T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOÇLARDA AFLATOKSİNİN KARACİĞER İLE BÖBREK ÜZERİNE ETKİLERİ VE GLUKOMANNAN (EG)'IN KORUYUCU ETKİNLİĞİ

Fatma KAYIKCI ÇOLAKOĞLU

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ

2. Danışman

Prof. Dr. Mustafa ORTATATLI

KONYA-2012

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOÇLARDA AFLATOKSİNİN KARACİĞER İLE BÖBREK ÜZERİNE ETKİLERİ VE GLUKOMANNAN (EG)'IN KORUYUCU ETKİNLİĞİ

Fatma KAYIKCI ÇOLAKOĞLU

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ

2.Danışman

Prof. Dr. Mustafa ORTATATLI

TÜBİTAK Proje No: 107O866
Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 09202023 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2012

ÖNSÖZ

Aflatoksinler uygun olmayan şartlarda üretilen ve depo edilen gıdalarda sıklıkla gözlenebilen mikotoksinlerdendir. Sıcak ve nemli ortamlarda uzun süreli depo edilen gıdalarda kontaminasyon kaçınılmazdır. Kontamine olmuş gıdalarla beslenen insan ve hayvanlarda önemli sağlık problemleri ve buna bağlı olarak da ciddi ekonomik kayıplar ortaya çıkmaktadır. Buna sebep olarak; aflatoksikoza bağlı organ ve dokularda ortaya çıkan patolojik değişiklikler, immun sistemin baskılanması, verim düşüklüğü ve reprodüktif kapasitede azalmalar gösterilmektedir. Aflatoksinler hayvanların verimini düşürmeleri yanında hayvansal ürünlere de geçebilmekte ve dolaylı olarak insan sağlığını da tehdit etmektedirler. Bu çalışmadan elde edilecek veriler doğrultusunda, aflatoksinlerin karaciğer ve böbrek üzerine olan etkileri daha iyi ortaya konularak, yetiştiricilikteki ekonomik kayıpların azaltılması veya engellenmesine katkı sağlanabilmesi hedeflenmektedir. Meydana gelebilecek histopatolojik değişikliklerin ortaya konulması, aflatoksikozun önlenmesine yönelik çalışmalarda yararlı olabileceği gibi, gerek insanlarda ve gerekse diğer türlerde yapılacak araştırmalara da fikir verebilecektir. Bu çalışmanın amacı, yemle total aflatoksin verilen koçlarda karaciğer ve böbrekte oluşabilecek histomorfolojik değişiklikler (çekirdek alanı, AgNOR sayıları, AgNOR alanları ile AgNOR alanının çekirdek alanına oranları, organların genel histolojik yapısı ve hücrelerdeki patolojik değişiklikler) ile karaciğer epitel hücrelerindeki yağlanma oranında meydana gelebilecek değişiklikleri belirlemektir. Ayrıca, aflatoksin bağlayıcısı olan esterifiye glukomannan (EG) ilavesinin aflatoksine bağlı olumsuz etkilerin ortadan kaldırılmasındaki etkisini belirlemektir.

Bu tezin yapılması aşamalarında yardım ve desteklerini gördüğüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üye ve Elemanları Prof. Dr. Emrah SUR, Doç. Dr. Murat BOYDAK, Doç. Dr. Yasemin ÖZNURLU, Arş. Gör. Dr. Tuğba ÖZAYDIN, Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa ORTATATLI ve Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN'a ve ayrıca ekonomik katkı sağlayan TÜBİTAK ve Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGELER VE KISALTMALAR	**v**
1. GİRİŞ	**1**
1.1. Aflatoksinler	**3**
1.2. Aflatoksinlerin Toksikokinetik Özellikleri	**5**
1.3. Aflatoksinlerin Etki Mekanizması	**8**
1.4. Yemlerde ve Hayvansal Ürünlerde Aflatoksinler	**11**
1.5. Hayvanlarda Aflatoksikozis	**13**
1.6. Aflatoksin Bağlayıcılar	**14**
1.7. Aflatoksinlerin Karaciğer ve Böbrek Üzerine Etkileri	**17**
1.8. Çekirdekçik Organizatör Bölgeleri ve AgNOR Boyama	**18**
2. GEREÇ ve YÖNTEM	**20**
2.1. Hayvan Materyali	**20**
2.2. Hayvanların Beslenmesi	**20**
2.3. Aflatoksin Üretimi ve Tayini	**21**
2.4. Doku Örneklerinin Alınması ve İşlenmesi	**21**
2.5. AgNOR Solüsyonunun Hazırlanması ve Kesitlerin Boyanması	**22**
2.6. Preparatların Görüntü Analiz Sistemi ile İncelenmesi	**22**
2.7. İstatistiksel Analizler	**23**
3. BULGULAR	**24**
4. TARTIŞMA	**40**
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	**50**
6. ÖZET	**51**
7. SUMMARY	**52**
8. KAYNAKLAR	**53**
9. EKLER	**67**
EK 1. Etik Kurul Onayı	**67**
10. ÖZGEÇMİŞ	**68**

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFB_1 : Aflatoksin B_1
AFB_2 : Aflatoksin B_2
AFG_1 : Aflatoksin G_1
AFG_2 : Aflatoksin G_2
AFM_1 : Aflatoksin M_1
AFM_2 : Aflatoksin M_2
AgNORs : Gümüşleme metoduyla çekirdekçik organizatör bölgeleri
α : Alfa
Aw : Su aktivitesi
β : Beta
CLA : Linoleik asit
DNA : Deoksiribonükleik asit
EG : Esterifiye glukomannan
FDA : Birleşik Devletler Gıda ve İlaç İdaresi
GST : Glutatyon S-transferaz
HCl : Hidroklorik asit
HPLC : Yüksek performans likit kromatografi
MFO : Mikrozomal karma işlevli oksidaz
µm : mikrometre
NaCl : Sodyum klorür
NOR : Nükleolus organizatör bölgeleri
P : Fosfor
PAS : Periyodik asit shift
Ppb : milyarda bir birim
Ppm : milyonda bir birim
PVPP : Polivinilpolipirolidon
ROS : Reaktif oksijen türleri
rDNA : Ribozomal deoksiribonükleik asit
RNA : Ribonükleik asit
rRNA : Ribozomal ribonükleik asit
SCE : Saccharomyces cerevisiae

1. GİRİŞ

Mikotoksinler hastalıklara ve ekonomik kayıplara yol açan; insanlar, hayvanlar ve bitkisel ürünler üzerinde zararlı etkilere sahip olan küflerin sekonder metabolitleridir. Bitkisel ürün üzerinde doğal olarak bulunan mikroskobik iplik şekilli küflerin misel yapıları tarafından tarlada, hasat öncesi veya sırasında ve depolama sırasında üretilmektedirler. Gıda maddelerinin ve yemlerin mikotoksinlerle kontaminasyonu dünya çapında önemli bir problemdir. Gıdalarda ya da yemlerdeki mikotoksinlerin oluşumunu etkileyen faktörler kontrol edilemeyen depolarla ilgili olan çevresel şartları kapsamaktadır. Sıcaklık ve nem gibi dış faktörler ya da küf türünün özelliği, türlerinin çeşitliliği ve toksijenik özelliklerinin değişkenliği gibi iç faktörler bu kontrolü zorlaştırmaktadır (Agag 2004).

Genel olarak mikotoksinler düşük moleküler ağırlığa ve nonantijenik özelliğe sahiptirler. Pek çoğu ısıya oldukça dayanıklıdır. Mikotoksinler mutajenik, karsinojenik, embriyotoksik, teratojenik ya da östrojenik etkilere neden olabilmektedirler. Mikotoksinleri sentezleyebilme kabiliyetindeki küfler mısırda, buğdayda, yulafta, arpada, pamuk tohumunda ve yerfıstığında identifiye edilmiştir. Çiftlik hayvanlarının performansını etkileyen 5 önemli mikotoksin; aflatoksinler, deoksinivalenol, ergot, okratoksin ve zearalenondur. Mikotoksinler daha çok ağız yoluyla alınmasına karşın deriden ve solunum yoluyla da vücuda girebilmektedir. İnsan gıdası ya da hayvan yemine bulaşması ve bunların tüketilmesi durumunda mikotoksikozlara neden olmaktadırlar. En önemli mikotoksikoz aflatoksin toksikasyonlarıdır (Smith ve ark 1995).

Aflatoksinler çeşitli biyolojik etkilere yol açan, akut ve kronik patolojik etkiler gösteren güçlü biyolojik toksinlerdir. B_1, B_2, G_1 ve G_2 gibi aflatoksin alt türleri yeterli yükseklikteki nem ve ısı varlığında *Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus, Penicillium* ve *Rhizopus* türü mantarlar tarafından üretilmektedirler. Araştırmacılar tarafından ilk tespit edilen, günümüzde de en çok bilinen ve en toksik mikotoksin türü olan aflatoksin B_1 (AFB_1)'dir. 12-40^oC arasında ve % 12'nin üzerinde nem içeren fındık, yer fıstığı, mısır, pamuk tohumu, soya fasulyesi ve diğer tahıl ürünlerinde, yem ve yem hammaddeleri ile besinlerde kolayca üremektedirler. Hayvanların verimini düşürmeleri yanında hayvansal ürünlere de geçebilmekte ve dolaylı olarak insan sağlığını da tehdit etmektedirler (Kuiper-Goodman 1991).

Aflatoksikoz dünyanın birçok yerinde yaygın olan bir problemdir. Toksik etkileri içerisinde mutajen, karsinojen, teratojen ve immun sistemin baskılanması yer almaktadır. Memeli hayvanlarda yapılan çalışma sonuçlarına göre, annenin yemle aldığı aflatoksinin belirli bir oranının plasenta yoluyla yavruya geçebildiği ve yavrunun immun sisteminin embriyonik gelişimini baskıladığı ileri sürülmektedir. (Kaya ve ark 2002). Aflatoksinlerin farklı hayvan türlerinin ve kanatlıların çeşitli organlarında patolojik etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Yaş, cinsiyet, alınma şekli ve tür gibi birçok faktöre bağlı olarak akut, subakut ve kronik aflatoksikozlar şekillenmektedir. Spesifik toksinler karaciğer, böbrek, ağız ve mide mukozası, beyin veya reprodüktif sistem gibi spesifik organ ve dokuları etkilemektedir. Akut aflatoksikozlarda hastalık belirtileri dikkat çekicidir ve direkt olarak etkilenen organlarla ilgilidir. Patoanatomik değişiklikler kronik aflatoksikozlarda da gözlenmektedir. Aflatoksinlerin uzun süreli düşük dozları büyüme hızında yavaşlamaya, yemin değerlendirilmesinde azalmaya, genital sistemde meydana gelen değişikliklere bağlı olarak döl veriminde bozukluklara ve dolayısıyla hayvan verimliliğinin azalmasına yol açmaktadır (Oğuz ve Kurtoğlu 2000, Ortatatlı ve ark 2002).

İnsanlarda karaciğer karsinojeni olarak bilinen mikotoksinler genellikle hayvanların ve insanların beslenmeleri sırasında vücuda alınmaktadır. Hepatotoksik etkili olan AFB_1 hepatositlerde oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif hasar genel olarak hücresel komponentlerin fonksiyonlarında bozulmaya yol açmaktadır. Canlıda çevresel faktörler toksik etkilerini çoğunlukla organizmada O_2 radikallerinin oluşumunu gerçekleştirerek meydana getirmektedir. Serbest radikaller savunma sisteminin koruyucu etkisini aşacak şekilde oluştuklarından metabolizmayı olumsuz etkilemektedirler. Ayrıca bağ dokuda, hücre proliferasyonlarında ve hücre başkalaşımında önemli role sahip olan hiyaluronik asitin aflatoksinlerin oluşturduğu enfeksiyonlarda arttığı ve yangısal aktivite belirlenmesinde bir gösterge olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (Bozkurt ve ark 2004).

Aflatoksinlerin çiftlik hayvanlarındaki etkileri hayvanın türü, cinsiyeti, ırkı, yaşı, alınan toksinin çeşidi ve miktarı, maruz kalma süresi, stres faktörleri gibi birçok faktörlere bağlıdır. Evcil hayvanlar içerisinde erkekler dişilerden daha duyarlıdır. Ördek, alabalık, kedi, köpek, hindi gibi hayvanlar en duyarlı; at, sığır, koyun, keçi,

rat, kobay, bıldırcın gibi hayvanlar orta derecede duyarlı; fare ve maymun ise en az derecede duyarlı hayvanlar olarak bilinmektedir. Yüksek oranda alınan aflatoksin klinik olarak belirgin hastalıklara neden olurken, düşük dozda alınan aflatoksinin genç hayvanlarda büyüme performansını ve immun sistemi baskıladığı bildirilmektedir. Besinle AFB_1'e maruz kalma, hayvanlarda immun sistemi baskılayarak infeksiyonlara olan duyarlılığın artmasına da yol açmaktadır (Çelik 2001).

Gıdaların ve hayvan yemlerinin, küflerin gelişiminden ve aflatoksin kontaminasyonundan korunması çok önemlidir. Kontaminasyonun engellenemediği durumlarda ise aflatoksin içeren gıdaların ve yemlerin detoksifikasyonu için pratik ve etkili metotların önemi artmaktadır. Aflatoksin toksikasyonunu minimuma indirmek ve kontamine olmuş besinlerden aflatoksini uzaklaştırmak için toksin bağlayıcı maddelerin kullanıldığı çalışmalar yapılmaktadır. Aflatoksinlerle kontamine olmuş yemler değerlendirilirken yeme bentonitler, yapay ve doğal zeolitler ya da yaygın olmamakla birlikte polivinilpolipirolidon (PVPP) katılmaktadır. Yeme % 0,5 oranında ilave edilen PVPP'nin aflatoksinlerin emilimini % 79–91 oranında azalttığı bildirilmektedir (Kaya 1984). Son yıllarda kullanılmaya başlanan bir diğer adsorban ise biyolojik detoksifikasyon sağlayan maya glukomannanıdır. Basmacıoğlu ve ark (2005) aflatoksin içeren yeme glukomannan ilave ederek yaptıkları çalışmada, glukomannanın broylerlerde aflatoksinin olumsuz etkilerini etkin bir şekilde azalttığını ve aflatoksin içermeyen yemlerde de önemli bir olumsuz etkinin oluşmadığını bildirmişlerdir. Tavşanlarda aflatoksinlerin reprodüktif sistemde oluşturduğu etkilerin vitamin C gibi antioksidanlarla giderilmesine yönelik çalışmalar yapılmış; ancak aflatoksin bağlayıcısı olarak bilinen glukomannanın etkilerinin araştırıldığı çok fazla çalışmaya rastlanmamıştır.

1.1. Aflatoksinler

Aflatoksinlerle kontamine olmuş gıdalarla beslenme, çiftlik hayvanlarının yanı sıra insan sağlığı açısından da tehdit oluşturmaktadır (Robens ve Richard 1992, Lakkawar ve ark 2004). İlk olarak 1960 yılında İngiltere'de 100.000 hindinin öldüğü ''Turkey-X-Disease (Hindi Hastalığı)'' na sebep olan (Blount 1961, Asao ve ark 1965, Yu ve ark 2002, Verma 2004, Farombi 2006) taşınabilir bir toksin olarak tanımlanmıştır (Kuhn ve Ghannoum 2003, Do ve Choi 2007). Benzeri ölümlere

ördek palazları ve sülünlerde de rastlanmış ve toksikasyona neden olarak hayvan yemlerinde kullanılan Brezilya yer fıstığından şüphe edilmiştir (Agag 2004). Halver (1965) da yer fıstığı ve pamuk tohumu unlarından hazırlanan rasyonla beslenen alabalıklarda kanser oluşumu salgınlarının görüldüğünü bildirmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda toksik madde izole edilmiş ve kaynağının *Aspergillus flavus* olduğu ortaya konulmuştur. Sonuçta bu toksin ‘‘aflatoksin’’ olarak isimlendirilmiştir (Blount 1961, Lancaster ve ark 1961).

Aflatoksinler, *Aspergillus* cinsinin toksijenik türleri tarafından, özellikle de tarımsal ürünlerde *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*’un (Yu ve ark 2002) gelişmesi sırasında oluşan besin kaynaklı sekunder toksik küf metabolitleridir (Pohland 1993, Wilson ve Payne 1994, Fink 1999, Allameh ve Razzaghi 2001, Park 2002, Verma 2004, Mathuria ve Verma 2007). Aflatoksinler en iyi bilinen hepatotoksik, hepatokarsinojenik (Wogan 1999, Ortatatlı ve Oğuz 2001, Verma 2004, Mathuria ve Verma 2007), teratojenik, mutajenik (Eaton ve Groopman 1994, Smith ve ark 1995, Wang ve ark 1999) ve immunosupressif (Enriquez 2000, Smela ve ark 2001, Oğuz ve ark 2003) ajanlar olup akut ve kronik patolojik etkiler gösteren güçlü biyolojik toksinlerdir (Lawson ve ark 2006). Aflatoksinin 18 ayrı türü olup yem ve yem hammaddelerinde en fazla tespit edilen türleri aflatoksin B_1, B_2, G_1 ve G_2’dir (Leeson ve ark 1995, Tuzcu ve ark 2010). *A. flavus, A. pseudotamarii* ve *A. ochraceoroseus* sadece aflatoksin B’leri; *A. nomius, A. bombycis* ve *A. parasiticus* hem B hem de G toksinleri üretmektedirler (Squire 1989, Coulombe 1993, Çelik 2001, Yu ve ark 2002, Do ve Choi 2007). AFB_1 ve aflatoksin B_2 (AFB_2) ultraviyole ışığı altında güçlü mavi floresans vermesinden dolayı “B (blue)”, aflatoksin G_1 (AFG_1) ve aflatoksin G_2 (AFG_2) de yeşilimsi floresansından dolayı “G (green)” harfi ile isimlendirilmişlerdir (Verma 2004, Rhee ve ark 2006, Do ve Choi 2007, Ataman ve ark 2009). Ayrıca bu 4 ana aflatoksin dışında aflatoksinli yemlerle beslenen hayvanların sütlerinde bulunan ve ‘‘süt toksini-milk toksin’’ olarak isimlendirilen aflatoksin M_1 (AFM_1) ve aflatoksin M_2 (AFM_2), süt, süt ürünleri ya da ette bulunabilen AFB_1 ve AFB_2’in hidroksile olmuş türevleridir (Denning 1987, Verma 2004). Aflatoksinler içinde en yaygını, en çok oluşanı ve en toksik olanı AFB_1’dir (Sudakin 2003, Farombi 2006).

Suda çözünmeyen aflatoksinler değişik oranlarda etanol, aseton, isopropanol, hekzan-etanol, hekzan-metanol ve hekzan-aseton-su gibi organik çözücülerde çözündürülebilirler (Stubblefield ve ark 1972, Leeson ve ark 1995, Kaya ve ark 2002). Yüksek sıcaklıklara oldukça dayanıklı olan bu bileşiklerin özellikle sütle atılan türevlerinin pastörizasyon işleminden bile etkilenmedikleri ve yapılarında çok fazla bir değişiklik olmadığı vurgulanmaktadır (Kaya ve ark 2002).

Küfler klorofil içermediklerinden, kendileri için gerekli olan lipid, karbonhidrat ve proteinleri sentezleyemezler ve bu nedenle de saprofit ya da parazit olarak yaşamak zorundadırlar (Cavalheiro 1981). Fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörler *Aspergillus* türlerinin aflatoksin oluşturmasını etkilemektedir. Fiziksel faktörler sıcaklık ve nemi; kimyasal faktörler havanın bileşimi ve yemin niteliğini; biyolojik faktörler ise konakçı türleriyle ilgili olanları kapsamaktadır (Agag 2004). Yemlerde aflatoksinlerin sentezlenmesi; 27ºC'nin üstündeki sıcaklıkta, ortam nem oranının % 62'nin üzerinde yem maddesinin nem oranının % 14'ün üzerinde olması (Royes ve Yanong 1992, Agag 2004), ortam havasının oksijen oranının % 20-90 arasında olması ve su aktivitesinin ise 0,95-0,99 aw düzeylerinde olması (Ellis ve ark 1991,) durumunda 3-4 gün gibi kısa bir sürede gerçekleşmektedir. Bununla birlikte pH'nın 4-5 arasında olması (Ellis ve ark 1991) ve özellikle taneli yem maddelerinin kırılmış olması da (Reddy 1992) küflenmeyi hızlandırmaktadır. Tarımsal ürünlerdeki aflatoksinlerin doğal oluşumu pek çok ülkede ve üründe rapor edilmesine karşın, aflatoksinlerin seviyesi bölgeden bölgeye oldukça büyük farklılık göstermektedir (Denning 1987, Verma 2004). Özellikle bol yağışlı yıllarda hasat öncesi kontaminasyon artmaktadır (Jelinek ve ark 1989, Yu ve ark 2002).

1.2. Aflatoksinlerin Toksikokinetik Özellikleri

Hayvanların aflatoksinlere farklı reaksiyonlar göstermesi farklı metabolizmaları ile ilgili olabilmektedir (Tulpule 1981). Türler arasındaki duyarlılık farklılığına bağlı olarak özellikle tek mideli hayvanlar ve insanlar üzerindeki akut ve kronik etkileri de değişiklik göstermektedir. Rumen florasının mikotoksinleri indirgeyici özelliğe sahip olmasından dolayı ruminantlar mikotoksinlerin zararlı etkilerine daha dayanıklıdırlar (Hussein ve ark 2001).

Vücuda giren tüm yabancı moleküller gibi aflatoksinlerin metabolizmasında da emilim, dağılım, biyotransformasyon ve vücuttan atılım aşamaları bulunmaktadır. Emilim en çok gastro-intestinal kanal, akciğerler ve deri yoluyla gerçekleşmektedir. Kimyasal maddelerin vücut membranlarından geçiş oranı, onların yağda eriyebilirlik oranlarına göre değişmektedir. Yağda iyi çözünen bileşikler olan aflatoksinler, gastro-intestinal kanaldan kolaylıkla emilip kan dolaşımına geçtikten sonra, büyük oranda yumuşak dokular ile birlikte yağ dokularında da birikirler. Ancak asıl birikim yerleri, toksinin biyotransformasyonunun gerçekleştiği karaciğer ve böbrek gibi organlardır (Leeson ve ark 1995, Kaya ve ark 2002, Agag 2004).

Yem ve besinlerle alınan aflatoksinler sindirim kanalından sınırlı ölçüde emilmektedirler (Kaya ve ark 2002). Zararlı etkilerini göstermeden önce toksinlerin enzimatik biyoaktivasyonu olmaktadır (Swick 1984). Metabolizma oranı ve şekillenen ara ürünler AFB_1'in toksik etkisinin belirlenmesinde önemli faktörlerdir (Tulpule 1981). Aflatoksin vücuda alındıktan sonra başlıca karaciğerde, aynı zamanda akciğer ve böbrekte de bulunan mikrozomal karma işlevli oksidaz (Mix Function Oxydase-MFO) sistemi tarafından enzimatik dönüşüme uğramaktadır (Verma 2004). Karaciğerde sitokrom P-450 enzimine bağlı MFO sistemi daha polar, daha atılabilir ve daha az toksik etkili metabolitler halinde yabancı bileşikleri metabolize etmektedir. Aflatoksinlerin metabolizması esnasında okside olmuş metabolitler hücresel unsurlarla birlikte daha reaktif ve esas bileşikten daha toksik olmaktadır. Aktif metabolitler direkt hayvanların dokularında şekillendiği için hepatik biyoaktivasyonun oldukça önemli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca MFO sistemi sınırlayıcı bir özelliğe sahiptir (Swick 1984).

Dolaşıma geçen aflatoksinler başlıca karaciğer ve kaslarda dağılım göstermektedirler (Kaya ve ark 2002). Marvan ve ark (1983) AFB_1'in gonadlarda, karaciğerde, böbrekte, dalakta, bursa Fabricius'ta, timusta, endokrin bezlerde, akciğer ve beyinde farklı dağılımlar gösterdiğini bildirmişlerdir. Petr ve ark (1995) hamsterlere periton içi 0,1 mg/kg AFB_1 verdiklerinde enjeksiyondan 8 dk - 10 sa sonrasında kanda, karaciğerde, böbrekte ve testislerde serbest AFB_1'e rastlamışlardır. İnsanların serumlarında kaydedilen aflatoksin konsantrasyonu vücudun fiziksel durumuna, aflatoksinin ağızdan alınma süresine ve miktarına göre farklılık göstermektedir. Dolaşımda aflatoksin plazma proteinlerine özellikle de albümine

bağlanmaktadır (Autrup ve ark 1991). Albüminin insanlardaki yarı ömrü 20 gündür. Daha önceden alınan aflatoksin, aflatoksin-albümin bileşiğinin oluşmasıyla dolaşımda birikerek beslenme kesildikten sonra bile albüminde görülebilmektedir (Verma 2004).

Schwartz ve Perantoni (1975) AFB_1'in kültür hücrelerinde değişimlere ve sitotoksisiteye yol açtığını rapor etmişlerdir. Kaden ve ark (1987) AFB_1'in kültür hücrelerinde toksisite yanında mutasyonlara da neden olduğunu fark etmişlerdir. Karenlampi (1987) fare karaciğer hücrelerinde aflatoksinin sitotoksisitesini rapor etmiştir. Alyuvarlar *in vitro* ortamda aflatoksine maruz bırakıldığında yıkımla sonuçlanan konsantrasyona bağlı şişme gözlenmekte, bunun da permeabilitedeki değişiklikler ile membran stabilitesinin bozulmasından ileri geldiği belirtilmektedir (Verma ve Raval 1991). Glahn ve ark (1991)'nın yaptığı çalışmada toksin uygulamasının kesilmesinden 10 gün sonra bile glomerular filtrasyon hızında azalma ve plazma ozmolalitesinde artış saptanması, aflatoksinlerin böbrek fonksiyonları üzerinde uzun süreli değişikliğe neden olabileceğini göstermiştir.

AFB_1'in total dozunun yaklaşık % 80'i bir haftada atılmaktadır. Plazma yarı ömrü 36,5 dk, dağılım oranı vücut ağırlığının % 14'ü ve vücuttan temizlenmesi 1,25 L/kg/sa olarak tespit edilmiştir (Verma 2004). AFM_1 alındıktan 48 saat sonra vücuttan atılmaktadır (Hendrickse 1991). Aflatoksinin hem metabolize olmuş (aflatoksikol, M_1 ve M_2) hem de olmamış (B_1, B_2, G_1 ve G_2) formları idrarla, dışkıyla ve sütle dışarı atılmaktadır (Coulter ve ark 1986, De Vries ve ark 1987, Verma ve Chaudhari 1997). Maymunlarda idrarla atılımın, fare ve ratlarda ise safra ile atılımın daha etkin olduğu vurgulanmaktadır. Aynı zamanda yumurta ile de önemli oranda bir eliminasyon gerçekleşmektedir (Ataman ve ark 2009). Bunların dışında Verma ve Chaudhari (1998), insanların tükrük salgılarında aflatoksinin yedi farklı tipinin varlığını rapor etmişlerdir. Tükrük yoluyla atılan aflatoksin sindirim sisteminden emilmekte ve tekrar dolaşıma geçebilmektedir. Dolaşıma geçen toksinler plazmadan çabuk ayrılırlar; başlıca karaciğer ve kaslarda dağılım gösterirler. Vücuda giren AFB_1'in % 75'lik kısmı ilk 24 saat içinde dışkı, % 15-20'lik kısmı idrar ve sütle değişmemiş ve metabolitleri halinde atılır (Kaya ve ark 2002). Sütçü ineklere 10 gün boyunca % 15 oranında aflatoksin içeren yemle uygulanan beslemenin 9. gününde

yapılan ölçümlerde AFB_1'in % 23-67'lik kısmının idrar ve dışkı ile % 1,35'lik kısmının da süt ile atıldığı saptanmıştır (Hoogenboom ve ark 2001).

1.3. Aflatoksinlerin Etki Mekanizması

Oral yolla alınan AFB_1 en etkili bir biçimde ince bağırsaklardan emilmekte (Kumagai 1989), lipid peroksidasyonu ve hücresel zedelenmeye yol açan AFB_1-8,9-epoksit gibi reaktif ara ürünleri şekillendiren hücresel sitokrom P-450 enzim sistemi (Stresser ve ark 1994, Lakkawar ve ark 2004) ve aril hidrokarbon hidroksilaz enzimi etkisiyle karaciğerde metabolize edilmektedir (Stresser ve ark 1994, Lakkawar ve ark 2004). Ayrıca lipid peroksidasyonu ve oksidatif DNA hasarı, AFB_1 kaynaklı toksisitenin olduğunu göstermektedir (Mathuria ve Verma 2007).

Aflatoksinler etkilerini özellikle DNA, RNA ve protein formasyonlarına bağlanarak göstermektedirler. Ayrıca lipid peroksidasyonuna ve yanı sıra DNA'ya da oksidatif zarar vermektedirler. (Hendrickse 1991). Aflatoksinin en erken etkisi DNA, RNA ve proteinli bileşiklerin şekillenmesi ile protein sentezinin azalması, DNA'ya bağlı RNA polimeraz aktivitesini ve RNA sentezlerini engellenmesi ve endoplazmik retikulumun degranülasyonuna sebep olmasıdır (Pohland ve Wood 1987, Groopman ve ark 1996). AFB_1 hücrede ilk olarak mitokonriyal DNA'ya etki etmektedir (Niranjan ve ark 1982, Verma 2004).

Karaciğerdeki DNA, RNA ve proteinlerin biyosentezlerinin engellenmesi AFB_1'in esas biyokimyasal etkileri olarak düşünülmektedir (Rogers ve Newberne 1967, Godoy ve Neal 1976, Yu 1981, Parhizkar ve ark 2002). Biyokimyasal süreçler sonunda ayrıca lipid metabolizması, mitokondriyal mekanizma, lizozomal enzim aktiviteleri ve membran transportu da etkilenmektedir. Karaciğerdeki DNA biyosentezinin engellenmesi AFB_1'in metabolik aktivasyonuna ve detoksifikasyonuna bağlanmıştır (Parhizkar ve ark 2002). AFB_1'i hem aktive hem de detoksifiye edebilen P450 3A4 enzimi karaciğerde ve ince bağırsaklarda bulunmaktadır (Guengerich ve ark 1996). P450 3A4 ve P450 1A2 enzimleri AFB_1'i exo-8,9-epoksite yüksek bir şekilde reaktife ederek AFB_1'in biyotransformasyonunu katalize etmektedirler (Guengerich ve ark 1998). Özellikle DNA gibi hücresel makromoleküllere kovalent bağlanma affinitesi olan AFB_1-8,9-epoksit aflatoksinin biyolojik etkilerini ortaya çıkarmaktadır (Swenson ve ark 1977, Croy ve ark 1978,

Coulombe 1993, Parhizkar ve ark 2002). Bu oldukça reaktif olan AFB_1-8,9-epoksit subtansı DNA bazları ile özellikle guaninin N7 pozisyonuna eklenerek DNA'da değişiklikler yapmaktadır (Bressac ve ark 1991, Hendrickse 1991, Hsu ve ark 1991, Wang ve ark 1999, Guengerich 2001, Yu ve ark 2002, Bennett ve Klich 2003, Farombi 2006, Guengerich 2006, Do ve Choi 2007). DNA'ya bağlanan AFB_1-N7-guaninin (Guindon ve ark 2007) karsinojenik ve mutajenik etkide önemli rolü olduğu sanılmaktadır (Wang ve ark 1999, Verma 2004). DNA hasarının bir diğer olası sebebi de DNA bazlarının oksidasyonunu sağlayan reaktif oksijen türlerinin (ROS) şekillenmesidir (Guindon ve ark 2007). Bu serbest radikaller kromozomlarda hasara neden olmaktadır (Çelik 2001). Hücre ya da dokudaki oksidatif zarar ROS'un (O_2, H_2O_2, OH) hücrelerin antioksidan kapasitesini genişlettiğinde meydana gelmektedir (Verma 2004). Shen ve ark (1995) AFB_1 kaynaklı hücresel zedelenmelerde süperoksit radikalleri, hidroksi radikalleri ve hidrojen peroksit gibi ROS'un rol oynadığını ileri sürmüşlerdir.

AFB_1'in aktif bir metaboliti olan AFB_1-8,9-epoksitteki muhtemel bir artış hepatik lipid peroksit seviyesinde önemli bir artışa sebep olmaktadır (Toskulkao ve ark 1982). Doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımlanma şekli olan lipid peroksidasyonu, membran yapısında değişiklikler ve enzim inhibisyonu ile ilişkilidir. AFB_1 ilişkili hepatotoksitede enzimatik olmayan lipid peroksidasyonun yüksek seviyede gerçekleşmesi hücre membranlarında hassasiyet artışına ve hasara neden olmaktadır (Nakae ve ark 1987, Shen ve ark 1994, Ravi ve ark 2001). Membran lipidlerinin peroksidasyonu membrana bağlı enzim aktivitesinin ve hücre yıkımını kapsayan membran bütünlüğünün kayıplarıyla başlamaktadır (Toskulkao ve ark 1982, Younes ve Siegers 1984, Toskulkao ve Glinsukon 1988). Lipid peroksidasyonu aflatoksine maruz bırakılmış farelerin karaciğer, böbrek (Verma ve Nair 1999) ve testisinde (Verma ve Nair 2001) önemli derecede artış göstermiştir (Verma 2004). Gözlenen yağ infiltrasyonları/değişiklikleri artan lipid biyosentezinden ziyade lipid transportunun bozulmasından dolayı olabilmektedir. Ayrıca aflatoksikozu takiben mitokondriyal hasar, lipidlerin sürekli birikmesi mitokondriler vasıtasıyla yağların oksidasyonunda bir azalmaya neden olabilmektedir (McLean ve Dutton 1995, Lakkawar ve ark 2004). Mikotoksin mitokondrilerde ultrastruktural değişikliklere yol açmakta (Shanks ve ark 1986,

Rainbow ve ark 1994) ve aynı zamanda apoptozise yönlenmiş mitokondrilere neden olmaktadır (Pasupathy ve ark 1999, Verma 2004).

İnsanlarda ve hayvanlarda AFB_1-8,9 epoksitin neden olduğu DNA ve diğer hücresel unsurlardaki bozulmayı azaltıcı etkiye sahip enzimatik bir sistem bulunmaktadır (Verma 2004). Hücre ve dokulardaki oksidatif zarar, hücrenin antioksidan savunma mekanizmasının belli determinantları olan vitamin C, E ve glutatyon gibi enzimatik olmayan antioksidanların; süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi enzimatik antioksidanların seviyelerinde önemli düşüşlere neden olabilmektedir (Verma 2004). Nakae ve ark (1987) oksijen radikallerini etkisiz hale getiren antioksidatif sistem olan süperoksit dismutaz ve katalaz gibi enzimatik sistemlerin, karaciğer hücreleri üzerine AFB_1'in öldürücü etkisini engellediklerini bildirmişlerdir. Glutatyon aşaması AFB_1'in detoksifikasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Johnson ve ark 1997, Farombi ve ark 2005b, Farombi 2006). AFB_1 8,9 exo- ve endo-epoksitler, glutatyon S-transferaz (GST) tarafından katalize edilen AFB-merkapturat'ın oluşması sonucu glutatyon ile konjuge olabilmektedir (Johnson ve ark 1997, Farombi 2006). AFB_1-8,9-epoksitin glutatyon ile konjugasyon derecesi AFB_1 kaynaklı hepatoselüler kanserlerin farklı hayvan türlerini etkilemesinde önemli bir faktör olmaktadır (Guengerich ve ark 1996). Reaktif AFB_1-epoksit oluşturan mikrozomal bağımlı sitokrom P-450'nin AFB1-DNA bileşiğinin şekillenmesini engellemek için sitosolik GST tarafından inaktive edilebildiği *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda görülmüştür (Degen ve Neumann 1981, Lotlikar ve ark 1984, Parhizkar ve ark 2002). GST; endojen bileşik glutatyona 8,9 epoksitin konjugasyonunu sağlayarak 8,9 epoksitin toksik gücünü nötralize etmektedir (Verma 2004). Glutatyon seviyeleri karaciğer ve böbrekte önemli ölçüde azalmaktadır. Glutatyon; peroksidasyonu engellerken, serbest radikallerin ortadan kaldırılmasını ve hücre membranlarının korunmasını sağlamaktadır (Patel 1987). Düşük glutatyon seviyeleri aflatoksinin toksik etkilerini şiddetlendirebilmektedir. Maymunda GST aktivitesi ratlara göre 3-5 kat daha fazla olduğundan maymunlar aflatoksin karsinojenezine daha dayanıklıdır. GST aktivitesi ya da 8,9 epoksit konjugasyonu daha düşük olan insanlarda ise ratlara ve maymunlara göre aflatoksin detoksikasyonu daha az etkindir (Groopman ve ark 1996, Verma 2004). Süperoksit dismutaz; zararlı serbest radikal süperoksitleri H_2O_2 ve O_2'ye indirgeyerek hücreleri oksidatif zarardan korumaktadır. Oluşan H_2O_2 sadece katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile parçalanmamakta

aynı zamanda lipid peroksidasyonu ile de etkileşebilmektedir (Venkateswaran ve ark 1987). Bu enzim aktivitelerindeki düşüş, protein sentezindeki azalmadan dolayı olabilmektedir (Verma 2004). Breimer (1990) serbest radikallerin alfa (α) tokoferil radikalleri ile biyolojik membranlarda hızlı bir şekilde reaksiyona girdiğini bildirmiştir.

1.4. Yemlerde ve Hayvansal Ürünlerde Aflatoksinler

Mikotoksinlerin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki etkisi günümüzde gittikçe artmaktadır (Smith ve ark 1995). Yemlerin mikotoksinlerle kontaminasyonu evcil hayvanların sağlığı üzerinde ciddi zararlara sebep olmaktadır. Yemlerdeki aflatoksinlerle ilgili olarak yemden yararlanma ve büyüme geriliği yüzünden çiftlik hayvanları endüstrisinde ekonomik kayıplar ortaya çıkmaktadır. Bu bileşikler çiftlik ile kümes hayvanlarında ve diğer hayvanlarda ciddi hastalıklara ya da ölümlere sebep olmaktadır (Newberne ve Butler 1969, Parhizkar ve ark 2002).

Besinler belli mikotoksinlere maruz kalarak insanlar için de kaçınılmaz bir tehlike oluşturmaktadır. Pek çok gelişmiş ülkede temel gıda maddelerinin ve tarımsal ürünlerin özellikle AFB_1 gibi mikotoksinlerle önemli oranda kontamine olduğu bildirilmektedir (Farombi ve ark 2005a). Bu mikotoksinlerin yemlerdeki düşük seviyeleri çiftlik hayvanlarının üretimi üzerine görünür bir etki oluşturmamakla birlikte hayvansal ürünlerde bıraktıkları kalıntılar besin zincirinde taşınmakta ve sonuçta insanlar tarafından dolaylı olarak alınması halk sağlığı açısından da ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Ayrıca mikotoksin içerebilen besin ürünlerinin ve tahılların insanlar tarafından direkt alınmasıyla da sağlık sorunları oluşabilmektedir (Kuiper-Goodman 1991).

Aflatoksinler besin zincirinde bulunmaktadır. Dünyanın pek çok ülkesindeki aflatoksin tüketimi günlük 0-30 000 ng/kg arasında değişmektedir (Denning 1987, Verma 2004). Amerika Birleşik Devletleri'ndeki pek çok eyalet, yiyeceklerde 20 ppb (µg/kg) oranında sınırlayıcı bir aflatoksin miktarı belirlemişlerdir. Bununla birlikte 1999'da Avrupa Ekonomi Birliği AFB_1 için 20 ppb, total aflatoksinler için ise 40 ppb seviyelerini en düşük limit olarak bildirmiştir (Yu ve ark 2002, Mishra ve Chitrangada 2003, Farombi 2006). Birleşik Devletler Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) eyaletler arasındaki ticari gıda ve yemlerdeki total aflatoksin seviyesini 20 ppb'in

altında düzenlemektedir (Whitlow ve Hagler 2005, Han ve ark 2006, Do ve Choi 2007). AFB_1'in bir metaboliti olan AFM_1'in sütteki en düşük değeri 0,5 ppb olarak sınırlandırılmıştır (Karemlampi 1987, Han ve ark 2006, Do ve Choi 2007).

Ülkemizde üretilen hayvan yemlerinin aflatoksin düzeylerinin belirlenmesine yönelik olan çalışmalarda oldukça farklı sonuçlar elde edilmektedir. Kaya (1982) 106 süt ineği yemi örneğinin 21'inde (% 19,6) 0,0125 ppm düzeyinde total aflatoksin tespit etmiş iken; Özpınar ve ark (1988) Marmara bölgesindeki 15 yem fabrikasından topladıkları 74 adet kanatlı karma yemi ve yem hammaddesi örneğinin % 44'ünde 0,2 ile 30,4 ppb arasında değişen AFB_1 düzeyleri tespit etmişlerdir. Elazığ yöresinden temin edilen yem hammaddeleri ile karma yemler üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise (Şahin ve Sarı 1996) üretim-yedirme-depolama zinciri göz önüne alındığında en büyük sorunun depolama aşamasında oluştuğu, bu aşamada üreyen mantar türleri arasında ise % 65,62 ile *Aspergillus* türlerinin birinci sırayı aldığı tespit edilmiştir.

Aflatoksin düzeyleri yem ve yem hammaddelerinde yapılan çalışmalarda nispeten düşük bulunmuş olsa da, kontaminasyonun yem üretimi-depolama ve yedirme zincirinin her aşamasında olabildiği ve bu durumun da uzun vadede ciddi sorunlara neden olabileceği vurgulanmaktadır (Şahin ve Sarı 1996). Ayrıca yemlerle alınan aflatoksinler değişik oranlarda hayvansal ürünlere de geçebilmektedir. Aldemir (1993), günde 500 µg AFB_1 tüketen tavukların karaciğer, böbrek, kırmızı ve beyaz kaslarında uygulama sonrası 4. güne kadar ölçülebilir düzeyde (>0,01 ppb) AFB_1 tespit etmiştir. Jacobson ve Wiseman (1974) ise, 100 ve 400 ppb düzeyinde AFB_1 içeren yemle besledikleri yumurtacı tavukların yumurtalarında 0,2-0,3 ppb düzeyinde AFB_1 tespit etmişlerdir. Sudhakar (1992) ise 600 ppb düzeyinde AFB_1 içeren yemle beslenen tavukların yumurtalarında 5 ng/gr miktarında AFB_1 tespit ettiğini bildirirken, Oliveira ve ark (2000) 500 ppb AFB_1 içeren yemle beslenen tavukların yumurtalarının 6 ng/yumurta düzeyinde AFB_1 içerdiğini ileri sürmüşlerdir.

Yemlerle alınan aflatoksinler ve türevleri süte de geçebilmektedir. Kaya (1982) 106 süt ineği yemi örneği ve 38 çiğ süt örneği üzerinde yaptığı bir çalışmada yemlerin % 19,6'sında ölçülebilir düzeylerde aflatoksin, sütlerin ise % 5,7'sinde aflatoksin metaboliti olan AFM_1 tespit ettiğini bildirmektedir. Stubblefield ve ark (1983) ise, Holstein ırkı sığırlar üzerinde yapmış oldukları deneysel bir çalışmada 3

gün süreyle 0,35 mg AFB_1/kg canlı ağırlık dozunda AFB_1'li yem ile besledikleri ineğin son uygulamadan 24 saat sonra alınan beyin, kalp, bağırsak, böbrek, karaciğer, akciğer, dalak, meme dokusu, iskelet kası dokusu, meme lenf yumrusu, dil dokusu örnekleri ile süt, safra salgısı, kan, dışkı ve rumen içeriğinde değişik düzeylerde AFB_1 ve AFM_1 tespit etmişlerdir. Sütçü sığırlar üzerinde yapılan bir başka deneysel çalışmada 7 gün süre ile 100 ve 200 ppb aflatoksin içeren yemle beslenen sığırların sütlerinde sırasıyla 0,91 μg/L ve 1,85 μg/L düzeyinde AFM_1 belirlenmiştir (Harvey ve ark 1991).

1.5. Hayvanlarda Aflatoksikoz

Son yıllarda insanlarda ve hayvanlarda mikotoksinlere ve mikotoksikozlara olan ilgi gittikçe artmaktadır (Hintz 1990). Bütün hayvan türleri aflatoksikoza duyarlıdır fakat salgın çoğunlukla domuz, koyun ve sığırlarda olmaktadır (Agag 2004). Yemlerdeki doğal kontaminasyon sonucu çiftlik hayvanlarının intoksikasyonu büyük bir ekonomik öneme sahiptir (Swick 1984). Kümes hayvanları aflatoksinlere oldukça duyarlı olduğu için (Diaz ve ark 2008) en önemli ekonomik kayıplar kanatlı sektöründe yaşanmaktadır (Robens ve Richard 1992). Kanatlı türlerinde yapılan kıyaslamalı toksikolojik çalışmalar, ördeklerin ve hindilerin aflatoksinlere en duyarlı, bıldırcınların orta derecede duyarlı, tavukların ise en dayanıklı türler olduğunu göstermiştir (Diaz ve ark 2008). Ördek palazlarının karaciğer hücrelerindeki MFO düzeylerinin diğer türlerdekinden oldukça yüksek olması, bu türün aflatoksine duyarlılığını artırmıştır (Reddy 1992). Domuz, sığır ve çiftlik hayvanları aflatoksikozda genel olarak immunite, canlı ağırlık kazancında azalma, beslenme yetersizliği ve üretim gibi faktörlerde önemli ekonomik kayıpların olduğu evcil türler iken kanatlı sektörünün aflatoksikozdan daha çok etkilendiği bildirilmektedir (Robens ve Richard 1992). Maymun ve insanlar akut zehirlenmelere daha duyarlı, karsinojenik etkilere ise kısmen daha dayanıklıyken; rat gibi hayvanlarda ise bu durum tersinedir (Tulpule 1981). Atlar mikotoksinlere ruminantlardan daha duyarlıdır (Hintz 1990, Agag 2004). Su kuşlarında birçok ölüm olaylarının akut aflatoksikoza bağlı olduğu bildirilmektedir (Robinson ve ark 1982). Son yıllarda vahşi hayvan türlerinin de düşük seviyelerde uzun süre aflatoksine maruz kalarak kronik etkilerin ortaya çıktığı bildirilmektedir (Lawson ve ark 2006).

Allameh ve Razzaghi (2001) ratlarda yaptıkları çalışma sonucunda AFB_1 tüketiminin yetişkinlere göre gençlerde önemli ölçüde GST aktivitesini artırarak aflatoksin metabolitlerinin daha etkili ve hızlı bir şekilde ortadan kaldırıldığını bildirmişlerdir. Tavuklarda reaktif metabolitlerin ve metabolik aktivasyonun karaciğerde daha etkili bir şekilde oluşmasından dolayı DNA biyosentezinin engellenmesi daha etkilidir. Ayrıca toksik metabolitlerin glutatyon konjugasyonu yoluyla detoksifikasyon oranı normal seviyede gerçekleşirken, sitokrom P-450'ye bağlı epoksidasyon oranı tavuklara göre piliçlerde oldukça düşüktür (Parhizkar ve ark 2002). Hastalıklar ile aflatoksin ilişkisinin en önemli kanıtı, karaciğer hasarını gösteren enzimlerin serumda artmasıyla birlikte akut ve kronik karaciğer hastalıklarının olmasıdır. (Robens ve Richard 1992).

Aflatoksin kontaminasyonları yem kalitesinde düşüşe ve besinlerin değerlendirilme oranının düşmesi ya da reprodüktif anormallikler gibi problemlere yol açarak hayvanlarda verim düşüklüğüne neden olmaktadır (Oğuz ve Kurtoğlu 2000, Ortatatlı ve ark 2002, Basmacıoğlu ve ark 2005). Kümes hayvanlarında aflatoksikoz aynı zamanda halsizliğe, büyüme ve yemden yararlanma oranının azalması ile iştahsızlığa, yumurta veriminde düşmeye ve ölümlerde artışlara yol açmaktadır (Miazzo ve ark 2000, Basmacıoğlu ve ark 2005). Ayrıca canlı ağırlık kazancında azalma, immun sistemin baskılanması, karaciğer fonksiyon bozukluğu ve kanın pıhtılaşmasında bozukluklara sebep olmaktadırlar (Quist ve ark 2000). Kronik zehirlenmeler hayvanlarda özellikle bağışıklık sistemini baskılayarak birçok hastalığın ön plana çıkmasına neden olmaktadır (Çelik 2001).

1.6. Aflatoksin Bağlayıcılar

Gıdaların ve hayvan yemlerinin küf gelişiminden ve aflatoksin kontaminasyonundan korunması çok önemlidir. Son yıllarda aflatoksin içeren gıdaların ve yemlerin detoksifikasyonu için pratik ve etkili metotların geliştirilmesi büyük önem kazanmıştır. Üreticiler ve bilim adamları besin kaynaklı toksinleri ortadan kaldırmak için etkili bir dekontaminasyon teknolojisi geliştirmeyi amaçlamaktadırlar (Basmacıoğlu ve ark 2005). Aflatoksinle kontamine besinler ile ilgili tehlikeler spesifik uygulamaların ve dekontaminasyon yöntemlerinin kullanılmasıyla azaltılabilmektedir (Park 2002). Dekontaminasyon prosedürleri fiziksel, kimyasal ve biyolojik metotlarla aflatoksini parçalama, yıkımlama, inaktive

etme ya da uzaklaştırma üzerine odaklanmaktadır (Basmacıoğlu ve ark 2005). Aflatoksinlerin dekontaminasyon yöntemlerinde amaç aflatoksin konsantrasyonlarını kabul edilebilir seviyeye düşürmede başarılı olmalıdır (Park 2002). Olumsuz etkileri önlemek için yapılacak ilk uygulama saha şartlarında küflenme ve bulaşmanın önlenmesidir. Bunun için ürünün hasat edilmesi, kurutulması, taşınması ve depolanması aşamasında gerekli özen gösterilmelidir (Çelik 2001). Çekirdek, tohum ve kabuklu yemişlere zarar veren mantarların olduğu yerde bozulmamış hammaddelerden bunların uzaklaştırması için yapılan fiziksel temizleme ve ayırma yöntemleri aflatoksin seviyelerini % 40-80 oranında azaltabilmelidir (Park 2002). Kaya ve ark (2000) aflatoksinlerden ileri gelen zehirlenmelerde vitamin A, C (Nyandieka ve ark 1993), E (Nyandieka ve ark 1993, Harvey ve ark 1994) ve D'nin, selenyum, bakır, kolin ve metiyonin gibi bazı mineraller ile kükürtlü aminoasitleri içeren proteinlerin koruyucu etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Biyolojik olmayan materyaller, örneğin topaklanmayı önleyici bazı ajanlar da aflatoksinlere bağlanarak toksinin etkilerini önlemektedir (Park 2002). Antioksidatif özelliklere sahip bir bileşik olan kurkumin'in aflatoksin kaynaklı hemolizler ile karaciğer ve böbrekteki lipid peroksidasyonunda iyileştirici bir özelliğe sahip olduğu bildirilmektedir (Mathuria ve Verma 2007). Meki ve ark (2001) melatonin uygulamasının aflatoksikoz olaylarında tedavi amaçlı kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Aflatoksikozu önlemede bir başka yaklaşım ise inert ve besleyici özelliği olmayan, sindirilemeyen bağlayıcıların rasyona ilavesidir. Bu maddeler gastro-intestinal kanaldan emilmemekte, aflatoksinleri bağlamakta ve onların gastrointestinal kanaldan emilimini azaltmaktadırlar (Oğuz 2011). 1990'lı yılların başında çiftlik hayvanlarında aflatoksinin zararlı etkilerini minimuma indirmek ve kontamine olmuş besinlerden aflatoksini uzaklaştırmak için toksini tutma esaslı çalışmalar yapılmıştır (Huwig ve ark 2001, Peraica ve ark 2002). Günümüzde en sık başvurulan bağlayıcılar arasında bentonit (Keçeci ve ark 1998), PVPP (Kıran ve ark 1998), silikatlı bileşikler (Kubena ve ark 1990, 1993, 1998), klinoptilolit (Oğuz ve Kurtoğlu 2000, Ortatatlı ve Oğuz 2001, Oğuz ve ark 2003) sentetik zeolit (Keçeci ve ark 1998) kullanımı gelmektedir. Fiziksel ve kimyasal metotlarla aflatoksinlerin ayrılması veya yıkımlanması işlemlerinin ise ekonomik olmaması veya ürünün besin değerinde azalmaya sebep olması gibi riskleri bulunmaktadır (Çelik 2001).

Son yıllarda araştırmacılar aflatoksin için etkili bir biyolojik yıkımlamaya doğru yönelmişlerdir (Murthy ve ark 2002, Aravind ve ark 2003, Girish ve Devegowda 2006, Dönmez ve Keskin 2008, Kamalzadeh ve ark 2009, Yıldırım ve ark 2011). Detoksifiye edilmiş gıda ve yemlerin lezzetinde ve besleyici değerinde önemli kayıplar oluşturmadan ve zararlı kimyasallar kullanmadan aflatoksinin uzaklaştırılması amacıyla uygun şartlar altında verilen biyolojik materyallerin dekontaminasyon için en iyi yaklaşım olacağı bildirilmektedir (Bata ve Lasztity 1999, Basmacıoğlu ve ark 2005). 1990'lı yılların başlarında destekleyici bir performans artırıcı olarak kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* (SCE)'nin aflatoksine maruz kalan broylerlerde immun cevapta ve ağırlık kazancında yararlı etkiler gösterdiği bulunmuştur (Stanley ve ark 1993). SCE'nin yararlı etkilerini sağlayan hücre duvarındaki mannan, ekstrakte edilip glukan ile esterleştirilmektedir. Esterleştirilmiş glukomannan (EG) aflatoksine % 80-97 gibi oldukça yüksek bir oranda bağlanma özelliği göstererek (Diaz ve ark 2002, Basmacıoğlu ve ark 2005, Karaman ve ark 2005, Ataman ve ark 2009) çiftlik hayvanlarında aflatoksinin detoksifikasyonunda öncelik kazanmıştır. EG'nin kanatlılarda performans, biyokimyasal hematoloji ve immun cevap üzerine aflatoksinin zararlı etkilerini kısmen ve/veya tamamen ortadan kaldırdığı bildirilmiştir (Raju ve Devegowda 2002, Basmacıoğlu ve ark 2005, Kamalzadeh ve ark 2009, Mogadam ve Azizpour 2011, Yıldırım ve ark 2011). Karaman ve ark (2005) glukomannanın aflatoksikoz sonucu karaciğer hücrelerinde ve böbreğin tubuler epitelinde yol açtığı patolojik değişikliklerin şiddetini ve etkilenen organ sayısını azalttığını bildirmişlerdir.

Maya hücrelerinin antitoksik etki mekanizmaları halen tam olarak açıklanamamıştır (Baptista ve ark 2008). Bazı araştırmacılara göre maya hücreleri toksik molekülleri ayırıcı bir yeteneğe sahiptir (Stanley ve ark 1993, Parlat ve ark 2001, Raju ve Devegowda 2002). Yiannikouris ve ark (2003) ise; maya hücrelerinin toksik molekülleri kendi hücre duvarına bağlayarak mikotoksinin etkilerini azaltma ve sonuçta organizmanın kullanımını sınırlandırmada etkili olduğunu bildirmişlerdir. Maya hücrelerinin aflatoksinin zararlı etkilerini azaltıcı enzimler, vitaminler ya da identifiye edilmemiş büyüme faktörleri salgıladığını söyleyen araştırmacılar da bulunmaktadır (Crumplen ve ark 1989, Krause ve ark 1989). Baptista ve ark (2001) aktif maya hücrelerinin enzimatik bir kompleks yoluyla aflatoksinleri dekontamine ettiğini bildirmişlerdir.

1.7. Aflatoksinlerin Karaciğer ve Böbrek Üzerine Etkileri

Aflatoksin, hepatosit çekirdeklerinde bulunan RNA polimeraz aktivitesinde hızlı bir inhibisyona yol açan güçlü bir hepatotoksindir (Butler ve Neal 1973). Gelişme hızında azalma, yem tüketimi ve yemden yararlanmada azalma, reprodüktif faaliyetlerde azalma, bağışıklık sisteminde zayıflama, anemi, asites, hafif sarılık, gebe hayvanlarda abort, laktasyondaki hayvanlarda süt veriminde azalma, karaciğer hasarı, kanser, aflatoksinlere bağlı olarak ortaya çıkan kronik belirtilerdir (Ataman ve ark 2009).

AFB_1 toksikasyonlarının hayati organlarda meydana getirdiği pato-anatomik değişikliklere paralel olarak enzim seviyelerinde de değişimler söz konusudur (Clarke ve ark 1982, Abdelhamid ve ark 1990, Sahoo ve ark 1993, Lakkawar ve ark 2004). Lakkawar ve ark (2004) AFB_1 ile beslenen tavşanların özellikle karaciğer ve böbreklerde fokal hemorajiler ve çeşitli derecelerde konjesyonlar tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Hayvanların aflatoksinlerle kontamine olmuş yemler tüketmeleri, karaciğerlerinde çeşitli histopatolojik ve biyokimyasal değişikliklere yol açmaktadır (Newberne ve Butler 1969, Cullen ve Newberne 1993, Parhizkar ve ark 2002). Hastalıklar ile aflatoksin ilişkisinin en önemli kanıtı serumda spesifik karaciğer enzimlerinin artmasıyla birlikte akut ve kronik karaciğer hastalıklarının olmasıdır (Robens ve Richard 1992). Temel hedef noktası periportal hepatik parenşimal hücrelerdir (Butler and Neal 1973). Aflatoksin hepatositlerde belirgin bir büyümeye, polimorfik şekillere ve hücre yıkımlanmasına sebep olmaktadır (Raval ve Verma 1997, Verma 2004). Çelik (2001) aflatoksinlerin yüksek dozlarının şiddetli hepatoselüler nekroza, uzun süreli düşük dozlarının ise hayvanda büyümenin yavaşlamasına ve karaciğer büyümesine yol açtığını bildirmektedir. Aflatoksinler tarafından karaciğerde oluşturulan histopatolojik etkiler safra kanalı hiperplazisi, çekirdek büyümesi, nükleus inkluzyonları ve hepatositlerde büyüme şeklinde olmaktadır (Hastings ve Llewellyn 1987). Ayrıca hemorajik nekrozlar ve yağ asidi birikimi gibi primer lezyonlar da görülmektedir. Domuz, kobay ve köpeklerde bu lezyonlara daha çok sentrilobuler alanlarda rastlanırken; ördeklerde ve ratlarda periportal alan etkilenme bölgesidir (Coulombe 1993, Do ve Choi 2007).

Aflatoksin böbreklerde histopatolojik olarak tubuler epitelin hiyalinizasyonu ve dejenerasyonuna, paranşimde yaygın vasküler konjesyon ile bazen fokal hemoraji

alanlarına neden olmaktadır (Lakkawar ve ark 2004). Ayrıca aflatoksikoz sonucu endojen paratiroid hormon sentezi ve bu hormona karşı böbreğin duyarlılığı azalmaktadır. Aflatoksinin böbrek fonksiyonları üzerinde uzun süreli değişikliklere yol açtığı bildirilmektedir (Glahn ve ark 1991).

1.8. Çekirdekçik Organizatör Bölgeleri ve AgNOR Boyama

Hücre çekirdeği genetik materyali (DNA) bulundurması nedeni ile hücredeki tüm faaliyetleri yöneten bir merkezdir. Çekirdek zarı, çekirdek içindeki kromatin, çekirdekçik ve bunların arasını dolduran çekirdek sıvısını çevreleyerek sitoplazmadan ayırır (Sağlam ve ark 1997). Çekirdekçikler ribozomal alt birimlerin sentezlendiği çekirdek bölgeleridir. Ribozamal RNA (rRNA)'ları sentezleyen genler (rDNA) kromozomlarda taşınırlar. Bu kromozomların (DNA) rRNA sentezleyen genlerini içeren ve çekirdekçiği oluşturan bölgeleri nukleolus organizer regions (NOR) olarak adlandırılır (Akar ve Sur 2010).

Gümüşleme metoduyla NOR'ların boyanması (Silver Staining Nucleolus Organiser Regions, AgNORs) sırasında aktif olarak transkripsiyon yapan NOR'lar ve bu nedenle rDNA bölgeleri de boyanır. Bu sebeple aktif olarak çoğalan hücrelerdeki NOR'lardaki genlerin ekspresyonunda önemli bir artış olmaktadır. Gerçekte gümüşle boyanan yapılar bu bölgelerdeki asidik proteinlerdir (Lee ve ark 1999). Karademir ve ark (1996) AgNOR boyama metodunun tümörlerin malignitelerinin belirlenmesinde ve derecelendirilmesinde kullanılabileceği gibi hastalığın prognozu ve tedavi süreçlerinin belirlenmesinde de faydalı olabileceğini bildirmektedirler. AgNOR sayıları, büyüklükleri ve AgNOR alanı/çekirdek alanı da türlerde ve aynı türün farklı dokularında değişiklik gösterir. Bu parametrelerin, hücrelerin çoğalma aktiviteleri ile ilgili olduğu ileri sürülmektedir (Zaczek ve ark 1992). Bukhari ve ark (2007) özellikle merkezi sinir sistemi tümörlerinde AgNOR'un boyut ve dağılımının sayıdan daha önemli bir kriter olduğunu bildirirlerken, Chappard ve ark (1998) insanlarda viral kaynaklı bir kemik hastalığı olan Paget hastalığında osteoklastların çekirdeklerinde yer alan ortalama AgNOR sayısının 2,12'den 6,8'e kadar artabildiğini, ancak bu artışın osteoklastlardaki proliferatif aktiviteyi değil ribozom sentezindeki artışı gösterdiğini ileri sürmektedirler. Genetik çalışmalarda kullanılan materyaller genler ve kromozomlardır. Günümüzde bu tip çalışmalar sayesinde kromozomlardaki yapısal ve sayısal bozuklukların tespiti yapılabilmektedir.

”Koçlarda aflatoksinin semen kalitesi, testis histolojisi ile semen hyaluronidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri ve glukomannan (EG)’ın koruyucu etkinliği” başlıklı TÜBİTAK projesinden (107 O 866) çıkarılan bu doktora tez projesiyle, yemle tüketilen total aflatoksinin koçlarda karaciğer ve böbrek üzerine olan zararlı etkilerinin ortaya konulması ve aflatoksinle birlikte verilen glukomannanın bu organlarda aflatoksine bağlı olarak oluşacak olumsuz etkilerin azaltılması/engellenmesi yönünden olası etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda aflatoksinlerin karaciğer ve böbrek üzerindeki etkileri daha iyi ortaya konularak, yetiştiricilikteki ekonomik kayıpların önlenmesine veya azaltılmasına bir nebze de olsa katkıda bulunabilmek hedeflenmektedir. Ayrıca ileride yapılacak benzeri çalışmalara temel veriler sağlaması da bu çalışmanın hedefleri arasındadır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Çalışma başlamadan önce Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu (SÜVFEK)'ndan 02.09.2008 tarih ve 2008/061 sayılı kararı ile onay alındı. Hayvanlar için uygun padoklar hazırlandıktan sonra yaklaşık 1 yaşında (12-14 aylık) 32 adet Merinos ırkı koç satın alındı. Hayvanlar alınmadan önce genel sağlık yönünden muayene edildi. Koçlara antiparaziter olarak ivermektin enjeksiyonu (Avromec-F, 1ml/50 kg) ve oksifendazol (Okzan-F, 1 tablet/50 kg) uygulaması yapıldı. Ayrıca enterotoksemi (Pluritoxiven-8, 1 ml) ve çiçek aşıları uygulandı. Koçların her biri 2x2 metre ölçülerindeki padoklarda kulak numarası takılarak bireysel olarak bakıma alındı. Çevreye ve yeni yemleme uygulamasına adaptasyon için 15 günlük alıştırma programı uygulandı. Hayvanların grup adları ve kulak numaraları padoklara ayrı ayrı yazıldı.

2.2. Hayvanların Beslenmesi

Koçlar, canlı ağırlıkları belirlenerek 4 eşit gruba ayrıldı ve çalışma öncesi homojen dağılım sağlandı. Deneysel besleme çalışmasına 19 Nisan 2008 tarihinde başlandı ve 92 gün devam edildi. Birinci gruptaki koçlara (Kontrol, K grubu) sadece ticari yem; ikinci gruptaki koçlara (Aflatoksin, A grubu) ticari yemle birlikte günlük 250 µg aflatoksin; üçüncü gruptakilere (Aflatoksin+glukomannan, AG grubu) ticari yem + 250 µg /gün aflatoksin + 2 gr/gün glukomannan karışımı; dördüncü gruptakilere (Glukomannan, G grubu) ticari yem + 2 gr/gün glukomannan karışımı verildi. Su ve yonca *ad libitum* olarak sağlandı. Beslemeler sabah 06.00-07.30 ve akşam 18.00-19.30 saatleri arasında yapıldı. Aflatoksin ve glukomannan, sabah yemlemesinden hemen önce bu maddeler 250 gr yeme karıştırıldıktan sonra tek tek hayvanlara verildi ve bu yemlerin tamamı tüketildikten sonra verilmesi gereken yem tüm gruplardaki hayvanlara yine ayrı ayrı verildi.

Koçların beslenmesinde kullanılan ticari yemin içeriği aşağıdaki gibidir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Koçların beslenmesinde kullanılan ticari yemin içeriği

Kuru Madde	% 88	Na	% 0,1-0,4
Ham Protein	% 12	NaCl	% 1,0
Ham Selüloz	% 12	Metabolik Enerji	2750 kcal/kg
Ham Kül	% 9	Vit A	7000 IU-kg
HCL'de çözünmeyen Kül	% 1,0	Vit D3	700 IU-kg
Ca	% 0,6-1,6	Vit E	25 mg/kg
P	% 0,4		

2.3. Aflatoksin Üretimi ve Tayini

Çalışmada kullanılan aflatoksin; Shotwell ve ark (1966)'nın bildirdikleri metodu esas alan Demet ve ark (1995)'nın bildirdikleri yönteme göre *Aspergillus parasiticus NRLL 2999 suşu* (U.S. Department of Agricultural Research Service, Peoria, Ilinois, USA) kullanılarak pirincin fermente edilmesi ile üretilmiştir. Fermente pirinç otoklavda sterilize edildikten sonra, 70°C'de kurutularak, öğütüldü. Fermente pirinçteki aflatoksinin ekstraksiyonu ve temizlenmesi Vicam (1999)'ın bildirdiği metoda göre immunoaffinite kolon (Afla Test®; Vicam) kullanılarak ve miktar tayini Stroka ve ark (2000) tarafından bildirilen yönteme göre yüksek performans likit kromatografi (HPLC)'de gerçekleştirildi. Fermente pirinçteki aflatoksinin miktarı ve çeşitleri daha önce 100 µl uygulanan değişik oranlarda aflatoksin standartlarından (AFB_1, AFB_2, AFG_1 ve AFG_2) elde edilen piklerin alanlarının ve alıkonma sürelerinin karşılaştırılması ile tespit edildi. Fermente pirinçteki toplam aflatoksin miktarı 73,96 ppm olarak belirlendi ve bunun % 84,15 AFB_1, % 6,29 AFB_2, % 9,13 AFG_1 ve % 4,25 AFG_2'den oluştuğu tespit edildi (metodun geriye kazanç oranı, % 97,4; duyarlılığı, 0,4 ppb).

2.4. Doku Örneklerinin Alınması ve İşlenmesi

Çalışma sonunda (92. gün) tüm hayvanlar kesildikten sonra karaciğer ve böbrekleri çıkarılarak doku örnekleri alındı. Alınan doku örnekleri % 10'luk tamponlu nötral formaldehid ile tespit edildikten sonra rutin takip işlemine tabii tutularak parafin blokları yapıldı. Bloklardan 6 mikrometre (µm) kalınlıkta alınan kesitlere histolojik yapının ve hücrelerdeki değişikliklerin belirlenmesi amacıyla Masson'un trikrom boyaması (Culling ve ark 1985) ve AgNOR boyama (Platon ve ark 1986, Korek ve ark 1991) teknikleri uygulandı. Ayrıca karaciğer epitel hücrelerindeki yağlanma oranını belirlemek amacıyla karaciğerden alınan örnekler formol-kalsiyum tespit solüsyonunda +4ºC'de ve karanlıkta 16 saat süreyle tespit

edildi. Kriyostatta 12 μm kalınlığında alınan kesitler Sudan Black B boyama metodu ile boyandı (Burdon 1946).

2.5. AgNOR Solüsyonunun Hazırlanması ve Kesitlerin Boyanması

AgNOR'ların belirlenmesi için gümüşleme boyama yöntemi (Platon ve ark 1986, Korek ve ark 1991) uygulandı. Bu amaçla 2 g jelatin % 1'lik formik asit içinde çözdürüldü. Bu solüsyondan 1 hacim alınarak 2 hacim % 50'lik gümüş nitrat solüsyonu (50 g gümüş nitrat, Merck, 100 ml distile suda eritildi) ile karıştırıldı. Kesitler taze hazırlanan ve süzülen çalışma solüsyonu içerisinde 37 ^{o}C'de ve karanlık ortamda 20-30 dakika kontrollü olarak bekletildi. Bu sürenin sonunda kesitler 3 kez distile suda çalkalanarak bilinen rutin işlemlerden sonra Entellan (Merck) ile kapatıldı.

2.6. Preparatların Görüntü Analiz Sistemi ile İncelenmesi

Hazırlanan preparatlar DFC-320 model kamera donanımlı Leica DM-2500 model ışık mikroskobu ile incelendikten sonra gerekli bölgelerin dijital görüntüleri kaydedildi. Çekirdek çaplarının yanı sıra AgNOR parametrelerinin de elde edilebilmesi için her hayvandan 25'er adet karaciğer (1, 2 ve 3. bölgeler) ve böbrek (glomerulus, tubulus proksimalis, tubulus distalis ve tubulus kolektivus) bölgelerinden hücreler değerlendirilmeye alındı. Bu hücrelerin çekirdeklerinin alanları ve içerdikleri AgNOR'ların alan ve sayılarının tespiti IM-50 (Leica, Switzerland) görüntü analiz programı kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen verilerden AgNOR alanının çekirdek alanına oranları (%) aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\text{AgNOR alanının çekirdek alanına oranı (\%)} = \frac{\text{AgNOR alanı}}{\text{Çekirdek alanı}} \text{ x100}$$

Karaciğer epitel hücreleri içindeki yağların sitoplazmada kapladıkları alanı tespit etmek amacıyla her bir hayvandan alınan 5 seri kesit Sudan Black B yöntemiyle boyandı (Burdon 1946). Hazırlanan preparatların rastgele seçilmiş 5 farklı bölgesinden Leica DFC-320 model video kamera donanımlı Leica DM model mikroskop yardımıyla x40 objektif büyütmesi ile Gaal ve ark (1983)'nın uyguladığı

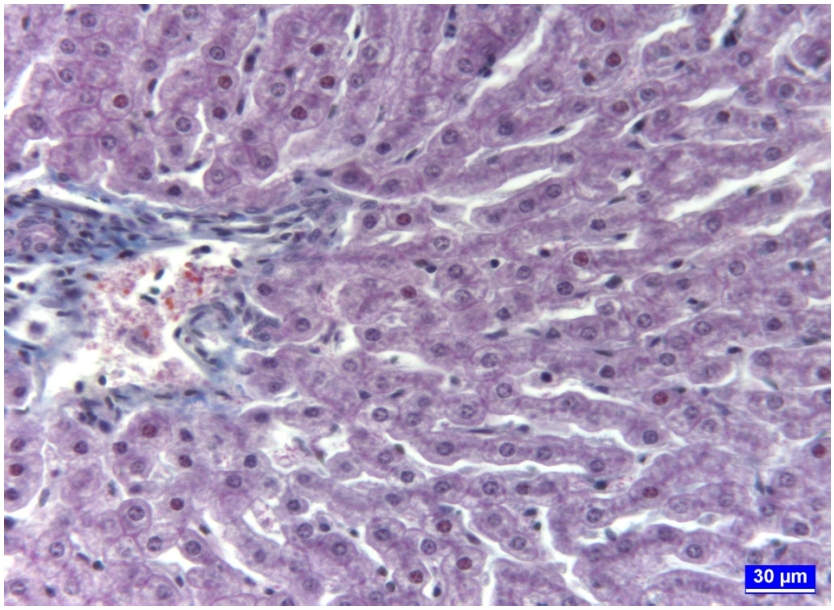
yöntemle yağlanma oranı (%) belirlendi. Yağlanma oranı 0-10 $\mu m^2/100\ \mu m^2$ arasında olanlar hafif, 10-20 $\mu m^2/100\ \mu m^2$ arasında olanlar orta şiddetli, 20 μm^2 /100 μm^2 ve üzeri olanlar ise şiddetli yağlı karaciğer olarak değerlendirildi (Gaal ve ark 1983, Aslan ve ark 1989).

2.7. İstatistiksel Analizler

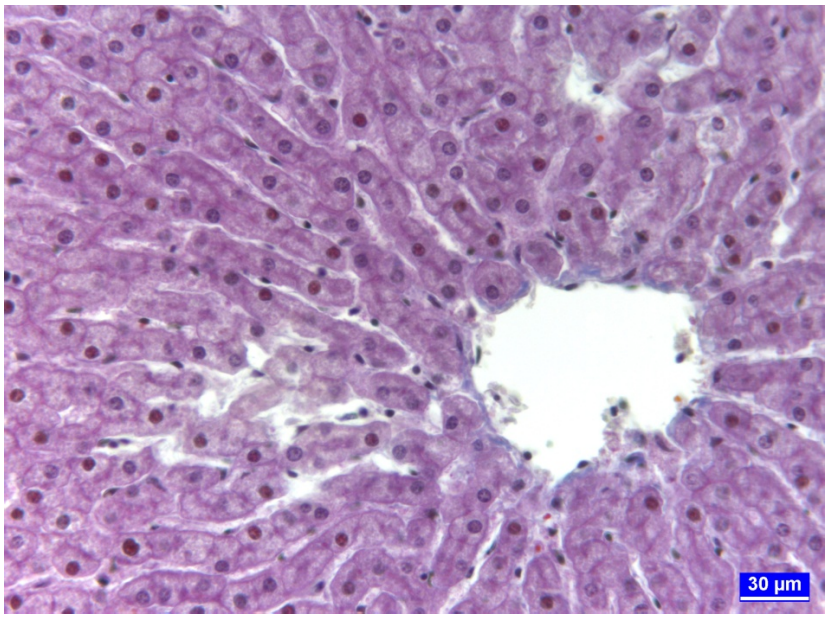
Elde edilen verilerin (çekirdek alanı, AgNOR alanı, AgNOR alanının çekirdek alanına oranı, AgNOR sayısı ve yağlanma oranı) SPSS paket programı (SPSS 2008) ile varyans analizleri yapıldı. Gruplar arası farkı belirlemek amacıyla DUNCAN testi uygulandı.

3. BULGULAR

Mikroskobik incelemeler sonucunda, kontrol grubuna ait karaciğerin üçlü (triple) boyamasında dokunun normal yapıda olduğu gözlendi (Şekil 1 ve 2).



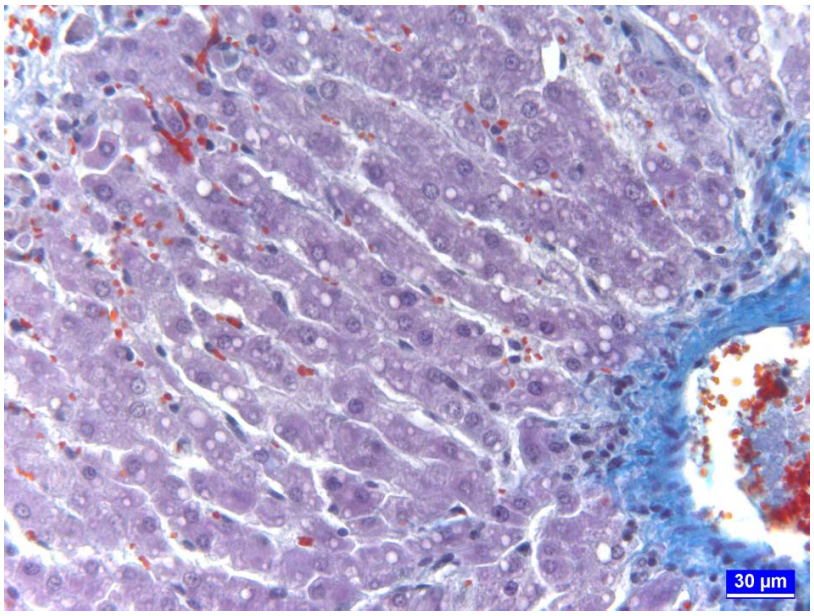
Şekil 1. Kontrol grubuna ait karaciğerin üçlü (triple) boyamasında dokunun normal histolojik görünümü, Portal alana yakın 1. bölge.



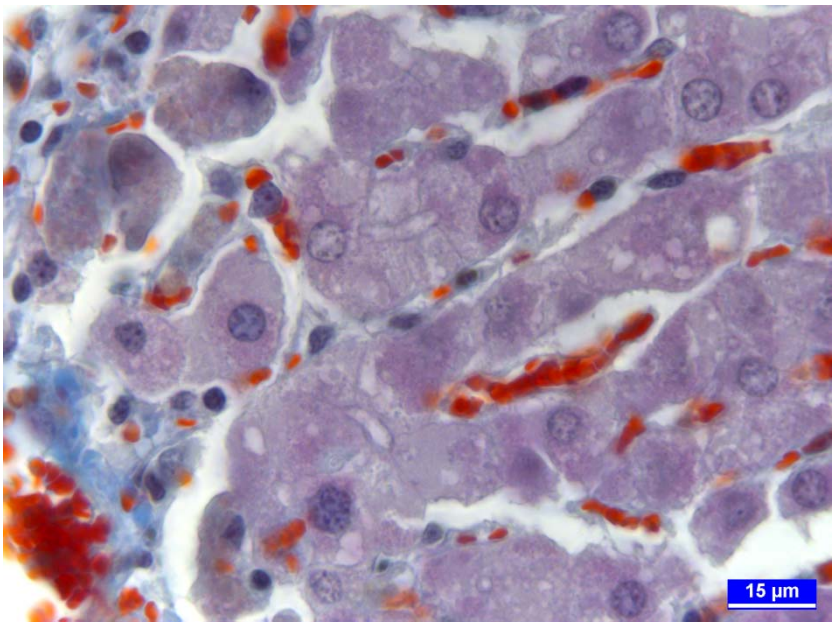
Şekil 2. Kontrol grubuna ait karaciğerin üçlü (triple) boyamasında dokunun normal histolojik görünümü, sentral venaya yakın 3. bölge.

Yemlerine aflatoksin ilave edilen grupta özellikle vena sentralisler çevresinde daha belirgin olmak üzere tüm bölgelerdeki hepatositlerde küçük ve iri damlalı vakuoler dejenerasyonlar (yağlanma) (Şekil 3, 6, 7) ile belirgin hidropik

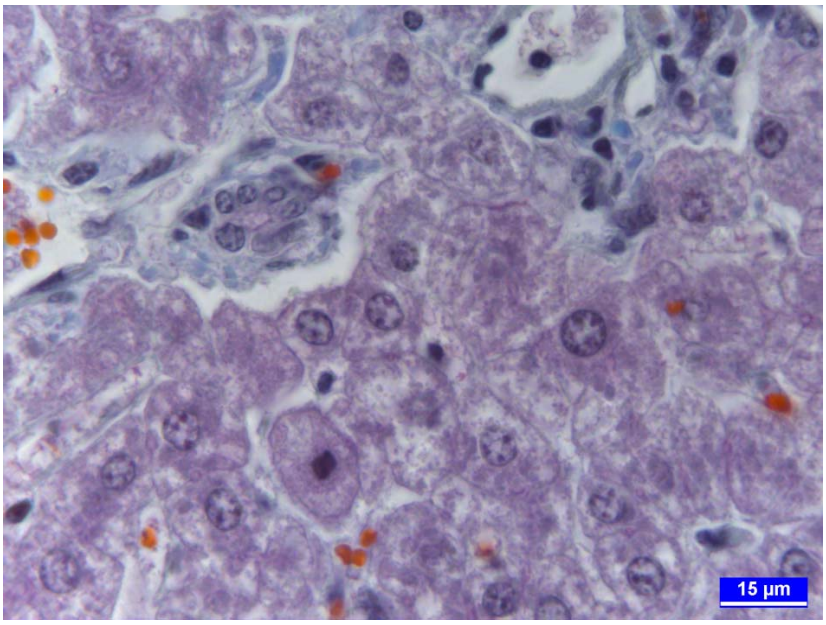
dejenerasyonlar (Şekil 4, 6, 7) gözlendi. Hepatositlerde büyümeye bağlı olarak sinüzoidlerde belirgin daralmalar dikkati çekti. Sinüzoidlerin görülebildiği bölümlerde ise lokal kan göllenmeleri (lokal hiperemi) bulunmaktaydı. Lopçuklarda az sayıda piknotik çekirdekli hepatosite rastlandı (Şekil 5). Ayrıca vena sentralisler çevresinde zaman zaman lokal kanama alanları ile seroid pigmenti içeren tek ve gruplar halinde makrofajlar gözlendi (Şekil 6, 7).



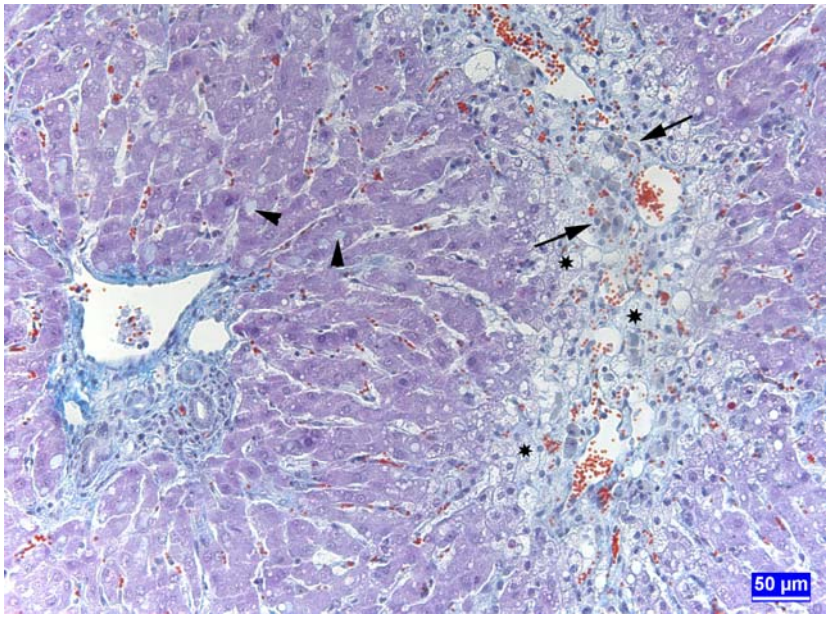
Şekil 3. Aflatoksin ilave edilen gruptaki hepatositlerde küçük ve iri damlalı vakuoler dejenerasyonlar (yağlanma), 1.ve 2. bölge, üçlü boyama.



Şekil 4. Aflatoksin grubundaki hepatositlerde belirgin hidropik dejenerasyonlar, 1. bölge, üçlü boyama.

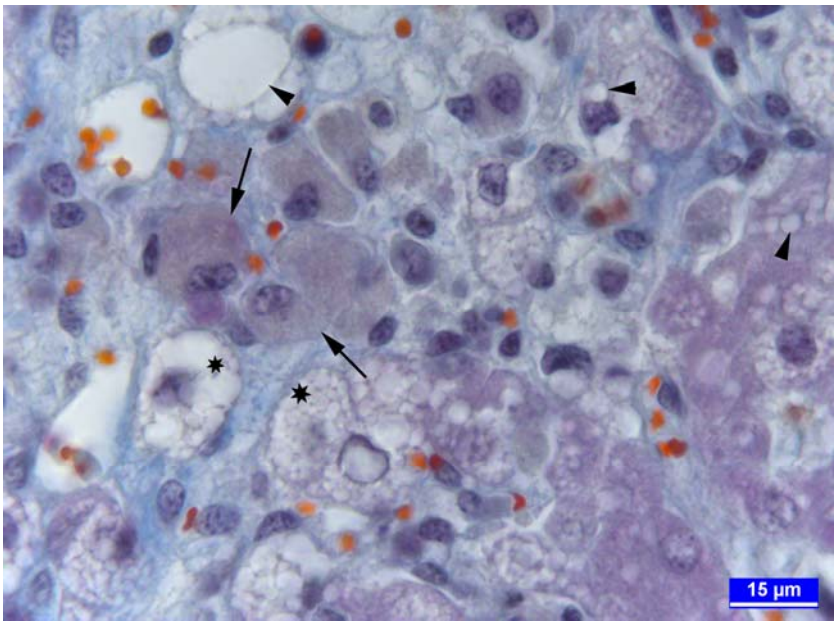


Şekil 5. Aflatoksin grubunda hepatositlerde belirgin hidropik dejenerasyonlar ile bazılarının çekirdeğinde piknoz (1. bölge), üçlü boyama.

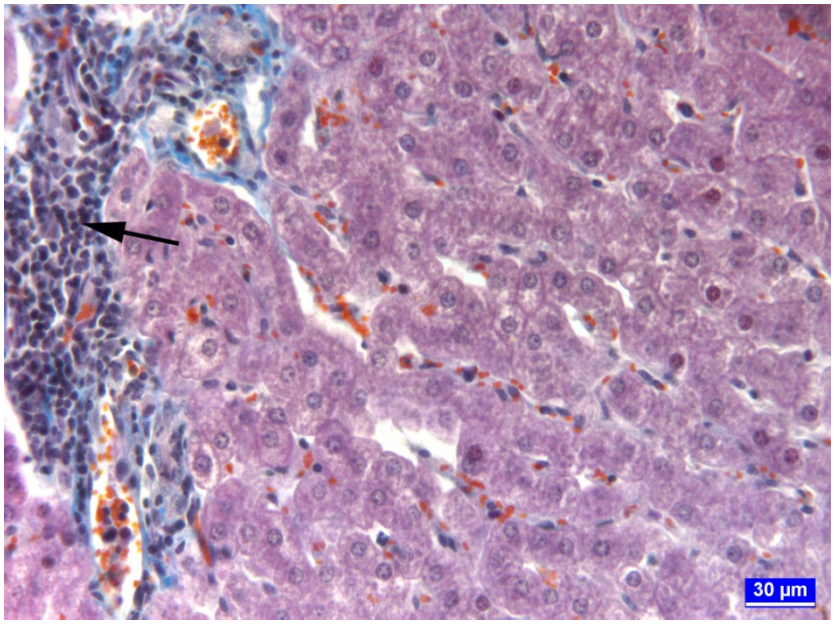


Şekil 6. Aflatoksin grubunda karaciğerdeki şiddetli vakuoler (ok başları) ve hidropik dejenerasyonlar (∗) ile seroid pigmenti (oklar) içeren makrofajlar. 3. bölge, üçlü boyama.

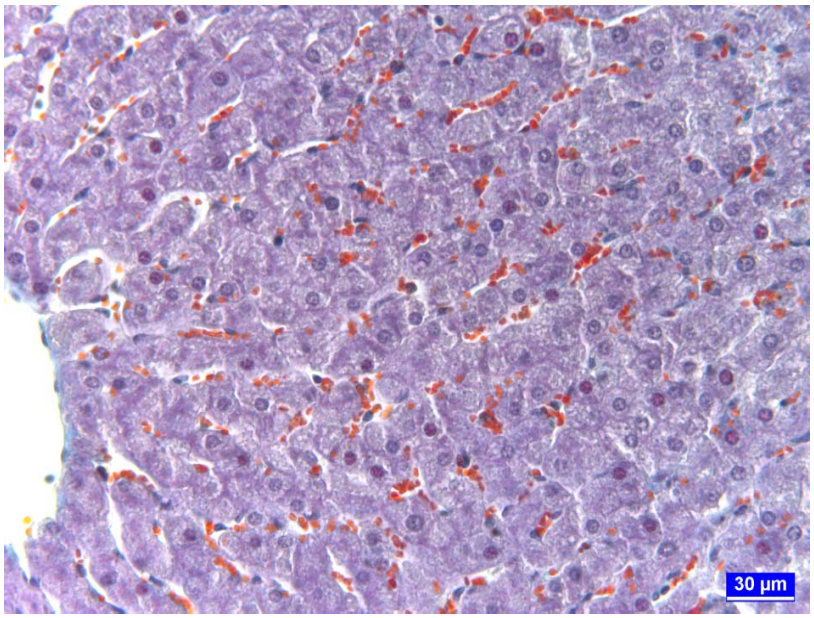
Aflatoksin+glukomannan grubundaki hayvanlarda ise portal alanda mononükleer hücre infiltrasyonu görüldü (Şekil 8). Hepatositlerde büyümeye bağlı olarak sinüzoidlerde daralma ve yer yer kan göllenmeleri gözlendi (Şekil 9). Bu grupta hepatositlerde vakuoler dejenerasyonun oldukça az olduğu dikkati çekti.



Şekil 7. Aflatoksin grubunda seroid pigmenti içeren makrofajlar (oklar), hepatositlerdeki şiddetli vakuoler (ok başları) ve hidropik (∗) dejenerasyonlar. 3. bölge, üçlü boyama.

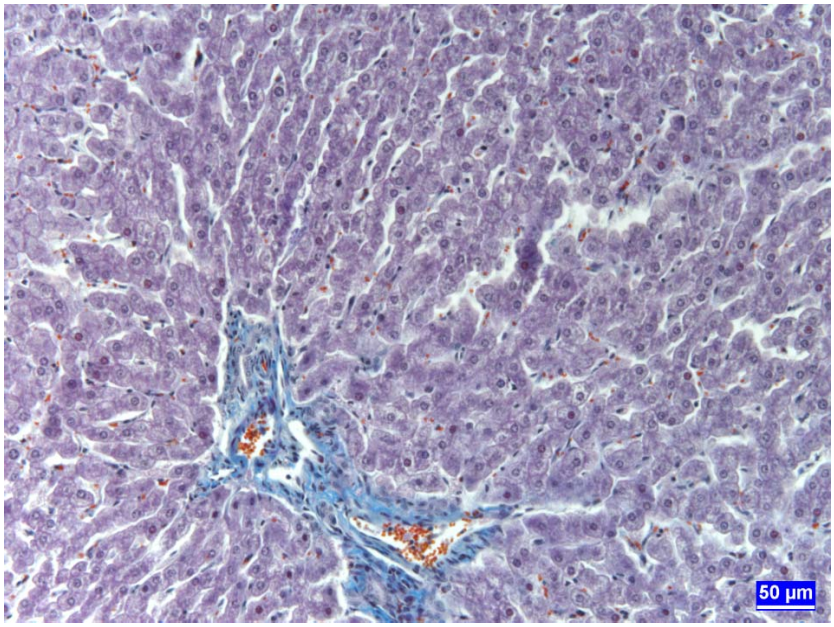


Şekil 8. Aflatoksin+glukomannan grubunda karaciğerin portal alanlarında görülen mononükleer hücre infiltrasyonları (ok), üçlü boyama.



Şekil 9. Aflatoksin+glukomannan grubuna ait karaciğer sinüzoidlerindeki kan göllenmeleri (hiperemi), üçlü boyama.

Glukomannan ilave edilen grupta karaciğerin histolojik yapısının normal olduğu; kontrol grubuna benzer yapı gösterdiği gözlendi (Şekil 10).



Şekil 10: Glukomannan grubunda karaciğerin kontrol grubuna benzer normal histolojik görünümü, üçlü boyama.

Karaciğer örneklerindeki hepatositlerin çekirdek alanları, karaciğerin üç ayrı bölgesine göre çizelge halinde (Çizelge 2) verilmiştir. Aflatoksin grubundaki koçların karaciğerlerinde, çekirdek alanları yönünden yapılan değerlendirmede her üç bölgede de kontrol grubuna göre önemli ($P<0,05$) bir düşüş gözlenmiştir.

Glukomannan ve aflatoksin+glukomannan gruplarında 1. bölgedeki hepatositlerin çekirdek alanları kontrol grubundan düşük olmakla birlikte aflatoksin grubundan yüksek bulunmuştur. 2. bölgede glukomannan ilave edilen gruptaki hepatositlerin çekirdek alanları kontrol grubuna benzer iken aflatoksin+glukomannan grubunda aflatoksin grubuna göre yüksek, kontrol grubuna göre ise düşük olarak tespit edildi. Üçüncü bölgede bütün gruplar arasında belirgin farklılıklar olmasına rağmen aflatoksin grubundaki hepatositlerin çekirdek alanları en düşük bulundu.

Çizelge 2. Karaciğer epitel hücrelerinde çekirdek alanı (µm²)±SE

Gruplar (n=8)	1. Bölge	2. Bölge	3. Bölge
K	33,55±0,42^{a}	33,35±0,51^{a}	33,04±0,60^{a}
A	28,74±0,26^{c}	28,60±0,27^{c}	27,47±0,28^{c}
G	32,62±0,38^{ab}	32,42±0,26^{a}	32,53±0,32^{ab}
AG	29,82±0,31^{b}	30,77±0,39^{b}	28,96±0,42^{b}

K: Kontrol, A: Aflatoksin, G: Glukomannan, AG: Aflatoksin+glukomannan
^{a,b,c}: Aynı sütundaki farklı harfler arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

Karaciğer epitel hücrelerindeki AgNOR alanları Çizelge 3'te verilmiştir. Çizelgeye göre aflatoksin ilave edilen grubun AgNOR alanları diğer gruplara göre belirgin oranda düşük bulunmuştur. Aflatoksin ve aflatoksin+glukomannan gruplarının 1. ve 2. bölgesindeki AgNOR alanları birbirine benzerlik gösterirken, kontrol ve glukomannan gruplarından düşük olduğu gözlendi. Kontrol grubundaki AgNOR alanının glukomannan grubuna göre her üç bölgede de yüksek olduğu görüldü. Üçüncü bölgede tüm gruplar arasında farklılık bulunmasına rağmen aflatoksin ilave edilen grubun AgNOR alanı en düşük bulundu.

Çizelge 3. Karaciğer epitel hücrelerinde AgNOR alanı (µm²)±SE

Gruplar (n=8)	1. Bölge	2. Bölge	3. Bölge
K	1,34±0,04^{a}	1,38±0,04^{a}	1,24±0,03^{a}
A	0,71±0,02^{c}	0,72±0,02^{c}	0,65±0,02^{d}
G	1,21±0,03^{ab}	1,29±0,03^{b}	1,18±0,04^{b}
AG	0,75±0,02^{c}	0,77±0,02^{c}	0,79±0,02^{c}

K: Kontrol, A: Aflatoksin, G: Glukomannan, AG: Aflatoksin+glukomannan
^{a,b,c,d}: Aynı sütundaki farklı harfler arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

Karaciğer lopçuklarının farklı bölgelerindeki epitel hücrelerinde AgNOR alanının çekirdek alanına oranları Çizelge 4'te verilmiştir. Çalışmada aflatoksin grubunun hepatositlerinin AgNOR alanının, çekirdek alanına oranları; 1. bölgede % 2,60, 2. bölgede % 2,66, 3. bölgede ise % 2,55 olarak belirlenmiştir. Bu değerler çalışılan diğer gruplardan istatistikî olarak farklı ($P<0,05$) bulunmuştur. Aflatoksin+glukomannan grubundan elde edilen veriler ise hem kontrol hem de aflatoksin grubundan istatistikî olarak farklı ($P<0,05$) olmakla birlikte, kontrol grubuna yakın değerler olduğu dikkati çekmiştir.

Çizelge 4. Karaciğer lopçuklarının farklı bölgelerindeki epitel hücrelerinde AgNOR alanının çekirdek alanına oranı (%) ±SE

Gruplar (n=8)	1. Bölge	2. Bölge	3. Bölge
K	$4,06\pm0,21^{a}$	$4,01\pm0,22^{a}$	$4,38\pm0,18^{a}$
A	$2,60\pm0,11^{c}$	$2,66\pm0,09^{c}$	$2,55\pm0,09^{c}$
G	$3,81\pm0,15^{ab}$	$3,79\pm0,14^{ab}$	$3,92\pm0,12^{a}$
AG	$3,57\pm0,09^{b}$	$3,62\pm0,11^{b}$	$3,45\pm0,09^{b}$

K: Kontrol, A: Aflatoksin, G: Glukomannan, AG: Aflatoksin+glukomannan
^{a,b,c}: Aynı sütundaki farklı harfler arasındaki fark önemlidir ($P<0,05$).

Karaciğer lopçuklarının her üç bölgesindeki hepatositlerin AgNOR sayıları açısından yapılan değerlendirmede gruplar arasında önemli farklılıkların olmadığı görüldü ($P>0,05$) (Çizelge 5).

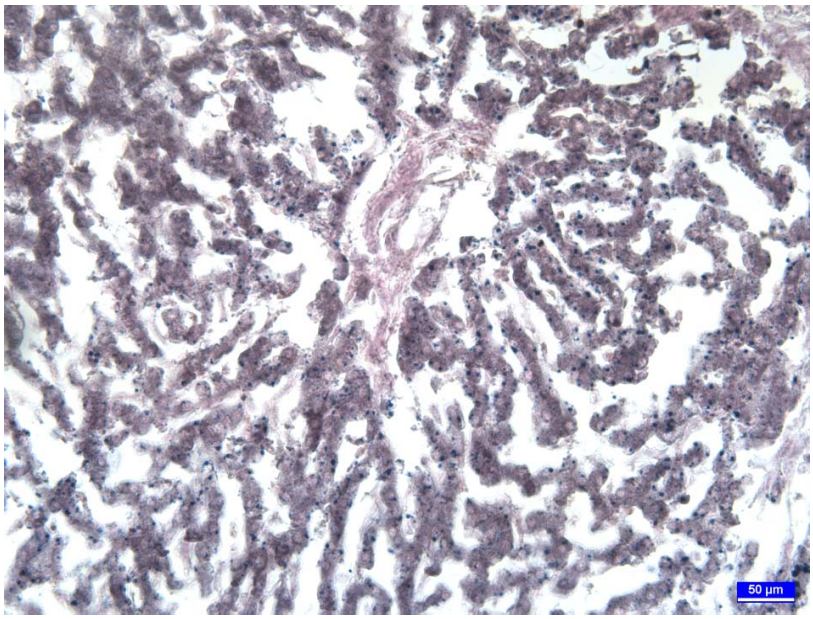
Çizelge 5. Karaciğer lopçuklarının farklı bölgelerindeki epitel hücrelerinde AgNOR sayıları (adet) ±SE

Gruplar (n=8)	1. Bölge	2. Bölge	3. Bölge
K	2,28±0,16	2,39±0,17	2,56±0,17
A	2,48±0,17	2,54±0,16	2,51±0,16
G	2,50±0,15	2,37±0,15	2,29±0,15
AG	2,32±0,17	2,49±0,16	2,18±0,17

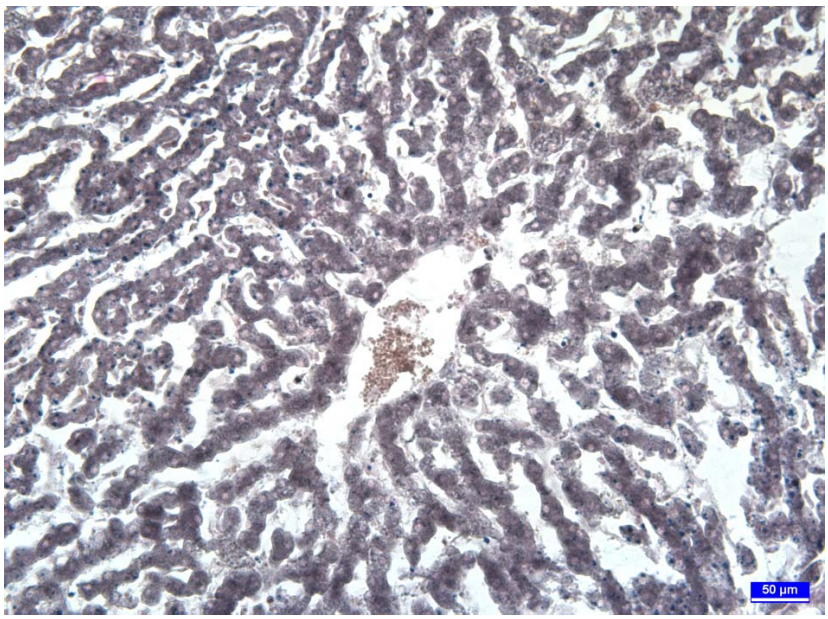
K: Kontrol, A: Aflatoksin, G: Glukomannan, AG: Aflatoksin+glukomannan

Karaciğer epitel hücrelerindeki yağlanmayı belirlemek amacıyla yapılan Sudan Black B boyama sonunda, ortalama yağlanma oranının kontrol grubu (Şekil 11a-b)'nda % 2,6, aflatoksin grubu (Şekil 12)'nda % 35,5, glukomannan grubu (Şekil

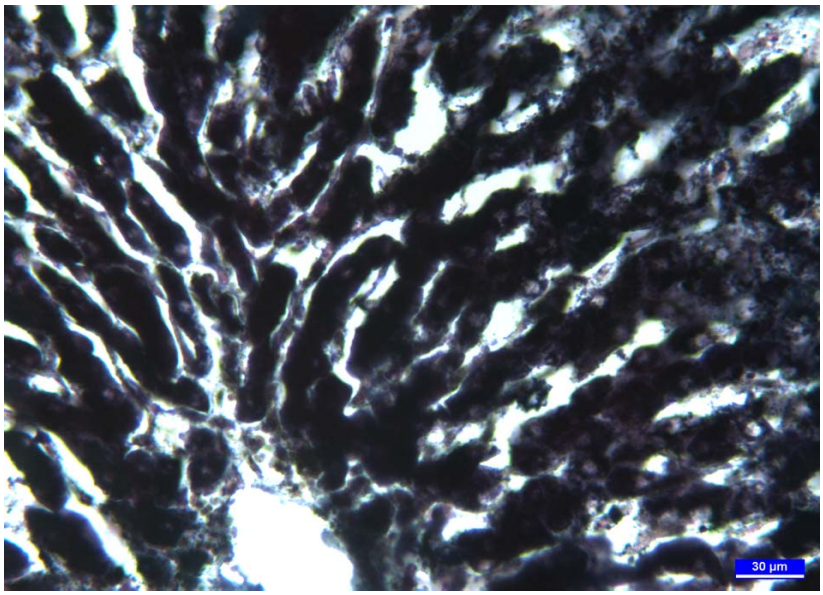
13)'nda % 2,9 ve aflatoksin+glukomannan grubu (Şekil 14)'nda ise % 9,6 olduğu gözlenmiştir (Çizelge 6). Bu veriler, glukomannanın hepatositlerdeki yağlanma ile ilgili olarak kontrol grubundan farklı bir durum oluşturmadığını; aflatoksinin karaciğerde önemli derecede yağlanmaya sebep olduğunu; aflatoksinle birlikte verilen glukomannanın ise hepatositlerdeki yağlanma oranını dikkate değer düzeyde azalttığını göstermiştir.



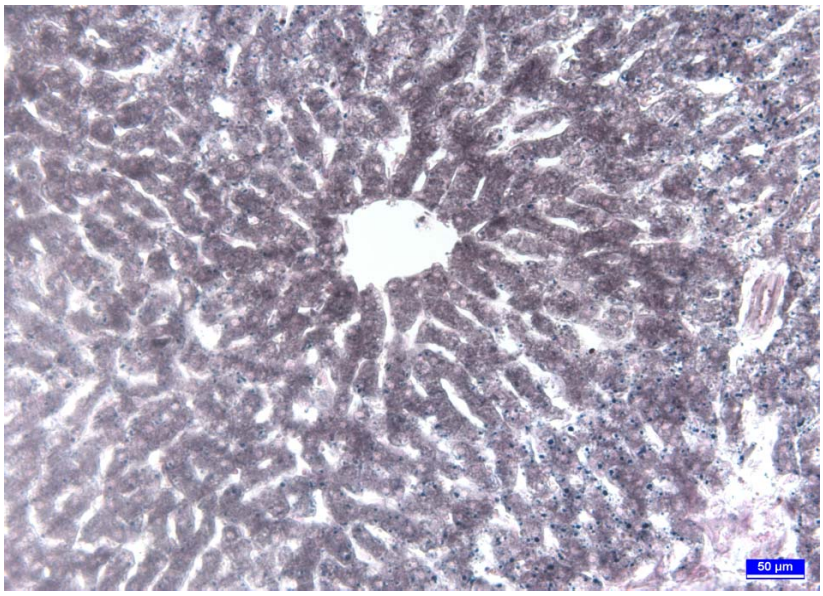
Şekil 11a. Kontrol grubunda karaciğerin portal alanı çevresindeki (1. bölge) hepatositlerde yağ damlacıkları, Sudan Black B boyama.



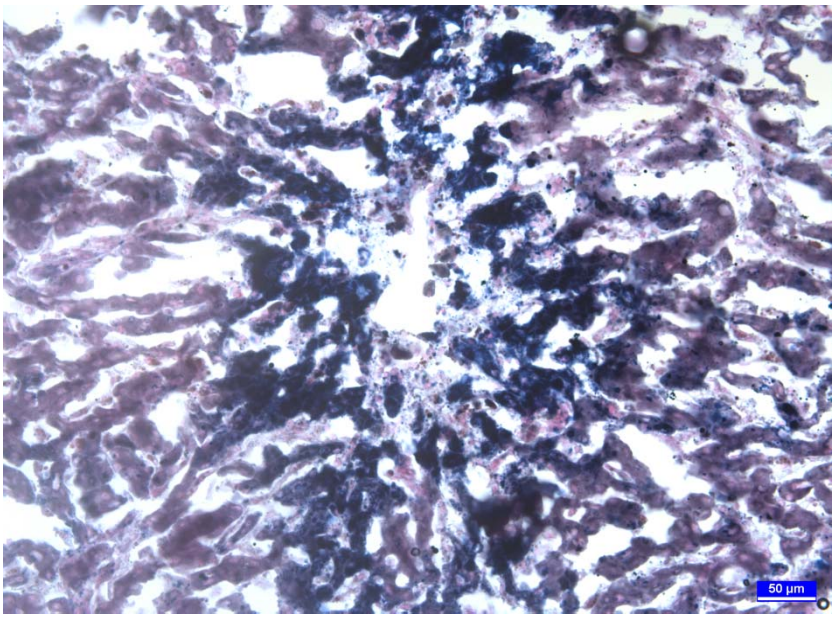
Şekil 11b. Kontrol grubunda karaciğerin vena sentralis alanı çevresindeki (3. bölge) hepatositlerde yağ damlacıkları, Sudan Black B boyama.



Şekil 12. Aflatoksin grubunda karaciğer lopçuğunun 3. bölgesindeki hepatositlerde şiddetli yağlanma, Sudan Black B boyama.



Şekil 13. Glukomannan grubunda hepatositlerdeki yağ damlacıkları, Sudan Black B boyama.



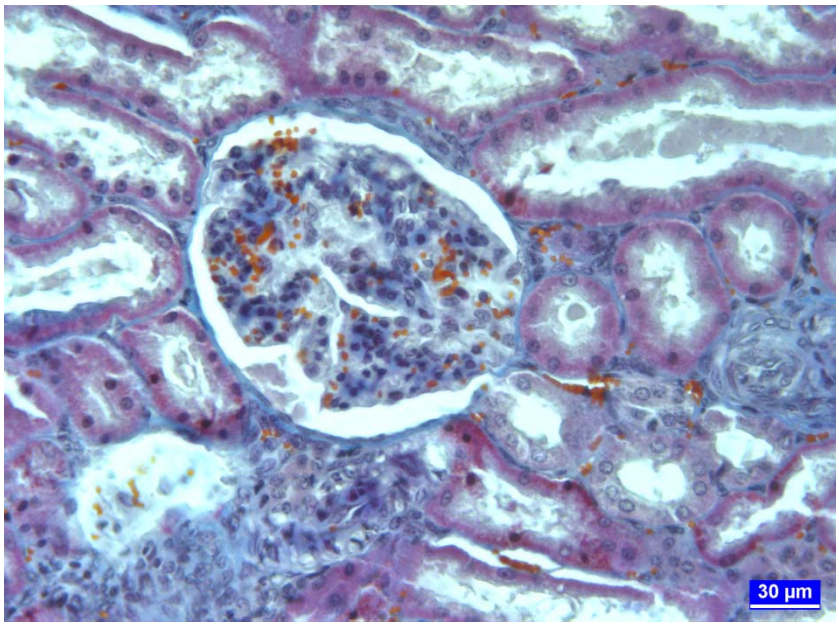
Şekil 14. Aflatoksin+glukomannan grubunda hepatositlerdeki yağ damlacıkları, Sudan Black B boyama.

Çizelge 6. Karaciğer yağlanma oranı (%)

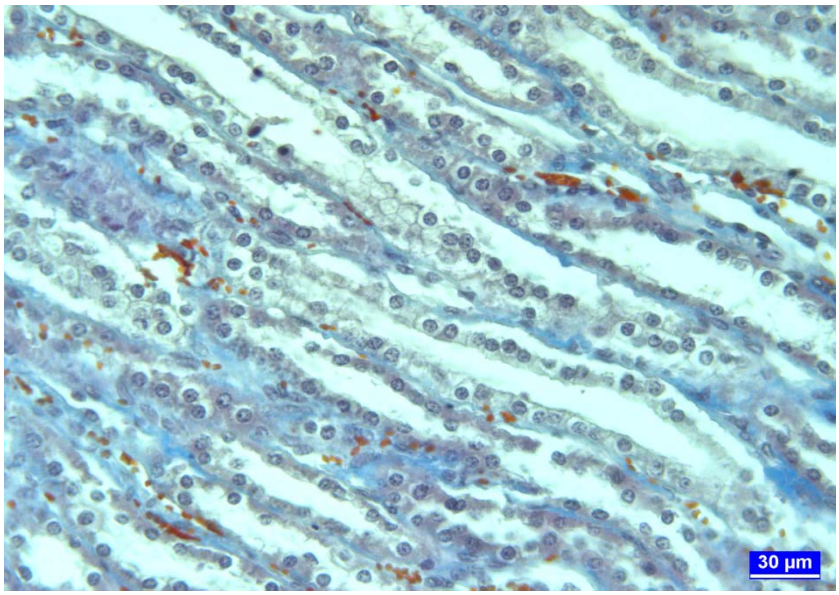
Gruplar (n=8)	K	A	G	AG
Yağlanma oranı	2,63±0,21^{c}	35,50±0,65^{a}	2,94±0,25^{c}	9,63±0,98^{b}

K: Kontrol, A: Aflatoksin, G: Glukomannan, AG: Aflatoksin+glukomannan
^{a,b,c}: Aynı sütundaki farklı harfler arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

Kontrol grubuna ait böbreğin üçlü (triple) boyamasında dokunun normal yapıda olduğu gözlendi (Şekil 15a-b).

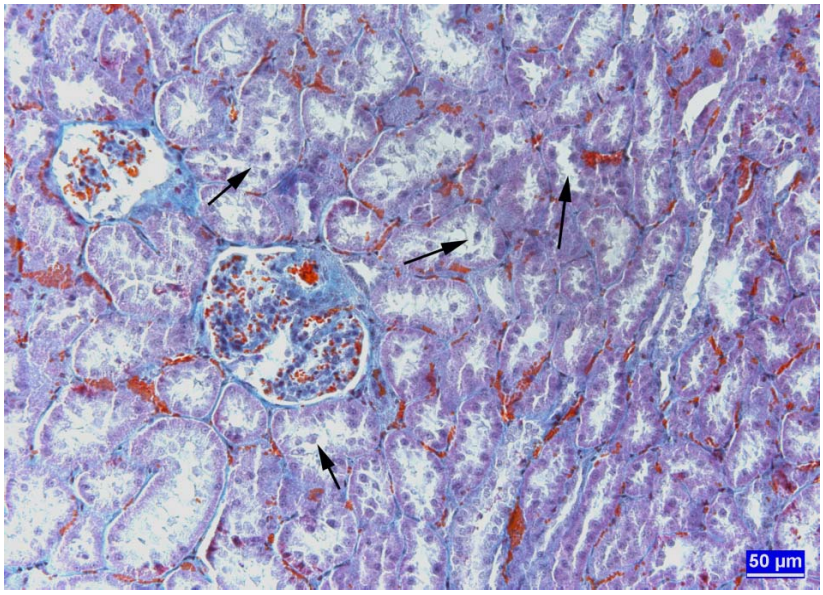


Şekil 15a. Kontrol grubuna ait böbreğin üçlü (triple) boyamasında korteks bölgesinin normal histolojik görünümü.

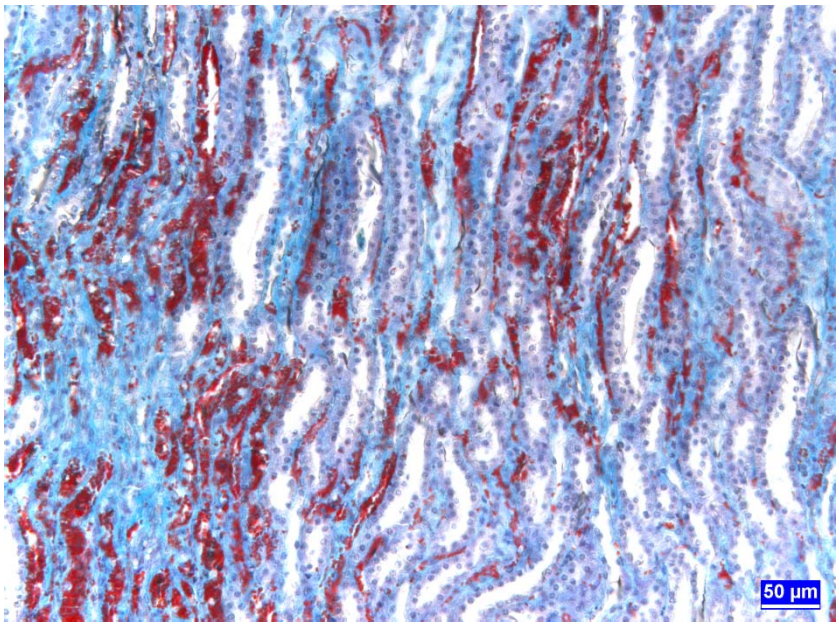


Şekil 15b. Kontrol grubuna ait böbreğin medula bölgesinin normal histolojik görünümü, üçlü boyama.

Aflatoksin ilave edilen grubun böbrek tubul epitellerinde dejenerasyon ve dökülmeler görüldü. Böbrek damarlarında genişlemeler ve konjesyonlar dikkati çekti. Özellikle medula bölgesindeki damarlarda yoğun hiperemiye rastlandı (Şekil 16a-b).

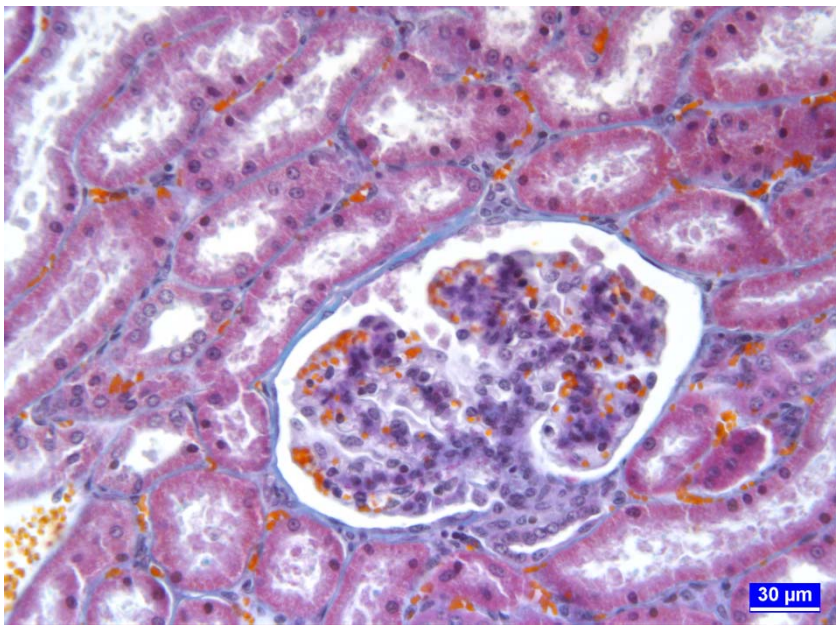


Şekil 16a. Aflatoksin grubuna ait böbreğin korteks bölgesindeki tubullerin epitel hücrelerinde dökülmeler (oklar) görülmekte, üçlü boyama.

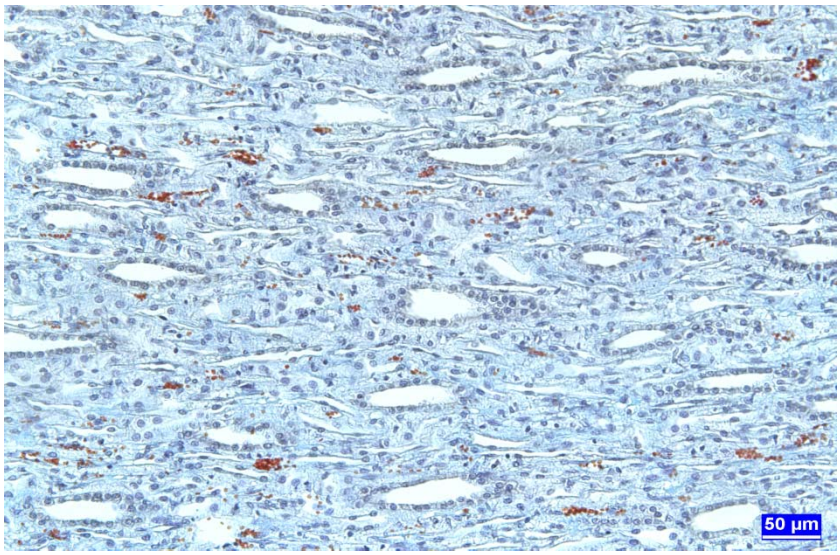


Şekil 16b. Aflatoksin grubuna ait böbreğin medula bölgesindeki damarlarda genişlemeler ve yoğun konjesyonlar, üçlü boyama.

Glukomannan ilave edilen grupta böbreğin histolojik yapısının normal olduğu; kontrol grubuna benzer yapı gösterdiği gözlendi (Şekil 17a-b).

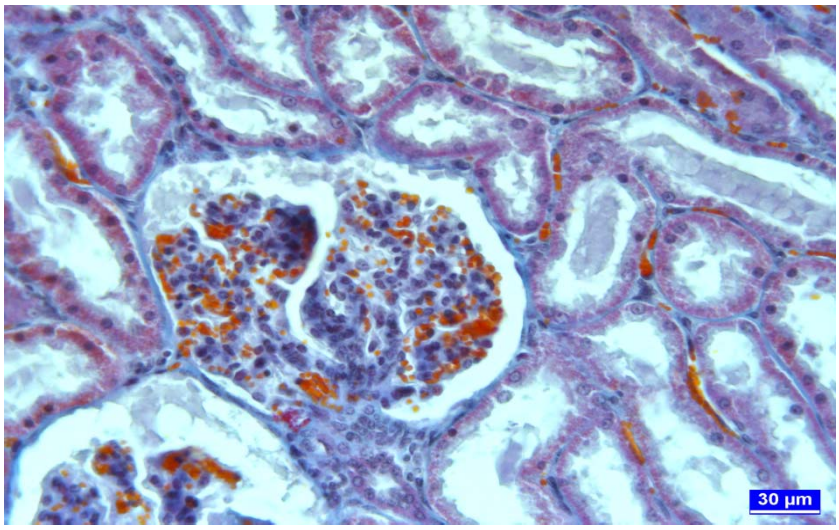


Şekil 17a. Glukomannan grubunda böbreğin korteks bölgesinin normal histolojik görünümü, üçlü boyama.

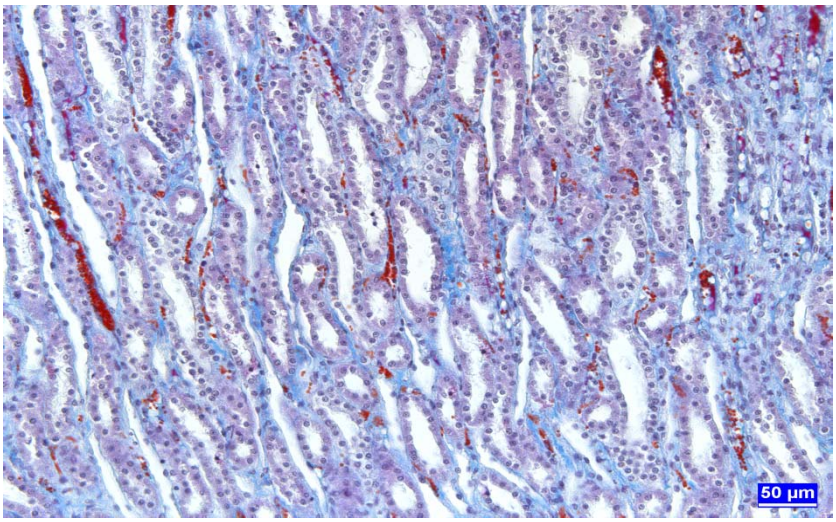


Şekil 17b. Glukomannan grubunda böbreğin medula bölgesinin normal histolojik görünümü, üçlü boyama.

Aflatoksin+glukomannan grubunda böbreğin kontrol grubuna yakın morfolojik yapı göstermesine rağmen, kortekste tubul epitellerinde az sayıda dökülmeler ile medulada yer yer konjesyonlar dikkati çekti (Şekil 18a-b).



Şekil 18a. Aflatoksin+glukomannan grubunda böbreğin korteks bölgesindeki tubul epitel hücrelerinde az sayıda dökülmeler, Üçlü boyama.



Şekil 18b. Aflatoksin+glukomannan grubunda böbreğin medula bölgesindeki hafif konjesyon, üçlü boyama.

Böbreğin farklı bölgelerindeki glomerulus ve tubul epitel hücrelerinin çekirdek alanları Çizelge 7'de verilmiştir. Çizelgeye göre aflatoksin ilave edilen grubun çekirdek alanlarının diğer gruplara göre belirgin bir düşüş ($P<0,05$) gösterdiği görülmektedir. Glukomannan ve aflatoksin+glukomannan grubunda tüm bölgelerde çekirdek alanları birbirine benzerlik göstermesine rağmen, aflatoksin grubunda glomerulus, tubulus distalis ve tubulus kolektivus bölgelerindeki çekirdek alanının en düşük değerlerde olduğu gözlendi. Böbreğin tüm bölgelerine ait çekirdek alanı değerleri kontrol grubunda diğer tüm gruplara göre yüksek düzeydeydi.

Çizelge 7. Böbreğin farklı bölgelerindeki hücrelerin çekirdek alanı (µm²)±SE

Gruplar (n=8)	Glomerulus	Tubulus proximalis	Tubulus distalis	Tubulus kolektivus
K	15,75±0,34^{a}	26,02±0,46^{a}	23,11±0,32^{a}	28,95±0,48^{a}
A	13,13±0,28^{c}	22,20±0,29^{b}	20,32±0,32^{c}	25,33±0,30^{c}
G	15,17±0,32^{ab}	25,30±0,39^{ab}	22,29±0,33^{ab}	28,24±0,35^{abc}
AG	14,33±0,31^{b}	22,33±0,36^{b}	21,65±0,30^{b}	27,00±0,29^{b}

K: Kontrol, A: Aflatoksin, G: Glukomannan, AG: Aflatoksin+glukomannan
^{a,b,c}: Aynı sütundaki farklı harfler arasındaki fark önemlidir ($P<0,05$).

Böbreğin farklı bölgelerindeki glomerulus ve tubul epitel hücrelerindeki AgNOR alanları Çizelge 8'de verilmiştir. Çizelgeye göre çalışılan tüm bölgelerde kontrol ve glukomannan grupları birbirine benzerlik gösterirken, aflatoksin grubunun en düşük ($P<0,05$) AgNOR alanına sahip olduğu gözlendi. Aflatoksin+glukomannan

grubunun çalışılan tüm bölgelerindeki epitel hücrelerinin ise aflatoksin grubundan yüksek AgNOR alanına sahip olduğu görüldü. Tubulus proksimalis bölgesindeki AgNOR alanları aflatoksin grubunda en düşük değerde iken kontrol grubuna ait veriler en yüksek değerdeydi. Aflatoksin+glukomannan grubunda bu oran gruplar arasındaki farklar önemli ($P<0,05$) olmak üzere kontrol grubuna göre düşük; aflatoksin grubuna göre yüksek bulundu. Tubulus kolektivus bölgesinde AgNOR alanı bakımından aflatoksin grubu ile aflatoksin+glukomannan grupları birbirine benzerlik gösterirken; kontrol grubu ile glukomannan grupları arasında da istatistikî farklılık gözlenmedi.

Çizelge 8. Böbreğin farklı bölgelerindeki hücrelerde AgNOR alanı (μm^2)±SE

Gruplar (n=8)	Glomerulus	Tubulus proximalis	Tubulus distalis	Tubulus kolektivus
K	0,23±0,06[a]	0,43±0,01[a]	0,41±0,01[a]	0,51±0,01[a]
A	0,17±0,00[c]	0,27±0,01[c]	0,26±0,01[c]	0,38±0,01[b]
G	0,22±0,01[a]	0,41±0,01[a]	0,38±0,01[a]	0,49±0,01[a]
AG	0,19±0,01[b]	0,33±0,01[b]	0,29±0,01[b]	0,39±0,01[b]

K: Kontrol, A: Aflatoksin, G: Glukomannan, AG: Aflatoksin+glukomannan
[a,b,c]: Aynı sütundaki farklı harfler arasındaki fark önemlidir ($P<0,05$).

Böbreğin farklı bölgelerindeki hücrelerin AgNOR alanının çekirdek alanına oranları Çizelge 9'da verilmiştir. Çizelgeye göre aflatoksin grubunun epitel hücrelerinde AgNOR alanının çekirdek alanına oranları glomerulus bölgesinde % 1,23; tubulus proksimalis bölgesinde % 1,18; tubulus distalis bölgesinde % 1,27 ve tubulus kolektivus bölgesinde ise % 1,44 olarak bulunmuştur. Bu değerler, çalışılan diğer gruplardan istatistikî olarak farklı ($P<0,05$) olduğunu göstermektedir. Aflatoksin+glukomannan grubundan elde edilen veriler ise glomerulus, tubulus proksimalis ve tubulus kolektivus bölgelerinde hem glukomannan hem de kontrol grubu ile istatiki olarak farklılık göstermezken, tubulus distalis bölgesinde kontrol grubu ile aynı glukomannan grubu ile de istatistikî olarak farklı ($P<0,05$) bulundu.

Çizelge 9. Böbreğin farklı bölgelerindeki hücrelerde AgNOR alanının çekirdek alanına oranı (%) ±SE

Gruplar (n=8)	Glomerulus	Tubulus proximalis	Tubulus distalis	Tubulus kolektivus
K	1,80±0,09[a]	1,53±0,07[a]	1,50±0,06[b]	1,76±0,07[a]
A	1,23±0,05[c]	1,18±0,05[b]	1,27±0,05[c]	1,44±0,06[b]
G	1,60±0,09[a]	1,79±0,09[a]	2,08±0,09[a]	1,82±0,06[a]
AG	1,59±0,07[a]	1,49±0,07[a]	1,49±0,06[b]	1,68±0,08[a]

K: Kontrol, A: Aflatoksin, G: Glukomannan, AG: Aflatoksin+glukomannan
[a,b,c]: Aynı sütundaki farklı harfler arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

Böbreğin farklı bölgelerindeki glomerulus ve tubul epitel hücrelerindeki AgNOR sayıları açısından yapılan değerlendirmede ise gruplar arasında önemli farklılıkların olmadığı gözlendi (Çizelge 10).

Çizelge 10. Böbreğin farklı bölgelerindeki hücrelerde AgNOR sayısı (adet, X±SE)

Gruplar (n=8)	Glomerulus	Tubulus proximalis	Tubulus distalis	Tubulus kolektivus
K	2,52±0,19	2,83±0,19	2,74±0,18	2,68±0,23
A	2,60±0,17	2,59±0,19	2,68±0,17	2,63±0,21
G	2,62±0,22	2,74±0,18	2,80±0,18	2,96±0,17
AG	2,82±0,18	2,30±0,24	2,66±0,17	2,73±0,18

K: Kontrol, A: Aflatoksin, G: Glukomannan, AG: Aflatoksin+glukomannan

4. TARTIŞMA

Aflatoksikozis olaylarında en çok etkilenen organların başında karaciğer ve böbrekler gelmektedir (Krishna ve ark 1991, Sahoo ve ark 1993, Churamani ve ark 1995, Guerre ve ark 1996, Singh ve ark 1999, Vinita ve ark 2003, Denli ve ark 2005). Lakkawar ve ark (2004) tavşanların yemlerine 50 gün süreyle 0,5 ppm AFB_1 vererek oluşturdukları aflatoksikoz sonucunda en çok etkilenen organların karaciğer ve böbrek olduğunu açıklamışlardır. Besinlerle alınan AFB_1 duodenumdan etkili bir şekilde emildikten sonra karaciğerde hücresel sitokrom- P450 enzim sistemi yoluyla lipid peroksidasyonuna ve hücresel hasarlara yol açan AFB_1-8-9- epoksite dönüştürülerek metabolize olmaktadır (Stresser ve ark 1994). Shen ve ark (1995) AFB_1 kaynaklı hücre hasarlarında süperoksit radikalleri, hidroksi radikalleri ve hidrojen peroksit gibi ROS'un rolü olduğunu ifade etmektedirler.

Aflatoksikozda histopatolojik bulgular, aflatoksin konsantrasyonu ve maruz kalma süresi ile ilişkilidir (Boonyaratpalin ve ark 2001). Edrington ve ark (1994) 2,5 ppb aflatoksin içeren diyetin büyüme dönemindeki kuzularda karaciğer hasarı oluşturmak için yeterli olduğunu görmüşlerdir. Hinton ve ark (2003) kırk hafta boyunca dört hafta aralıklarla 0; 0,01; 0,04; 0,4 ppm verilen hayvanlarda oluşan hepatoselüler vakuoler değişikliğin; kırk hafta boyunca sürekli 1,6 ppm aflatoksin verilen hayvanlardakinden daha az olduğunu açıklamışlardır. Bu çalışmada 92 gün süreyle uygulanan aflatoksinin karaciğer ve böbreklerde önemli histopatolojik değişikliklere neden olduğu gözlenmiştir.

Aflatoksinler tüm hayvanları aynı şekilde etkilememekte, tür farklılıkları da toksisitede önemli yer tutmaktadır (Richard 2008). Sütçü ve etçi sığırlarda aflatoksikoz olaylarının karaciğerde yağ dejenerasyonu, megalositozis, fibrozis ve nekrozlarla karakterize olduğu bildirilmiştir (Burnside ve ark 1957, Morehouse 1981, Colvin ve ark 1984, Edrington ve ark 1994). Armbrecht ve ark (1970) 2 ppb dozda aflatoksin verilen koyunlardan 24 saat içinde ölenlerin karaciğerlerinde belirgin sentrilobuler nekrozlara, 7 güne kadar hayatta kalan hayvanlarda ise periportal konjesyon, genişlemiş sinuzoidler ve hepatositlerde nekrozlara rastlamışlardır. Bir çalışmada da 4 ppb aflatoksin verilen keçilerdeki histopatolojik lezyonların önemli olmayan ya da orta dereceden şiddetliye kadar değişen sentrilobuler nekrozlar halinde olduğu rapor edilmiştir (Wylie ve Morehouse 1978). Bu çalışmada da süre ve

doz çalışması olmamakla birlikte 3 ay süreyle 250 µg/gün aflatoksin verilen koçların karaciğerinde hidropik ve vakuoler dejenerasyon, Kuppfer hücreleri ile hepatositlerde seroid pigmentasyonu ve piknoz gibi histopatolojik bulgular gözlenmiştir.

Farklı hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda da karaciğerde benzer bulgular elde edilmiştir: Greene ve Ochme (1976) aflatoksikoz sonucu ölen atların karaciğerlerinin histopatolojik incelemesinde sentrilobuler bölgede nekrozlara, çeşitli derecelerde yağlanmaya, periportal fibrozise ve inflamatuar hücre infiltrasyonlarına rastladıklarını bildirmişlerdir. Rumbeiha (2001) köpeklerde aflatoksikozun subakut döneminde hepatositlerde şiddetli yağ dejenerasyonu, portal ve sentral venlerde konjesyon; kronik safhada ise fibrozis ile karakterize histopatolojik bulgular elde etmiştir. Agag (2004) toksik seviyede AFB_1 tüketen domuzların histopatolojik bulgularını şekilsiz hücreler, sentrilobuler konjesyon, karyoreksis ve piknozis, vakuolizasyon, çekirdeklerin kaybolması ve inter/intralobuler alanlarda yoğun bağ dokusu artışı olarak sıralamıştır. Ördeklerin öldürücü aflatoksikozunda hepatositlerde yağlanma ve yoğun fibrozis kaydedilmiştir (Asplin ve Carnagham 1961, Calnek ve ark 1997). Denli ve ark (2005) broyler tavukların karaciğerinde portal ve parenşimatöz dejenerasyon, portal lökosit infiltrasyonu, konjesyon, periportal ve multifokal yağ dejenerasyonu, nekroz, multifokal displazi ve hepatositlerde düzensizlikler olduğunu kaydetmişlerdir. Aflatoksinlerin karaciğerde oluşturduğu histopatolojik bulgular arasında hepatositler ile hepatositlerin çekirdeklerinde büyüme ve çekirdek inklüzyonları da bildirilmiştir (Hastings ve Llewellyn 1987). Hinton ve ark (2003) ratlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada sekiz hafta sonunda 1,6 ppm dozunda aflatoksine maruz kalan hayvanların hepatositlerinde büyüme ve sitoplazmik membranın sınırlandırdığı hepatoselüler sitoplazmik vakuoler değişiklikler bulunduğunu göstermişlerdir. Mckenzie ve ark (1981) akut toksikasyon sonucu buzağıların karaciğerinin histopatolojik incelemesinde özellikle periportal alanlardaki hepatositlerde belirgin büyüme ile birlikte bazı hepatosit çekirdeklerinin diğerlerinden 5 kat daha büyük olduğunu ve hepatosit sitoplazmasının yağ içeren vakuollerle dolu olduğunu bildirmişlerdir. Yıldırım ve ark (2011) broyler tavuklar üzerinde yaptıkları çalışmada hepatositlerin bir kısmının çekirdeklerinin piknotik olduğunu, bir kısmının da çekirdeklerini kaybettiklerini görmüşlerdir. Üç ay süreyle koçlar üzerinde gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda da aflatoksin ilave edilen

grubun hepatositlerinde büyümeler ve lopçuklarda piknotik çekirdekli hepatositler gözlenmiştir. Gradelet ve ark (1998)'nın da ifade ettiği gibi hepatositlerdeki büyümenin, bu hücrelerin metabolik aktivitelerini yerine getirirken gösterdikleri faaliyetler sonucu depoladıkları metabolizma ürünlerinden kaynaklanabileceği ve bazı enzimlerin etkileri sonucunda ortaya çıkan aflatoksin metabolitlerinin hepatosit DNA'sı ile reaksiyona girerek çekirdekte mutasyonlara sebep olabileceği düşünülmektedir.

Özen ve ark (2009)'nın yaptıkları bir çalışmada mikroskopik olarak hepatositlerde doza bağımlı olarak değişen şiddette vakuolar dejenerasyona ve yer yer nekrotik hücrelere rastlanmıştır. Hepatositlerin çoğunun yağ birikimi ile karakterize olan keskin sınırlı vakuoller içermekte olduğu da bildirilmektedir. Kıran ve ark (1998) aflatoksine maruz kalan broylerlerde hepatik lezyonlar olarak diffuz/şiddetli hidropik dejenerasyon ve periportal fibrozis rapor etmişlerdir. Bryden ve Cumming (1980) broylerlerde yaptıkları bir çalışmada üç hafta boyunca 2 ppb aflatoksin içeren yemle besledikleri hayvanların karaciğerlerinde mikroskopik olarak değişik derecelerde yağ infiltrasyonlarının ve dejenerasyonlarının olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda (Bryden ve Cumming 1980, Özen ve ark 2009) elde edilen bulgulara benzer şekilde bu çalışmada da hepatositlerde küçük ve iri damlalı vakuoler yağ dejenerasyonlarının ve belirgin hidropik dejenerasyonların olduğu gözlendi. Vakuoler dejenerasyonların bozulan yağ transportundan ileri geldiği bildirilmektedir (McLean ve Dutton 1995).

Lakkawar ve ark (2004) aflatoksine maruz kalan tavşanlarda vasküler konjesyon, sentral ven çevresinde koagülatif nekroz ve portal alanda tıkanıklıklara; Abdel-Wahhab ve ark (2002) vasküler genişlemelere ve orta şiddette hemorajilere rastlamışlardır. Aflatoksinli yemle beslenen hayvanlarda görülen hemorajiler diğer çalışmalarda da rapor edilmiştir (Clarke ve ark 1986, Baker ve Green 1987, Dafalla ve ark 1987). Broylerlerin karaciğer sinuzoidlerinde konjesyon ve fokal hemorajilerin olduğu bildirilirken (Dafalla ve ark 1987) sentral venlerin genişlememiş olduğu rapor edilmiştir (Asuzu ve Shetty 1986, Okoye ve ark 1988). Aflatoksikoz sonucu hepatositlerdeki nekrozlara bağlı olarak genişlemiş sinuzoidler tespit ettiklerini bildiren araştırmacılara (Armbrecht ve ark 1970, Khan ve ark 2010, Salim ve ark 2011) karşın, yaptığımız çalışmada hepatositlerdeki büyümeye ve

şişmeye bağlı olarak sinuzoidlerin belirgin olarak daraldığı gözlenmiştir. Bu bulgumuz bazı araştırmacıların yaptıkları çalışmalarla da (Nunez ve ark 1990, Uopasai ve ark 2008) uyumludur. Sinuzoidlerin görülebildiği yerlerde kan göllenmeleri dikkat çekmiştir. İnflamasyona bağlı olarak dokuya gelen kanın artması sonucu oluşan arteriol dilatasyon hiperemiye neden olmaktadır (Ünal 2012).

Newman ve ark (2007) aflatoksikozun subakut döneminde lopçukların ikinci bölgesindeki hepatositlerin orta şiddette, büyük miktarlarda sarı/kahverengi granüler sitoplazmik pigment içerdiğini, kronik safhada ise çok sayıda altın yeşili, granüler, sitoplazmik pigmentli makrofajların fibrotik alanlarda olduğunu bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar da karaciğer dokusunda pigment birikimi ile karakterize hücresel bozuklukları rapor etmişlerdir (Çelik ve ark 2003, Baptista ve ark 2004, Baptista ve ark 2008). Gül ve ark (2006) primer hepatik lipidozisli bir kedinin karaciğerinde histolojik olarak periportal bölgede daha yoğun olmak üzere karaciğerin tüm bölgelerinde serbest halde ya da hepatosit/Kupffer hücrelerinin sitoplazmaları içerisinde iri damlacıklar halinde sarı renkte, Periyodik Asit Shift (PAS) pozitif seroid pigment birikimlerinin olduğunu görmüşlerdir. Hepatosit nekrozuna bağlı olarak intersitisyel bölgede serbest kalan lipitlerin oluşturduğu yağ kistlerinin makrofajlar tarafından tam olarak ortadan kaldırılamaması ve yağların peroksidasyona uğrayarak polimerleşmesi sebebiyle seroid pigmentin oluştuğu ifade edilmektedir (Milli ve Hazıroğlu 2000). Bu çalışmada da aflatoksin verilen gruptaki koçların karaciğerlerinde vena sentralis çevresinde yoğun olmak üzere lopçuklar içerisinde seroid pigmentasyon gösteren hepatositler ile Kupffer hücrelerine rastlanmış ve bu durumun yağ metabolizmasındaki bozukluk ve şiddetli yağlanmaya bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Aflatoksinin zararlı etkisini önlemede pek çok kimyasal madde kullanılmış ve bazı uygulamalardan başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Fakat bunlardan ticari olarak kullanılanların sayısı son derece sınırlıdır. Alüminosilikatlar, bentonitler (Rosa ve ark 2001) ve clinoptilolit içeren zeolitler (Kubena ve ark 1990, Harvey ve ark 1993, Kubena ve ark 1993, Santurio ve ark 1999, Oğuz ve Kurtoğlu 2000) aflatoksinleri bağlayıp gastrointestinal kanaldan bunların emilimini azaltan inert bileşiklerdir (Kubena ve ark 1998). Baptista ve ark (2008) ratlarda yaptıkları bir çalışmada maya

ile methiyonin ve sistein gibi aminoasitleri probiyotik ajan olarak kullanmışlar ve aflatoksin kaynaklı karaciğer hasarını azalttığı sonucuna varmışlardır.

Aflatoksin vitamin emilimini azaltarak organizmanın antioksidan savunma mekanizmasını zayıflatmaktadır (Eraslan ve ark 2005). Kaya ve ark (2002) yemlere vitamin A, vitamin D, selenyum, bakır, kolin ve metiyonin ilave ederek aflatoksin zehirlenmelerinde koruyucu etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca vitamin C ve E (Davila ve ark 1983), mangan sülfat (Hasting ve Llewellyn 1987) ve karnitin (Sachan ve Yatim 1992) ilavelerinin de faydalı sonuçlar verdiği vurgulanmıştır. Nyandieka ve Wakhisi (1993), aflatoksinleri karsinojenik olmayan ürünlere metabolize eden hepatik mikrozomal enzimler vasıtasıyla vitamin A, C ve E'nin karaciğer kanserini engelleyebildiğini ifade etmişlerdir.

Aflatoksikozun zararlı etkilerini engellemede mayanın da önemli bir faktör olduğu bilinmektedir (Stanley ve ark 1993, Parlat ve ark 2001, Çelik ve ark 2003, Baptista ve ark 2004). Kuru maya ve glukomannan sulu çözeltilerden aflatoksini bağlama özelliğine sahip olan adsorbanlar olarak kabul edilmektedirler (McGuire ve McGuire 1999). Karaman ve ark (2005) glukomannanın (Mycosorb) aflatoksinin karaciğer, böbrek, timus, dalak ve bursa Fabriciide yol açtığı patolojik etkileri hafiflettiğini, yüksek konsantrasyondaki glukomannanın (1g/kg) düşük konsantrasyondan (0,5 g/kg) daha etkili olduğunu ve Mycosorb'un kendisinin hiçbir yan etkisinin olmadığını rapor etmişlerdir. Ataman ve ark (2009) da koçlarda yaptıkları deneysel çalışma sonucunda glukomannanın testisler ile spermatolojik özellikler üzerine aflatoksinin olumsuz etkilerini önlemede yararlı sonuçlar verdiğini açıklamışlardır. Raju ve Devegowda (2000) ticari broylerlerde aflatoksinin karaciğer ve böbrek gibi organlardaki zararlı etkilerini iyileştirmede EG'nin yararlı olduğunu bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada aflatoksinle birlikte glukomannan ilave edilen gruptan elde edilen bulguların kontrol grubuna yakın değerlerde bulunması, glukomannanın toksikasyonda aflatoksinin zararlı etkilerini azaltmak için önemli bir adsorban olabileceği yönündeki çalışmaları (Basmacıoğlu ve ark 2005, Karaman ve ark 2005, Ataman ve ark 2009) desteklemektedir.

Bu çalışmada glukomannan ilave edilen gruptan alınan histopatolojik veriler kontrol grubundan elde edilen veriler ile kıyaslandığında önemli değişikliklerin olmadığı gözlenmiştir. Yıldırım ve ark (2011) aflatoksin verilen broyler tavukların

karaciğerlerinin portal alanlarında hafif şiddette mononükleer hücre infiltrasyonlarının olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da aflatoksin+glukomannan verilen grubun karaciğer dokusunun portal alanlarında yer yer mononükleer hücre infiltrasyonlarına rastlanmıştır. Aflatoksinler pek çok hayvan türünde immuniteyi özellikle de hücresel immuniteyi etkilemektedir (Oğuz ve ark 2003, Richard 2008). Sekiz hafta boyunca yüksek dozda aflatoksine maruz kalan ratlarda lenfositlerin, plazma hücrelerinin, mononükleer hücrelerin ve nötrofillerin oluşturduğu küçük inflamatuar hücre infiltrasyonlarının, hepatositlerdeki vakuoler dejenerasyona cevap olarak oluştuğu söylenmektedir (Hinton ve ark 2003).

Yapılan çalışmalarda AFB_1 metabolitlerinin DNA ile reaksiyona girdiği ortaya konmuştur (Gradelet ve ark 1998). Benasutti ve ark (1988) AFB_1-8,9 epoksidin DNA'daki guanin ile kompleks oluşturduğunu bildirirlerken; Lyman ve ark (1988) ribozomların da AFB_1 tarafından modifikasyona uğratıldığını ileri sürmüşlerdir. Aflatoksinin hepatositlerdeki ribozom sayısını düşürdüğü ve sonuçta bu durumun protein sentezinde azalmaya neden olduğu ileri sürülmüştür (Jindal ve ark 1994, Ergün ve ark 2006, Sehu ve ark 2007). Yaptığımız çalışmada aflatoksin verilen grubun karaciğerindeki her üç bölgede de çekirdek AgNOR alanlarının düşüklüğü, protein sentezinin engellendiğinin ve/veya azaldığının bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Aflatoksin+glukomannan ilave edilen gruptaki çekirdek alanının kontrol grubuna göre düşük, aflatoksin ilave edilen gruba göre yüksek olması glukomannanın aflatoksinin zararlı etkilerini azaltmaya yönelik bir rolü olduğunu ortaya koymaktadır. Sadece glukomannan ilaveli gruptan elde edilen değerlerin kontrol grubuna yakın olması da glukomannanın çekirdek alanı yönünden herhangi bir zararlı etkisinin olmadığını göstermektedir.

Gümüşleme metodu ile NOR'ların boyanması sırasında aktif olarak transkripsiyon yapan rDNA bölgeleri boyanmaktadır. Bu nedenle aktif olarak çoğalan ve sentez aktivitesi yüksek olan hücrelerin NOR'larındaki genlerin ekspresyonunda önemli bir artış olmaktadır (Lee ve ark 1999). Hücre çekirdeğinde boyanan AgNOR'ların sayıları ve büyüklükleri aynı türün farklı dokularında değişiklik göstermektedir (Zaczek ve ark 1992). Bir çekirdekteki AgNOR sayısı ve her bir AgNOR alanının çekirdek alanı ile bağlantılı olduğu da saptanmıştır. Aktif NOR sayılarının hücrenin protein sentez ihtiyacı ve çevre şartlarına göre değişiklik

gösterdiği ileri sürülmektedir (Aydın 2004). Çalışmamızda aflatoksin ilave edilen grubun karaciğer AgNOR alanlarının diğer gruplara göre her üç bölgede de belirgin oranda düşük olması aflatoksinin hepatositlerdeki çoğalma ve sentez aktiviteleri üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Aflatoksin+glukomannan ilave edilen grubun AgNOR alanının kontrol ve glukomannan grubuna göre düşük, aflatoksin ilave edilen gruba göre yüksek olması aflatoksinin protein sentezi üzerindeki baskısının glukomannan tarafından nispeten ortadan kaldırıldığını göstermektedir. Öte yandan çalışmada hepatositlerde ölçülen ve hücrelerin çoğalma ve sentez aktiviteleri ile ilgili olduğu bilinen AgNOR sayılarında ise karaciğerin her üç bölgesi için de gruplar arası herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir. Bu durum çalışmada uygulanan dozdaki aflatoksinin karaciğer epitel hücrelerinin çekirdeklerindeki AgNOR sayılarını etkilemediğini ancak AgNOR alanlarında değişime neden olduğunu göstermektedir.

Aflatoksikozda hepatositlerde görülen yağ infiltrasyonları lipid biyosentezinin artmasından ziyade lipid transportunun bozulmasından ileri gelmektedir (McLean ve Dutton 1995). Aflatoksinin yağ asidi sentezinde zincir uzamasından sorumlu olan mikrozomal enzim sistemini ve yağ asit sentezini baskılaması sonucu karaciğerdeki lipid sentezi bozulmakta (Donaldson ve ark 1972) karaciğerden lipid transportu önemli ölçüde azalmaktadır (Tung ve ark 1972, Merkley ve ark 1987). Aflatoksikozu takiben oluşan mitokondriyal hasarın da yağların oksidasyonunda azalmaya neden olduğu ileri sürülmektedir (McLean ve Dutton 1995). Merkley ve ark (1987) yaptıkları bir çalışmada aflatoksikozlu broylerlerin karaciğerlerinde % 68 oranında yağlanma olduğunu bulmuşlardır. Yüksek seviyelerde aflatoksinle beslenen hayvanların karaciğerleri % 300 oranında yağ artışı göstermektedir (Wyatt ve ark 1973). Bu çalışmada da aflatoksin ilave edilen grubun karaciğer epitel hücrelerinde % 35,5 oranında yağlanma olduğu, aflatoksin+glukomannan ilave edilen grupta % 9,6; glukomannan ilave edilen grupta % 2,9; kontrol grubunda ise % 2,6 oranında yağlanma olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu veriler aflatoksinin koçlarda da diğer hayvanlarda (Greene ve Ochme 1976, Merkley ve ark 1987, Yener ve ark 2009) olduğu gibi karaciğer epitel hücrelerinde yağlanmaya neden olduğunu göstermektedir. Aflatoksinle birlikte verilen glukomannanın ise hepatositlerdeki yağlanmayı önemli ölçüde azalttığını ve

aflatoksinin bu yönde olan zararlı etkilerini büyük oranda ortadan kaldırdığını göstermektedir.

Aflatoksinden en çok etkilenen organ karaciğer olmakla birlikte, hayvan türü, doz ve verilme şekli gibi değişkenlere bağlı olarak böbrek, kalp, dalak ve pankreas gibi diğer organlarda da nekrotik ve hemorajik değişiklikler gözlenebilmektedir (Newberne ve Rogers 1981). AFB_1'in böbrekler ile vücuttan atıldığı ve böbrek medulasının aflatoksine en duyarlı bölge olduğu Arora ve ark (1978) tarafından bildirilmiştir. Ikegwuonu ve ark (1980) da ratlarda aflatoksinin böbreklere olan zararını bildirmişlerdir. Grosman ve ark (1984) ratlarda AFB_1'in tek dozunun (100 ppb) akut nefrotoksik etkilere neden olduğunu kaydetmişlerdir.

Lakkawar ve ark (2004) AFB_1 ile tavşanlar üzerinde yaptıkları deneysel çalışmada 30 gün ve üzeri süreyle aflatoksine maruz kalan hayvanların böbreklerinde histopatolojik olarak tubuler epitelde dejenerasyona ve paranşimada yoğun konjesyon ile birlikte fokal hemorajik alanlara rastlamışlardır. Bu çalışmada da tubul epitellerinde dejenerasyon ve dökülmeler görülmüş; medulada daha yoğun olmak üzere böbrek damarlarında genişleme ve konjesyona rastlanmıştır. Doku ve organlarda meydana gelen vasküler değişikliklerin AFB_1 kaynaklı endotelyal hasar sonucu şekillendiği bildirilmektedir (Lakkawar ve ark 2004, Baptista ve ark 2008). Aflatoksinin etkisiyle koagülasyon bozukluklarına (Lakkawar ve ark 2004) ve venöz dönüşün yeterince hızlı sağlanamamasına bağlı olarak konjesyonlara yol açtığı bilinmektedir (Ünal 2012).

Yıldırım ve ark (2011) broyler tavuklar üzerinde yaptıkları aflatoksin çalışması sonucunda böbrek kesitlerinde tubuler epitel hücrelerinin solgun ve şişmiş yer yer de nekrotik olduklarını bildirmişlerdir. Morrissey ve ark (1987) ratların böbreklerinde özellikle korteksin iç kısımlarında piknotik çekirdekli tubuler hücre nekrozlarına rastlamışlardır.

Asplin ve Carnagham (1961) ile Calnek ve ark (1997) aflatoksine maruz kalmış ördeklerin böbreklerinde dejeneratif lezyonlar olduğunu rapor etmişlerdir. Dafalla ve ark (1987) broylerlerde aflatoksikoz sonucu böbrek tubullerinin epitel hücrelerinde vakuolasyonlar olduğunu bildirmişlerdir. Özen ve ark (2009)'nın tavuklarda yaptıkları bir çalışmada aflatoksine bağlı, böbreklerde orta şiddette

tubuler dejenerasyona rastlamışlardır. Glahn ve ark (1991) ise toksikasyonda en çok etkilenen bölgenin böbreklerde glomeruluslar olduğunu rapor etmişlerdir. Lakkawar ve ark (2004) da tavşanlarda 0,5 ppb AFB_1 ile yaptıkları deneyin son aşamasında, böbrek tubul epitellerinde belirgin dejenerasyonu ve tubuler epitelin hiyalinizasyonunu bildirmişlerdir.

Böbreğin farklı bölgelerindeki glomerulus ve tubul epitel hücrelerinin çekirdek alanları karşılaştırıldığında, aflatoksin ilave edilen grubun tüm bölgelerinde kontrol grubuna göre önemli ($P<0,05$) düşüşler dikkati çekmiştir. Aflatoksin grubunda ortalama çekirdek alanları glomerulusta 13,13 μm^2; tubulus proksimaliste 22,20 μm^2; tubulus distaliste 20,32 μm^2 ve tubulus kolektivusta 25,33 μm^2 olarak bulunmuştur. Bu değerler aflatoksin+glukomannan grubu ile karşılaştırıldığında ise tubulus proksimalis bölgesi haricinde ölçümü yapılan diğer üç bölgede de kontrol grubuna benzer sonuçlar alınmış ancak kontrol grubu ile de önemli ($P<0,05$) farklılık olduğu gözlenmiştir.

Aflatoksinlerin hücrelerin genetik yapılarını bozduğunu bildiren birçok çalışma vardır (Benasutti ve ark 1988, Öztürk 1991, Shi ve ark 1995, Sengstag 1997). Aflatoksinlerin hücrelerde DNA hasarı oluşturan etkenlere karşı koruyucu etkisi olan p53 geni üzerinde toksik etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Gerbes ve Caselmann 1993). Elde edilen bulgular aflatoksinin ölçümü yapılan bölgelerdeki hücrelerin çekirdek alanlarını önemli oranda düşürdüğünü ve hücrelerin metabolik aktivitelerini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir.

Böbreğin farklı bölgelerindeki glomerulus ve tubul epitel hücrelerinde yapılan AgNOR alanları ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde; çalışılan tüm bölgelerde kontrol ve glukomannan grupları birbirine benzerlik gösterirken aflatoksin grubunun en düşük ($P<0,05$) AgNOR alanına sahip olduğu gözlenmiştir. Aflatoksin+glukomannan grubunun ise aflatoksin grubundan yüksek AgNOR alanına sahip olduğu bulunmuştur. Bu veriler, aflatoksinlerin hücrelerde oluşturduğu genetik bozuklukları tanımlayan (Benasutti ve ark 1988, Öztürk 1991, Shi ve ark 1995, Sengstag 1997), özellikle p53 geni üzerindeki toksik etkisi (Gerbes ve Caselmann 1993) nedeniyle bölgedeki hücrelerin aktivitelerinin olumsuz etkilendiğini ifade eden araştırmacıların bulgularıyla paralellik göstermektedir. Çalışmada aflatoksin grubunun en düşük AgNOR alanına sahip olması, araştırmacıların da belirttiği gibi

ribozomların AFB_1 tarafından modifikasyona uğratıldığını (Lyman ve ark 1988), ribozom sayısını düşürdüğünü ve sonuçta bu durumun protein sentezinde azalmaya neden olduğunu (Jindal ve ark 1994, Ergün ve ark 2006, Sehu ve ark 2007) ortaya koymaktadır. Öte yandan aflatoksin+glukomannan ilave edilen grubun AgNOR alanının aflatoksin ilave edilen gruba göre yüksek olması, aflatoksinin protein sentezi üzerindeki baskısının glukomannan tarafından nispeten ortadan kaldırıldığını göstermektedir.

Böbreğin yine farklı bölgelerindeki glomerulus ve tubul epitel hücrelerinin AgNOR alanının çekirdek alanına oranı, çalışılan tüm bölgelerde karşılaştırıldığında; aflatoksin grubunun düşük, diğer grupların ise yüksek bir orana sahip olduğu bulunmuştur. Zaczek ve ark (1992) AgNOR parametrelerinin epitelin proliferasyon aktivitesi ile ilişkili olduğunu, bir nükleustaki AgNOR sayısı ve her bir AgNOR'un alanının çekirdek alanı ile de bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada AgNOR alanının çekirdek alanına oranının aflatoksin grubunda düşük çıkması aflatoksinlerin DNA hasarına yol açarak (Öztürk 1991) hücrenin protein sentez aktivitesini düşürdüğünü ortaya koymaktadır. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular ışığında; hücrelerin protein sentez aktivitesindeki bu düşüşün, kullanılan glukomannan tarafından nispeten ortadan kaldırılarak, aflatoksinin söz konusu hücreler üzerindeki olumsuz etkisinin kısmen de olsa giderildiği söylenebilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, koçlarda aflatoksinin karaciğer ve böbrek üzerine etkileri ışık mikroskobik düzeyde belirlenerek, aflatoksikozun önlenmesi amacıyla kullanılan glukomannan (EG)'ın koruyucu etkinliği araştırılmıştır. Aflatoksinlerin karaciğer ve böbreklerdeki histolojik bütünlüğü bozduğu, karaciğer epitel hücrelerinde yağlanmaya neden olduğu, karaciğerin ve böbreğin farklı bölgelerinde yapılan ölçümlerde çekirdek alanı ile AgNOR alanlarında değişiklikler sonucu hücrelerin metabolik aktivitelerinde bozulmalara yol açtığı tespit edilmiştir. Toksikasyonu ilgilendiren birçok çalışmada farklı bağlayıcılar denenmiş, bu bağlayıcıların etkinlik dereceleri tespit edilmiştir. Ancak bu bağlayıcılardan biri olan glukomannanın özellikle koçlarda kullanımı ile ilgili çalışmalar son derece sınırlı kalmıştır. Bu çalışmada glukomannan kullanılan koçlarda karaciğer ve böbrek ile ilgili elde edilen bulguların kontrol grubuna benzerlik gösterdiği; aflatoksin ile birlikte verilen glukomannanın aflatoksine bağlı olarak ortaya çıkan bozuklukları önemli oranda azalttığı gözlenmiştir. Bu veriler yemle birlikte glukomannan kullanımının aflatoksinin karaciğer ve böbrekte oluşturacağı patolojik değişiklikleri azaltmada ya da engellemede etkili olacağını ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak gerek çiftlik gerekse laboratuar hayvanlarında aflatoksine bağlı toksikasyonların önlenmesi gerektiği kaçınılmaz bir gerçektir. Bu amaçla polivinil polipirolidon, zeolit, clinoptilolit gibi birçok ajan kullanılabilmektedir. Bu ajanlardan adsorban özelliği taşıyan glukomannanın da bu amaçla kullanılabileceği bu çalışma ile ortaya konmuştur. Ancak bu tür bağlayıcıların toksikasyonu önleme başarıları yanında işletmelere getirdiği ekonomik yükler de göz ardı edilmemelidir. Bu ve benzeri toksikasyon önleyicilerin ekonomik maliyetlerinin belirlenip aralarından en uygun olanının seçilmesi de sürdürülebilirlik açısından ticari işletmeler için bir nevi zorunluluk teşkil etmektedir. Glukomannan rahatlıkla bulunabilen, ticari olarak satılan ve ekonomik maliyeti çok yüksek olmayan bir bağlayıcıdır. Aflatoksine bağlı toksikasyonların önlenmesinde başarıyla kullanılabilecek bir ajan olduğu sonucuna varılmıştır.

6. ÖZET

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Koçlarda Aflatoksinin Karaciğer ile Böbrek Üzerine Etkileri ve Glukomannan (EG)'ın Koruyucu Etkinliği

Fatma KAYIKCI ÇOLAKOĞLU

Histoloji ve Embriyoloji (Vet) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2012

Sunulan bu çalışmada Merinos ırkı koçlara oral yolla verilen total aflatoksinin karaciğer ve böbrekler üzerine olan etkileri ve aflatoksinle verilen glukomannanın (EG) bu organlarda aflatoksine bağlı olarak oluşacak olumsuz etkilerini azaltıcı/engelleyici etkinliğinin belirlenmesi amaçlandı.

Hayvan materyali olarak, 32 adet 1 yaşlı Merinos ırkı koç kullanıldı. Koçlar her grupta 8 adet olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Gruplardaki koçların her biri ayrı padoklarda tutularak beslendi. Beslemeye 92 gün süreyle devam edildi. Su ve yonca ad libitum olarak verildi. Kontrol (K) grubuna ticari yem, Aflatoksin (A) grubuna ticari yem ile günlük 250 µg aflatoksin, Glukomannan (G) grubuna ticari yem ile günlük 2 gr glukomannan, Aflatoksin+glukomannan (AG) grubuna ise ticari yemle birlikte günlük 250 µg aflatoksin ve 2 gr glukomannan verildi.

Doksaniki günlük besleme periyodunu takiben hayvanlar kesildi. Karaciğer ve böbreklerden alınan doku örneklerinde karaciğer ve böbreğin genel histolojik yapısının yanı sıra karaciğer epitel hücrelerindeki yağlanma oranı, karaciğer ve böbrek hücrelerinde AgNOR sayıları, AgNOR alanları, çekirdek alanları ile AgNOR alanının çekirdek alanına oranları ve hücrelerdeki toksikasyona bağlı değişiklikler değerlendirildi.

Aflatoksin ilave edilen grupta hepatositlerde küçük ve iri damlalı vakuolar dejenerasyonlar ile belirgin hidropik dejenerasyonlar gözlendi. Seroid pigmentasyona maruz kalan çok sayıda tek ve gruplar halinde makrofajlar dikkati çekti. Aflatoksin grubunda karaciğer epitel hücrelerinin AgNOR alanının çekirdek alanına oranları 1. bölgede % 2,60; 2. bölgede % 2,66; 3. bölgede ise % 2,55 olarak bulundu. Bu değerler diğer gruplardan farklı ($P<0,05$) bulundu. Karaciğer epitel hücrelerindeki yağlanma oranının kontrol grubunda % 2,6; aflatoksin grubunda % 35,5; glukomannan grubunda % 2,9 ve aflatoksin+glukomannan grubunda ise % 9,6 olduğu tespit edildi.

Aflatoksin ilave edilen grubun böbrek tubullerinde dejenerasyon ve tubullerin epitel hücrelerinde dökülmeler görüldü. Böbrek damarlarında genişlemeler ve konjesyonlar dikkati çekti. Aflatoksin+glukomannan grubunda böbreğin kontrol grubuna yakın morfolojik yapı gösterdiği gözlendi. Aflatoksin grubunda böbreğin farklı bölgelerindeki hücrelerde AgNOR alanının çekirdek alanına oranları glomerulus bölgesinde % 1,23; tubulus proksimalis bölgesinde % 1,18; tubulus distalis bölgesinde % 1,27 ve tubulus kolektivus bölgesinde ise % 1,44 olarak bulundu. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli ($P<0,05$) olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak; elde edilen veriler, yemle birlikte alınan aflatoksinin karaciğer ve böbrek üzerinde olumsuz etki oluşturabileceğini, bu etkilerin yeme glukomannan (EG) ilave edilerek önemli oranda önlenebileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin; böbrek; glukomannan; karaciğer; koç.

7. SUMMARY

Effects of Aflatoxin on Liver and Kidney, and Protective Effectiveness of Esterified Glucomannan in Ram.

In this study, the effects of total aflatoxin given orally on liver and kidney in Merino rams were studied. In addition, this study was conducted in order to evaluate he efficiacy of a esterified glucomannan for protection against to aflatoxicosis.

As materials, 1 year-old 32 Merino rams were used. Animals were divided into four equal groups. Rams were fed through the 92 days. Water and alfalfa were given *ad libitum*. Control group (K) fed with the commercial feed. Aflatoxin group (A) fed with commercial feed added 250 µg/day of total aflatoxin. Glucomannan group (G) fed with commercial feed added 2 g/day of glucomannan daily. Aflatoxin and glucomannan group (AG) fed with commercial feed added 250 µg/day of total aflatoxin and 2 g/day of glucomannan.

At the end of the 92 day after cessation of the animals, tissue samples were taken from the livers and the kidneys. The general histological structure of liver and kidney tissue samples were additionally evaluated in terms of the ratio of fatty liver, AgNOR counts in the liver and kidney cells nuclei, AgNOR areas, nucleus areas and AgNOR area ratio of the nucleus area, and changes in cells.

Vacuolar degeneration with small and large droplets and hydropic degeneration in hepatocytes were observed in the aflatoxin group. The ceroid pigmentation was observed in macrophages in groups or one by one. The ratio of nuclear area to AgNOR area in the aflatoxin group were found 2,60 % in the first region, 2,66 % in the second region and 2,55 % in the third region. The differences between the groups were statistically important ($P<0,05$). It was observed that fat rate in liver was 2,6 % in the control group, 35,5 % in the aflatoxin group, 2,9 % in the glucomannan grup and 9,6 % in the aflatoxin+glucomannan group.

Degeneration in the renal tubules and loss of tubular epithelial cells was observed in the aflatoxin group. Expansion and congestions of renal veins were noted. Morphological structure of kidney in the aflatoxin+glucomannan group was similar to that of the control group. The ratio of nuclear area to AgNOR area in the kidney of the aflatoxin group were found 1,23 % 1,18 % 1,27 % and 1,44 % in the glomerulus, proximal tubules, distal tubules and collecting tubules, respectively. The differences between the groups were statistically important ($p<0,05$).

In conclusion, the adverse effects causing by aflatoxicosis on the liver and kidney could be ameliorated by adding esterified glucomannan (EG) to the ration.

Key Words: Aflatoxin; glucomannan; kidney; liver; ram.

8. KAYNAKLAR

Abdelhamid AM, El-Shawaf I, El-Ayoty SA, Ali MM, Gamil T. Effect of level of dietary aflatoxins on Baladi rabbits. Arch Tierenahr, 1990; 45(5-6): 517-37.

Abdel-Wahhab MA, Nada SA, Khalil FA. Physiological and toxicological responses in rats fed aflatoxin-contaminated diet with or without sorbent materials. Animal Feed Science and Technology, 2002; 97: 209-19.

Agag BI. Mycotoxins in food and feeds 1-aflatoxins. Ass Univ Bull Environ Res, 2004; 7(1): 173-205.

Akar S, Sur E. The development of chicken cerebellar cortex and the determination of AgNOR activity of the Purkinje cell nuclei. Belg J Zool, 2010; 140(2): 214-22.

Aldemir C. Aflatoksinlerin yumurta tavuklarının dokularına dağılım düzeyleri ve atılım sürelerinin tespiti üzerine araştırma. Veterinarium, 1993; 4(1): 16-21.

Allameh A, Razzaghi M. Mycotoxins: mycological, chemical and environmental aspects, first edition, Tehran, Imam Hossein University Publication, 2001, 353-8.

Aravind KL, Patil VS, Devegowda G, Umakantha B, Ganpule SP. Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally-contaminated feed on performance, serum biochemical and haematological parameters in broilers. Poult Sci, 2003; 82: 570-6.

Armbrecht BH, Shalkop WT, Rollins LD, Pohland AE, Stoloff L. Acute toxicity of AFB_1 in wethers. Nature Lond, 1970; 225: 1062-3.

Arora RG, Appelgren LE, Bergman A. Distribution of [^{14}C]-labeled aflatoxin B_1 in mice. Acta Pharmacol Toxicol, 1978; 43: 273-9.

Asao T, Buchi G, Abdel-Kader MM, Chang SB, Wick EL, Wogan GN. Aflatoxins B and G. J Amer Chem Soc, 1965; 87: 882-6.

Aslan V, Aştı RN, Nizamlıoğlu M, Tekeli T, Başoğlu A, Demirci Ü. Postpartum hastalıklarının yağlı karaciğer sendromu ile ilgisi. Selçuk Ünv Vet Fak Dergisi, 1989; 4(1): 43-51.

Asplin FD, Carnaghan RB. The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. Vet Res, 1961; 73: 1215-9.

Asuzu IU, Shetty SN. Acute aflatoxicosis in broiler chicken in Nsuka, Nigeria. Trop Vet, 1986; 4: 79-80.

Ataman MB, Dönmez HH, Dönmez N, Sur E, Çoyan K. Koçlarda aflatoksinin semen kalitesi, testis histolojisi ile semen hyaluronidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri ve glukomannan (EG)'ın koruyucu etkinliği. Tübitak projesi. 2009; proje no: 107 O 866.

Autrup JL, Schmidt J, Seremet T, Autrup H. Determination of exposure to aflatoxins among Danish workers in animal feed production though the analysis of aflatoxin B_1 adducts to serum albumin. Scand J Work Environ Health, 1991; 17: 436-40.

Aydın MF. Yumurta ve et tavuklarının farklı dokularında gümüşleme metoduyla boyanan nükleolus organizer (AgNOR) bölgeleri dağılımının belirlenmesi, Konya, Selçuk Ünv Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 2004; 1-99.

Baker DC, Green RA. Coagulation defects of aflatoxins in toxicated rabbits. Veterinary Pathology, 1987; 24: 62-70.

Baptista AS, Horii J, Gloria EM. *Saccharomyces cerevisiae* in the reduction of the aflatoxins effects. Eur J Pham Sci, 2001; 13(1): 48.

Baptista AS, Horii J, Calori-Domingues MA. The capacity of mannanoligosaccharides, thermolysed yeast and active yeast to attenuate aflatoxicosis. World J Microbiol Biotechnol, 2004; 20(5): 475-81.

Baptista AS, Abdalla AL, Aguiar CL, Baptista AAS, Micheluchi D, Zampronio AC, Pires DS, Gloria EM, Calori-Domingues MA, Walder JMM, Vizioli MR, Horii J. Utilization of diets amended with yeast and amino acids for the control of aflatoxicosis. World J Microbiol Biotechnol, 2008; 24: 2547-54.

Basmacıoğlu H, Oğuz H, Ergül M, Çöl R, Birdane YO. Effect of dietary esterified glucomannan on performance, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to aflatoxin. Czech J Anim Sci, 2005; 50(1): 31-9.

Bata A, Lasztity R. Detoxification of mycotoxin contaminated food and feed by microorganisms. Trends Food Sci Technol, 1999; 10: 223–8.

Benasutti M, Ejadi S, Whitlow MD, Loechler EL. Mapping the binding site of aflatoxin B_1 in DNA: Systematic analysis of reactivity of aflatoxin B_1 with guanines in different DNA sequences. Biochemistry, 1988;27: 472-81.

Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev, 2003; 16: 497-516.

Blount WP. Turkey ‘‘X’’ disease. J Br Turkey Fed, 1961; 9: 55-8.

Boonyaratpalin M, Supamattaya K, Verakunpiriya V, Suprasert D. Effects of aflatoxin B_1 on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon fabricius*). Aquacult Res, 2001; 32: 388-98.

Bozkurt T, Tanyıldızı S, Türk G. Effects of levamisole on hyaluronidase activity and sperm characteristics in rams. Theriogenology, 2004; 62: 323-4.

Breimer LH. Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: The role of DNA base damage. Mol Carcinogenesis, 1990; 3: 188-97.

Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from Southern Africa. Nature, 1991; 350: 429-31.

Bryden WL, Cumming RB. Observations on the liver of the chicken following aflatoxin B_1 ingestion. Avian Pathology, 1980; 9: 551-6.

Bukhari MH, Niazi S, Khan SA, Hashmi I, Perveen S, Qureshi SS. Modified method of AgNOR staining for tissue and interpretation in histopathology. Int J Exp Path, 2007; 88: 47-53.

Burdon KL. Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations. J Bacteriol, 1946; 52: 665-78.

Burnside JE, Sipple WL, Forgacs J, Carll WT, Atwood MB, Doll ER. A disease of swine and cattle caused by eating moldy corn. II. Experimental production with pure cultures of molds. Am J Vet Res, 1957; 18: 817.

Butler WL, Neal GE. The effect of aflatoxin B_1 on the hepatic structure and RNA synthesis in rats fed a diet marginally deficient in choline. Cancer Research, 1973; 33: 2878-85.

Calnek BC, Barnes HJ, MCDougald LR, Saif YM. Diseases of poultry, 10^{th} ed, Mosby-Wolfe, Iowa State Univ press, 1997. p. 951-79.

Cavalheiro ACL. Aflatoxin and aflatoxicosis. Poulltry Sci J, 1981; 37(1): 34-8.

Chappard D, Gaborit NR, Filmon R, Audran M, Basle MF. Increased nucleolar organizer regions in osteoclast nuclei of Paget’s bone disease. Bone, 1998; 22(1): 45-9.

Churamani CP, Chattopadhyay SK, Pawaiya RS, Johri TS. Patho-anatomical studies on cumulative aflatoxicosis induced with low dose in rabbits. Ind J Vet Pathol, 1995; 19(2): 119-22.

Clarke JD, Hatch RC, Jain AV, Weiss R. Effect of enzyme inducers and inhibitors and glutathion precursor and depleter on induced acute aflatoxicosis in rabbits. Am J Vet Res, 1982; 43(6): 1027-33.

Clarke RN, Doerr JA, Ottinger MA. Relative importance of dietary aflatoxins and feed restriction on reproductive changes associated with aflatoxicosis in maturing White Leghorn male. Poultry Science, 1986; 65: 2239-45.

Colvin BM, Harrison LR, Grosser HS, Hall RF. Aflatoxicosis in feeder cattle. J Am Vet Med Assoc, 1984; 184(8): 956-8.

Coulombe RA JR. Biological action of mycotoxins. Journal of Dairy Sci, 1993; 76(3): 880-91.

Coulter JBS, Hendrickse RG, Lamplugh SM, Macforlane SBJ, Moody JB, Omar MLA, Suliman GL, Williams TE. Aflatoxins and kwashiorkor: Clinical studies in Sudanese children. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1986; 80: 945.

Croy RG, Essigmann JM, Reinhold VN, Wogan GN. Identification of the prencipal aflatoxin B_1-DNA adduct formed *in vivo* in rat liver. Proceeding of National Academy of Sci, 1978; 756: 1745-9.

Crumplen R, D'Amore T, Panchal CJ, Russell I. Industrial uses of yeast: present and future. Yeast, 1989; 5(1): 3-9.

Cullen JM, Newberne PM. Experimental Toxicology of aflatoxins. 1. Acute hepatotoxicity of aflatoxins. In: Eaton DL, Groopman JD, editors. The toxicology of aflatoxins, human health, veterinary and agricultural significance. London: Academic Pres Inc; 1993. p. 3-21.

Culling CFA, Allison RT, Barr WT. Cellular pathology technique. Butterworths and Co Ltd, London, 1985.

Çelik S. Karaciğer karsinojeni olan aflatoksinlerin biyokimyasal, histolojik etkileri ve sağaltım seçenekleri. J Fac Vet Med, 2001; 20: 131-6.

Çelik K, Denli M, Savaş T. Reduction of toxic effects of aflatoxin B1 by using baker yeast *(Saccharomyces cerevisiae)* in growing broiler diets. Rev Bras Zootec, 2003; 32(3): 615-9.

Çetin İ. Avian Aflatoxicosis. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 1990; 7(1): 160-81.

Dafalla R, Yagi AI, Adam SEI. Experimental aflatoxicosis in Hybro-type chicks: Sequential changes in growth and serum constituents and histopathological changes. Vet Human Toxicol, 1987; 29: 222-5.

Davila JC, Edds GT, Osuna O, SimpsonCF. Modification of the effects of aflatoxin B_1 and warfarin in young pigs given selenium. Am J Vet Res, 1983; 44(10): 1877-83.

De Vries HR, Maxwell SM, Hendrickse RG. Foetal and neonatal exposure of aflatoxins. Acta Paediatr Scand, 1987; 78: 373.

Degen GH, Neumann HG. Differences in aflatoxin B_1-suspectibility of rat and mouse are correlated with the capability *in vitro* to inactivate aflatoxin B_1-epoxid. Carcinogenesis, 1981; 2: 299-306.

Demet Ö, Oğuz H, Çelik İ, Nizamlıoğlu F. Pirinçte aflatoksin üretilmesi. Vet Bil Derg, 1995; 11(1): 19-23.

Denli M, Okan F, Doran F, İnal TC. Effect of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on carcass quality, serum lipid variables and histopathological changes of broiler chickens infected with aflatoxin B1. South African Journal of Animal Science, 2005; 35(2): 109-16.

Denning DW. Aflatoxin and human disease. Adverse Drug React Acute Pois Rev, 1987; 4: 175.

Diaz GJ, Hagler WM, Hopkins BA, Whitlow LW. Aflatoxin binder: *in vitro* binding assay for aflatoxin B_1 by several potential sequestering agents. Mycopathologia, 2002; 156: 223-6.

Diaz GJ, Calabrese E, Blain R. Aflatoxicosis in chickens (*Gallus gallus*): an example of hormesis. Poult Sci, 2008; 87(4): 727-32.

Do JH, Choi DK. Aflatoxins: detection, toxicity and biosynthesis. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2007; 12: 585-93.

Donaldson WE, Tung HT, Hamilton PB. Depression of fatty acid synthesis in chick liver by aflatoxin. Comp Biochem Physiol, 1972; 41: 843.

Dönmez N, Keskin E. The effects of aflatoxin and glucomannan on some antioxidant and bichemical parameters in rabbits. Acta Veterinaria, 2008; 58(4): 307-13.

Eaton DL, Groopman JD. The toxicology of aflatoxins-human health. Veterinary and agricultural significance. New York, Academic Press, 1994.

Edrington TS, Harvey RB, Kubena LF. Effect of aflatoxin in growing lambs fed ruminally degradable or escape protein sources. J Anim Sci, 1994; 72: 1274-81.

Ellis O, Smith JP, Simpson BK. Aflatoxins in Food: Occurance, Biosynthesis, Effects on Organisms, Detection, and Methods of Control. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1991; 30(3): 403-39.

Enriquez B. Mycotoxins. Contaminants of animal and human foods. Annales Pharmaceutiques Francaises, 2000; 58(6): 464-9.

Eraslan G, Akdoğan M, Yarsan E, Şahindokuyucu F, Eşsiz D, Altıntaş L. The effects of aflatoxins on oxidative stress in broiler chickens. Türk J Vet Anim Sci, 2005; 29: 701-7.

Ergün E, Ergün L, Eşsiz D. Light and electron microscopic studies on liver histology in chicks fed aflatoxin. Dtsch Tierarztl Wochenschr, 2006; 49: 243-7.

Farombi EO, Adepoju BF, Ola-Davies OE, Emerole GO. Chemoprevention of aflatoxin B_1- induced genotoxicity and hepatic oxidative damage in rats by kolaviron, a natural bioflavonoid of Garcinia kola seeds. Eur J Cancer Prev, 2005a; 14: 207-14.

Farombi EO, Nwankwo JO, Emerole GO. The effect of modulation of glutathione levels on markers for aflatoxin B1-induced cell damage. Afr J Med Sci, 2005b; 34: 37-43.

Farombi EO. Aflatoxin contamination of foods in developing countries: ımplications for hepatocellular carcinoma and chemopreventive strategies. African Journal of Biotechnology, 2006; 5(1): 1-14.

Fink GJ. Mycotoxins: Their implications for human and animal health. Vet Quart, 1999; 21: 115-20.

Gaal T, Reid IM, Collins RA, Roberts CJ, Pike BV. Comparison of biochemical and histological methods of estimating fat content of liver of dairy cows. Res Vet Sci, 1983; 34: 245-8.

Gerbes AL, Caselmann WH. Point mutations of the p53 gene, human hepatocellular carcinoma and aflatoxins. Journal of Hepatology, 1993; 19(2): 312-5.

Girish CK, Devegowda G. Efficacy of glucomannan-containing yeast product (Mycosorb) and hydrated sodium calcium aluminosilicate in preventing the individual and combined toxicity

of aflatoxin and T-2 toxin in commercial broilers. Asian- Australian J Anim Sci, 2006; 19: 877-83.

Glahn RP, Beers KW, Bottje WG, Wideman RF Jr, Huff WE, Thomas W. Aflatoxicosis alters avian renal function, calcium and vitamin D metabolism. J Toxicol Environ Health, 1991; 34(3): 309-21.

Godoy HM, Neal DJ. Some studies of the effects of aflatoxin B_1 *in vivo* and *in vitro* on nucleic acid synthesis in rat and mouse. Chemico-Biological Interactions, 1976; 13: 257-77.

Gradelet S, Bon ML, Bergès R, Suschetet M, Astorg P. Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B_1-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat: Role of the modulation of aflatoxin B_1 metabolism. Carcinogenesis, 1998; 19(3): 403-11.

Greene HJ, Ochme FW. A possible case of equine aflatoxicosis. Clin Toxicol, 1976; 9: 251.

Groopman JD, Wang JS, Scholl P. Molecular biomarkers for aflatoxins: From adducts to gene mutations to human liver cancer. Can J Physiol Pharmacol, 1996; 74: 203-9.

Grosman ME, Elias MM, Comin EJ, Rodriguez Garay EA. Distal nephron function of the rat during acute aflatoxicosis. Toxicol Lett, 1984; 21(3): 263-70.

Guengerich FP, Johnson WW, Ueng YF, Yamazaki H, Shimada T. Involvement of cytochrome p450, glutathione S-transferase and epoxide hydrosale in the metabolism of aflatoxin B_1 and relevance to risk of human liver cancer. Environmental Health Perspectives, 1996; 104(3): 557-62.

Guengerich FP, Johnson WW, Shimada T, Ueng YF, Yamazaki H, Langouet S. Activation and detoxication of aflatoxin B_1. Mutant Res, 1998; 402: 121-8.

Guengerich FP. Forging the links between metabolism and carsinogenesis. Mut Res, 2001; 488: 195-209.

Guengerich FP. Cytochrome p450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. AAPS J, 2006; 10(8): 101-11.

Guerre P, Eeckhoutte C, Larrieu G, Burgat V, Galtier P. Dose-related effect of aflatoxin B_1 on liver drug metabolizing enzymes in rabbits. Toxicol, 1996; 108: 39-48.

Guindon KA, Bedard LL, Massey TE. Elevation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA from isolated Mouse lung cells following *in vivo* treatment with aflatoxin B1. Toxicol Sci, 2007; 98: 57-62.

Gül Y, Kızıl Ö, Çeribaşı AO. Bir kedide primer hepatik lipidozis olgusu. Fırat Ünv Sağlık Bilimleri Vet Dergisi, 2006; 20(5): 375-8.

Halver JE. Aflatoxicosis and rainbow trout hepatoma. In: Wogan GN, ed. Mycotoxins in foodstuffs, MIT Pres, Cambridge, Massachusetts, 1965. p. 209-34.

Han EM, Park HR, Hu SJ, Kwon KS, Lee HM, Ha MS, Kim KM, Ko EJ, Ha SD, Chun HS, Chung DH, Bae DH. Monitoring of aflatoxin B1 in livestock feeds using ELISA and HPLC. J Microbiol Biotechnol, 2006; 16: 643-6.

Harvey RB, Phillips TD, Ellis JA, Kubena LF, Huff WE, Peterson HD. Effects on aflatoxin M_1 residues in milk by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to aflatoxin-contaminated diets of dairy cows. American Journal of Veteriary Research, 1991; 52(9): 1556-9.

Harvey RB, Kubena LF, Elissalde MH, Phillips TD. Efficacy of zeolite ore compounds on the toxicity of aflatoxin to growing broiler chicken. Avian Diseases, 1993; 73: 67-73.

Harvey RB, Kubena LF, Elissalde MH. Influence of vitamin E on aflatoxicosis in growing swine. Am J Vet Res, 1994; 55(4): 572-7.

Hastings CE JR, Llewellyn GC. Reduced aflatoxicosis in livers of hamsters fed a manganese sulfate supplement. Nutrition and Cancer, 1987; 10(1-2): 67-77.

Hendrickse RG. Clinical implications of food contaminated by aflatoxins. Ann Acad Med Singapore, 1991; 20: 84-90.

Hinton DM, Myers MJ, Raybourne RA, Francke-Carroll S, Sotomayer RE, Shaddock J, Warbritton A, Chou MW. Immunotoxicity of aflatoxin B_1 in rats: Effects on lymphocytes and the inflammatory response in a chronic intermittent dosing study. Toxicological Sciences, 2003; 73: 362-77.

Hintz HF. Molds, mycotoxins and mycotoxicosis. Vet Clin North Am Equine Pract, 1990; 6(2): 419-31.

Hoogenboom LAP, Polman Th HG, Neal GE, Verma A, Guyomard C, Tulliez J, Gautier JP, Coker RD, Nagler MJ, Heidenreich E, Delort-Laval J. Genotoxicity testing of extracts from aflatoxin contaminated peanut meal, following chemical decontamination. Food Additivies and Contaminants, 2001; 18(4): 329-41.

Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. Mutational hot spot in the p53 gene in hepatocellular carcinomas. Nature (London), 1991; 350: 427-8.

Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology, 2001; 167(2): 101-34.

Huwig A, Friemud S, Kappeli O, Dutler H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. Toxicol Lett, 2001; 122: 179-88.

Ikegwuonu FI, Egbunike GN, Emerole GO, Aire TA. The effects of aflatoxin B_1 on some testicular and kidney enzyme activity in rat. Toxicology, 1980; 17(1): 9-16.

Jacobson WC, Wiseman HG. The ttranmission of aflatoxin B_1 into Eggs. Poultry Science, 1974; 53: 1743-5.

Jelinek CF, Pohland AE, Wood GE. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds - an update. J Assoc Off Anal Chem, 1989; 72: 223-30.

Jindal N, Mahipal SK, Mahajan NK. Toxicity of alatoxin B_1 in broiler chicks and its reduction by activated charcoal. Res Vet Sci, 1994; 56: 37-40.

Johnson WW, Ueng YF, Widersten M, Mannervik B, Hayes JD, Sherratt PJ, Ketterer B, Guengerich FP. Conjugation of highly reactive aflatoxin B_1 exo-8,9-epoxide catalyzed by rat and human glutathione transferases: estimation of kinetic parameters. Biochemistry, 1997; 36: 3056-60.

Kaden DA, Call KM, Leong PM, Konives EA, Thilly WG. Killing and mutation of human lymphoblast cells by aflatoxin B_1: Evidence for an inducible repair response. Cancer Res, 1987; 47: 1993-2001.

Kamalzadeh A, Hosseini A, Moradi S. Effects of yeast glucomannan on performance of broiler chickens. Int J Agriculture Biol, 2009; 11(1): 49-53.

Karademir N, Güvenç T, Yarım M, Orman MM, Gülbahar MY. Comparison of AgNORs staining and PCNA immunostaining methods and mitotic index scores in intracutaneous cornifying epithelioma and squamous cell carcinoma. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 1996; 43: 281-5.

Karaman M, Basmacıoğlu H, Ortatatlı M, Oğuz H. Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology. Br Poult Sci, 2005; 46(3): 394-400.

Karemlampi SO. Mechanism of cytotoxicity of aflatoxin B1. Biochem Biophys Res Comm, 1987; 145: 854-60.

Kaya S. Süt yemi ve çiğ sütte aflatoksin kalıntılarının kromatografik yöntem ile araştırılması. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1982; 29(3-4): 443-57.

Kaya S. Yem ve besinlerdeki mikotoksinler: İnsan ve hayvan sağlığı için önemleri. AÜ Vet Fak. Derg, 1984; 36: 226-33.

Kaya S, Baydan E, Yarsan E, Özdemir M, Çelik S. Etlik piliçlerde sulu sodyum kalsiyum alüminyum silikat'ın B1-vitamin A ve C'yi bağlama kapasitesi. Çiftlik Dergisi, 2000; 70-4.

Kaya S, Pirinçci İ, Traş B, Ünsal A, Bilgili A, Akar F, Doğan A, Yarsan E. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. Ankara: Medisan Yayınevi; 2002. p. 544-50.

Keçeci T, Oğuz H, Kurtoğlu V, Demet O. Effects of polyvinylpolypyrrolidone, synthetic zeolite and bentonite on serum biochemical and haemetological characters of broiler chickens during aflatoxicosis. Br Poult Sci, 1998; 39(3): 452-8.

Khan WA, Khan MZ, Khan A, Hussain I. Pathological effects of aflatoxin and their amerilation by vitamin E in white leghorn layers. Pak Vet J, 2010; 30(3): 155-62.

Kıran MM, Demet O, Ortatatlı M, Oğuz H. The preventive effect of polyvinypolypyrrolidone on aflatoxicosis in broilers. Avian Pathol, 1998; 27(3): 250-5.

Korek BG, Martin H, Wenzelides K. A modified method for the detection of nucleolar organiser regions (AgNOR). Acta Histochem, 1991; 90: 155-7.

Krause OG, Richardson CR, Castleberry RE. Biological response of chicks fed sorghum grain based diets with added grain spesific enzymes mixture and yeast. Tex Technol Agric Sci, 1989; 5: 727-35.

Krishna L, Dawra RK, Vaid J, Gupta VK. An outbreak of aflatoxicosis in Angora rabbits. Vet Hum Toxicol, 1991; 32(2): 159-61.

Kubena LF, Harvey RB, Huff WE, Corrier DE. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin. Poultry Science, 1990; 69: 1078-86.

Kubena LF, Harvey RB, Phillips TD, Clement BA. Effects of hydrated sodium calcium aluminosilicate on aflatoxicosis in broiler chicks. Poultry Science, 1993; 72: 651-7.

Kubena LF, Harvey RB, Bailey RH, Buckley SA, Rottinghaus GE. Effects of hydrated sodium calcium aluminosilicate (T-Bind™) on mycotoxicosis in young broiler chickens. Poultry Science, 1998; 77: 1502-9.

Kuhn DM, Ghannoum MA. Indoor mold, toxigenic fungi, and Stachybotrys chartarum: infectious disease perspective. Clin Microbiol Rev, 2003; 16: 144-72.

Kuiper- Goodman T. Risk assessment to humans of mycotoxins in animal–derived food products. Vet Hum Toxicol, 1991; 33(4): 325-32.

Kumagai S. Intestinal absorption and excretion of aflatoxins in rats. Toxicol Appl Pharmocol, 1989; 97(1): 88-97.

Lakkawar AW, Chattopadhyay SK, Johri TS. Experimental aflatoxin B_1 toxicosis in young rabbits-a clinical and patho-anatomical study. Slov Vet Res, 2004; 41(2): 73-81.

Lancaster MC, Jenkins FP, Philp JM. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature, 1961; 192:1095-6.

Lawson B, MacDonald S, Howard T, Macgregor SK, Cunningham AA. Exposure of garden birds to aflatoxins in Britian. Sci Total Environ, 2006; 361(1-3): 124-31.

Lee W, Kim Y, Lee KY, Kang CS, Lee W, Lee KS. AgNOR of human interphase cells in relation to acrocentric chromosomes. Cancer Genet Cytogenet, 1999; 113: 14-8.

Leeson S, Diaz G, Summers JD. Aflatoxins. In: Leeson S, Gonzala JDG, Summers JD, editors. Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins. Ontario: University Books; 1995. p. 249-98.

Lotlikar PD, Jhee EC, Insetta SM, Clearfield MS. Modulation of microsome-mediated aflatoxin B_1 binding to exogenous and endogenous DNA by cytosolic glutathione S-transferases in rat and hamster livers. Carcinogenesis, 1984; 5: 269-76.

Lyman BA, Erki L, Biedrzycka DW, Devlin TM, Ch'ih JJ. Modification of protein synthetic components by aflatoxin B_1. Biochemical Pharmacology, 1988; 37(8): 1481-6.

Marvan F, Vernerova E, Samek M, Reisnervov H, Nemec J, Martakova R. Aflatoxin B_1 residues in the organs of young poultry. Biol Chem Vet, 1983; 24: 85-92.

Mathuria N, Verma RJ. Curcumin ameliorates aflatoxin-induced lipid peroxidation in liver, kidney and testis of mice-an *in vitro* study. Acta Poloniae Pharm Drug Res, 2007; 63(5): 413-6.

McGuire MA, McGuire MK. Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. Proc Am Soc Anim Sci, 1999; 1-8.

Mckenzie RA, Blaney BJ, Connole MD, Firzptrick LA. Acute aflatoxicosis in calves fed peanut hay. Austr Vet J, 1981; 57: 284-6.

McLean M, Dutton MF. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin : an update. Pharmocol Ther, 1995; 65: 163-92.

Meki AR, Abdel-Ghaffar SK, El-Gibaly I. Aflatoxin B1 induces apoptosis in rat liver: protective effect of melatonin. Neuro Endocrinol Lett, 2001; 22(6): 417-26.

Merkley JW, Maxwell RJ, Phillips JG, Huff WE. Hepatic fatty acids profiles in aflatoxin-exposed broiler chickens. Poult Sci, 1987; 66:59.

Miazzo R, Rosa CA, De Queiroz Carvalho EC, Magnoli C, Chiacchiera SM, Palacio G, Saenz M, Kikot A, Basaldella E, Dalcero A. Efficacy of synthetic zeolite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. Poultry Sci, 2000; 79: 1-6.

Mishra HN, Chitrangada D. A review on biological control and metabolism of aflatoxin. Crit Rev Food Sci Nutr, 2003; 43(3): 245-64.

Milli ÜH, Hazıroğlu R. Veteriner Patoloji, I. Cilt, Ankara, Medisan, 2000.

Mogadam N, Azizpour A. Ameliorative effects of glucomannan-containing yeast product (Mycosorb) and sodium bentonite on performance and antibodt titers against Newcastle disease in briolers during chronic aflatoxicosis. Afr J Biotechnology, 2011; 10(75): 17372-8.

Morehouse LG. Mycotoxins-their toxicology and principle lesions. Proc US Anim Health Assoc, 1981; 232.

Morrissey RE, Norred WP, Hinton DM. Combined effects of the mycotoxins aflatoxin B_1 and Cyclopiazonic acid on Sprague-Dawley rats. Food Chem Toxicol, 1987; 25: 837–42.

Murthy TNK, Reddy BN, Devegowda G. Evalutation of glucomannan for its adsorbing ability of aflatoxin B_1 and T-2 toxin in the gastrointestinal tract of brioler chickens. Mycoxoxin Res, 2002; 8(1): 20-3.

Nakae D, Konishi Y, Farber JL. A role for oxygen radicals in the hepatotoxicity of aflatoxin B_1 and dimethyl nitrosamine. Proc Jap Cancer Assoc, 1987; 38.

Newberne PM, Butler WH. Acut and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals. Cancer Research, 1969; 29: 236-50.

Newberne PM, Rogers AE. Animal toxicity of major environmental toxins. In: Shanks RC, ed. Enviromental Risks, Boca Raton: CRC Press; 1981. p. 51-106.

Newman SJ, Smith JR, Stenske KA, Newman LB, Dunlap JR, Imerman PM, Kirk CA. Aflatoxicosis in nine dogs after exposure to contaminated commercial dog food. J Vet Diagn Invest, 2007; 19: 168-75.

Niranjan BG, Bhat NK, Avadhani NG. Preferential attack of mitochondrial DNA by aflatoxin B_1 during hepatocarcinogenesis. Science, 1982; 215: 73-5.

Nunez O, Hendricks JD, Tong AT. Inter-relationships among aflatoxin B_1 (AFB_1) metabolism, DNA-binding, cytotoxicity and hepatocarcinogenesis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss.* Dis Aquat Org, 1990; 9(15): 15-23.

Nyandieka HS, Wakhisi J. The impact of vitamins A, C, E and selenium compound on prevention of liver cancer in rats. East Afr Med J, 1993; 70(3): 151-3.

Oğuz H, Kurtoğlu V. Effect of clinoptilolite on performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. Br Poult Sci, 2000; 41(4): 512-7.

Oğuz H, Hadimli HH, Kurtoğlu V, Erganiş O. Evaluation of humoral immunity of broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. Revue Med Vet, 2003; 154(7): 483-6.

Oğuz H. A review from experimental trials on detoxification of aflatoxin in poultry feed. Eurasion J Vet Sci, 2011; 27(1): 1-12.

Okoye JOA, Asuzu IU, Gugnani JC. Paralysis and lameness associated with aflatoxicosis in broilers. Avian Pathol, 1988; 17: 731-4.

Oliveira CAF, Kobashigawa E, Reis TA, Mestieri L, Albuquerque R, Corrêa B. Aflatoxin B_1 residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. Food Additives and Contaminants, 2000; 17(6): 459-62.

Ortatatlı M, Oğuz H. Ameliorative effects of dietary clinoptilolite on pathological changes in broiler chickens during aflatoxicosis. Res Vet Sci, 2001; 71(1): 59-66.

Ortatatli M, Çiftçi MK, Tuzcu M, Kaya A. The effects of aflatoxin on the reproductive system of roosters. Res Vet Sci, 2002; 72(1): 29-36.

Özen H, Karaman M, Çiğremiş Y, Tuzcu M, Özcan K, Erdağ D. Effectiveness of melatonin on aflatoxicosis in chicks. Research in Veterinary Sciences, 2009; 86: 485-9.

Özpınar H, Özpınar A, Şenel HS. Marmara bölgesi yem fabrikalarından alınan kanatlı karma yemleri ve yem hammaddelerinin aflatoksin ve okratoksin A yönünden incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1988; 14(2): 11-8.

Öztürk M. P53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. Lancet, 1991; 338: 1356–9.

Parhizkar A, Mirhadi SA, Allameh A. Effects of aflatoxin B1 on liver nuclear DNA biosynthesis in growing and day-old chickens. Arch Razi Ins, 2002; 53: 57-65.

Park DL. Effect of processing on aflatoxin. Adv Exp Med Biol, 2002; 504: 173-9.

Parlat SS, Ozcan M, Oğuz H. Biological suppression of aflatoxicosis in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) by dietary addition of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Res Vet Sci, 2001; 71: 207–11.

Pasupathy K, Krishna M, Bhattacharya RK. Alterations of phosphatidylinositol signal pathway in hepatic mitochondria following aflatoxin B_1 administration. Indian J Exp Biol, 1999; 47: 876-80.

Patel JW. Stimulation of cyclophosphamide induced pulmonary microsomal lipid peroxidation by oxygen. Toxicology, 1987; 45:71.

Peraica M, Domijan A, Jurjevic Z, Cvjetkovic B. Prevention of exposure to mycotoxins from food and feed. Arch Hig Rada Toxicol, 2002; 53: 229–37.

Petr T, Barta I, Turek B. *In vitro* effect of mutagenic activity of aflatoxin B_1. Hyg Epidemiol Microbiol Immunol, 1995; 34: 123-8.

Platon D, Menager M, Jeanesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualisation of the argyrophilic proteins of the nucleolus organiser region at the optical level. Histochem J, 1986; 18: 5-14.

Pohland AE, Wood GE. Occurrence of mycotoxins in food. In: Krogh P, editor. Mycotoxins in food. London: Academic Press; 1987. p. 35-64.

Pohland AE. Mycotoxin in review. Food Add Contam, 1993; 10: 17-28.

Quist CF, Bounous DI, Kılburn JV, Nettles VF, Wyatt RD. The effect of dietary aflatoxin on wild turkey poults. Journal of Wildlife Diseases, 2000; 36(3): 436-44.

Raju MVLN, Devegowda G. Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haemotology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). British Poultry Science, 2000; 41: 640-50.

Raju MVLN, Devegowda G. Esterified glucomannan in broiler chicken diets contaminated with aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin: evalution of its binding ability (*in vitro*) and efficacy as immunomodulator. Australian J Anim Sci, 2002; 15: 1051-6.

Rainbow L, Maxwell SM, Hendrickse RG. Ultrastructural changes in murine lymphocytes induced by aflatoxin B1. Mycopathologia, 1994; 125: 33.

Raval PJ, Verma RJ. Aflatoxin induced cytotoxicities in rabbits hepatocytes. J Anim Morphol Physiol, 1997; 44: 1-4.

Ravi R, Kumar SA, Kumar RA. Bichemical changes induced in liver and serum of aflatoxin B_1-treated male Wistar rats: preventive effect of picroliv. Pharmacology and Toxicology, 2001; 88(2): 53-8.

Reddy CV. Aflatoxins in Feed: An Enemy to Poultry Producers in the Tropics. World Poultry, 1992; 8(6): 19-20.

Richard JL. Discovery of aflatoxins and significant historical features. Toxin Reviews, 2008; 27: 171-201.

Rhee JI, Kang TH, Lee KI, Sohn OJ, Kim SY, Chung SW. Application of principal component analysis and self-organizing map to the analysis of 2D fluorescence spectra and the monitoring of fermentation processes. Biotechnol Bioprocess Eng, 2006; 11: 432-41.

Robens JF, Richard JL. Aflatoxins in animal and human health. Rev Environ Contam Toxicol, 1992;127: 69-94.

Robinson RM, Ray AC, Reagor JC, Holland LA. Waterfowl mortality caused by aflatoxicosis in Texas. Journal of Wildlife Diseases, 1982; 18(3): 311-3.

Rogers AE, Newberne PM. The effects of aflatoxin B1 and dimethyl sulfoxide on 3H-tymidine uptake and mitosis in rat liver. Cancer Research, 1967; 27: 855-64.

Rosa CAR, Miazzo R, Magnoli C, Salvano M, Chiacchiera SM, Ferrero S, Saenz M, Carvalho ECQ, Dalcero A. Evaluation of the efficacy bentonite from the south of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. Poult Sci, 2001; 80: 139-44.

Royes JB, Yanong RP. Molds in fish feeds and aflatoxicosis. Copyright by the University of Florida, Institute of Agric Sci, 1992.

Rumbeiha W. Mycotoxicosis in pets. DCPAH-Newsletter, 2001; 18(2).

Sachan DS, Yatim AM. Suppression of aflatoxin B_1-induced lipid abnormalities and macromolecule-adduct formation by L-carnitine. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 1992; 11(4): 205-10.

Sağlam M, Aştı RN, Özer A. Genel Histoloji, genişletilmiş 5. baskı, Ankara, Yorum Matbaacılık Sanayi, 1997.

Sahoo PK, Chattopadhyay SK, Johri TS, Charan K, Sikdar A. Pathology of experimental aflatoxicosis in rabbits. Ind J Anim Sci, 1993; 63: 268-73.

Salim AB, Zohair A, Hegazy AES, Said A. Effect of some strains of probiotic bacteria against toxicity induced by aflatoxins *in vivo*. J Am Sci, 2011; 7(1): 1-12.

Santurio JM, Mallmann CA, Rosa AP, Appel G, Heer A, Dageforde S, Bottcher M. Effects of sodium bentonite on the performance and blood variables of broiler chickens in intoxicated with aflatoxin. British Poultry Science, 1999; 40: 115-9.

Schwartz AG, Perantoni A. Protective effect of dehydroepiandrosterone againts aflatoxin B1 and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced cytotoxicityand transformation in cultured cell. Cancer Res, 1975; 35: 2482.

Sehu S, Ergün L, Çakır S, Ergün E, Cantekin Z, Şahin T, Eşsiz D, Sareyyüpolu B, Gürel Y, Yiğit Y. Hydrated sodium calcium aluminosilicate for reduction of aflatoxin in quails (*Coturnix coturnix japonica*). Dtsch Tierarztl Wochenschr, 2007; 114: 252-9.

Sengstag C. The molecular mechanism of aflatoxin B_1- induced liver cancer: is mitotic recombination involved. Molecular Carcinogenesis, 1997; 19: 147-52.

Singh KP, Singh R, Singh YP, Telang AG, Mehrotra ML. Investigation of mortality due to aflatoxicosis in New Zealand White rabbits. Ind J Vet Pathol, 1999; 23: 83-4.

Shanks ET, Statkiewicz WR, Llwelleyn GC, Dashak WV. Tissue distribution and hepatic ultrastructural effects of aflatoxin B_1 in Japanese quail. Pol Arch Weter, 1986; 26: 117-31.

Shen HM, Shi CY, Lee HP, Ong CN. Aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. Toxicol Appl Pharmocol, 1994; 127(1): 145-50.

Shen HM, Ong CN, Shi CY. Involvement of reactive oxygen species in aflatoxin B_1 induced cell injury in cultured rat hepatocytes. Toxicol, 1995; 99(1-2): 115-23.

Shi CY, Phang TW, Lin Y, Wee A, Li B, Lee HP, Ong CN. Codon 249 mutation of the p53 gene is a rare event in hepatocellular carcinomas from ethnic Chinese in Singapore. British Journal of Cancer, 1995; 72: 146-9.

Shotwell OL, Hasseltine CW, Stubblefield RD, Sorenson WG. Production of aflatoxin on rice. Appl Mler, 1966; 5: 425-9.

Smela ME, Currier SS, Bailey EA, Essigman JM. The chemistry and biology of aflatoxin B_1: from mutational spectrometry to carcinogenesis. Carcinogenesis, 2001; 22(4): 535-45.

Smith JE, Solomons G, Lewis C, Anderson JG. Role of mycotoxins in human and animal nutrition and health. Nat Toxins, 1995; 3(4): 187-92.

Squire RA. Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach. Science, 1989; 214: 887-91.

SPSS, SPSS statistics v.17.0. Base Manuel for the IBM. Polar Engineering and Consulting, SPSS Inc, 2008.

Stanley VG, Ojo R, Woldensenbet S, Hutchinson DH. The use of *Saccharomyces cerevisiae*, to suppres the effect of aflatoxicosis in broiler chicks. Poultry Sci, 1993; 72: 1867–72.

Stresser DM, Bailey GS, Williams DE. Indole-3-carbinol and α-naphthoflavone induction of aflatoxin B_1 metabolism and cytochrome p450 associated with bioactivation and detoxication of aflatoxin B_1 in the rats. Drug Metab Dispos, 1994; 22: 383-91.

Stroka J, Anklam E, Otterdijk R. Immunoaffinity columnclean-up prior to thin layer chromatography for determination of aflatoxins in various food matrices. Journal of Chrom, 2000: 904; 251-6.

Stubblefield RD, Shotwell OL, Shannon GM. Aflatoxins M_1 and M_2 and parasiticol: thin layer chromatography and physical and chemical properties. Journal of the Aoae, 1972; 55(4): 762-7.

Stubblefield RD, Pier AC, Richard JL, Shotwell OL. Fate of aflatoxins in tissues, fluids and excrements from cows dosed orally with aflatoxin B1. American Journal of Veterinary Research, 1983; 44(9): 1750-2.

Sudakin DL. Dietary aflatoxin exposure and chemoprevention of cancer: a clinical review. J Toxicol Clin Toxicol, 2003; 41: 195-204.

Sudhakar BV. The carry-over effect of aflatoxin B_1 into eggs and liver of chicken. Indian Vet J, 1992; 69: 1061-2.

Swenson DH, Lin J, Miller EC, Miller JA. Aflatoxin B_1-2,3-oxide as a probable intermediate in the covalent binding of aflatoxin B_1 and B_2 to rat liver DNA and ribosomal RNA *in vivo*. Cancer Res, 1977; 37: 172-81.

Swick RA. Hepatic metabolism and bioactivation of mycotoxins and plant toxins. J Anim Sci, 1984; 58(4): 1017-28.

Şahin K, Sarı M. Elazığ yöresinde yaygın olarak kullanılan yemlerin bakteri ve mantar florası üzerine bir araştırma. Fırat Üniv Sağ Bil Derg, 1996; 10(2): 251-8.

Toskulkao C, Taycharpipranai S, Glinsukon T. Enhanced hepatotoxicity of aflatoxin B_1 by pretreatment of rats with ethanol. Res Comm Chem Pathol Pharmacol, 1982; 36: 477-82.

Toskulkao C, Glinsukon T. Hepatic lipid peroxidation and intracellular calcium accumulation in ethanol potentiated aflatoxin B_1 toxicity. J Pharmacobio Dyn, 1988; 11: 191-7.

Tulpule PG. Aflatoxins-experimental studies. J Cancer Res Clin Oncol, 1981; 99(1-2): 137-42.

Tung HT, Donaldson WE, Hamilton PB. Altered lipid transport during aflatoxicosis. Toxicol Appl Pharmacol, 1972; 22: 97.

Tuzcu M, Sur E, Çelik İ, Öznurlu Y, Çiftçi MK. Effects of aflatoxin on the proportions of peripheral blood leukocytes and alpha-naphtyl acetate esterase (ANAE) positive lymphocytes in the mouse. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 2010; 16(2): 337-41.

Uopasai S, Pimpukdee K, Tengjaroenkul B, Muanglai P, Surachon P. Effect of natural charcoal powder added in swine feeds as aflatoxin adsorbents on improving performance of swine production and histopathological changes of swine livers. KKU Vet J, 2008; 18(2): 109-19.

Ünal T. Hemodinamik bozukluklar. Ege Ünv Diş Hekimliği Fak, 2012; 1-11. http://www. dent.ege.edu.tr/ dosyalar/kaynaklar /301_patoloji/13.pdf/2012/08/20.

Venkateswaran PS, Millman I, Blumberg BS. Effects of an extract from Phyllanthus niruri on hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses: *In vivo* and *in vitro* studies. Proc Nat Acad Sci, 1987; 84: 274.

Verma RJ, Raval PJ. Cytotoxicity of aflatoxin on red blood corpuscles. Bull Environ Contam Toxicol, 1991; 47: 428-32.

Verma RJ, Chaudhari SB. Detection of aflatoxin in human urine. Indian J Environ Toxicol, 1997; 7: 47-8.

Verma RJ, Chaudhari SB. Aflatoxins in human saliva. Indian J Toxicol, 1998; 5: 45-6.

Verma RJ, Nair A. Vitamin E prevents aflatoxin-induced lipid peroxidation in liver and kidney. Med Sci Res, 1999; 27: 223.

Verma RJ, Nair A. Ameliorative effect of vitamin E on aflatoxin-induced lipid peroxidation in the testis of mice. Asian J Androl, 2001; 3: 217.

Verma RJ. Aflatoxin cause DNA damage. Int J Hum Genet, 2004; 4(4): 231-6.

Vicam LP. Fluorometer USDA-FGIS prodecure for corn, corn meal, corn/soy blend, milled rice, popcorn, sorghum and soybeans. Aflatest Instruction Manuel, 1999; 36-8.

Vinita R, Prasad LN, Sinha BK. Pathological and histochemical changes in liver and kidneys in experimental aflatoxicosis in rabbits. Ind J Vet Pathol, 2003; 27(1): 57.

Wang JS, Shen X, He X, Zhu YR, Zhang BC, Wang JB, Qian GS, Kuang SY, Zarba A, Egner PA, Jacobson LP, Munoz A, Helzlsouer KJ, Groopman JD, Kensler TW. Protective alterations in phase 1 and 2 metabolism of aflatoxin B1 by oltipraz in residents of Qidong, people's Republic of China. J Natl Cancer Inst, 1999; 91: 347-54.

Wilson DM, Payne GA. Factors affecting *Aspergillus flavus* group infection and aflatoxin contamination of crops. In: Eaton DL, Groopman JD, editors. The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance. London: Academic Press; 1994. p. 309-25.

Whitlow LW, Hagler WM. Mycotoxins in dairy cattle: occurrence, toxicity, prevention and treatment. Proc Southwest Nutr Conf, 2005; 124-38.

Wogan GN. Aflatoxin as a human carcinogen. Hepatology**,** 1999; 30: 573-5.

Wyatt RD, Briggs DM, Hamilton PB. The effect of dietary aflatoxin on mature broiler breeder males. Poult Sci, 1973; 52: 1119-23.

Wylie TD, Morehouse LG. Mycotoxic fungi, mycotoxins and mycotoxicosis. An Encylopedic Handbook, 1978; 2: 414-27.

Yener Z, Çelik İ, İlhan F, Bal R. Effects of Urtica Dioica L seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats. Food and Chemical Toxicology, 2009; 47: 418-24.

Yıldırım E, Yalçınkaya İ, Kanbur M, Çınar M, Oruç E. Effects of yeast glucomannan on performance, some biochemical parameters anf pathological changes in experimental aflatoxicosis in broilers chickens. Revue Med Vet, 2011; 162(8-9): 413-20.

Yiannikouris A, Poughon L, Cameleyre X. A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. Biotechnol Lett, 2003; 25(10): 783-9.

Younes M, Seigers CP. Interrelation between lipid peroxidation and other hepatotoxic event. Biochem Pharmacol, 1984; 33: 2001.

Yu FL. Studies on the mechanism of aflatoxin B_1 inhibition of rat liver nuclear RNA synthesis. Journal of Biological Chemistry, 1981; 256: 3292-7.

Yu J, Bhatnagar D, Ehrlich KC. Aflatoxin biosynthesis. Rev Iberoam Micol, 2002; 19: 191-200.

Zaczek M, Macie jowski J, Gil K, Szot W, Chlap Z. Silver-binding nucleolar organiser regions (AgNORs) in the normal epithelium of different parts of the digestive tract in rats. Acta Pathol Jpn, 1992; 42(8): 573-8.

10. ÖZGEÇMİŞ

17.01.1978 yılında Konya'da doğdu. İlköğretim ve lise eğitimini Konya'da tamamladıktan sonra 1995 yılında kazandığı Pamukkale Üniversitesi Jeoloji Mühendisliği'nden ayrıldı. 1997 yılında girdiği Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2002 yılının Haziran döneminde dönem üçüncüsü olarak mezun oldu. 2005'de aynı okulun Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. Evli ve İngilizce bilmektedir.