiler, doğal zararlı gazlar (ozon, oksijen), iyonize ve non-iyonize radyasyon, ilaçlar, alkol, patojenik bakteri ve virüsler (Halliwell and Gutteridge 2001). Endojen kaynaklar: Mitokondriyal, endoplazmik ve nükleer elektron transport sistemlerinde (Sitokrom P450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi normal metabolik olaylar sırasında bol miktarda serbest radikal üretilir (Akkuş 1996).



Şekil 2.3.1. Oksidatif stres seviyesinin hücrelerde meydana getirdiği etkiler (Valko *et al.* 2006)

Şekil 2.3.1. de görüldüğü gibi oksidatif stresin düşük seviyede olması tümör oluşumunu teşvik ederken, orta seviyede mutasyonlara, yüksek seviyede oksidatif stres ise hücre ölümlerine neden olmaktadır (Valko *et al.* 2006).

Çizelge 2. 3. 1. Papas (1999)'a göre ROT nin oluşumu (Turna 2008)

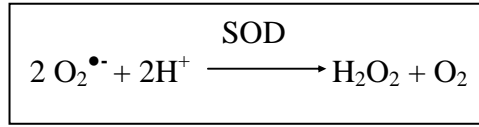
| Aktif oksijen türleri | Oluşum |
|---|--|
| Süperoksit($O_2^{\bullet-}$) | Oksijenin, enzimatik veya nonenzimatik yolla bir elektron redüksiyonu |
| Hidroksil radikali (HO^{\bullet}) | Suyun radyolizi, H_2O_2 'in metal-katalizli parçalanması, NO ve $O_2^{\bullet-}$ etkileşmesi |
| Alkoksil ve peroksil radikalleri ($LO^{\bullet-}$), ($LO_2^{\bullet-}$) | Hidroperoksitleri metal-katalizli parçalanması |
| Hidrojen peroksit (H_2O_2) | Süperoksitin dismutasyonu, şekerlerin oksidasyonu |
| Demir-oksijen kompleksi | Hemoglobin, Miyoglobin, vb. Fotosensitizasyon ile oksidasyon, |
| Singlet oksijen (1O_2) | peroksil radikalleri arasındaki biyomoleküler etkileşimler, hipoklorit ve hidrojen peroksit reaksiyonu |
| Lipit ve protein hidroperoksitler | Lipit ve proteinlerin oksidasyonu |
| Nitrojen dioksit (NO_2^-) | Peroksil radikali ve NO reaksiyonu, hava kirliliği ve sigara |
| Nitrik oksit (NO^-) | Nitrik oksit sentaz, nitrozo tiyol ve hava kirliliği |
| Tiyil radikalleri (RS^-) | Tiyollerden hidrojen atomu transferi |
| Protein radikalleri | Proteinlerden hidrojen atomu transferi |

ROT'lerinin başlıcaları süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, singlet oksijeni, peroksil ve alkoksil radikalleridir.

2.3.1. Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$)

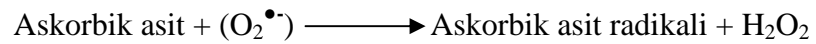
Nordberg ve Arner (2001)'a göre moleküler oksijenin indirgeyici bir ajandan bir elektron alması sonucu süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) oluşur. Çok reaktif bir serbest radikal değildir. Süperoksit nötral çözeltilerde negatif yüklüdür, lipit membranlara penetre olma özelliği yoktur, biyomembranları sadece anyon kanalları yoluyla aşabilmektedir ve bu nedenle üretildiği kısımda kalmaktadır (Turna 2008).

Süperoksit radikali oluştuğu yerden fazla uzağa gidemez. Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla hasar veremez, asıl önemli olan, H_2O_2 kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali sulu çözeltilerde H_2O_2 oluşturmaktadır. Süperoksitlerden biri elektronlarını diğerine verir, böylece birinci süperoksit $O_2^{\bullet-}$ 'ye okside olurken ikinci süperoksit H_2O_2 'e redükte olur. Bu reaksiyon dismutasyon olarak adlandırılır (Gutteridge and Halliwell 1994).



Süperoksit genel olarak anyon şeklinde tarif edildiği halde ortamın pH sına bağlı olarak protonlanarak katyon haline dönüşebilir. Bu durumda perhidroksi radikali (HO_2) ismini alır (Cherubini *et al.* 2005).

Süperoksit radikalının kimyasal davranışı nerede çözüldüğüne göre değişir. Suda süperoksit çok reaktif değildir. Bazen bir elektron alarak okside edici ajan olarak davranabilir. Buna örnek olarak askorbik asidin oksitlenmesi verilebilir (Gutteridge and Halliwell 1994).



Artmış süperoksit düzeyleri ise SOD enzimiyle H_2O_2 ve oksijene dönüştürülerek azaltılır. Böylece hücrel süperoksit düzeyi sıkı kontrol altına alınmış olur (Cherubini *et al.* 2005).

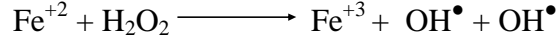
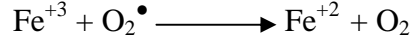
2.3.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektron indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya non-enzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur. Yapısında eşlenmemiş elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz (Halliwell and Gutteridge 1984). Üretildiği bölgede kalan süperoksitin aksine membranları geçen, sitozole diffüze olan ve uzun ömürlü bir oksidan olarak bilinir. Bu nedenle süperoksitin ulaşmadığı membranla korunan yapılara kolaylıkla ulaşabilir. Burada süperoksitle reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir (Cherubini *et al.* 2005). Hidrojen peroksitin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin sebebi demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalının öncülü gibi davranmasıdır (Halliwell *et al.* 1984).

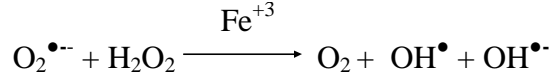
2.3.3. Hidroksil radikali (OH^\bullet)

Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan OH^\bullet , su dahil, ortamda rastladığı her molekül ile tepkimeye girer. Bütün bu tepkimeler OH^\bullet 'in eşlenmemiş elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (Halliwell *et al.* 1984). Aminoasitler, nükleik asitler, organik asitler, fosfolipitler ve şekerler gibi biyokimyasal maddelerin birçoğuyla reaksiyona girebilirler. Hidroksilin yarılanma ömrü çok kısadır (Cherubini *et al.* 2005). Başka yere göç edecek kadar uzun ömürlü değildir (Gutteridge and Halliwell 1994).

Biyolojik sistemlerde hidroksil radikali birçok reaksiyon ile oluşabilmektedir. Fe^{+3} 'ün süperoksitle indirgenip Fe^{+2} olması ve Fe^{+2} 'nin H_2O_2 ile reaksiyona girerek OH^\bullet oluşturması fenton reaksiyonu olarak bilinir (Gutteridge and Halliwell 1994).



Doğal enzimler ve glutatyon yetersiz düzeyde iseler süperoksit ve hidrojen peroksit ortamda serbestleşmiş halde bulunan Fe^{+3} veya Cu^{+2} katalizörlüğünde birbirleriyle reaksiyona girerek en güçlü radikal olan OH^{\bullet} molekülünü oluşturur. Bu reaksiyona Haber-Weis reaksiyonu denir (Aruoma *et al.*1991).



Hidroksilradikali yüksek enerjili iyonize radyasyon ile suyun radyolizi sonucu oluşabilmektedir (Gutteridge and Halliwell 1994). Hidroksil radikali, UV ile indüklenen hidrojen peroksitin O-O bağlarının homolitik kırılması sonucu da oluşmaktadır (Halliwell and Gutteridge 1996). Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. Hücre zarı su içermediğinden OH^{\bullet} 'ın başlıca hedefi yağ asitleridir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir (Nishiyama *et al.* 1998).

2.3.4. Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Singlet oksijen, moleküler oksijenin yüksek enerji ile uyarılmış formudur. Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunun reaktivitesi çok yüksektir. Singlet oksijen molekül yapısında iki adet eşlenmemiş elektron taşır. İhtiva ettiği yüksek enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde vererek yeniden oksijene dönüşebilir veya kovalent tepkimelere girerler (Stahl and Sies 2002).

2.3.5. Peroksil (ROO•) ve Alkoksil (RO•) radikalleri

Karbon merkezli radikaller, lipit, nükleik asit, karbonhidrat, protein gibi biyolojik moleküllerin hidroksil grubu ile reaksiyona girmesi sonucu oluşur. Bunlar hızlı bir şekilde O₂ ile reaksiyona girerek peroksi radikalini (ROO•) oluşturur. Peroksi radikalinden de alkoksil radikali (RO•) oluşabilir. Peroksil radikalleri askorbat ve NADH'ı okside etmekte; oksijen varlığında NADH'ın oksidasyonu ise süperoksit oluşumuna yol açmaktadır. Peroksil radikalleri ayrıca singlet oksijen oluşturmak üzere birbirleriyle reaksiyona girebilmektedir (Halliwell and Gutteridge 1996).

Genel olarak hücredeki ROT'nin oluşumu ve oluşan ROT'nin hasar meydana getirdiği hücre yapıları ve bunları etkisiz hale getiren antioksidan sistemler Şekil 2. 3. 5. 1'de gösterilmiştir. Ayrıca antioksidan özelliğe sahip SOD, GPx, glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimlerle GSH ın ROT'leri ile etkileşimi ile Fe atomlarının etkisinde Şekil 2. 3. 5. 1 de gösterilmiştir.

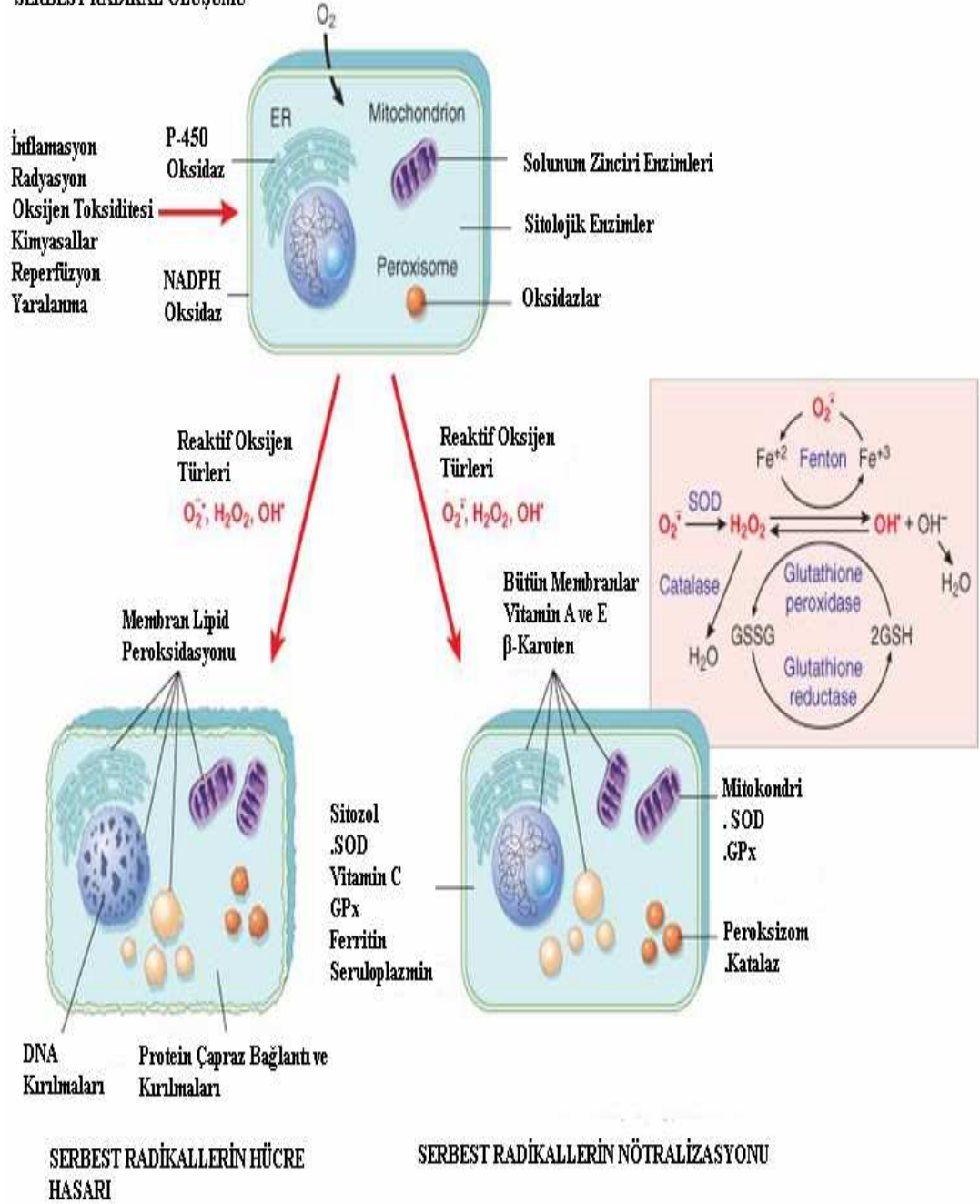
2.4. Antioksidanlar

Antioksidanlar, genel olarak serbest radikal oluşumunu engelleyen maddeler olarak tanımlanmışlardır (Powell 2000). Antioksidan savunma sistemi hücre içi ve hücre dışı olarak ikiye ayrılır.

a) Hücre içi savunma sisteminin enzimatik antioksidanları, SOD, CAT ve GPx'tir. Enzimatik olmayan hücre içi antioksidanlar; GSH, membranlara bağlanabilen α-tokoferol ve β-karoten, askorbat, transferin, seruloplazmin ve bilirubindir (Woods *et al.* 2002).

b) Hücre dışı savunma sistemi ise; metallothionein gibi serbest radikal yokedicileri ve Zn gibi iz elementlerden oluşur (Armstrong 1998).

SERBEST RADİKAL OLUŞUMU



Şekil 2.3.5.1. ROT ve antioksidanlar (Erdemli 2006)

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi oksitlenebilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir. İnsanda belli başlı hücre içi antioksidanlar SOD, CAT

ve GPx enzimleridir. SOD'un yapısında bakır, çinko ve manganez, GPx'de ise selenyum iyonu bulunduğundan bu enzimler metaloenzim olarak adlandırılırlar. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda antioksidan savunmadan E ve C vitamini, transferrin, seruloplazmin, albumin, bilirubin, β -karoten sorumludur. SOD, GPx ve CAT enzimlerinden ayrı olarak E ve C vitamini de hücre içi antioksidan özelliğe sahiptir. Her ikisi de hücre membranlarındaki lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını kıran antioksidanlardır. Hücre içi ortamın aksine, hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır (Halliwell 1991).

Antioksidan bileşiklerin etki şekli ve etkinlik düzeyi oldukça farklıdır. Genelde antioksidanlar reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin temizlenmesi, oksidatif stresle hasarlanmış dokuların tamiri, diğer antioksidanların onarımı veya yenilenmesi ve metal şelasyonu gibi oldukça farklı etki şekillerinden birini veya birkaçını ortaya koyarlar. İdeal bir antioksidan bilinen bu etki şekillerinden birçoğunu yerine getirebilme özelliğine sahiptir (Biewenga *et al.* 1994).

Cherubini ve arkadaşlarına (2005) göre biyolojik sistemlerde oksidanların yıkımı ve oluşumu arasındaki denge, hücre ve dokunun biyolojik bütünlüğünün sürdürülmesinde önemlidir. Antioksidanlar dört farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler:

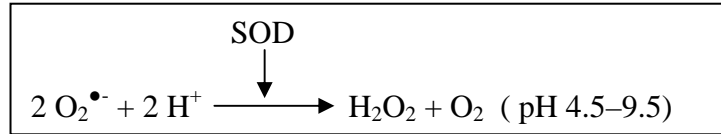
1. Temizleme (Scavenging) etkisi: Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan bu etki enzimler tarafından gerçekleştirilir.
2. Baskılama (Quencher) etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.
3. Onarma etkisi: Serbest radikallerin meydana getirdiği zararlı etkinin onarılmasıdır.
4. Zincir koparma etkisi: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olan bu etki hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır (Turna 2008).

2.4.1. Enzimatik antioksidanlar

En önemli enzimatik antioksidanlar SOD, CAT ve GPx'tir.

2.4.1.a. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Hücre içi antioksidanların en önemlilerinden biridir. Antioksidant bir enzim olan SOD $O_2^{\cdot-}$ yi O_2 'ye ve daha az reaktif olan H_2O_2 'ye katalizler. 1939'ların başlarında izole edilen SOD un antioksidant aktivitesi 1969'da McCord ve Fridovich tarafından tespit edilmiştir (Mc Cord and Fridovich 1969). İnsanlarda SOD enziminin 3 formu vardır. Sitozolde bulunan Cu ve Zn-SOD, mitokondride bulunan Mn-SOD ve ekstraselular SOD (EC-SOD) dur (Landis and Tower 2005).



Cu-Zn SOD: Genellikle sitozolde ve lizozom organellerinde bulunur. Cu-Zn SOD enzimi 32 kDa molekül ağırlığında iki alt birimden oluşmuştur. Her bir alt birim bakır ve çinkodan oluşan küme halinde iki çekirdekli aktif bölge bulundurur. Enzim aktivitesi pH'ın 5-9.5 olmasına bağlıdır. Cu ve Zn atomları arasındaki köprü histaminle sağlanır. Cu-Zn SOD'un antioksidan savunmada ilk sırada yer aldığına inanılır (Mates 1999).

Mn-SOD (Mitokondrial SOD): Mitokondride bulunur ve kofaktörü mangandır. Mn-SOD'lar bakterilerden yüksek yapılı organizmalar kadar, pek çok kaynaktan izole edilmiştir. Yüksek yapılı organizmalardan elde edilen tüm Mn-SOD'lar tetramerdir ve her alt ünite de bir Mn^{+2} iyonu içerirler (Fridovich 1985). Mn-SOD en etkili antitümör aktiviteye sahiptir (Behrend 2003). Mn-SOD 96 kDa molekül ağırlığındadır (Mates 1999).

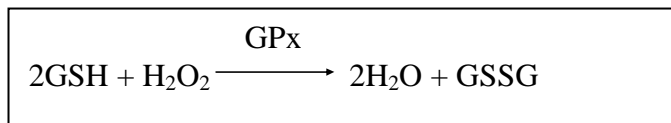
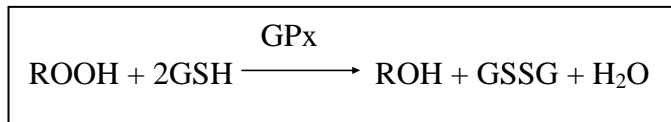
Ekstraseluler SOD (EC-SOD): Tetramerik bir proteindir, ekstrasellüler bölümlere salgılanır. Heparin bir domaine sahiptir ve hücre yüzeyindeki heparin sülfat proteoglikanlara bağlanabilir. Cu-Zn SOD enzimi gibi EC-SOD enziminin de kofaktörleri çinko ve bakırdır (Mates 1999).

Bu üç çeşit SOD enziminin dışında son zamanlarda *Streptomyces*'lerde keşfedilen Ni-SOD enzimi vardır. 117 aminoasitlik küçük bir proteine sahip bu enzim diğer SOD enzimleri ile sekans homolojisi göstermemektedir (Barondeau 2004).

2.4.1.b. Glutatyon Peroksidaz (GPx)

GPx, antioksidan enzimlerin en etkin olanıdır. Hücre içi hidroperoksitlerin yok edilmesinden sorumludur (Armstrong 1998). H_2O_2 'i suya çevirerek methemoglobin oluşumunu engeller (Kalaycıoğlu vd. 1998) ve membran lipidlerini peroksit anyonuna karşı koruyarak hücre membranının bütünlüğünü korur. E vitamini ile sinerjik etkileşimi söz konusudur. GPx ayrıca büyüme, gelişme ve üreme için gerekli bir iz element olan selenyumu yapısında bulundurur. Selenyum eksikliğinin, bu enzimin aktivitesini azalttığı bilinmektedir (Brigelius and Flohe 1999; Karagül vd. 2000).

GPx ilk kez 1957'de Mills tarafından tanımlanmıştır. Glutatyon sisteminin ilk enzimi olan GPx, lipid peroksitlerini daha az toksik yağ asitlerine indirger, bunu yaparken de GSH'ü kofaktör olarak kullanır (Bukan 1999).

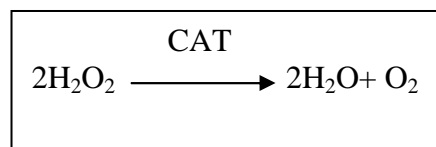


Mates (1999)' e göre üç peptidli glutasyonu (GSH) kendi oksidize formuna (GSSG) oksidize ederken sitozol ve mitokondrideki SOD tarafından üretilmiş olan hidrojen peroksidi de ortadan kaldıracak özelliğine sahiptir. GPx'ın selenyum bağımlı ve selenyumdan bağımsız olmak üzere iki tipi vardır. Farklı substratları kullanırlar. Selenyum bağımlı formu sitoplazmada bulunur ve düşük bir kapasiteye sahiptir. Selenyum bağımsız formu ise organik hidrojen peroksitleri kullanır ve daha yüksek bir aktiviteye sahiptir. Glutasyon metabolizması antioksidant savunma sistemlerinden en önemlilerinden biridir. İnsan dokuları majör peroksit uzaklaştırıcı enzim olarak GPx içermektedir. İnsanlarda selenyuma bağlı 4 farklı GPx vardır (Turna 2008).

CAT ve SOD başlıca membranın hidrofilik bölgelerinde etki gösterir. Glutasyon peroksidaz ise hidrofobik membran komponentlerinde lipit peroksidasyonuna karşı indirekt olarak koruyucu etki yapmaktadır. Dolayısıyla glutasyon peroksidaz, CAT ve SOD'un kombine bulunduğu durumlarda serbest radikal ataklarına karşı hücre bütünlüğünün korunmasında daha etkili olmaktadır (Mates 1999). E vitamini yetersiz olduğunda membranı peroksidasyona karşı GPx korur. Eritrositlerde en kuvvetli antioksidandır (Chao *et al.* 2002).

2.4.1.c. Katalaz (CAT)

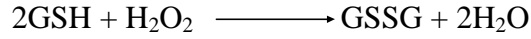
Sumer ve Dounce tarafından 1937'de kristalize halde saflaştırıldı. Her biri bir prostetik grup olan ve yapısında Fe^{+3} bulunduran dört hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir. SOD'un oluşturduğu H_2O_2 'yi peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalar (Mates 1999).



2.4.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

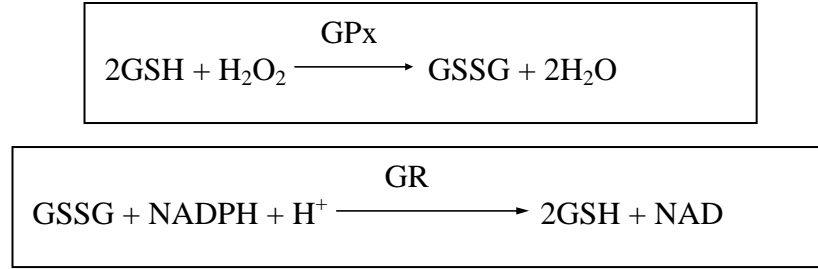
2.4.2.a. Glutasyon (GSH)

GSH ise önemli bir intraselüler antioksidandır. Okside edilmiş şekli, serbest radikallerinin inhibisyonunda (Boehme *et al* 1992), indirgenmiş sülfidril gruplarının stabilizasyonunda ve tokoferol ile askorbatın rejenerasyonunda görevlidir (Armstrong 1998). Ayrıca GPx'in kofaktörü olarak da görev yapar (Boehme *et al.* 1992).



Glutasyon sitozolde bol miktarda bulunur. Sitozolde (1–11 mM), nukleusta (3–15 mM) ve mitokondride (5–11 mM) bulunur, ayrıca suda çözünebilir (Masella *et al.* 2005). Tabiatta yaygın bir şekilde bulunan bu sülfürlü bileşik 1921 yılında Hopkins tarafından keşfedilmiş ve glutamil-sisteinden ibaret bir dipeptit olduğu zannedilmiştir. Ancak 1929 yılında kristal halde elde edildikten sonra yapısının tripeptit olduğu anlaşılmıştır (Gözükara 1997). Glutasyon sistein içeren bir tripeptid olup glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir. Glutasyon hücrelerde en çok bulunan protein dışı endojen tioldür. Doku GSH düzeyi sadece senteze katılan enzimler tarafından düzenlenmez, tiol içeren aminoasitlerin yeterince olması da oldukça önemlidir (Parcell 2002). GSH'ın antioksidan özelliği bulundurduğu –SH grubundan veya koenzim veya kofaktör olarak görev yaptığı enzimlerin ROT'lerini etkisizleştirmelerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Janssen *et al.* 1993). *In vivo* sentezlenebilen ve ince bağırsaktan kısmen emilebilen GSH endojen ve eksojen bir antioksidandır. Glutasyon, GSH-transferaz ve peroksidazlar için bir substrat olup ksenobiyotik ve ROT'nin detoksifikasyonuna katılır. Ayrıca, antioksidan etkili C ve E vitaminleri üzerinde orta düzeyde koruyucu etkiye sahiptir (Parcell 2002). GPx GSH'ın GSSG'ye oksitlenme reaksiyonunu katalizler. GSH ile GSSG arasındaki dinamik dengenin korunabilmesi için glutasyonun oksitlenmiş formu

(GSSG) glutatyon redüktaz (GSSG-red) enzimi ile GSH'a indirgenir ve kofaktör olarak NADPH kullanılır (Luberda 2005).



GSH eksikliği hücre ölümüne yol açabilir. Karaciğer iki GSH havuzuna sahiptir. Birincisinin yarı ömrü 2–4 saat ve sitozoliktir, ikincisinin yarı ömrü 30 saattir ve mitokondriyaldir. Ökaryotik hücrelerde GSH'nin %90'ı sitozolde, %10'u mitokondride, çok azı da endoplazmik retikulumda bulunur. GSH oksidasyonu, apoptozis sürecin erken belirticidir ve metabolik sinyal gibi davranabilir. GSH, DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır (Masella *et all.* 2005).

2.4.2.b. A Vitamini

Suda çözünmeyen, yağda ve organik çözücülerde çözünebilen bir maddedir. A vitamini bir primer alkol grubuna ve çok sayıda doymamış bağa sahiptir. Büyümede etkili olan A vitamini alkol (retinol), aldehit (retinal) ve asit (retinoik asit) formları mevcuttur (Keha vd. 1997). Ayrıca α -karoten ile γ -karotenin birleşmesiyle bir molekül A vitamini oluşur. A vitamini karaciğerde yağ asidi esteri şeklinde depo edilir. A vitamini büyüme, görme, üreme ve epitelyum hücrelerinin sağlamlığı fonksiyonlarına sahiptir. Karaciğer, yağ, yumurta sarısı A vitamini, sarı ve koyu yeşil sebze ve meyveler ise A vitamininin öncü maddesi olan karotenler bakımından zengindir (Tüzün 1997). A vitamini singlet oksijen temizleyicisi olması nedeniyle oksijen radikallerine karşı koruyucu etki yapar (Kılınç 1985).

2.4.2.c. C Vitamini (Askorbik Asit)

C vitamininin kapalı formülü $C_6H_8O_6$ olan ketolaktondur. Suda çözünebilen C vitamini özellikle yeşil sebze, patates ve meyvelerde bol miktarda bulunur. Bağırsaklardan kolayca emilir. C vitamini eksikliğinde skorbüt hastalığı oluşur. C vitamininin fazlası ter ve idrarla dışarı atıldığı için depo edilemez (Tüzün 1997).

Askorbik asit; moleküler oksijen, nitrat, sitokrom a ve c bileşiklerinin indirgenmesine neden olan ve sulu ortamlarda serbest radikallerle reaksiyona girebilme kabiliyetindedir. Plazmada oksidan ajanlara karşı ilk antioksidan savunmayı oluşturur. Süperoksit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girip onları temizleyen bir antioksidan olmasının yanı sıra tokoferoksil radikalının tekrar tokoferole dönüşmesini sağlar. Bu sırada kendisi de dehidroaskorbata oksitlenir (Cherubini *et al.* 2005).

C vitamini yetersizliği durumlarında oluşan tokoferoksil radikalleri tokoferole dönüşmek için GSH ile reaksiyona girerek böylece hücredeki GSH miktarını azaltacaktır. Yine plazma C vitamini düşük (0.2 mmol/L'den düşük) olduğu zaman oksidan etki de gösterebilir. Süperoksit dışında Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyen başka bir ajandır. Bu şekilde demiri Fenton reaksiyonuna girmeye uygun hale getirerek böylece plazma düzeyleri düşük olduğu zaman süperoksit üretimine katkıda bulunur (Cherubini *et al.* 2005). C vitamininin iki ana formu vardır: 1. L-askorbik asit güçlü indirgeyici ajandır. 2. L-dihidroaskorbik asit (DHAA) ise okside formudur. C vitamininin kanserin önlenmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir (Decker *et al.* 1999).

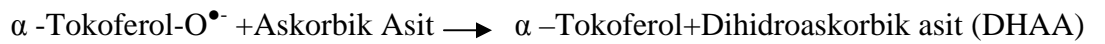
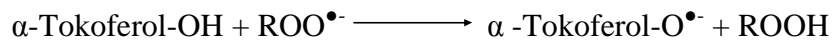
2.4.2.d. E Vitamini

E vitamini ilk olarak Evans (1938) tarafından bulunmuştur. Yağda çözünen bir vitamindir ve 8 farklı formu vardır. Membranlarda oksijen radikallerinin ana temizleyicisidir. İnsanlarda en aktif formu α -tokoferoldür ve çok kuvvetli bir biyolojik

antioksidandır. En temel antioksidan özelliği lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağlamasıdır (Pryor 2000).

E vitamini doğal olarak alfa, beta, gama ve delta, gibi çeşitli formlarda bulunmaktadır. Bunlar içerisinde α -tokoferol en geniş doğal dağılıma ve en yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir (Akkuş 1996). Bitkisel yağlar E vitamini yönüyle zengin, karaciğer ve yumurta E vitamini bakımından orta zenginliktedir (Özer 1996). Zincir kırıcı antioksidan olarak fonksiyon görür. Hidrofobik kısmına hidrojenini kolaylıkla verebilen OH^- grubu bağlıdır. Bu yüzden lipid peroksidasyonu sırasında oluşan peroksil ve alkoksil radikalleri yağ asidi yerine α -tokoferolle birleşir ve reaksiyon zinciri kırılmış olur. Böylece α -tokoferol yeni bir radikal olan α -tokoferol- $\text{O}^{\bullet-}$ 'e dönüştürülmüş olur. Bu radikalın ise başka bir yağ asidiyle birleşebilme aktivitesi düşüktür. Sonuçta zincir reaksiyonu durur. Oluşan bu tokoferoksil radikali membran yüzeyinde askorbik asitle (C vitamini) reaksiyona girerek tekrar tokoferole dönüşmektedir (Chao *et al.* 2002).

Analizlere göre günlük 400 IU miktarında alınması sağlık riskini artırırken, 200 IU alınmasının sağlık riskini artırmadığı gibi faydası vardır (Valko 2006).



E vitamini peroksit ve hidroperoksitleri hidrojen iyonu ile doyurarak peroksit radikallerinin aktivitesini azaltır (Çelik *et al.* 1996). Tokoferoller singlet oksijen ile reaksiyona girerek membranları bunun zararına karşı korumaktadır (Halliwell *et al.* 1996).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. KKD Analizi

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

- RPMI-1640
- Fitohemaglutinin (FHA)
- Fetal Bovine Serum (FBS)
- L-Glutamine
- Penisilin-Streptomisin (PS)
- Kolşemid solüsyonu (Biological Industries)
- KCl (MERCK)
- KH_2PO_4 (MERCK)
- Na_2HPO_4 (MERCK)
- Giemsa boyası (MERCK)
- Asetik asit (MERCK)
- Methanol (MERCK)
- 5-Bromo-2-deoksiüridin (BrdU) (Sigma)
- Hoechst 33258 (Sigma)
- Aflatoxin B₁ (Sigma)
- Vitamin A
- Vitamin C
- Vitamin E
- DMSO (Dimetil sulfoxide)

b) Kullanılan alet ve cihazlar

- Elektronik terazi (Precisa 160 M)
- pH metre (Jenway 3010)

- Santrifüj (nüve CN180, NF048)
- Mikroskop (Olympus BX2)
- Mikroskop (Nikon)
- Kromozom Görüntüleme (Nikon)
- UV kaynağı
- Su banyosu (Nüve BM402)
- Isıtılmalı manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica)
- Cam erlen mayer
- Cam mezür
- Cam şale
- Plastik pastör pipeti
- Kültür tüpleri

3.1.2. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

AFB₁ çözeltisinin hazırlanması

10 mg AFB₁ %10'luk 10 mL DMSO'da çözüldü. Bu çözeltiden 2.5 mL alınarak üzeri 1 L'ye distile su ile tamamlandı. 80 µM lık stok çözelti hazırlandı. Bu stoktan kültür ortamına 0.5 mL katılınca medium ortamında son konsantrasyonu 5 µM olarak ayarlandı.

A vitamininin hazırlanması

Stok çözelti için 0.038 mL retinoik asitten (%95 lik, molekül ağırlığı 300 gr/mol) 160 mL DMSO'da çözülüp 750 µM'lık stok çözelti hazırlandı. Stok çözeltiden 8 mL'lik medyum ortamına 6 µL katınca 0.5 µM, 11 µL katınca 1 µM ve 16 µL katınca 1.5 µM'lık son konsantrasyonlar elde edildi.

C vitamininin hazırlanması

Stok için 0.0352 gr askorbik asit (0.025 M) 8 mL distile su ile çözüldü. Stok çözültiden 8 mL'lik medyum ortamına 8 µL katıldığında 25 µM, 16 µL katılınca 50 µM ve 32 µL katılınca 100 µM'lık son konsantrasyon elde edilmiş olur.

E vitamininin hazırlanması

Stok α- tokoferol için 18 µL α- tokoferolü (0.01 M, d: 0.95 gr/mL, MA:430.7 gr/mol) 8 mL asetonda çözümlenip medyum ortamına 50 µM için 41 µL, 100 µM için 81 µL ve 200 µM için 163 µL katıldı.

Tespit solüsyonunun hazırlanması

1/3 asetik asit metanol çözültisi hazırlandı.

Hipotonik solüsyonun hazırlanması

0.560 gr KCl 100 mL distile suda çözülerek 0.0075M KCl çözültisi hazırlandı.

Hoechst 33258 stok çözültisi hazırlanması

25 mg'lık Hoechst 33258 (sigma) şişesi 5 mL distile su ile sulandırıldı. Karanlık ortamda -20 °C de saklandı.

Hoechst 33258 çalışma çözültisi hazırlanması

1 mL Hoechst 33258 Stok Çözültisi ile 99 mL PBS çözültisi taze hazırlanarak kullanıldı.

5-Bromo–2-Deoksiüridin çözeltisinin hazırlanması

5-Bromo–2-deoksiüridin (BrdU) (Sigma) 0.0026 g tartıldı ve 5 mL RPMI 1640 ile sulandırıldı. Alüminyum folyo ile sarılarak karanlık ortamda +4 °C de saklandı. Kültürde son konsantrasyon 10^{-2} M idi.

20XSSC çözeltisinin hazırlanması

175.3 gr NaCl ve 88.2 gr Na-Sitrat 800 mL distile suda çözüldü ve toplam hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

2XSSC çözeltisinin hazırlanması

100 mL 20XSSC solüsyonuna 850 mL distile su eklendi. pH NaOH ile 7.0'ye ayarlandı. Toplam hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

PBS çözeltisinin hazırlanması

0.2 gr KCl+0.2 gr KH_2PO_4 +8 gr NaCl+1.15 gr (anhidro) Na_2HPO_4 1 litre distile suda çözüldü (pH 7.0).

Boya solüsyonunun hazırlanması

9.08 gr/L KH_2PO_4 , 14.8 gr/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ hazırlandı. 30 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ alınıp üzerine 40 mL KH_2PO_4 solüsyonu eklenerek pH 6.8'e ayarlandı.

3.1.3. Lenfosit besi yerlerinin hazırlanması ve saklanması

- 100 mL RPMI-1640

- 20 mL FBS

- 5 mL FHA
- 2 mL L-Glutamine
- 1 mL PS

Hazırlanan solusyon 7.5 mL olacak şekilde steril hücre kültür tüplerine paylaştırıldı. Kullanım zamanına kadar -20 °C de saklandı.

3.1.4. Donör seçimi

Sağlıklı 25 ile 35 yaş arasında 2 erkek ve 2 kadından oluşan gönüllü olarak deneye katılmak isteyen toplam 4 donör seçildi. Donörler sigara kullanmayanlar arasından seçildi (pasif içicide olmadıkları belirlenerek). Son 6 ay içerisinde her hangi bir nedenle antibiyotik, X-Ray almadıkları, bilinen veya tanımlanan akut veya kronik bir rahatsızlıklarının olmadığı sözlü beyanları ile kabul edildi. Donörlerden deneye başlanacağı saatte kan alındı.

3.1.5. Deney düzeneğinin oluşturulması

Daha önce hazırlanan besi yerleri -20 °C den çıkarılarak oda ısısına gelmesi sağlandı. Oda ısısına gelen besi yerine aşağıda planlanan kimyasallar, belirlenen oranlarda steril (filtre) edilerek eklendi. Bu işlemler sonrasında belirlenen donörden alınan kan örneklerinden 1 mL eklendi (her bir tüp için). Bu deney düzeneği toplam 4 donör için tekrarlandı.

Kültür 1: Sadece besi yeri + DMSO (Kontrol)

Kültür 2: Besi yeri + 5 µM AFB₁

Kültür 3: Besi yeri + 5 µM AFB₁ + 0.5 µM Vit A

Kültür 4: Besi yeri + 5 µM AFB₁ + 1 µM Vit A

Kültür 5: Besi yeri + 5 µM AFB₁ + 1.5 µM Vit A

Kültür 6: Besi yeri + 5 µM AFB₁ + 25 µM Vit C

Kültür 7: Besi yeri + 5 µM AFB₁ + 50 µM Vit C

Kültür 8: Besi yeri + 5 µM AFB₁ + 100 µM Vit C

Kültür 9 : Besi yeri + 5 µM AFB₁ + 50 µM Vit E

Kültür 10: Besi yeri + 5 µM AFB₁ + 100 µM Vit E

Kültür 11: Besi yeri + 5 µM AFB₁ + 200 µM Vit E

3.1.6. Lenfosit kültürü

1- Donörlerden alınan periferik kan örneği ve ilgili kimyasallar ile hazırlanan 8 mL'lik hücre kültür tüpüne 5 damla 10⁻² M stok BrdU çözeltisi eklenerek 72 saat 37 °C de kapalı hücre kültürüne alındı. Kültür tüpleri aliminyum folya ile sarılarak karanlık ortam sağlandı.

2- Kültürün 69. saatinde her kültür tüpüne 5 damla kolşisin solüsyonu eklendi.

3- 72. saatte kültüre edilen tüpler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüje edilerek süpernatant kısmı biyokimyasal analizler için ayrıldı.

4- Pellet üzerine hipotonik solüsyonu (0.075 M KCl) eklendi ve tüpler 25 dakika 37°C'lik etüvde bekletildi.

5- 1000 rpm'de 10 dakika santrifüje edilerek süpernatant kısmı atıldı ve pellet üzerine 1:3 oranında soğuk asetik asit metanol karışımı eklenerek tespit işlemi gerçekleştirildi.

6- Tespit işlemi toplam üç kez tekrarlandı. Tespit işlemi sonunda süpernatantın 1–1.5 mL'lik alt kısmı hariç diğer bölümü atıldı.

7- Dipte kalan pellet çalkalanarak resüspanse edildikten sonra soğuk tespit içinde bekleyen lamaların her birine 5–6 damla bu süspansiyondan damlatılarak 5 lam hazırlandı.

8- Hazırlanan preparatlar üç gün oda sıcaklığında bekletilerek yaşlandırıldı.

9- Bu süre sonunda her bir preparat floresan plus giemsa tekniği ile boyandı.

3.1.7. Floresan plus giemsa tekniği ile boyama

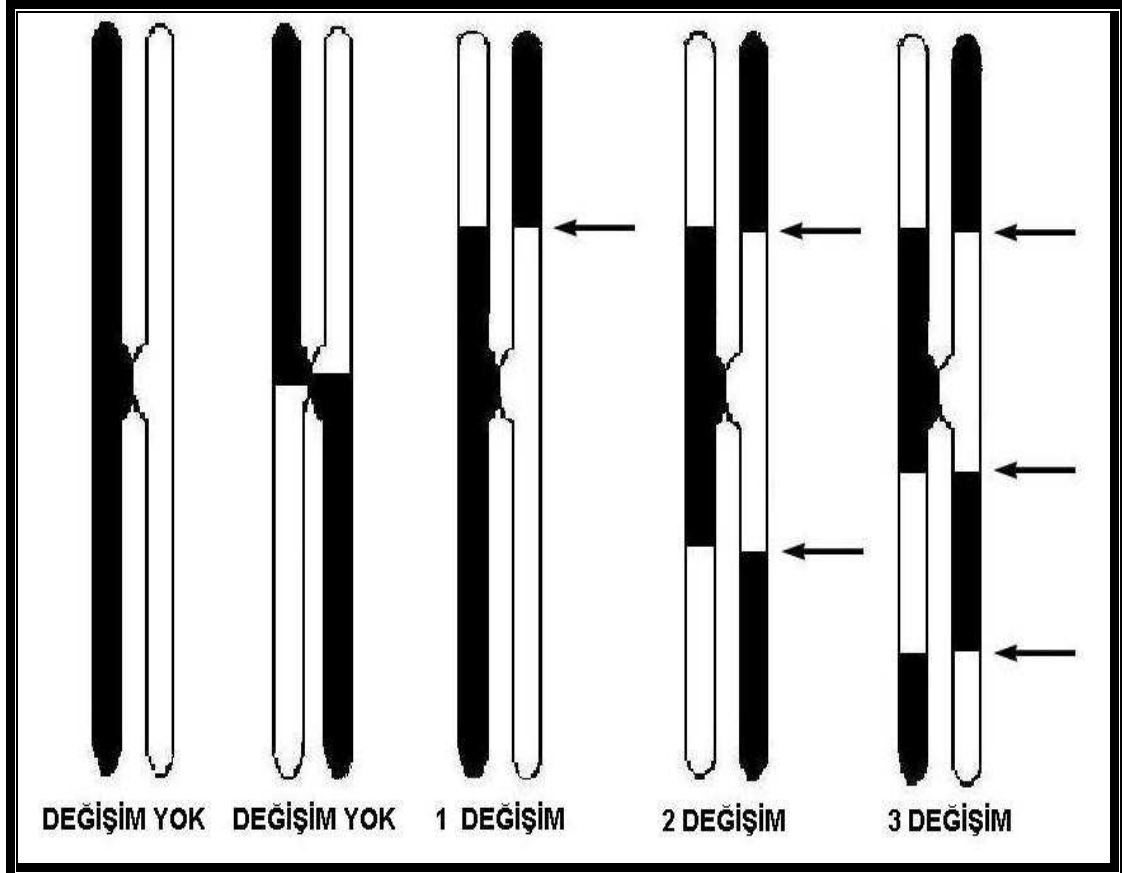
Bu işlem sırası ile şu şekilde tatbik edildi;

1. Üç gün oda ısısında kurutulan preparatlar 100 mL PBS tampon çözeltisi bulunan alüminyum folyoya sarılı temiz bir şalede 5 dakika oda ısısında bekletildi.

2. Süre sonunda şaleden çıkarılan preparatlar 0.5 µgr/mL konsantrasyondaki stok Hoechst 33258 solüsyonundan 1/100 oranında PBS tampon çözeltisi içerisinde hazırlanarak bu solüsyonda 10 dakika karanlık ortamda bekletildi.
3. 1–2 saniye PBS'te yıkanan preparatlar bir kaba horizontal olarak dizilip üzerlerine lamel kapatıldı.
4. Hazırlanan preparatlar 13 cm yükseklikte bulunan UV lambasının altında 25 dakika bekletildi.
5. Preparatlardan lameller kaldırılarak 65°C'deki 2XSSC solüsyonu içinde 15 dakika bekletildi.
6. 2XSSC solüsyonundan çıkartılan preparatlar distile su ile yıkandı.
7. Preparatlar 5 dakika Giemsa boyasında tutularak boyandı ve incelemeye alındı.

3.1.8. KKD sayımı

Her bir donör için en az 20 metafaz mikroskopta (Olympus BX50 100x büyütmede) değerlendirildi. Her kromozomda koyu boyalı KKD bölgelerinin bir kromatitten diğerine atladığı bölgeler bir adet değişim olarak kabul edildi. Aynı kromozom üzerinde 1 den fazla geçiş görüldüğü durumlarda bunların her biri ayrı ayrı sayıldı. Sentromerden geçiş gösteren bölgeler değerlendirmeye alınmadı (Şekil 3.1.7). Planlanan deney düzeneğine uygun olarak her bir donörden alınan kan örnekleri ve uygulanan kimyasalların farklı konsantrasyonları için ayrı ayrı olmak üzere ortalama KKD sıklığı belirlendi.



Şekil 3.1.7. KKD'lerin sayılmasında esas alınan kriterler

3. 2. SOD, GPx, MDA, GSH Ölçümü

SOD, GPx, MDA, GSH Ölçümü için 72 saat kültüre edilen tüpler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant kısmı analiz için kullanıldı.

3. 2. 1. Superoksit Dismutaz (SOD) ölçümü:

Kullanılan reaktifler:

- Deney Reaktifi (Ksantin 0.3 mM; EDTA 0.6 mM; NBT 150 µM; Na₂CO₃ 4 M; BSA 1 gr/L)
- Ksantin oksidaz 167 U/L

Cu,Zn-SOD aktivitesi hücre kültürü süpernatantında Sun ve arkadaşlarının tarif ettiği metod kullanılarak ölçüldü (Sun *et al.* 1988). 100 µl numune üzerine 2.45 mL assay reaktifi [0.3 mM xanthine, 0.6 mM Na₂EDTA, 0.15 mM NBT, 0.4 M Na₂CO₃, 1 g/L bovine serum albumin (BSA)] katıldı. Ksantin oksidaz (50 µl, 167 U/L) ilavesi ile reaksiyon başlatıldı. Ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından üretilen süperoksit anyon radikalleri tarafından NBT'nin indirgenmesi ile oluşan absorbans değişimi 560 nm de ölçüldü. NBT'nin indirgenmesini % 50 inhibe eden enzim aktivitesi 1 enzim ünitesi olarak tanımlandı. Cu, Zn-SOD aktivitesi mg proteinde SOD ünitesi olarak ifade edildi.

3. 2. 2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) ölçümü:

Kullanılan reaktifler:

- Fosfat tamponu (50 mM, pH 7.5 mM EDTA'lı)
- GSH (150 mM)
- Glutasyon redüktaz (30 U/mL)
- NADPH (8 mM)
- NaN₃ (0.12 M)
- H₂O₂ (2 mM)
- NADPH (8 mM)

GPx aktivitesi, hücre kültürü süpernatantında Paglia ve Valentine metodu ile ölçüldü (Paglia and Valentine 1967). Özetle, bir küvet içerisine 50 µl numune, 100 µl NADPH (8 mM), 100 µl redükte glutasyon (150 mM), 20 µl glutasyon redüktaz (30 U/mL), 20 µl sodyum azid çözeltisi (0.12 M) ve 2.65 mL potasyum fosfat tamponu (50 mM) (pH 7.0, 5 mM EDTA) birleştirildi. 30 dk. 37 °C'de inkübe edildi. 100 µl H₂O₂ (2 mM) ilave edilip alt üst edilerek karıştırıldı ve reaksiyon başlatıldı. NADPH'ın NADP'ye dönüşümü 5 dk. 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Enzim aktivitesi, 340 nm dalga boyundaki NADPH'ın molar absorbtivite katsayısı (6.22×10^{-6}) kullanılarak hesaplandı ve ünite/gr protein olarak ifade edildi.

3. 2. 3. Total Glutasyon (GSH) ölçümü:

Kullanılan reaktifler:

- Na₂EDTA (5 mM pH 7.5)
- Fosfat reaktifi (0.3 M Na₂HPO₄)
- DTNB (5-5 dithiobis(2-nitrobenzoik asit) 40 mg/dL , % 1'lik Na sitrat içinde)
- KH₂PO₄ (100 mM)
- Glutasyon redüktaz (625 U/L)

Hücre kültürü süpernatantında GSH seviyesi, Tietze ve Anderson'nun (Tietze 1969; Anderson, 1985) metoduna göre ölçüldü. Özetle, 3 mL'lik bir küvete 100 µl numune konuldu ve daha sonra 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) (10 mM) çözeltisi, Na₂EDTA (5 mM) (pH 7.5) içeren KH₂PO₄ (100 mM) ve 750 µl glutasyon redüktaz (625 U/L) eklendi ve oda sıcaklığında 3 dk inkübe edildi. Daha sonra 1.47 mM β-NADPH'dan 150 µl eklendi ve alt üst edilerek karıştırıldı ve 5-thio-2-nitrobenzoik asit oluşumu 2 dk 412 nm spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar µmol/gr protein olarak ifade edildi.

3. 2. 4. Malondialdehit (MDA) ölçümü:

Kullanılan Reaktifler:

- % 8.1 sodyum dodesil sulfat
- %20 asetik asit
- n-bütanol/piridin (15:1, v/v)
- EDTA 0.1 M
- Tiobarbutirik asit (TBA) çözeltisi % 1
- NaOH 0.05 N

MDA seviyesi hücre kültürü süpernatantında Ohkawa tarafından tanımlanan metoda göre spektrofotometrik olarak belirlendi (Ohkawa 1979). Toplam hacim 4 mL olacak

şekilde % 8.1 sodyum dodesil sulfat, %20 asetik asit, %0.9 tiobarbiturik asit karışımına 0.2 mL numune eklenerek 1 saat 95 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüpler oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve üzerine 1 mL distile su ile 5 mL n-butanol/piridin (15:1, v/v) eklendi. Numuneler 4000xg 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatantın 532 nm'de absorbansı ölçüldü ve standart grafik yardımı ile MDA konsantrasyonu hesaplandı. 1.1.3.3-Tetraetoksipropan standart olarak kullanıldı. MDA konsantrasyonu µmol/L olarak ifade edildi.

Protein konsantrasyonu hücre kültürü süpernatantında Bradford metoduna göre belirlendi (Bradford 1976). Fotometrik ölçümler, DU 530 spektrofotofmetre (Beckman Instruments, Fullerton, CA) ile kuartz küvetler kullanılarak ölçüldü.

3.3. İstatistiksel değerlendirme

Elde edilen KKD verileri ile sayı, ortalama ve standart hatalar ($\bar{x} \pm SE$) hesaplandı. AFB₁'in KKD üzerine etkisi ve bunun vitamin A, C ve E ile nasıl bir ilişki içerisinde olduğunu SPSS 11.5 analiz programında T-Testi ile değerlendirildi. Sonuçların p<0.05 olması durumunda aradaki fark istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

Biyokimyasal parametrelerin ortalama değişimlerinin değerlendirilmesinde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Sonuçların p<0.05 olması durumunda önemli kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar mutajenite testi olan KKD ve biyokimyasal analizlerden olan SOD, GPx, MDA ve GSH için ayrı iki başlık altında verilmiştir. Her bir parametre içinde kontrol ve deney grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

4.1. KKD Bulguları

Deney gruplarının her biri için ortalama KKD frekansları ($\bar{X} \pm SE$) her bir donör için toplanmıştır. Donörlere ait KKD frekansları vitamin A için izelge 4.1.1 de, vitamin C için izelge 4.1.2’de ve vitamin E için izelge 4.1.3’de sunulmuştur.

Donörlerden elde edilen KKD bulguları değerlendirildiğinde; metafaz alanlarında en az 2, en fazla 17 KKD değişimlerinin bulunduğu görülmüştür.

Donör kanlarından elde edilmiş KKD görüntüleri Şekil 4.1.1–4.1.8 arasında fotoğraflanmıştır.



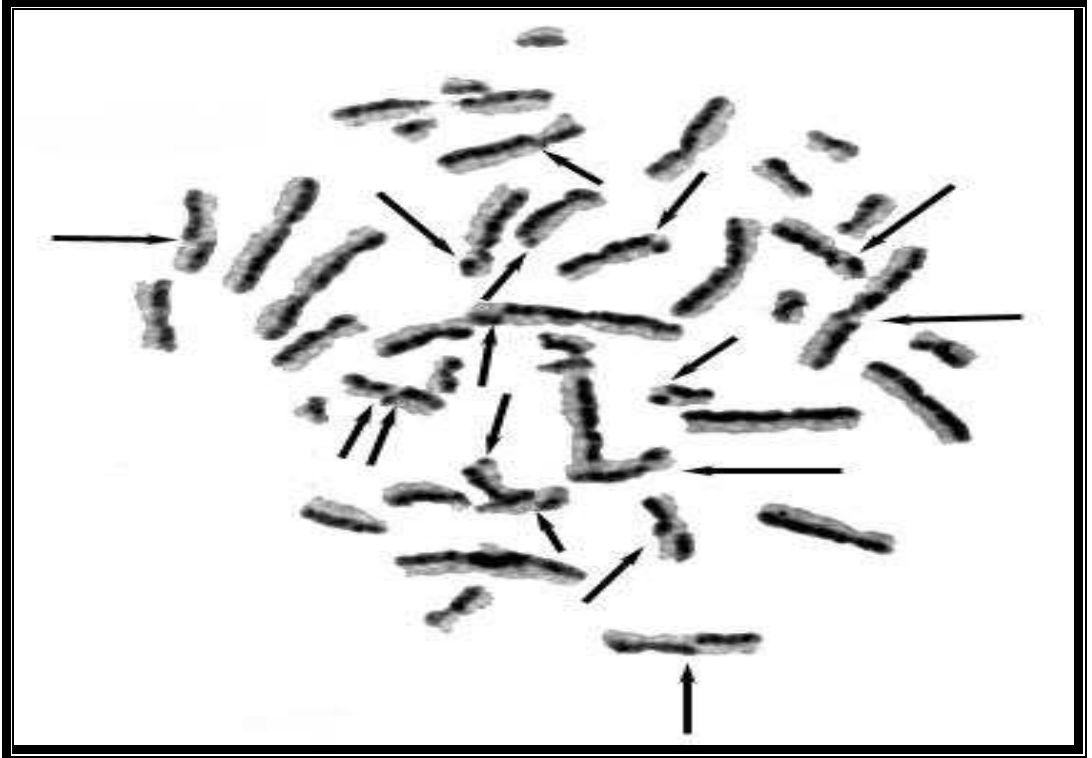
Şekil 4.1.1.: Donör 1'e ait elde edilen bir metafaz alanındaki 10 adet KKD değişimi



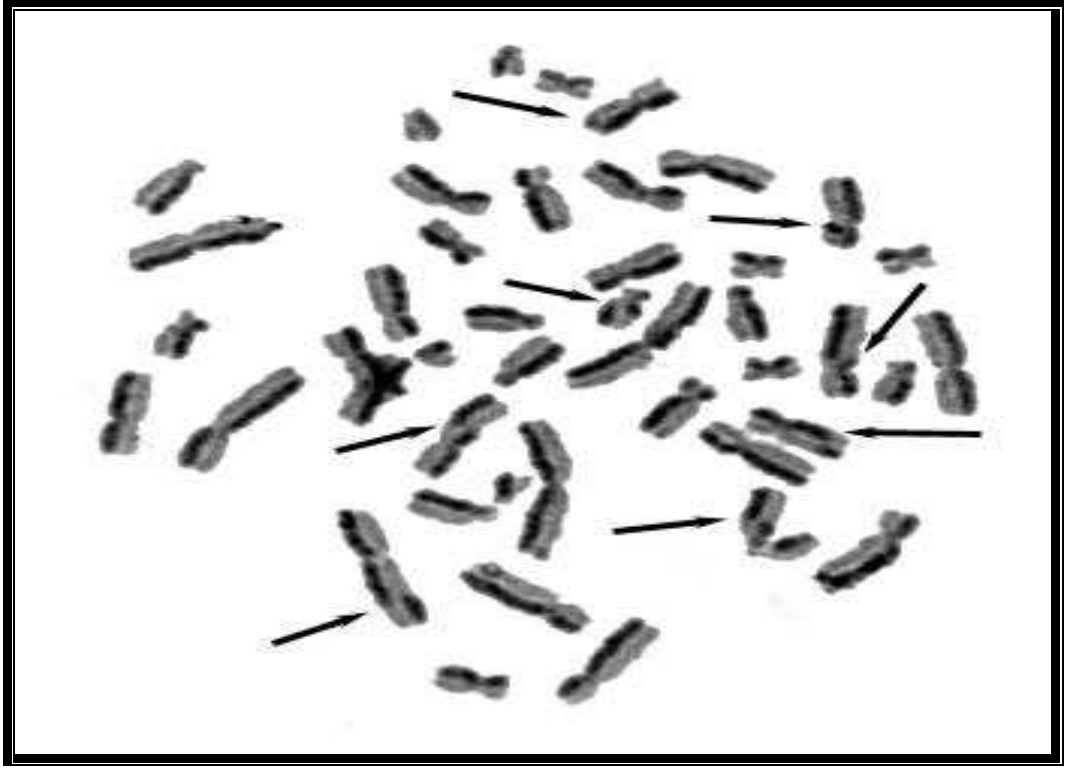
Şekil 4.1.2: Donör 1'e ait elde edilen bir metafaz alanındaki 4 adet KKD değişimi



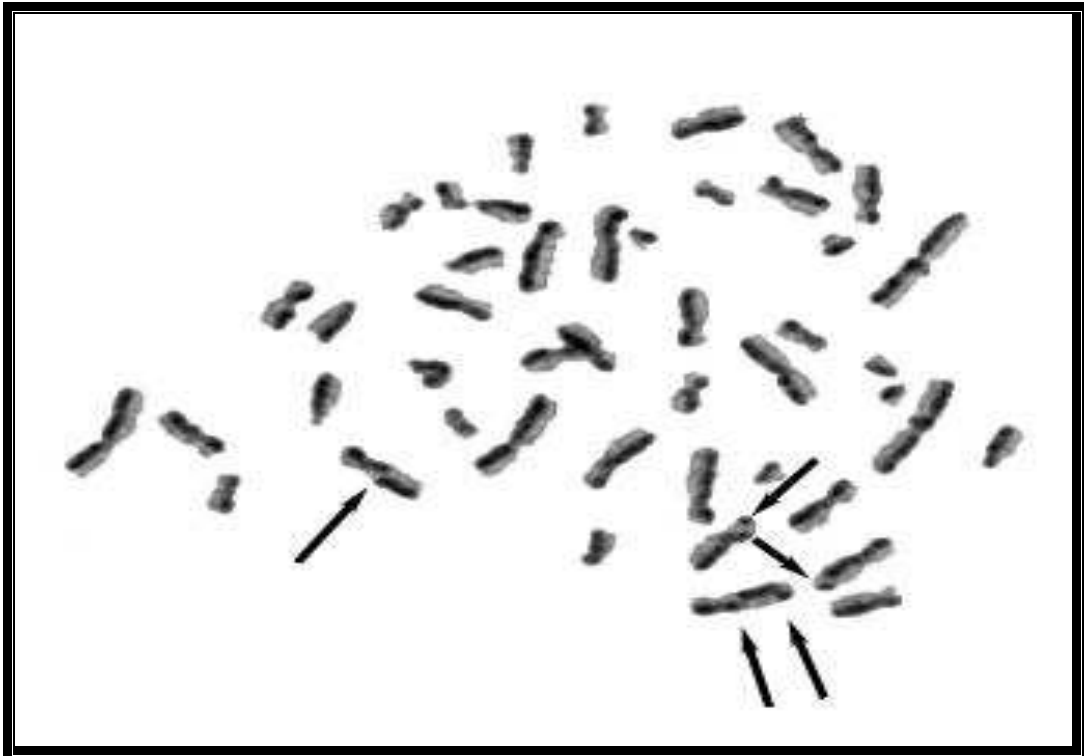
Şekil 4.1.3. Donör 2'e ait elde edilen bir metafaz alanındaki 4 adet KKD değişimi



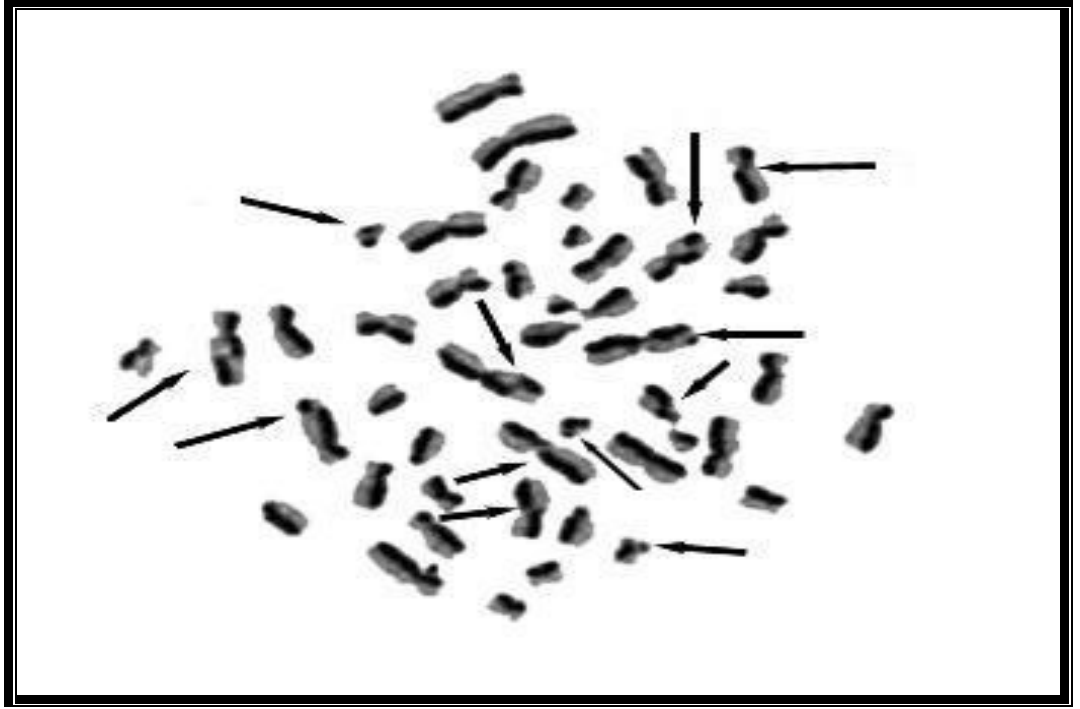
Şekil 4.1.4. Donör 1'e ait elde edilen bir metafaz alanındaki 16 adet KKD değişimi



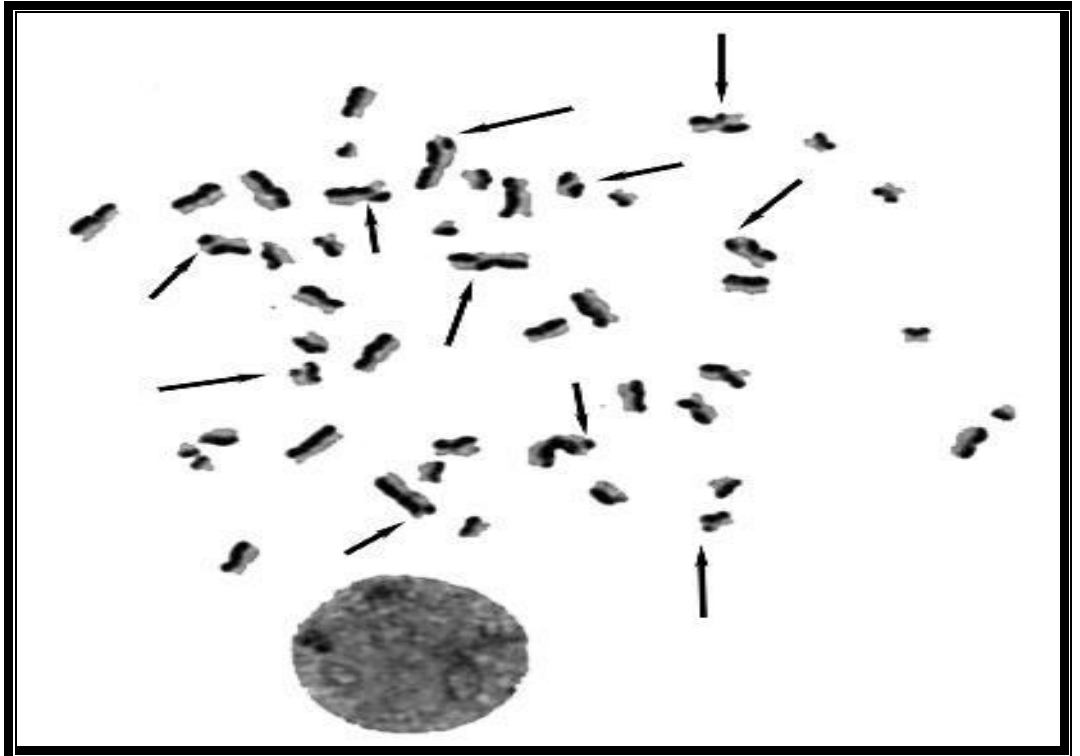
Şekil 4.1.5. Donör 3'e ait elde edilen bir metafaz alanındaki 8 adet KKD değişimi



Şekil 4.1.6. Donör 3'e ait elde edilen bir metafaz alanındaki 5 adet KKD değişimi



Şekil 4.1.7. Donör 4'e ait elde edilen bir metafaz alanındaki 12 adet KKD değişimi



Şekil 4.1.8. Donör 4'e ait elde edilen bir metafaz alanındaki 11 adet KKD değişimi

AFB₁ tek verildiğinde KKD frekansı 9.89±0.17 bulunmuştur bu değer kontrol ile kıyaslandığında AFB₁'in KKD'yi indüklediği (p=0.000) görülmüştür. Sadece AFB₁'in verildiği kültürlerin vitamin A'nın 0.5 µM, 1 µM ve 1.5 µM dozlarındaki KKD frekansları karşılaştırıldığında sırası ile 9.01 ± 0.24 (p=0.012), 8.48 ± 0.25 (p=0.01) ve 6.86 ± 0.38 (p=0.006) olarak bulunmuştur. Bu değerler ile vitamin A'nın AFB₁'in KKD'yi arttırıcı etkisinin engellendiği görülmüştür. AFB₁'in KKD'yi arttırıcı etkisini engellemesi açısından değerlendirildiğinde, vitamin A'nın 1.5 µM dozlarındaki uygulamalarında daha net görüldüğü tespit edilmiştir (p=0.008; Çizelge 4.1.1.). A vitamininin 1.5 µM'lık dozu ile kontrol grubu arasında KKD değeri ortalamaları birbirine yakın ve fark istatistiksel olarak önemsizdir (Çizelge 4.1.1.).

Çizelge 4.1.1. Vitamin A uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen KKD frekansları ($\bar{X} \pm SE$)

| | Donör 1 | Donör 2 | Donör 3 | Donör 4 | Ortalama |
|----------------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|----------------------------|
| Kontrol | 6.20 ± 0.22 | 5.90 ± 0.51 | 6.47 ± 0.46 | 6.12 ± 0.33 | 6.17 ± 0.12 |
| AFB₁ | 10.12 ± 0.10 | 9.71 ± 0.36 | 10.22 ± 0.26 | 9.52 ± 0.36 | 9.89 ± 0.17 ^a |
| AFB₁+VA1 | 9.42 ± 0.24 | 8.38 ± 0.72 | 9.35 ± 0.73 | 8.91 ± 0.49 | 9.01 ± 0.24 ^{ac} |
| AFB₁+VA2 | 8.21 ± 0.76 | 8.35 ± 0.23 | 8.15 ± 0.71 | 8.22 ± 0.23 | 8.48 ± 0.25 ^{bd} |
| AFB₁+VA3 | 7.40 ± 0.29 | 6.04 ± 0.29 | 6.43 ± 0.25 | 7.60 ± 0.71 | 6.86 ± 0.38 ^{efg} |

AFB₁: 5 µM, VA1: 0.5 µM, VA2: 1 µM, VA3: 1.5 µM

Kontrole göre; ^ap=0.000 ^bp=0.004

AFB₁'e göre; ^cp=0.012 ^dp=0.01 ^ep=0.006

AFB₁+VA1'e göre; ^fp=0.008

AFB₁+VA2'e göre; ^gp=0.02

Sadece AFB₁ in verildiği kültürlerin vitamin C'nin 25 µM, 50 µM ve 100 µM dozlarındaki KKD frekansları karşılaştırıldığında sırası ile 7.76 ± 0.37 (p=0.01), 6.86 ± 0.31 (p=0.000) ve 6.47 ± 0.29 (p=0.003) olarak bulunmuştur. Bu değerler ile vitamin C'nin AFB₁'in KKD'yi arttırıcı etkisinin engellendiğinin ve vitamin C'nin 100 µM

dozlarındaki uygulamalarında daha net görüldüğü tespit edilmiştir ($p=0.004$) (Çizelge 4.1.2.). C vitamininin $25\mu\text{M}$ 'lık dozu ile $50\mu\text{M}$ 'lık arasındaki fark önemli değilken, $25\mu\text{M}$ 'lık doz ile $100\mu\text{M}$ 'lık doz arasındaki fark önemlidir ($p=0.004$). Kontrole en yakın KKD değeri C vitamininin $100\mu\text{M}$ 'lık dozunda görülmüş ve kontrol ile arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.1.2.)

Çizelge 4.1.2. Vitamin C uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen KKD frekansları ($\bar{X} \pm \text{SE}$)

| | Donör 1 | Donör 2 | Donör 3 | Donör 4 | Ortalama |
|----------------------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|----------------------|
| Kontrol | 6.20 ± 0.22 | 5.90 ± 0.51 | 6.47 ± 0.46 | 6.12 ± 0.33 | 6.17 ± 0.12 |
| AFB₁ | 10.12 ± 0.10 | 9.71 ± 0.36 | 10.22 ± 0.26 | 9.52 ± 0.36 | 9.89 ± 0.17^a |
| AFB₁+VC1 | 7.20 ± 0.49 | 7.12 ± 0.23 | 8.64 ± 0.44 | 8.10 ± 0.62 | 7.76 ± 0.37^{bd} |
| AFB₁+VC2 | 6.80 ± 0.60 | 6.78 ± 0.36 | 7.18 ± 1.34 | 6.56 ± 0.30 | 6.86 ± 0.31^{ce} |
| AFB₁+VC3 | 6.00 ± 0.49 | 6.36 ± 0.12 | 7.24 ± 0.42 | 7.04 ± 1.18 | 6.47 ± 0.29^{ef} |

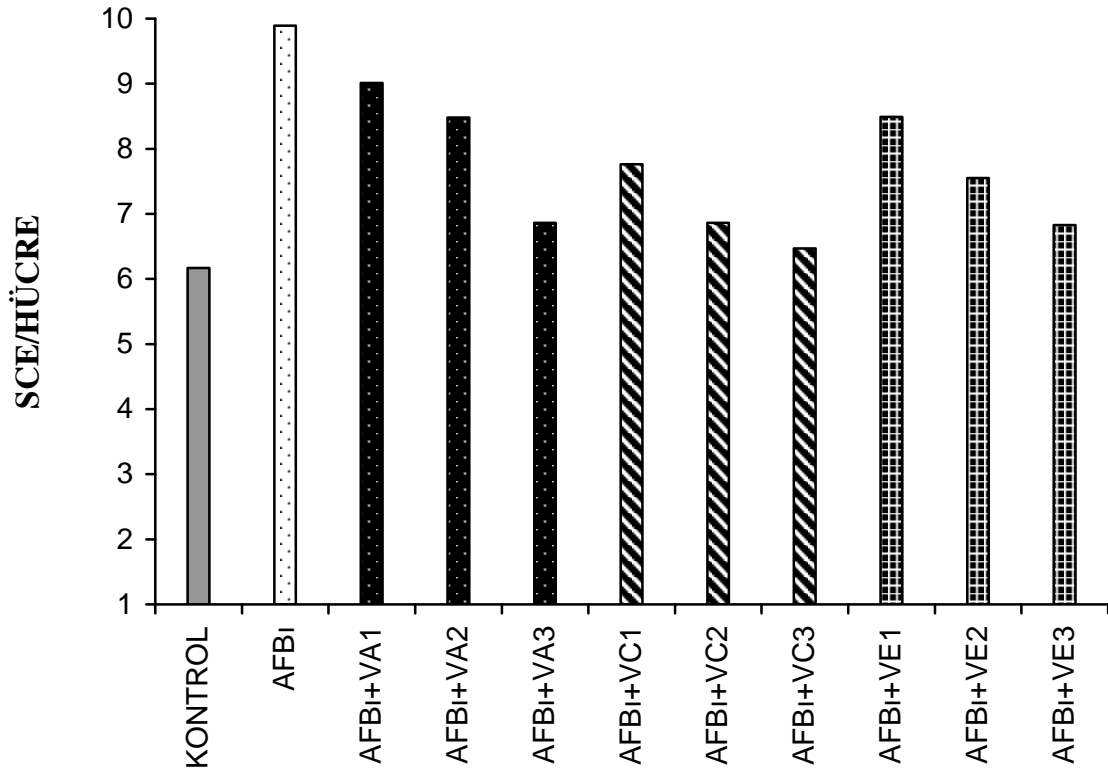
AFB₁: $5\mu\text{M}$, VC1: $25\mu\text{M}$, VC2: $50\mu\text{M}$, VC3: $100\mu\text{M}$
 Kontrole göre; ^a $p=0.000$ ^b $p=0.011$ ^c $p=0.006$
 AFB₁'e göre; ^d $p=0.01$ ^e $p=0.000$
 AFB₁+VC1'e göre; ^f $p=0.004$

Sadece AFB₁ in verildiği kültürlerin vitamin E'nin $50\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$ ve $200\mu\text{M}$ dozlarındaki KKD frekansları karşılaştırıldığında sırası ile 8.49 ± 0.27 ($p=0.028$), 7.55 ± 0.46 ($p=0.022$) ve 6.83 ± 0.32 ($p=0.001$) olarak bulunmuştur. Bu değerler ile vitamin E'nin AFB₁'in KKD'yi arttırıcı etkisinin engellendiği görülmüştür. AFB₁'in KKD'yi arttırıcı etkisini engellemesi açısından değerlendirildiğinde, AFB₁+VE2 ile AFB₁+VE3 karşılaştırıldıklarında, KKD üzerine azaltıcı etkileri yönünden bir fark oluşmadığı, vitamin E'nin $200\mu\text{M}$ dozlarındaki uygulamalarında KKD'yi azaltıcı bu etkinin daha net görüldüğü tespit edilmiştir ($p=0.001$; Çizelge 4.1.3.). E vitamininin $200\mu\text{M}$ 'lık dozu ile kontrol grubu arasında KKD değeri ortalamaları birbirine yakın ve fark istatistiksel olarak önemsizdir (Çizelge 4.1.1.).

Çizelge 4.1.3. Vitamin E uygulandığında lenfosit kültürlerinden elde edilen KKD frekansları ($\bar{X} \pm SE$)

| | Donör 1 | Donör 2 | Donör 3 | Donör 4 | Ortalama |
|----------------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|----------------------------|
| Kontrol | 6.20 ± 0.22 | 5.90 ± 0.51 | 6.47 ± 0.46 | 6.12 ± 0.33 | 6.17 ± 0.12 |
| AFB₁ | 10.12 ± 0.10 | 9.71 ± 0.36 | 10.22 ± 0.26 | 9.52 ± 0.36 | 9.89 ± 0.17 ^a |
| AFB₁+VE1 | 8.10 ± 0.48 | 8.00 ± 0.26 | 8.78 ± 0.38 | 9.11 ± 0.57 | 8.49 ± 0.27 ^{bd} |
| AFB₁+VE2 | 6.60 ± 0.52 | 6.95 ± 0.38 | 8.10 ± 1.69 | 8.53 ± 0.34 | 7.55 ± 0.46 ^{ceg} |
| AFB₁+VE3 | 6.40 ± 0.64 | 6.54 ± 0.34 | 7.78 ± 0.61 | 6.60 ± 0.39 | 6.83 ± 0.32 ^{fh} |

AFB₁: 5 µM, VE1: 50 µM, VE2: 100 µM, VE3: 200 µM
 Kontrole göre; ^ap=0.000 ^bp=0.002 ^cp=0.03
 AFB₁ e göre; ^dp=0.028 ^ep=0.022 ^fp=0.001
 AFB₁+VE1 e göre; ^gp=0.02 ^hp=0.013



Şekil 4.1.1. KKD üzerine AFB₁ ve vitaminlerin etkisi

4. 2. SOD, GPx, MDA ve GSH Bulguları

Yaptığımız çalışmalarda sadece AFB₁ verilen grup kontrol grubuna göre, AFB₁ ile birlikte vitamin verilen gruplarda sadece AFB₁ verilen gruba göre değerlendirilmiştir. AFB₁'in kontrol grubuna göre önemli derecede ($p<0.001$) SOD aktivitesini azalttığı görülmüştür (Çizelge 4.2.1.). AFB₁ ile birlikte kültür ortamına ilave edilen A, C ve E vitaminleri ve bunların 3 farklı konsantrasyonlarının SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. AFB₁ in SOD aktivitesini azaltmasına karşın, AFB₁ ile birlikte A vitamininin 3 farklı konsantrasyonunun eklenmesi, bu enzimin aktivitesini önemli derecede artırdığı belirlenmiştir. Vitamin A'nın uygulanan konsantrasyonlarının artmasına bağlı olarak SOD aktivitesi de artmıştır. Kontrol grubunda SOD aktivitesi 5.12 ± 0.34 U/mg protein, sadece AFB₁ verilen grupta SOD aktivitesi 1.45 ± 0.081 U/mg protein, A vitamini ilavesine bağlı olarak AFB₁+A vitamininin $0.5 \mu\text{M}$ 'lık dozunda SOD aktivitesi 1.67 ± 0.07 U/mg protein, AFB₁+A vitamininin $1 \mu\text{M}$ 'lık dozunda 1.92 ± 0.08 U/mg protein ve AFB₁+A vitamininin $1.5 \mu\text{M}$ 'lık dozunda ise 2.33 ± 0.26 U/mg protein olarak ölçülmüştür. AFB₁+A vitamininin $0.5 \mu\text{M}$ 'lık dozu ile AFB₁ grubu arasındaki SOD aktivitesi istatistiksel olarak $p<0.001$ seviyesinde önemli bulunmazken $p<0.05$ seviyesinde önemli bulunmuştur. A vitamininin AFB₁ ile birlikte kullanılan 2 farklı dozunun SOD aktivitesi üzerine olan etkisi $p<0.001$ seviyesinde önemli olduğu görülmüştür (Çizelge 4.2.1.) (Şekil 4.2.1). SOD aktivitesinin A vitamininin $0.5 \mu\text{M}$ 'lık dozu ile $1 \mu\text{M}$ 'lık ve $1.5 \mu\text{M}$ 'lık dozu arasındaki artışı $p<0.001$ seviyesinde önemli iken, $1 \mu\text{M}$ 'lık dozu ile $1.5 \mu\text{M}$ 'lık dozu arasındaki artışı $p<0.05$ seviyesinde önemli bulunmuştur.

AFB₁ ile verilen C vitaminin de $25, 50$ ve $100 \mu\text{M}$ 'lık 3 farklı konsantrasyonunun SOD aktivitesini artırdığı gözlenmiştir. Her 3 konsantrasyonunun sadece AFB₁ verilen grupla mukayese edildiği zaman SOD aktivitesi üzerine olan etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.001$). Özellikle C vitamini konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak SOD aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. AFB₁+C vitamininin $25 \mu\text{M}$ 'lık dozunda SOD aktivitesi 1.99 ± 0.10 U/mg protein, AFB₁+C vitamininin $50 \mu\text{M}$ 'lık dozunda 2.40 ± 0.25 U/mg protein, AFB₁+C vitamininin $100 \mu\text{M}$ 'lık dozunda ise 3.34 ± 0.21 U/mg protein

olarak ölçülmüştür. C vitamini konsantrasyonunun artmasına bağlı olarakta SOD aktivitesi artışı pozitif korelasyon göstermiştir. C vitamininin bütün konsantrasyonlarındaki SOD aktivitesi artışları istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.001$) (Çizelge 4.2.2.) (Şekil 4.2.1). C vitamininin 25 μM 'lık dozu ile 50 μM 'lık dozu arasındaki fark $p<0.05$ seviyesinde önemli iken, 25 μM ve 50 μM 'lık doz ile 100 μM 'lık dozu arasındaki fark $p<0.001$ seviyesinde önemli olduğu gözlenmiştir.

E vitamininin kullanılan farklı konsantrasyonları yine SOD aktivitesinde artışa neden olmuştur. SOD aktivitesi AFB₁+E vitamininin 50 μM 'lık dozunda 2.28 ± 0.18 U/mg protein, AFB₁+E vitamininin 100 μM 'lık dozunda 2.91 ± 0.30 U/mg protein ve AFB₁+E vitamininin 200 μM 'lık dozunda 4.03 ± 0.17 U/mg protein olarak ölçülmüştür. Her 3 konsantrasyonda da SOD aktivitesindeki artış değerleri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Özellikle AFB₁ ile+E vitamininin 200 μM 'lık dozunda ölçülen SOD aktivitesinin kontrol grubuna en yakın değer olduğu tespit edilmiştir. E vitamininin 3 farklı dozu arasındaki SOD aktivite farkında $p<0.001$ seviyesinde önemli olduğu görülmüştür. SOD aktivitesi üzerine kullanılan vitaminlerin etkinlik sırasının ortalama aktivitelere bakılarak E>C>A olduğu söylenebilir.

AFB₁ ve vitamin A, C ve E'nin GPx üzerine etkilerinde ise genel olarak AFB₁'in GPx aktivitesini azalttığı AFB₁ ile vitaminlerin 3 farklı dozunun verilmesi ile GPx aktivitesinin arttığı görülmüştür. Kontrol grubunda GPx aktivitesi 243.75 ± 28.20 U/g protein iken, AFB₁ grubunda 58.12 ± 8.5 U/g proteine düşmüştür. GPx aktivitesindeki azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.001$). Çizelge 4.2.1. de görüldüğü gibi, AFB₁ ile A vitamininin 3 farklı konsantrasyonu verildiğinde ise GPx aktivitesi sırayla AFB₁+A vitamininin 0.5 μM 'lık konsantrasyonunda 76.62 ± 6.78 U/g protein, AFB₁+A vitamininin 1 μM 'lık konsantrasyonunda 91.62 ± 11.16 U/g protein ve AFB₁+A vitamininin 1.5 μM 'lık konsantrasyonunda ise 125.25 ± 12.48 U/g protein olarak ölçülmüştür (Şekil 4.2.2). A vitamininin her 3 konsantrasyonunun da GPx aktivitesi artışı üzerine olan etkisi $p<0.001$ e göre istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. GPx aktivitesi üzerine A vitamininin 3 farklı dozu arasındaki farklar ise 0.5 μM 'lık doz ile 1

μM 'lık doz arasındaki fark $p<0.005$ seviyesinde önemli, $1.5 \mu\text{M}$ 'lık doz ile $0.5 \mu\text{M}$ ve $1 \mu\text{M}$ 'lık doz arasındaki fark ise $p<0.001$ seviyesinde önemli bulunmuştur.

AFB₁ ile C vitamininin 3 farklı konsantrasyonu verildiğinde ise GPx aktivitesi sırası ile AFB₁+C vitamininin $25 \mu\text{M}$ 'lık dozunda 82.75 ± 8.18 U/g protein, AFB₁+C vitamininin $50 \mu\text{M}$ 'lık dozunda 114.12 ± 11.98 U/g protein ve AFB₁+C vitamininin $100 \mu\text{M}$ 'lık dozunda ise 149.87 ± 8.18 U/g protein olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.2.2.) (Şekil 4.2.2). A vitamininde olduğu gibi C vitamininin 3 farklı konsantrasyonunun GPx aktivitesi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.001$). C vitamininin 3 farklı dozu arasındaki GPx aktivitesi farklılığı $p<0.001$ seviyesinde önemli görülmüştür.

Son olarak kullanılan E vitamininin 3 farklı konsantrasyonunda AFB₁ ile beraber verildiğinde GPx aktivitesi AFB₁+E vitamininin $50 \mu\text{M}$ 'lık dozunda 87.12 ± 5.51 U/g protein, AFB₁+E vitamininin $100 \mu\text{M}$ 'lık dozunda 124.50 ± 8.66 U/g protein ve AFB₁+E vitamininin $200 \mu\text{M}$ 'lık dozunda ise 166.00 ± 10.16 U/g protein olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.2.3.). E vitamininin bu 3 farklı dozunda kontrol grubuna en yakın olan GPx aktivitesi, E vitamininin $200 \mu\text{M}$ 'lık dozunda tespit edilmiştir. E vitamininin her 3 dozunda GPx aktivitesi artışı üzerine olan etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.001$). GPx aktivitesi üzerine kullanılan vitaminlerden E vitamininin en etkili olduğu gözlenmiş ve etki sırasının GPx aktivite ortalamalarına bakılarak E>C>A vitamini şeklinde olduğu söylenebilir.

Enzimatik olmayan antioksidan GSH miktarı üzerine yaptığımız çalışmalarda ise AFB₁ grubunda ($0.13\pm 0.016 \mu\text{mol/g}$ protein) kontrole ($1.73\pm 0.08 \mu\text{mol/g}$ protein) göre GSH miktarı önemli derecede düşük ölçülmüştür. Fakat kullanılan vitaminlerin 3 farklı dozu da AFB₁ grubu ile mukayese edildiği zaman GSH miktarını önemli derece artırdığı gözlenmiştir ($p<0.001$).

AFB₁+A vitamininin $0.5 \mu\text{M}$ 'lık dozunda GSH miktarı $0.24\pm 0.04 \mu\text{mol/g}$ protein, AFB₁+A vitamininin $1 \mu\text{M}$ 'lık dozunda $0.77\pm 0.07 \mu\text{mol/g}$ protein ve AFB₁+A vitamininin $1.5 \mu\text{M}$ 'lık dozunda ise $0.91\pm 0.07 \mu\text{mol/g}$ protein olarak ölçülmüştür. A

vitaminin her 3 konsantrasyonunda GSH miktarı artışı üzerine olan etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.001$).

Çizelge 4.2.2 de görüldüğü üzere, AFB₁+C vitamininin 25 µM'lık dozunda GSH miktarı 0.27 ± 0.06 µmol/g protein, AFB₁+C vitamininin 50 µM'lık dozunda 0.99 ± 0.11 µmol/g protein ve AFB₁+C vitamininin 100 µM'lık dozunda ise 1.25 ± 0.07 µmol/g protein olarak ölçülmüştür. A vitamininde olduğu gibi C vitaminin de 3 farklı dozu GSH miktarı artışı üzerine etkisi $p<0.001$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

E vitamininin ise AFB₁ ile verilen 3 farklı dozunda GSH miktarı AFB₁+50 µM E vitamininde 0.38 ± 0.09 µmol/g protein AFB₁+100 µM E vitamininde 1.43 ± 0.07 µmol/g protein AFB₁+200 µM E vitamininde ise 1.54 ± 0.06 µmol/g protein olarak ölçülmüştür. Bu ölçümler ile AFB₁ grubu arasındaki GSH miktarı farkı istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.001$). GSH miktarı üzerine vitaminlerin etki sırası E>C>A vitamini şeklinde olduğu tespit edilmiştir.

Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA miktarı ile yaptığımız çalışmalarda ise, AFB₁ lipid peroksidasyonunu artırdığından dolayı MDA miktarında önemli derecede artışa neden olmuştur. Kontrol grubunda MDA miktarı 15.50 ± 3.42 µmol/L iken AFB₁ ilave edilen grupta MDA miktarının 94.25 ± 8.01 µmol/L olduğu gözlenmiştir ($p<0.001$). Fakat AFB₁ ile birlikte antioksidan özelliğe sahip olan vitaminlerin (A; C ve E) ilave edilmesi ile MDA miktarının azaldığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.2.1'de görüldüğü gibi, AFB₁+0.5 µM'lık A vitamini dozunda MDA miktarı 66.12 ± 10.02 µmol/L, AFB₁+1 µM'lık A vitamini dozunda 42.12 ± 9.49 µmol/L ve AFB₁+1.5 µM'lık A vitamini dozunda 39.25 ± 5.67 µmol/L olduğu görülmüştür. A vitamini konsantrasyonu artışına bağlı olarak MDA miktarının azalması dikkati çekmiştir. MDA miktarındaki bu azalma AFB₁ grubu ile mukayese edildiği zaman istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.001$)

AFB₁ ile C vitamininin 25 µM'lık dozunda MDA miktarı 47.25±3.95 µmol/L, 50 µM'lık dozunda 38.12±3.68 µmol/L ve 100 µM'lık dozunda 31.75±8.31 µmol/L olarak ölçülmüştür. A vitamininde olduğu gibi C vitamininin de MDA üzerine olan etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0.001).

AFB₁ ile E vitamininin verildiği gruplarda ise sırası ile MDA miktarı 50 µM'lık dozunda 35.37±6.11 µmol/L, 100 µM'lık dozunda 26.37±6.30 µmol/L 200 µM'lık dozunda 21.75±7.55 µmol/L olarak ölçülmüştür ve bu ölçümlerle AFB₁ grubu arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (p<0.001). SOD ve GPx aktivitesi ile GSH miktarında olduğu gibi MDA miktarı üzerine de E vitaminin en etkili vitamin olduğu ve vitaminlerin etki sırasının E>C>A şeklinde olduğu tespit edilmiştir.

Vitaminlerin AFB₁'in mutajenik etkisine karşı antimutajenik mekanizmada her 3 vitaminin de etkili olduğu ve bu vitaminlerin konsantrasyonlarının artması ile AFB₁'in mutajenik etkisinin azaldığı gözlenmiştir. Özellikle bu vitaminlerden C vitamininin yüksek dozunun antimutajenite mekanizmasında daha etkili olduğu tespit edilmiştir (C>E>A).

AFB₁'in SOD ve GPx enzimlerinin aktivitesi ile GSH miktarı üzerine azaltıcı, MDA miktarı üzerine ise artırıcı etkisine karşın vitaminlerin antagonistik etkisinin olduğu, özellikle E vitamininin yüksek dozunun en etkili doz olduğu gözlenmiştir (E>C>A).

Çizelge 4.2.1. AFB₁ ve Vitamin A'nın SOD, GPX, GSH ve MDA üzerine etkileri

| | Grup 1 Kontrol | Grup 2 AFB ₁ | Grup 3 AFB ₁ +VA1 | Grup 4 AFB ₁ +VA2 | Grup 5 AFB ₁ +VA3 |
|---|-------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| SOD (U/mg protein) | 5.12±0.34 | 1.45± 0.08 ^a | 1.67± 0.07 ^b | 1.92±0.08 ^{ac} | 2.33±0.26 ^{acf} |
| GPx (U/g protein) | 243.75±28.20 | 58.12±8.5 ^a | 76.62±6.78 ^a | 91.62±11.16 ^{ad} | 125.25±12.48 ^{ace} |
| GSH (µmol/g protein) | 1.73±0.08 | 0.13±0.016 ^a | 0.24±0.04 ^a | 0.77±0.07 ^{ac} | 0.91±0.07 ^{acf} |
| MDA (µmol/L) | 15.50±3.42 | 94.25±8.01 ^a | 66.12±10.02 ^a | 42.12±9.49 ^{ad} | 39.25±5.67 ^{ac} |
| Kontrol ve AFB ₁ grubuna göre; | | ^a p<0.001 | | | |
| AFB ₁ grubuna göre; | | ^b p<0.05 | | | |
| AFB ₁ +VA1'e göre; | | ^c p<0.001 | | ^d p<0.05 | |
| AFB ₁ +VA2'e göre; | | ^e p<0.001 | | ^f p<0.05 | |

Çizelge 4.2.2. SOD, GPX, GSH ve MDA üzerine AFB₁ ve Vitamin C'nin etkileri

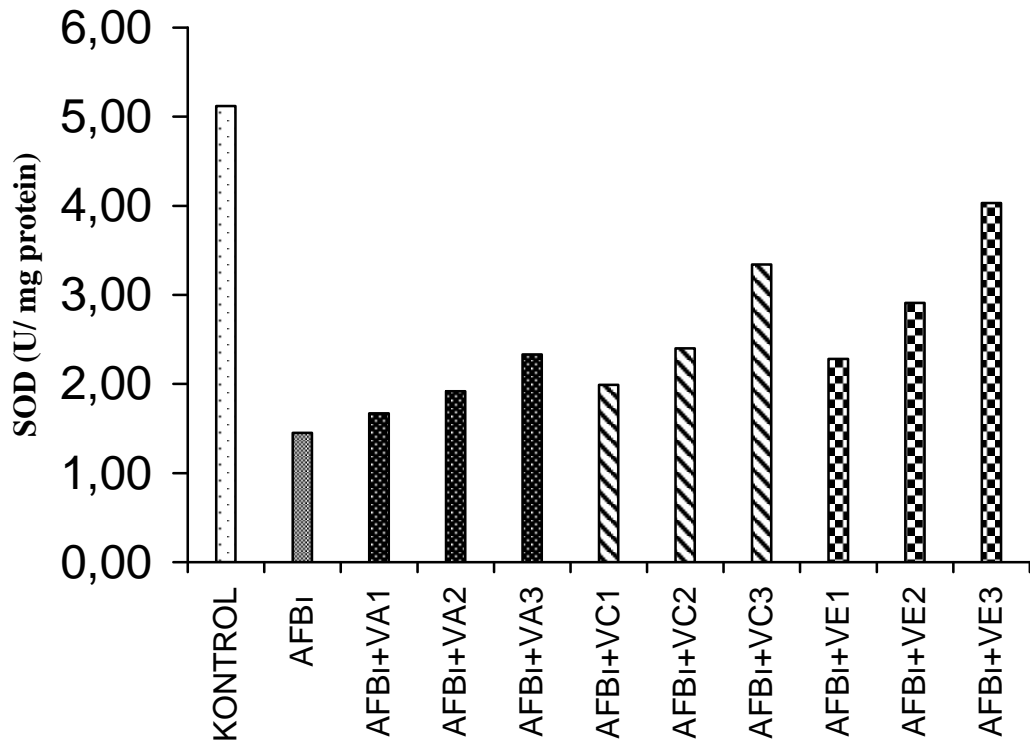
| | Grup 1 Kontrol | Grup 2 AFB ₁ | Grup 3 AFB ₁ +VC1 | Grup 4 AFB ₁ +VC2 | Grup 5 AFB ₁ +VC3 |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| SOD (U/mg protein) | 5.12±0.34 | 1.45± 0.08 ^a | 1.99±0.10 ^a | 2.40±0.25 ^{ac} | 3.34±0.21 ^{abd} |
| GPX (U/g protein) | 243.75±28.20 | 58.12±8.52 ^a | 82.75±8.18 ^a | 114.12±11.98 ^{ab} | 149.87±8.18 ^{abd} |
| GSH (µmol/g protein) | 1.73±0.08 | 0.13±0.016 ^a | 0.27±0.06 ^a | 0.99±0.11 ^{ab} | 1.25±0.078 ^{abe} |
| MDA (µmol/L) | 15.50±3.42 | 94.25±8.01 ^a | 47.25±3.95 ^a | 38.12±3.68 ^{ac} | 31.75±8.31 ^{ab} |

Kontrol ve AFB₁ grubuna göre; ^ap<0.001
 AFB₁+VC1'e göre; ^bp<0.001 ^cp<0.05
 AFB₁+VC2'e göre; ^dp<0.001 ^ep<0.05

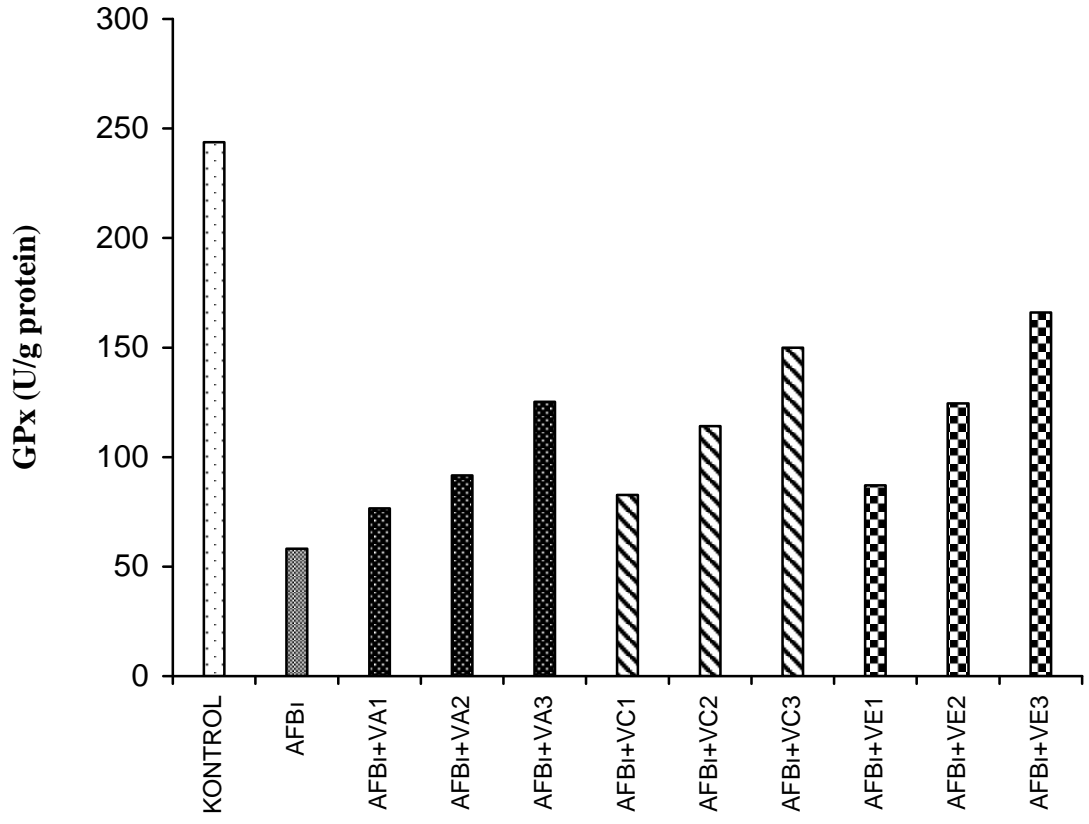
Çizelge 4.2.3. AFB₁ ve Vitamin E'nin SOD, GPX, GSH ve MDA üzerine etkileri

| | Grup 1 Kontrol | Grup 2 AFB ₁ | Grup 3 AFB ₁ +VE1 | Grup 4 AFB ₁ +VE2 | Grup 5 AFB ₁ +VE3 |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| SOD (U/mg protein) | 5.12±0.34 | 1.45±0.08 ^a | 2.28±0.18 ^{ab} | 2.91±0.30 ^{abc} | 4.03±0.17 ^{abce} |
| GPX (U/g protein) | 243.75±28.2 0 | 58.12±8.52 ^a | 87.12±5.51 ^{ab} | 124.50±8.66 ^{abc} | 166.00±10.16 ^{abce} |
| GSH (µmol/g protein) | 1.73±0.08 | 0.13±0.01 ^a | 0.38±0.09 ^{ab} | 1.43±0.07 ^{abc} | 1.54±0.06 ^{abcf} |
| MDA (µmol/L) | 15.50±3.42 | 94.25±8.01 ^a | 35.37±6.11 ^{ab} | 26.37±6.30 ^{abd} | 21.75±7.55 ^{bd} |

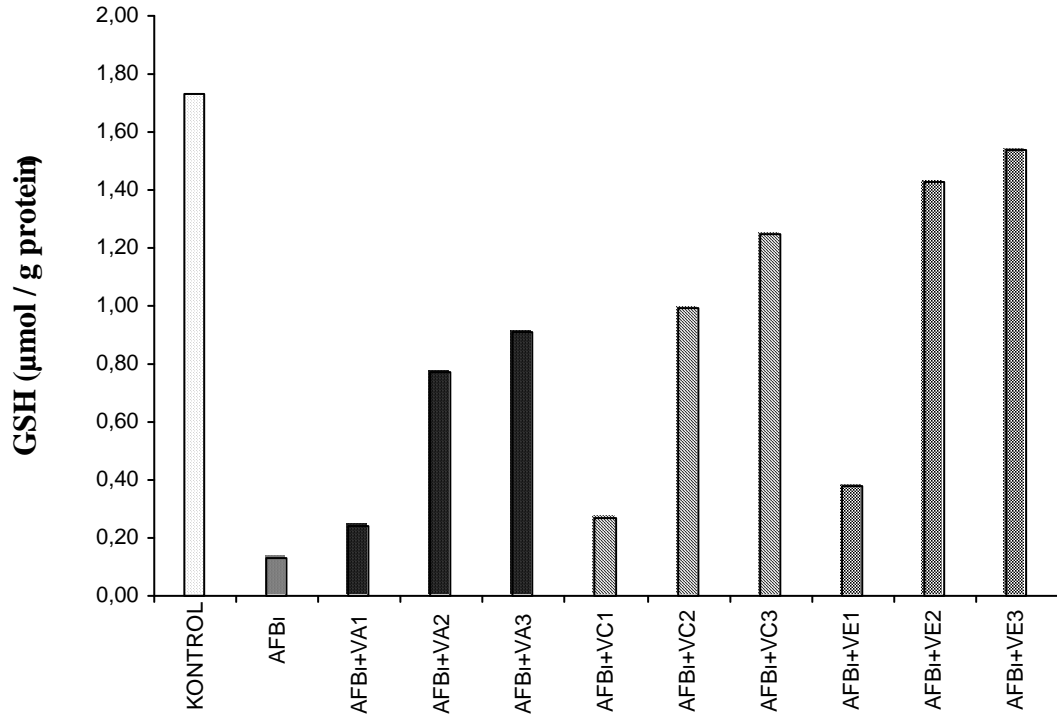
Kontrole göre; ^ap<0.001
 AFB₁ grubuna göre; ^bp<0.001
 AFB₁+VE1'e göre; ^cp<0.001 ^dp<0.05
 AFB₁+VE2'e göre; ^ep<0.001 ^fp<0.05



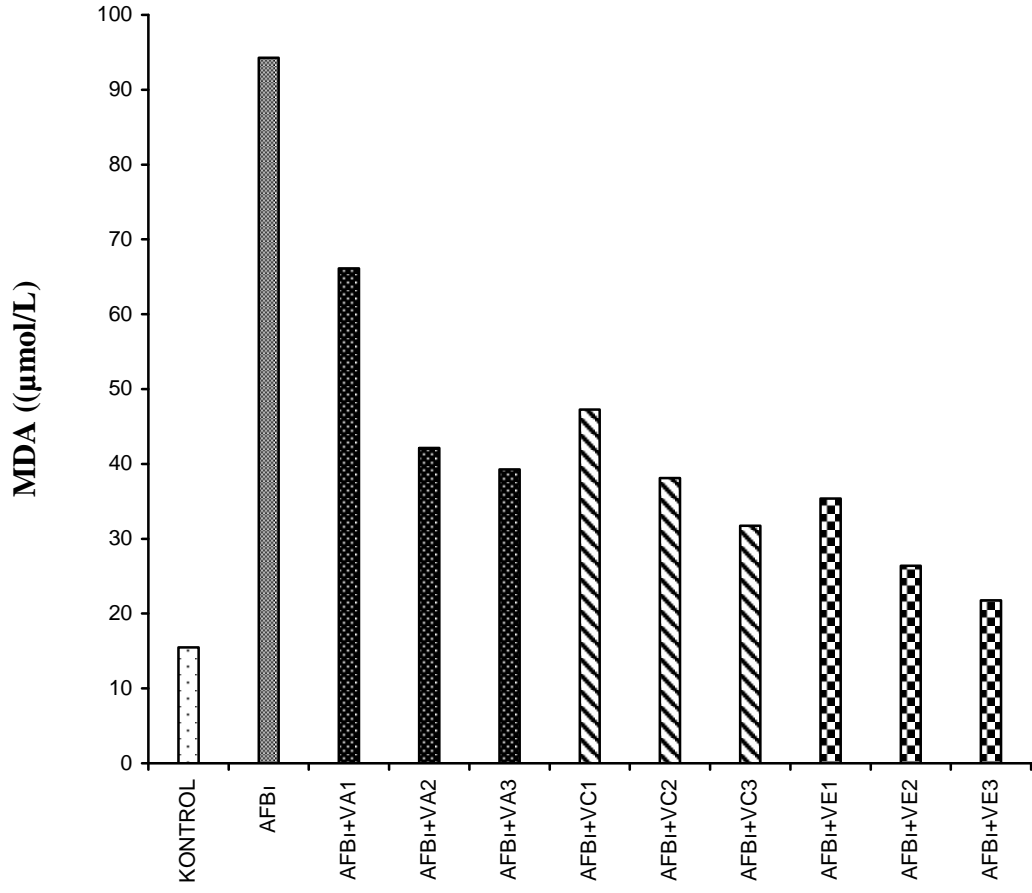
Şekil 4.2.1. AFB₁ ile vitamin A, C ve E'nin SOD aktivitesi üzerine etkileri



Şekil 4.2.2. GPx aktivitesi üzerine AFB₁ ile vitamin A, C ve E'nin etkileri



Şekil 4.2.3. AFB₁ ile vitamin A, C ve E'nin GSH seviyesi üzerine etkileri



Şekil 4.2.4. MDA seviyesi üzerine AFB₁ ile Vitamin A, C ve E'nin etkileri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çerçevesinde yaptığımız çalışmalarda, AFB₁'in insan periferik lenfositlerinde KKD'ni artırdığı görülmüştür. AFB₁ (5 µM) uygulanan lenfosit kültürlerinde kontrol ile aralarındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. AFB₁ tek verildiğinde KKD frekansı 9.89±0.17 olarak tespit edilmiştir (p=0.000).

Daha önce yapılan benzer çalışmalarda aflatoksinlerin KA'leri ve KKD'ni artırdığı bilinmektedir. Leon-Cazares ve Aroche-alfonso (1977), insan lenfositleri ile *Aspergillus parasiticus* türü mantarın sporlarını birlikte 37 °C'de 72 saat inkübasyona bırakmış, yapılan çalışmaların sonucunda da aflatoksinlerin KA'lere neden olduğunu göstermiştir Thomson ve Evans (1979) ise Çin hamster ovaryum (CHO) hücreleri ve insan lenfositleri ile yaptıkları çalışmada AFB₁'in KKD artışından sorumlu olduğunu belirtmişlerdir. Deng ve arkadaşları (1988), AFB₁'in KKD oluşumunu ciddi oranda artırdığını tespit etmişlerdir. Andrew ve arkadaşlarının (1997), yaptığı çalışmada ise 1–10 µM AFB₁'in fare, rat ve insan lenfositlerinde KKD'ni artırdığını bildirmişlerdir. Çalışmamızla paralellik gösteren diğer bir araştırmada da 1, 5, 10 µM AFB₁'in insan lenfosit hücrelerinde KKD'ni artırdığı ve sodyum selenitenin antioksidan özelliğinden dolayı, AFB₁'in bu zararlı etkisini azalttığı ortaya konulmuştur (Geyikoğlu ve Türkez 2006).

KKD'nin oluşum mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, mutajenitenin artmasına bağlı olarak KKD artışının olduğu düşünülmektedir (İkbal vd. 2003). AFB₁ gerek DNA'ya bağlanarak, gerekse salınımını uyardığı OH⁻ iyonlarının DNA hasarına neden olmasından dolayı mutajenik etkisi vardır. AFB₁'in mutajenik etkisi DNA'daki guanin bazının N-7 ile AFB₁'in 8. karbonu arasında kovalent bağ kurulmasına bağlı olarak, özellikle G-T şeklinde transversiyona neden olmasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir. AFB₁ verilmesine bağlı olarak ratların karaciğerlerinde 8-oksodeoksiguanozin (8-oxodG) oluşumu artmakta bunun da KKD oluşumunu arttırdığı düşünülmektedir. AFB₁'in KKD'ni artırmasının ikinci bir nedeni ise ROT oluşumunu

artırmasıdır. AFB₁'in metabolik aktivasyonundan dolayı ROT'nin miktarını ve oksidatif stresi artırdığı bildirilmektedir (Chan *et al.* 2003). ROT'lerinin artışı ise mutasyona neden olarak KKD'ni artırmaktadır (Lee *et al.* 1989; Weitberg 1989).

AFB₁ (5 µM) ile birlikte vitamin A (0.5, 1, 1.5 µM), C (25, 50, 100 µM) ve E (50, 100, 200 µM)'nin üç farklı konsantrasyonları uygulandığında, KKD sayısının azaldığı tespit edilmiştir. KKD'nin azaltılması üzerine kullanılan vitamin ve dozları dikkate alındığında, en etkili vitaminin indirgeyici aktiviteye sahip, güçlü bir antioksidan, süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girebildiği için, onların temizlenmesini sağlayan C vitamini olduğu görülmüştür. AFB₁ ile birlikte tüm vitamin uygulamaları, AFB₁ in mutajenik etkisini azaltarak KKD'ni azalttığı belirlenmiştir. AFB₁'in KKD'ni arttırıcı etkisini engellemesi açısından değerlendirildiğinde, vitamin A'nın 1.5 µM'lık dozundaki uygulamalarda A vitamininin diğer dozlarına göre KKD oranında daha net bir azalma görüldüğü tespit edilmiştir (p=0.008; Çizelge 4.1.1.).

AFB₁'in ve çeşitli kimyasal maddelerin mutajenik etkisine karşı vitaminlerin antimutajenik etki gösterdiğine dair çeşitli çalışmalar vardır. AFB₁'in KKD'ni artırmasına karşın, β-karotenin düşük dozlarının (2×10^{-7} M) KKD'ni azalttığı, yüksek dozlarının (10^{-4} - 10^{-5}) ise KKD oranını artırdığı yapılan bir araştırmada gösterilmiştir (Deng *et al.* 1988). Vitamin A'nın diğer bir formu olan retinol ile yapılan başka bir çalışmada retinolün dozu ve uygulama süresinin sidofosfamid ve AFB₁'in neden olduğu KKD'ni azalttığı bulunmuştur (Huang *et al.* 1982). Yine retinol ve 3-Amino-1-metil-5H-pirido [4.3-b] indol (Trp-P-2) ile yapılan diğer bir çalışmada, retinolün 1 ve 10 µM'lık konsantrasyonları KKD oranını azaltırken 100 µM'lık dozunun KKD üzerine etkili olmadığı bildirilmiştir (Edenharder *et al.* 1998). İnsan lenfosit kültüründe hidrokortizonun genotoksik etkisi üzerine β-karotenin iki farklı konsantrasyonu (0.5 ve 0.7 µM) çalışılmış ve KA'ler, KKD ve replikasyon indeksi üzerine etkileri incelenmiştir. KA'ler ile KKD'ni azaltırken replikasyon indeksini artırdığı tespit edilmiş, askorbik asitin β-karotene göre daha etkili olduğu ortaya konulmuştur (Ahmad *et al.* 2004). Arseniğin mutajenik etkisine karşı A vitamininin antagonistik etkisini gösteren diğer bir çalışmada ise, insan lenfosit hücrelerinde 10 µg (2.72 µM)'lık A

vitamini ilavesiyle KKD azaldığı gösterilmiştir (Avani and Rao 2007). Fakat literatürlerde bildirildiği gibi, A vitamininin yüksek dozlarının toksik etkiye sahip olduğu, bunun da KA'leri artırdığı belirtilmiştir. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada insan lenfosit kültür ortamına gama ışınları ile birlikte A vitamininin yüksek dozları (2, 8 ve 24 µg) verildiğinde, A vitamini mutajenik etkiyi artırarak KA'leri artırdığı gözlenmiştir (Badr *et al.* 1998). A vitamininin antimutajenik etkisinin singlet oksijen temizleyicisi olması nedeniyle, oksijen radikallerine karşı koruyucu etki yapmasından dolayı olduğu düşünülmüştür. Mutajenik bir madde ile birlikte A vitamininin verilmesinin KKD'ni azaltması da buna bağlanmıştır (Kılınç 1985).

Sadece AFB₁ verilen kültürlerin KKD frekansları C vitamininin 25 µM, 50 µM ve 100 µM'lık dozları ile karşılaştırıldığında, vitamin C'nin AFB₁'in KKD'ni artırıcı etkisini engellediği ve vitamin C'nin 100 µM'lık dozunun uygulamalarda daha etkili olduğu tespit edilmiştir (p=0.000; Çizelge 4.1.2.). C vitamininin çalıştığımız 3 farklı dozunun da toksik etkisine rastlanılmamıştır. 25, 50 ve 100 µM'lık dozları KKD oranında önemli derecede azalmaya neden olmuştur. İnsanlar için tedavi edici dozu günlük 500 mg olan C vitamini, AFB₁ ile birlikte İsviçre albino farelerine verilmiş, C vitamini AFB₁'in neden olduğu KA'leri azaltmıştır (Bose and Sinha 1991) Hidrokortizonun mutajenik etkisine karşı da insan lenfosit kültürlerinde C vitamininin 60 ve 80 µM'lık konsantrasyonları kullanılmış ve β-karoten ve flavonoidlere göre KA, KKD ve replikasyon indeksi üzerine daha etkili olduğu gösterilmiştir (Ahmad *et al.* 2002; 2004). İnsan lenfosit kültürlerinde doksorubisin (DXR) ve C vitamininin KA'ler üzerine etkisi incelenmiş ve C vitamininin 100 ve 200 µg/mL'lik dozları 500 ve 1000 µg/mL'lik dozlara göre daha etkili olduğu bulunmuştur (Lusania *et al.* 1999). Pirimetamin ile yapılan başka bir çalışmada, yine insan lenfosit kültürlerinde 20, 40, 80 µM'lık C vitamininin KA'leri azaltıp mitotik indeksi artırdığı belirlenmiştir (Egel *et al.* 2002). İnsan lenfosit kültüründe merkurik klorid'in (MC) mutajenik etkisine karşı C vitamininin 12 µg/7 mL (9.7 µM)'lık konsantrasyonu çalışılmış ve MC'in KKD ve KA'ni artırmasına karşılık C vitamininin mutajenik etkiyi azalttığı gözlemlenmiştir (Rao *et al.* 2001). Fareler üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise megastrol asetat (32.50 mg/kg) ile birlikte 20, 40 ve 60 mg/kg C vitamini verildiğinde, gerek KA'de

gerekse KKD'de önemli derecede azalma meydana geldiği gösterilmiştir (Siddique *et al.* 2005). Çalışmalarımız bu literatürlerle paralellik göstermektedir. C vitamininin bu antimutajenik etkisi plazmada oksidan ajanlara karşı ilk antioksidan savunmayı oluşturması, süperoksit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girip onları temizleyen bir antioksidan olmasının yanı sıra, tokoferoksil radikalinin tekrar tokoferole dönüşmesi, bu esnada kendisinin de dehidroaskorbata oksitlenmesinden kaynaklanmaktadır. (Cherubini *et al.* 2005). Mutajenik maddelerin hücrede artışına neden olduğu ROT'lerini bu mekanizma ile C vitamininin azaltılmasında, KKD'ni azalttığı düşünülmektedir.

Diğer bir antioksidan özelliğe sahip olan E vitamininin de çalışılan 3 farklı dozunun da AFB₁ tarafından artırılan KKD'ni önemli derecede azalttığı görülmüştür. Sadece AFB₁'in verildiği kültürlerin KKD frekansları vitamin E'nin 50 µM, 100 µM ve 200 µM dozlarındaki KKD frekansları ile karşılaştırıldığında, vitamin E'nin AFB₁'in KKD'ni arttırıcı etkisini engellendiği görülmüştür. AFB₁'in KKD'ni arttırıcı etkisini engellemesi açısından değerlendirildiğinde, vitamin E'nin 200 µM'lık dozundaki uygulamalarda daha net görüldüğü tespit edilmiştir (p=0.013) Yapılan benzer çalışmalarda karaciğer dokusunda AFB₁ ve adriamisinin mutajenik etkisine karşı E vitamininin antimutajenik aktivitesi gösterilmiştir (Chlopkiwicz *et al.*1991). İnsan lenfosit kültüründe hidrokortisonun neden olduğu KA'ler ve KKD'ni azalttığı belirlenmiştir (Ahmad *et al.* 2002). Çalışmalarımızla paralellik gösteren diğer bir çalışmada ise koyun periferik lenfosit kültüründe karbontetrakloritin neden olduğu KA, KKD ve MN'u vitamin E ve selenyum ilavesinin azalttığı bildirilmiştir (Weitberg 1989; Sivikova *et al.* 2001). E vitamininin antimutajenik etkisi peroksit ve hidroperoksitleri hidrojen iyonu ile doyurarak, peroksit radikallerinin aktivitesini azaltması (Çelik *et al.* 1996), ayrıca tokoferollerin singlet oksijen ile reaksiyona girerek membranları singlet oksijenine karşı koruması (Halliwell *et al.* 1996) ve bu koruma sayesinde oksidatif stresi azaltmasından kaynaklandığı çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Anderson. and Phillips 1999; Ahmad *et al.* 2004).

Yaptığımız çalışmada KKD üzerine vitaminlerin etki sırasının KKD oranlarına bakıldığında C>E>A şeklinde olduğu söylenebilir. Uygulanan vitaminler kendi aralarında karşılaştırıldığında, C vitamininin A ve E vitaminine göre mutajenik maddelere karşı antimutajenik aktivitesinin daha fazla olduğu, yaptığımız çalışmaların sonuçlarına paralel olan çalışmalarla gösterilmiştir. Bunun nedeni ise DNA ile çok kolay reaksiyona girdiği için mutasyonlara neden olan OH⁻ radikalleri ile C vitamininin doğrudan reaksiyona girerek miktarını azaltması olarak gösterilmiştir (Anderson. and Phillips 1999; Ahmad *et al.* 2004).

Organizmada metabolik ve fizyolojik olaylar sonucu ROT üretilmekte ve zararlı oksidatif reaksiyonlar oluşabilmektedir (Erel 2004). Günümüzde çok sayıda araştırmacı serbest radikallerin DNA, proteinler, lipitler ve hücrenin diğer bileşenleri üzerinde sebep olduğu oksidatif hasarı araştırmaktadır (Çakatay ve Kayalı 2004). Serbest radikallerin nukleusta ve DNA'daki etkileri genotoksik ve mutajeniktir. Serbest radikaller pürin ve pirimidin modifikasyonuna veya DNA iplikleri ve kromozom kırılmalarına, onkojen aktivasyonuna neden oldukları için karsinogeneziste önemlidirler (Seven ve Candan 1995; Barrington *et. al.* 1996). Aflatoksinlerde ROT'lerinin seviyesinde artmaya neden oldukları bildirilmiştir (Lee *et al.* 2005). AFB₁ özellikle serbest radikallerden DNA, protein ve lipidlerle kolayca reaksiyona girerek DNA'nın yapısında mutasyonlara, proteinlerin yapısına bağlanarak proteinlerde yapı değişikliklerine ve dolayısıyla da proteinlerin oksidasyonuna ve lipid peroksidasyonuna neden olan OH⁻ radikalinin salınımına neden olurlar (Bedard and Massey 2006).

ROT'lerinin azaltılmasını veya başka moleküllere çevrilmesini antioksidan sistemler sağlamaktadırlar. Bu antioksidan sistemlerin enzimatik olanlarından en önemlilerinden bir tanesi süperoksit radikallerini O₂ veya daha az reaktif olan H₂O₂'e dönüştüren SOD enzimidir (Mc Cord and Fridovich 1969). Yaptığımız çalışmalarda AFB₁'in SOD aktivitesi üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Kontrol grubunda ki SOD aktivitesi, sadece AFB₁ verilen grupla karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0.001). Verma ve Nair'in (2001), yapmış olduğu çalışmada total aflatoksin kullanımının (25 veya 50 mg/aflatoksin/hayvan/gün) DNA, RNA ve protein miktarını

ve SOD enzim aktivitesini azalttığını bildirmişlerdir. Ratların karaciğeri üzerine yapılan çalışmada da, AFB₁ verilen ratlarda SOD aktivitesi kontrol grubunda AFB₁ verilen gruba göre daha düşük olduğu belirlenmiştir (Preetha *et al.* 2006). Ross PM3 ırkı piliçlere de aflatoksinli (0.05 ppm, 0.1 ppm, 0.5 ppm ve 1.0 ppm) yem verildiğinde 15, 30 ve 45 günlük kan parametrelerinde SOD aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (Eraslan vd. 2005). Çalışmalarımız bu sonuçlarla paralellik göstermektedir. Oksidatif stresin SOD aktivitesini düşürmesinin sebeplerinden birincisi, ROT'lerinin enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi yapmaları, ikincisinde, ROT'lerinin proteinlere bağlanarak proteinlerde yapısal değişikliklere ve buna bağlı olarakta proteinlerin oksidasyonuna neden olmalarıdır. Ayrıca lipid peroksidasyonunun artması, ve buna bağlı olarak ortaya çıkan aldehitler SOD aktivitesi üzerine azaltıcı etkiye sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Venkataraman *et al.* 2004).

Enzimatik olmayan diğer antioksidan maddelerden birisi de vitaminlerdir. Bunlardan en önemlileri A, C ve E vitaminleridir. A vitamini singlet oksijen temizleyicisi olması nedeniyle oksijen radikallerine karşı koruyucu etki yapar (Kılınç 1985). Bundan hareketle yaptığımız çalışmalarda vitaminlerin bu antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. AFB₁ verilen grupta SOD aktivitesi kontrolle mukayese edildiğinde azalma gösterirken, AFB₁ ile birlikte vitaminlerin uygulanan 3 farklı dozuna bağlı olarak SOD aktivitesi artmıştır. Kontrole en yakın SOD aktivitesi E vitamininin en yüksek dozunda ölçülmüştür. Diğer bir ifade ile en etkili vitamin E vitamindir. Ratların beyin hücrelerinde yapılan çalışmalarda sabah 9 ile 15 arasında strese maruz bırakıldıktan sonra A, C, E ve C ile E vitamini birlikte verilmesiyle önce azalan SOD aktivitesi, vitamin verilmesiyle artmıştır. Vitaminlerin etki sırası E>C>A şeklinde olmuştur. E ve C vitamini birlikte verilince antioksidan etki daha fazla olduğu gözlenmiştir (Gupta *et al.* 2003; Kashif *et al.* 2004). Kromiumun neden olduğu oksidatif strese karşı C vitamini, E vitamini ve β-karotenin etkisi araştırılmış, kromiumun SOD aktivitesini azaltmasına karşın vitamin verilen tüm gruplarda SOD aktivitesi arttığı gösterilmiştir (Vandana *et al.* 2006). Yine benzer bir çalışmada klorifirifos'un (CPF) neden olduğu oksidatif strese karşı vitamin A, C ve E den oluşan vitamin karışımının (1000 µg vitamin A, 10 mg vitamin E, ve 60 mg vitamin C) etkisi çalışılmış ve CPF SOD

aktivitesini azaltırken vitamin verilen grupta SOD aktivitesinin önemli derecede arttığı bildirilmiştir (Verma *et al.* 2007). Krishnamoorthy ve arkadaşlarının (2007), ratların epididimal spermalarında PCB'nin (Aroclor 1254) SOD aktivitesini azaltmasına karşı C ve E vitamininin antagonistik etki göstererek SOD aktivitesini önemli derecede artırdığını göstermişlerdir. PCB ile yapılan diğer bir çalışmada ise kontrole göre PCB'nin SOD aktivitesini azalttığı, C vitamini muamelesiyle SOD aktivitesinin arttığı bulunmuştur (Muthuvel *et al.* 2006). Çalışmalarımızdaki sonuçları doğrulayan diğer bir çalışmada ise erkek albino ratların karaciğer, akciğer ve böbreklerinde PCB muamelesiyle SOD aktivitesi azalırken, α -tokoferol verilen ratlarda SOD aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (Banudevi *et al.* 2006). Vitaminlerin SOD aktivitesini artırıcı etkisi ve etkili olan vitaminlerin etki sırası farklı literatürle belirlenmiştir. SOD aktivitesi üzerine en etkili vitaminin E olduğu ve vitaminlerin etki sırasının E>C>A olduğu çalışma sonuçlarımızı doğrulayan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Kashif *et al.* 2004; Krishnamoorthy *et al.* 2007).

Diğer bir antioksidan enzim olan GPx ise hidroperoksitlerin ortadan kaldırılmasında etkilidir (Armstrong 1998). Yaptığımız çalışmada AFB₁'in GPx aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir. Kontrol grubunda GPx aktivitesi AFB₁ grubuna göre daha düşük ölçülmüş, aradaki azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0.001). Daha önce yapılan benzer bir çalışmada ratlara AFB₁ verilen grupta karaciğerde ki GPx aktivitesinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu belirlenmiştir (Preetha *et al.* 2006). Total aflatoksin kullanımı (25 veya 50 mg/aflatoksin/hayvan/gün) ile DNA, RNA, protein miktarında ve enzim aktivitesinde önemli derecede azalma meydana geldiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Verma and Nair 2001). Ross PM3 ırkı piliçlere aflatoksinli (0.05 ppm, 0.1 ppm, 0.5 ppm ve 1.0 ppm) yem verilmiş, 15, 30 ve 45. günlerinde kan alınarak GPx seviyeleri ölçülmüş, GPx aktivitesinde azalma görülmüştür (Eraslan vd. 2005). AFB₁'in neden olduğu oksidatif stresin GPx aktivitesini düşürmesinin sebeplerinden birincisi AFB₁'in neden olduğu ROT'lerinin enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi yapmalarıdır. İkinci bir sebepte, ROT'lerinin proteinlere bağlanarak proteinlerde yapısal değişikliklere ve buna bağlı olarak proteinlerin oksidasyonuna neden olmalarıdır (Janssen *et al.* 1993; Preetha *et al.* 2006).

GPx aktivitesinin azalmasının bir diğere sebebi de GPx aktivitesinin GSH miktarına bağılı olmasıdır. Oksidatif stres GR aktivitesinin azalmasına neden olarak GSH miktarını azaltmakta (Preetha *et al.* 2006), buna bağılı olarak GPx aktivitesi azalmaktadır. Özetle GPx aktivitesinin azalması GSH'ın azalmasına, GPx sentezinin azalmasına, enzim bozulmasının artmasına ve enzimin inaktivasyonuna bağılı olduğu bilinmektedir (Janssen *et al.* 1993; Krishnamoorthy *et al.* 2007).

Yaptığımız çalışmada AFB₁ verilen grupta GPx aktivitesi azalırken AFB₁ ile birlikte vitamin verilmesi GPx aktivitesini artırmıştır. Kontrol grubuna en yakın GPx aktivitesi E vitamininin 200 µM'lık dozunda ölçülmüştür. Kullanılan vitaminler ve dozlarına bakıldığında en etkili vitaminin E olduğu görülmüştür. Tüm vitamin uygulanan gruplar ile AFB₁ grubu arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0.001). Daha önce yapılan benzer bir çalışmada aflatoksin (50 mg/aflatoksin/hayvan/gün) verilen hayvanların testislerinde ki GPx aktivitesi, aflatoksinle birlikte E vitamini verilen hayvanlardaki GPx aktivitesine göre daha yüksek ölçülmüştür (Verma and Nair 2001). Yine PCB'nin neden olduğu oksidatif strese bağılı olarak, GPx aktivitesi önemli derecede azalırken C vitamini ve α-tokoferol verilen ratlarda GPx aktivitesi normale yaklaşmıştır (Krishnamoorthy *et al.* 2007). PCB ile yapılan başka bir çalışmada ise oluşan oksidatif stresde GPx aktivitesi azalırken C vitamini GPx aktivitesini artırmıştır (Muthuvel *et al.* 2006). Kromiumun neden olduğu oksidatif strese karşı C vitamini, E vitamini ve β-karotenin etkisi araştırılmış, kromiumun GPx aktivitesini azaltmasına karşın vitamin verilen tüm gruplarda GPx aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Vandana *et al.* 2006). N-nitrosodietilamin'in (NDEA) ratların karaciğerinde GPx aktivitesini azalttığı, E vitamini verilmesi GPx aktivitesini önemli derecede arttığı bildirilmiştir (Bansal *et al.* 2005). Vitaminlerin GPx aktivitesini artırmalarının nedeni ise ROT'leri ile reaksiyona girerek onların temizlenmesinde ve miktarlarının azaltılmasında rol oynamalarına bağılı olduğu belirtilmiştir. AFB₁ GR enzim aktivitesini azalttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Verma and Nair 2001; Preetha *et al.* 2006). GR aktivitesinin azalmasına bağılı olarak GSH miktarının azaldığı, gerek yaptığımız çalışmada gerekse çalışma sonuçlarımızla paralellik gösteren çalışmalarla belirlenmiştir (Preetha *et al.* 2006; Krishnamoorthy *et al.* 2007).

Enzimatik olmayan antioksidanlardan olan GSH ise GPx gibi aktivite göstererek H₂O₂'in ortamdaki uzaklaştırılmasını sağlar (Boehme *et al.* 1992). Ayrıca GSH, DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır (Masella *et al.* 2005). Yaptığımız çalışmada GSH miktarı AFB₁ grubunda kontrol grubuna göre düşük ölçülmüş, arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (p<0.001). Sonuçlarımızla paralellik gösteren çeşitli çalışmalarda aflatoksinin GSH seviyesini azalttığı gösterilmiştir (Verma and Nair 2001; Preetha *et al.* 2006). Bu konuda yapılan farklı çalışmalarda Arsenik, PCB, stres, kromyum ve klorofirifosun neden olduğu oksidatif strese bağlı olarak GSH seviyesinin azaldığı bildirilmiştir (Kashif *et al.* 2004; Muthuvel *et al.* 2006; Banudevi *et al.* 2006; Vandana *et al.* 2006; Krishnamoorthy *et al.* 2007; Chang *et al.* 2007; Verma *et al.* 2007).

AFB₁ ile vitaminlerin farklı konsantrasyonları verildiğinde ise GSH miktarında artış meydana gelmiştir. AFB₁ grubu ile AFB₁ ve vitamin verilen grup arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (p<0.001). E vitamini ve aflatoksin ile yapılan bir çalışmada aflatoksinin kontrole göre GSH miktarını azalttığı görülmüştür. Aflatoksinle birlikte vitamin E (2 mg/gün/hayvan/oral yolla) verildiğinde ise GSH miktarının arttığı bildirilmiştir (Verma and Nair 2001). Arseniğin neden olduğu oksidatif stresden dolayı GSH miktarı azaldığı buna karşın C vitamini muamelesiyle GSH seviyesinin arttığı gösterilmiştir (Chang *et al.* 2007). Banudevi ve arkadaşlarının (2006), yaptığı çalışma ile Krishnamoorthy ve arkadaşlarının (2007), yaptığı çalışmalarda PCB verilen albino ratlarda GSH miktarının azaldığı, H₂O₂ ve OH⁻ iyonu miktarında ise artma olduğu gösterilmiştir. PCB ile birlikte E vitamini verilince GSH miktarında artma, H₂O₂ ve OH⁻ iyonu miktarında ise azalma meydana gelmiştir. Yine vitaminlerle yapılan diğer bir çalışmada, strese maruz bırakılan ratlarda GSH miktarı azalmış, antioksidant vitaminlerin (A, E, C) verilmesiyle GSH miktarı artmıştır. En etkili vitaminin E vitamini olduğu vitaminlerin etki sırasının da E>C>A şeklinde olduğu belirtilmiştir. E ve C vitaminin birlikte verilmesiyle antioksidan etkinin daha fazla olduğu görüşü savunulmuştur (Kashif *et al.* 2004). Vandana ve arkadaşları da (2006),

kromiumun neden olduğu oksidatif stresi E ve C vitamininin azaltarak GSH miktarını artırdığını ileri sürmüşlerdir. Ratlarda klorfirifosun neden olduğu oksidatif strese karşı vitamin A, E ve C çalışılmış, bunların GSH miktarını artırdığı tespit edilmiştir (Verma *et al.* 2007). Bu sonuçlar çalışmalarımızla paralellik göstermektedir.

AFB₁'in artırdığı ROT'leri GSH ile reaksiyona girerek GSH'ı GS[•]'a (okside glutatyon) dönüştürmektedirler. İki adet GS[•] ise GR enzimi yardımı ile tekrar glutatyonla dönüştürülmektedir (Krishnamoorthy *et al.* 2007). AFB₁ GR enzim aktivitesini azalttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Verma and Nair 2001; Preetha *et al.* 2006). GR aktivitesinin azalmasına bağlı olarakta GSH miktarının azaldığı gerek yaptığımız çalışmada gerekse çalışma sonuçlarımızla paralellik gösteren çalışmalarla belirlenmiştir (Preetha *et al.* 2006).

Lipid peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkan MDA lipid peroksidasyonunu gösteren parametrelerden birisidir (Seven ve Candan 1995). AFB₁ lipid peroksidasyonunun dolayısı ile de onun bir ürünü olan MDA miktarının artmasına neden olur (Shen *et al.* 1994). Yaptığımız çalışmada kontrol grubunda MDA miktarı düşük iken AFB₁ ilave edilen grupta daha yüksek olarak ölçülmüştür. Aradaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (p<0.001). Ratların karaciğeri üzerine yapılan benzer bir çalışmada, AFB₁ (1 mg/kg) verilen grupta lipid peroksidasyonunun arttığı buna bağlı olarakta MDA miktarı kontrol grubunda düşük iken, AFB₁ grubunda ise daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Preetha *et al.* 2006). Ross PM3 ırkı piliçlere aflatoksinli (0.05 ppm, 0.1 ppm, 0.5 ppm ve 1.0 ppm) yem verilmiş 15, 30 ve 45. günlerinde kan alınarak MDA miktarı ölçülmüş, MDA miktarı kontrol grubuna göre artma göstermiştir (Eraslan vd. 2005). PCB (Aroclor 1254) ile yapılan çalışmada ise PCB'nin H₂O₂, OH⁻ iyonu miktarı ile lipid peroksidasyonunu ve buna bağlı olarak MDA miktarını artırdığı bildirilmiştir (Muthuvel *et al.* 2006; Krishnamoorthy *et al.* 2007). Ayrıca arsenik'in neden olduğu oksidatif stresden dolayıda MDA miktarının arttığı gösterilmiştir (Chang *et al.* 2007). Aflatoksinlerin MDA seviyesini artırmalarının nedeni çeşitli araştırmacılar tarafından ROT'lerinin artışına ve bunun da lipid peroksidasyonunu artırmasına bağlanmıştır (Verma and Nair 2001; Lee *et al.* 2005; Bedard and Massey 2006)

Yaptığımız çalışmada AFB₁ ile birlikte antioksidan özelliğe sahip vitaminlerin (A, C ve E) ilave edilmesinin MDA miktarını azalttığı belirlenmiştir. Daha önce yapılan benzer çalışmalarda aflatoksinin kontrole göre MDA miktarını artırdığı, aflatoksinle birlikte E vitamini (2 mg/gün/oral yolla) verilmesiyle sadece aflatoksin verilen gruplara göre MDA miktarının azaldığı bildirilmiştir (Verma and Nair 2001). PCB verilen albino ratlarda MDA miktarı, LPO oranı, H₂O₂ ve OH⁻ iyonu miktarında artma olmuş, PCB ile birlikte E ve C vitamini verilmesiyle MDA miktarı, LPO oranı, H₂O₂ ve OH⁻ iyonu miktarında azalma meydana gelmiştir (Muthuvel *et al.* 2006; Banudevi *et al.* 2006; Krishnamoorthy *et al.* 2007). Arseniğin neden olduğu oksidatif stres MDA miktarı artırmış, buna karşın C vitamini muamelesiyle MDA seviyesinin azaldığı gösterilmiştir (Chang *et al.* 2007). Vitaminlerin aflatoksine karşı bu antagonistik etkisi serbest oksijen radikallerini azaltması, buna bağlı olarakta lipid peroksidasyonunu azaltmasına bağlanabilir. Vitaminlerin biyokimyasal parametreler üzerine olan etki sırasının E>C>A şeklinde olduğu, gerek bizim çalışmamızda gerekse benzer çalışmalarda vurgulanmıştır.

En etkili vitamin olan E vitamini zincirleme reaksiyon şeklinde ilerleyen lipid peroksidasyonunda, lipid peroksit radikalleri ile reaksiyona girerek zincirin kırılmasına neden olduğu, buna bağlı olarakta lipid peroksidasyonunu durdurduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, membranlara bağlı olarak ROT'leri ile doğrudan reaksiyona girerek onların konsantrasyonlarını azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca C vitamini E vitamininin en etkin formu olan α -tokoferolün lipid peroksil radikalleri ile reaksiyonu sonucunda oluşan α -tokoferoksilin tekrar α -tokoferole dönüşümünü sağladığı için E vitamininin etkinliğini artırdığı gösterilmiştir.

C vitamininin A vitamininden daha etkin olmasının sebebi ise, C vitamininin indirgeyici aktiviteye sahip olduğu için güçlü bir antioksidan olması, süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girdiği için onların temizlenmesini sağlaması (Akkuş 1996; Granada *et al.* 1998), ayrıca singlet oksijen temizleyicisi olarak görev yapmasından kaynaklandığı bilinmektedir (Kılınç 1985). Buna karşın A vitamini sadece singlet oksijen temizleyicisi olması nedeniyle oksijen radikallerine karşı koruyucu etki yapar (Kılınç 1985). C vitamininin antioksidan sistem içerisinde daha etkin rol alması

sebebiylede, A vitaminine göre biyokimyasal parametreler üzerinde daha etkili olduğu bildirilmiştir.

5.1. Öneriler

AFB₁'in mutajenik ve kanserojenik etkisi yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. AFB₁'in bu mutajenik ve kanserojenik etkisine karşı, antagonistik etkisi olan birçok madde çalışılmış ve bunların etkileri ortaya konulmuştur. Bu maddelerin en önemlilerinden olan vitaminlerin antioksidan özellikleri ve buna bağlı olarakta antimutajenik etkileri nedeniyle yapılan çok sayıda çalışma mevcuttur. Ancak yapılan çalışmaların tamamı kromozomlar üzerine olan antimutajenik etkileri ile biyokimyasal parametreler üzerine olan antigenotoksik etkisi ayrı ayrı çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmamızda her iki parametre üzerine AFB₁'in etkisi ve buna vitaminlerin antagonistik etkisi çalışılması yönünden önemlidir. Ayrıca A ve E vitamininin yağda, C vitamininin suda çözünüyor olması ve günlük ihtiyaç duyulan dozlarının farklı olması ve buna bağlı olarakta plazmada bulunma seviyelerinin farklı olması nedeniyle etki derecelerinin sınıflandırılması zorlaşmaktadır.

E vitamininin antioksidan sistem üzerine en etkili vitamin olmasına rağmen KA ve KKD üzerine C vitamininin daha etkin olmasının nedeni bir problem olarak önümüzde durmaktadır. Çalışmaların bu noktaya odaklanmasının faydalı olacağı düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahmad, MS., Sheeba, Afzal, M., 2004. Amelioration of genotoxic damage by certain phytoproducts in human lymphocyte cultures. *Chemico-Biological Interactions*, 149, 107–115.
- Ahmad, S., Hoda, A. and Afzal, M., 2002. Additive action of vitamins C and E against hydrocortisone-induced genotoxicity in human lymphocyte chromosomes. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 72, 204–209.
- Akbaş, E., Çelik, A., Derici, E., Söylemez, F., 2001. The investigation of cigarette smoking on the lymphocyte life time and genotoxic effects. *Turkish Journal of Geriatrics*, 4, 15-18.
- Akkuş, İ., 1996. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya, Mimoza Yayınları.
- Algur ÖF., 1992. Temel Biyoteknoloji Ders Notları. Atatürk Üniversitesi, 185, Erzurum.
- Allen, JW., Latt, SA., 1976. *in vivo* BrdU-33258 Hoechst analysis of DNA replication kinetics and sister chromatid exchange formation in mouse somatic and meiotic cells. *Chromosoma*, 58(4), 325-340.
- Anderson, D. And Phillips, BJ., 1999. Comparative *in vitro* and *in vivo* effects of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 1015-1025
- Anderson, ME., 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology*, 113, 548-555.
- Andrew S., Wilson, DP., Williams, CD., Davis, MD., Tingle, B., Kevin Park, 1997 Bioactivation and inactivation of aflatoxin B by human, mouse and rat liver preparations: Effect on SCE in human mononuclear leucocytes. *Mutation Research*, 373, 257–264.
- Arda M., 1980. Mikoloji (Genel ve Özel). Ankara Üniversitesi Basımevi, 260–269.
- Armstrong, DA., 1998. *Methods in molecular biology*. Volume 108, Toronto, Humana Press.
- Aruoma, O., Kauai, H., Halloween, B., 1991. Oxygen free radicals and human disease. *Journal of the Royal Society of Health*, 111(5), 172–177.
- Avani, G. and Rao, MV., 2007. Genotoxic effects in human lymphocytes exposed to arsenic and vitamin A. *Toxicology in vitro*, 21, 626-631.
- Badr, FM., El-Habit, OH., Hamdy, M. and Hassan, GA., 1998. The mutagenic versus protective role of vitamin A on the induction of chromosomal aberration in human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 414, 157-63.
- Bansal, AK., Bansal, M., Soni, G., Bhatnagar, D., 2005. Protective role of Vitamin E pre-treatment on *N*-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver. *Chemico-Biological Interactions*, 156, 101–111
- Banudevi, S., Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., Vignesh, C., Aruldha, MM. and Arunakaran, J., 2006. Role of a-tocopherol on antioxidant status in liver, lung and kidney of PCB exposed male albino rats. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 2040–2046.
- Barondeau, DP., Kassmann, CJ., Bruns, CK., Tainer, JA., Getzoff, ED., 2004. Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. *Biochemistry*, 43, 8038–8047.

- Barrington, JW., Lindsay, P., James, D., Smith, S. and Roberts, A., 1996. Selenium deficiency and miscarriage: a possible link. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 103, 130-132.
- Basu TK, Temple NJ, Garg ML, 1999. *Antioxidants in Human Health and Disease*. New York, CABI Publishing, 2. Bölüm, 15–17.
- Batt, TR., Hsueh, JL., Chen, HH. and Huang, CC., 1980. Sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in V79 cells induced by aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ with or without metabolic activation. *Carcinogenesis*, 1(9), 759-76.
- Baysal, V., Sahin, F., Erel, A., Oruk, S., Menevşe, S., 2003. The effect of PUVA treatment on sister chromatid exchange (SCE) values in psoriasis vulgaris patients. *The Journal of Dermatological Treatment*, 14, 22-5.
- Bedard, LL. and Massey TM., 2006. Aflatoxin B(1)-induced DNA damage and its repair. *Cancer Letters*, 16458422.
- Behrend, L., Henderson, G., Zwacka, RM., 2003. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochemical Society Transactions*, 31, 1441–1444.
- Betina V., 1989. *Mycotoxins, chemical, biological and environmental aspects*, Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York, Tokyo, 437.
- Biewenga, G., de Jong, J. and Bast, A., 1994 Lipoic acid favors thiolsulfinate formation after hypochlorous acid scavenging: a study with lipoic acid derivatives. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 312, 114–20.
- Boehme, DS., Hatchkiss, JA. and Handerson, RF., 1992. GSH and GSH dependent enzymes in bronchoalveolar lavage fluid cells in response to ozone. *Experimental and Molecular Pathology*, 56, 37–48.
- Bose, S. and Sinha, SP., 1991. Aflatoxin-induced structural chromosomal changes and mitotic disruption in mouse bone marrow. *Mutation Research*, 261, 15-19.
- Bradford, MM., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brigelius-Flohe, R., and Traber, MG., Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*, 13, 1145 -1155.
- Bukan, N., 1999. Glibenklamidin streptozotosin-diabetik ratlarda kalp dokusu süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerine etkisi. *Uzmanlık Tezi*. Ankara Gazi Üniversitesi.
- Bullerman, LB., 1979. Significance of mycotoxins to food safety and human health. *Journal of Food Protection*, 42 (1): 65–86.
- Bullerman, LB., 1986. *Mycotoxins and Food safety: food technology. a scientific status summary by the institute of food technologists*. Expert Panel on Food Safety and Nutrition, 59 -66.
- Carrano, AV., Thompson, LH., Lindi, PA. and Minkler, JL., 1978. Sister chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis. *Nature*, 271, 551–553
- Cassand P., Decoudu S., Leveque F., Daubeze M., Narbonne JF., 1993. Effect of vitamin E dietary intake on in vitro activation of aflatoxin B1. *Mutation Research*, 319, 309-16
- Chan, HT, Chan, Ho JW., 2003. Inhibition of glycyrrhizic acid on aflatoxin B1-induced cytotoxicity in hepatoma cells. *Toxicology*. 30, 211–217

- Chang, SI., Jin, B., Youn, P., Park, C., Park, JD., Ryu, D., 2007. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 218, 196–203.
- Chao, JC., Huang, CH., Wu, SJ., Yang, SC., Chang, NC., Shieh, MJ. and Lo, PN., 2002. Effects of beta-carotene, vitamin C and E on antioxidant status in hyperlipidemic smokers. *The Journal of Nutrition Biochemistry*, 13, 427-434.
- Chen J., 1982, Effects of dietary and selenium and vitamin E on hepatic mixed-function oxidase activities and *in vivo* covalent binding of aflatoxin B₁ in rats. *Journal of Nutrition*, 112, 324.
- Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, MC. and Mecocci C., 2005. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology and Medicine* 39, 841–852.
- Chlopkiewicz, B., Marczewska, J., Kozirowska, J., 1991. An evaluation of antimutagenic properties of vitamin E. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 48, 33-4.
- Chu, FS., 1977. Mode of action of mycotoxins and related compounds. *Advances in Applied Microbiology*, 22, 83–142.
- Coulombe Jr, AR., 1993 Biological action of mycotoxins. *Journal of Dairy Science*, 76(3), 880–91.
- Çakatay, U., Kayalı, R., 2004. The clinical importance of protein oxidation. *Cerrahpaşa Journal of Medicine*, 35, 140-149.
- Çakatay, U., Telci, A., Yılmaz, İA., Akçay, T., Sivas, A., 2000. The effect of aging on plasma oxidative protein damage. *Cerrahpaşa Journal of Medicine*, 31 (4), 220-223
- Çelik, S., Yılmaz, Ö., Nazıroğlu, M., Çay, M. ve Aksakal M., 1996. Kuzularda eritrosit ve serum yağ asitleri bileşimine diyetik e vitamini ve selenyumun etkisinin araştırılması. *Biyokimya Dergisi*, 21(1), 69-79.
- De Ferrari, M., Artuso, M., Bonassi, S., Bonatti, S., 1991. Cytogenetic biomonitoring of an Italian population exposed to pesticides: chromosome aberration and SCE analysis in peripheral blood lymphocytes. *Mutation Research*, 260, 105-113.
- Decker, EA. and Clarkson, PM., 1999. Dietary sources and bioavailability of essential and nonessential antioxidants: handbook of oxidants and antioxidants in exercise. Amsterdam: Sen CK, Packer L, Hanninen O (eds) Elsevier.
- Deng, DJ., Hu, GG., Luo, XM., 1988. Effect of beta-carotene on sister chromatid exchanges induced by MNNG and aflatoxin B₁ in V79 cells. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 10(2), 89–91.
- Denizel, T., 1989. New perspective in aflatoxin toxicology and dry figs dilemma. uluslararası kuru incir ve aflatoksin sempozyumu. 4–8 Nisan 1989-İzmir.
- Edenharder, R., Kerkhoff, G., and Dunkelberg, A., 1998. Effects of β-carotene, retinal, riboflavin, α-tocopherol and vitamins c and k1 on sister-chromatid exchanges induced by 3-amino-1-methyl-5h-pyrido[4,3-b]indole (trp-p-2) and cyclophosphamide in human lymphocyte cultures. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 897–906
- Egel, Ç., Bilaloğlu, R. ve Aydemir, N., 2002. Inhibitory effects of ascorbic acid and folic acid on chromosome aberrations induced by pyrimethamine *In Vitro*. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 22, 353–362.
- El-Zawahri, M., Moubasher, A., Morad, M., El-Kady, I., 1977. Mutagenic effect of aflatoxin B₁. *Annales de la nutrition et de l'alimentation*, 31, 859–66

- El-Zawahri, MM., Morad, MM., Khishin, AF., 1990. Mutagenic effect of aflatoxin G1 in comparison with B1. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 10(1-2), 45-51.
- Eraslan, G., Akdoğan, M., Yarsan, E., Şahindokuyucu, F., Eşsiz, D., Altıntaş, L., 2005. The Effects of Aflatoxins on Oxidative Stress in Broiler Chickens. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29, 701–707.
- Erdemli, EA., 2006. Hücre hasarı ve ölümünde rol alan mekanizmalar. *Histoloji Ve Embriyoloji Kongresi*. <http://web.inonu.edu.tr/~histoloji/Kongre/sunu/ppt>. (29 Haziran 2008).
- Erel, O., 2004 A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry*, 7, 112-119.
- Fridovich, I., 1985. Superoxide radical and superoxide dismutase regularities and irregularities. *Harvey Lectures*, 79, 51-75.
- Fridovich, I., 1986. Superoxid dismutase. *Advances in Enzymology of Molecular Biology*, 58, 61–97
- Gadhia, P., Gadhia, M and Zankl, H., 1991. Adriamycin-induced sister chromatid exchange and chromosomal aberrations in Down's syndrome lymphocytes. *Mutagenesis*. 6, 31–33.
- Gantt, R., *et al.* 1978. Fluorescent light-induced DNA crosslinkage and chromatid breaks in mouse cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75, 3809-12.
- Garret, NE, Stack, HF and Waters, MD., 1986. Evaluation of the genetic activity profile of 65 pesticides. *Mutation Research*, 168, 301-325.
- Geyikoğlu, F., Türkez, H., 2006. Protective effect of sodium selenite against the genotoxicity of aflatoxin B₁ in human whole blood cultures. *Brazilian Archives of Biology And Technology*, 49, 393–398.
- Ghosh, R. and Ghosh, PK., 1987. The effect of tobacco smoking on the frequency of sister chromatid exchanges in human lymphocyte chromosomes. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 21, 15–9.
- Gözükara, EM., 1997. *Biyokimya*. İstanbul, Evin Matbaası.
- Granado, F., Olmedilla, B., Gil-Martinez, E., Blanco, I., Millan, I., Rojas-Hidalgo, E.: 1998. Carotenoids, retinol and tocopherols in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and their immediate relatives. *Clinical Science (Colch)*, 94(2), 189–195.
- Groopman, JD. and Kensler, TW., 1988. Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relationship to cancer. *CRC Critical Review in Toxicology*, 19(2), 113-145.
- Gupta RS., Gupta ES., Dhakal, BK., Thakur, AR., and Ahnn, J., 2003. Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species. *Molecules and Cells*, 17, 132-139
- Gutteridge, JMC., Halliwell, B., 1994. *Antioxidants in nutrition, health and disease*. New York. Oxford University Pres.
- Halliwell, B. and Gutteridge, JMC., 1996. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford. 2nd Edition Clarendon Pres.
- Halliwell, B., 1991. Drug antioxidant effects. *Drugs*, 42(4), 569–605.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC., 1984. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *The Lancet*, 23, 1396-1398.

- Halliwell, B., Gutteridge, JMC., 2001. Free Radicals in Biology and Medicine. Third Edition, Oxford Science Publications, 22–24.
- Hastings CE. JR., Llewellyn GC., 1987. Reduced aflatoxicosis in livers of hamsters fed a manganese sulfate supplement. *Nutrition and Cancer*, 10, 67-77.
- Hoogenboom LA., Tulliez J., Gautier JP., Coker RD., Melcion JP., Nagler MJ., Polman TH., Delort-Laval J., 2001. Absorption, distribution and excretion of aflatoxin-derived ammoniation products in lactating cows. *Food Additives and Contaminants*, 18(1), 47–58.
- Hsieh, DPH., Wong, ZA., Wong, JJ., Michos, C., and Ruebner, BH., 1977, Comparative Metabolism of Aflatoxin: Mycotoxins in Human and Animal Health. Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W., Mehlman, M.A. (Eds.), Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, Illinois, 37-50.
- Hsu, IC., Metcalf, RA., Sun, T. *et al.* 1991. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas [see comments]. *Nature*, 350, 427-428.
- Huang, CC., Hsueh, JL., Chen, HH. and Batt, TR., 1982. Retinol (vitamin A) inhibits sister chromatid exchanges and cell cycle delay induced by cyclophosphamide and aflatoxin B₁ in Chinese hamster V79 cells. *Carcinogenesis*, 3, 1-5.
- Hubel, CA., Roberts, JM., Taylor, RN., Musci, TJ., Rogers, GM. and McLaughlin, MK., 1989. Lipid peroxidation in pregnancy: New perspectives on preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 161, 1025-1034.
- IARC, 1985. Aflatoxin, IARC Monographs (Suppl. 7), 83–87.
- IARC, 1987. Overall Evaluations of Carcinogenicity. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Supplement 7. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 440 pp.
- IARC, 1993. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines, and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 56. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 571 pp.
- IARC, 2002. Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 82. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- İkbal M, Ezirmik N, Tos T, Pirim I. 2003. Association of sister chromatid exchange frequencies in patients with ankylosing spondylitis with and without HLA-B27. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 62, 775-777.
- Ito, Y., Peterson, SW., Wicklow, DT. and Goto, T., 2001, *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *flavi*, *Mycological Research*, 105(2), 233-239.
- Janssen, YM., Van Houten, B., Borm, PJ., Mossman, BT., 1993. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Laboratory. Investigation*, 69, 261–274.
- Jin, S. and Levine, AJ., 2001. The p53 functional circuit. *Journal of Cell Science*, 114, 4139-4140.
- Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamhoğlu, M., Başpınar, N., ve Tiftik AM., 1998. *Biyokimya Kitabı.1.Baskı*, Konya Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayinevi Ünitesi. Konya.
- Karagül, H., Fidancı, UR., Altıntaş , A. ve Sel, T., 2000. *Klinik Biyokimya. 1. Baskı*, Meteksan, Ankara.

- Kashif, SM., Zaidi, R. and Banu, N., 2004. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clinica Chimica Acta.*, 340, 229–233.
- Kasprzak, KS., 2002. Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(10), 958-967.
- Kaya S., Piriñçi İ., Traş B., Bilgili A., Baydan E., Akar F., Doğan A. 1998. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. *Medisan Yayın Serisi*:35, 341-375.
- Keha, E., Küfrevioğlu, Öİ., 1997. *Biyokimya*. Şafak Yayınevi, Erzurum, 151-157.
- Kılınç, K., 1985. Oksijen Radikalleri, Üretilmeleri, Fonksiyonları, Toksik Ekileri. *Biyokimya Dergisi.*, 10, 60-89.
- Krishnaja, AP. and Sharma, NK., 2003. Ascorbic acid potentiates mitomycin C-induced micronuclei and sister chromatid exchanges in human peripheral blood lymphocytes *in vitro*. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis Supplement*, 1, 99–112.
- Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., Arunkumar, A., Vignesh, RC., Aruldhas, MM., Arunakaran, J., 2007. Ameliorative effect of vitamins (α -tocopherol and ascorbic acid) on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in rat epididymal sperm. *Reproductive Toxicology* 23, 239–245.
- Landis, GN. and Tower, J., 2005. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126, 365–379.
- Latt SA and Schreck RR., 1980. Sister chromatid exchange analysis. *American Journal of Human Genetics*. 32(3):297-313. Review.
- Lee, CK., Brown, BG., Rice WY Jr, Doolittle, DJ., 1989. Role of oxygen free radicals in the induction of sister chromatid exchanges by cigarette smoke. *Environ Molecular Mutagen*. 13(1):54-9.
- Lee, JK., Choi, EH., Lee, KG., Chun, HS., 2005. Alleviation of aflatoxin B1 -induced oxidative stress in HepG2 cells by volatile extract from *Allii Fistulosi Bulbus*. *Life Sciences*, 77, 2896–2910.
- Leon-Cazares, JM., Aroche-alfonso, RM., 1977. Effects of fungus (*Aspergillus parasiticus*) toxins on the chromosomes of human lymphocytes *in vitro*. *Toxicon*, 15(6), 489-496.
- Li, D., Cao, Y., He, L. *et al.*, 1993. Aberrations of p53 gene in human hepatocellular carcinoma from China. *Carcinogenesis*, 14(2), 169-173.
- Loveday, KS., Latt, SA., 1978. Search for DNA interchange corresponding to sister chromatid Exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Nucleic Acids Research*, 5, 4087–4104
- Luberda, Z., 2005. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reproductive Biology*, 5(1), 5-17.
- Lunec, J., Hollaway, KA., Cooke, MS., 2002. Urinary 8-Oxo-2'-deoxyguanosine:redox regulation of DNA repair *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(7), 875-885.
- Lusania, M., Antunes, G. and Takahashi, CS., 1999. Protection and induction of chromosomal damage by vitamin C in human lymphocyte cultures. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 19, 53–59.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C. and Giovannini, C., 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, *The Journal of Nutritional Biochemistry* 16, 577–586. 555.

- Mates, JM., Perez-Gomez, C. and De Castro, IN., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32, 595–603.
- Mc Cord, JM., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal Biological and Chemistry*, 244, 60409–60455.
- McLean, M., Dutton, MF., 1995. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacology Therapeutics*, 65, 163–192.
- Muthuvel, R., Venkataraman, P. Krishnamoorthy, G., Gunadharini, DN., Kanagaraj, P., Jone Stanley, A., Srinivasan, N., Balasubramanian, K., Aruldas, MM. and Arunakaran, J., 2006. Antioxidant effect of ascorbic acid on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in hypothalamus of albino rats. *Clinica Chimica Acta*, 365, 297 – 303.
- Nixon JE, Hendrick JD, Pawlowski NE, Loveland PW, Sinnhuber RO., 1981. Carcinogenicity of aflatoxin in Fisher 344 rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 66, 1159-1163.
- Nishiyama, Y., Ikeda, H. and Haramaki, N., 1998. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *American Heart Journal*, 135, 115.
- Nordberg, J., Arner, ESJ., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine* 31(11), 1287-1312.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxidase in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, 351-358.
- Ottino, P. and Duncan, JR., 1997. Effect of α -tocopherol succinate on radical and lipid peroxidation levels in BL and melanoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 22, 1145-1151.
- Özer, N., 1996. *Temel Biyokimya*. Editörler Onat, T., Emerk, K. Saray Medikal Yayıncılık, İzmir, 785-820.
- Özkaya, Ş. ve Temiz, A., 2003. Aflatoksinler : kimyasal yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları. *Mikrobiyoloji Dergisi*. 1, 1–21
- Öztürk, A., 1995. Meme kanserli olguların lenfosit hücrelerinde kardeş kromatid değişimi sıklığı. Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Antalya.
- Öztürk, M., 1995. P53 Mutations in nonmalignant human liver: fingerprints of aflatoxins. *Hepatology*, 21 (2), 600-601.
- Paglia, DE. and Valentine, WN., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70, 158-169.
- Papas, AM., 1999. Antioksidant status, diet, nutrition and health. *Pres United States of America*
- Parcell, S., 2002. Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Alternative Medicine Review*, 7, 22-44.
- Parkin, DM., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., 2001. Estimating the world cancer burden: globocan 2000. *International Journal of Cancer*, 94, 153–156.
- Perry, P. and Evans, HJ., 1975. Cytological Detection Of Mutagen-Carcinogen Exposure By Sister Chromatid Exchange, *Nature*, 258, 121-125).
- Pohland, AE., 1993. Mycotoxins in Review. *Food Additives and Contaminants*, 10, 17-28.

- Porter, NA., Caldwell, SE., Mills, KA., 1995. Mechanisms of freeradical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, 30, 277–290.
- Powell, SR., 2000 The antioxidant properties of zinc. *Journal of Nutrition*, 130, 1447-1454.
- Preetha, S.P., Kanniappan, M., Selvakumar, E., Nagaraj, M., Varalakshmi, P., 2006. Lupeol ameliorates aflatoxin B₁ -induced peroxidative hepatic damage in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143, 333–339
- Pryor, WA., 2000. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials, *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 141–164.
- Rao, MV., Chinoy, NJ., Suthar, MB. and Rajvanshi, MI., 2001. Role of ascorbic acid on mercuric chloride-induced genotoxicity In human blood cultures. *Toxicology in vitro*, 15, 649–654.
- Sachan, DS. and Yatim, AM., 1992. Suppression of aflatoxin B₁-induced lipid abnormalities and macromolecule-adduct formation by L-carnitine. *Journal Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 11, 205-10.
- Scott, PM., 1978. Mycotoxins in feeds and ingredients and their origin. *Journal of Food Protection*, 41(5), 385-398.
- Seven, A. ve Candan, G., 1995. Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu. *Klinik Gelişim*, 8, 3906-3911.
- Sharby, TF., 1977. Küfler ve Mikotoksinler. Çev: İstanbulluoğlu, E. *Veteriner Hek. Der.*
- Shen, HM., Shi, CY., Lee, HP. and Ong, CN., 1994. Aflatoxin B₁ induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 127, 145-150.
- Siddique, YH., Afzal, M., 2005. Protective role of allicin and L-ascorbic acid against the genotoxic damage induced by chlormadinone acetate in cultured human lymphocytes. *Indian Journal Experimental Biology*, 43, 769-772.
- Siddique, YH., Beg, T. and Afzal, M., 2005. Antigenotoxic effects of ascorbic acid against megestrol acetate-induced genotoxicity in mice. *Human and Experimental Toxicology*, 24, 121-127.
- Sivikova, K., Piesova, E., Dianovski, J., 2001. The protection of vitamin E and selenium against carbon tetrachloride-induced genotoxicity in ovine peripheral blood lymphocytes. *Mutation Research*, 494, 135–142.
- Smith, JE. and Moss, MO., 1985. *Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance*, Printed in Great Britain, Sons Limited, 143.
- Stahl, W. And Sies, H., 2002. Introduction: reactive oxygen species. *Research Monographs*, 1-2.
- Stoloff, L., 1977. Aflatoxins – an overview : mycotoxins in human and animal health. Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W., Mehlman, M.A. (eds), *Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, Illinois*. 7-29.
- Sun, Y., Oberley, LW., Li, Y., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 34, 497-500.
- Taylor JH, Woods PS, Hughes ML., 1957. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 43, 122.
- Thannickal VJ and Fanburg BL., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology*, 279, 1005-1028.

- Thomson, VE. and Evans, HJ., 1979. Induction of sister-chromatid exchanges in human lymphocytes and Chinese hamster cells exposed to aflatoxin B₁ and n-methyl-n-nitrosourea. *Mutation Research*, 67, 47-53.
- Tietze, F., 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*, 27, 502-522.
- Turna, G., 2008. Ehrlich asit solid tümör modeli oluşturulmuş farelerde thymus sipyleus ve taurinin karaciğer MDA, glutatyon, AOPP düzeylerine ve SOD aktivitesine etkileri. Yüksek Lisans, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gazi Üniversitesi.
- Tüzün, C., 1997. *Biyokima*. 3. Baskı, Palme Yayıncılık, 151-187, Ankara.
- Ueno, Y., 1985, The toxicology of mycotoxins. *Critical Review in Toxicology*, 14(2), 99-132.
- Valko, M., Rhodes, CJ., Moncola, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidativestress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1–40
- Vandana, S., Ram, S., Ilavazhagan, M., Kumar, GD., Banerjee, PK., 2006. Comparative cytoprotective activity of vitamin C, E and beta-carotene against chromium induced oxidative stres in murine macrophages. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 60, 71–76.
- Venkataraman P, Sridhar M, Dhanammal S, Vijayababu MR, Srinivasan N, Arunakaran J., 2004. Antioxidant role of zinc in PCB (Aroclor 1254) exposed ventral prostate of albino rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15, 608–613.
- Verma, RJ. and Nair, A., 2001. Ameliorative effect of vitamin E on aflatoxin\induced lipid peroxidation in the testis of mice. *Asian Journal Andrology*, 3, 217-221.
- Verma, RS., Anugya, M., Srivastava, N., 2007. In vivo chlorpyrifos induced oxidative stress:Attenuation by antioxidant vitamins. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88, 191–196.
- Wang, J. and Groopman, JD., 1999. DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research*, 424, 167–181
- Weitberg, AB., 1989. Effect of combinations of antioxidants on phagocyte-induced sister-chromatid exchanges. *Mutation Research*, 224(1):1-4.
- Wilson, BJ., 1978, Hazards of Mycotoxins to Public Health, *Journal of Food Protection*, 41(5), 375-384.
- Woods, JR., Cavanaugh, JL., Narkus, EP., Plessinger, MA. and Miller, RK., 2002. The effect of labor on maternal and fetal vitamins C and E. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 187(5), 1179-1185.
- Woods, JR., Plessinger, MA., and Miller RK., 2001. Vitamins C and E: missing links in preventing premature rupture of membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 185, 5-10.
- Wyllie, T. ve Morehouse, L., 1977. *Mycotoxic Fungi and Chemistry of Mycotoxins*. Marcel Dekker. USA.
- Yousef, MI., Awad, TI., Mohamed, EH., 2006. Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by Vitamin E. *Toxicology*, 227, 240–247.
- Yücel, A., 1999. Medical mycology: yesterday and today. *Cerrahpasa Journal Medical*, 30 (2), 191–198.

- Zakharov AF, Baranovskaya LI, Ibraimov AI, Benjusch VA, Demintseva VS, Oblapenko NG. 1974. Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes 5-bromodeoxyuridine and 5-bromodeoxycytidine-revealed differentiation in human chromosomes. *Chromosoma*. 29;44(4):343-59.
- Zinten, H., 1978. A Summary of The Vitamin E/ Selenium Problem in Ruminants. *News and Reviews, Roche*, 1–18.

ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Erzurum'un Narman ilçesinde doğdu. İlköğrenimini Tortum'da, orta öğrenimini Erzurum'da ve lise öğrenimini Bursa'da tamamladı. 1992 yılında kayıt yaptırdığı Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 1996 yılında mezun oldu. 2000 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans öğrenimine başladı. 2003 yılında yüksek lisansını tamamladı. 2003 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde doktora öğrenimine başladı. Evli ve 2 çocuk babasıdır.