T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENTİTÜSÜ

ETLİK PİLİÇLERDE ÇÖREK OTU TOHUMU VE TİMOKİNONUN KARACİĞERDE AFLATOKSİN BİYOTRANSFORMASYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

MEHMET BURAK ATEŞ

VETERİNERLİK PATOLOJİSI ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. MUSTAFA ORTATATLI

KONYA 2019

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENTİTÜSÜ

ETLİK PİLİÇLERDE ÇÖREK OTU TOHUMU VE TİMOKİNONUN KARACİĞERDE AFLATOKSİN BİYOTRANSFORMASYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

MEHMET BURAK ATEŞ

VETERİNERLİK PATOLOJİSI ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. MUSTAFA ORTATATLI

Bu araştırma TÜBİTAK-3001- Başlangıç AR-GE Desteklemeleri programı tarafından 117O872 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA 2019

ÖNSÖZ

Aflatoksin, insanlar ve birçok hayvan türü için hepatotoksik, genotoksik ve immünotoksik etkileri bulunan, çok çalışılan ve iyi bilinen küresel kanserojen bir maddedir. Aflatoksinler, broylerler başta olmak üzere tüm kümes hayvanlarında gelişme geriliği, yumurta üretiminin azalması, hastalıklara karşı duyarlılığın artması gibi etkileri nedeniyle ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Aflatoksinlerin zararlı etkileri ortaya çıktıkça, bunların önlenmesi veya giderilmesi konusunda yapılan çalışmalar da önem kazanmıştır. Öte yandan bu amaçla denenen pek çok madde ve metodun kullanımı, uygulamasının pratik ve ekonomik olmaması, etkin konsantrasyonlarda toksisiteye sebep olabilmeleri, besinlerde rezidü bırakması veya toksik funguslarda direnç gelişmesi gibi nedenlerden dolayı büyük olumsuzlukları beraberinde getirmektedir. Bu nedenle, gıdalarla bulaşan aflatoksinlerin etkisizleştirilebilmesi için doğal ve kolay uygulanabilir kaynakların değerlendirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır. Ayrıca aflatoksin kaynaklı sitotoksitenin önlenmesinde veya bazen de artmasında önemli rol oynayan nükleer reseptör, enzim ve bazı maddeler üzerine, koruma amaçlı kullanılan bileşiklerin etkisinin daha iyi araştırılması ve anlaşılması gerekmektedir.

Bu araştırmada, deneysel olarak broyler piliçlerde oluşturulan aflatoksikozisde, çörek otu tohumu ve bunun farmasötik olarak etkin maddesi timokinonun, aflatoksin biyotransformasyon yolaklarında görevli nükleer reseptör, metabolizan-antioksidan enzimler ve DNA etkileşimleri ile bu yolaklardaki etki mekanizmaları immunohistokimyasal olarak moleküler düzeyde ilk kez araştırılmıştır.

Çalışmanın her aşamasında bilgi birikimi, tecrübesi ve desteğini esirgemeyen danışman hocam, Prof. Dr. Mustafa ORTATATLI'ya; doktora eğitimim sırasında değerli görüş ve tecrübeleri ile bana ışık tutan Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof.Dr. M. Kemal ÇİFTÇİ, Prof.Dr. Fatih HATİPOĞLU, Prof.Dr. Ertan ORUÇ, Doç.Dr. Özgür ÖZDEMİR ve Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr. Halis OĞUZ'a, çalışmalarım esnasında büyük katkı ve fedakarlıklarından dolayı sevgili eşim Z. Seher ATEŞ, kızım Almina Buse ATEŞ, babam Burhan ATEŞ, annem Menşure ATEŞ'e ve tez projemi destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR v
1.GİRİŞ 1
1.1. Aflatoksinlerin Biyotransformasyonu 5
1.1.1.Aflatoksinlerin Faz I Metabolizması 5
1.1.2. Aflatoksinlerin Faz II Metabolizması ve Detoksifikasyonda Glutatyon Konjugasyonunun Rolü 9
1.1.3. Aflatoksin-B1 Aldehit Redüktaz (AFAR) Yolağının Aflatoksinlerin Metabolizması ve Detoksifikasyonundaki Rolü 11
1.2. Aflatoksinlerin Moleküler Hedefleri 11
1.2.1. Aflatoksinlerin Nükleik Asit Hedefleri (DNA ve RNA) 12
1.3. Aflatoksinlerin Mitokontriyal Hedefleri 13
1.4. Aflatoksinlerin Hücre Bölünmesi Üzerine Etkileri 13
1.5. Aflatoksinlerin Protein Sentez Yolakları Üzerine Etkileri 14
1.6. Aflatoksinlerin Karbonhidrat Metabolizması Üzerine Etkileri 15
1.7. Oksidatif Stres ve Aflatoksinlerin Oksidatif Stres Üzerine Etkileri 16
1.8. Apoptoz ve Aflatoksinlerin Apoptoz Üzerine Etkileri 19
1.9. Aflatoksinlerin Fiziksel Yollarla Detoksifikasyonu 21
1.10. Aflatoksinlerin Kimyasal Yollarla Detoksifikasyonu 21
1.11. Aflatoksinlerin Biyolojik Yollarla Detoksifikasyonu 23
1.12. Aflatoksinlerin Antioksidan Maddelerle Detoksifikasyonu 23
1.13. Aflatoksinler ile Tıbbi Bitkiler ve Bitki Özleri 26
1.14. Nigella Sativa Linnaeus (Çörek Otu) Tohumu 28
1.15. Timokinon 29
1.16. Nigella Sativa L. ve Timokinonun Antioksidan Etkileri 30
1.17. Aflatoksinler ile Nigella Sativa L. ve Timokinon 31
2. GEREÇ VE YÖNTEM 35
2.1. Gereç 35
2.1.1. Hayvan Materyali 35
2.1.2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler 35
2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler 35
2.1.4. Kullanılan Primer Antikor ve Kitler 36

2.2. Yöntem 37
2.2.1. Aflatoksin Üretimi 37
2.2.2. Pirinç Unundan Aflatoksin Analizi 42
2.2.3. Hayvanların Gruplandırılması, Barındırma ve Beslemesi 44
2.2.4. Serum Biyokimyasal Analizler 49
2.2.5. Nekropsi ve Histopatolojik Analizler 49
2.2.6. İmmunohistokimyasal Analizler 50
2.2.7. İstatistiksel Analizler 51
3. BULGULAR 53
3.1. Aflatoksin Üretim Değerleri 53
3.2. Serum Biyokimyasal Parametreler 53
3.3. Patolojik Bulgular 55
3.3.1. Relatif Organ Ağırlıkları 55
3.3.2. Makroskobik ve Histopatolojik Bulgular 57
3.4. İmmunohistokimyasal Bulgular 69
3.4.1. Karaciğerde AFB1-DNA Adükt İmmunoreaktivitesi 70
3.4.2. Pregnane X Reseptör (PXR) İmmunoreaktivitesi 72
3.4.3. Aryl Hidrokarbon Reseptör (AhR) İmmunoreaktivitesi 74
3.4.4. Constituve Androstane Reseptör (CAR) İmmunoreaktivitesi 76
3.4.5. Sitokrom P450 1A1 (CYP1A1) İmmunoreaktivitesi 78
3.4.6. Sitokrom P450 2A6 (CYP2A6) İmmunoreaktivitesi 80
3.4.7. Glutathione (GSH) İmmunoreaktivitesi 82
3.4.8. Glutathione S-Transferaz Alfa 3 (GSTA3) İmmunoreaktivitesi 84
4. TARTIŞMA 88
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 101
6. KAYNAKLAR 105
7. EKLER 119
EK A: Etik Kurul Onayları 119
8. ÖZGEÇMİŞ 121

SİMGELER VE KISALTMALAR

AF	: Aflatoksin
AFB1	: Aflatoksin B1
AFBO	: Aflatoksin B1-8,9-ekso-epoksit
AhR	: Aril hidrokarbon reseptör
BAX	: Bcl-2-associated X protein
BCL-2	: B-cell lenfoma 2
CAR	: Constituve androstane reseptör
CASPASE	: Sistenin-aspartik proteaz
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CKI	: Siklin kinaz inhibitörleri
ÇÖT	: Çörek otu tohumu
DISC	: Ölüm- uyarıcı sinyal kompleksi
FADD	: FAS-associated death domain
FAS	: Fatty asid sentetaz reseptör
GSH	: Glutatyon
GST	: Glutatyon S transferaz
GSTA3	: Glutatyon S transferaz alfa 3
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
K_m	: Bir enzimin substrata olan affinitesini gösteren değer
MDA	: Malondialdehit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF-kB	: Nükleik faktör kappa B
Nrf2	: Nükleik faktör eritroid 2
p53	: Tümör protein 53
pRb	: Retinoblastoma protein
PXR	: Pregnane X reseptör
TNF R1	: Tümör nekroz faktör receptör 1
TQ	: Timokinon
TRAF2	: TNF receptor-associated factor 2
XIAP	: X-linked inhibitor of apoptosis protein

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Etlik Piliçlerde Çörek Otu Tohumu ve Timokinonun Karaciğerde Aflatoksin Biyotransformasyonu Üzerine Etkilerinin İmmunohistokimyasal Olarak Araştırılması

MEHMET BURAK ATEŞ

Veterinerlik Patolojisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2019

Bu çalışmada, broyler civcivlerde çörek otu tohumu (ÇÖT) ve bunun farmasötik olarak etkin maddesi kabul edilen uçucu yağ asiti timokinonun (TQ), aflatoksinin (AF) biyotransformasyon mekanizmaları ve detoksifikasyonu üzerine olan etkinlikleri, histopatolojik ve immunohistokimyasal (İHK) olarak moleküler düzeyde araştırıldı. Çalışmada, her bir grupta 20'şer adet 1 günlük broyler civciv bulunan 6 grup oluşturuldu; kontrol grubu (normal yem), AF grubu (2mg/kg aflatoksin), TQ grubu (300mg/kg timokinon), ÇÖT grubu (%5 çörek otu tohumu), AF+TQ grubu (2mg/kg aflatoksin+300mg/kg timokinon) ve AF+ÇÖT grubu (2mg/kg aflatoksin+%5 çörek otu tohumu) içeren yemlerle 28 gün süreyle beslendi. Deneme süresi sonunda her bir gruptan rastgele 10'ar adet broyler civciv seçilerek, AST, ALT, ALP, GGT, bilirubin, total protein ve total kolesterol ölçümleri için kan alındı. Çalışmada kullanılan hayvanların canlı ağırlıkları belirlendikten sonra sistemik nekropsileri yapılarak karaciğerin ağırlığı ve makroskobik bulgular kaydedildi. Histopatolojik ve immunohistokimyasal (AFB1-DNA adüktü, PXR, AhR, CAR, CYP1A1, CYP2A6, glutatyon, GSTA3) incelemeler için örnekler alınarak %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda tespiti ve rutin doku takibi yapıldı. Aflatoksinin AST, ALT, ALP ve GGT miktarlarında neden olduğu artış ile total protein ve kolesterol düzeylerinde neden olduğu azalmanın, rasyona çörek otu tohumu veya timokinon ilave edilmesiyle normale yaklaştırıldığı belirlendi ($p<0,05$). Aflatoksinin karaciğerde neden olduğu relatif organ ağırlığı artışının yanı sıra histopatolojik olarak görülen hidropik dejenerasyon ve yağlanma ile periportal mononükleer hücre -heterofil infiltrasyonları, asiner dizilim ve safra kanalı proliferasyonunun ÇÖT veya TQ tarafından önemli oranda azaltıldığı saptandı ($p<0,05$). İHK boyamalarda AF'nin, biyotransformasyonunda görevli nükleer reseptörler olan PXR, AhR ve CAR ile yine metabolizmasından sorumlu CYP1A1 ve CYP2A6 enzim aktivitesinde artışa, glutatyon ve GSTA3 seviyelerinde ise azalmaya neden olduğu, AFB1-DNA adükt oluşumunu güçlü bir şekilde uyardığı gözlendi. Çalışmada rasyona yapılan TQ veya ÇÖT ilavesinin AF'nin bu olumsuz etkilerini önemli oranda ($p<0,05$) düzelttiği moleküler düzeyde ilk kez ortaya konuldu. Ayrıca, TQ ve ÇÖT'ün incelenen parametreler yönünden kontrol grubuna kıyasla önemli bir değişikliğe neden olmadıkları ve GSH ve GSTA3 seviyelerini artırarak antioksidan aktivite sergiledikleri saptandı. AF'nin detoksifikasyonunda TQ'nun ÇÖT'e kıyasla daha etkili olduğu ve etkisini hem AF'nin metabolizmasını inhibe ederek hem de antioksidan sistem enzimlerini stimüle ederek gösterdiği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Aflatoksin; GSTA3; İmmunohistokimya; PXR; Timokinon.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Immunohistochemical Investigation of effects of Nigella Sativa L. And Thymoquinone on Aflatoxin Biotransformation in Liver in Broilers

MEHMET BURAK ATES

Department of Veterinary Pathology

PHD THESİS / KONYA-2019

In this study, the activity of Nigella sativa L. seed (NS) and its pharmaceutically active substance volatile fatty acid thymoquinone (TQ) on the biotransformation and detoxification mechanisms of aflatoxin (AF) in broiler chicks were investigated by histopathological and immunohistochemical (IHC) technics as molecular level. Six groups of 20 broiler chicks at the age of 1 day were formed for the study; control group (normal feed); AF group (2mg/kg aflatoxin), TQ group (300mg/kg thymoquinone) NS group (%5 Nigella sativa L. seed), AF+TQ group (2mg/kg aflatoxin + 300mg/kg thymoquinone) and AF+NS group (2mg/kg aflatoxin + % 5 Nigella sativa L. seed) containing diets were fed for 28 days. At the end of the trial period, 10 broiler chicks were randomly selected from each group and blood was collected for AST, ALT, ALP, GGT, bilirubin, total protein, and total cholesterol measurements. After determining the live weights of each animal used in the study, systemic necropsies were performed and liver weight and macroscopic findings were recorded. Samples taken for histopathological and immunohistochemical examinations (AFB1-DNA adduct, PXR, AhR, CAR, CYP1A1, CYP2A6, glutathione, GSTA3) were fixed in 10% buffered formaldehyde solution and routine tissue processing was performed. It was determined that the increase in AST, ALT, ALP and GGT amounts and the decrease in total protein and cholesterol levels caused by aflatoxin were normalized by adding NS or TQ to the ration ($p<0,05$). In addition to the relative organ weight increase, also the histopathological findings such as hydropic degeneration and fatty changes and periportal mononuclear cell-heterophil infiltrations, acinar arrangement and biliary duct proliferation in the livers caused by AF, were significantly reduced by NS or TQ ($p<0,05$). In IHC staining, AF strongly stimulated the formation of the AFB1-DNA adduct by inducing an increase in the nuclear receptors PXR, AhR and CAR and in the enzyme activity of the CYP1A1 and CYP2A6 which are responsible for its metabolism and reduced the glutathione and GSTA3 amounts in hepatocytes. It was demonstrated for the first time at the molecular level that the addition of TQ or NS to the diet ameliorated these negative effects of AF significantly ($p<0,05$). In addition, it was found that TQ and NS did not cause a significant change in terms of the parameters examined compared to the control group and showed antioxidant activity by increasing GSH and GSTA3 levels. It was concluded that TQ was more effective in detoxification of AF than NS and showed its effect both by inhibiting the metabolism of AF and by stimulating antioxidant system enzymes.

Key Words: Aflatoxin; GSTA3; IHC; PXR; Thymoquinone.

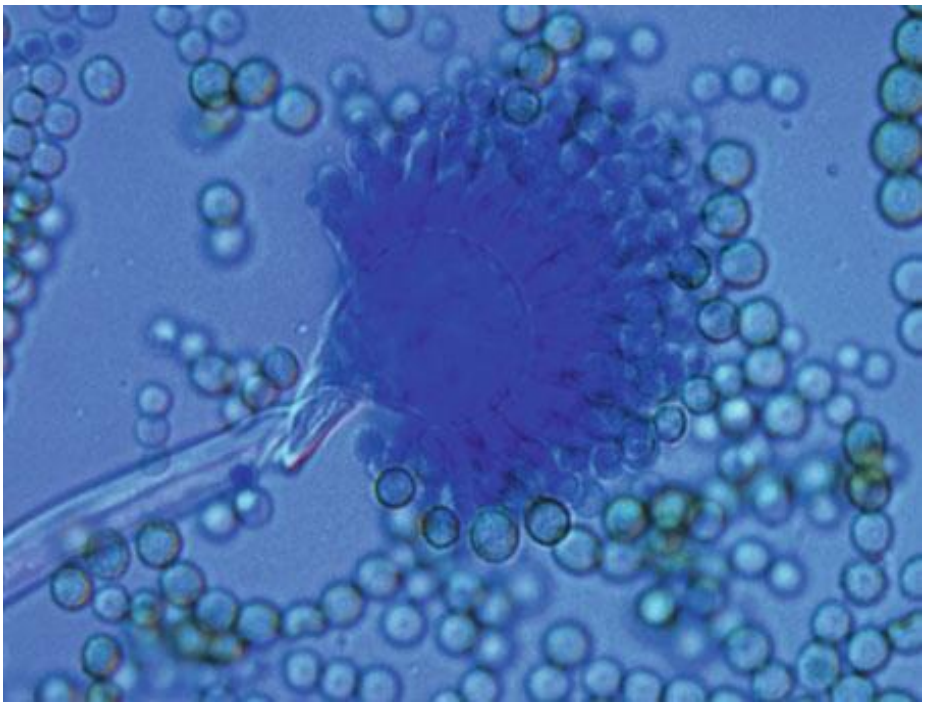
1.GİRİŞ

Aflatoksinler, fungal ikincil metabolitlerin bir üyesi olup Aspergillus cinsi mantarlar tarafından üretilmektedirler. Aflatoksinler, ilk defa 1960 yılında İngiltere'de farklı çiftliklerde öğütülmüş yer fıstığı unu ile beslenen 100 bin hindinin ölümü ile keşfedilmiş ve o yıllarda Hindi-X-hastalığı olarak adlandırılmıştır (Bräse ve ark 2013). Aynı yıl, aflatoksinlerin insan karaciğer hastalıkları ile bağlantısı ortaya konulmuş ve o tarihten günümüze kadar yapılan araştırmalar, aflatoksinin dünya çapında önemli bir insan ve hayvan sağlığı sorunu olduğunu göstermiş ve göstermeye devam etmektedir (Coppock ve ark 2018). Aflatoksinler, güçlü hepatotoksik, kanserojenik, mutajenik, teratojenik, epigenetik, immunosupresif etkileri yanında üreme ve büyüme disfonksiyonlarına sebep olmalarından dolayı insan, çiftlik hayvanları, kümes hayvanları ve suda yaşayan canlılarda ciddi sağlık problemlerine neden olur (Eaton ve Gallagher 1994, Shuaib ve ark 2010). Yaygınlıkları ve toksisitelerinden dolayı, halk ve hayvan sağlığı açısından en önemli mikotoksin olarak kabul edilen aflatoksinlerin, sadece Amerika kanatlı sektörüne verdiği zararın yıllık 143 milyon doları aştığı (Cast 1989), ayrıca 932 milyon dolar mahsul kaybına ilave olarak önleme veya azaltma çabaları için de yıllık 466 milyon dolar ek kayba neden olduğu bildirilmiştir (Cast 2003, Rawal ve ark 2010).

Aflatoksinler yaygın olarak *Aspergillus (A.) flavus, A. parasiticus, A. nomius, A. tamarii, A. pseudotamarii, A. bombycis* ve *A. ochraceoroseus* tarafından üretilmektedir (Cary ve ark 2005). Tarımsal hammaddelerin aflatoksin (AF) kontaminasyonu, hasat öncesi mantar oluşumuna katkı sağlayan tarla koşullarının yanı sıra gıdaların ve yemlerin yanlış depolanmasından kaynaklanmaktadır. *A. flavus* ve *A. parasiticus*, en önemli aflatoksigenik türlerdir (Şekil 1.1). Aflatoksin isminin kökenini de oluşturan *A. flavus* izolatlarının çoğunluğu aflatoksin B1 ve B2 üretir, ancak bazı suşlarının aflatoksin G1 ve G2 ürettiği de bildirilmiştir. Buna karşılık, *A. parasiticus,* dört çeşit aflatoksini de üretmektedir (Rai ve Varma 2010). Bu isimlendirme ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boyu UV ışığı altında aflatoksin B1 ve B2'nin mavi, aflatoksin G1 ve G2'nin ise yeşil floresan vermesiyle ilişkilidir.

Toksijenik *A. flavus* kültürleri ve aflatoksin ile kontamine olmuş ürünlerdeki biyolojik aktiviteden aflatoksin B1 ve daha az olarak da aflatoksin G2 sorumludur. Bu

durum, her iki toksinin terminal furan halkasınının 8,9 karbon pozisyonunda bir doymamış bağa sahip olmasıyla ilişkilendirilmektedir (Groopman ve ark 1992). Bu aflatoksinlerin dışında aflatoksin M1 ve aflatoksin M2 olarak isimlendirilen önemli iki aflatoksin türevi daha bulunmaktadır. M (milk) toksinleri aflatoksinli yemle beslenen laktasyon devresindeki memeli hayvanların sütlerinden ve idrarlarından izole edilmiştir. Bu toksinler de ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boyu UV ışığı altında mavi floresan verirler ve B toksinlerinden daha düşük R_f değerlerine sahip olmalarıyla ayrılırlar. Aflatoksin M1 ve M2 aflatoksin B1 ve B2'nin hidroksi türevleridir ve aflatoksin M2 aynı zamanda, dihidro-aflatoksin M1'dir (Bullerman 1979, Betina 1989).



Şekil 1.1. Aspergillus flavus sporlarının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü (Bräse ve ark 2013).

Aflatoksinler yüksek dozlarda akut, sub-letal dozlarda ise kronik toksisite göstermektedirler. Bu akut toksik bileşikler ciddi karaciğer hasarına sebep olur. Başlıca etkilenen organ olan karaciğeri böbrekler takip eder. Ancak pankreas, safra kesesi, akciğer, bağırsaklar ve ürogenital organlarla kanatlılarda timus, bursa Fabricius ve dalak gibi lenfoid organların da etkilendiği bildirilmiştir (Ortatatli ve ark 2002, Bräse ve ark 2013). Karaciğerde hidropik ve yağ dejenerasyonu, safra kanalı proliferasyonu, fibrozis en sık görülen histopatolojik bulgulardır (Ortatatli ve Oğuz 2001).

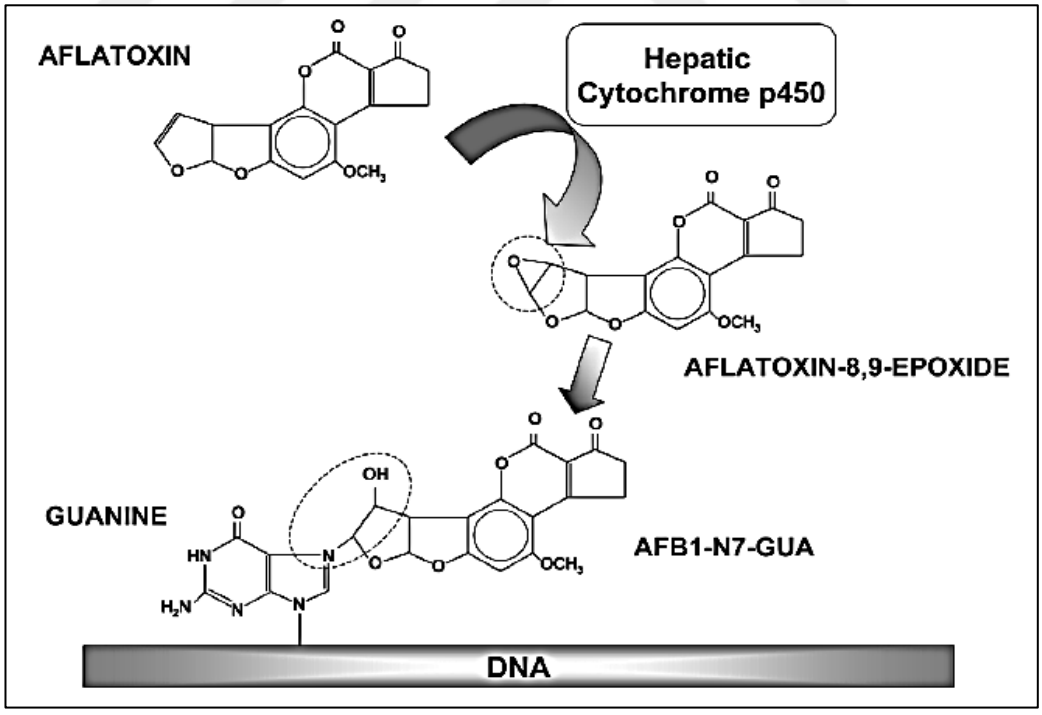
Aflatoksinler oral olarak alındığında, bağırsaktan emilir ve metabolize edilmek üzere karaciğere taşınırlar. Örneğin, aflatoksin B1'in daha az aktif olduğu için aflatoksin M1'e dönüşümü bir detoksifikasyonu temsil etmektedir. Fakat furan halkasının çift bağında diol oluşumu sonucu elden edilen aflatoksin metabolitleri, aflatoksin B1'den çok daha toksiktir. Yani diol oluşumu, metabolik olarak aktif ve çok daha toksik türevlerin ortaya çıkması ile sonuçlanmaktadır (Stephen Hsia 1982).

Doğal aflatoksinler arasında, en yüksek toksisiteyi aflatoksin B1 (AFB1) göstermektedir ve onu aflatoksin G1, B2 ve G2 takip eder. Bu toksisite verileri, bir günlük yaştaki ördek yavrularının LD50 değerleriyle belirlenmiştir. Doymuş bir furan halkası içeren aflatoksin B1'in LD50 değeri 0,36 mg/kg iken, aflatoksin B2'nin LD50 değeri bu bileşikten beş kat daha yüksektir. Bu, doymamış furan halkasının akut toksisite üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Aflatoksin G1'in, aflatoksin B1'e oranla önemli derecede daha az toksik olduğu (LD50=0,78 mg/kg) bildirilmiştir. Bu durum ise, siklopentanon halkasının akut toksisitede daha az önemli olduğunun bir göstergesidir (Wogan ve ark 1971, Bullerman 1979, Rai ve Varma 2010, Bräse ve ark 2013). Aflatoksinler, difurokumarosiklopentenon serileri (AFB1, AFB2, AFB2A, AFM1, AFM2, AFM2A ve aflatoksikol) ve difurokumarolakton serisi (AFG1, AFG2, AFG2A, AFGM1, AFGM2, AFGM2A ve AFB3) gibi iki önemli kimyasal yapı serisine sahip difuranokumarinlere dahildirler (Bbosa ve ark 2013).

Aflatoksinler, akut toksisitelerinin yanı sıra önemli kanserojenik bileşiklerdir. Aslında AFB1, memeliler için bilinen en güçlü karaciğer kanserojenidir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı sınıflandırmasında Grup I'de yer almaktadır. Sadece doğrudan olarak enjekte edildiğinde tümörleri ve metastazları uyarmakla kalmaz, aynı zamanda oral yolla uzun süre verildiğinde de tümörlerine neden olabilir (Verma 2004). Kanserojen özellikteki kimyasal bir bileşiğin DNA'ya kovalent olarak bağlanmasına DNA adüktü (DNA katımı) adı verilir. Bu durumda, DNA'da meydana gelen hasar neticesinde tam bir replikasyon gerçekleştirilemez. Sonuç olarak, hasara neden olan sebep ortadan kaldırılıp, DNA onarılamaz ise bu adüktler mutasyonlar ve kanserogenezise neden olabilir. Bu nedenle normal hücrelerdeki DNA adüktleri kanserojenlere maruziyetin belirlenmesinde önemli bir biyobelirteç olarak işlev görmektedir (Rajalakshmi ve ark 2015). Aflatoksinler de adükt formasyonu ile DNA, RNA ve protein biyosentezini inhibe eder veya hatalı protein sentezlerine yol açar.

Mutajenik potansiyeli, bu biyolojik etkilerle ilgilidir. Kromozomlar üzerindeki etkileri açısından test edildiğinde aflatoksinler, kromozomların parçalanması ve mitozun inhibisyonu ile anormal anafazların sayısının önemli ölçüde artmasına neden olur (Verma 2004, Bräse ve ark 2013).

AFB1'in kanserojen potansiyeli, metaboliti olan aflatoksin B1-8,9-ekso-epoksit (AFBO)'nun hücresel DNA'ya kovalent bağlanma derecesine, epigenetik mekanizmaları aktive etme kabiliyetine ve p53 genlerinin (tümör baskılayıcı genlerin) bastırılması ile büyük bir korelasyona sahiptir (Butler ve ark 1969, Agag 2004). Aflatoksin B1, büyük oranda karaciğerde sitokrom p450 tarafından AFBO'ya metabolize edilir. AFBO, DNA'ya bağlanarak guaninden (G) timine (T) transversiyon mutasyonlarına neden olan, promutajenik AFB1-N7-GUA'dan DNA katımı (adükt) oluşturan bir kanserojendir (Şekil 1.2). Yüksek aflatoksin maruziyeti olan bölgelerde insan hepatoselüler karsinomlarının yaklaşık %50'sinde *p53* tümör baskılayıcı gende 249. kodonda AGG'den AGT'ye dönüşen (Arg249Ser) nokta mutasyonu gösterilmiştir (Bressac ve ark 1991, Bressac ve ark 1991, Aguilar ve ark 1993).



Şekil 1.2. Aflatoksin metabolitlerinin DNA katımı (McKillop ve Schrum 2005).

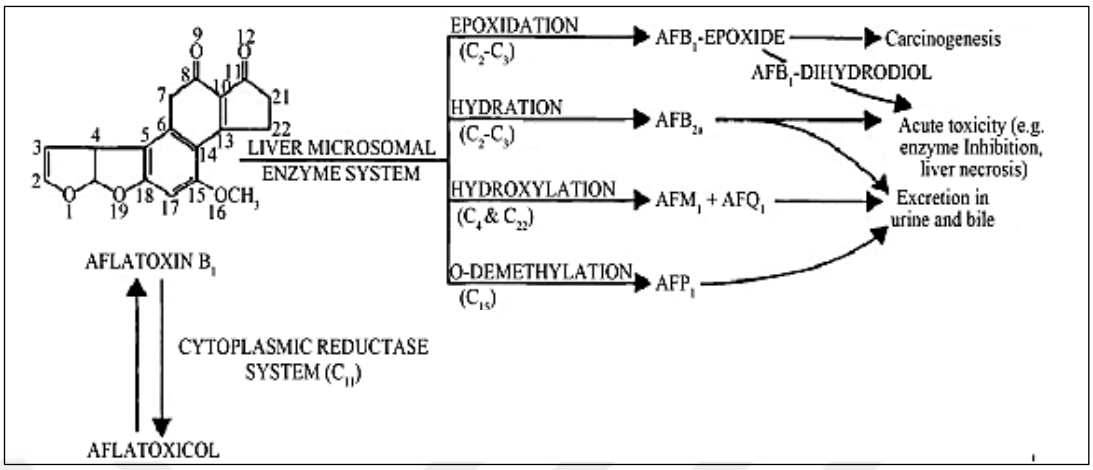
1.1. Aflatoksinlerin Biyotransformasyonu

Vücutta aflatoksinler ağırlıklı olarak karaciğerde biyolojik transformasyona uğrarlar. Biyotransformasyon (metabolizma), bir kimyasal maddenin vücuttaki bir dizi enzimatik veya kimyasal reaksiyon tarafından ve esas itibariyle yan ürünlerin veya metabolitlerin vücuttan atılması amacıyla, bir kimyasal formdan diğerine dönüştürülmesi işlemidir. Toksikolojideki biyotransformasyon, toksik ksenobiyotiklerin ve vücut atıklarının giderilmesi amacıyla, kolaylıkla atılabilecek daha az zararlı ve polar maddelere dönüştüğü önemli bir savunma mekanizmasıdır. Vücutta kimyasal maddelerin ortadan kaldırılması (metabolizması ve atılımı) süreci iki ana safhadan oluşur. Kimyasal maddelerin metabolizmasının I. fazında, aflatoksinler gibi ksenobiyotiklere oksidasyon, redüksiyon (indirgeme), asetilasyon ve hidroliz işlemi ile hem pozitif hem de negatif yükleri içeren küçük bir polar grubu eklenerek zararsız hale getirilmektedir. Bu süreç, faz I ürününün, böbrek tarafından kolaylıkla atılabilen polar veya suda çözünür bir madde üretmek üzere başka bir madde ile konjuge hale geldiği faz II enzim sistemine uyum sağlamasına olanak tanır. Ancak bazı durumlarda, biyotransformasyon esnasında bazı kimyasal maddeler reaktif veya daha zararlı bir ürüne dönüştürülebilir. Faz I çoğunlukla Sitokrom P450 enzim sistemleri (CYP450s) tarafından gerçekleştirilirken, faz II metabolizması, sülfat, glukuronid, glutatyon ve amino asit konjugasyon reaksiyonlarını içerir (Eaton ve ark 1995, Zhang ve ark 1997, Vondracek ve ark 2001, Bbosa ve ark 2013, Omar 2013).

1.1.1. Aflatoksinlerin Faz I Metabolizması

Aflatoksinler, esas olarak karaciğerde sitokrom P450 enzimleri (CYP450s) ile epoksidasyon, hidrasyon, hidroksilasyon ve O-demetilasyon reaksiyonlarını (oksidasyon reaksiyonları) içeren faz I metabolizması sonucu AFBO, AFB2a, AFM1, AFQ1 ve AFP1 gibi metabolitlerine dönüştürüldükten sonra faz II'de glutatyon ile konjuge edilmektedir (Şekil 1.3) (Zhang ve ark 1997, Dhanasekaran ve ark 2011, Omar 2013). Bunlardan, AFM1, AFP1 ve AFQ1 bir miktar kanserojen etki göstermesine rağmen daha az toksiktir ve kanserojen potansiyeli azalmıştır. Ancak AFBO, guaninin N7 atomuyla tepkimeye girerek promutajenik bir DNA adüktü oluşturur. Oluşan bu DNA adüktleri, DNA onarım süreçlerine oldukça dirençlidir ve bu durum gen mutasyonuna ve dolayısıyla kanserlerin, özellikle hepatoselüler karsinomların gelişimine neden olur (Zhang ve ark 2016, Deng ve ark 2018). AFB2a

ise akut toksisite, karaciğer nekrozu ve hücresel metabolizan enzim inhibisyonuna neden olur (Şekil 1.4) (Farombi ve Nwaokeafor 2005, Dhanasekaran ve ark 2011).

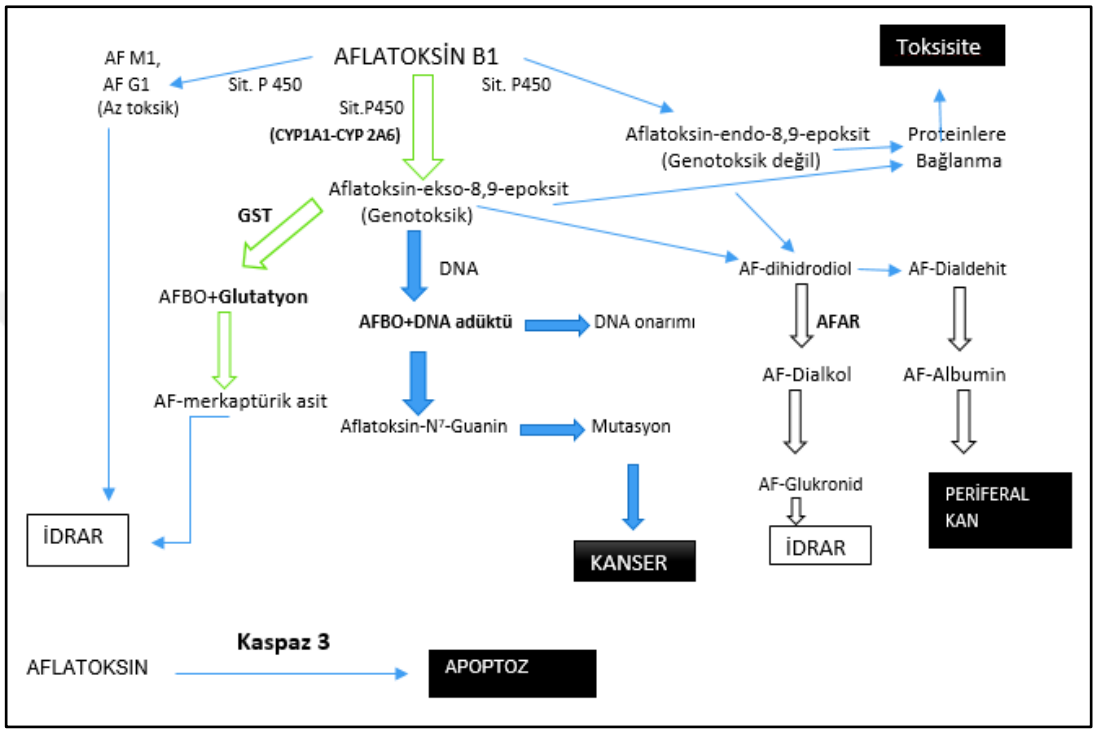


Şekil 1.3. Karaciğerde aflatoksinin Faz I metabolizması (Dhanasekaran ve ark 2011).

CYP450 enzimleri, aflatoksinler gibi ksenobiyotiklerin (yabancı maddelerin) biyotransformasyonunun yanı sıra, endojen substratların sentezi ve metabolizmasıyla ilgili olan bağlayıcı enzimlerin büyük bir süper familyasıdır (Code ve ark 1997, Vondracek ve ark 2001). Bu enzimler, ilaç metabolizmasında ve ksenobiyotik kimyasalların vücuttan uzaklaştırılmasında kilit rol oynamasına rağmen, biyolojik olarak etkisiz inert maddeler veya prokanserojenik bileşiklerin biyotrasformasyonuna neden olarak, hücre ölümü, DNA mutasyonları ve kanser gelişimini uyarabilirler. İnsan karaciğer mikrozomlarında, AFB1'in faz I metabolizması sonucu AFBO'ya biyoaktivasyonundan başlıca CYP1A2, CYP3A4, CYP3A5 ve CYP3A7 enzimleri sorumlu tutulmuştur (Eaton ve ark 1995, Code ve ark 1997, Lampe ve ark 2000, Wild ve ark 2000, Wild ve Turner 2002, Gross-Steinmeyer ve Eaton 2012). Ayrıca plasentayı geçen AFB1'in, yeni doğanların kordon kanında ve insan fetal karaciğerinde CYP3A7 tarafından toksik ve mutajenik metabolit AFBO'ya metabolize edildiği bildirilmiştir (Wild ve ark 2000, Wild ve Turner 2002).

İnsan ve memeli karaciğerinde bulunan CYP450 enzimleri kapsamlı olarak tanımlanmasına karşın kanatlılarda özellikle aflatoksin metabolizmasında görevli enzimler ile ilgili bilgiler oldukça kısıtlıdır. Diaz ve ark (2010), bıldırcın ve tavuk hepatik mikrosomlarında AFB1'in AFBO'ya biyoaktivasyonunda yer alan sitokrom P450 enzim ortologlarını belirlemek için immünoblotlama tekniğini kullanarak bir çalışma yapmışlardır. Sonuçlar bıldırcın ve tavuk mikrozomlarının CYP1A1,

CYP1A2, CYP2A6 ve CYP3A4 enzimatik aktivitesine sahip olduğunu göstermiş, AFB1'in AFBO'ya biyolojik olarak aktive edilmesinden CYP2A6 ve daha az ölçüde CYP1A1 sorumlu tutulmuştur. Benzer şekilde hindi ve ördeklerde de AFB1'in zararlı metaboliti AFBO'ya dönüşümünde CYP1A1 ve CYP2A6'nın rolünün büyük olduğu bildirilmiştir (Diaz ve ark 2010b, Diaz ve ark 2010c).



Şekil 1.4. Aflatoksin B1 biyotransformasyon yolakları ve oluşan metabolitler, Wild ve Turner (2002), Omar (2013)'den uyarlanmıştır.

Aflatoksin Metabolizmasında AFB'nin Nükleer Reseptörler Üzerindeki Etkileri ve Cyp450 Enzimlerinin İndüksiyonu

Canlı organizmalar kendilerini, tıpkı bir ksenosensör gibi görev yapan ve ksenobiyotikleri metabolize edici sistemlerde görevli aril hidrokarbon reseptörü (AhR), pregnan X reseptörü (PXR) ve constitutive androstan reseptörü (CAR) gibi nükleer reseptörleri aktive veya inhibe ederek ilaçlar, zehirler, toksinler ve besinler gibi yabancı maddelerden (ksenobiyotikler) korurlar. Aflatoksinle kontamine gıdaların kronik olarak alınması vücutta AFB'nin özellikle de AFB1'in artmasına yol açmaktadır. Bu durum AhR, PXR ve CAR nükleer reseptörlerinin mRNA ekspresyonunu arttırmaktadır. PXR ve CAR nükleer reseptörleri, vücudu ksenobiyotik gibi çevresel kimyasallara karşı korumada kritik öneme sahiptir. PXR ve CAR, pek çok ksenobiyotik çeşidi ile aktive edilir ve başta sitokrom P450 enzim sistemi olmak

üzere bu kimyasalların detoksifikasyonunda görevli diğer genleri düzenler (Maglich ve ark 2002, Ayed-Boussema ve ark 2012).

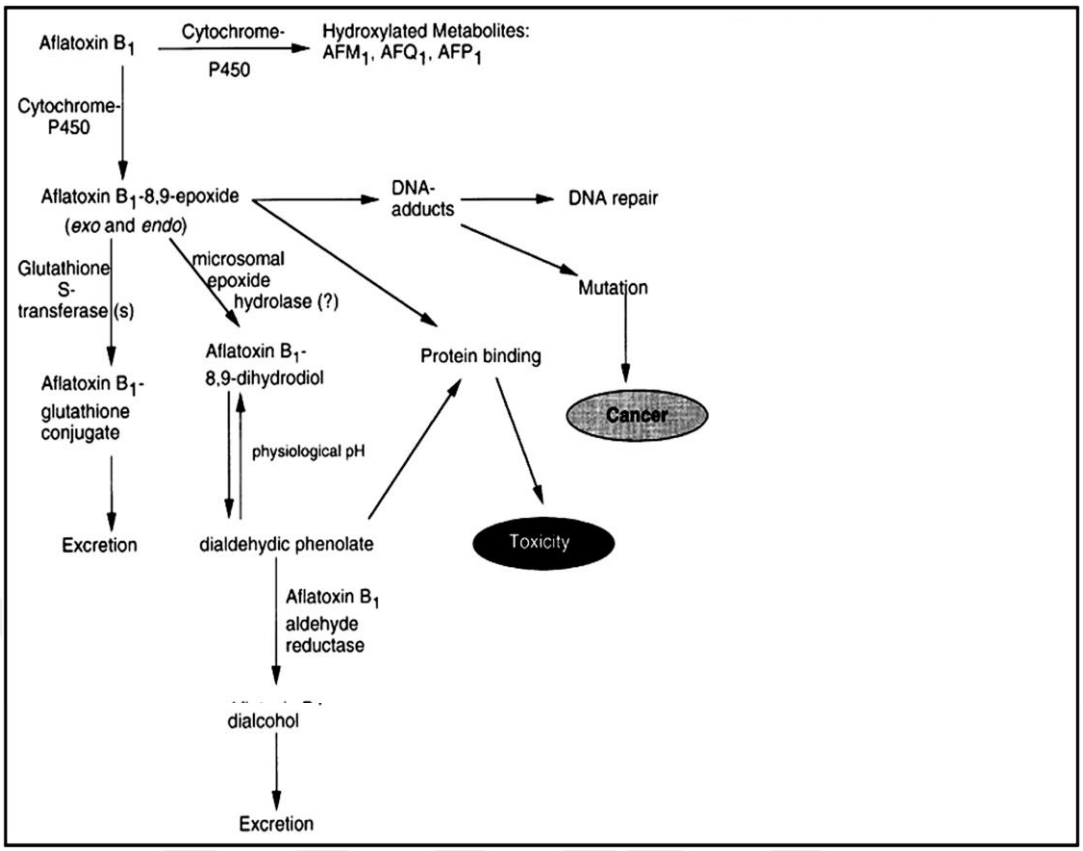
Bu reseptörlerin ekspresyonu aflatoksinler gibi ksenobiyotiklerin metabolizmasına katılan hedef CYP'lerin bir kısmının uyarımına yol açar. Birtakım ksenobiyotiklerin CYP'lerin uyarıcıları veya inhibitörleri olduğu bilinmektedir. CYP enzimlerinin indüksiyonunda, PXR, CAR ve AhR gibi önemli nükleer reseptörleri içeren reseptör aracılı mekanizmalar kullanılır. Bunlar CYP enzimlerinin, gen transkripsiyonunu ve dolayısıyla CYP3A, CYP2B ve CYP1A alt familyası izoformlarının aktivasyonunu sağlar (Maglich ve ark 2002, Ayed-Boussema ve ark 2012).

PXR ve CAR, önceden ksenobiyotik reseptörler olarak adlandırılan nükleer reseptör ailesi 1'in iki önemli üyesini oluşturur. Bunlar, faz I ve II reaksiyonlarında görevli kimyasal madde metabolizan enzimlerin ana düzenleyicileridir. AhR'nin, kimyasal maddelerin metabolizmasına katılan CYP1A1 ve CYP1A2 izoenzimlerinin ekspresyonunu kontrol ettiği bilinmektedir. Aflatoksin B1'in, AhR mRNA ekspresyonunda artışa neden olarak, CYP1A1 ve CYP1A2 enzimlerinin uyarıcı genlerinin aşırı ekspresyonunu sağladığı ortaya konulmuştur (Maglich ve ark 2002, Ayed-Boussema ve ark 2012). Ayrıca, AFB1 maruziyeti, PXR ve CAR gen düzeylerinin artışına da neden olur. CYP3A, CYP2B ve CYP2C'nin genlerinin ekspresyonu ağırlıklı olarak PXR ve/veya CAR nükleer reseptörleri vasıtasıyla gerçekleşir (Maglich ve ark 2002, Ayed-Boussema ve ark 2012). Sonuç olarak, aflatoksinle kontamine gıdaların tüketimi, AhR, PXR ve CAR nükleer reseptörlerinin aşırı ekspresyonu sonucu CYP450 izoenzimlerinin (CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP3A5, CYP2C9, CYP3A4) indüklenmesi ile faz I ve faz II biyotransformasyonunu artırır. Ancak bu durum, biyotransformasyon sonucu daha fazla miktarda ve daha toksik zararlı metabolitler oluşması nedeniyle, bir takım bireysel değişikliklerin (toksiko-genetik etkiler) olabilmesine karşın özellikle karaciğerde kanser gelişimine yol açabilmektedir (Maglich ve ark 2002, Ayed-Boussema ve ark 2012).

1.1.2. Aflatoksinlerin Faz II Metabolizması ve Detoksifikasyonda Glutatyon Konjugasyonunun Rolü

AF'nin faz I metabolizması sonucunda ortaya çıkan metabolitleri, öncelikle konjugasyon reaksiyonlarını katalize eden glutatyon S-transferazlar (GST) tarafından glutatyon (GSH) ile konjuge edilerek faz II enzimatik metabolizmasına uğrar. Glutatyon, sistein, glisin ve glutamat ile birlikte vücudun ana antioksidanlarından biri olarak düşünülmektedir (Pool-Zobel ve ark 2005, Dhanasekaran ve ark 2011). Glutatyon vücudun detoksifikasyon sürecinde kritik bir rol oynamaktadır ve neredeyse tüm vücut hücrelerinde bulunmasına karşın karaciğerde en yüksek konsantrasyona sahiptir. Ayrıca vücudun doğal savunma sisteminin vazgeçilmez bir bileşenidir.

GSH, antioksidan olarak rol oynayarak membran onarımı ve stabilitesinin yanı sıra oksidatif stres faktörlerini ve lipit peroksidasyon metabolik süreçlerinden üretilen yüksek reaktif oksijen türlerini (ROT) azaltmak gibi birçok işleve sahiptir (Verma 2004, Farombi ve Nwaokeafor 2005). GSH'nin azalması, hücrelerde anormal derecede ROT artışına neden olur. Ayrıca bu azalma, adükt formunun sorumlusu olan AFB-8,9-epoksitler tarafından oluşturulan kritik hücresel bileşenlerin (DNA, lipitler, proteinler) hasarını daha da artırır (Verma 2004, Gross-Steinmeyer ve Eaton 2012). Aflatoksin-glutatyon ürünü karaciğer ve böbreklerde ardışık metabolizmaya uğrayarak idrarla merkapturik asit (aflatoksin-N-asetilsistein) olarak atılır (Şekil 1.5) (Murphy ve ark 2006, Gross-Steinmeyer ve Eaton 2012).



Şekil 1.5. Aflatoksinin karaciğerde faz I-II metabolizması ve atılımı (Murphy ve ark 2006, Gross-Steinmeyer ve Eaton 2012).

Glutatyon S transferazlar, alfa, mu, pi, teta gibi çeşitli üyelerden oluşan geniş bir metabolik enzim ailesidir (Hayes ve ark 2005, Ye ve ark 2006). Alfa ve pi sınıflarındaki GST, hepatositlerde bol miktarda bulunur ve ekzojen kimyasal maddeler ve aflatoksinler gibi kanserojenler tarafından indüklenebilir (Verma 2004, Gross-Steinmeyer ve Eaton 2012). Glutatyon S transferaz aktivitesine sahip üç ana enzim ailesi vardır:

1) Sitosolik GSTler,

2) Mitokondriyal GSTler ve

3) Eikozanoid ve glutatyon (MAPEG) metabolizmasında kullanılan membran bağlantılı protein olan mikrozomal GST'ler.

Sitosolik ve mitokondriyal GST çözünür enzimlerdir, ancak uzaktan ilişkili olsalar da üç boyutlu katlarında bazı benzerlikler göstermektedirler. Yapısal olarak MAPEG enzimlerinden farklıdır, ancak hepsi GSH'u peroksidaz aktivitesiyle birleştiren substratları içerir (Verma 2004, Gross-Steinmeyer ve Eaton 2012).

1.1.3. Aflatoksin-B1 Aldehit Redüktaz (AFAR) Yolağının Aflatoksinlerin Metabolizması ve Detoksifikasyonundaki Rolü

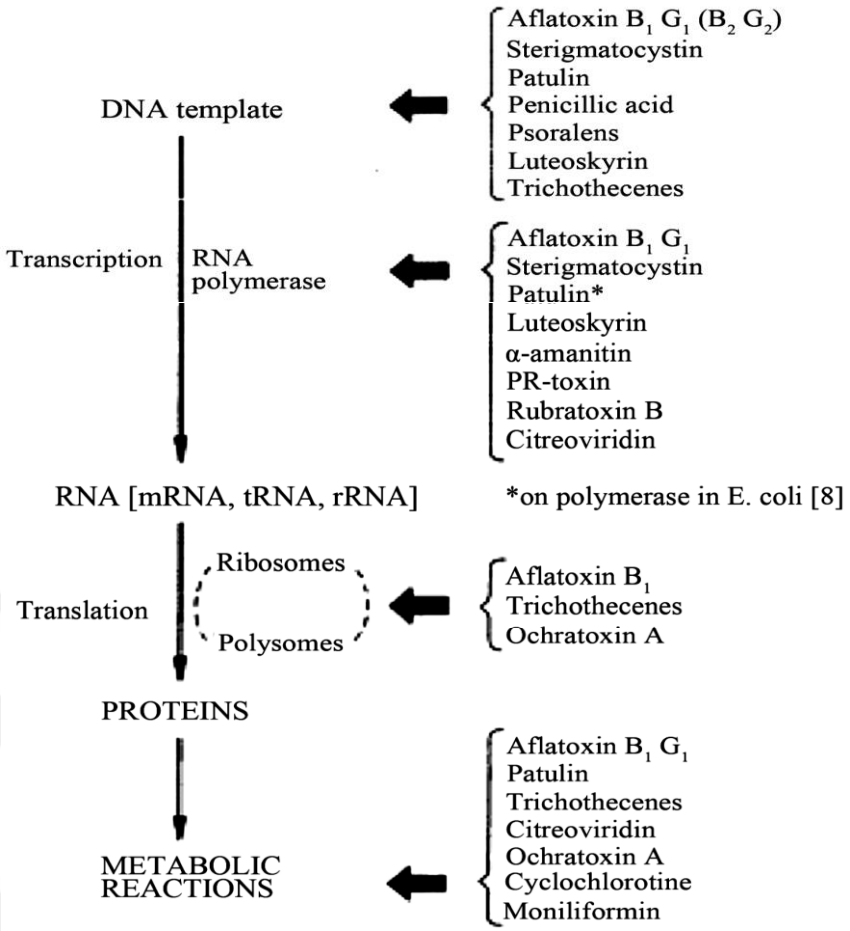
Deneysel hayvan modelinde yapılan bazı çalışmalar, spesifik doğal veya sentetik bileşiklerin yeme katılmasıyla AFB1'in güçlü biyolojik etkilerinin azaltılabileceğini göstermiştir (Kensler ve ark 1999). Araştırmacılar, bu bileşiklerin AFB1 toksisitesine karşı koruyucu etkilerini, GST'ler ve aflatoksin-B1 aldehit redüktaz (AFAR) gibi detoksifikasyon enzimlerini indükleme yetenekleri ile sağladığını bildirmişlerdir (Kensler ve ark 1999). NADPH'ye bağımlı aldo-keto redüktaz (AKR) süper ailesinin bir üyesi olan AFAR'ın, rat karaciğerinden saflaştırılarak protein reaktif AFB1-dialdehitin, AFB1-dialkole indirgenmesini katalize ettiği gösterilmiştir (Şekil 1.4) (Hayes ve ark 1993). AFAR enzimlerinin, özellikle de ratlarda AKR7A1, insanda AKR7A3 ve farede AKR7A5'in, reaktif AFB1 türevli dialdehitin indirgenmesini benzer şekilde yüksek oranlarda katalize ettiği bildirilmiştir (Ellis ve ark 1993, Linda ve ark 1998, Knight ve ark 1999, Guengerich ve ark 2001). AKR7A3 ve AKR7A2 arasında %88 amino asit özdeşliği belirlenmiş olup insan hepatositlerinden sentezlendiği ifade edilmiştir. Ancak AKR7A2'nin AFB1 dialdehit için çok daha yüksek K_m değerine sahip olduğu bildirilmiştir (Guengerich ve ark 2001). AFAR'ın aracılık ettiği AFB1 redüksiyon yolağı, AFB1 kaynaklı sitotoksitenin önlenmesinde önemli rol oynadığından, bu enzimlerin AFB1'in toksisitesine karşı koruyucu amaçla kullanılan bazı bileşikler tarafından indüklenip indüklenmediğinin daha iyi araştırılması gerekmektedir.

1.2. Aflatoksinlerin Moleküler Hedefleri

Aflatoksinle kontamine gıdaların tüketilmesinden sonra aflatoksinler ve metabolitleri birçok farklı biyomolekülü, organları ve dokuları hedef alır ve etkileşime girer. Burada iki farklı etkileşim yolu tanımlanmıştır;

1) Nükleik asitlerle non-kovalent, zayıf ve reversibl bağlanma,
2) Memelilerde metabolizan enzimlere irreversibl bağlanma.

Aflatoksinler, özellikle DNA, RNA (mRNA, tRNA, rRNA), proteinler, transkripsiyon, translasyon ve hücresel metabolik reaksiyonlar gibi protein sentez yollarını hedefler (Şekil 1.6) (Verma 2004, Omar 2013).



Şekil 1.6. Mikotoksinlerin (aflatoksinler) DNA ve protein sentezindeki ana hedefleri (Kiessling 1986, Omar 2013).

1.2.1. Aflatoksinlerin Nükleik Asit Hedefleri (DNA ve RNA)

Daha önce de bahsedildiği gibi AFB1, karaciğerdeki sitokrom P450 enzimleri ile makromoleküllere bağlanan reaktif metaboliti AFBO'ya metabolik olarak aktive edilir ve sonuçta mutasyonlara ve karsinogenezise neden olan DNA adüktlerinin oluşmasına yol açar (Kiessling 1986, Verma 2004, Bbosa ve ark 2013, Omar 2013). AFBO, albümin içerisinde lizine spesifik olarak bağlanan ve AFB1-lizin adüktlerini oluşturan (AFB-Lys) AFB1-8,9-diole dönüştürülebilir. AFB-Lys, insanlarda aflatoksinlere maruziyetin biyolojik belirteci olarak doğrulanmıştır (Kiessling 1986, Verma 2004, Bbosa ve ark 2013, Omar 2013). AFBO metabolitleri oldukça reaktiftir ve hücresel biyomoleküllere kovalent olarak bağlanırlar. DNA yapısında AFB-N^7-guanin adüktü en büyük hasarı oluşturur. Bu oluşum kimyasal olarak dengesizdir ve depurizasyondan sonra hızla idrarla atılır. AFB-DNA-adüktleri, DNA onarım enzimleri tarafından onarılmazsa, özellikle transkripsiyonel olarak aktif DNA

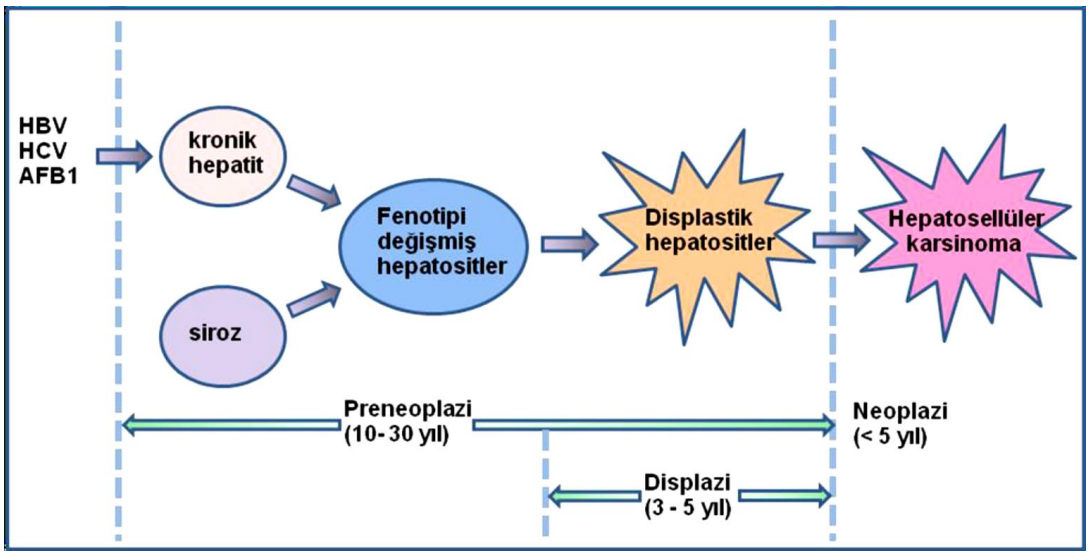
bölgelerinde lokalize olduklarında, somatik değişiklikler ortaya çıkabilmektedir (Kiessling 1986, Verma 2004, Bbosa ve ark 2013, Omar 2013).

1.3. Aflatoksinlerin Mitokontriyal Hedefleri

Aflatoksin B1 ve AFBO, mitokondride yapısal değişikliklere neden olur. Reaktif aflatoksin-8,9-epoksit, hepatokarsinogenez sırasında nükleer DNA'ya kıyasla mitokondriyal DNA'ya (mitDNA) bağlanarak ATP üretimi ve FAD/NAD ile bağlantılı enzimatik işlevleri engeller. Bu, vücudun çeşitli yerlerinde mitokondriyal fonksiyonların bozulmasına yol açar ve dolayısıyla ATP oluşumuna engel olur. Aflatoksinle ilişkili mitokondriyal hasar yaşlanma süreçlerinden de sorumlu olabilir (Kiessling 1986, Gross-Steinmeyer ve Eaton 2012). MitDNA'ya verilen hasar, enerji üretiminde aksamalara sebep olmasının yanı sıra hücre ölümlerinin artmasına da (apoptoz) neden olur (Bbosa ve ark 2013).

1.4. Aflatoksinlerin Hücre Bölünmesi Üzerine Etkileri

Aflatoksinler ve metabolitleri, özellikle AFBO, hücre bölünmesi sırasında telomer uzunluğunu ve hücre döngüsündeki çeşitli kontrol noktalarını etkiler ve böylece sinyal yollarını (signaling pathway) ve hücre döngüsünün düzenleyici süreçleri bozar. Ayrıca aflatoksinin DNA'ya bağlanma derecesi ve verdiği hasar, hücre döngüsü ve c-Myc, p53, pRb, Ras, protein kinaz A (PKA), protein kinaz C (PKC), Bcl-2, NF-kB, CDK, siklinler ve CKI gibi hücrenin yaşama veya ölümüne karar verme sürecine katkıda bulunan apoptotik yolakları etkiler. Ayrıca karsinogenezise yol açan hücre proliferasyonunun kontrolden çıkmasına katkıda bulunabilirler. Reaktif aflatoksin-8,9-epoksit, karsinogeneze yol açan hücre döngüsünde; mitotik (M) faz, büyüme süreci (G1 ve G2 fazı) ve DNA sentezini (S fazı) etkileyebilir (Bbosa ve ark 2013). AFB1 maruziyeti hepatoselüler karsinom riskini tek başına yaklaşık 4 kat artıran bir risk faktörü olmasının yanı sıra, Hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonu ile birlikte sinerjik etki yaratarak riski 60 kata kadar artırabilmektedir (Şekil 1.7) (Qian ve ark 1994, Thorgeirsson ve Grisham 2002, Kew 2003).



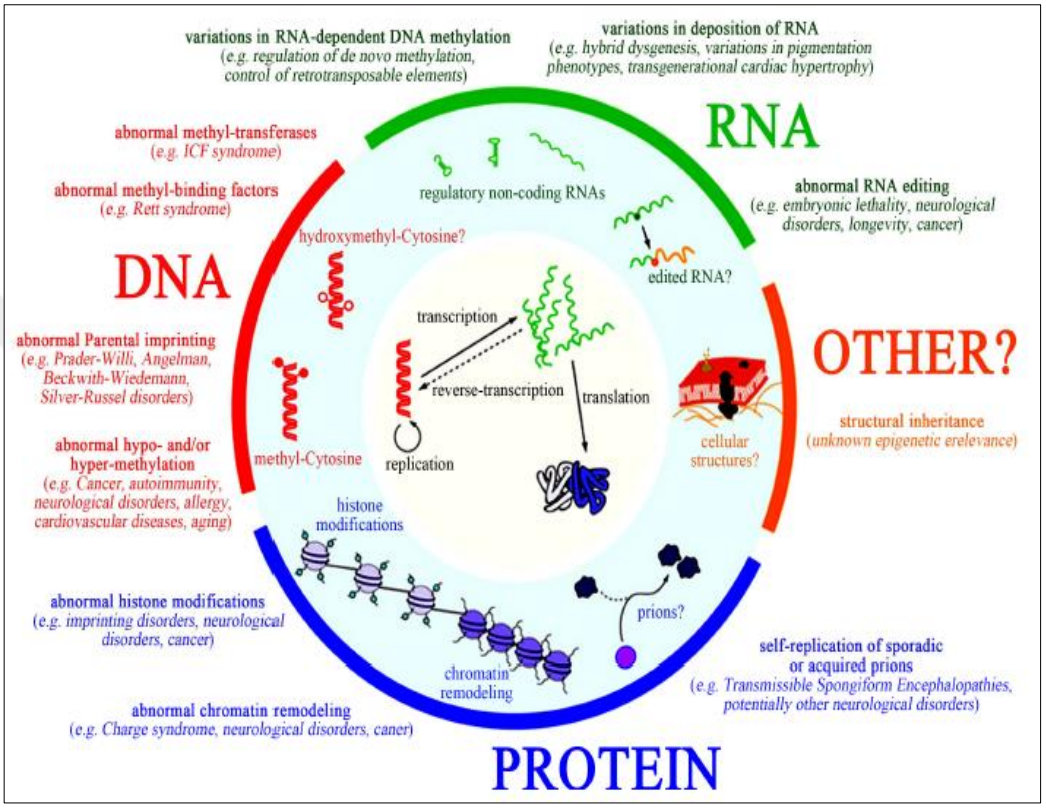
Şekil 1.7. Hepatoselüler karsinomun kronolojik hücresel değişim dizisi, Thorgeirsson ve Grisham (2002)'dan uyarlanmıştır.

1.5. Aflatoksinlerin Protein Sentez Yolakları Üzerine Etkileri

Mikotoksinler, özellikle aflatoksinler, protein sentezini engeller ve anormal protein sentezinin artışına neden olurlar. Bu durum birincil ve/veya ikincil nükleik asit veya protein sentezinde bozulmaya bağlı olabilir (Bhat ve ark 1982). Aflatoksinlerin reaktif bir metaboliti olan AFBO, temel enzimler, blok RNA polimeraz ve ribozomal translokaz gibi biyolojik moleküllere bağlanarak protein sentezini de inhibe eder (Eaton ve Gallagher 1994). Ayrıca DNA adüktleri oluştururlar ve bu yolla da protein sentezini etkilerler. Aflatoksin, protein sentezinde yer alan başlatma, transkripsiyon ve translasyon süreçlerinde gerekli olan enzimlere ve substratlara bağlanır ve bunlara müdahale eder. DNA, RNA ve proteinler ile adüktler oluşturarak protein sentezinde bozulmaya neden olan pürin ve pirimidin nükleositleri ile etkileşirler (Bhat ve ark 1982, Verma 2004). Aflatoksin ayrıca, DNA'ya bağımlı RNA polimeraz aktivitesi ve endoplazmik retikulum ile etkileşerek RNA sentezini engeller. Böylece, iskelet kası, kalp, karaciğer ve böbrek gibi vücut dokularındaki protein içeriğinde azalmaya neden olabilir.

Aflatoksin maruziyetini takiben vücutta biriken AFB ve metabolitlerinin neden olduğu hasar nedeniyle karaciğer ve böbrek nekrozu görülmektedir (Bbosa ve ark 2013). AFB1, karaciğer, böbrek ve kalp gibi hayati organların bazı önemli metabolik yolaklarını engellemesinin yanı sıra protein sentezinin normal sürecine müdahale edebilecek kadar güçlü mutajenik, kanserojenik, teratojenik ve immunosupresif

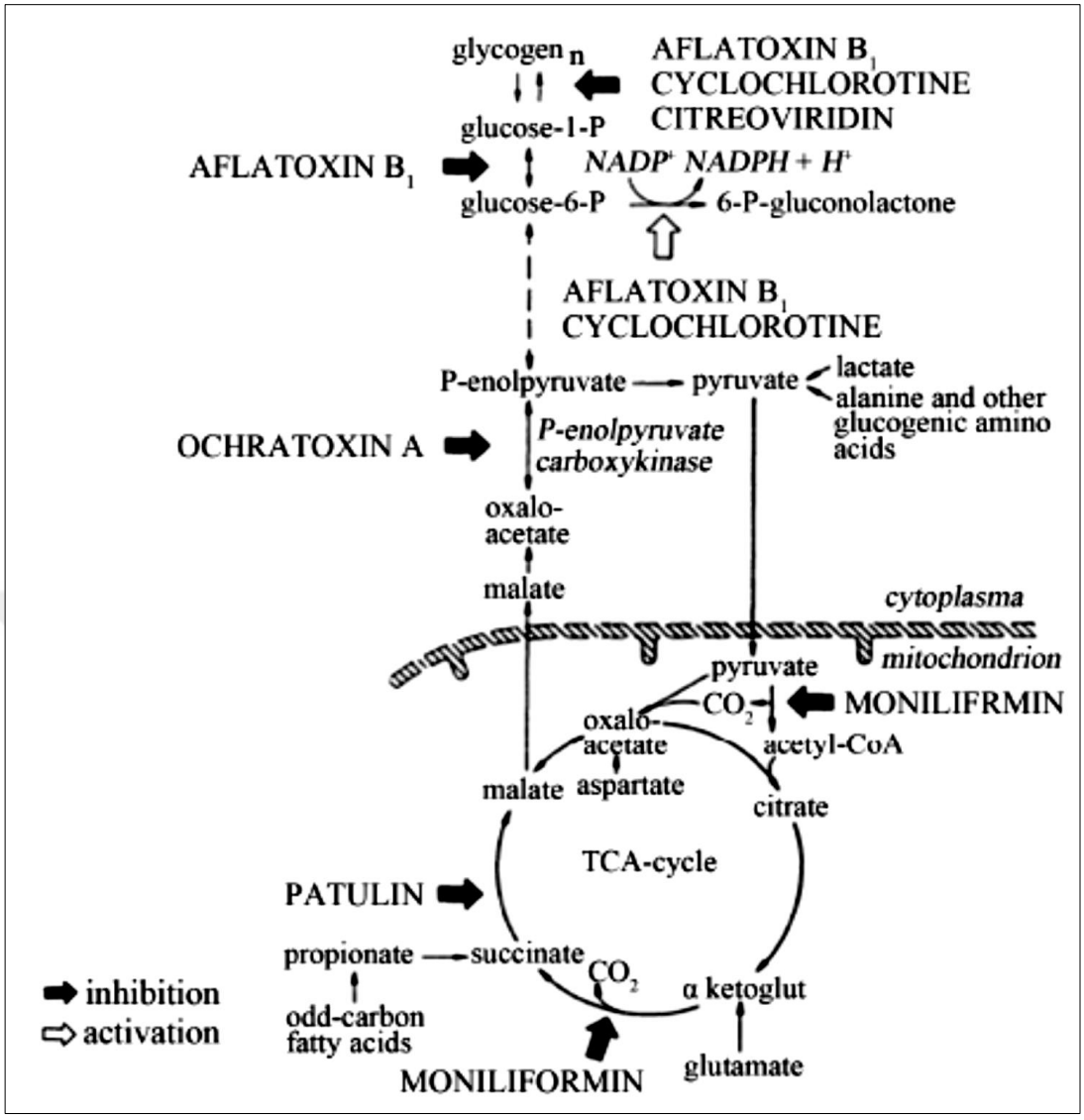
toksindir (Mohamed ve Metvvally 2009). Aflatoksinler DNA'dan RNA'ya ve proteinlere genetik bilgi akışını da engelleyebilir. Metilsitozin gibi DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kromatinin yeniden modellenmesi gibi epigenetik mekanizmaları da bozar ve böylece hücresel sinyal yollarını, hücre proliferasyonunu ve büyümesini etkiler (Şekil 1.8) (Li ve ark 2011).



Şekil 1.8. Aflatoksinler gibi ksenobiyotiklerin çeşitli protein sentez bölge hedefleri ve genetik ve epigenetik mekanizmalar üzerindeki etkileri (Li ve ark 2011, Bbosa ve ark 2013).

1.6. Aflatoksinlerin Karbonhidrat Metabolizması Üzerine Etkileri

Mikotoksinlerin, özellikle de aflatoksinlerin karbonhidrat metabolizması üzerindeki etkisi, hepatik glikojenin azalması ve kan glikoz düzeylerinin yükselmesi ile sonuçlanır. Hepatik nekroza neden olan ve kanserojen özelliklere sahip AFB1'in, oksidatif fosforilasyon yolları üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir. Glikojen sentezini katalize eden transglikozilaz ve glikojen sentetaz enzim aktivitelerini azaltarak glikojen sentezini engeller. Aflatoksin B1, glikoz-6-fosfatı glikoz-1-fosfat haline dönüştüren fosfoglukomutazın aktivitesini düşürür (Şekil 1.9). Aynı zamanda, glikoz-6-fosfat oksidasyonunu hızlandırarak karaciğer glikojenini de azaltır (Kiessling 1986).



Şekil 1.9. Aflatoksinlerin oksidatif fosforilasyon enzimlerine olan etkisi (Kiessling 1986).

1.7. Oksidatif Stres ve Aflatoksinlerin Oksidatif Stres Üzerine Etkileri

Normal hücre metabolizmaları tarafından üretilen serbest radikaller reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türleri (ROS/ROT ve RNT)'dir (Çizelge 1.1). Bunlar lipit, karbonhidrat, protein ve nükleik asitler gibi makromolekülleri etkileyerek oksidatif hasara neden olabilen, reaktif kimyasal ürünlerdir. Normal koşullarda serbest oksijen radikalleri ile koruyucu antioksidan sistem arasında bir denge vardır. Antioksidan ve oksidanlar arasındaki bu dengenin oksidanlar lehine bozulması oksidatif stres olarak adlandırılır. Bunun sonucunda, lipit peroksidasyonu ve serbest radikal/reaktif oksijen ürünlerinin açığa çıkması ile organizmada hücresel hasar oluşur. Oksidatif strese karşı organizmanın savunma mekanizmaları (antioksidan mekanizmalar) yetersiz kalırsa, hücrelerde oksidatif hasar gelişerek fonksiyonlar önemli oranda aksar (Cutteridhe

1993). İskemi-reperfüzyon hasarı, kimyasal ve radyasyon hasarları, oksijen ve diğer gazların toksik etkileri, hücrenin yaşlanması, inflamatuar hücrelerin neden olduğu doku hasarı gibi pek çok durumda, hücre hasarı serbest radikaller tarafından meydana getirilir (Kumar ve ark 2007). Organizmalarda normal metabolizma sırasında da, besinlerin oksijen eşliğinde enerjiye dönüşümü aşamasında oksijen molekülü indirgenerek yan ürün olarak hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipit peroksit gibi değişik serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri meydana gelir (Freeman ve Crapo 1982).

Reaktif oksijen türleri, normal olarak tüm hücrelerde mitokondri solunumu ve enerji üretimi sırasında meydana gelen redüksiyon-oksidasyon (redoks) reaksiyonlarında az oranda üretilmektedir. Bu reaksiyonlar esnasında mitokondrilerde, oksijene su oluşturmak için art arda dört elektron ilave edilir. Ancak bu sırada oksijenin kısmen indirgenmesiyle, kısa ömürlü, ileri derecede reaktif, toksik ara ürünler oluşur. Bu ara ürünlerden biri olan süperoksit (O_2^-), hem kendiliğinden ve hem de süperoksit dismutaz adlı enzimin etkisiyle hidrojen perokside (H_20_2) dönüşür. Hidrojen peroksit, O_2^- 'den, daha dayanıklıdır ve biyolojik membranlardan geçebilir. Şayet ortamda demir (Fe^{2+}) gibi metaller varsa, fenton reaksiyonu ile son derecede reaktif hidroksil radikaline (HO-) dönüştürülür (Kumar ve ark 2007).

Hücreler, serbest radikalleri bertaraf ederek hasarı minimize etmek için enzimatik ve enzimatik olmayan bazı sistemler geliştirmiştir. Enzimatik antioksidanlar, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktazdır. Süperoksitler, çoğu hücrede bulunan (SOD) tarafından parçalanır. Hücreleri oksidatif hasardan koruyan en önemli enzim ailesi GPx'lerdir. Bu enzimin aktivitesini, hücre içindeki oksitlenmiş glutatyonun (GSSG) indirgenmiş glutatyona oranı yansıtır. Bu oran aynı zamanda hücrenin serbest radikalleri katalize edebilme yeteneğini ifade etmektedir. Hidrojen peroksidin parçalanmasında rol oynayan bir diğer enzim peroksizomlardaki enzimlerden biri olan katalaz'dır. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise endojen veya eksojen antioksidanlar olmak üzere iki grupta incelenir. Endojen antioksidanlar (glutatyon, melatonin, selenyum vs.) hücre membranı, sitozol ve çekirdek üzerine etki yaparak enzimatik olarak serbest radikallerin temizlenmesinden sorumludur. Ekzojen antioksidanlar (örneğin E, A ve C vitaminleri, beta-karoten, flavonoidler vs.) ise çoğunlukla besin yoluyla dışarıdan

organizmaya alınarak serbest radikallerin oluşumunun azaltılmasına ya da oluşmuş serbest radikal moleküllerinin ortadan kaldırılmasına yardımcı olabilir (Kumar ve ark 2007).

Çizelge 1.1. Serbest radikaller.

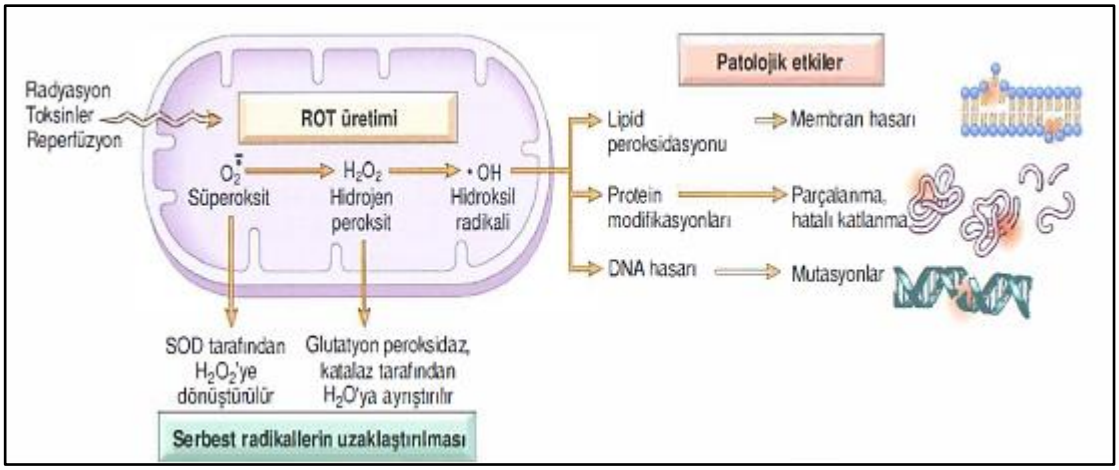
ROT molekülleri	*RNT molekülleri*
Superoksit anyon radikali (O2-)	Nitrik oksit (NO)
Hidrojen peroksit (H2O2)	Peroksinitrit ($ONOO^-$)
Hidroksil radikalleri (HO-)	
Hipoklorik asit (HOCl)	
Singlet oksijen (O2)	
Ozon (O3)	
Alkil radikali (R)	
Peroksil radikali (POO-)	
Organik peroksit radikali (RCOO-)	
Perhidroksil radikali (HO2-)	
Alkoksil radikali (RO-)	

Reaktif oksijen türevlerinin hücre hasarına neden olma yolları şu şekilde sıralanabilir:

• Membranların lipit peroksidasyonu: Hücresel membranların doymamış yağlarında bulunan çift-bağlar ile oksijen kaynaklı serbest radikallerin etkileşimi kararsız ve reaktif olan peroksitlerin ortaya çıkmasına sebep olur.

• Protein modifikasyonları: Serbest radikaller proteinlerin, çapraz-bağlanma oranını artırarak yıkımına veya enzimatik aktivitelerini kaybetmelerine sebep olur. Ayrıca direkt olarak polipeptidlerin parçalanmasına da yol açabilir.

• DNA hasarı: Serbest radikaller çekirdek ve mitokondri DNA'sındaki timin ile reaksiyona girerek tek iplikçik kırılmalarına yol açar. Böylece, oluşan DNA hasarı ile hücre ölümü, yaşlanma ve malign değişimler gelişebilir (Şekil 1.10) (Kumar ve ark 2007).



Şekil 1.10. ROT'lerinin hücre içinde üretilmesi, uzaklaştırılması ve patolojik etkileri (Kumar ve ark 2007).

Yapılan bir *in vitro* çalışmada, AFB1'in, reaktif oksijen türlerinin de içinde bulunduğu serbest radikallerin salınımını uyardığı saptanmıştır (Amstad ve ark 1984). Ayrıca reaktif oksijen türlerini etkisiz hale getiren süperoksit dismutaz ve katalazın, AFB1'in rat hepatositleri üzerindeki öldürücü etkisini engelledikleri belirlenmiştir. Bu bilgi, reaktif oksijen türlerinin AFB1 tarafından oluşturulan hücre toksikasyonunda önemli bir role sahip olduklarını kanıtlamaktadır (Kyle ve ark 1987).

AFB1'in, rat ve ördek karaciğeri ile fare akciğerinde ROT oluşumunda artışa neden olabileceği belirtilmiştir (Shen ve ark 1995, Barraud ve ark 2000). Ratlara AFB1 verilmesinin, gama-glutamil transpeptidaz (GGT), 5'-nükleotidaz, asit fosfataz, asit ribonükleaz aktivitelerinde ve altı ay sonrasında karaciğerdeki lipit peroksit içeriğinde önemli artışa neden olduğu gösterilmiştir (Rastogi ve ark 2001, Karaman ve ark 2010). Ayrıca, 300 ppb aflatoksin verilen civcivlerde güçlü bir iNOS ve nitrotirozin immunoreaktivitesi gözlenmiştir (Karaman ve ark 2010).

Son zamanlarda, oksidatif stresin apoptozu indüklediği kabul edilmektedir (Chandra ve ark 2000). Apoptozu indükleyen birçok madde hem oksidanlar hem de hücresel oksidatif metabolizma uyarıcılarıdır. AFB1'in p53, bax ve bcl2 gibi proapoptotik proteinlerin ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Duan ve ark 2005).

1.8. Apoptoz ve Aflatoksinlerin Apoptoz Üzerine Etkileri

Apoptoz, hücrenin DNA'sının, nükleer ve sitoplazmik proteinlerinin yıkımına neden olacak enzimleri aktive etmesiyle gerçekleşen programlı bir hücre ölümü

çeşididir. Apoptoz, gelişme ve yaşlanma sırasında normal olarak dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizma olarak gerçekleşir. Apoptoz, bağışıklık reaksiyonlarında olduğu gibi, hücreler hastalık nedeniyle veya zararlı maddelerle hasar görmüşse savunma mekanizması olarak da işlev görür. Apoptotik hücre ve komponentleri, plazma membranının sağlam kalmasıyla hücre içeriğinin dışarıya sızmasına zaman kalmadan, hızla ortadan kaldırıldığından apoptotik hücre ölümü konakta yangısal yanıta neden olmaz. Apoptozun fizyolojik veya patolojik nedenlerden kaynaklanabileceği bildirilmektedir (Green 2011). Patolojik nedenler kısaca şu şekilde sıralanabilir;

-Radyasyon, kanser tedavisinde kullanılan sitotoksik ilaçlar, aşırı sıcak veya soğuk, hipoksi, doğrudan veya serbest radikal üretimi üzerinden DNA'ya hasar verebilir. Onarım mekanizmaları hasarla başa çıkamazsa hücre apoptozu başlatılabilir. Bu gibi durumlarda hücrenin yok edilmesi, hasarlı DNA'da malign transformasyona ilerleyebilecek mutasyonların oluşumu riskinden daha iyi bir seçenektir. Kanser hücrelerinde apoptoz başlatmak, çoğu DNA'ya hasar veren kemoterapötiklerin arzu edilen bir etkisidir.

-Hatalı proteinler, kendilerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar veya serbest radikallerin yol açtığı hasar nedeniyle meydana gelebilir. Bu proteinlerin endoplazmik retikulumda aşırı miktarda birikmesi sonucunda apoptotik hücre ölümü görülebilir.

-Bazı enfeksiyonlar, özellikle viral enfeksiyonlarda çoğalan virüs (adenovirüs veya HIV gibi enfeksiyonlar) ya da konak immun yanıtı (viral hepatitteki gibi) apoptotik hücre ölümünü başlatabilir.

-Parankim hücrelerinde, obstrüksiyonları izleyen patolojik atrofiler sonucu da apoptoz görülebilir (Kumar ve ark 2007).

Aflatoksin B1 ile toksikasyon oluşturulan ratlarda yapılan bir çalışmada apoptoz yolaklarında önemli yeri bulunan kaspaz-3 aktivitesi kontrol gruplarına göre oldukça yüksek çıkmıştır. Bu durum oksidatif stres göstergeleri olan lipit peroksidaz ve nitrik oksit seviyelerinin yükselmesi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca glutatyon, glutatyon peroksidaz (GSPx) ve glutatyon redüktaz gibi antioksidan seviyelerinde de önemli düşüşler kaydedilmiştir (Meki ve ark 2004). Benzer şekilde, 21 gün boyunca 150-300 ppb AFB1 verilen civcivlerin karaciğerinde birçok apoptotik hücre ile birlikte

hayvanların karaciğerinde ve böbreklerinde yüksek düzeyde malondialdehit (MDA) tespit edilmiştir (Özen ve ark 2009).

1.9. Aflatoksinlerin Fiziksel Yollarla Detoksifikasyonu

Temizleme, yıkama, eleme, toksinle bulaşık tohumların veya danelerin ayrılması, ısı veya ışınlama gibi yöntemlerle mikotoksinler yemden fiziksel olarak uzaklaştırılabilmektedir. Basit olarak elle küflü danelerin ayrılması yemde bulunan aflatoksin ve fumonisin oranının %70-90 oranında azalmasına neden olmuştur. Yemin toksinlerden temizlenmesinde % 90'lık metil alkol, hekzan, aseton, asetonitril gibi organik çözücüler ile kalsiyum klorür, sodyum bikarbonat ve sodyum klorür gibi sulu çözeltiler kullanılabilmektedir (Basmacıoğlu ve Ergül 2003).

Yapılan bir çalışmada 20000-30000 ppb AFB1 içeren kontamine pirinç, haziran ayı boyunca 5 saat süreyle doğrudan 37°C'den 42°C'ye kadar değişen sıcaklıklarda güneş ışığına maruz bırakılmıştır. Sonuçlar, doğrudan güneş ışığına maruz bırakmanın AFB1 içeriğini %10-17 azalttığını göstermiştir (Bedi ve Agarwal 2014). Ayrıca X-ışınları, g-ışınları, elektron ışını ve UV ışınlar gibi radyasyon ışınlarının mikotoksinleri yok ettiği gösterilmiştir (Rai ve Varma 2010).

1.10. Aflatoksinlerin Kimyasal Yollarla Detoksifikasyonu

Aflatoksinlerle kontamine olmuş yemlerin kimyasal yolla detoksifiye edilmesinde kalsiyum hidroksit, sodyum bisülfit, monometilenamin, klorin gazı, amonyak, hidrojen peroksit, amonyum hidroksit, hidroklorik asit ve formaldehit gibi pek çok kimyasal ajan kullanılmıştır (Keser ve Kutay 2009, Düzel 2016, Oğuz 2017). Ancak bu yöntemlerin kullanılması bir takım uygulama güçlüklerinin yanı sıra yemlerde insan ve hayvan sağlığına zararlı olabilecek kalıntı problemlerine de neden olabilmektedir. Örneğin; aflatoksinlerin detoksifasyonunda amonyak kullanımı ile yapılan pek çok çalışmada, amonyak kullanımının etkili ve pratik bir metot olduğu belirtilse de güvenilirliği konusu tam olarak aydınlatılamamıştır (Basmacıoğlu ve Ergül 2003).

Detoksifikasyon amacıyla kullanılan oksitleyici ajanlardan biri de Ozon (O_3)'dur. Yapılan bir çalışmada, mısır üzerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan

O3'ün, AFB1'i %57, AFG1'i ise %54,6'ya varan seviyelerde düşürdüğü rapor edilmiştir (Porto ve ark 2019).

Kimyasal maddelerin, çeşitli mikotoksinleri yok etmekte etkili olduğu gösterilmiş olsa da, FAO'nun işlenmiş gıdaların ve yemlerin besinsel ve organoleptik özelliklerinin korunması için ortaya koyduğu gereklilikleri yerine getiremediklerinden dolayı bu kimyasal maddelerin kullanımları kısıtlanmıştır (Rai ve Varma 2010).

Son yıllarda yemde bulunan mikotoksinleri adsorbe edebilen spesifik bazı maddelerin kullanımı sayesinde toksinlerin bağırsaklardan emilmeden dışarıya atılması sağlanmaya çalışılmaktadır (Oguz ve Kurtoglu 2000). Yoğun olarak kullanılan bazı inert adsorban maddeler ile bunların etkili oldukları mikotoksinler Çizelge 1.2' de özetlenmiştir.

Çizelge 1.2. Yoğun olarak kullanılan inert adsorbanlar ve etkileri.

Bileşik	***Etkili Olduğu Mikotoksin***
Hydrated sodium calcium aluminosilicate (HSCAS)	Aflatoksin B1
Zeolitler	Aflatoksin B1 ve Zeralenon
Bentonitler	Aflatoksin B1 ve T-2 toksin
Spesifik killer (kaolin, sepiolite ve montmorillonite)	Aflatoksin B1
Aktif karbonlar	Okratoksin ve Aflatoksin B1
Kolestiralamin	Okratoksin ve Zeralenon
Polivinil poli prolidon polimerleri (PVPP)	Aflatoksin B1
Clinoptilolite	Aflatoksin

Aktif karbon (AK), farklı organik maddelerin piroliziyle oluşturulan çözülmeyen bir toz olup, kökenine bağlı olarak farklı adsorpsiyon özellikleri gösterir. Gastrointestinal sistemde AK'ların mikotoksinlere karşı etkinliği ile ilgili olarak, %2'lik AK'nin, zearalenonun bağırsak emilimini %32'den %5'e düşürmeyi başardığı gösterilmiştir. Ayrıca AK'nin laktasyondaki hayvanlarda AFM1 seviyesini düşürmede etkili olduğu belirtilmiştir. Fakat AK'un yüksek maliyeti, çevre ve yemi karartma eğilimi, besleme için kullanımını kısıtlamaktadır. Ayrıca, uzun süreli kullanımının, evcil hayvanlarda besin maddesi eksikliğine (örn. vitaminler ve mineraller) yol açıp açmayacağı bilinmemektedir (Galvano ve ark 2001, Rai ve Varma 2010).

Alüminosilikatlar arasında, doğal zeolitten üretilen bir filosilikat olan HSCAS, yüksek aflatoksin bağlama kapasiteleri nedeniyle en yaygın olarak incelenen adsorbenttir. HSCAS aflatoksin toksisitesini azaltmada etkiliyken diğer mikotoksinlere karşı etkinliği çok düşüktür (Rai ve Varma 2010).

Zeolitlerin adsorpsiyon yeteneği ile ilgili literatürde çelişkili raporlar bulunmaktadır. Bir zeolit olan klinoptilolitin %1,5 oranında kullanılmasının broyler piliç performansı üzerinde aflatoksinlerin olumsuz etkilerini azalttığı gösterilmiştir (Oguz ve Kurtoglu 2000). Öte yandan başka bir çalışmada %0,5 klinoptilolit kullanımı ile diyetteki aflatoksinin yüksek konsantrasyonlarında toksik etkilerinin önemli ölçüde azalmadığı kaydedilmiştir (Harvey ve ark 1993).

Bentonitin aflatoksinin toksik etkilerinin azaltılmasında etkili olduğu bildirilmiştir. Lindemann ve ark (1993) yaptığı çalışmada, sodyum bentonitin (%0,5), AFB1 içeren domuz rasyonuna ilave edilmesiyle, ortalama günlük ağırlık artışı ve yemden yararlama oranlarında iyileşme sağladığı görülmüştür. Başka bir çalışmada (Santurio 1999), tavukların bağırsak lümeninden aflatoksinlerin emiliminin sodyum bentonit ilavesi ile azaltıldığı sonucuna varılmıştır.

1.11. Aflatoksinlerin Biyolojik Yollarla Detoksifikasyonu

Fiziksel ve kimyasal detoksifikasyon yöntemlerinin uygulama güçlükleri ve yemlerde/gıdalarda meydana gelen organoleptik ve fiziksel bozulmalar araştırmacıları biyolojik ürünlerin geliştirilmesine sevk etmiştir. Bu kapsamda bazı bakteriler (ör; Lactobasiller) ile Saccharomyces türü mayalar bu amaçla denenerek olumlu sonuçlar alınmıştır (Dawson ve ark 2001). Bu maya türü direk yeme ilave edilebileceği gibi maya hücre duvarından elde edilen glucomannan veya esterleşmiş şekli mannanoligosakkaritler de bu amaçla kullanılabilmektedir (Basmacıoğlu ve Ergül 2003, Karaman ve ark 2005).

1.12. Aflatoksinlerin Antioksidan Maddelerle Detoksifikasyonu

Aflatoksin maruziyetinin ardından karaciğer dokusunda, lipit peroksit seviyelerinde belirgin artış ve enzimatik (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glikoz-6-fosfat dehidrojenaz ve glutatyon-S-transferaz) ve enzimatik olmayan (azalmış glutatyon, vitamin C ve vitamin E)

değişimler gözlenmiştir. Deneysel koşullara (türe, doza, zamana ve uygulama yoluna, diğer antioksidan konsantrasyonuna vb.) bağlı olarak, antioksidan özellikli diğer enzimlerin aktiviteleri, oksidatif strese bir yanıt olarak artabilir veya mikotoksinlerin doğrudan veya dolaylı etkilerine bağlı olarak azalabilir (Marin ve Taranu 2012). Hayvan türlerinin çoğunda AFB1'in detoksifikasyonunun başlıca yolu, AFBO'nun indirgenmiş glutatyon ile konjügasyonudur (Bbosa ve ark 2013). Bu şekilde detoksifikasyon birçok hayvan türünde AFB1 atılımının temel yoludur. Reaksiyon GST ile katalize edilir (Peter 1992). Yetişkin farelerin AFB1'e direncinin, karaciğerde AFB1'e karşı yüksek katalitik aktivite sergileyen GST'nin alt birimi A3'ün (mGSTA3, ayrıca Yc veya Ya3 olarak da bilinir) varlığına bağlı olduğu öne sürülmüştür (Buetler ve Eaton 1992). AFB1 toksisitesinden farelerin korunmasında mGSTA3'ün rolü, mGSTA3'den yoksun farelere tek bir AFB1 uygulamasını takiben incelenmiştir. AFB1 uygulamasından sonra bu fareler, normal kontrol farelerindeki seviyelere göre, karaciğerlerinde AFB1-N7-DNA adükt seviyelerinde 100 kattan fazla bir artış göstermiş; bu durum AFB1 hepatokarsinogenezis direncine karşı fare karaciğerindeki mGSTA3'ün kilit rolünü ortaya koymuştur (Hayes ve ark 1992, Ilic ve ark 2010).

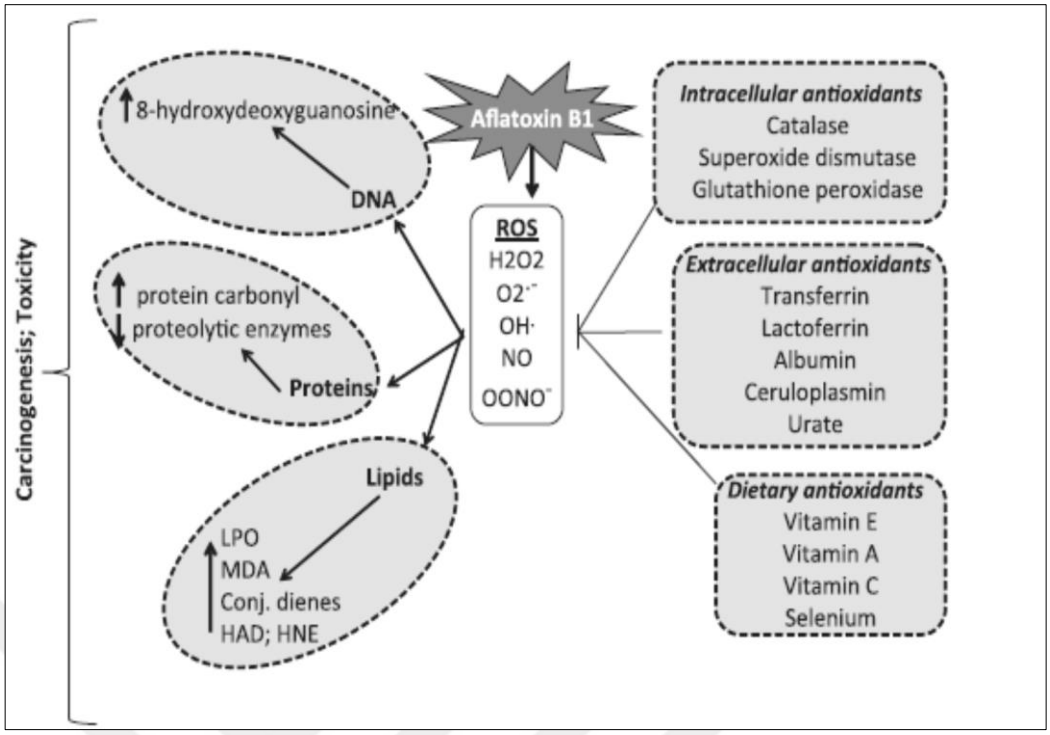
AFB1 maruziyeti sonucu GSH konsantrasyonu artabilir. Böbrekte GSH konsantrasyonunun, aflatoksinin 10 gün uygulanmasının ardından arttığı gözlemlenmiştir (Beers ve ark 1992a). Benzer şekilde tavuklarda, GSH'in karaciğer konsantrasyonu tek doz AFB1 uygulamasını takiben 2 ve 8 saat sonra arttığı belirtilmiştir (Beers ve ark 1992b). Ayrıca, Pekin ördeklerinde AFB1 uygulaması süperoksit dismutaz aktivitesinde belirgin bir artışa neden olmuştur (Barraud ve ark 2000). AFB1 detoksifikasyonunun asıl yolunun AFBO'in glutatyon ile konjugasyonuna dayandığı bilgisi göz önüne alındığında, bu sonuçlar organizmanın kendisini AFB1 toksisitesine karşı savunma girişimi olarak açıklanabilir. Fakat bazı çalışmalarda (Meki ve ark 2001, Ali Rajput ve ark 2017), organizmanın savunma kapasitesinin aşıldığı durumlarda GSH konsantrasyonunda azalma gözlenmiştir. Ratlarda intraperitonel olarak AFB1 uygulamasının (2 mg/kg) karaciğer GSH düzeyinde azalma ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Nili-Ahmadabadi ve ark 2011). Benzer sonuç, hepatosit kültürlerinde yapılan bir çalışmada da gözlenmiştir (Liu ve ark 1999). Ayrıca, fare ve ratlarda AFB1 zehirlenmesinin, antioksidan savunmaya katılan enzimlerin (süksinat dehidrojenaz, glikoz-6 fosfataz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT) süperoksit dismutaz ve GST) aktivitesinde

belirgin azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (Rastogi ve ark 2001, Adedara ve ark 2010). GSH'nin azalmasına, AF uygulanan civcivlerin veya ratların karaciğer ve böbreklerinde MDA ve NO konsantrasyonlarının artışı eşlik etmiştir (Meki ve ark 2001, Karaman ve ark 2010). Ratlarda, AFB1'in doğrudan veya dolaylı kaspaz-3 aktivasyonuna, dolayısıyla rat karaciğerinde apoptozise yol açabileceği gösterilmiş ve kaspaz-3 aktivitesi MDA ile pozitif korelasyon gösterirken, GSH, GSPx ve GR ile negatif korelasyon saptanmıştır (Meki ve ark 2001). Buradan, AFB1'in bir taraftan oksidatif stresi arttırarak, diğer taraftan antioksidan enzimlerin azalmasına neden olarak hücreyi apoptoza sürüklediği anlaşılmaktadır.

Antioksidanlar serbest radikalleri stabilize ederek hücrenin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü korurlar ve bağışıklık sisteminin antijenlere cevap verme kapasitesini arttırırlar. Antioksidanlar arasında, selenyum, karotenoidler, vitamin A, C ve E önemli bir yer tutmaktadır. Bu antioksidanların yetersizliğinde, farklı organ fonksiyonlarının aksaması, tümör progresyonu, enfeksiyonlar ve genel sağlık durumunda bozulmalar olabileceği gösterilmiştir (Şekil 1.11) (Shi ve ark 1994, Alpsoy ve ark 2009). Birçok durumda, AFB1'in neden olduğu lipit peroksidasyonu, antioksidan konsantrasyonun azalması ile ilişkilendirilmiştir (Marin ve Taranu 2012).

Antioksidanların kanserojenlerden önce veya aynı zamanda uygulandıklarında bunların toksik etkilerinin hafifletilmesindeki etkinlikleri ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. AFB1 uygulanan ratlarda yapılan bir çalışma, diyetteki E vitamininin hücre membranını, direkt olarak lipit peroksidasyonu ve dolaylı olarak hepatik mikrozomal monooksigenaz aktiviteleri tarafından oluşacak hasara karşı koruduğunu göstermiştir (Cassand ve ark 1993). Bazı durumlarda, A ve E vitamini takviyesinin, aflatoksinin neden olduğu değişiklikleri iyileştirdiği ve anti-mutajenik etki ile aflatoksin kaynaklı karsinogenezi inhibe ettiği bildirilmiştir (Verma ve Nair 2001).

Likopen ve beta-karoten, AFB1'in insan hepatositleri üzerinde indüklediği *in vitro* toksisiteyi, apoptozu ve AFB-guanin adükt seviyesini düşürerek inhibe etmede etkilidir (Alpsoy ve Yalvac 2010). Bu karotenoidlerin ayrıca p53 tümör baskılayıcı gendeki AFB1 kaynaklı mutasyonları inhibe ederek, AFB1'in metabolizmasını engellediği gösterilmiştir (Reddy ve ark 2006, Tang ve ark 2007).



Şekil 1.11. Antioksidanların yokluğunda aflatoksinlerin oksidatif stres üzerine etkisi (Marin ve Taranu 2012).

1.13. Aflatoksinler ile Tıbbi Bitkiler ve Bitki Özleri

Aflatoksinlerin, özellikle de en güçlü doğal hepatokarsinojen AFB1'in önemi, biyokimyadan genetik ve kontrol stratejilerine kadar çok çeşitli alanlarda önemli ilerlemelere yol açmıştır. Aflatoksinleri etkisizleştirmek için yukarıda tanımlanan kimyasalların çoğunun kullanımı, etkin konsantrasyonlarda insan ve hayvan toksisitesi, toksikojen funguslarda direnç gelişmesi, güvenli deneyler için yüksek maliyetler ve ekosistemi paylaşan hedef olmayan organizmalar üzerinde istenmeyen etkiler de dahil olmak üzere büyük sınırlamalardan etkilenmektedir. Araştırmacılar, AF biyosentezinin etkili ve daha güvenilir yöntemlerle önlenebilmesi için, bitkiler ve mikroorganizmalar da dahil olmak üzere doğal kaynakları değerlendirmeye odaklanmışlardır. Bu alanda, çok sayıda bitki esans yağı ve özütlerin taranması sonucu, mantar oluşumuna/AF üretimine karşı ve bu toksinlerin organizma üzerinde oluşturduğu zararların onarımına yönelik potansiyel etki gösterebilen bazı bitkiler tanımlanmıştır. Tıbbi bitkilerden ilaç keşfi konusundaki son gelişmeler, farmasötik olarak aktif bileşiklerin bilhassa kansere, HIV/AIDS'e, sıtmaya ve ağrıya karşı potansiyel etkili maddelerin izole edilmesine ve saflaştırılmasına yol açmıştır (Balunas ve Kinghorn 2005).

Bitkisel tıbbın binlerce yıllık geçmişi bulunmaktadır. Tıbbi bitkiler dünyada yaygın olarak bulunur ve flavonoidler, alkaloidler, terpenoidler, terpenler, aromatik bileşikler vb. (aldehitler, alkoller, fenoller, vb.) gibi yararlı metabolitlerin zengin kaynaklarıdır. Doğada bu metabolitler, bitkilerin çeşitli bitki mikroorganizmaları, böcekler ve otobur gruplarından korunmasında önemli rol oynamaktadır (Bakkali ve ark 2008).

Araştırmacılar, şifalı otlar ve bitkilerden elde edilen birçok ekstraktın AFB1 toksisitesini önleme kapasitesine dikkat çekmiştir. Bunlar arasında; *Cassia senna* konsantresinin (laksatif olarak kullanılan bir bitki) etanol özütü (Al-Dakan ve ark (1995), *Cassia tora*'nın metanol ekstraktı (Choi ve ark 1997), *Semecarpus anarkurum* fıstığı özütü (Premalatha ve ark 1997), *Piper argyrophyllum* yapraklarının metanol ekstraktı (Raj ve ark 1998), *Thonninga sanguinea* ekstraktı (Gyamfi ve Aniya 1998), *Rosmarinus offcinalis L.*'de (biberiye) bulunan iki doğal polifenol olan karnozol ve karnozik asit (Offord ve ark 1997) ve *Schisandra chinensis* meyvesinin (Şizandra üzümü) lignin bakımından zenginleştirilmiş bir özütünün (Ip ve ark 1996) AFB1'e karşı hepatoprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir.

Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, AFB1 uygulanan gruplarda silimarinin standart bir hepatoprotektif olduğu, artmış karaciğer MDA düzeyini azalttığı ve açıkça hepatik GSPx aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (Kheir Eldin ve ark 2008). Firozi ve Bhattacharya (1995) da Curcuminin, CYP450 fonksiyonunu modüle ederek AFB1-DNA adüktlerinin oluşumunu azalttığını bildirmiştir.

Choi ve ark (2010), en yoğun Mürver (yivdin) olmak üzere birçok meyve ve sebzede bulunan bir flavonoidler olan quercetin ve isorhamnetinin, Cabassi ve ark (2004) da sarımsağın bileşimindeki diallilsülfit ve diallildisülfitin AFB1'in neden olduğu pek çok zararlı etkileri engellediğini veya azalttığını kaydetmişlerdir.

Kemoprotektif ve antikarsinojenik etkilere sahip kahve, AFB1'in genotoksik etkilerine karşı koruyucu özelliği bulunan kafestol ve kafeol içerir. Ratlarda AFB1 genotoksisitesi üzerine yapılan çalışmalarda, kafeol ve kafestol içerikli diyetin DNA adüktünü azaltmasının yanı sıra CYP450 enzim aktivitesini azalttığı, GST enzimini arttırdığı ve dolayısıyla AFB1 detoksifikasyonuna yardımcı olduğu gösterilmiştir (Cavin ve ark 1998, Cavin ve ark 2001).

1.14. Nigella Sativa Linnaeus (Çörek Otu) Tohumu

Nigella sativa L., Ranunculaceae (düğün çiçeğigiller) familyası üyelerinden biri olup yoğun olarak Doğu Akdeniz ülkelerinde yetiştirilmektedir. Ülkemizde 12 adet Nigella türü yetişmektedir. Çoğunun kimyasal ve farmakolojik özellikleri tam olarak bilinmemektedir. Türkiye'de tarımı ve ticareti yapılan tek tür Nigella sativa L. olup yaygın olarak Afyon, Isparta, Burdur ve Konya yörelerinde yetiştirilmektedir. Nigella sativa L.'nin tohumları tüm dünyada geleneksel tıpta kullanılmaktadır. Nigella sativa L. ("black cumin" ya da "black caraway") eskiden beri hem gıdalarda hem de tıbbi alanda yoğun kullanımından dolayı daha kapsamlı olarak araştırılmaktadır (Yayla 2014).

Çörek otu tohumunun geleneksel olarak diüretik, diyaforetik, karaciğer kuvvetlendirici ve digestif etkileri bilinmektedir. Diğer maddelerle birlikte hazırlanan preparatları ağız kokusunu gidermenin yanında obezite, nefes darlığı, diyare, hazımsızlık ve dispepside kullanılır. İştahsızlık, kusma, ödem ve lohusa dönemi hastalıklarında faydalı olmuştur. Safra taşına karşı koruyucudur. Hepatik ve digestif rahatsızlıklarda önemli bir ilaç olarak düşünülmektedir. Ayrıca kronik baş ağrısı ve migren tedavisinde kullanılmaktadır (Ali ve Blunden 2003, Uras 2009).

Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgulara göre, çörek otu tohumu ve bileşenlerinin bazı farmakolojik etkileri şu şekilde sıralanabilir; antioksidan, immünmodülatör, antiinflamatuar, antifungal, antihelmintik, antidiyabetik, antiülserojenik, antinosiseptif, antikonvülzan, antialerjik, analjezik, antibakteriyel, antiviral, antitümör, antihepatonefrotoksik, antiaflatoksin ve nöroprotektif etki (Khan 1999, El-Dakhakhny ve ark 2000, Kalus ve ark 2003, Salem 2005).

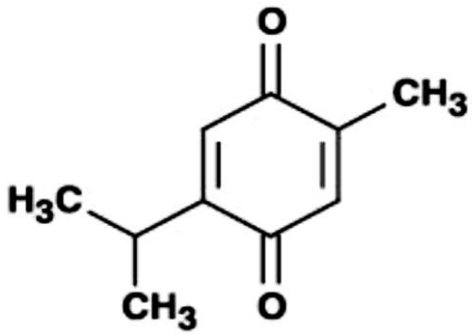
Nigella Sativa L.'nin Bileşimi

Çörek otu tohumunun kimyasal içeriği bitkinin hasat mevsimine, çeşidine ve yetiştirildiği iklime göre değişmektedir. Nigella sativa L. tohumlarının yapısında; uçucu yağlar, sabit yağlar, proteinler, aminoasitler, alkaloidler, tanenler, saponinler, lifler, karbonhidratlar, mineraller, askorbik asit, tiamin, niasin, pridoksin ve folik asit bulunmaktadır (Hanafy ve Hatem 1991). Farmakolojik etkilerden daha çok sabit ve uçucu yağlar sorumlu olduğu için çalışmalar bu iki etken madde grubu üzerinde

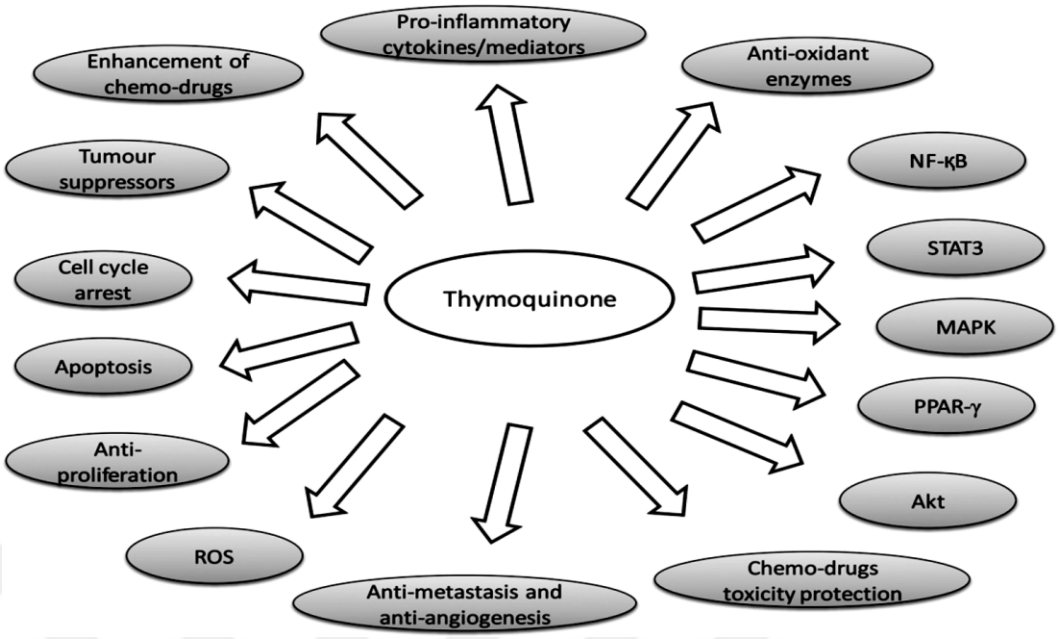
yoğunlaşmıştır (Türker ve Bayrak 1997, Nickavar ve ark 2003). Nigella sativa L. tohumlarından elde edilen uçucu yağların yapısında bulunan ve miktar olarak önemli bileşenleri; p-simen, timokinon, α-pinen ve β-pinen'dir. Timokinon, ditimokinon, timohidrokinon ve timolün farmakolojik olarak aktif bileşenler olduğu belirtilmiştir (Hanafy ve Hatem 1991, Houghton ve ark 1995). Sabit yağların yapısında ise oleik asit, linoleik asit, eikozadienoik, araşidonik asit ve linolenik asit gibi doymamış yağ asitleri ile çeşitli doymuş yağ asitleri bulunmaktadır. Bunların yanı sıra, Nigella sativa L. tohumlarında az miktarda B1, B2 ve B6 vitamini ile demir, kalsiyum, magnezyum, çinko ve selenyum gibi mineraller vardır (Yayla 2014). Zengin bir bileşim gösteren Nigella sativa L. tohumlarının birçok çözücü ile ekstraksiyonları yapılarak çeşitli polar ve non-polar bileşikler ve etken maddeler elde edilmiştir. Fenolik içeriği sunması bakımından etanol en çok tercih edilen ekstraksiyon çeşidi olmuştur. Nigella sativa L. tohumlarının etanol ekstresinde baskın fenolik bileşenler kuersetin ve kaempferoldür (Merfort ve ark 1997).

1.15. Timokinon

Timokinon (TQ) ($C_{10}H_{12}O_2$, 2-izopropil-5-metil 1, 4-benzokinon) çörek otu tohumlarının esansiyel yağında %27,8-57 oranında bulunan en önemli biyoaktif bileşendir (Şekil 1.12) (Lautenbacher 1997, Burits ve Bucar 2000, Ali ve Blunden 2003). Çalışmalar, çörek otu tohumlarının biyolojik aktivitesinin ağırlıklı olarak esansiyel yağ bileşenine özellikle de timokinona atfedildiğini göstermiştir (Woo ve ark 2012). Timokinonun El–Dakhakhny (1963) tarafından izole edilmesinden bu yana, araştırmacılar bu maddeyi inflamasyon, kanser, sepsis, ateroskleroz ve diyabet gibi birçok hastalıkta terapötik etkisi için test etmiştir (Şekil 1.13). Bu çalışmalar, timokinonun birçok farklı etki modunu ortaya çıkarmıştır (Woo ve ark 2012).



Şekil 1.12. Timokinonun kimyasal yapısı.



Şekil 1.13. Timokinonun kanser ve yangı üzerine çeşitli etkileri (Woo ve ark 2012).

1.16. Nigella Sativa L. ve Timokinonun Antioksidan Etkileri

Çörek otu tohumu ve uçucu yağlarının, özellikle de timokinonun güçlü antioksidan özelliğe sahip olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu konudaki bir çalışmada (Burits ve Bucar 2000), timokinon, karvakrol, *t*-anetol ve 4-terpineol'un önemli birer radikal temizleyicisi olduğu gösterilmiştir. Kruk ve ark (2000) tarafından da N. sativa tohumları bileşenlerinden timol, timokinon ve ditimokinonun, süperoksit anyon (O_2^-), hidroksil (HO-) ve singlet oksijen ($^1O_2$) gibi radikal oksijen türlerinin etkilerini giderdiği bildirilmiştir. Ayrıca Nigella sativa tohumlarının sulu ekstraktının (Mahmood ve ark 2003) ve timokinonun (El-Mahmoudy ve ark 2002), rat peritonal makrofajlarının nitrik oksit (NO) üretiminde doza bağımlı azalmaya neden olduğu kaydedilmiştir.

Nigella sativa'nın aktif bileşeni olan timokinon, rat hepatositlerinde tert-bütil hidroperoksit (TBHP) toksisitesine karşı hücre kültürlerinde test edilmiş ve TQ'nun hepatoprotektif bir ajan olduğu sonucuna varılmıştır (Daba ve Abdel-Rahman 1998).

Diyabetik tavşanlarda yapılan bir çalışmada Nigella sativa L.'nin lipit peroksidasyonunu azaltıp azaltamayacağı, antioksidan savunma sistemini artırıp artırmadığı ve diyabetik tavşanlarda lipit peroksidasyonuna bağlı karaciğer hasarını

önleyip önlemediği araştırılmıştır. Bu kapsamda diyabetik tavşanlara 2 ay süreyle ağızdan N. sativa tohumlarının ekstraktları verilmiştir. Araştırma sonucunda N. sativa ile yapılan tedavinin, diyabetik tavşanlarda yüksek glikoz ve MDA konsantrasyonlarını düşürerek, GSH ve serüloplazmin konsantrasyonlarını artırdığı ve lipit-peroksidasyona bağlı karaciğer hasarını önlediği tespit edilmiştir. Böylelikle N. sativa'nın lipit peroksidasyonunu önlemek, antioksidan savunma sistemi aktivitesini arttırmak ve karaciğer hasarını önlemek için diyabetik hastalarda kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Meral ve ark 2001).

Tavşanlarda karbon tetraklorür (CCl_4) ile oluşturulan karaciğer fibrozisinin önlenmesinde vitamin C ve E, selenyum ve Nigella sativa (NS) gibi antioksidanların rolü araştırılmış, NS uygulanan hayvanlarda lezyonların daha hafif olduğu ve sentrilobüler nekroz ve fibrozis olmadan midzonal bölgelerde sınırlı kaldığı belirlenmiştir. Histopatolojik bulgular NS'nin tavşanlarda karaciğer fibrozisinin önlenmesinde kısmen başarılı olabileceğini göstermiştir (Türkdoğan ve ark 2001).

1.17. Aflatoksinler ile Nigella Sativa L. ve Timokinon

Aflatoksikozis çiftlik hayvanlarında özellikle kanatlı sektöründe önemli bir sorun olmasının dışında hayvansal ürünlerde olası kalıntı varlığı ve bazı gıdalara da doğrudan bulaşabilmeleri sebebiyle ciddi bir halk sağlığı problemidir. Günümüzde birçok tıbbi bitki, destekleyici tedavi amacıyla yoğun olarak kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütünün tahminlerine göre 20 binden fazla bitki türü tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. Nigella sativa L. (çörek otu) ve onun ana bileşeni olan timokinonun son zamanlarda birçok *in vivo* ve *in vitro* deneylerle terapötik, hepatoprotektif, antikarsinojen, antiinflamatuar, immünmodülatör vs. etkileri araştırılmaktadır (Hanafy ve Hatem 1991, Daba ve Abdel-Rahman 1998, El-Dakhakhny ve ark 2000, Türkdoğan ve ark 2001, Salem 2005, Basarslan ve ark 2012, Ince ve ark 2012, Wagner ve ark 2012, Woo ve ark 2012, Nehar ve Kumari 2013, Alimohamadi ve ark 2014, Pourbakhsh ve ark 2014, Farkhondeh ve ark 2018).

Funguslar gıda ve yemlerin depolanması sırasında üreyerek besin değerlerini düşürmek suretiyle bazen de doğrudan mikotoksin üreterek bunları insan tüketimi için uygunsuz kılan önemli kirleticilerdir (Kumar ve ark 2007). Birleşmiş Milletlerin gıda ve tarım organizasyonu (FAO) dünyadaki tahıl tohumlarının en az % 25'inin

aflatoksinler gibi mikotoksinlerle kontamine olduğunu tahmin etmiştir (Labbé ve García 2013). Sentetik ajanlar yanında, bazı bitkiler ve bunların aktif metabolitleri aflatoksin biyosentezinin önleyicileri olarak sunulmuştur (Sakuda ve ark 2000, Yoshinari ve ark 2007, Roze ve ark 2011). N. sativa'nın ise aflatoksin üreten mantarlara karşı etkisi hakkında çok az veri rapor edilmiş olmasının yanında aflatoksinlere ya da etkilerine karşı detoksifikasyon çalışmalarına ağırlık verilmektedir (Shokri 2016).

Khosravi ve ark (2011)'nın yaptığı bir çalışmada, N. sativa esansiyel yağının *A. parasiticus*'un büyüme ve aflatoksin üretimi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Sonuçlar, N. sativa yağının *A. parasiticus*'a karşı orta düzeyde bir etkinliğe sahip olduğunu ancak aflatoksin üretiminde %96,2 değerinde bir azalmaya neden olduğunu göstermiştir.

Maraqa ve ark (2007)'nın yaptığı bir çalışmada, N. sativa'nın %5 konsantrasyondaki ham özütü üç tip aflatoksinin (AFB1, AFB2, AFG2) üretimini inhibe ederken, %3'lük konsantrasyonundaki yağının dört tip aflatoksinin (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) üretimini inhibe ettiği bildirilmiştir. Yazarlar, yağın anti aflatoksin özelliklerinin, daha önce gösterildiği gibi yüksek fenolik içeriği ile ilişkili olduğunu önermişlerdir (Cosentino ve ark 1999). El-Nagerabi ve ark (2012) tarafından yürütülen benzer bir çalışmada, %3 konsantrasyonunda N. sativa yağının, *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un aflatoksin B1 üretimini sırasıyla %47,9-58.3 ve %32-48 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir.

Al-Ghasham ve ark (2008), N. sativa'nın sitoprotektif ve antioksidan özelliklerine bağlı olarak ratlarda AFB1'in karaciğer ve böbreklerdeki toksik etkisini azalttığını göstermiştir. Abdel-Wahhab ve Aly (2005) aflatoksinle kontamine olmuş diyetle beslenen ratlarda N. sativa yağının aflatoksikozise karşı önemli derecede koruma sağladığını tespit etmiştir.

Farelerde AFB1 ile oluşturulan karaciğer toksisitesi üzerine TQ'nun koruyucu etkilerini araştırmaya yönelik yapılan bir çalışmada; TQ verilen hayvanlarda AST, ALT, ALP ve MDA düzeylerinin AFB1 grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu ve AF'den kaynaklanan yükselmeyi normale çevirdiği gösterilmiştir. Dahası, TQ karaciğer dokusunun glutatyon içeriğini iyileştirmeyi başarmıştır. AFB1 verilmiş

farelerin karaciğer kesitlerinde, nekroz, Kupffer hücre hiperplazisi, mononükleer hücre infiltrasyonu, sinüzoidlerde genişleme ve hepatositlerde dejenerasyon görülürken, TQ ile tedavi edilenlerde (özellikle 9 mg/kg, intraperitonel dozda) bu bulgularda anlamlı azalmalar görülmüştür (Nili-Ahmadabadi ve ark 2011).

Ratlarda deneysel olarak oluşturulan aflatoksikozisde, özellikle karaciğerdeki lezyonların oluşumunda ÇÖT'ün engelleyici etkisinin olup olmadığının biyokimyasal, histopatolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle araştırıldığı bir diğer çalışmada (Çelik 2007); GSH verilerinin, AFB1 uygulanan grubun karaciğer dokusu dışında kontrol grubuna göre önemli oranda değişmediği görülmüştür. Kan MDA düzeylerinin AFB1 grubunda arttığı, çörek otu uygulanan grupta ise anlamlı bir şekilde düştüğü gözlemlenmiştir. Serum enzimlerinden AST ve ALT düzeylerinde kontrol grubuna göre bütün uygulama gruplarında istatistiki açıdan önemli yükselmeler görülmüştür. AFB1 ve ÇÖT ekstraktının birlikte verildiği grupta, sadece AFB1'in verildiği gruba göre gözlenen mikroskobik bulguların bir kısmının hiç oluşmadığı ya da az şekillendiği dikkati çekmiştir. AFB1 ile oluşturulan karaciğer hasarında çörek otunun engelleyici etkisinin daha çok lipit peroksidasyonunu engelleme ve immun sistemi aktive etme özelliklerinden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (Çelik 2007).

Aflatoksinleri ham maddelerde, gıdalarda veya vücuda girdikten sonra biyotransformasyon aşamalarında etkisizleştirme konusunda yapılan onlarca çalışmaya rağmen, rutin uygulamaya aktarılabilecek düzeyde istenilen sonuçlara henüz tam olarak ulaşılamamıştır. Bu nedenle de aflatoksikozis sorunu güncelliğini korumakta ve bu toksik madde, çoğu zaman varlığı gözle fark edilmediği için insan ve hayvanlar tarafından gıdalarla kolayca alınarak, kanserojenik, mutajenik, hepatorenal, gastrointestinal, ürogenital, vasküler, immunosupresif ve sinirsel bozukluklar gibi birçok zararlı etkiye neden olmaktadır. AF'nin karaciğerde detoksifikasyon ve biyotransformasyon mekanizmaları oldukça karmaşık bir süreci ve çok çeşitli moleküler aşamaları kapsamaktadır. Bu konudaki derinlemesine çalışmalar yoğun şekilde devam etmekte olup, henüz bilinmeyen moleküler düzeydeki noktaların aydınlığa kavuşturulmasıyla, bu evrensel sorunun çözümüne yönelik doğabilecek yeni umutlar ve bakış açıları sayesinde yeni araştırma konuları ortaya çıkabilecektir. Bu çalışmanın amacı da; broyler civcivlerde aflatoksikozise karşı çörek otu tohumu ile bunun etkin maddesi olarak kabul edilen timokinonun olası koruyucu etkinliklerini

biyokimyasal ve histopatolojik bulgular ışığında belirlemek, her iki maddeyi karşılaştırmak ve ayrıca karaciğerde AF'nin biyotransformasyon aşamaları ile bu aşamalarda görevli çeşitli nükleer reseptör ve enzimler üzerine söz konusu maddelerin etkilerini immunohistokimyasal yöntemle 8 ayrı markırla (AFB1-DNA adüktü, PXR, AhR, CAR, CYP1A1, CYP2A6, glutatyon, GSTA3) moleküler düzeyde ilk kez araştırmaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Hayvan Materyali

Sunulan tez çalışması, TÜBİTAK 3001 Başlangıç AR-GE destekleme projeleri kapsamında, 117O872 nolu ve "***Broyler Civcivlerde Çörek Otu Tohumu, Timokinon ve Bentonitin Aflatoksikozise Karşı Koruyucu Etkinliğinin ve Biyotransformasyon Mekanizmalarının Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Olarak Moleküler Düzeyde Araştırılması***" isimli projeden üretilmiştir ve çalışmada Adana Garip Tavukçuluk Gıda ve Yem San.Tic. A.Ş.'den temin edilen 120 adet Ross ırkı bir günlük broyler civciv kullanılmıştır.

Deneysel çalışmaya başlamadan T.C. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu (SÜVDAMEK) tarafından, tüm çalışma sürecinde hayvanlar üzerinde gerçekleştirilecek işlemlerin uygunluğuna dair Etik Kurul onayı (No:2017/58) alındı. Tez projesi için ise, aynı kurul tarafından ayrıca etik kurul onayına ihtiyaç olmadığına karar verildi (No: 2018/02).

2.1.2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Çalışmada, nekropsi seti, patoloji makroskobi kabini, otomatik doku takip cihazı (Leica TP 1020), parafin dispanseri, mikrotom (Leica RM-2125 RT), etüv (Dedeoğlu), buzdolabı (Bosch), tam otomatik immunohistokimya boyama cihazı (Leica Bondmax), HPLC (Shimadzu, Tokyo, Japan) santrifüj, otomatik pipet (Axygen), 5 kollu, binoküler başlıklı, gelişmiş araştırma mikroskobu (Olympus, BX51, Tokyo, Japan), bilgisayar görüntüleme ve analiz programı (analySIS FIVE, Olympus), otoanalizör (ILab-300 bioMérieux Diagnostics, Milan, Italy) ile patoloji ve toksikoloji laboratuvarlarının diğer malzemeleri kullanıldı.

2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Aflatoksin üretiminde patates dekstroz agar (Merck), *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 suşu (USDA, Agricultural Research Service, Peoria, IL) ve baldo pirinç (Duru, Karaman, Türkiye) kullanıldı.

Fermente pirinç unundan HPLC cihazı ile AF analizleri için, AF miks standardı (B1 ve G1; 2 µg/mL, B2 ve G2; 0,5 µg/mL, asetonitril) Sigma-Aldrich 'den sağlandı. AF'lerin fermente pirinç unundan ekstraksiyonu için immunoaffinite kolon (Aflaprep® P07, R-Biopharm Rhone Ltd) kullanıldı. Di-sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), sodyum hidroksit (NaOH), sodyum klorür (NaCl), potasyum di-hidrojen fosfat (KH_2PO_4), potasyum bromür (KBr) ve potasyum klorür (KCl) Merck'den alındı. Asetonitril ve metanol (VWR Chemicals) yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) için uygun saflıkta kullanıldı. Nitrik asit (4 mol/L) BDH (BDH Chemicals Ltd, Poole)'dan temin edildi. HPLC ve solüsyonlar ultra saf su (aqua Max-Ultra System, Younglin Instrument) kullanılarak hazırlandı. Fosfat buffer (PBS) 0,2 g KCl, 0,2 g KH_2PO_4, 1,16 g susuz Na_2HPO_4 ve 8 g NaCl'ün 1 L suda çözdürülmesi ve pH'nın 0,1 N NaOH ile 7,3'e getirilmesi ile hazırlandı. Analiz metodunun geri kazanım oranı ve tespit limiti 2.2.2 nolu bölümde belirtilmiştir.

Deneysel çalışmada kullanılan yemler (başlangıç ve büyütme dönemi) Balcılar ve Çöğenler Yem Sanayi'nden temin edildi. Timokinon (CAS 490-91-5, Santa Cruz®) pirinç ununa (Selva, Konya, Türkiye) karıştırılarak kullanıldı. Çörek otu tohumu Bağdat Baharat (Ankara, Türkiye)'den temin edildi.

Histopatolojik incelemelerde kullanılmak üzere alınan dokular Merck'den alınan %37'lik formaldehitden hazırlanan %10'luk solüsyon ile tespit edildi. Daha sonra otomatik doku takip cihazına konulan dokular Merck'den temin edilen sırasıyla %70, %80, %90, %96 ve absolut alkol ile ksilol serilerinin ardından Sigma-Aldrich'den alınan eritilmiş parafine (46-48°C, 56-58 °C) tabi tutuldu. Bloklama için blok parafini (Leica Paraplust®) kullanıldı. Bloklardan hazırlanan kesitler adezivli lamlara (Histobond®) alındı. Hematoksilin-Eosin boyama için hazırlanan solüsyonlar (Hematoksilin kristalleri ve Eosin Y) Merck'den temin edildi. Kapatmalar ise lamel (Menzel®) ve entellan (Merck) ile yapıldı.

2.1.4. Kullanılan Primer Antikor ve Kitler

1. Anti-Aflatoxin B1 Antikor (6A10, Novus, NB600-443)
2. Anti-Pregnane X receptor antikor (PXR, Abcam, ab217375)
3. Anti-Constitutive androstane receptor antikor (CAR, Abcam, ab83850)
4. Anti-Aryl hydrocarbon receptor antikor (AHR, Mybiosource, MBS829549)

5. Anti-Cytochrome P450 1A1 antikor (CYP1A1, Abcam, ab3568)
6. Anti-Cytochrome P450 2A6 antikor (CYP2A6, Abcam, ab3570)
7. Anti-Glutathione antikor (GSH, Abcam, ab19534)
8. Anti-Glutathione S Transferase Alpha 3 antikor (GSTa3, Cloude-Clone, PAA671Ga01)
9. İmmunohistokimya kiti (Bond™ Polymer Refine Detection, Leica, DS9800)
10. Epitope 1 Antijen Retrieval Solüsyonu (Bond™, Leica, AR9961, Citrate Buffer Ph: 6.0)
11. Epitope 2 Antijen Retrieval Solüsyonu (Bond™, Leica, AR9940 Edta buffer Ph: 9.0)
12. Proteinaz K, PIER (Novacastra™, Leica, RE7160-K)
13. Yıkama Solüsyonu (Bond™, Leica, AR9590)
14. Dewax solüsyonu (Bond™, Leica, AR9222)
15. Primer Antikor Dilüent Solüsyonu (Bond™, Leica, AR9352)

2.2. Yöntem

2.2.1. Aflatoksin Üretimi

Yeme katılan AF, Shotwell ve ark (1966)'nın bildirdiği ve Oğuz (1997)'nin küçük modifikasyonlarla laboratuvara uyarladığı metoda göre *Aspergillus parasiticus NRRL 2999* suşu (USDA, ABD) kullanılarak üretildi.

Besiyerinin Hazırlanması ve İnokülasyon

Patates Dekstroz Agar (PDA) 3,9 gr tartılarak 250 ml'lik erlenmayere konuldu. Üzerine 100 ml distile su ilave edildi. Erlenmayerin ağzı pamukla sıkıca kapatılarak otoklavda sterilize edildi. PDA, daha sonra 15 x 1,5 cm'lik steril cam tüplere aktarılarak tüpler eğik bir konuma getirildi ve agarın katılaşması sağlandı.

Liyofilize *Aspergillus parasiticus NRRL 2999* suşu steril şartlar altında 1 ml steril distile su ile sulandırılarak öze yardımıyla agarın bulunduğu tüplere ekimi yapıldı. Daha sonra tüpler spor gelişimi için 28 °C'de etüvde 7 gün bekletildi (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2). Sürenin sonunda yeşil renkli sporlar steril balon jojede süspanse edilerek inokülasyona hazır hale getirildi.



Şekil 2.1. Agarda sporlanma 3.gün.



Şekil 2.2. Agarda sporlanma 7.gün.

Pirinçte Fermantasyon

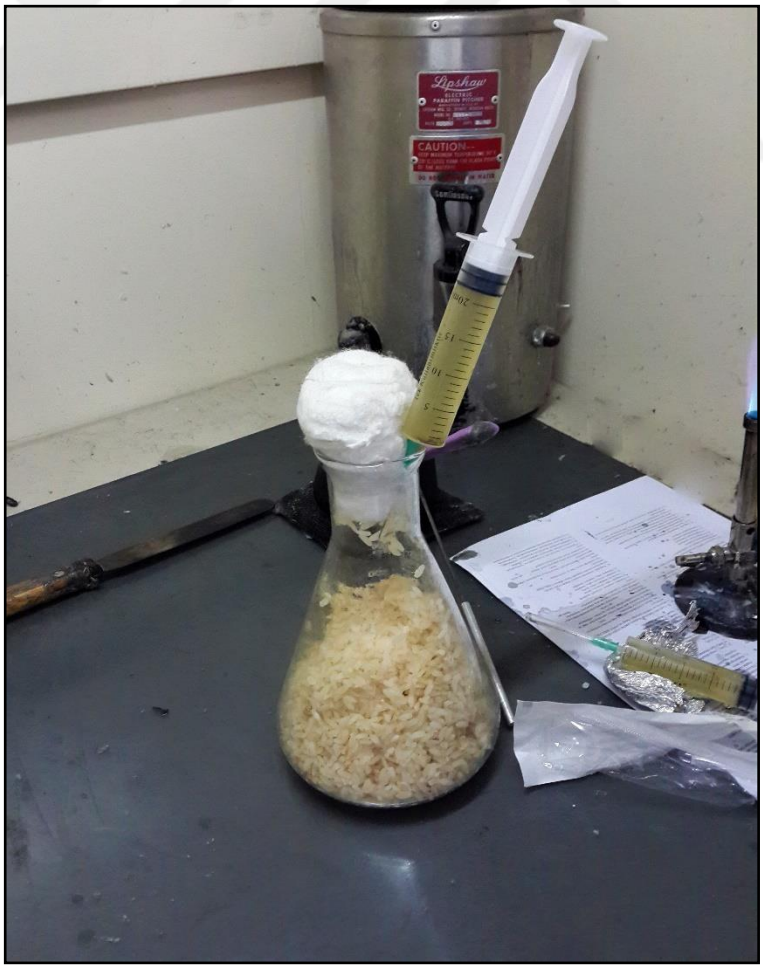
20 adet 1000 ml'lik erlenmayerlerin her birine 350 gr baldo pirinci ve üzerine 175 ml musluk suyu ilave edildi (Şekil 2.3). İyice karıştırıldıktan sonra ağızları pamuk tamponlar ile kapatılarak otoklavda (121°C, 15 psi basınç, 30 dk.) sterilize edildi (Şekil 2.4). Soğumalarının ardından kuvvetlice çalkalanarak pirinçlerin lapalaşması önlendi. Her birine 1-1,5 ml spor süspansiyonlarından ilave edilip fermente olması için 28 °C'de etüve konuldu (Şekil 2.5). Geceleri hariç olmak üzere her saat başı karıştırılarak pirinç tanelerinin birbirlerine yapışması engellendi. 24. saatte ise her birine 10 ml steril su ilave edildi. Her gün renk değişimleri takip edildi (Şekil 2.6). Erlenmayerler, 5 gün süren fermantasyonun ardından canlı mantar etkenlerini yıkımlamak için yeniden otoklava alındı (121°C, 15 psi basınç, 30 dk.) ve yalnızca toksinin kalması sağlandı. Erlenmayerden çıkartılan pirinçler, uygun bir tepsi içerisine alınarak 70°C'de 2 gün boyunca kurutuldu (Şekil 2.7). Kurutulan pirinçler kahve değirmeninde öğütülerek aflatoksinli pirinç unu halinde kullanıma hazır hale getirildi (Şekil 2.8).



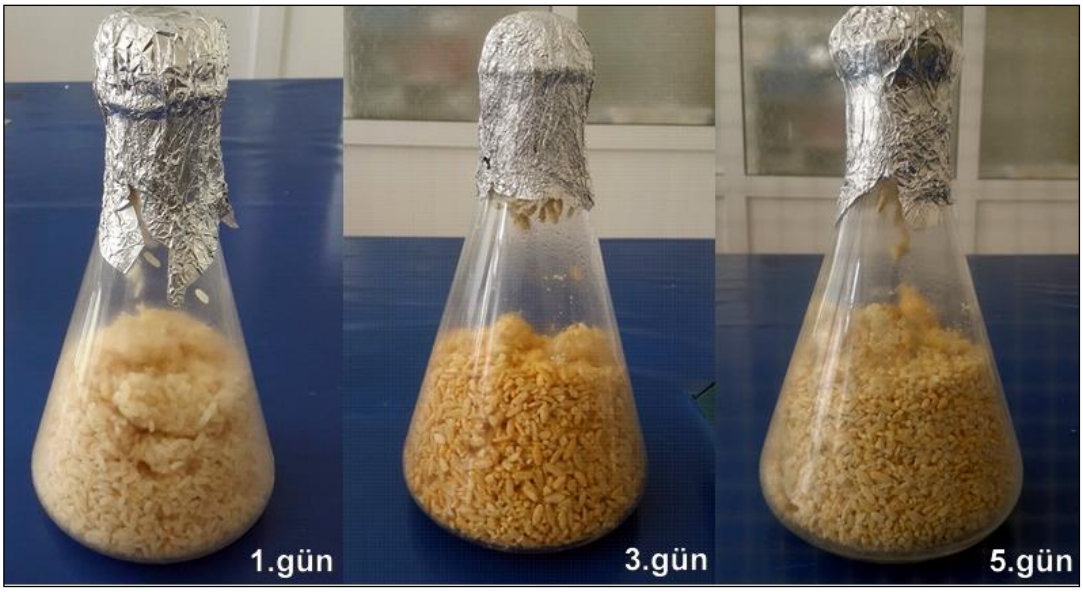
Şekil 2.3. Otoklava hazırlanan pirinçler.



Şekil 2.4. Otoklavlanarak sterilize edilen pirinçler.



Şekil 2.5. Pirinçlere AF sporu inokülasyonu.



Şekil 2.6. Fermantasyon süreci.



Şekil 2.7. Fermantasyonu tamamlanan pirinçlerin kurutulması.



Şekil 2.8. Kurutulan pirinçlerin öğütülmesi.

2.2.2. Pirinç Unundan Aflatoksin Analizi

HPLC ve Kromatografik Şartlar

AF analizinde pompa (LC-20AT), degasser (DGU-14A), autosampler (SIL-10AD) ve kolon fırınından (CTO-10A) oluşan HPLC (Shimadzu) sistemi kullanıldı. AF tespiti 360 nm eksitasyon ve 430 nm emisyon dalga boylarındaki FLD dedektör (RF 20A) aracılığı ile yapıldı. Kolon sıcaklığı 30 °C, autosampler oda sıcaklığına ayarlandı. AF ayrımı SupelcosilLC-18 kolon (150x4,6 mm; internal diameter, 5 µm; Supelco Analytical) ile gerçekleştirildi. AF'lerin floresans verme özelliği post kolon türevlendirmede Cobra cell (Coring System Diagnostics GmbH) ünitesiyle elektrokimyasal bromür ile sağlandı. Test için potasyum bromür (120 mg) venitrik asit (4 M, 350 µl) içeren mobil faz (su: asetonitril: methanol, 60:20:20, v/v/v) 1 mL/dk'lik akış hızıyla gönderildi. Analizler LC solution software (Shimadzu) ile yapıldı.

Fermente Pirinç Unu Örneklerinin Hazırlanması

AF'lerin fermente pirinç unu örneklerinden ekstraksiyonu için daha önce bildirilen metot (Horwitz 2000) kullanılmıştır. Fermente pirinç ununun 10 gr'ı 250 ml'lik erlen mayere alınıp üzerine 10 g NaCl ve 45 ml metanol:su (80:20, v/v) eklendi ve 1 dk vortekslendi. Takiben karışım filtre kâğıdından süzülerek 40 ml'si alındı ve 70

ml PBS ile dilüe edilerek saniyede 1 damla olacak şekilde immünoaffinite kolonundan geçirildi. Kolon 4 ml ultra saf su ile iki kez yıkandı. AF'ler sırasıyla kolondan 0,5'er ml metanol ve su kullanılarak uzaklaştırıldı. Sonrasında eluatviallere alınarak 100 µL'si HPLC'ye alındı.

Standartların Hazırlanması

Çalışma standartları miks AF stok solüsyonunun su: asetonitril: methanolde (60:20:20, v/v/v) seri dilüsyonu (0,01-2 ng/ml) ile hazırlandı. Kalibrasyon için (1-1000 ng/ml) 10 gr fermente pirinç unu üzerine 75 µl çalışma standart eklendi. Düşük (10 ng/ml), orta (100 ng/ml) ve yüksek (1000 ng/ml) düzeyde hazırlanan kalite kontrol örnekleri metodun geri kazanım ve kesinlik değerlerini belirlemek için yapıldı. Kalibrasyon ve kalite kontrol örnekleri fermente pirinç unu örneklerinin hazırlanmasında uygulanan metot ile test edildi.

Metot Validasyonu

Özgünlük, doğrusallık, geri kazanım, duyarlılık ve kesinlik kriterleri metot validasyonunun belirlenmesi için kullanıldı. Özgünlük blank fermente pirinç unu örnekleri kullanılarak değerlendirildi. Miks AF standartı ile AF içermeyen fermente pirinç unu örneklerinin HPLC sistemine uygulanması sonrasında kromatogram üzerinde AF'lerin alıkonma zamanında plazma pikler gözlenmedi. Linearite, çalışma ve kalibrasyon standartlarının 5 tekrarlı analizi ile elde edilen alan ve konsantrasyon değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrilerinin çizilmesi ve korelasyon katsayılarının hesaplanması ile belirlendi. Korelasyon katsayıları çalışma standartları için>0.9997, kalibrasyon standartları için>0.9996 olarak belirlendi. Blank fermente pirinç unu örneklerine AF içeren standart solüsyonların farklı miktarları eklenerek kalibrasyon standartları (1-1000 ng/ml) hazırlandı. Geri kazanımlar, herhangi bir numune gibi değerlendirilen örneklerde tayin edilecek maddelerin pik alanlarının çalışma standartların pik alanları ile karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Fermente pirinç unu örneklerinde hesaplanan ortalama geri kazanım değerleri AFB1, B2, G1 ve G2 için sırasıyla %89, %98, %84 ve %91'idi. Tespit (LOD) ve hesaplanabilir limit (LOQ) düzeyleri 0,1-1 ng/ml konsantrasyonda hazırlanan miks AF standartının AF içermeyen plazma örneklerine eklenmesiyle belirlendi. LOD kromatogram üzerinde S/G oranı 3, LOQ ise S/G oranı 6 olan konsantrasyon düzeyi olarak tespit edildi. LOD, AFB1 ve

G1 için 0,2 ng/ml, B2 ve G2 için 0,1 ng/ml, LOQ ise AFB1 ve G1 için 0,4 ng/ml, B2 ve G2 için 0,4 ng/ml olarak belirlendi. Kesinlik için gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik ölçüt olarak kullanıldı. Gün içi ve günler arası farklılık düşük (10 ng/ml), orta (100 ng/ml) ve yüksek (1000ng/ml) düzeyde hazırlanan kalite control örneklerinin 5 farklı günde 5 tekrarlı analizi ile belirlendi. Kesinliğin belirlenmesinde konsantrasyon üzerinden hesaplanan % varyasyon katsayısı kullanıldı ve kabul edilebilir sınır değer olarak <%15 alındı. Tüm plazma örneklerinde AF'ler için gün içi tekrar edilebilirlik <%7,6, günler arası tekrar edilebilirlik ise <%6,3 olarak hesaplandı.

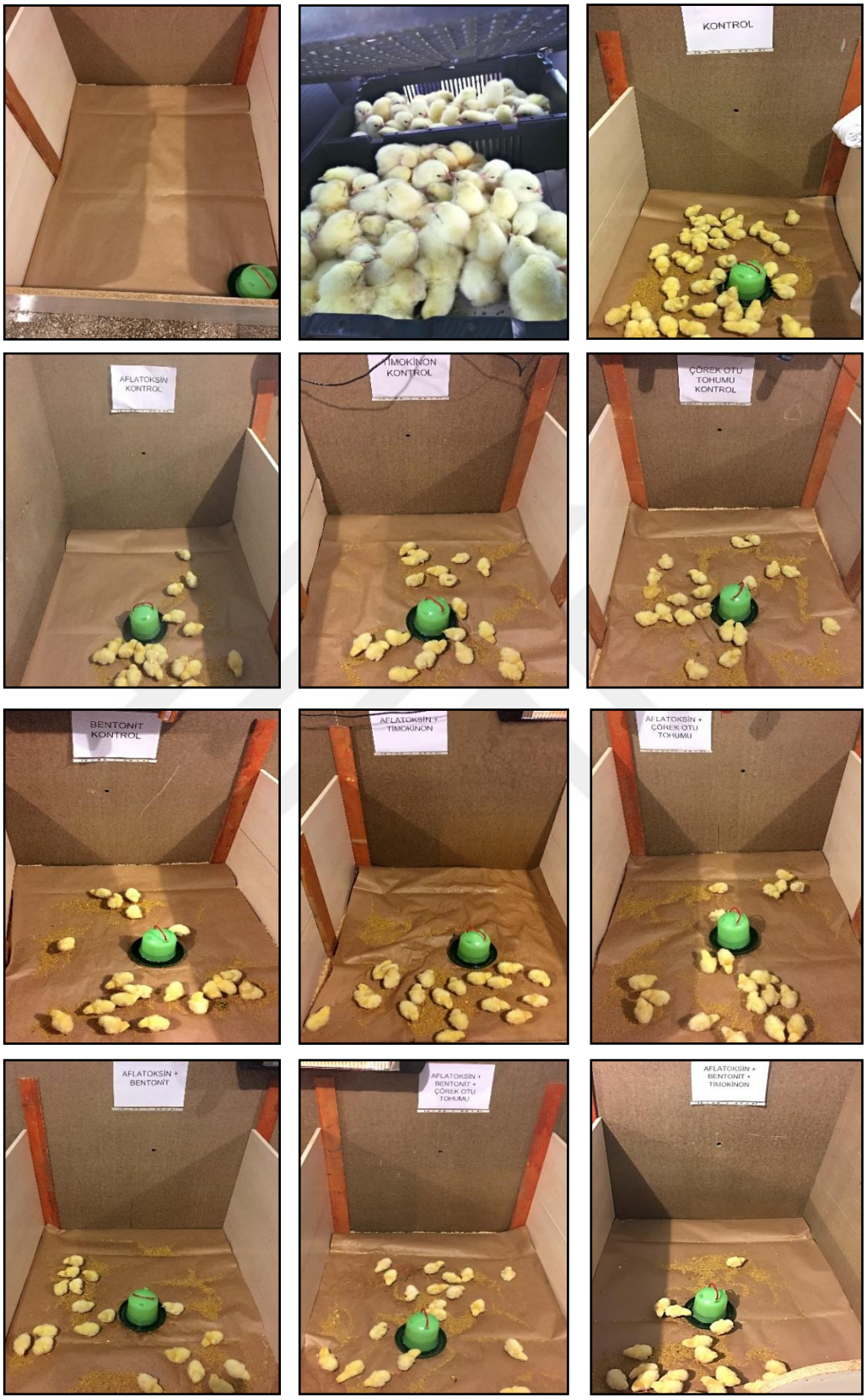
2.2.3. Hayvanların Gruplandırılması, Barındırma ve Beslemesi

Deneysel çalışma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde 28 günde tamamlanmıştır. Denemenin yapıldığı barınak öncelikle, TÜBİTAK 3001 Başlangıç AR-GE destekleme projeleri kapsamında desteklenen 117O872 nolu projeye göre yeniden dizayn edilerek; dezenfekte edilmiş, kış şartlarına göre hazırlanmış, içerisine izolasyon malzemesi döşenmiş, elektrikli ısıtıcılarla civcivler için sabit optimum ısı derecesi ve nem sağlanarak talaştan altlık döşenmiş ve gruplara göre 10 eşit bölme oluşturularak (bunlardan 6 grup tez çalışmasına dahil edilmiştir) proje çalışmalarına uygun hale getirilmiştir (Şekil 2.9-10). Deneme gruplarına ait ayrıntılı bilgiler Çizelge 2.1'de, grup dizaynına ilişkin özet bilgiler ise Çizelge 2.2'de belirtilmiştir. Bu bilgilere göre gruplandırılan civcivler bölmelerine koyulduktan sonra hassas terazi ile tek tek tartılmıştır. Deneme sürecinde kullanılan rasyonların bileşimi ile barınağın nem ve sıcaklık değerleri Çizelge 2.3 ve 2.4'de sunulmuştur.

Çalışmada hayvanlara gruplarına göre yemle birlikte 2 mg/kg dozunda AF, 300 mg/kg düzeyinde TQ ve %5 oranında ÇÖT verilmiştir. Uygulanan AF düzeyinin pek çok çalışmada broylerler için yeterli düzeyde akut toksisite oluşturduğu gözlenmiştir. TQ ve ÇÖT miktarları belirlenirken de bu konuda daha önce yapılan çalışmalar dikkate alınmıştır. İncelenebilen çalışmalarda, TQ'nun farelerde 4-18 mg/kg canlı ağırlık (CA)-oral doz (po) (EL-Sawi ve ark 2012, Karimi ve ark 2019), ratlarda 10-50 mg/kg CA-po (Nagi ve Mansour 2000, Kanter 2011, Jaswal ve ark 2013) ve tavşanlarda ise 20 mg/kg CA-po (Elbarbry ve ark 2012) dozlarda gavaj veya suya karıştırılarak kullanıldığı gözlenmiştir. Broylerlerde ise TQ'nun 5-11 mg/kg CA dozunda ve yalnızca intraperitonel yoldan kullanıldığı bir çalışmaya rastlanılmıştır (Rastad ve ark

2016). Bu bilgilerden yola çıkarak, çalışmada kullanılacak TQ'un pratik kullanımı ve rutin uygulamaya aktarılabilmesinin sağlanması açısından yeme katılarak verilmesi planlandı ve oral dozu broyler başına yaklaşık 30 mg/kg CA olarak belirlendi. Bu kapsamda, broyler civcivlerin günlük yem tüketimleri ve ortalama canlı ağırlıkları ilgili literatür bilgiler (Perry ve ark 1999, Beski ve ark 2015) ve civcivlerin temin edildiği işletmenin verileri dikkate alınarak, TQ'nun yeme 300 mg/kg düzeyinde katılması gerektiği hesaplandı (1000 gr canlı ağırlığa ulaşan ve günlük yaklaşık 100 gr. yem tüketen bir pilicin günlük 30 mg TQ alacağı ve böylece dozun 30 mg/kg/CA olacağı ön görüldü). Homojen bir karışım sağlayabilmek amacıyla toz kristal halindeki 5 gr TQ, öncelikle 95 gr pirinç unu ile karıştırıldı ve bu karışımdan 6 gr/kg yem (=300 mg TQ/kg yem) oranında rasyona ilave edildi.

Çörek otu tohumunun bileşiminde % 0,4-2,5 oranında uçucu (esansiyel) yağ asidi (UYA) olduğu ve bu uçucu yağ asitlerinin % 27,8-57'sinin TQ olduğu bilgisinden (Lautenbacher 1997, Burits ve Bucar 2000, Ali ve Blunden 2003) hareketle tüm bu oranların ortalaması (UYA için: %1,45, UYA içeresindeki TQ için: % 42) alınarak; 1gr ÇÖT bileşiminde yaklaşık 6,1 mg TQ bulunduğu ve ÇÖT'ün rasyona yaklaşık 300 mg/kg düzeyinde TQ ihtiva edecek şekilde (TQ grubu ile eşdeğer olması açısından) ilave edilebilmesi için yeme % 5 oranında ÇÖT katılması gerektiği (50 gr ÇÖT/1000 gr yem) hesaplanmıştır.



Şekil 2.9. Civcivlerin gruplara göre bölmelere yerleştirilmesi.



Şekil 2.10. Barınağın gruplara göre bölümlendirilmesi.

Çizelge 2.1. Gruplandırma ve Deneme Düzeni.

I. Grup (Kontrol grubu): 20 adet 1 günlük broyler civciv, 4 hafta boyunca standart broyler civciv/piliç yemleri ve temiz suyla *ad-libitum* beslenerek başka herhangi bir uygulama yapılmamıştır.
II. Grup (Aflatoksin-AF grubu): 20 adet 1 günlük broyler civciv, yeme 2 mg/kg düzeyinde AF katılarak 28 gün süreyle beslenmiştir.
III. Grup (Timokinon-TQ grubu): 20 adet 1 günlük broyler civciv, yeme 300 mg/kg dozda Timokinon ilave edilerek 28 gün süreyle beslenmiştir.
IV. Grup (Çörek Otu Tohumu-ÇÖT grubu): 20 adet 1 günlük broyler civciv, yeme %5 oranında çörek otu tohumu (yemde yaklaşık 300 mg/kg düzeyinde uçucu yağ asiti ihtiva edecek şekilde) okside olmaması için günlük öğütülerek ilave edilmiş ve 28 gün süreyle beslenmiştir.
V. Grup (AF + TQ deneme grubu): 20 adet 1 günlük broyler civciv, yeme 2 mg/kg düzeyinde AF ve 300 mg/kg dozda TQ ilave edilerek 28 gün beslenmiştir.
VI. Grup (AF + ÇÖT deneme grubu): 20 adet 1 günlük broyler civciv, yeme 2 mg/kg düzeyinde AF ve %5 oranında ÇÖT ilave edilerek 28 gün süreyle beslenmiştir.

Çizelge 2.2. Deneme Düzeni Özet Çizelgesi.

Gruplar	***AF***	***TQ***	***ÇÖT***
1. KONTROL	-	-	-
2. AF	+	-	-
3. TQ	-	+	-
4. ÇÖT	-	-	+
5. AF+TQ	+	+	-
6. AF+ÇÖT	+	-	+

Çizelge 2.3. Rasyon Bileşenleri

Dönem	Analitik Bileşenler (%)		Dönem	Analitik Bileşenler (%)	
Başlangıç Yemi 1-10. Günler	Ham Protein	%22	Büyütme Yemi 11-28. Günler	Ham Protein	%20
	Ham Selüloz	%3,7		Ham Selüloz	%3,8
	Ham Yağ	%6,3		Ham Yağ	%6,3
	Ham Kül	%6,7		Ham Kül	%6,8
	Kalsiyum	%1,2		Kalsiyum	%1,2
	Fosfor	%0,65		Fosfor	%0,65
	Methionin	%0,5		Methionin	%0,4
	Lizin	%1,2		Lizin	%1,3
	Sodyum	%0,15		Sodyum	%0,15

Çizelge 2.4. Barınak Sıcaklık ve Nem Çizelgesi

Hafta	Gün	Isı (°C)	Nem	Aydınlatma**
1.Hafta	1-7	30,5-33,5*	% 60-65	23A:1K
2.Hafta	8-14	27,0-30,0	% 55-60	20A:4K
3.Hafta	15-21	25,0-26,5	% 50-55	18A:6K
4.Hafta	22-28	23,5-25,0	% 50-55	18A:6K

* İlk 24 saat sıcaklık 36°C uygulanmıştır.
** A: Aydınlık K: Karanlık

2.2.4. Serum Biyokimyasal Analizler

Çalışma sonunda tüm gruplardan rastgele seçilen 10'ar tane hayvanın kanat altı venasından (Vena subcutenea ulnaris) alınan kan, serum için anti koagulantsız jelli tüplere aktarıldı. Kan örnekleri 15 dakika oda ısısında bekletilerek 5000 rpm'de ve 10 dakika santrifüj edilip serumu çıkartıldı. Serumu çıkartılan örneklerden karaciğer hasar belirteçleri (ALT, AST, GGT, ALP) ile total protein, total bilirubin ve kolesterol seviyeleri otoanalizör (ILab-300 bioMérieuxDiagnostics, Milan, Italy) ile ölçüldü.

2.2.5. Nekropsi ve Histopatolojik Analizler

Deneme sonunda, her gruptan 10 broylerin (biyokimyasal analizler için kan alınan) canlı ağırlıkları belirlendikten sonra dekapitasyonla ötanazi edilerek sistemik nekropsileri yapıldı ve bütün organlardaki makroskobik patolojik bulgular kaydedildi (Şekil 2.11). AF için asıl hedef organ olan karaciğer uzaklaştırılarak relatif organ ağırlığının belirlenmesi için tartıldı. Ayrıca hastalıkla ilgili karakteristik bulguların

fotoğrafları çekildi. Daha sonra karaciğerden alınan örneklerin bir kısmı dondurma mikrotomunda kesit alınmak üzere ayrıldıktan sonra kalan kısmı %10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat boyunca tespiti yapıldı. Tespitin ardından, alınan dokular doku takip kasetlerine konularak 24 saat süreyle akan suda yıkandı. Kasetler, doku takip cihazına (Leica TP 1020) alınarak rutin histopatolojik takibi yapıldı. Daha sonra parafinde bloklanan dokular, buzdolabı buzluğunda soğutularak mikrotomla (Leica RM 2125RT) 5µ kalınlığında kesildi. Adezivli lamlara alınan kesitler 37°C'lik etüvde 24 saat bekletildi. Bütün kesitler önce Hematoksilen Eozin (HE) ile, gerekli görülen olgulardan da dondurma miktoromunda kesit alınarak Sudan black yöntemine göre boyandıktan sonra (Luna 1968), 5 ataçmanlı binoküler başlıklı ışık mikroskobunda (Olympus BX51, Tokyo, Japan) incelendi. Histopatolojik bulgular ayrı ayrı kaydedilerek karakteristik bulguların fotoğrafları (Olympus, DP12) çekildi. Çalışma sonunda artan canlı hayvanların da 1 hafta ve 15 gün sonra nekropsileri yapılarak organları formolde stoklandı.



Şekil 2.11. Nekropsi ve Makroskobik Muayene.

2.2.6. İmmunohistokimyasal Analizler

İmmunohistokimyasal boyama (İHK) için, karaciğerden 5 mikron kalınlığında adezivli lamlara alınan kesitler, tam otomatik Leica Bondmax immunohistokimya ve *in situ* hibridizasyon boyama cihazında, Bond™ Polymer Refine Detection (Leica DS9800) kit prosedürüne uygun olarak (Peroxidase Blok, Protein Blok, Post Primer, Polymer, DAB, Hematosilen) boyandı. Öncelikle tüm dokular ısı ve dewax solüsyonu (Bond™, Leica AR9222) ile deparafinize ve dereceli alkollerde (Merck) rehidre edildi. Cihaz tarafından, her bir aşama sonrası en az 3'er kez ayrı ayrı yıkama solüsyonu

(Bond™, Leica, AR9590) ve de-iyonize su ile yıkamalar yapıldı. Daha sonra kullanılan primer antikor özelliğine göre kesitlere; Heat induced epitope retrieval (HIER, Epitope 1 Antijen Retrieval Solüsyonu, Bond™, Leica, AR9961, Citrate Buffer Ph:6.0, Epitope 2 Antijen Retrieval Solüsyonu Bond™, Leica, AR9940 Edta buffer Ph:9.0), Proteolytic Induced Epitope Retrieval (PIER, Proteinaz K, Novacastra™, Leica, RE7160-K) veya her ikisi birlikte uygulanırken bazılarına herhangi bir antijen retriveal protokolü uygulanmadı. Peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için değişen sürelerde peroxidase blok ve takibinde protein blok uygulaması sonrası ayrı ayrı **Primer antikorlar** (8 adet; *anti- aflatoksin B1 antikor, anti-Ahr antikor, Anti-PXR antikor, anti-CAR antikor, anti-CYP1A1 ve anti-CYP2A6 antikor, anti-Glutathione S Transferase Alpha 3 antikor, anti-Glutatyon antikor*) ile oda sıcaklığında değişen sürelerde veya +4°C'de overnight reaksiyonun ardından post primer ve polymer uygulamaları yapıldı (Çizelge 2.5). Primer antikorların dilüsyonu Primer Antikor Dilüent Solüsyonu (Bond™, Leica, AR9352) ile değişen oranlarda yapıldı. Sonrasında tüm kesitler, DAB ile 3-10 dk oda ısısında inkübe edilerek distile suyla yıkandıktan sonra Mayer's Hematoksilen ile zıt boyama yapılarak, alkol ve ksilolde 2'şer kez değiştirildikten sonra entellan ile kapatıldı. Kesitler binoküler ışık mikroskobunda (Olympus BX51, Tokyo, Japan) incelenerek fotoğrafları çekildi (Olympus DP12, Tokyo, Japan). Her bir primer antikor ile boyama protokollerine ilişkin ayrıntılar ve yapılan uygulamalar Çizelge 2.5'de gösterilmiştir.

2.2.7. İstatistiksel Analizler

İstatistiki açıdan normal dağılıma uygun olan verilerin (relatif organ ağırlıkları, serum biyokimyasal değerler) analizi *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS for Windows® version 25.0) paket programı ile gerçekleştirildi. Elde edilen verilerin varyasyonunun kontrolü için dağılım analizleri *Kolmogrov – Smirnov* testi kullanılarak yapıldı. Ayrıca varyansların homojenliği *Levene* testi ile kontrol edildi. Normal dağılım gösteren veriler ise önce one – way ANOVA testi ile değerlendirildi, daha sonra gruplar arası farklılıkların belirlenmesi için *post-hoc* Duncan analizi yapıldı. Sonuçlar ortalama ± standart hata ($\overline{X}\pm S\overline{x}$) şeklinde verildi ve $p<0,05$ anlamlı olarak değerlendirildi. İstatistiksel anlamda normal dağılıma uymayan veriler ise (histopatolojik bulgular), Minitab® (version 18.1) paket programı kullanılarak Khi-kare testi ile analiz edildi.

Çizelge 2.5. Primer Antikorlara göre İmmunohistokimyasal Boyama Protokolleri

Primer Antikor	Dilüsyon	Antijen Retriveal	Peroxidase Blok	Protein Blok	Antikor İnkübasyon	Post Primer	Polymer	DAB	Hematoksilen
Aflatoxin B1 Antikoru	1:3000	PIER-37°C-10 dk.	30 dk.	30 dk.	60 dk.	15 dk.	15 dk.	5 dk.	3 dk.
PXR Antikoru	1:100	HIER1-100°C-30 dk PIER-37°C -10 dk.	30 dk.	30 dk.	60 dk.	15 dk.	15 dk.	10 dk.	3 dk.
AHR Antikoru	1:400	HIER1-100°C-20 dk	30 dk.	30 dk.	60 dk.	15 dk.	15 dk.	8 dk.	3 dk.
CAR Antikoru	1:100	HIER1-100°C-20 dk	30 dk.	30 dk.	4°C -overnight.	30 dk.	30 dk.	8 dk.	3 dk.
CYP 2A6 Antikoru	1:400	HIER1-100°C-20 dk	30 dk.	30 dk.	60 dk.	15 dk.	15 dk.	5 dk.	3 dk.
CYP 1A1 Antikoru	1:400	HIER1-100°C-20 dk	30 dk.	30 dk.	60 dk.	15 dk.	15 dk.	5 dk.	3 dk.
Glutathione Antikoru	1:150	-	30 dk.	30 dk.	60 dk.	15 dk.	15 dk.	5 dk.	3 dk.
GST Alpha 3 Antikoru	1:1600	-	30 dk.	30 dk.	60 dk.	15 dk.	15 dk.	5 dk.	3 dk.

3. BULGULAR

3.1. Aflatoksin Üretim Değerleri

Aspergillus parasiticus NRRL 2999 suşu kullanılarak pirinçte fermantasyon yolu ile üretilen total AF içindeki AF türlerinin (B1, B2, G1, G2) oranları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Üretilen total aflatoksin içindeki AF'lerin oranı.

Total AF	AF B1	AF B2	AF G1	AF G2
41,8 mg/kg	%83,34	%9,28	%5,37	%2,01

3.2. Serum Biyokimyasal Parametreler

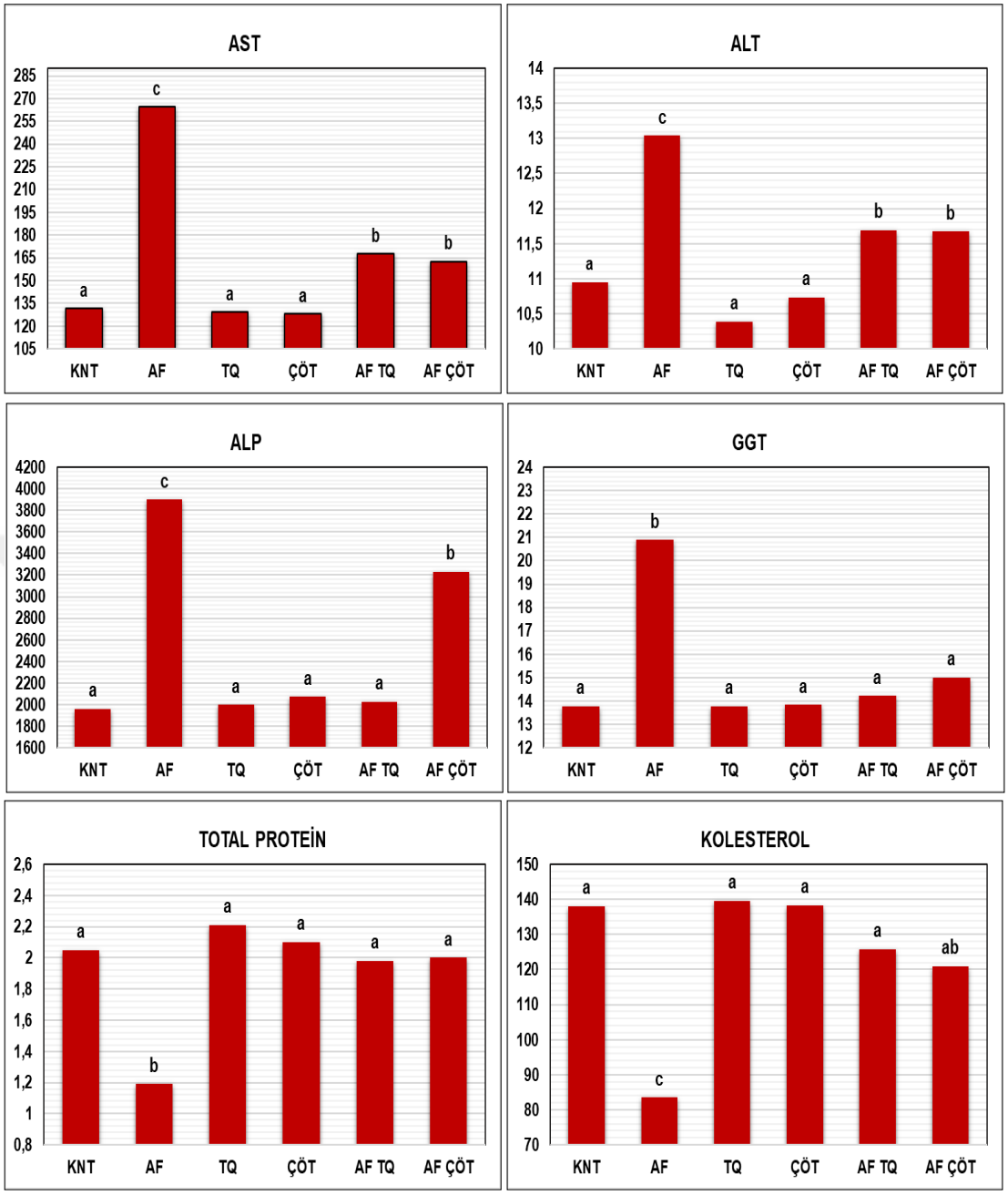
Deneme süresi sonunda gruplardan elde edilen serum biyokimyasal parametreler Çizelge 3.2'de, istatistiksel olarak farkın önemli bulunduğu parametrelerin grafikleri ise Şekil 3.1'de sunulmuştur. Çizelgede aynı sütundaki değerler arasında ortak harf taşımayan değerler istatistiki açıdan en az $p<0,05$ düzeyinde farklı bulunmuşken bunlar arasında; kontrol grubuna ulaşan deneme grubu (AF + TQ veya ÇÖT verilen gruplar) değerleri önemli derecede, kontrole yakın olan değerler ise AF'ye göre kısmi veya orta derecede düzelme olarak değerlendirildi. Buna göre, ölçülen parametrelerde TQ ve ÇÖT grubu ile kontrol grubu arasındaki farkın önemsiz ($p>0,05$) olduğu, yani bu maddelerin olumsuz bir etkisinin bulunmadığı belirlendi. Yalnızca AF uygulanan grupta kontrol grubuna göre, total protein ve kolesterol önemli oranda ($p<0,01$) düşük iken, AST, ALT, ALP ve GGT değerlerinde önemli oranda ($p<0,01$) yükselişler saptandı. Yeme AF'nin yanı sıra ayrı ayrı TQ veya ÇÖT ilavesinin, AST ve ALT değerlerinde AF'e bağlı yükselişleri orta derecede, total proteindeki düşüşü ise önemli oranda düzelttiği görüldü. ALP değerlerinde AF+TQ gruplarında önemli, AF+ÇÖT grubunda orta dereceli bir düzelme görülürken GGT seviyesinde önemli bir düzelme belirlendi. Kolesterolde AF'e bağlı düşüşler, ÇÖT ilavesiyle sırasıyla orta dereceli düzelme gösterirken, TQ ilavesi ile önemli bir düzelme görüldü. ALP değerinde ise TQ ilavesinin ÇÖT ilavesine kıyasla normale daha çok yaklaştırdığı belirlendi. Bunlara ilaveten ölçülen bilirubin değerlerinde gruplar arası fark olmadığı ($p>0,05$) saptandı.

Çizelge 3.2. 28 Gün Süreyle Yapılan Denemenin Serum Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi. *

	Değerler $(\overline{X} \pm S_{\bar{x}})$						
Gruplar	**AST**	**ALT**	**ALP**	**GGT**	**Bilirubin**	**Total Protein**	**Kolesterol**
KNT	131,55±3,81 [a]	10,95±0,11[a]	1957,00±167,95[a]	13,78±0,76 [a]	0,34±0,01	2,05±0,12[a]	138,00±6,27[a]
AF	264,44±9,09 [c]	13,04±0,29[c]	3898,17±206,41[c]	20,89±1,07 [b]	0,33±0,00	1,19±0,05[b]	83,50±4,68[c]
TQ	129,22±3,56[a]	10,39±0,24[a]	1995,83±39,11[a]	13,78±0,22 [a]	0,33±0,01	2,21±0,11[a]	139,63±7,73[a]
ÇÖT	127,88±2,01[a]	10,73±0,49[a]	2071,33±52,11[a]	13,83±0,53 [a]	0,33±0,01	2,10±0,10[a]	138,25±3,49[a]
AF TQ	167,56±16,23[b]	11,69±0,23[b]	2023,67±139,78[a]	14,22±0,84 [a]	0,33±0,01	1,98±0,03[a]	125,80±4,14[ab]
AF ÇÖT	162,56±14,78[b]	11,67±0,27[b]	3228,50±102,50[b]	15,00±1,57 [a]	0,33±0,01	2,00±0,10[a]	120,88±2,92[b]
	P<0,01 One-way ANOVA	P<0,01 One-way ANOVA	P<0,01 One-way ANOVA	P<0,05 One-way ANOVA	P>0,05 One-way ANOVA	P<0,05 One-way ANOVA	P<0,05 One-way ANOVA

[a-c] One-way ANOVA ve sonrasında yapılan post-hoc Duncan testine göre sütunlardaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir.

* Çizelgedeki değerler her gruptan 10 broyler pilicin Ortalama ± Standart Hata $(\overline{X} \pm S_{\bar{x}})$ değerlerini temsil etmektedir.



Şekil 3.1. İstatistiksel olarak önemli (P<0,05) serum parametrelerinin grafiksel gösterimi.

3.3. Patolojik Bulgular

3.3.1. Relatif Organ Ağırlıkları

Çalışmada grup içerisindeki hayvanlarda da gelişimsel farklar bulunduğu için organların direkt ağırlığı yerine, her bir civcivin canlı ağırlığına oranlanan karaciğer relatif organ ağırlıkları % olarak (*karaciğer ağırlığı x 100/canlı ağırlık*) hesaplandı. Böylece deneme sonunda nekropsi öncesi canlı ağırlıkları kayıt edilen piliçlerin, AF

için hedef organ olan karaciğere ait relatif organ ağırlık ortalamaları Çizelge 3.3 ve Şekil 3.2'de gösterilmiştir. AF uygulamasının karaciğer relatif ağırlığını önemli oranda artırdığı görüldü (p<0,01). Yalnız TQ uygulanan grupta KNT grubuna göre fark önemsizken, ÇÖT grubunda, karaciğerde önemli oranda ağırlık artışı saptandı. AF'li yemlere TQ ilavesinin, relatif karaciğer ağırlık değerlerini normale önemli oranda, ÇÖT ilavesinin ise kısmen yaklaştırdığı belirlendi.

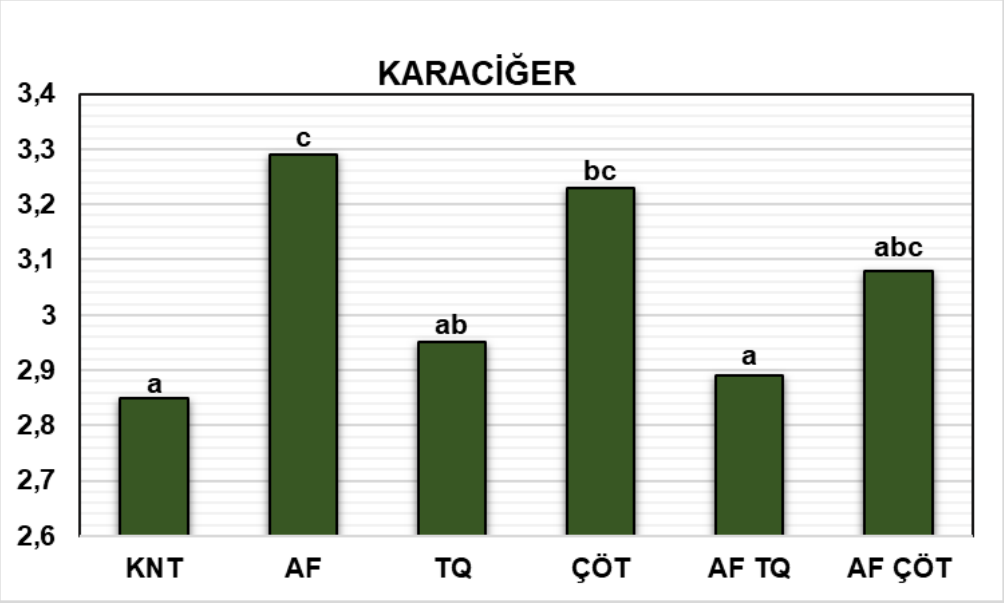
Çizelge 3.3. Gruplara göre Karaciğerlerin Ağırlık Ortalamaları. *

Gruplar	***Karaciğer Relatif Ağırlıkları*** $(\overline{X} \pm S_{\bar{x}})$
KNT	2,85±0,10[a]
AF	3,29±0,11[c]
TQ	2,95±0,04 [ab]
ÇÖT	3,23±0,13[bc]
AF+ TQ	2,89±0,07[a]
AF+ ÇÖT	3,08±0,11[abc]

P<0,01 (One-way ANOVA)

[a-c] One-way ANOVA ve sonrasında yapılan post-hoc Duncan testine göre sütundaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,01).

* Çizelgedeki değerler her gruptan 10 broyler pilicin karaciğer ağırlıklarının canlı ağırlığa göre % olarak hesaplanan Ortalama karaciğer relatif ağırlığı ± Standart Hata ($\overline{X}$±S$\overline{x}$) değerlerini temsil etmektedir.



Şekil 3.2. Karaciğer relatif organ ağırlığının grafiksel olarak gösterimi.

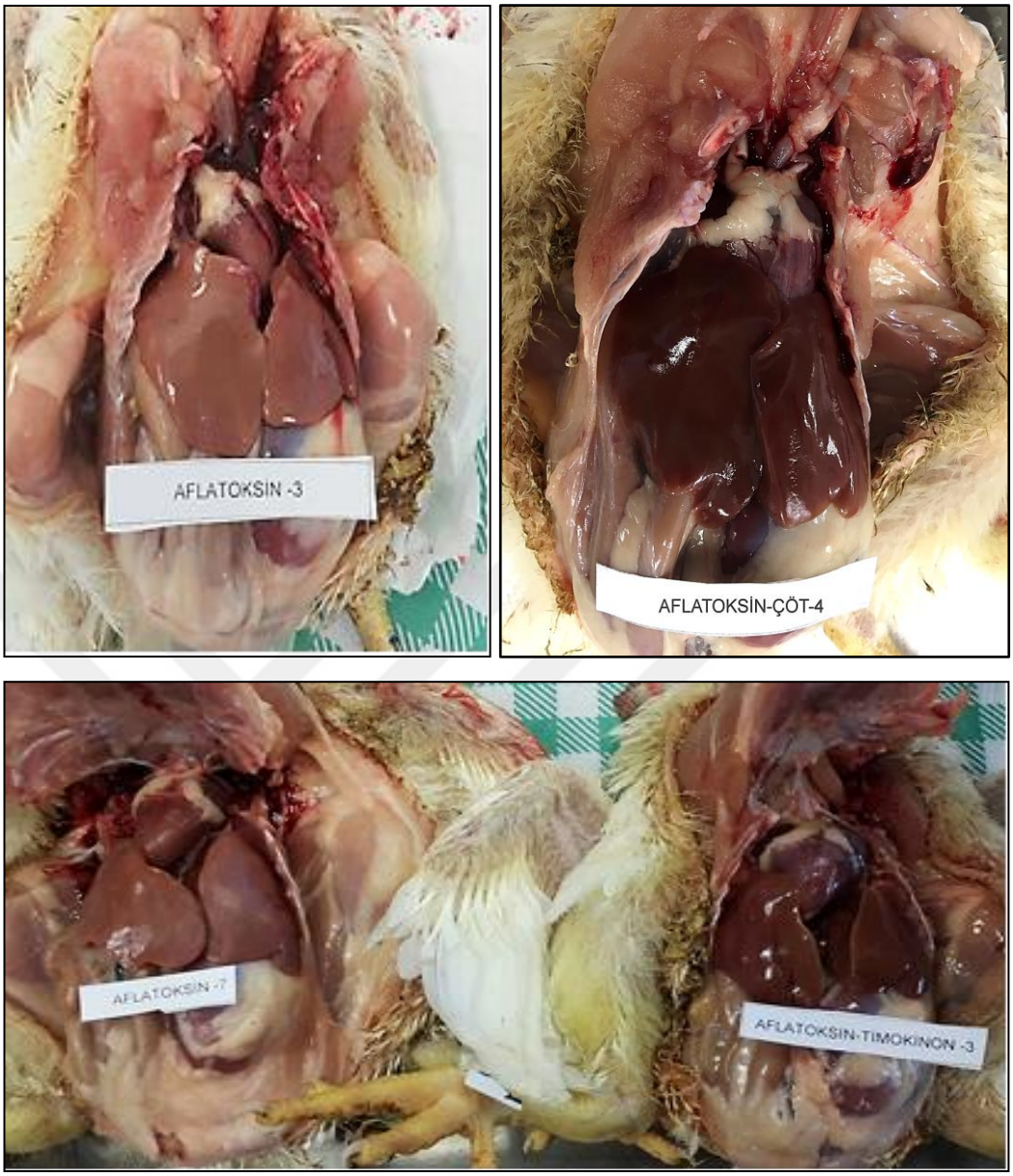
3.3.2. Makroskobik ve Histopatolojik Bulgular

Makroskobik Bulgular

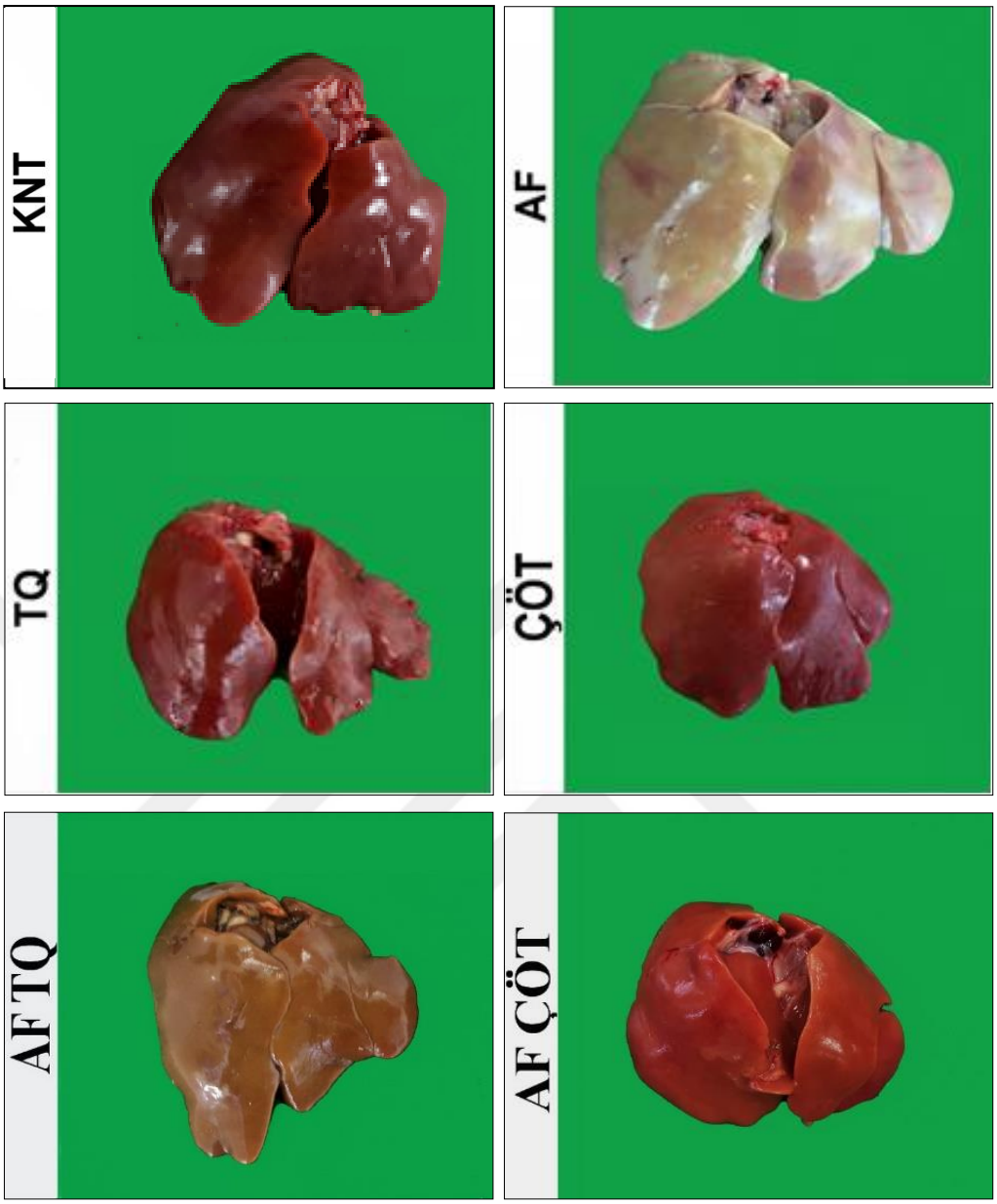
Antemortem muayenede AF grubu piliçlerin diğer gruplara kıyasla gelişimsel olarak zayıf oldukları dikkati çekti (Şekil 3.3). Nekropsi sonrası makroskobik olarak AF grubundaki tüm piliçlerin karaciğeri, değişen derecelerde büyümüş, kenarları kütleşmiş ve soluk renkli olarak gözlendi (Şekil 3.4-5). Karaciğerlerde solgun veya açık sarıdan koyu sarı veya açık kahverengine kadar olan renk değişimleri ile büyüme oranları hafif veya şiddetli olarak derecelendirildi (Çizelge 3.5). Benzer bulgulara diğer gruplarda da daha hafif düzeylerde rastlanılmış olsa da bu durum istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p>0,05$).



Şekil 3.3. 28 günlük broyler piliçlere aflatoksinin etkisi. **A.** Kontrol grubu, **B.** Aflatoksin grubu.



Şekil 3.4. Deneme gruplarının karaciğerlerine, AF'nin makroskobik olarak renk açısından etkisi.



Şekil 3.5. Gruplara göre karaciğerlerin makroskobik olarak renk değişimleri.

Mikroskobik (Histopatolojik) Bulgular

AF grubundaki piliçlerin tamamının karaciğerlerinde yaygın, bazı olgularda ise sentrilobüler bölgede daha belirgin olmak üzere şiddetli hidropik dejenerasyon ile bazen yağlanma görüldü. Çoğu olguda dissosiasyon ile hepatositlerin halka tarzında dizilimleriyle oluşan ve bazen ortasında lumenleri bulunan asiner yapılar dikkati çekti. Bazı olgularda safra kanallarında proliferasyon ve periportal bölgelerde hafif bağdoku artışının bulunduğu (periportal fibrozis) gözlendi. Genellikle portal bölgelerde perivasküler mononükleer hücre ve heterofil infiltrasyonları ile bazen paranşime yayılmış fokal, nodüler lenfoid hücre toplulukları görüldü. Gruplara göre, hidropik dejenerasyon/yağlanma, asiner dizilim, safra kanalı proliferasyonu ve periportal fibrozis görülen piliç sayıları Çizelge 3.5'de özetlendi.

Ayrıca karaciğerde, hidropik dejenerasyon ve yağ dejenerasyonlarına bağlı dejeneratif değişiklikler daha önce Ortatatli ve ark (2005)'nın bildirdiği yönteme göre skorlandı. Bu kapsamda lezyonlara; hafif derece=1, orta derece=2 ve şiddetli derece=3 olarak skor verildi (Çizelge 3.4). Her bir gruptaki hepatoselüler dejenerasyon değerlerinin şiddetine göre ağırlıklı skor ortalamaları; ilgili değerlerin sayılarının skor katsayısı ile çarpımlarının toplamı, toplam hayvan sayısına (10) bölünmek suretiyle ***(Σ skor katsayısı x hayvan sayısı/toplam hayvan sayısı (10))*** hesaplandı. Böylece gruplardaki total (hafif+orta+şiddetli) dejenerasyon sayıları yerine, gruplar arasında şiddeti de göz önüne alan daha sağlıklı bir karşılaştırma yapabilmek adına, lezyonun şiddetiyle doğru orantılı olarak artan ağırlıklı ortalama değerlerinin [Ortalama±Standart Hata ($\overline{X}\pm S\overline{x}$)] istatistiksel olarak karşılaştırılması yapıldı ve sonuçlar Çizelge 3.5-3.6 ve Şekil 3.6'da gösterildi.

Skorların ağırlıklı ortalamasının hesaplama formülü:

$$\frac{(\text{Hafif}(1) \times \text{Hayvan sayısı}) + (\text{Orta}(2) \times \text{Hayvan sayısı}) + (\text{Şiddetli}(3) \times \text{Hayvan sayısı})}{\text{Bir gruptaki toplam hayvan sayısı } (10)}$$

Buna göre istatistiksel olarak hepsinde anlamlı ($p<0,05$) olmak üzere, AF tarafından oluşturulan dejeneratif lezyonların, AF+TQ grubunda belirgin düzeyde, AF+ÇÖT grubunda ise orta derecede azaldığı tespit edildi. AF'siz yeme TQ ve ÇÖT

ilavesinin KNT grubuna kıyasla söz konusu değerlerde önemli bir değişikliğe neden olmadığı görüldü (p>0,05) (Şekil 3.7-12).

Çizelge 3.4. Karaciğer lezyonlarının skorlanması ve esas alınan mikroskobik bulgular.

Skorlar	***Karaciğer***
0	*Histopatolojik bir değişiklik yok.*
1 (Hafif)	*Sentrilobüler bölgede hidropik ve yağ dejenasyonuna bağlı hafif hepatoselüler şişkinlik.*
2 (Orta)	*Sentrilobüler ve intermedier bölgede orta derecede dejenerasyon ve hepatoselüler şişkinlik.*
3 (Şiddetli)	*Diffüz, şiddetli hepatoselüler şişkinlik ve parçalanma.*

Hepatositlerde asiner dizilim, AF grubunda 9, AF+TQ ve AF+ÇÖT grubunda ise 2 piliçte görüldü. İstatistiksel olarak, AF ile diğer gruplar arasındaki farkın önemli olduğu belirlendi (p<0,05) (Şekil 3.13).

Safra kanalı proliferasyonu yönünden yapılan incelemede, AF'li yemlere TQ ve ÇÖT ilavesinin, AF grubuna (9 piliç) göre, safra kanalı proliferasyonunu anlamlı şekilde engellediği görüldü (p<0,05) (Şekil 3.14).

Periportal fibrozis AF grubunda 4, AF+TQ grubunda ise 1 piliçte belirlendi. Bu gruplar arasında istatistiksel olarak fark önemsiz bulunurken (p>0,05) AF ile KNT, TQ, ÇÖT ve AF+ÇÖT arasında fark önemli bulundu (p<0,05) (Şekil 3.15-16).

Karaciğerde portal alanda perivasküler mononükleer hücre ve heterofil infiltrasyonları, AF grubunda tüm piliçlerde, AF+ÇÖT grubunda 5 ve AF+TQ grubunda ise 3 piliçde görüldü. AF grubundaki fark diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0,05) (Şekil 3.17).

Çizelge 3.5. Karaciğerdeki Patolojik (Makroskobik-Mikroskobik) Bulgular. *

Değişiklikler/Lezyonlar			Grup 1 KNT	Grup 2 AF	Grup 3 TQ	Grup 4 ÇÖT	Grup 5 AF+TQ	Grup 6 AF+ÇÖT
Karaciğer	*Makroskobik*	Büyüme/solgunluk	1/10[a]	10/10[b]	1/10[a]	1/10[a]	3/10[a]	4/10[a]
		Hafif	*1*	*3*	*1*	*1*	*2*	*3*
		Şiddetli	*-*	*7*	*-*	*-*	*1*	*1*
	Mikroskobik	Hidropik Dej./ Yağlanma	2/10	10/10	2/10	2/10	5/10	6/10
		Ağırlıklı Skor Ortalaması[1]	0,2±0,13[a]	2,2±0,25[c]	0,2±0,13[a]	0,2±0,13[a]	0,7±0,26[ab]	0,9±0,28[b]
		Hafif	*2*	*2*	*2*	*2*	*3*	*3*
		Orta		*4*			*2*	*3*
		Şiddetli		*4*				
		Asiner dizilim	-/10[a]	9/10[b]	-/10[a]	-/10[a]	2/10[a]	2/10[a]
		Safra-kanalı proliferasyonu	-/10[a]	9/10[c]	1/10 [a]	1/10 [a]	5/10[b]	3/10 [ab]
		Periportal fibrozis	-/10[a]	4/10[b]	-/10[a]	-/10[a]	1/10[ab]	-/10[a]
		Portal alanda mononükleer ve heterofil hücre infiltrasyonu	1/10[a]	10/10[b]	1/10[a]	1/10[a]	3/10[a]	5/10[a]

[a-d] Khi kare testi ve One – way ANOVA sonrasında yapılan *post-hoc* Duncan testine göre sütunlardaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

[*] Çizelgedeki değerler her gruptan 10 adet broyler pilicin nekropsi ve histopatolojik bulgularını göstermektedir.

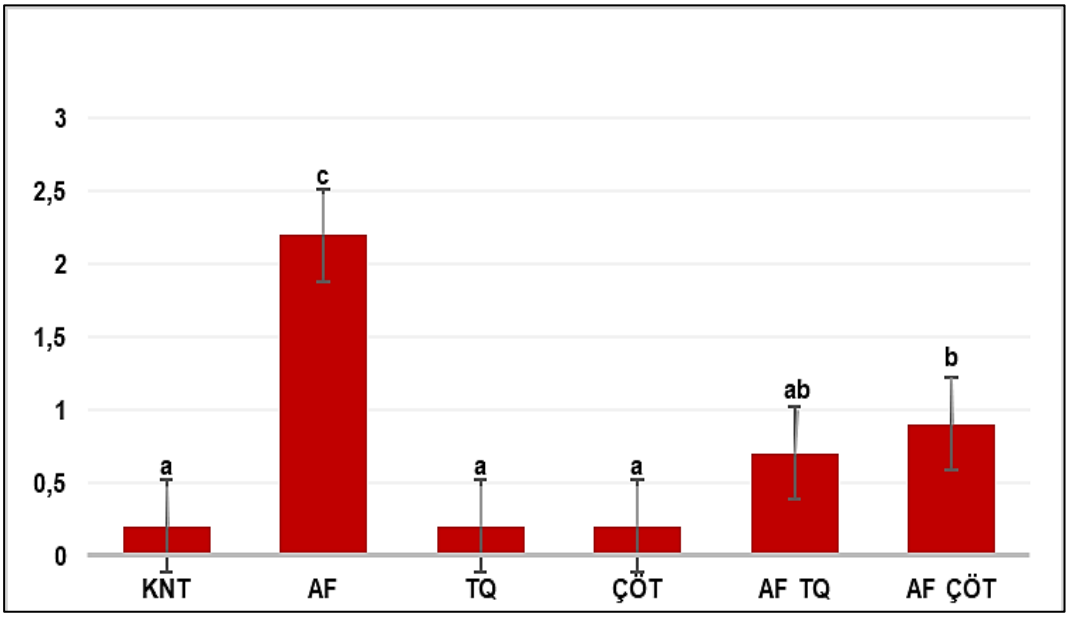
[1] Ağırlıklı skor Ortalaması (Ortalama ± Standart Hata): $\frac{\text{Hafif(1) x Hayvan sayısı)+(Orta(2) x Hayvan sayısı)+(Şiddetli(3) x Hayvan sayısı}}{\text{Bir gruptaki toplam hayvan sayısı (10)}}$

Çizelge 3.6. Karaciğer Hepatoselüler Dejenerasyon Şiddetinin Skorlanması ve Skorların Ağırlıklı Ortalama değerleri.

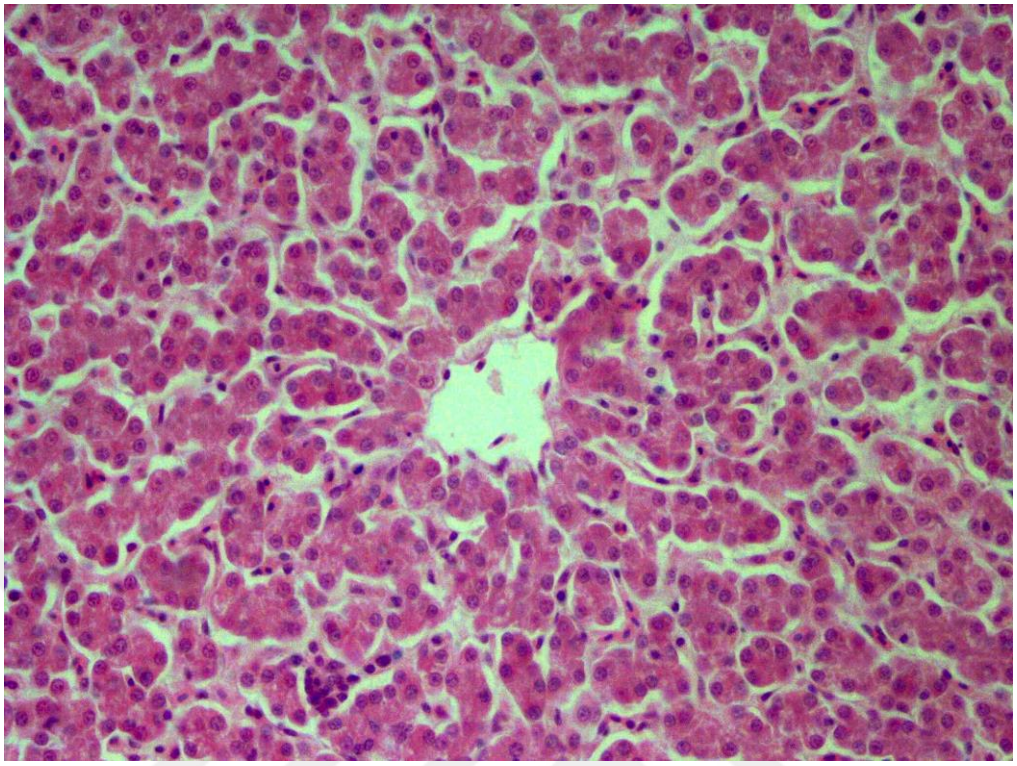
Gruplar/Skorlar	*Hafif (x1)*	*Orta (x2)*	*Şiddetli(x3)*	Ortalamalar ($\bar{X}\pm S\bar{x}$)*
KNT	*2*	-	-	$0,2\pm0,13^{a}$
AF	*2*	*4*	*4*	$2,2\pm0,25^{c}$
TQ	*2*	-	-	$0,2\pm0,13^{a}$
ÇÖT	*2*	-	-	$0,2\pm0,13^{a}$
AF+TQ	*3*	*2*	-	$0,7\pm0,26^{ab}$
AF+ÇÖT	*3*	*3*	-	$0,9\pm0,28^{b}$

P<0,01 (One-way ANOVA)

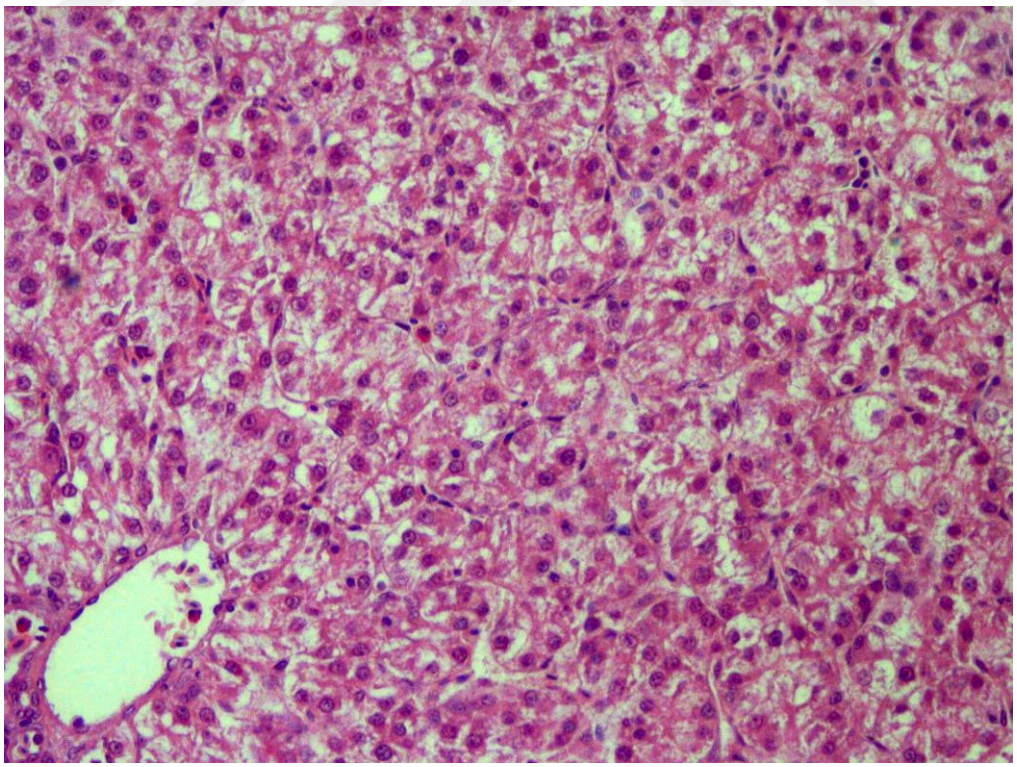
[a-c] One-way ANOVA ve sonrasında yapılan post-hoc Duncan testine göre sütunlardaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,01).
* Bu değerler her gruptan 10 broyler pilicin dejenerasyon şiddetinin ağırlıklı Ortalama ± Standart Hata ($\bar{X}\pm S\bar{x}$) değerlerini temsil etmektedir (*(Σ skor katsayısı x hayvan sayısı/toplam hayvan sayısı (10)*).



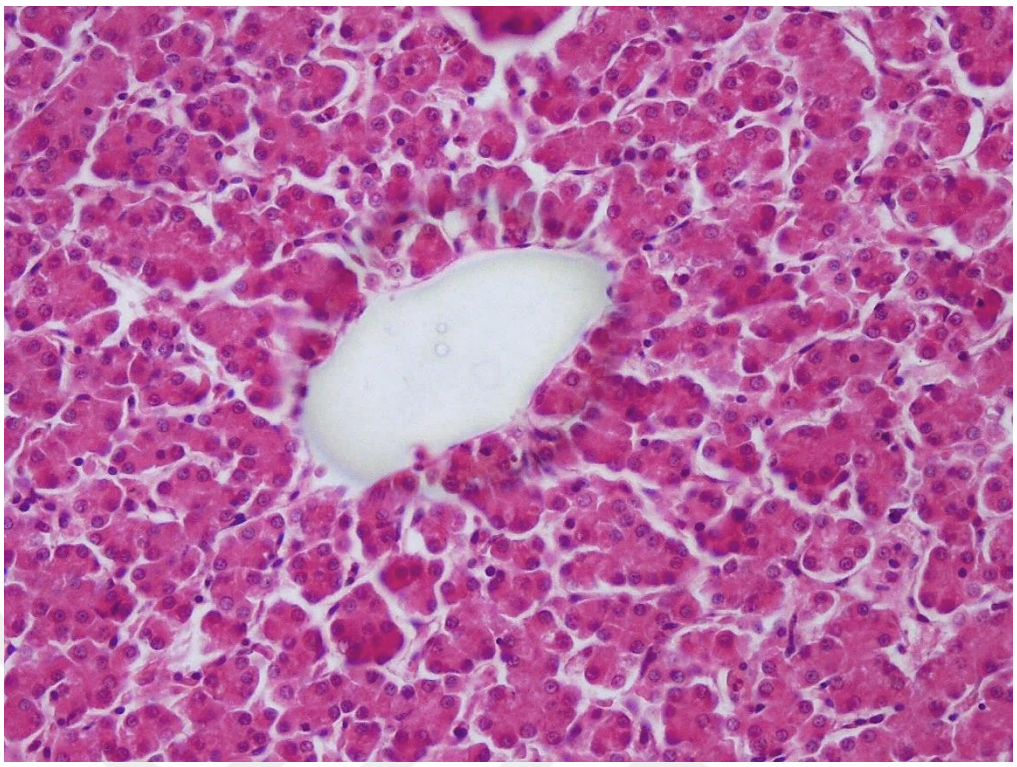
Şekil 3.6. Karaciğerde hepatoselüler dejenerasyon skor ortalamalarının istatistik değerlerinin grafiksel olarak gösterimi.



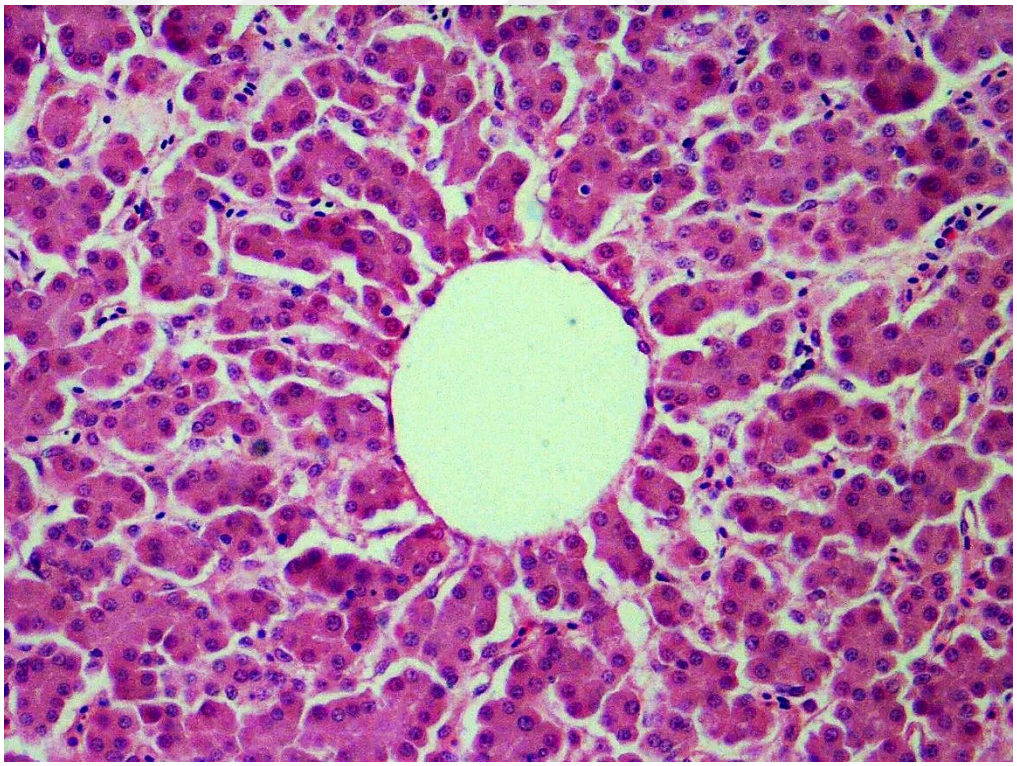
Şekil 3.7 Karaciğerin normal mikroskobik görünümü, KNT grubu, HxE, 40X.



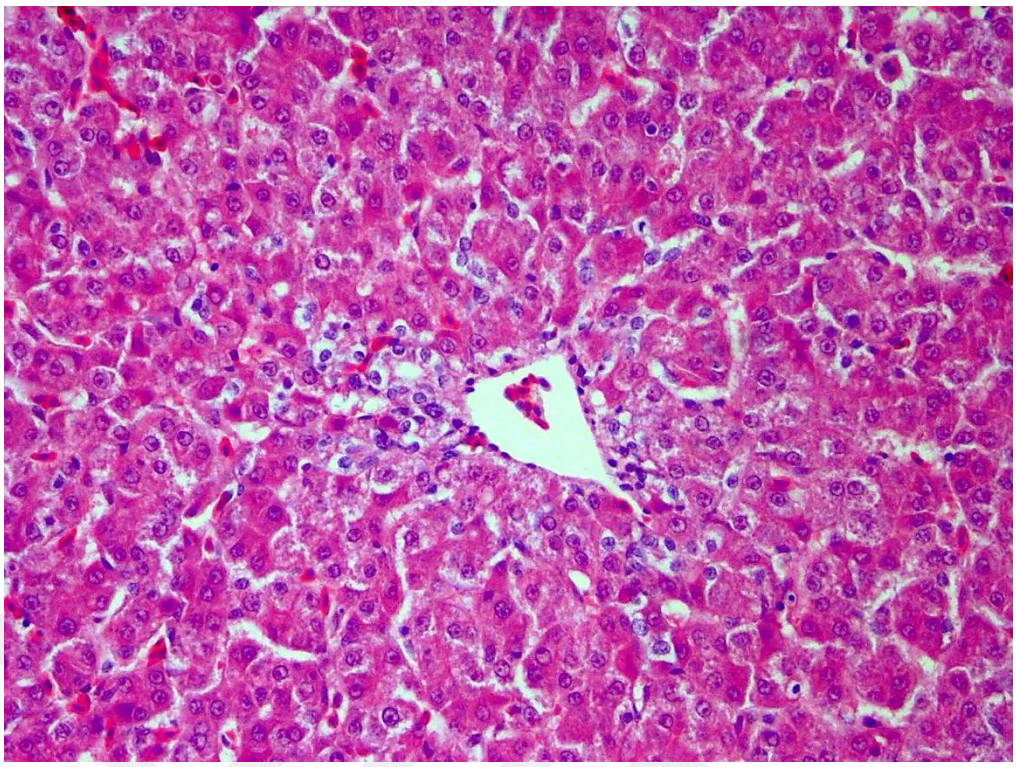
Şekil 3.8. Karaciğerde diffuz, şiddetli hidropik dejenerasyon ve yağlanma, AF grubu, HxE, 40X.



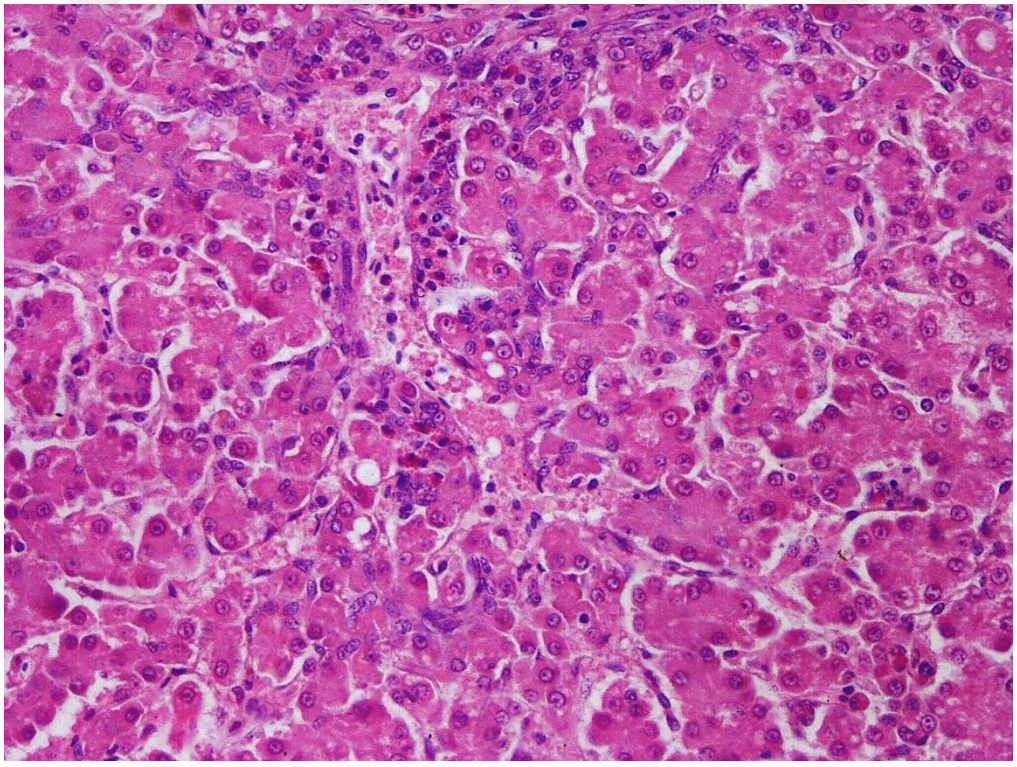
Şekil 3.9. Karaciğerin normal görünümü, TQ grubu, HxE, 40X.



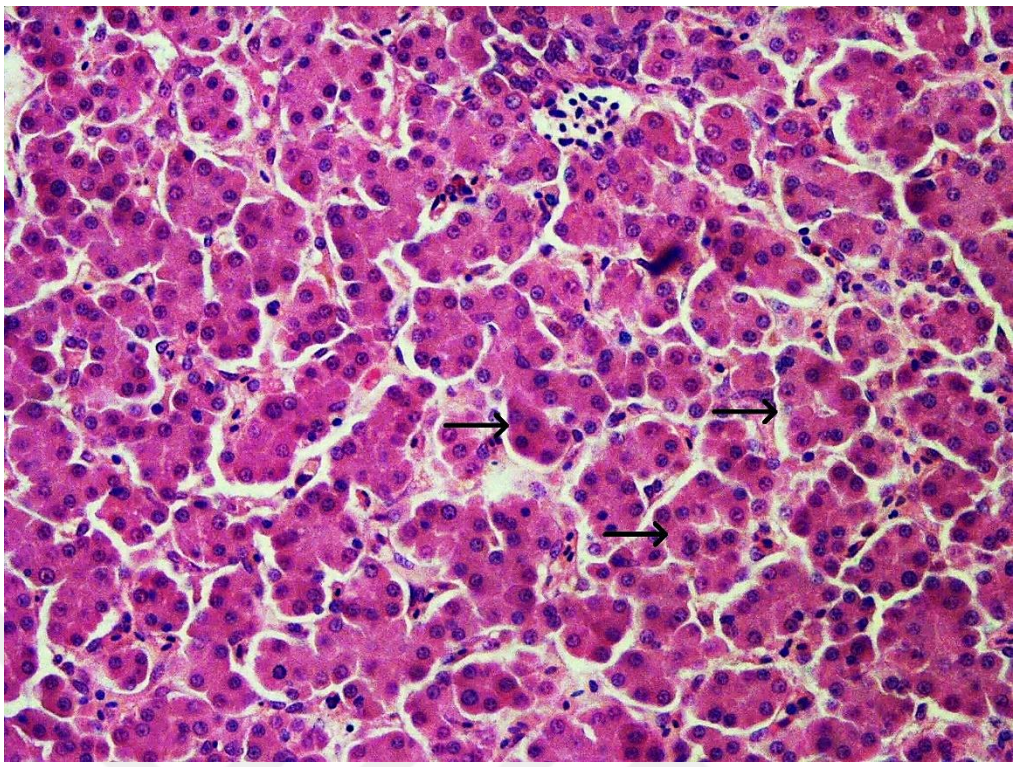
Şekil 3.10. Karaciğerin normal görünümü, ÇÖT grubu, HxE, 40X.



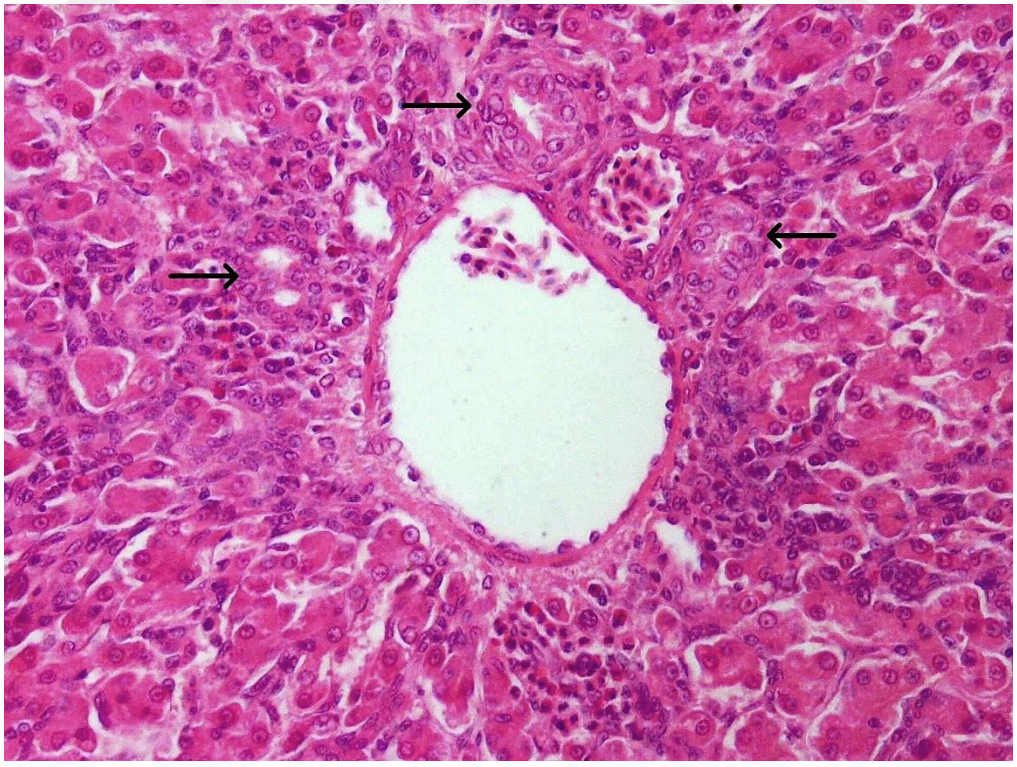
Şekil 3.11. Karaciğerde periportal bölgede hafif hidropik dejenerasyon, AF+TQ grubu, HxE, 40X.



Şekil 3.12. Karaciğerde hafif hidropik dejenerasyon ve portal alanda fibrozis ile heterofil infiltrasyonu, HxE, AF+ÇÖT grubu, 40X.



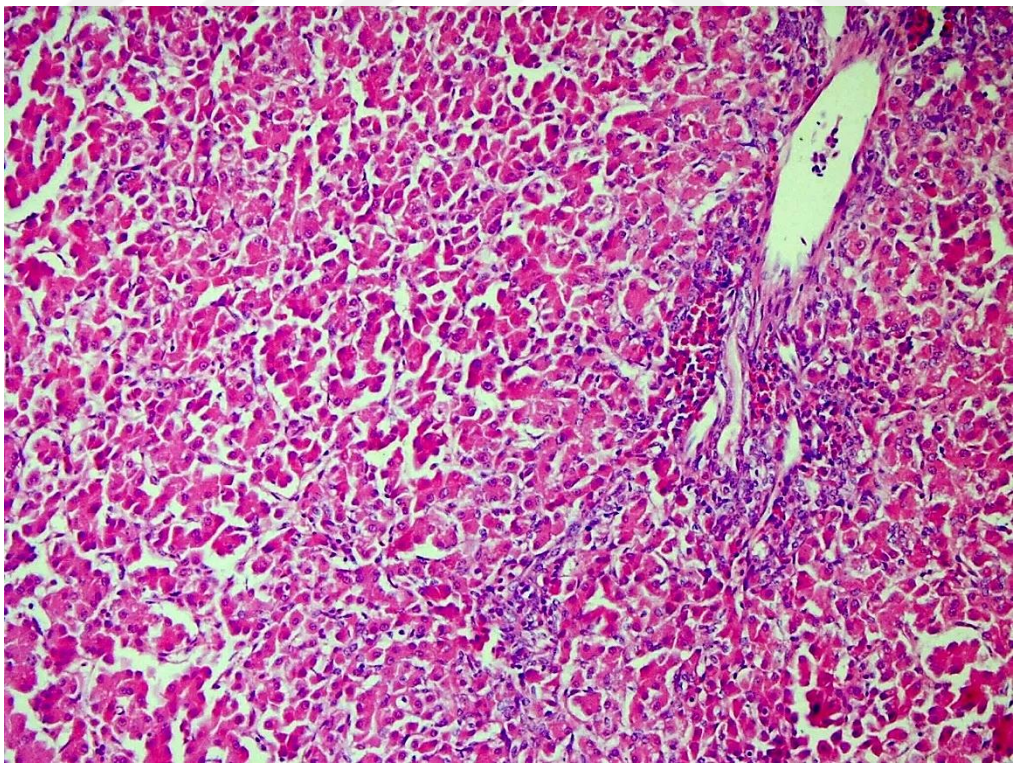
Şekil 3.13. Hepatositlerde asiner dizilim ve ortalarında lümen oluşumu (oklar) AF grubu, HxE, 40X.



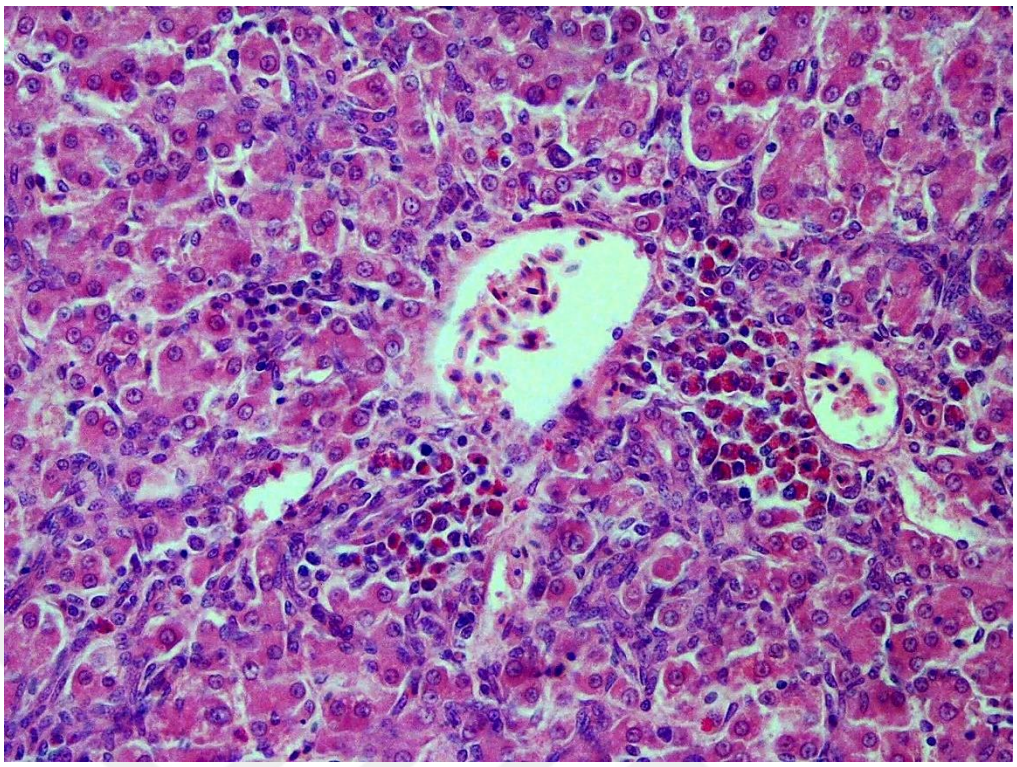
Şekil 3.14. Portal alanda safra kanalı proliferasyonu (oklar)**,** AF grubu, HxE, 40X.



Şekil 3.15. Hepatositlerde şiddetli hidropik dejenerasyon, portal alanda hafif fibrozis ve safra kanalı proliferasyonu**,** AF grubu, HxE, 40X.



Şekil 3.16. Portal alanda fibrozis, heterofil ve mononükleer hücre infiltrasyonu, AF grubu, HxE, 20X.



Şekil 3.17. Hepatositlerde hidropik dejenerasyon, portal alanda heterofil infiltrasyonu ve fibrozis AF grubu, HxE, 40X.

3.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

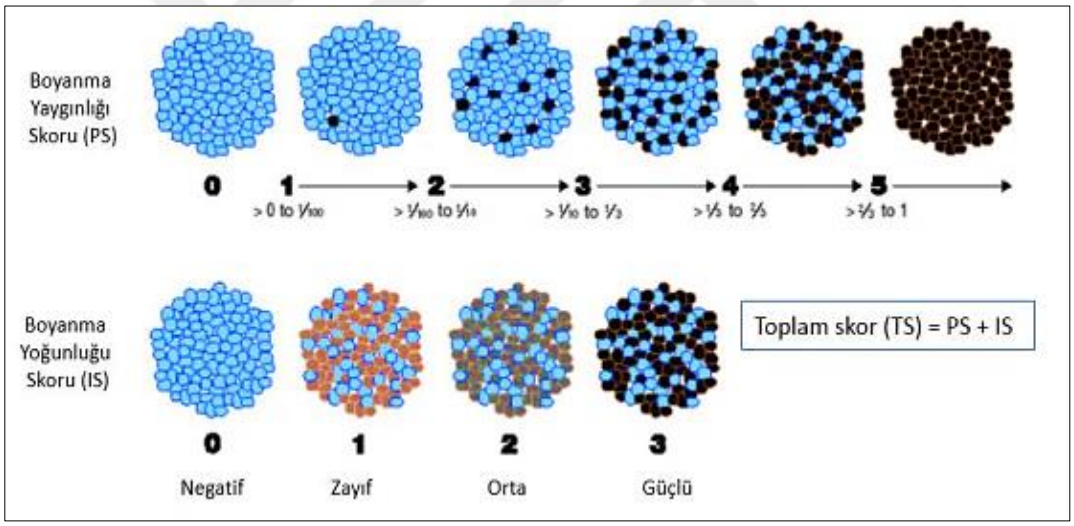
Çalışmada AF'nin temel hedef organı olan karaciğerde, aflatoksikozis bulguları ve AF'nin biyotransferinde rol oynayabilecek toplam 8 adet markıra ilişkin İHK boyamaları yapıldı. Karaciğerdeki bu immunohistokimyasal boyamaların genel değerlendirmesinde, incelenen alanlarda pozitif boyanmış hücre sayısı ve boyanma koyuluğu/yoğunluğu temel alınarak oluşturulan değerlendirme sistemleri esas alındı. Bu kapsamda her bir kesit ışık mikroskobunda 40'lık büyütmede, rastgele 10 ayrı alan seçilerek incelendi. Primer antikorlara göre değişmekle birlikte, pozitif hücre sayısı, boyanma yayınlığı ve/veya boyanma yoğunluğu ortalaması alınarak bulunan değer o hayvanın İHK verisi olarak kaydedildi. İncelenen alanlarda, primer antikorlar için kaynaklarda belirlenen bir skorlama sisteminin olmadığı durumlarda skorlamalar genel olarak Allred skorlama metoduna göre yapıldı (Choudhury ve ark 2010, Hameed ve ark 2015). Bu metoda göre; boyanma yoğunluk (koyuluk) skoru; 0 (boyanma yok), 1 (zayıf), 2 (orta), 3 (yoğun/koyu) olarak belirlendi. Boyanma yaygınlığı ise, boyanan hücrelerin incelenen alandaki tüm hücrelere oranı temel alınarak şu şekilde belirlendi: 0 (boyanma yok), 1 (>0-1/100), 2 (>1/100-1/10), 3

(>1/10-1/3), 4 (>1/3-2/3), 5 (>2/3-1). Boyanma yoğunluğu skoru ile boyanma yaygınlığı değeri toplanarak her bir olgu için Allred skoru belirlendi (Çizelge 3.7, Şekil 3.18). Tüm İHK boyamalarının özet tablosu ise bölüm sonunda Çizelge 3.16'da özetlendi.

Çizelge 3.7. Allred skorlama metodu (Hameed ve ark (2015)'dan uyarlanmıştır).

Boyanma yaygınlık skoru	*PS**	*Boyanma yoğunluğu skoru*	*IS**
0	0	Boyanma yok	0
>0-1/100	1	Zayıf	1
>1/100-1/10	2	Orta	2
>1/10-1/3	3	Yoğun	3
>1/3-2/3	4	**Allred Skoru= PS+IS**	
>2/3-1	5		

* PS: Paint Score, IS: Intensity score



Şekil 3.18. Allred skorlama metodu (Choudhury ve ark (2010)'dan uyarlanmıştır).

3.4.1. Karaciğerde AFB1-DNA Adükt İmmunoreaktivitesi

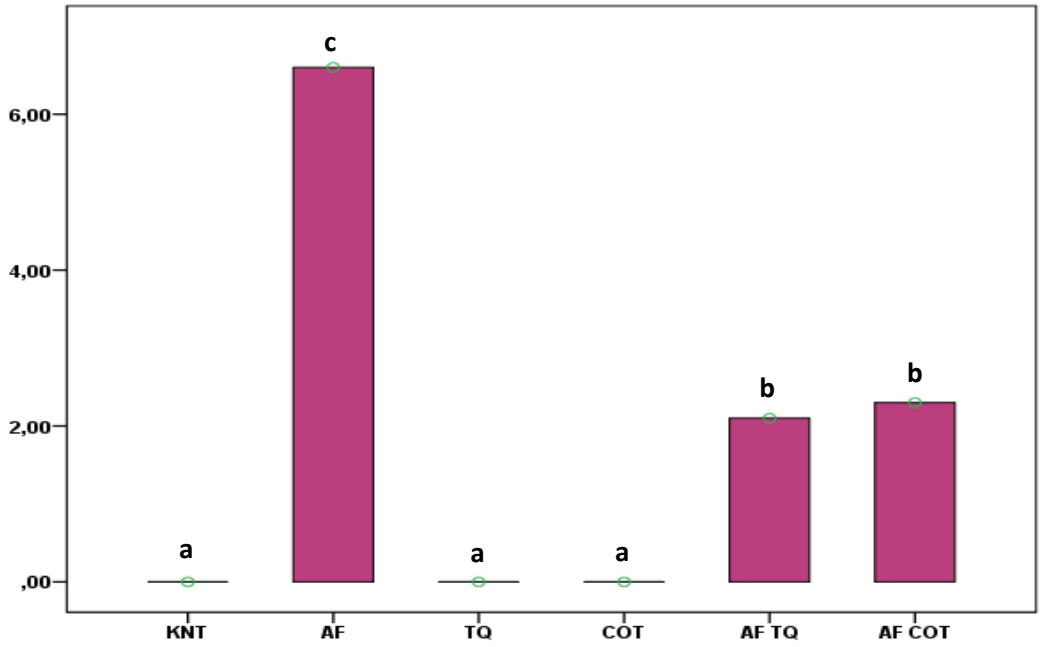
Karaciğerde AFB1-DNA adükt primeri ile yapılan immunohistokimyasal boyamalar neticesinde elde edilen sonuçlar Çizelge 3.8'de özetlendi. Yapılan skorlamalarda Allred skorlama metodu kullanıldı. Çizelge 3.8 incelendiğinde, deneme süresi sonunda AF grubunda AFB1-DNA adüktünün ve dolayısıyla hücrelerdeki AF miktarının önemli oranda yüksek çıktığı görüldü. Bu gruptaki hepatositlerin neredeyse tamamına yakınında pozitif immunoreaktivite belirlendi.

DNA'daki bu katım ve AF yoğunluğunda, AF+TQ ve AF+ÇÖT gruplarında önemli oranda bir azalma belirlendi ($p<0,05$). İmmunoreaktiviteye hepatositlerin çekirdeklerinde rastlanıldı (Şekil 3.19-20).

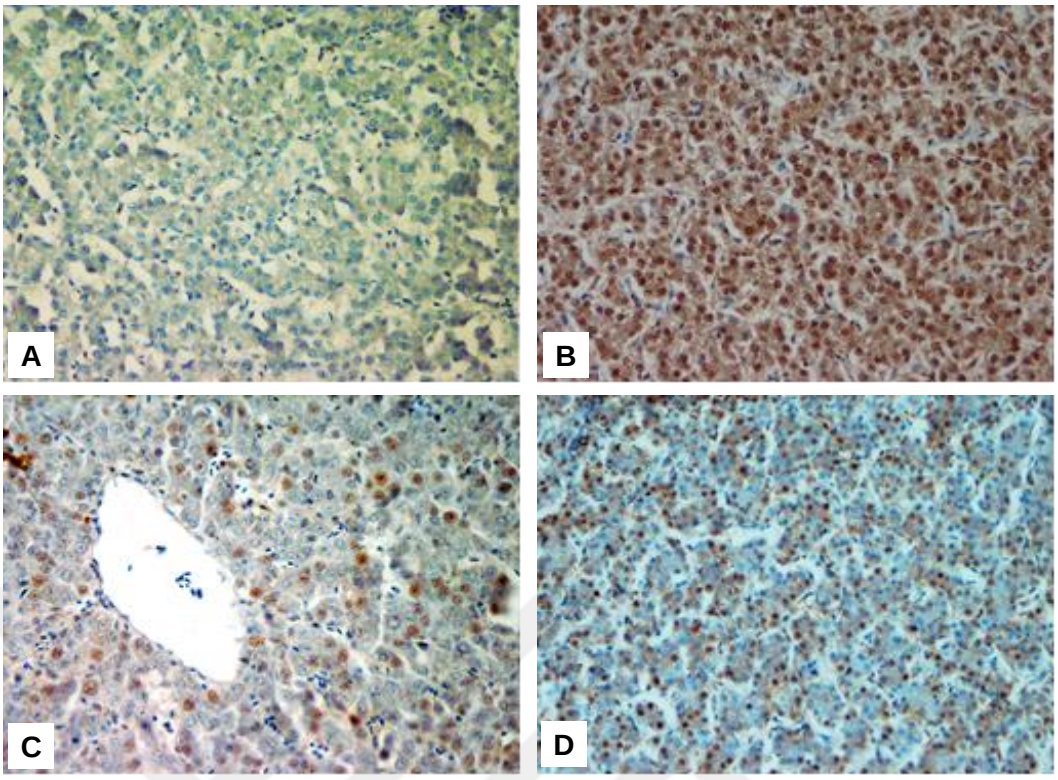
Çizelge 3.8. Karaciğerde AFB1-DNA adükt İHK boyanma skorları ve istatistiksel değerlendirmesi.

Gruplar	***İHK boyanma skorları*** $(\overline{X} \pm S_{\bar{x}})$
KNT	$0,00\pm0,00^{a}$
AF	$6,60\pm0,48^{c}$
TQ	$0,00\pm0,00^{a}$
ÇÖT	$0,00\pm0,00^{a}$
AF+ TQ	$2,10\pm0,23^{b}$
AF+ ÇÖT	$2,30\pm0,21^{b}$
P<0,01 (One-way Anova)	

[a-c] One-way ANOVA ve sonrasında yapılan post-hoc Duncan testine göre sütundaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,01).



Şekil 3.19. AFB1-DNA adüktü immunoreaktivitesi skorlarının grafiksel gösterimi ve istatistiksel değerler.



Şekil 3.20. Karaciğer dokusunda AFB1-DNA adüktü immunoreaktivitesi, **A.** KNT grubu, pozitif boyanma yok, **B.** AF grubu, hepatositlerin tamamına yakınında immunoreaktivite, **C.** AF+TQ grubu, az sayıda hepatositde immunoreaktivite, **D.** AF+ÇÖT grubu, hepatositlerde orta şiddette immunoreaktivite, İHK, DAB kromojen, Mayer hematoksilen, 40X.

3.4.2. Pregnane X Reseptör (PXR) İmmunoreaktivitesi

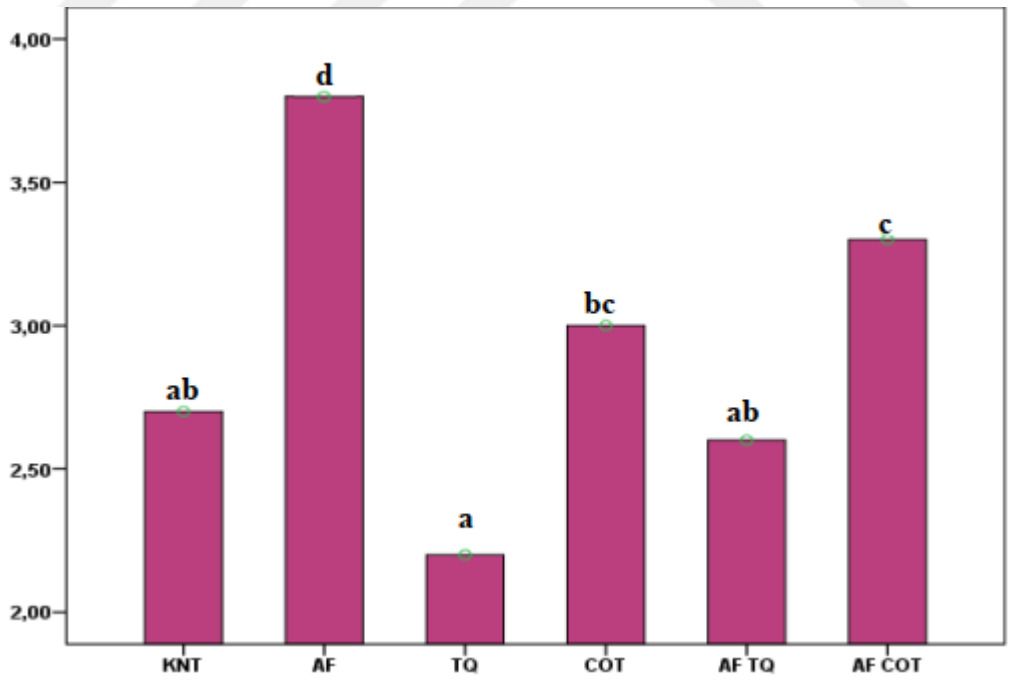
Karaciğerde, ksenobiyotiklerin ve endobiyotiklerin absorpsiyonunda, dağılımında ve metabolizmasında görevli reseptörlerden biri olan PXR primer antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyamaların sonuçları ve istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 3.9'da özetlendi. Bu primer için kullanılan skorlama metodu daha önce yapılan çalışmalardan (Han ve ark 2015, Dong ve ark 2017) uyarlandı. Buna göre; boyanma yoğunluk skoru; 0 (boyanma yok), 1 (zayıf), 2 (orta), 3 (yoğun) olarak belirlendi. Boyanma yaygınlığı ise, 40'lık büyütmede boyanan hücrelerin sayısı temel alınarak belirlendi: 0 (boyanma yok), 1 (1-5 hücre), 2 (6-10 hücre), 3 (11-15 hücre), 4 (>15 hücre). Daha sonra, boyanma yoğunluk ile boyama yaygınlık verileri toplanarak her bir olgunun skoru tespit edildi. Çizelge 3.9 incelendiğinde, PXR ekspresyonunun AF+TQ grubunda önemli oranda azaldığı, hatta TQ grubunda KNT grubundan bile az olduğu belirlendi. AF grubunda da KNT grubuna kıyasla önemli oranda artış görüldü ($p<0,01$). AF'li yeme, ÇÖT ilavesinin

PXR ekspresyonu üzerine olan etkisinin istatistiksel olarak anlamlı ancak daha kısmi düzeyde olduğu belirlendi ($p<0,05$). İmmunoreaktiviteye hepatositlerin çekirdeklerinde rastlanıldı (Şekil 3.21-22).

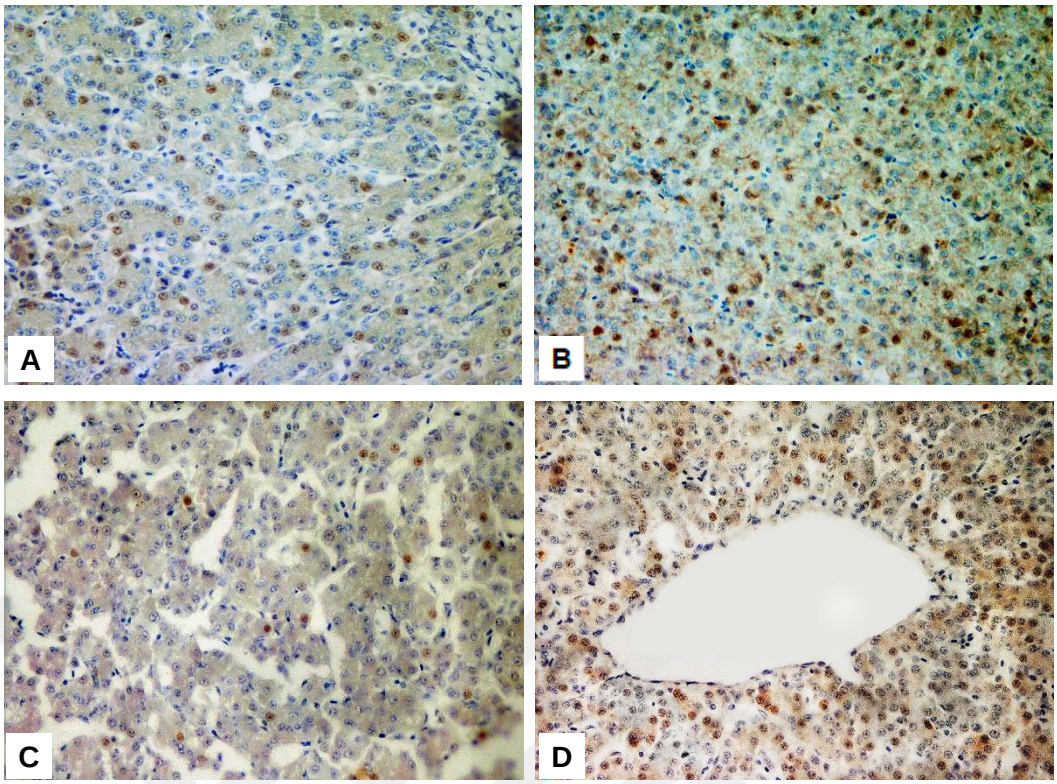
Çizelge 3.9. Karaciğerde PXR İHK boyanma skorları ve istatistiksel değerlendirmesi.

Gruplar	***İHK boyanma skorları*** $(\overline{X} \pm S_{\bar{x}})$
KNT	$2,70\pm0,15^{ab}$
AF	$3,80\pm0,13^{d}$
TQ	$2,20\pm0,13^{a}$
ÇÖT	$3,00\pm0,15^{bc}$
AF+TQ	$2,60\pm0,27^{ab}$
AF+ÇÖT	$3,30\pm0,15^{c}$
P<0,01 (One-way Anova)	

[a-d] One-way ANOVA ve sonrasında yapılan post-hoc Duncan testine göre sütundaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,01).



Şekil 3.21. PXR immunoreaktivitesi skorlarının grafiksel gösterimi ve istatistiksel değerler.



Şekil 3.22. Karaciğer dokusunda PXR immunoreaktivitesi, **A.** KNT grubu, hepatositlerde orta dereceli immunoreaktivite, **B.** AF grubu, hepatositlerde orta şiddette immunoreaktivite, **C.** AF+TQ grubu, az sayıdaki hepatositde immunoreaktivite, **D.** AF+ÇÖT grubu, hepatositlerde orta şiddette immunoreaktivite, İHK, DAP kromojen, Mayer hematoksilen, 40X.

3.4.3. Aryl Hidrokarbon Reseptör (AhR) İmmunoreaktivitesi

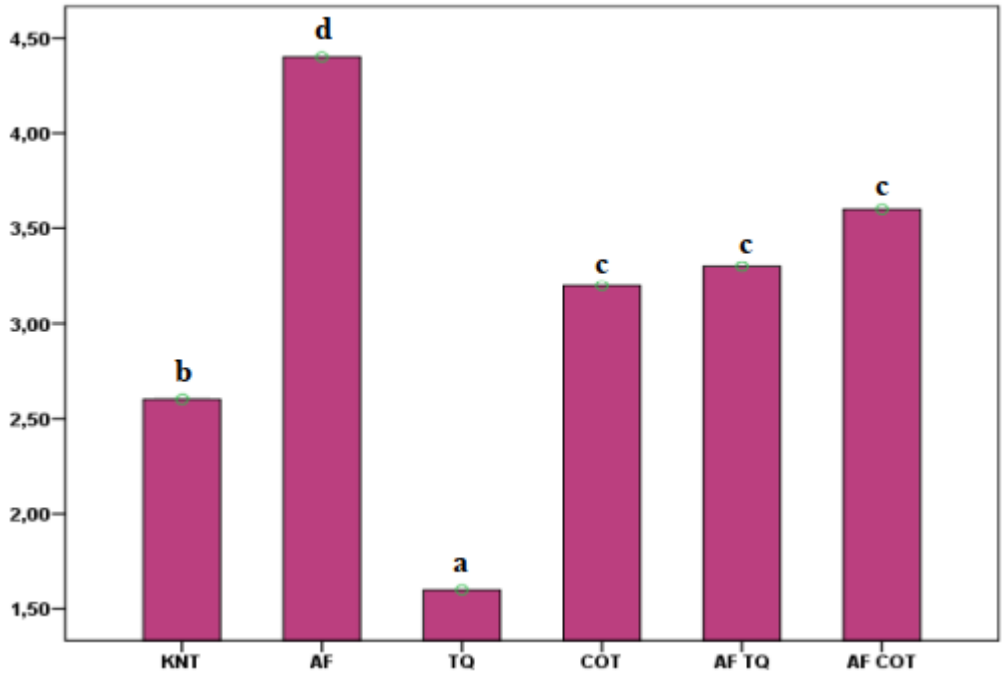
Karaciğerde, CYP1A subfamilyasının ekpresyonunu düzenleyen nükleer transkripsiyon faktörü olan AhR reseptörü için yapılan immunohistokimyasal boyamaların sonuçları ve istatistiksel farklılıklar Çizelge 3.10'da özetlendi. AhR'nin skorlamasında Allred skorlama metodu kullanıldı. Sonuçlar incelendiğinde, TQ kontrol grubunda AhR ekspresyonunun önemli oranda azaldığı belirlendi. Bunun yanında AF'li yemle beslenen gruplarda oldukça artan AhR ekspresyonu, AF'e ilaveten ÇÖT veya TQ katılan gruplarda önemli oranda azalarak KNT grubuna yaklaştığı tespit edildi ($p<0,05$). İmmunoreaktiviteye genellikle hepatositlerin çekirdeklerinde, daha az olarak da sitoplazmalarında rastlanıldı (Şekil 3.23-24).

Çizelge 3.10. Karaciğerde AhR İHK boyanma skorları ve istatistiksel değerlendirmesi.

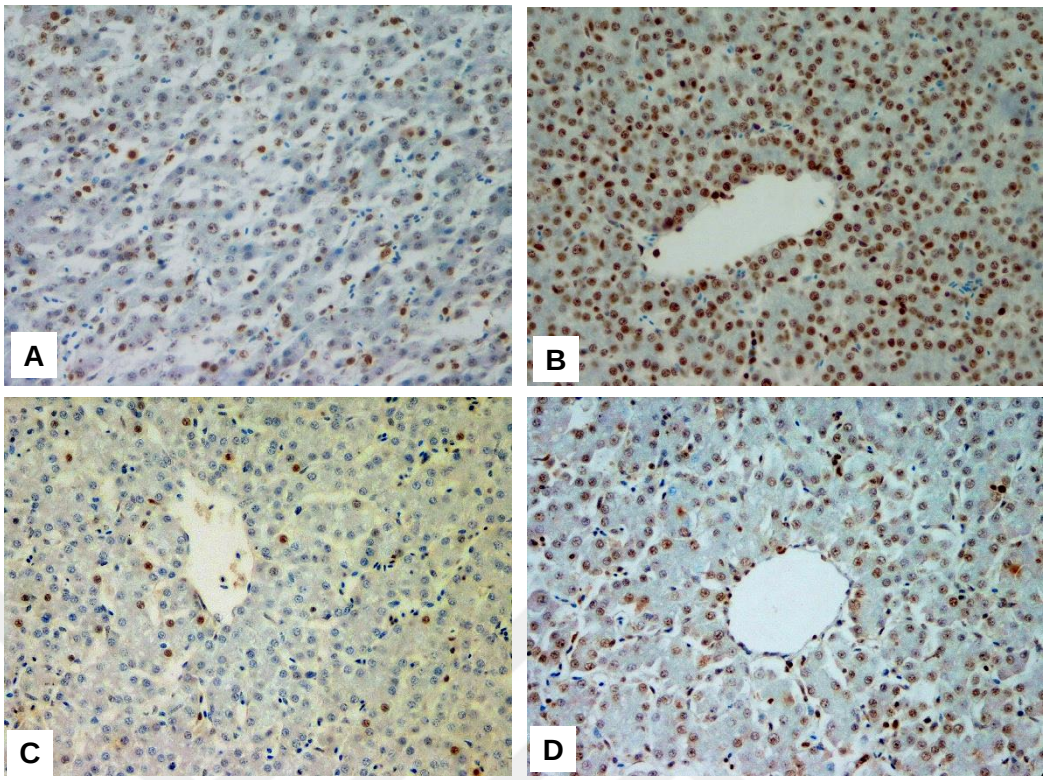
Gruplar	***İHK boyanma skorları*** $(\overline{X} \pm S_{\bar{x}})$
KNT	2,6±0,26[b]
AF	4,4±0,16[d]
TQ	1,6±0,16[a]
ÇÖT	3,2±0,13[c]
AF+TQ	3,3±0,15[c]
AF+ÇÖT	3,6±0,27[c]

P<0,01 (One-way Anova)

[a-d] One-way ANOVA ve sonrasında yapılan post-hoc Duncan testine göre sütundaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,01).



Şekil 3.23. AhR immunoreaktivitesi skorlarının grafiksel gösterimi ve istatistiksel değerler.



Şekil 3.24. Karaciğer dokusunda AhR immunoreaktivitesi, **A.** KNT grubu, hepatositlerde orta şiddette immunoreaktivite, **B.** AF grubu, hepatositlerde yoğun ve yaygın immunoreaktivite, **C.** TQ grubu, az sayıdaki hepatositde immunoreaktivite, **D.** AF+ÇÖT grubu, hepatositlerde orta şiddette immunoreaktivite, İHK, DAB kromojen, Mayer hematoksilen, 40X.

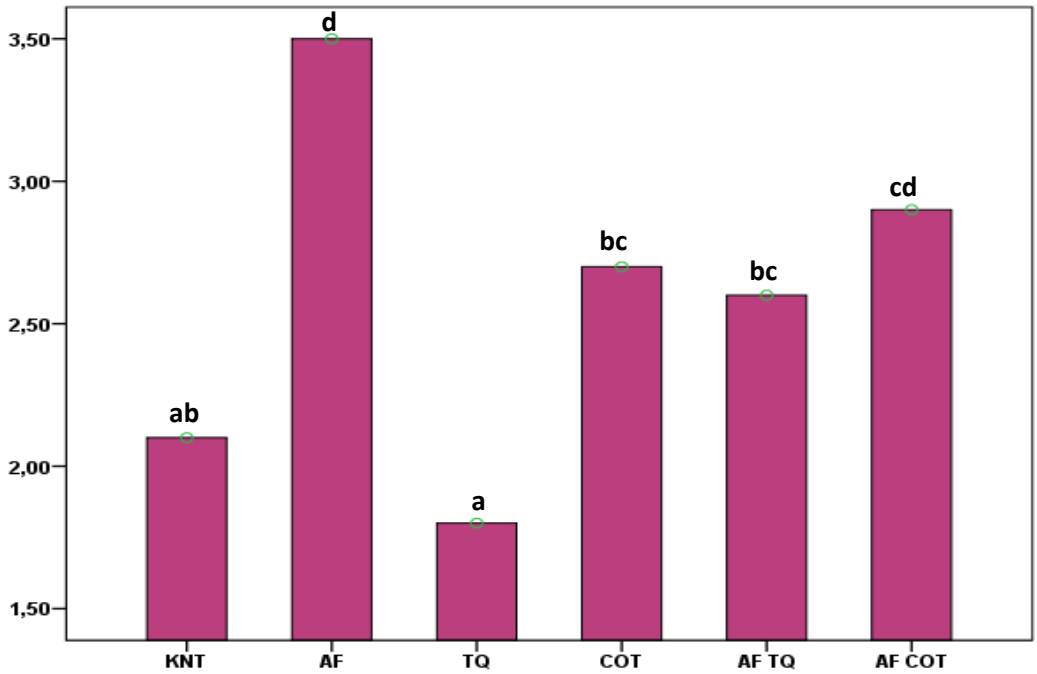
3.4.4. Constituve Androstane Reseptör (CAR) İmmunoreaktivitesi

Karaciğerde, faz I ve faz II reaksiyonlarını katalize eden enzimlerin yanı sıra bazı ilaç taşıyıcılarının gen ekspresyonunu sağlayan CAR reseptörü primer antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyamaların sonuçları Çizelge 3.11'de özetlendi. CAR'ın skorlanmasında boyanma yoğunluğu skoru (0, negatif; 1, zayıf; 2, orta; 3, güçlü) ile pozitif hepatositlerin yüzde skorunun (0, boyanma yok; 1, <%25; 2, >%25-50; 3, >%50) toplanması ile elde edilen değer kullanıldı (Ni ve ark 2008). Çizelge 3.11 incelendiğinde AF uygulamasının CAR seviyesinde ciddi bir artışa neden olduğu görüldü. TQ eklenen tüm gruplarda ise belirgin derece CAR ekspresyonunun azaldığı dikkati çekti ($p<0,01$). AF+ÇÖT grubunda ise istatistiksel olarak önemli bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 3.25-26). İmmunoreaktivite, hepatositlerin çekirdek, sitoplazma ve membranlarında görülürken bazı Kupffer hücrelerinin sitoplazmalarında da pozitif reaktivite gözlendi.

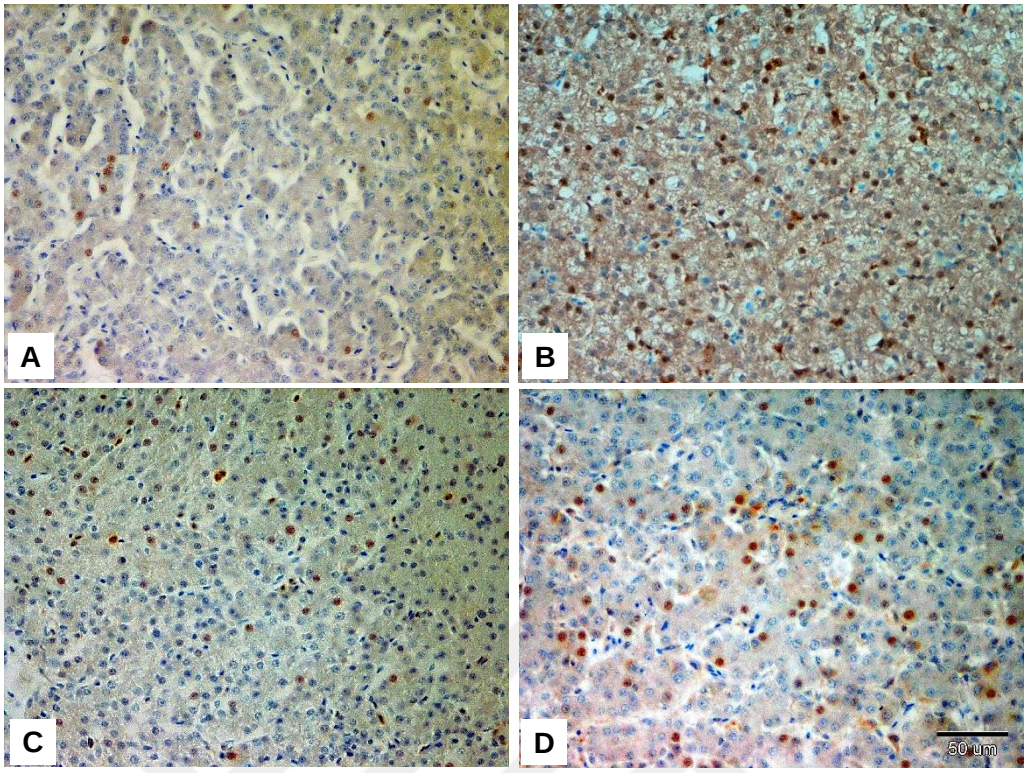
Çizelge 3.11. Karaciğerde CAR İHK boyanma skorları ve istatistiksel değerlendirmesi.

Gruplar	***İHK boyanma skorları*** $(\overline{X} \pm S_{\bar{x}})$
KNT	2,10±0,23[ab]
AF	3,50±0,34[d]
TQ	1,80±0,20[a]
ÇÖT	2,70±0,15[bc]
AF+TQ	2,60±0,16[bc]
AF+ÇÖT	2,90±0,23[cd]
P<0,01 (One-way Anova)	

[a-d] One-way ANOVA ve sonrasında yapılan post-hoc Duncan testine göre sütundaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,01).



Şekil 3.25. CAR immunoreaktivitesi skorlarının grafiksel gösterimi ve istatistiksel değerler.



Şekil 3.26. Karaciğer dokusunda CAR immunoreaktivitesi, **A.** KNT grubu, az sayıda hepatositde immunoreaktivite, **B.** AF grubu, hepatositlerde yoğun ve yaygın immunoreaktivite, **C.** AF+TQ grubu, hepatositlerde orta şiddette immunoreaktivite, **D.** AF+ÇÖT grubu, hepatositlerde yoğun şiddette, ancak orta derecede yaygın immunoreaktivite, İHK, DAB kromojen, Mayer hematoksilen, 40X.

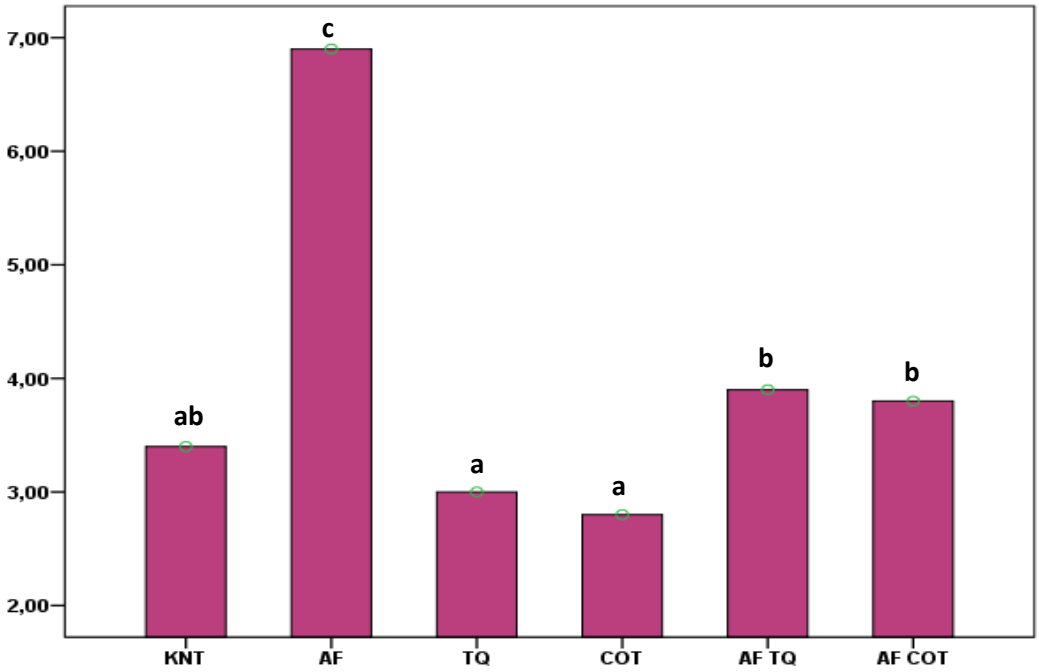
3.4.5. Sitokrom P450 1A1 (CYP1A1) İmmunoreaktivitesi

Karaciğerde, AF'lerin faz I metabolizmasında görevli enzim olan CYP1A1 primer antikorları ile yapılan immunohistokimyasal boyamaların sonuçları ve istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 3.12'de sunuldu. Bu antikorların immunskorlaması daha önce Godard ve ark (2004)'nın bildirdiği metoda göre yapıldı. Boyanma yaygınlığı (0-3) ve boyanma yoğunluğu (0-5) çarpılarak elden edilen değer o vaka için immunskor (0-15) olarak belirlendi. Boyanma yaygınlığında, "0" değeri pozitif boyanma olmadığı "3" değeri ise tüm hücrelerin boyandığını ifade etmektedir. Benzer şekilde boyanma yoğunluğunda "0" değeri negatif olarak kabul edilirken, "5" değeri çok güçlü immunoreaktiviteyi temsil etmektedir. Çizelge 3.12 incelendiğinde, CYP1A1 immunoreaktivitesinin AF grubunda tüm gruplara kıyasla önemli derecede yüksek çıktığı belirlendi. AF'li yemlere ÇÖT veya TQ ilavesinin CYP1A1 enzim seviyesini önemli oranda normale yaklaştırdığı saptandı ($p<0,05$) İmmunoreaktivitenin daha çok sentrilobüler bölgedeki hepatositlerde sitoplazmik ve membranöz olduğu dikkati çekti (Şekil 3.27-28).

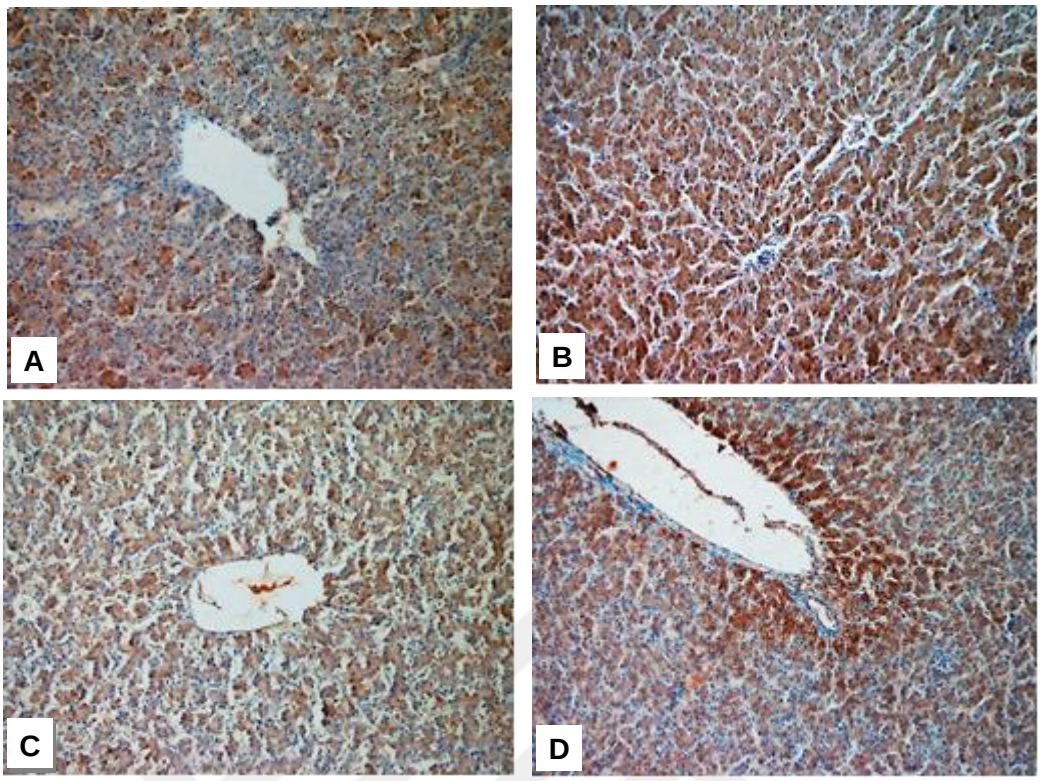
Çizelge 3.12. Karaciğerde CYP1A1 İHK boyanma skorları ve istatistiksel değerlendirmesi.

Gruplar	***İHK boyanma skorları*** $(\overline{X} \pm S_{\bar{x}})$
KNT	3,40±0,16[ab]
AF	6,90±0,28[c]
TQ	3,00±0,30[a]
ÇÖT	2,80±0,20[a]
AF+TQ	3,90±0,28[b]
AF+ÇÖT	3,80±0,29[b]
P<0,01 (One-way Anova)	

[a-c] One-way ANOVA ve sonrasında yapılan post-hoc Duncan testine göre sütundaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,01).



Şekil 3.27. CYP1A1 immunoreaktivitesi skorlarının grafiksel gösterimi ve istatistiksel değerler.



Şekil 3.28. Karaciğer dokusunda CYP1A1 immunoreaktivitesi, **A.** KNT grubu, hepatositlerde orta şiddette immunoreaktivite, **B.** AF grubu, hepatositlerde oldukça yoğun ve yaygın immunoreaktivite, **C.** AF+TQ grubu, hepatositlerde orta şiddette immunoreaktivite, **D.** AF+ÇÖT grubu, sentrilobüler hepatositlerde orta şiddette immunoreaktivite, İHK, DAB kromojen, Mayer hematoksilen, 20X.

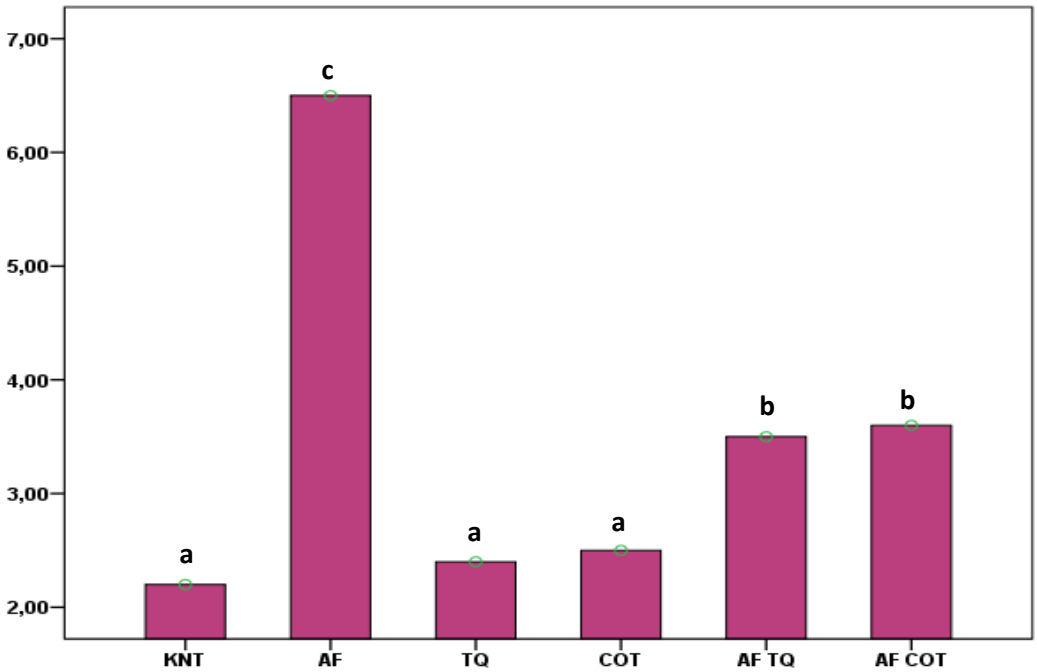
3.4.6. Sitokrom P450 2A6 (CYP2A6) İmmunoreaktivitesi

Kanatlılarda, AF'lerin faz I metabolizması için önemli bir diğer enzim olan CYP2A6 primer antikorları ile yapılan immunohistokimyasal boyamaların sonuçları ve istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 3.13'de sunuldu. Bu antikorların immunskorlaması da Godard ve ark (2004)'nın bildirdiği metoda göre yapıldı. CYP2A6'nın immunoreaktivesinin özetlendiği Çizelge 3.13 incelendiğinde, AF'nin bu enzim seviyelerini önemli oranda indüklediği belirlendi. Diğer deneme gruplarında, CYP2A6'nın seviyesinin AF grubundan düşük, kontrol gruplarından (KNT, TQ, ÇÖT) ise yüksek olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil 3.29-30). Ayrıca hem CYP1A1 hem de CYP2A6 enzimlerinin karaciğerde daha yoğun olarak sentrilobüler bölgede eksprese edildiği gözlendi.

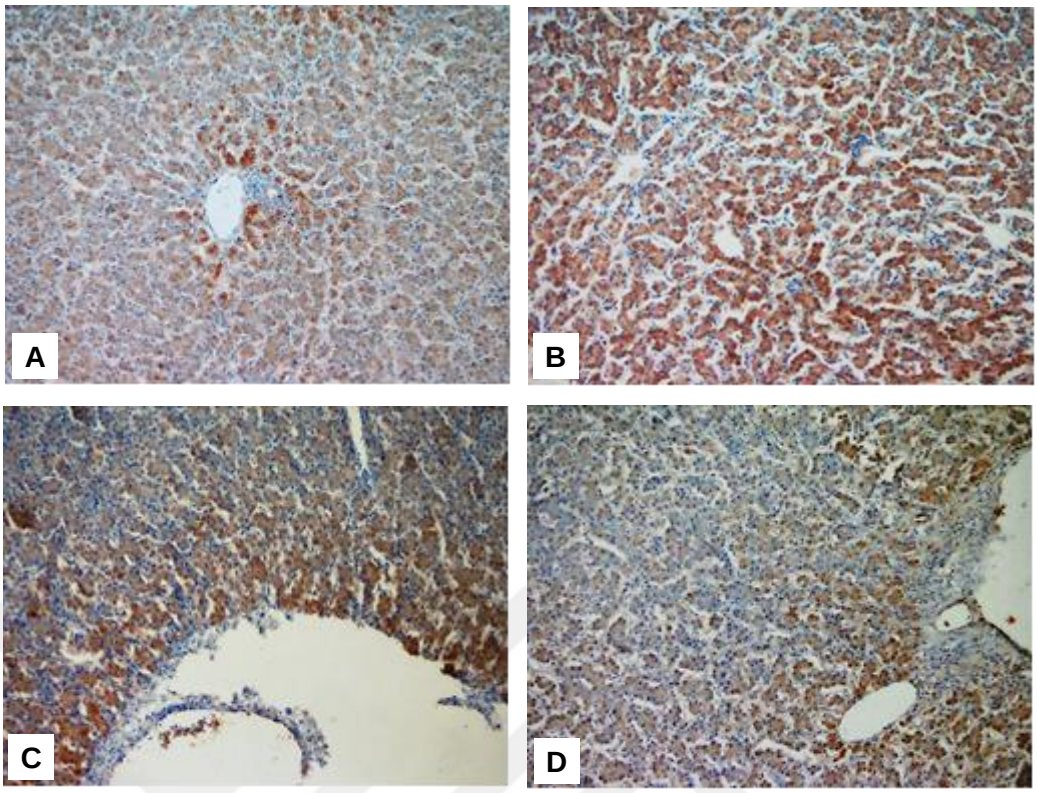
Çizelge 3.13. Karaciğerde CYP2A6 İHK boyanma skorları ve istatistiksel değerlendirmesi.

Gruplar	$(\overline{X} \pm S_{\bar{x}})$
KNT	2,20±0,25[a]
AF	6,50±0,54[c]
TQ	2,40±0,27[a]
ÇÖT	2,50±0,22[a]
AF+ TQ	3,50±0,22[b]
AF+ ÇÖT	3,60±0,22[b]
P<0,01 (One-way Anova)	

[a-c] One-way ANOVA ve sonrasında yapılan post-hoc Duncan testine göre sütundaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,01).



Şekil 3.29. CYP2A6 immunoreaktivitesi skorlarının grafiksel gösterimi ve istatistiksel değerler.



Şekil 3.30. Karaciğer dokusunda CYP2A6 immunoreaktivitesi, **A.** KNT grubu, sentrilobüler bölgedeki hepatositlerde hafif immunoreaktivite, **B.** AF grubu, hepatositlerde çok yoğun ve yaygın immunoreaktivite, **C.** AF+TQ grubu, sentrilobüler hepatositlerde orta şiddette immunoreaktivite, **D.** AF+ÇÖT grubu, yine sentrilobüler bölgede hepatositlerde orta şiddette immunoreaktivite, İHK, DAB kromojen, Mayer hematoksilen, 20X.

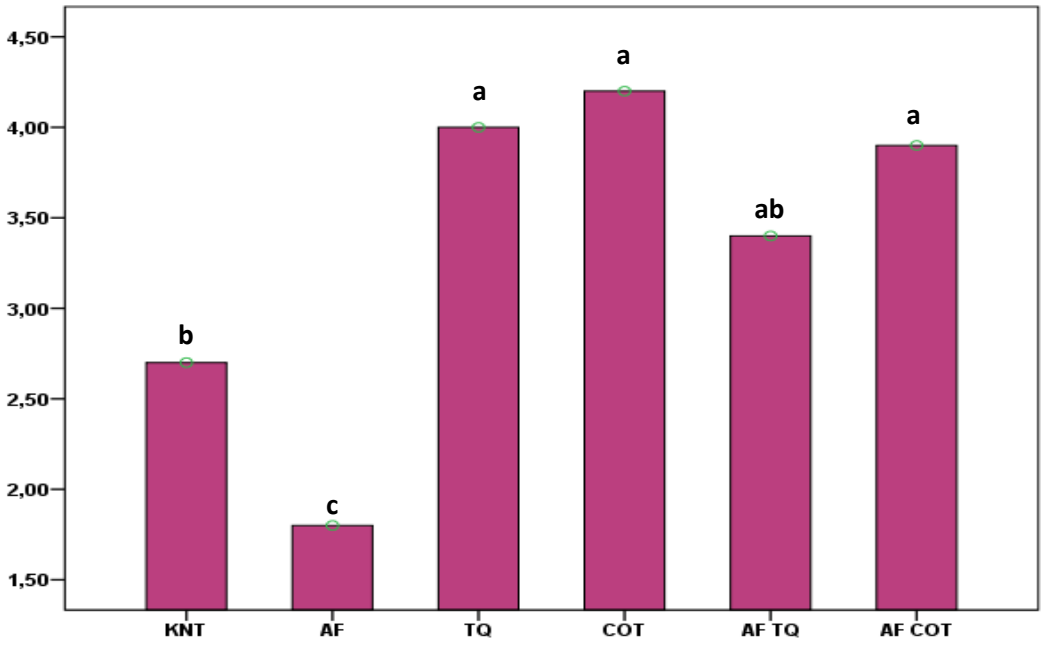
3.4.7. Glutathione (GSH) İmmunoreaktivitesi

Karaciğerde Faz II reaksiyonlarında görevli ana antioksidanlarından biri olan GSH primer antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyamaların sonuçları ve gruplar arasındaki istatistiksel farklar Çizelge 3.14 ve Şekil 3.31'de özetlendi. GSH'ın skorlanmasında Allred skor sistemi kullanıldı. Sonuçlar incelendiğinde; AF'nin GSH miktarını ciddi oranda düşürdüğü, TQ ve ÇÖT'ün önemli ölçüde yükselttiği hatta KNT grubunun da üzerine çıkardığı görüldü. AF'li yemlere ÇÖT veya TQ ilavesinin, AF'nin GSH üzerine olan olumsuz etkisini önemli oranda azalttığı saptandı ($p<0,01$). İmmunoreaktivitenin daha çok sitoplazmada bazen de çekirdekte şekillendiği görüldü (Şekil 3.31-32).

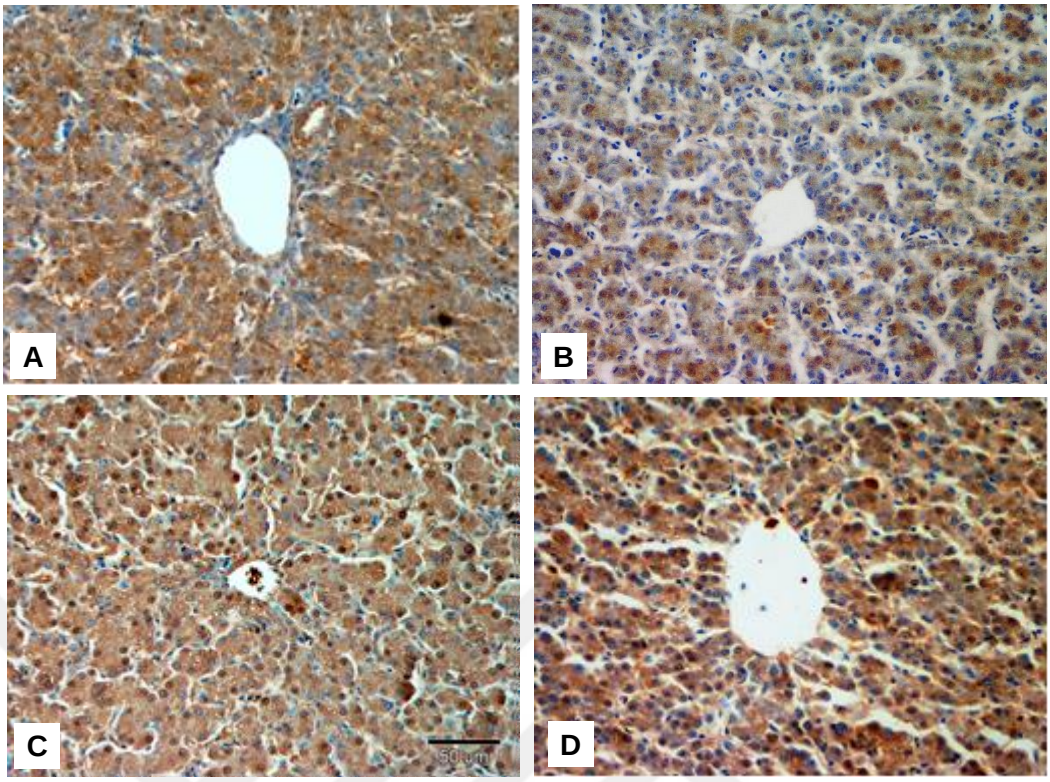
Çizelge 3.14. Karaciğerde GSH İHK boyanma skorları ve istatistiksel değerlendirmesi.

Gruplar	***İHK boyanma skorları*** $(\overline{X} \pm S_{\bar{x}})$
KNT	2,70±0,34[b]
AF	1,80±0,39[c]
TQ	4,30±0,34[a]
ÇÖT	4,50±0,22[a]
AF+TQ	3,40±0,16[ab]
AF+ÇÖT	3,90±0,28[a]
P<0,01 (One-way Anova)	

[a-c] One-way ANOVA ve sonrasında yapılan post-hoc Duncan testine göre sütundaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,01).



Şekil 3.31. GSH immunoreaktivitesi skorlarının grafiksel gösterimi ve istatistiksel değerler.



Şekil 3.32. Karaciğer dokusunda GSH immunoreaktivitesi, **A.** KNT grubu, hepatositlerde orta şiddette immunoreaktivite, **B.** AF grubu, hepatositlerde hafif immunoreaktivite, **C.** AF+TQ grubu, hepatositlerde yaygın ancak orta şiddette immunoreaktivite, **D.** AF+ÇÖT grubu, hepatositlerde yoğun şiddette ve yaygın immunoreaktivite, İHK, DAB kromojen, Mayer hematoksilen, 40X.

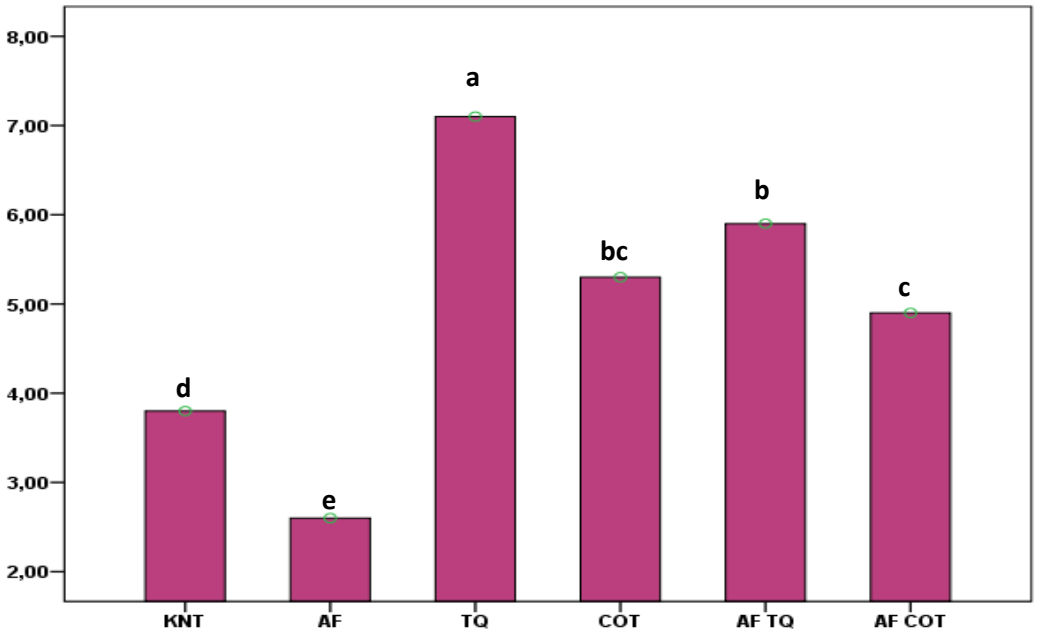
3.4.8. Glutathione S-Transferaz Alfa 3 (GSTA3) İmmunoreaktivitesi

Karaciğerde Faz II reaksiyonlarında AF'nin glutatyon ile konjugasyonunu sağlayan ve AF detoksifikasyonunda kritik rol oynayan GSTA3 için yapılan immunohistokimyasal boyamaların sonuçları ve istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 3.15'de gösterildi. GSTA3'ün skorlanmasında Allred skor sistemi kullanıldı. Sonuçlar incelendiğinde; AF'nin GSTA3 oranını KNT grubuna göre önemli derecede düşürdüğü, TQ ve ÇÖT'ün ise önemli ölçüde yükselttiği hatta KNT grubunun da üzerine çıkardığı görüldü. AF+ÇÖT ve AF+TQ gruplarında, AF'nin GSTA3 üzerine olan olumsuz etkisinin azaldığı saptandı. Ayrıca TQ verilen tüm gruplarda GSTA3'ün önemli oranda artışı dikkati çekti ($p<0,01$). GSTA3 immunoreaktivitesinin hepatositlerin çekirdek, sitoplazma ve membranlarında şekillendiği gözlendi (Şekil 3.33-34).

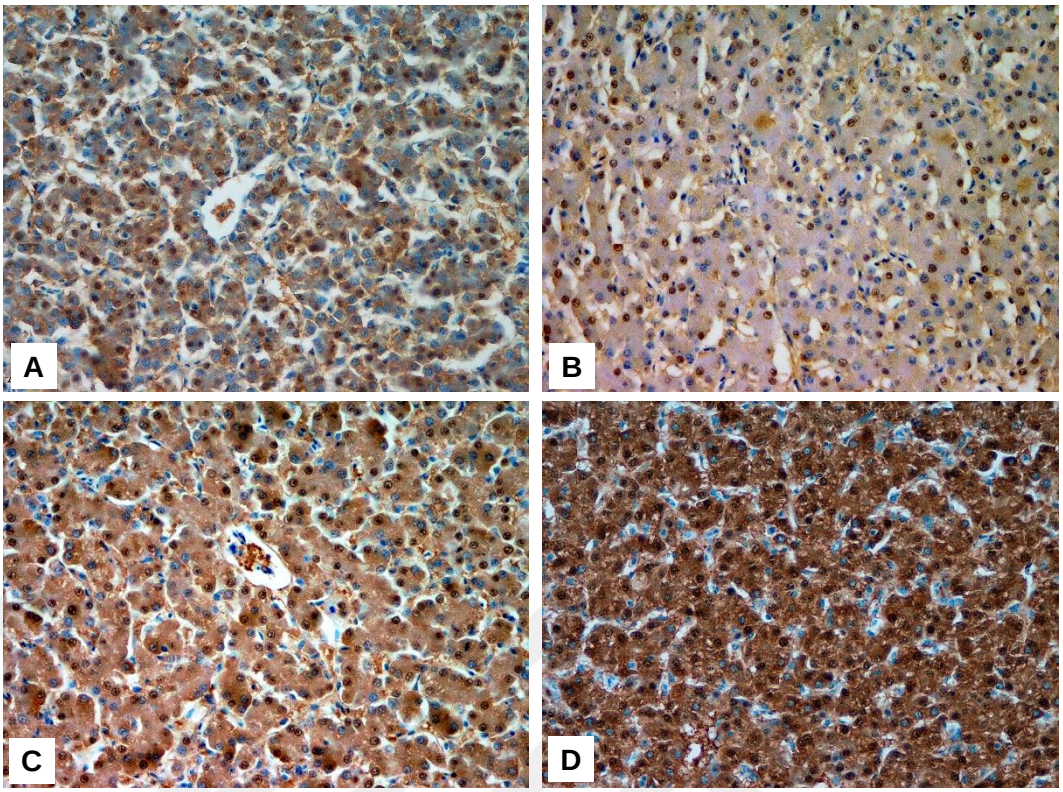
Çizelge 3.15. Karaciğerde GSTA3 İHK boyanma skorları ve istatistiksel değerlendirmesi.

Gruplar	***İHK boyanma skorları*** $(\overline{X} \pm S_{\bar{x}})$
KNT	3,80±0,25[d]
AF	2,60±0,22[e]
TQ	7,10±0,35[a]
ÇÖT	5,30±0,26[bc]
AF+TQ	5,90±0,38[b]
AF+ÇÖT	4,90±0,18[c]
P<0,01 (One-way Anova)	

[a-e] One-way ANOVA ve sonrasında yapılan post-hoc Duncan testine göre sütundaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,01).



Şekil 3.33. GSTA3 immunoreaktivitesi skorlarının grafiksel gösterimi ve istatistiksel değerler.



Şekil 3.34. Karaciğer dokusunda GSTA3 immunoreaktivitesi, **A.** KNT grubu, hepatositlerde orta şiddette immunoreaktivite, **B.** AF grubu, az sayıdaki hepatositde hafif immunoreaktivite, **C.** AF+ÇÖT grubu, hepatositlerde orta şiddette ve yaygın immunoreaktivite, **D.** AF+TQ grubu, hepatositlerde yoğun şiddette ve çok yaygın immunoreaktivite, İHK, DAB kromojen, Mayer hematoksilen, 40X.

Çizelge 3.16. İHK boyanma skorları ve istatistiksel değerlendirmelerinin özet çizelgesi.

	İHK boyanma skorları $(\overline{X} \pm S_{\bar{x}})$							
Gruplar/İHK	**AFB1-DNA**	**PXR**	**AHR**	**CAR**	**CYP1A1**	**CYP2A6**	**GSH**	**GSTA3**
KNT	0,00±0,00^{a}	2,70±0,15^{ab}	2,6±0,26^{b}	2,10±0,23^{ab}	3,40±0,16^{ab}	2,20±0,25^{a}	2,70±0,34^{b}	3,80±0,25^{d}
AF	6,60±0,48^{c}	3,80±0,13^{d}	4,4±0,16^{d}	3,50±0,34^{d}	6,90±0,28^{c}	6,50±0,54^{c}	1,80±0,39^{c}	2,60±0,22^{e}
TQ	0,00±0,00^{a}	2,20±0,13^{a}	1,6±0,16^{a}	1,80±0,20^{a}	3,00±0,30^{a}	2,40±0,27^{a}	4,30±0,34^{a}	7,10±0,35^{a}
ÇÖT	0,00±0,00^{a}	3,00±0,15^{bc}	3,2±0,13^{c}	2,70±0,15^{bc}	2,80±0,20^{a}	2,50±0,22^{a}	4,50±0,22^{a}	5,30±0,26^{bc}
AF+TQ	2,10±0,23^{b}	2,60±0,27^{ab}	3,3±0,15^{c}	2,60±0,16^{bc}	3,90±0,28^{b}	3,50±0,22^{b}	3,40±0,16^{ab}	5,90±0,38^{b}
AF+ÇÖT	2,30±0,21^{b}	3,30±0,15^{c}	3,6±0,27^{c}	2,90±0,23^{cd}	3,80±0,29^{b}	3,60±0,22^{b}	3,90±0,28^{a}	4,90±0,18^{c}
P<0,01 (One-way ANOVA)								

$^{a-e}$ One-way ANOVA ve sonrasında yapılan post-hoc Duncan testine göre sütundaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,01).

* Çizelgedeki değerler her gruptan 10 broyler pilicin Ortalama İHK skorları ± Standart Hata değerlerini $(\overline{X} \pm S_{\bar{x}})$ temsil etmektedir.

4. TARTIŞMA

Aflatoksinler *Aspergillus* cinsi mantarlar tarafından üretilen sekonder toksik metabolitler olup hayvansal yemler ve insan gıdalarında, ürün henüz tarladayken veya işleme ve depolama aşamalarında doğal olarak oluşabilmektedir. Çoğu zaman varlığı gözle fark edilmediği için insan ve hayvanlar tarafından kolayca alınabilmekte ve birçok zararlı etkisiyle önemli bir biyotoksik madde olarak tehditkar varlığını devam ettirmektedir (Bräse ve ark 2013). AF tüm dünyada çiftlik ve kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde akut-subakut ve kronik toksikasyonlara bağlı ciddi düzeyde ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Aflatoksinler (B1, B2, G1, G2, M1, M2) arasında hayvanlarda en yüksek toksisiteyi, aynı zamanda en yüksek oranda üretilen Aflatoksin B1 (AFB1) göstermektedir (Cary ve ark 2005, Rai ve Varma 2010). Aflatoksinlerin vücuda alınmasının ardından, karaciğerde başlıca Faz I ve Faz II reaksiyonları ile metabolitlerine dönüşerek eliminasyonu gerçekleştirilir. Ancak vücudun detoksifikasyon eşiğinin aşılması durumunda bu metobolitler, başta karaciğer olmak üzere pek çok dokuda dejenerasyon, yağlanma ve nekroza sebep olmasının yanı sıra hücrelerin DNA dizilimlerindeki mutasyonlarla kanserojenik etki göstermektedir (Bbosa ve ark 2013, Omar 2013). Bu çalışma ile broylerlerde AF'lerin etkisizleştirilmesinde, çörek otu tohumu (Nigella sativa L.) ile bunun etkin maddesi olarak kabul edilen ve uçucu bir yağ asidi olan Timokinon (TQ)'un etkinliği, serum biyokimyasal parametreler, patolojik bulgular (relatif organ ağırlığı, makroskobik ve histopatolojik) ve ilk kez 8 ayrı markırda olmak üzere immunohistokimyasal yöntemle moleküler düzeyde belirlenmeye çalışılmıştır.

Aflatoksin B1 biyotransformasyon süreçlerini geçirdiği karaciğerde, lipit metabolizmasını bozarak yağlanmaya, protein sentezini inhibe ederek büyüme geriliği ve çeşitli organlarda fonksiyon bozukluklarına neden olur (Tejada-Castañeda ve ark 2008, Siloto ve ark 2013). Ayrıca antioksidan enzimlerin ve antiinflamatuar sitokinlerin aktivitesini baskılar, lipit peroksidasyonunu ve proinflamatuar sitokinleri uyarır ve hepatosit apoptozisini arttırır (Yarru ve ark 2009, Ma ve ark 2012, Ma ve ark 2015, Muhammad ve ark 2018, Wang ve ark 2019). Aflatoksinin oluşturduğu hücre ve DNA hasarı için önerilen temel mekanizma reaktif oksijen türlerinin (ROT) artışına sebep olmasıdır (Yang ve ark 2000). Sonuç olarak, AFB1 ROT üretimini artırarak, hücre zarı lipitlerine hasar verir ve böylece hücre zarı akışkanlığını ve geçirgenliğini

değiştirerek oksidatif hasara yol açar (Choi ve ark 2010, Naaz ve ark 2014). Bu nedenle, AF'nin biyotrasformasyonu ve detoksifikasyonu üzerine, özellikle ROT üretimi veya ROT'a bağlı sitotoksititenin azaltılmasına yönelik pratik uygulamaya aktarılabilecek yeni deneme maddelerinin ve etki mekanizmalarının moleküler düzeyde araştırılması gerekmektedir.

Çalışmada 28 günlük deneme süresi sonunda gruplardan elde edilen serum biyokimyasal parametreler Çizelge 3.2'de özetlenmiştir. Çizelge detaylı bir şekilde incelendiğinde, AF verilen piliçlerde AST, ALT, ALP ve GGT miktarlarında, kanatlılarda yapılan diğer çalışmalara benzer şekilde (Han ve ark 2008, Diaz ve ark 2009, Yang ve ark 2012, Gomez-Espinosa ve ark 2017, Naseem ve ark 2018, Salem ve ark 2018, Fouad ve ark 2019) önemli oranda ($p<0,05$) yükselme gözlendi. Bu parametreler hepatik ve biliyer sistemin bozulmasının hassas serolojik göstergeleri olarak kabul edilmektedir (Abdel-Wahhab ve Aly 2005). Ayrıca mitokondrilerde bulunan AST ve sitoplazmada bulunan ALT'nin hücre bütünlüğünün korunması ve protein üretiminde görev aldıkları bilinmektedir (Jiang ve ark 2014, Salem ve ark 2018). Çalışmamızda, AF grubunda dejenerasyon sonucu hepatositlerin yapısal bütünlüğünün bozulması ile bu enzimlerin kanda yükseldiği düşünüldü. Aynı şekilde karaciğerde AF'nin neden olduğu hasara bağlı olarak serum kolesterol ve total protein miktarlarında literatür ile uyumlu (Bailey ve ark 2006, Ali Rajput ve ark 2017) bir şekilde önemli düşüşler ($p<0,01$) kaydedildi. Total protein miktarındaki azalma AF'nin doğrudan protein sentezini inhibe etmesiyle ve/veya oluşan metabolitlerinin DNA ve RNA'ya bağlanarak protein sentezini inhibe etmesi ile de açıklanabilir.

Aflatoksin ile kontamine diyete TQ ilavesinin (AF+TQ); AST ve ALT seviyelerinde orta derecede, ALP, GGT, kolesterol, total protein seviyelerinde ise önemli derecede düzelme sağladığı belirlendi. Aflatoksikozis kaynaklı hepatotoksisiteye karşı TQ'un koruyucu etkinliğinin ortaya konulduğu, farelerde yapılan ve çalışmamız bulguları ile örtüşen bir araştırmada ise; AST, ALT, ALP ve MDA seviyelerinin, TQ alan gruplarda anlamlı derecede düştüğü ve AF grubunun karaciğerinde gözlenen histopatolojik lezyonların TQ tarafından normale yaklaştırıldığı bildirilmiştir (Nili-Ahmadabadi ve ark 2011). Çalışmada yeme AF'nin yanı sıra ÇÖT ilavesinin (AF+ÇÖT); AST, ALT, ALP ve kolesterol seviyelerine orta derecede olumlu etkisi bulunurken, total protein seviyelerini önemli oranda normale

yaklaştırdığı gözlendi. Ratlarda aflatoksikozisin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, AF'li yemlere ÇÖT ilave edilen gruplarda karaciğer ve böbrekte histopatolojik olarak lezyonların azaldığı ve AST, ALT, üre ve kreatinin seviyelerinde olumlu düşüş kaydedildiği bildirilmiştir (Al-Ghasham ve ark 2008). Ratlar üzerine yapılan bir diğer çalışmada, AF'li diyete eklenen çörek otu yağının, AST, ALT, ALP, total protein, kolesterol ve üre seviyelerini kontrole önemli oranda yaklaştırdığı gözlenmiştir (Abdel-Wahhab ve Aly 2005). Sonuç olarak, broyler piliçlerde AF'nin karaciğer ve biliyer sistem serum biyokimyasal biyobelirteçleri üzerine olan olumsuz etkilerinin TQ ve ÇÖT tarafından başarılı bir şekilde azaltıldığı bu çalışma ile ilk kez ortaya konuldu.

Organların relatif ağırlığı, deneme hayvanlarının tek tek canlı ağırlığına oranlanarak hesaplandığı için piliçlerin bireysel olarak zayıf ya da gelişkin olmasından kaynaklanabilecek olumsuzlukları ortadan kaldırarak oldukça kullanışlı veriler ortaya koymaktadır. Yapılan araştırmalarda, AF'nin karaciğere olan toksik etkisinden dolayı artan lipit birikiminin ve hepatositlerdeki hidropik dejenerasyonun hepatomegaliye (Rajput ve ark 2017) ve relatif organ ağırlığında artışa neden olduğu bildirilmiştir (Ortatatli ve Oğuz 2001, Valchev ve ark 2013, Liu ve ark 2018, Salem ve ark 2018). Çalışmamızda, AF'nin neden olduğu relatif karaciğer ağırlığındaki artış deneme gruplarında değişen derecelerde azaltılmıştır (Çizelge 3.3). Literatür incelendiğinde, broylerlerde aflatoksikozisde TQ ve ÇÖT ile ilgili bir çalışma olmadığı ancak bazı ksenobiyotikler ile yapılan denemelerde, TQ ve ÇÖT'ün relatif karaciğer ağırlığını azalttığı bildirilmiştir (Abdel-Hamid ve ark 2013, Abdel-Wahab 2014). Buradan TQ ve ÇÖT'ün, AF'nin toksik etkisiyle bozulan lipit metabolizması ve transportunu düzelterek karaciğerin yağlanma ve dejeneratif değişiklikler nedeniyle büyümesini engellediği ve relatif karaciğer ağırlığının değerlendirmede önemli bir makroskobik ölçüt olarak kullanılabileceği yorumu yapılabilir.

Makroskobik olarak AF grubundaki tüm piliçlerin karaciğeri, değişen derecelerde büyümüş, kenarları kütleşmiş ve soluk renkli olarak gözlendi. Bunlardan 2 tanesinde hafif, 8 tanesinde ise şiddetli büyüme ve solgunluk bulguları belirlendi. Bu bulgular daha önce yapılan deneysel çalışmaların verileri ile tutarlılık göstermektedir (Giambrone ve ark 1985, Merkley ve ark 1987, Ortatatli ve Oğuz 2001, Ortatatli ve ark 2005). Benzer makroskobik bulgulara daha az sayılarda ve değişik şiddetlerde

olmak üzere diğer gruplarda da rastlanılmış olmasına karşın bu durum kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemsiz bulundu ($p>0,05$). Ortatatli ve ark (2005), karaciğerin rengi ve hepatomegalinin aflatoksikozisin iki önemli makroskobik göstergesi olduğunu bildirmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, makroskobik inceleme ile de AF kontrol grubunda aflatoksikozisin şekillendiği, diğer deneme gruplarında ise aflatoksinin verdiği hasarın önemli ölçüde azaltıldığı sonucuna ulaşılabilmektedir.

Karaciğerde, aflatoksikozisin önemli histopatolojik bulguları olarak, hepatositlerde hidropik dejenerasyon, yağlanma, asiner dizilim, özellikle portal alanlarda olmak üzere safra kanallarında artış, mononükleer hücre ve heterofil infiltrasyonu ile yer yer periportal fibrozis bildirilmiştir (Ortatatli ve Oğuz 2001, Karaman ve ark 2005, Ortatatli ve ark 2005, Karaman ve ark 2010, Chen ve ark 2014, Rajput ve ark 2017). Çalışmamızda, AF grubunda hidropik dejenerasyon ve yağlanma ile portal alanda mononükleer hücre-heterofil infiltrasyonları tüm piliçlerde, asiner dizilim ve safra kanalı proliferasyonu 9 piliçte ve periportal fibrozis ise 4 piliçte tespit edilmiştir. Aflatoksinli yemlere TQ veya ÇÖT ilavesi ile karaciğerde hasar (hidropik dejenerasyon/yağlanma, asiner dizilim, safra kanalı proliferasyonu, periportal fibrozis) gözlenen piliç sayısında önemli bir düşüş olduğu dikkati çekmiştir.

Karaciğerinde hasar tespit edilen piliç sayısı her ne kadar önemli olsa da bu lezyonların şiddetinin de değerlendirmede dikkate alınması daha mantıklı ve daha bilimsel bir yaklaşım olacaktır. Aynı sayıdaki hayvanda gözlenen hafif lezyonlarla şiddetli lezyonların etki değerinin bir olmayacağı fikrinden hareketle bu çalışmada, lezyonların şiddetine göre ve skorlarıyla bağlantılı olarak ağırlıklı ortalamaları hesaplandı ve istatistiksel değerlendirmeler bu ortalamalar üzerinden gerçekleştirildi. Böylece her bir grupta hafif, orta ve şiddetli lezyonların etkileri de değerlendirmeye katılarak, total lezyon sayılarının yanında, lezyon şiddetiyle doğru orantılı olarak artan ağırlıklı ortalama değerleri de belirlenmeye çalışıldı. Bu değerlerin gruplar arasındaki histopatolojik farklılıkları daha objektif ve daha net ortaya koyduğu gözlendi. Buna göre Çizelge 3.5 incelendiğinde, AF'nin oluşturduğu karaciğer lezyonlarının şiddetinin, TQ veya ÇÖT ilavesiyle önemli oranda azaldığı dikkati çekti. Her iki histopatolojik veri değerlendirildiğinde, AF'nin olumsuz etkilerinin TQ veya ÇÖT ilavesi ile başarılı bir şekilde giderildiği sonucu çıkarılabilir. Elde edilen bu veriler, ÇÖT'ün AFB1'in karaciğer üzerine oluşturduğu hasarı azalttığına dair ratlarda yapılan

çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Abdel-Wahhab ve Aly 2005, Çelik 2007, Al-Ghasham ve ark 2008). Çalışmamızdakine benzer şekilde broylerlerde TQ ve AF ile yapılan bir araştırmaya rastlanmamıştır, ratlar üzerinde yapılan çalışma sayısı da çok kısıtlıdır. Ratlarda yapılan bir çalışmada, AFB1 ile gerçekleştirilen karaciğer toksisitesi sonucu oluşan histopatolojik lezyonların çalışmamızdaki verilerle uyumlu şekilde, özellikle TQ'nun intraperitonel 9 mg/kg/canlı ağırlık dozunda verilmesi ile anlamlı şekilde azaldığı bildirilmiştir (Nili-Ahmadabadi ve ark 2011). Öte yandan, ÇÖT ve TQ'nun AF haricinde farklı ksenobiyotiklerle oluşturulan hasarlara yönelik hepatoprotektif etkinliğinin ortaya konulduğu birçok çalışma bulunmaktadır (Daba ve Abdel-Rahman 1998, El-Dakhakhny ve ark 2000, Meral ve ark 2001, Türkdoğan ve ark 2001, Meral ve Kanter 2003, Türkdoğan ve ark 2003) ve ortak kanı çörek otu tohumu ve yağının güçlü antioksidatif özelliğiyle toksinlerin etkisini azalttığı yönündedir.

Aflatoksin B1, hücresel sitokrom P450 enzim sistemi tarafından metabolize edilmesi sonucu oluşan reaktif ara ürünü AFBO vasıtası ile DNA gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek, serbest radikallerin salınımını artırarak ve lipit peroksidasyonuna yol açarak hücresel hasara neden olur (Stresser ve ark 1994). Bu nedenle AF kaynaklı hepatik değişiklikler, AF ve metabolitlerinin neden olduğu artan oksidatif stresin tezahürü olarak değerlendirilebilir. Antioksidan özelliklere sahip olduğu bildirilen ÇÖT ve TQ'nun (Daba ve Abdel-Rahman 1998, Nagi ve Mansour 2000, El-Mahmoudy ve ark 2002, Mahmood ve ark 2003), sunulan çalışmada serbest radikal salınımını engelleyerek oksidatif stresin azaltılması sonucu AF'nin neden olduğu histopatolojik lezyonlarda önemli bir azalma sağladığı düşünüldü.

Aflatoksinler özellikle de AFB1 karaciğerde faz I aşamasında CYP450 enzimleri tarafından genotoksik ve kanserojenik metaboliti olan AFBO'ya dönüştürülür. AFBO'nun promutajenik AFB1-N7-GUA formunun DNA'ya bağlanarak adükt oluşturması ile guaninden (G) timine (T) transversiyon mutasyonları şekillenir ve DNA mutasyonu veya apoptoz durumlarında hücre döngüsünün ilerlemesini durduran p53 geni baskılanır (Eaton ve ark 1995, Lampe ve ark 2000, Farombi ve Nwaokeafor 2005). DNA onarım süreçlerine oldukça dirençli olan bu AFB1-DNA adüktleri, normal transkripsiyon ve translasyonu engelleyerek ve gen mutasyonlarına neden olarak kansere, özellikle hepatoselüler karsinomlara neden

olabilir. Ek olarak, AFB1-DNA adükt formasyonu spesifik baz hasarı ve oksidatif DNA stresini artırarak da DNA'ya hasar verebilir (Butler ve ark 1969, Agag 2004, Feng ve ark 2017). Memelilerde AFBO'nun detoksifikasyonunun temel yolu GST enzimleri aracılığıyla glutatyon ile konjugasyonudur. AFBO'nun gerek hasar mekanizması gerekse detoksifikasyonunun kanatlılarda yeterince çalışılmadığı ancak memelilere benzer şekilde olabileceği bildirilmiştir (Monson ve ark 2015). Yapılan deneysel bir çalışmada AFB1 uygulanan zebra balıklarında henüz ilk haftadan itibaren AFB1-DNA adüktlerinin oluştuğu immunohistokimyasal olarak ortaya konulmuştur (Lu ve ark 2013). Broyler piliçler üzerinde yapılan bir çalışmada da, 28 gün aflatoksin uygulamasını takiben AF grubunda AFB1-DNA adükt seviyesinin diğer gruplara oranla önemli miktarda arttığı bildirilmiştir (Li ve ark 2019). Bu açıdan çalışmamızda, DNA adüktlerinin oluşumu için 28 gün deneme süresinin uygun olduğu değerlendirildi. Bulgular incelendiğinde de AF kontrol grubunun hepatositlerinde, AFB1-DNA adüktüne spesifik antikor kullanılarak yapılan immunohistokimyasal boyamalarda yoğun oranda immunoreaktiviteye rastlanılması (Çizelge 3.8, Şekil 3.19) bu durumu doğrulamaktadır. AFB1-DNA adüktünde, AF+TQ ve AF+ÇÖT gruplarında önemli oranda düşme belirlendi. TQ ve ÇÖT'ün adükt seviyesindeki bu azalmayı PXR, CAR ve AhR gibi nükleer reseptörleri (Çizelge 3.9-11) modüle ederek CYP450 grubu enzimlerin salınımı kontrol etmeleri ve özellikle faz II reaksiyonlarında AF metabolitlerinin bertaraf edilmesinde görevli GSH ve GSTA3 miktarlarını attırarak (Çizelge 3.14-15) sağladığı düşünüldü. Bu etkinliğinde TQ'nun ÇÖT'e oranla daha etkili olduğu belirlendi.

Nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesi olarak tanımlanan PXR, karaciğerde, ksenobiyotiklerin ve endobiyotiklerin absorpsiyonunda, dağılımında ve metabolizmasında görevli reseptörlerden biridir. Genel olarak ekzojen ve endojen kimyasallar tarafından aktif hale getirilen bir sensör olarak kabul edilen PXR, kimyasal tepkimelere katılan çok sayıda enzimi ve taşıyıcıyı düzenler (Lehmann ve ark 1998, Ma ve ark 2008). Ekzojen ve endojen bileşiklerin metabolizması, herhangi bir canlı organizmanın normal fizyolojik işleyişi için çok önemlidir. PXR'nin aktivasyonu, ligand bağlanması ile başlatılan çok aşamalı bir işlemdir. Ligandın yokluğunda, PXR hücre sitoplazmasında inaktif olarak kalır (Kawana ve ark 2003). Ligand ile bağlanmasının ardından hücre çekirdeğine translokalize olan PXR, retinoid X reseptör-α ile heterodimer bir yapı oluşturarak DNA response elemente bağlanır ve

hedef gen ekspesyonu başlar (Squires ve ark 2004). Böylece PXR, sitokrom P450 grubu enzim genlerini uyarmak suretiyle Faz I prosesini modüle eder (Drocourt ve ark 2001, Wyde ve ark 2003, Kishida ve ark 2008, Ihunnah ve ark 2011). Yapılan *in vitro* çalışmalarda, AFB1, M1 ve G1'in PXR ekspresyonunu önemli oranda arttırdığı ortaya konulmuştur (Ratajewski ve ark 2011, Ayed-Boussema ve ark 2012). Çalışmamızda, sadece AF verilen grupta, literatürle uyumlu bir şekilde PXR ekspresyonunun önemli oranda yükseldiği belirlenirken, AF+ÇÖT grubunda bu artışın engellenemediği görüldü. ÇÖT ilavesinin PXR seviyesinde istenilen düzeyde bir düzelme sağlayamamasında ise, bileşiminde bulunan diğer maddelerin reseptörler ile etkileşime girmesi ve AF'nin PXR reseptörü üzerine olan etkilerini gideremediğinden kaynaklanabileceği kanısına varıldı. Öte yandan, TQ verilen gruplarda, PXR seviyesinde önemli derecede bir düşüş kaydedilmesi, TQ'un PXR reseptörünü antagonist olarak modüle ederek nükleer translokasyonu engellemek suretiyle AF'nin olumsuz etkilerini azaltmada faydalı olabileceğini ortaya koydu.

Nükleer reseptör süper ailesinin bir diğer önemli üyesi olan CAR, sayısız hedef genin transkripsiyonunu modüle ederek, ilaç metabolizması ve enerji homeostazı düzenlenmesinde ve kanser gelişimi üzerine önemli bir rol oynar (Yang ve Wang 2014). Direkt (ligand bağımlı) ve indirekt (ligand bağımsız) olarak aktive edilebilen CAR, inaktif durumda sitoplazmada bulunur (Maglich ve ark 2003). Aktif hale geçince çekirdeğe translokalize olarak, PXR ile benzer şekilde RXRα ile heterodimer bir yapı oluşturur ve koaktivatör alınımı ile korepresör ayrışmasını sağlayan bir takım değişikliklere neden olur. Daha sonra, DNA'ya bağlanarak hedef genlerin ekspresyonunu başlatır (Timsit ve Negishi 2007, Yang ve Wang 2014). CAR, faz I ve faz II reaksiyonlarını katalize eden enzimlerle birlikte bazı ilaç taşıyıcılarını kodlayan hedef genlerin ekspresyonunu düzenler (Willson ve Kliewer 2002). Aflatoksikozisde CAR ekspresyonunun değerlendirildiği çalışmalar ise çok kısıtlıdır. Primer insan hepatosit kültüründe yapılan bir çalışmada AF'nin, CAR mRNA seviyelerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Ayed-Boussema ve ark 2012). Çalışmamızda da tek başına AF uygulamasının CAR seviyesinde ciddi bir artışa neden olduğu görüldü. TQ eklenen tüm gruplarda ise belirgin derece CAR ekspresyonunun azaldığı dikkati çekerken, diğer gruplarda önemli bir değişiklik saptanmadı (Çizelge 3.11). Bu durum, AF'nin bir CAR aktivatörü olarak değerlendirilebileceği, TQ'nun ise CAR'ın çekirdeğe translokasyonunu ve dolayısıyla aktive olmasını engelleyerek etkisini

gösterdiği şeklinde yorumlandı. Öte yandan ÇÖT'ün bünyesinde TQ dışında bulunan diğer maddelerin kısmen CAR aktivasyonuna da neden olduğu veya AF'nin CAR ile etkileşiminin önüne geçemediği düşünüldü.

Temel olarak, CYP1A subfamilyasının ekpresyonunu düzenleyen bir nükleer transkripsiyon faktörü olan aril hidrokarbon reseptörü (AhR), faz I ve II safhaları, immün cevap, hücre döngüsü ve farklılaşması, apoptoz ve karsinogenezde yer alan birkaç genin ekspresyonunda görev yapmaktadır (Matsumoto ve ark 2007, Ma ve ark 2009, Apetoh ve ark 2010, Stockinger ve ark 2011, Huang ve ark 2013). Endojen veya eksojen ligandlar ile aktive edilen AhR sitoplazmadan çekirdeğe translokalize olarak Ahr-nükleer translokatör proteini (ARNT) ile bir heterodimer oluşturur ve DNA'nın spesifik dizileriyle (xenobiotic response element-XRE) etkileşime girererek hedef genlerin (örneğin CYP450) ekspresyonunu sağlar (Mary ve ark 2015). *İn vitro* olarak yapılan bazı çalışmalarda, AF'nin artan AhR ekspresyonu ile bağlantılı olarak CYP1A aktivitesinde ve transkripsiyonunda artışa neden olduğu ifade edilmiştir (Ayed-Boussema ve ark 2012, Mary ve ark 2015). Çalışmamızda da, AF grubunda AhR seviyelerinde ciddi artışlar gözlendi. Bu nedenle AF'nin AhR reseptörüne bağlanarak nükleer translokasyonu artırarak agonist etki gösterdiği kanısına varıldı. Diğer ikili deneme gruplarında ise AhR seviyelerinde AF grubuna kıyasla anlamlı ($p<0,05$) düşüşler gözlendi. ÇÖT ve TQ'nun kısmen AF'nin reseptöre bağlanmasını engelleyerek antagonist etki göstermesi, kısmen de çekirdeğe translokalize olan AhR'nin etkinliğini azaltmak suretiyle (ARNT ve XRE etkileşimini engelleyerek) bu etkiyi gösterdiği düşünüldü. Ayrıca TQ grubunda gözlenen AhR ekspresyon seviyesinin KNT grubuna göre daha düşük olması, TQ' nun selektif bir AhR baskılayıcısı olduğu kanısını güçlendirmektedir.

Aflatoksinler, biyotransformasyon aşamasında esas olarak karaciğerde sitokrom P450 ile oksidasyon reaksiyonlarını kapsayan faz I metabolizması sonucu AFB1-ekzo-8,9-epoksit, AFB2a, AFM1, AFQ1 ve AFP1'e dönüştürülür (Zhang ve ark 1997, Dhanasekaran ve ark 2011, Omar 2013). Daha önce de değinildiği gibi AFM, AFP ve AFQ daha az toksiktir ve kanserojen potansiyelleri düşüktür. AFBO ise, guaninin N7 atomuyla tepkimeye girerek mutagenik etkili DNA adüktü (aflatoksin-N7-guanin) oluşturur (Eaton ve ark 1995, Lampe ve ark 2000). AFB1'in ara ürünlerinin bazıları, idrar ve safradan kolaylıkla atılan daha az toksik metabolitlerin

üretilmesi için faz II'de glutatyon ile konjuge edilerek metabolizmaya devam ederken bazıları ise özellikle vücudun savunma eşiğinin aşıldığı durumlarda DNA, RNA veya proteinlere bağlanarak kanserojenite, akut toksisite, karaciğer nekrozu ve hücresel enzim inhibisyonlarına neden olur (Dhanasekaran ve ark 2011). AF'lerin özellikle kanserojenik ve toksik özellikteki AFBO, AFB1-dihidroksit ve AFB2a gibi metabolitlerine biyoaktivasyonunda sorumlu CYP450 enzimlerinin rolü memelilerde iyi bir şekilde tanımlamasına karşın kanatlılarda yapılan araştırmalar çok kısıtlıdır. Bıldırcın, tavuk, ördek ve hindi hepatik mikrosomlarında AFB1'in AFBO'ya biyolojik olarak aktive edilmesinden CYP2A6 ve daha az ölçüde CYP1A1 sorumlu tutulmuştur (Diaz ve ark 2010, Diaz ve ark 2010b, Diaz ve ark 2010c). Çalışmamızda karaciğerde CYP1A1 ile yapılan immunohistokimyasal boyamaların sonuçları incelendiğinde, AF'nin CYP1A1 seviyesini önemli derecede yükselttiği saptanırken, rasyonlara AF'nin yanı sıra ÇÖT veya TQ ilavesinin bu enzimi önemli oranda normale yaklaştırdığı gözlendi. Benzer şekilde CYP2A6'nın immunoreaktivesi incelendiğinde, AF'nin bu enzim seviyelerini de önemli oranda indüklediği belirlendi. Diğer deneme gruplarında ise, CYP2A6'nın seviyesinin AF grubu ile kontrol grupları (KNT, TQ, ÇÖT) arasında olduğu gözlendi. Ayrıca hem CYP1A1 hem de CYP2A6 enzimlerinin karaciğerde daha yoğun olarak sentrilobüler bölgede eksprese edildiği dikkati çekti. Bu bulguların, AF'nin CYP1A1 (Yarru ve ark 2009, Ayed-Boussema ve ark 2012, Sun ve ark 2016, Zhang ve ark 2016) ve CYP2A6 (Sun ve ark 2016, Zhang ve ark 2016) seviyesini indüklediği diğer çalışmalar ile uyumlu olduğu görüldü. Doğrudan aflatoksikozis ile birlikte yapılan bir çalışma bulunmasa da, TQ'nun CYP450 grubu enzim üyeleri üzerine etkisinin araştırıldığı bazı çalışmalarda; TQ'nun CYP'lerin aktivitesini tümü için değil ancak bazı izoformlara spesifik olmak üzere modüle ettiği ve özellikle ilaç metabolizmasında görevli CYP1A2 ve CYP3A4'ü inhibe ettiği bildirilmiştir (Elbarbry ve ark 2012). İnsan karaciğer mikrozomlarında, CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 ve CYP3A4 gibi dört ana ilaç metabolize edici enzimin metabolik aktivitesi üzerine TQ'nun potansiyel etkisinin araştırıldığı bir çalışmada da, TQ'nun artan dozlarında, bu enzimlerin tamamında inhibisyona neden olduğu ve hem TQ hem de TQ içeren bitkilerle dar spektrumlu ilaçların etkileşime girebileceği sonucuna varılmıştır (Albassam ve ark 2018). TQ ve ÇÖT'ün, çalışmamızdakine benzer şekilde CYP1A1 ve CYP2A6 üzerine etkilerinin araştırıldığı bir veriye ulaşılamamıştır. Çalışmamızın bulgularından hareketle, TQ'nun bu enzimler üzerine inhibe edici bir

özelliği olduğu, ÇÖT'ün ise bu etkinliğini bünyesinde bulundurduğu TQ ile sağladığı düşünüldü. Ayrıca broylerlerde AF'nin diğer CYP450 enzimleri üzerine de etkilerinin olup olmadığının araştırılmasının, AF metabolizması ve detoksifikasyon sürecinin daha geniş bir perspektifle aydınlatılmasında faydalı olacağı kanaatine varıldı.

Yapılan bazı çalışmalarda, CYP450 genlerinin aşırı eksprese edilmesinin, daha fazla miktarda ROT üretimine neden olduğu ve böylelikle oksidatif stresi tetikleyerek hepatoselüler hasara ve nekroza yol açabileceği belirtilmiştir (Hari Kumar ve Kuttan 2006, Yarru ve ark 2009). TQ ve ÇÖT'ün, CYP450 enzimleri üzerine bu olumlu modülasyonunun, AF'nin karaciğerde oluşturduğu hasarın azaltılmasına katkı sağladığı düşünülmüştür. CYP1A1 subfamilyasının ekspresyonunu düzenleyen temel nükleer transkripsiyon faktörünün AhR (Matsumoto ve ark 2007, Ma ve ark 2009, Apetoh ve ark 2010, Stockinger ve ark 2011, Huang ve ark 2013, Noakes 2015, Yi ve ark 2018), kısmen de PXR ve CAR (di Masi ve ark 2009, Tolson ve Wang 2010, Wang ve ark 2012), CYP2A6'nın ise PXR ve CAR (Itoh ve ark 2006, Kojima ve ark 2007, Tolson ve Wang 2010, Raunio ve Rahnasto-Rilla 2012) olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızdaki verilerden yola çıkarak, AF'nin PXR, CAR ve AhR nükleer reseptörler seviyesinde oluşturduğu artış ile CYP1A1 ve CYP2A6'da artışa neden olduğu, TQ ve ÇÖT'ün ise bu reseptörlerin çekirdeğe translokasyonunu engelleyerek veya ligand (AF) ile aktive olarak çekirdeğe translokalize olan reseptörün hedef bölgeye bağlanmasını engelleyerek CYP450 genlerinin ekpresyonunu azaltmak suretiyle etki gösterdiği değerlendirilmiştir.

AF metabolitleri, faz I metabolizmasının ardından, faz II enzimatik metabolizmasında, glutatyon S-transferazlar tarafından glutatyon ile konjugasyona uğrar. Vücudun ana endojen antioksidanların biri olarak düşünülen ve karaciğerde en yüksek konsantrasyona ulaşan GSH, AF'nin detoksifikasyon sürecinde kritik rol oynamaktadır (Pool-Zobel ve ark 2005, Dhanasekaran ve ark 2011). GSH, antioksidan özelliğiyle membran onarımı ve stabilitesinin yanı sıra oksidatif stres faktörleri ile lipit peroksidasyonu sonucu oluşan yüksek reaktif oksijen türlerini düşürmek ve bazı ksenobiyotiklerin ve metabolik son ürünlerin konjugasyonla detoksifikasyonunu sağlamak gibi birçok işleve sahiptir (Verma 2004, Farombi ve Nwaokeafor 2005). Fakat, vücutta GSH'nin azalması, hücrelerde anormal derecede ROT artışına neden olarak, AFBO tarafından oluşturulan adükt formunun neden olduğu hasarı daha da

arttırır (Verma 2004, Gross-Steinmeyer ve Eaton 2012). Glutatyon ile konjuge edilen AF ve metabolitleri ise karaciğer ve böbreklerde ardışık metabolizmaya uğrayarak idrarla merkapturik asit (aflatoksin-N-asetilsistein) olarak atılır (Murphy ve ark 2006, Gross-Steinmeyer ve Eaton 2012). Çalışmamızdaki veriler incelendiğinde, AF'nin GSH miktarını ciddi oranda düşürdüğü dikkati çekti. Bu durumun daha önce yapılan çalışmalardaki bulgular ile uyumlu olduğu görüldü (El-Bahr 2015, Koohi Mohammad ve ark 2017, Liu ve ark 2017, Yılmaz ve ark 2017, Liu ve ark 2018, Wang ve ark 2018). Öte yandan, TQ ve ÇÖT yalnız başlarına verildiğinde KNT grubuna kıyasla GSH miktarını artırdığı, bu etkilerini AF ile birlikte verildiğinde de güçlü bir şekilde sürdürdükleri belirlendi (Çizelge 3.14). Ördekler üzerine yapılan bir çalışmada, AF'nin GSH üzerine olumsuz etkisinin ve karaciğere verdiği histopatolojik hasarın ÇÖT ilavesiyle giderildiği (Ayoub ve ark 2011), rasyonlarına ÇÖT ilave edilen kazlarda da, 2. haftadan itibaren kan total GSH miktarında artış şekillendiği (Karapehlivan ve ark 2011) gösterilmiştir. Bunların dışında ratlarda tiyoasetamid, karbon tetraklorid, gentamisin, tert-bütil hidroperoksit ve diyabetik sıçanlarda streptozotosin ile yapılan toksisite çalışmalarında ÇÖT ve TQ'nun azalan GSH seviyeleri üzerine olumlu etkiler yaptığı kaydedilmiştir (Sayed-Ahmed ve Nagi 2007, Sayed-Ahmed ve ark 2010, el-Sayed 2011, Sankaranarayanan ve Pari 2011, Nehar ve Kumari 2013). Literatür verilerden, TQ ve ÇÖT'ün pek çok ksenobiyotiğin GSH üzerine olan olumsuz etkisini azalttığı dikkati çekmektedir. Çalışmamızda da benzer şekilde, broylerlerde AF'nin neden olduğu GSH seviyesindeki azalmanın TQ ve ÇÖT tarafından düzeltildiği ortaya konulmuştur. Böylelikle TQ ve ÇÖT'ün hücresel koruyucu mekanizmada anahtar role sahip olan GSH seviyesini artırmak suretiyle oksidatif stresin neden olduğu doku yıkımını engelleyerek veya azaltarak patolojik koşulları modüle edebileceği düşünüldü. Yalnız TQ veya ÇÖT verilen gruplarda KNT grubuna kıyasla daha fazla miktarda GSH salınması ve bu etkinliklerini AF ile birlikte verildiklerinde dahi sürdürmelerinin güçlü antioksidan kapasitelerinden kaynaklanabileceği üzerinde duruldu.

Aflatoksin metabolitlerinin faz II enzimatik reaksiyonlarında GSH ile konjugasyonu GST'ler tarafından katalize edilir. Bu şekilde detoksifikasyon birçok hayvan türünde AF'nin atılımının temel yoludur. Yetişkin farelerin AFB1'e direncinin, karaciğerde AFB1'e karşı yüksek katalitik aktivite sergileyen GST'nin alt birimi A3'ün (GSTA3) varlığına bağlı olduğu bildirilmiştir (Buetler ve Eaton 1992, Hayes ve ark

1992, Ilic ve ark 2010). Öte yandan Kim ve ark (2010) AFB1'e en duyarlı kanatlı türlerinden birinin hindiler olduğunu ve bu durumun, yüksek reaktif ve elektrofilik metabolit olan AFBO'yu detokslayamayan hepatik GST'lerle ilişkili olduğunu kaydetmişlerdir. Ayrıca ördeklerde (Karn 2013), tavuklarda (Yarru ve ark 2009), ratlarda (Gao ve ark 2012) ve broylerlerde yapılan (Muhammad ve ark 2018) çalışmalarda, AF'nin doğrudan GST enzim aktivitesini azaltıcı etkisi olduğu ve çeşitli antioksidanlarla bunun hafifletildiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, AF detoksifikasyon aktivitesi "altın standart" olarak kabul edilen GSTA3 (Kim ve ark 2013) ile ÇÖT veya TQ'nun broylerlerde birlikte araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışma ile yine broyler piliçlerde ilk kez olmak üzere AF'nin karaciğerde GSTA3 aktivitesini negatif yönde etkilediği, AF'li yemlere ÇÖT veya TQ ilave edildiğinde GSTA3'ün seviyelerinin artmakla kalmayıp KNT grubunun dahi üstüne çıktığı belirlendi. Bu etkinlikte TQ'nun ÇÖT'e kıyasla daha iyi olduğu gözlendi. TQ ve ÇÖT'ün GSTA3'ü uyarması ile AF metabolitlerinin, bilhassa AFBO'nun vücuttan uzaklaştırılmasına ve karaciğerdeki AFB1-DNA adükt miktarının (Çizelge 3.8) azaltılmasına önemli katkı sağladığı belirlendi. GST aktivitesi uyarımının, tümörlerin insidansının azalması ile de ilişkili olduğu belirtilmiştir (Baez ve ark 1997). Ayrıca, GST izozimlerinin kimyasal karsinogeneze karşı duyarlılığı azaltabileceği bildirilmiştir (Henderson ve ark 1998). Bu nedenle TQ ve ÇÖT'ün, artan GST'ler aracılığıyla kanserojenik etkili AFBO başta olmak üzere AF metabolitlerinin detoksifikasyonunu sağlayarak hem hepatoprotektif hem de antikarsinojen etki gösterdiği kanısına varılmıştır.

Normal yeme yalnız TQ veya ÇÖT ilavesinin incelenen parametreler açısından KNT grubuna göre farklı olmadığı hatta GSH ve GSTA3 parametrelerine olumlu katkı sağladığı ve TQ ve ÇÖT'ün kullanılan dozlarında vücutta toksik etki oluşturmadığı gözlendi.

Çalışmamızdaki bulgular genel olarak değerlendirildiğinde; AF'nin bir taraftan PXR, AhR ve CAR gibi nükleer reseptörleri etkileyerek kendi metabolizmasını arttırdığı, öte taraftan glutatyon ve GSTA3 miktarlarını azaltarak hepatotoksik etkisini daha da güçlendirdiği düşünüldü. AF'li rasyonlara ÇÖT veya TQ ilavesinin glutatyon ve GSTA3 enzim seviyelerini arttırdığı ve böylelikle AF metabolizması sonucu üretimi artan ROT türevlerinin yanı sıra AFBO metabolitinin detoksifikasyonu gerçekleştirilerek hepatoprotektif etki gösterdikleri belirlendi. Bunların dışında TQ ve

ÇÖT, PXR, CAR ve AhR reseptörlerini inhibe ederek AF'nin metabolizmasını azaltmaktadır. Bu durum hem oksidatif stresin hem de toksik metabolitlerin oluşumunun azalmasına katkı sağlamaktadır. Yani, ÇÖT ve TQ bir yandan hücresel antioksidan savunma sistemini desteklemekte öte yandan PXR, CAR, AhR gibi nükleer reseptörleri ve dolayısıyla enzimatik faaliyetleri etkileyerek AF'nin toksik sonuçlar doğuran biyotransformasyonunu azaltmaktadır. Bu yorum, karaciğerde histopatolojik hasarın ve AFB1-DNA adükt miktarının azalması ve serum biyokimyasal parametrelerin düzelmiş olmasıyla da desteklenmiş gözükmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Aflatoksinlerin broyler piliçlerdeki çeşitli biyokimyasal parametreler, patolojik bulgular ve moleküler düzeyde yapılan immunohistokimyasal sonuçlar üzerine etkileri, detoksifikasyonu ve karaciğerdeki biyotransfer mekanizmaları ile tüm bu sonuçlara ve mekanizmalara etki edebilecek iki ayrı madde (TQ ve ÇÖT) ilk kez bu geniş çaplı çalışmada birlikte değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır.

Çalışmada, hepatik ve biliyer sistemin bozulmasının hassas serolojik göstergeleri olarak kabul edilen ve AF tarafından oluşturulan dejenerasyon sonucu hepatositlerin yapısal bütünlüğünün bozulması ile kanda seviyeleri yükselen enzimlerin (AST, ALP, ALP, GGT), rasyona eş zamanlı olarak ilave edilen TQ veya ÇÖT tarafından anlamlı bir şekilde düşürüldüğü ortaya konuldu. Aynı şekilde karaciğerde AF'nin neden olduğu hasara bağlı olarak kolesterol ve total protein miktarlarındaki düşüşler, ÇÖT ve TQ tarafından normale döndürüldü.

AF'nin karaciğere olan toksik etkisinden dolayı artan lipit birikimi ve hepatosit dejenerasyonlarının sebep olduğu hepatomegali, relatif organ ağırlığı artışı ve renginde meydana gelen solgunluğun, TQ ve ÇÖT tarafından azaltıldığı, broylerlerde ilk defa ortaya konuldu. Aynı şekilde, histopatolojik olarak AF'nin neden olduğu hidropik dejenerasyon, yağlanma, asiner dizilim, özellikle portal alanlarda olmak üzere safra kanallarında artış, mononükleer hücre ve heterofil infiltrasyonu ile yer yer periportal fibrozis bulgularının, TQ ve ÇÖT tarafından anlamlı bir şekilde hafifletildiği belirlendi. Karaciğerin relatif organ ağırlığı, makroskobik ve mikroskobik yapısı ile serum biyokimyasal parametrelerin ışığında, TQ ve ÇÖT'ün, karaciğer lipit metabolizması ve transportunu düzelttiği ayrıca antioksidan etkinlikleri sayesinde serbest radikal salınımını engelleyerek oksidatif stresin azaltılması sonucu histopatolojik lezyonlarda önemli bir azalma sağlayarak hepatoprotektif etki gösterdikleri sonucuna varıldı.

Aflatoksinlerin karaciğerde faz I metabolizmasından sorumlu CYP450 grubu enzimlerinden olan ve çalışmamızda incelenen CYP1A1'in ekspresyonunu düzenleyen temel nükleer reseptörün AhR, kısmen de PXR ile CAR, CYP2A6'nın ekspresyonunda görevli nükleer reseptörlerin ise PXR ve CAR olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda, AF'nin AhR, PXR, CAR nükleer reseptörlerinin miktarını önemli

oranda attırdığı ortaya konuldu. Bu durumun yansıması olarak, CYP1A1 ve CYP2A6'nın ekspresyonlarında da ciddi artışlar gözlendi. Yani, AF nükleer reseptörler ile agonist bir etkileşime girip, CYP450 grubu enzimlerin aktivasyonunda artışa neden olarak kendi metabolizmasını attırmaktadır. Ancak bu durum organizma için daha zararlı ikincil AF metabolitlerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. AF'li rasyonlara eş zamanlı olarak verilen TQ'nun, başta PXR olmak üzere CAR ve AhR nükleer reseptörlerindeki artışı engellediği yani bu reseptörlere antagonist etkili olduğu ortaya konuldu. Bu sonuç, yalnız TQ verilen piliçlerde KNT grubundan daha az miktarda nükleer reseptör immunoreaktivitesi görülmüş olması ile de desteklenmektedir. ÇÖT'ün ise, AF verilen gruplarda PXR ve AhR üzerinde azaltıcı etkisi olduğu belirlendi. Nükleer reseptörlerdeki bu değişimlerin tezahürü olarak CYP1A1 ve CYP2A6 enzimlerinde AF tarafından oluşturulan artışların, ÇÖT ve TQ tarafından normale yaklaştırıldığı saptandı. Bu veriler bir araya getirildiğinde, TQ'nun, AF'nin detoksifasyonunda önemli aşamalardan biri olan faz I metabolizmasını ciddi oranda azalttığı ve böylelikle başta AFBO olmak üzere zararlı metabolitlerin toksik düzeyde oluşumunu engelleyebileceği sonucuna varıldı. AF'nin broylerlerde nükleer reseptörler PXR, CAR ve AhR üzerine olan etkileri ve bunların deneme maddeleri (TQ ve ÇÖT) ile olan etkileşimleri de bu çalışma ile ilk defa değerlendirilmiştir.

Faz II detoksifikasyonunda görev alan ve AFB1'in ara metabolitlerini, idrar ve safra yoluyla kolaylıkla atılabilen polar bir madde haline getiren hücre içerisindeki glutatyonun, AF tarafından azaltıldığı/tüketildiği belirlendi. TQ ve ÇÖT'ün hem yalnız başına verildiklerinde hem de AF ile birlikte verildiğinde, hepatositlerdeki glutatyonu ciddi anlamda yükselttiği gözlendi.

Karaciğerde, AFB1'i glutatyon ile konjuge ederek yüksek katalitik aktivite sergileyen ve detoksifikasyon sürecindeki aktivitesi "altın standart" olarak kabul edilen GSTA3'ün, broyler piliçlerde AF uygulaması ile önemli oranda azaldığı tespit edildi. Aflatoksikozisde, GSTA3'ün miktarının ÇÖT veya TQ ile düzeltildiği hatta KNT grubu seviyesinin üzerine çıkarıldığı ilk defa ortaya konuldu. Özellikle TQ'nun çok güçlü bir GSTA3 uyarıcısı olduğu belirlendi.

Aflatoksinlerin, özellikle de AFB1'in karaciğerde faz I aşamasında ortaya çıkan kanserojenik metaboliti olan AFBO'nun neden olduğu DNA adüktlerinin, yalnız

AF verilen grupta ciddi oranda arttığı tespit edildi. Ayrıca, AFB1-DNA adüktü oluşması için 28 günlük deneme süresinin uygun olduğu belirlendi. Çalışmada, AF ile birlikte verilen TQ veya ÇÖT'ün hepatositlerde AFB1-DNA adüktlerini önemli oranda azalttığı ortaya konuldu.

Sonuç olarak, TQ, AF'nin etkisizleştirilmesi/detoksifikasyonu sürecinde ÇÖT'e göre daha başarılı bulundu. Bu etkinliğini, bir taraftan PXR, CAR ve AhR reseptörlerini modüle ederek CYP450 grubu enzimlerin salınımı kontrol etmeleri, diğer taraftan hücresel antioksidan savunma sistemini desteklemesi ile sağladığı düşünüldü. Böylelikle hem AF'nin metabolizmasını inhibe ederek, oksidatif stres ve toksik metabolit oluşumunu azaltmakta hem de glutatyon ve GSTA3 gibi enzimleri stimüle ederek, metabolitlerin oluşturabileceği oksidatif hasar ve toksik birikimlerin önüne geçmektedir. Ayrıca, TQ'nun bu etkinliği serum biyokimyasal parametreler ve patolojik bulguların düzelmesinin yanı sıra AFB1-DNA adüktünün azalması ile de ispatlanmaktadır.

ÇÖT'ün ise CAR nükleer reseptörü üzerine olan etkisinin daha kısıtlı olduğu, glutatyon ve GSTA3 aktivasyonunu, antioksidan özelliğinin yanı sıra yapısında bulundurduğu TQ ile sağlamış olabileceği düşünüldü. Bununla birlikte ÇÖT bileşiminde TQ haricinde de birçok aktif madde bulunduğu için bu çalışmada saf TQ ile ÇÖT birlikte kullanılarak kıyaslamaları yapılmış ve ÇÖT'ün olası bütüncül etkinliği de araştırılmıştır. Ancak çalışmada yeme katılan ÇÖT miktarının (%5) TQ içeriğinin, saf TQ verilen gruplarla (300 mg/kg) yaklaşık eşdeğer olmasına çalışılmasına rağmen kullanılan ÇÖT'ün TQ içeriği ölçülemediği ve tam olarak doğrulanamadığı için, yemlerdeki TQ miktarları az çok farklılık göstermiş ve bu durum da yeme katılan ÇÖT oranın yetersiz kalmasına neden olmuş olabilir. Bu konuda farklı ÇÖT miktarlarıyla ve bileşimi tam olarak belirlenerek derinlemesine yapılacak yeni çalışmaların, ÇÖT'ün etkinliği ve mekanizmasının aydınlatılmasına ışık tutabileceği ön görüldü.

Bu çalışmada AF ile eş zamanlı verilen ÇÖT ve TQ'un, AF'nin etkileri ve çeşitli mekanizmaları üzerine engelleyici veya koruyu etkinliği araştırılmıştır. Bunun dışında deneysel olarak önce aflatoksikozis oluşturulduktan sonra, AF'nin başta karaciğer, böbrek ve immun sistem organlarına verdiği hasarın yanı sıra artan PXR, CAR ve AhR nükleer reseptörleri ile azalan antioksidan sistem elemanlarının TQ veya

ÇÖT ile iyileştirilip iyileştirilemediğinin farklı doz ve sürelerle araştırılması önerilmektedir. Ayrıca, sunulan çalışmada 28 günde oluşan ve onarıma oldukça dirençli olan AFB1-DNA adüktlerinin, TQ veya ÇÖT ile tedavi durumunun belirlenmesi için de ilave çalışmaların yapılmasının yararlı olacağı değerlendirilmiştir.

6. KAYNAKLAR

Abdel-Hamid NM, Abdel-Ghany MI, Nazmy MH, Amgad SW, 2013. Can methanolic extract of Nigella sativa seed affect glyco-regulatory enzymes in experimental hepatocellular carcinoma? Environmental Health and Preventive Medicine, 18, 1, 49-56.

Abdel-Wahab WM, 2014. Thymoquinone attenuates toxicity and oxidative stress induced by bisphenol A in liver of male rats. Pakistan journal of biological sciences : PJBS, 17, 11, 1152-60.

Abdel-Wahhab M, Aly S, 2005. Antioxidant property of Nigella sativa (black cumin) and Syzygium aromaticum (clove) in rats during aflatoxicosis. Journal of Applied Toxicology, 25, 3, 218-23.

Adedara IA, Owumi SE, Uwaifo AO, Farombi EO, 2010. Aflatoxin B(1) and ethanol co-exposure induces hepatic oxidative damage in mice. Toxicol Ind Health, 26, 10, 717-24.

Agag B, 2004. Mycotoxins in foods and feeds: 1-aflatoxins. Ass. Univ. Bull. Environ. Res, 7, 1, 173-205.

Aguilar F, Hussain SP, Cerutti P, 1993. Aflatoxin B1 induces the transversion of G--> T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 90, 18, 8586-90.

Al-Dakan AA, Al-Tuffail M, Hannan MA, 1995. Cassia senna inhibits mutagenic activities of benzo[a]-pyrene, aflatoxin B1, shamma and methyl methanesulfonate. Pharmacol Toxicol, 77, 4, 288-92.

Al-Ghasham A, Ata HS, El-Deep S, Meki A-R, Shehada S, 2008. Study of protective effect of date and Nigella sativa on aflatoxin B1 toxicity. International journal of health sciences, 2, 2, 26.

Albassam AA, Ahad A, Alsultan A, Al-Jenoobi FI, 2018. Inhibition of cytochrome P450 enzymes by thymoquinone in human liver microsomes. Saudi Pharmaceutical Journal, 26, 5, 673-7.

Ali BH, Blunden G, 2003. Pharmacological and toxicological properties of Nigella sativa. Phytother Res, 17, 4, 299-305.

Ali Rajput S, Sun L, Zhang N, Mohamed Khalil M, Gao X, Ling Z, Zhu L, Khan F, Zhang J, Qi D, 2017. Ameliorative Effects of Grape Seed Proanthocyanidin Extract on Growth Performance, Immune Function, Antioxidant Capacity, Biochemical Constituents, Liver Histopathology and Aflatoxin Residues in Broilers Exposed to Aflatoxin B1. Toxins, 9, 11, 371.

Ali Rajput S, Sun L, Zhang N, Mohamed Khalil M, Gao X, Ling Z, Zhu L, Khan FA, Zhang J, Qi D, 2017. Ameliorative Effects of Grape Seed Proanthocyanidin Extract on Growth Performance, Immune Function, Antioxidant Capacity, Biochemical Constituents, Liver Histopathology and Aflatoxin Residues in Broilers Exposed to Aflatoxin B(1). Toxins (Basel), 9, 11.

Alimohamadi K, Taherpour K, Ghasemi HA, Fatahnia F, 2014. Comparative effects of using black seed (Nigella sativa), cumin seed (Cuminum cyminum), probiotic or prebiotic on growth performance, blood haematology and serum biochemistry of broiler chicks. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 98, 3, 538-46.

Alpsoy L, Agar G, Ikbal M, 2009. Protective role of vitamins A, C, and E against the genotoxic damage induced by aflatoxin B1 in cultured human lymphocytes. Toxicology and industrial health, 25, 3, 183-8.

Alpsoy L, Yalvac ME, 2010. Key roles of vitamins A, C, and E in aflatoxin B1-induced oxidative stress. Vitamins and hormones, 86, 287-305.

Amstad P, Levy A, Emerit I, Cerutti P, 1984. Evidence for membrane-mediated chromosomal damage by aflatoxin B1 in human lymphocytes. Carcinogenesis, 5, 6, 719-23.

Apetoh L, Quintana FJ, Pot C, Joller N, Xiao S, Kumar D, Burns EJ, Sherr DH, Weiner HL, Kuchroo VK, 2010. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. Nature Immunology, 11, 854.

Ayed-Boussema I, Pascussi J-M, Maurel P, Bacha H, Hassen W, 2012. Effect of aflatoxin B1 on nuclear receptors PXR, CAR, and AhR and their target cytochromes P450 mRNA expression in primary cultures of human hepatocytes. International journal of toxicology, 31, 1, 86-93.

Ayoub M, El-Far A, Taha N, Korshom M, Mandour A, Abdel-Hamid H, El-Neweshy M, 2011. The biochemical protective role of some herbs against aflatoxicosis in ducklings: II. Nigella sativa. Lucrări Științifice-Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Seria Zootehnie, 55, 68-77.

Baez S, Segura-Aguilar J, Widersten M, Johansson AS, Mannervik B, 1997. Glutathione transferases catalyse the detoxication of oxidized metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes. The Biochemical journal, 324 (Pt 1), 25-8.

Bailey CA, Latimer GW, Barr AC, Wigle WL, Haq AU, Balthrop JE, Kubena LF, 2006. Efficacy of Montmorillonite Clay (NovaSil PLUS) for Protecting Full-Term Broilers from Aflatoxicosis. The Journal of Applied Poultry Research, 15, 2, 198-206.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M, 2008. Biological effects of essential oils–a review. Food and chemical toxicology, 46, 2, 446-75.

Balunas MJ, Kinghorn AD, 2005. Drug discovery from medicinal plants. Life Sci, 78, 5, 431-41.

Barraud L, Douki T, Guerret S, Chevallier M, Jamard C, Trepo C, Wild CP, Cadet J, Cova L, 2000. The role of duck hepatitis B virus and aflatoxin B1 in the induction of oxidative stress in the liver. Cancer detection and prevention, 25, 2, 192-201.

Basarslan F, Yilmaz N, Ates S, Ozgur T, Tutanc M, Motor V, Arica V, Yilmaz C, Inci M, Buyukbas S, 2012. Protective effects of thymoquinone on vancomycin-induced nephrotoxicity in rats. Human & Experimental Toxicology, 31, 7, 726-33.

Basmacıoğlu H, Ergül M, 2003. Yemlerde bulunan toksinler ve kontrol yolları. Hayvansal Üretim, 44, 1, 9-17.

Bbosa GS, Kitya D, Odda J, Ogwal-Okeng J, 2013. Aflatoxins metabolism, effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis. Health, 2013.

Bedi P, Agarwal R, 2014. Detoxification of aflatoxin b1 by physical and chemical methods.

Beers K, Nejad H, Bottje W, 1992b. Aflatoxin and glutathione in domestic fowl (Gallus domesticus)—I. Glutathione elevation and attenuation by high dietary methionine. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 101, 2, 239-44.

Beers KW, Glahn RP, Bottje WG, Huff WE, 1992a. Aflatoxin and glutathione in domestic fowl (Gallus domesticus)--II. Effects on hepatic blood flow. Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology, 101, 3, 463-7.

Beski SSM, Swick RA, Iji PA, 2015. Specialized protein products in broiler chicken nutrition: A review. Anim Nutr, 1, 2, 47-53.

Betina V, 1989. Mycotoxins. Chemical, biological and environmental aspects, Elsevier, p.

Bhat NK, Emeh JK, Niranjan BG, Avadhani NG, 1982. Inhibition of mitochondrial protein synthesis during early stages of aflatoxin B1-induced hepatocarcinogenesis. Cancer Res, 42, 5, 1876-80.

Bräse S, Gläser F, Kramer C, Lindner S, Linsenmeier AM, Masters K-S, Meister AC, Ruff BM, Zhong S, 2013. The chemistry of mycotoxins, Springer Science & Business Media, p. 3-21.

Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M, 1991. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. Nature, 350, 6317, 429-31.

Bressac B, Puisieux A, Kew M, Volkmann M, Bozcall S, Mura JB, de la Monte S, Carlson R, Blum H, Wands J, 1991. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. The Lancet, 338, 8779, 1356-9.

Buetler TM, Eaton DL, 1992. Complementary DNA cloning, messenger RNA expression, and induction of α-class glutathione S-transferases in mouse tissues. Cancer research, 52, 2, 314-8.

Bullerman L, 1979. Significance of mycotoxins to food safety and human health. Journal of Food Protection®, 42, 1, 65-86.

Burits M, Bucar F, 2000. Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. Phytother Res, 14, 5, 323-8.

Butler W, Greenblatt M, Lijinsky W, 1969. Carcinogenesis in rats by aflatoxins B1, G1, and B2. Cancer research, 29, 12, 2206-11.

Cabassi E, Di Lecce R, De Angelis E, Fusari A, Perillo A, Borghetti P, 2004. Aflatoxicosis and vitamins A and E supplementation in sows: Immunological state of their piglets. Veterinary research communications, 28, 275-7.

Cary JW, Klich MA, Beltz SB, 2005. Characterization of aflatoxin-producing fungi outside of Aspergillus section Flavi. Mycologia, 97, 2, 425-32.

Cassand P, Decoudu S, Lévêque F, Daubèze M, Narbonne JF, 1993. Effect of vitamin E dietary intake on in vitro activation of aflatoxin B1. Mutation Research/Genetic Toxicology, 319, 4, 309-16.

Cast, 1989. Mycotoxins: Economic and Health Risks. 116, Ames, Iowa, USA, Council for Agricultural Science and Technology, p. 1-91.

Cast, 2003. Mycotoxins: Risk in Plant, Animal and Human Systems, Ames, Iowa, USA, Council for Agricultural Science and Technology, p. 1-2.

Cavin C, Holzhäuser D, Constable A, Huggett AC, Schilter B, 1998. The coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol protect against aflatoxin B1-induced genotoxicity through a dual mechanism. Carcinogenesis, 19, 8, 1369-75.

Cavin C, Mace K, Offord E, Schilter B, 2001. Protective effects of coffee diterpenes against aflatoxin B 1-induced genotoxicity: mechanisms in rat and human cells. Food and Chemical toxicology, 39, 6, 549-56.

Chandra J, Samali A, Orrenius S, 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine, 29, 3, 323-33.

Chen K, Fang J, Peng X, Cui H, Chen J, Wang F, Chen Z, Zuo Z, Deng J, Lai W, Zhou Y, 2014. Effect of selenium supplementation on aflatoxin B(1)-induced histopathological lesions and apoptosis in bursa of Fabricius in broilers. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 74, 91-7.

Choi JS, Lee HJ, Park K-Y, Ha J-O, Kang SS, 1997. In vitro antimutagenic effects of anthraquinone aglycones and naphthopyrone glycosides from Cassia tora. Planta medica, 63, 01, 11-4.

Choi K-C, Chung W-T, Kwon J-K, Yu J-Y, Jang Y-S, Park S-M, Lee S-Y, Lee J-C, 2010. Inhibitory effects of quercetin on aflatoxin B 1-induced hepatic damage in mice. Food and Chemical Toxicology, 48, 10, 2747-53.

Choi K-C, Lee B-S, Chung W-T, Choi M-S, Lee J-C, 2010. Protective effects of apigenin and quercetin on aflatoxin B1-induced immunotoxicity in mice. Food Science and Biotechnology, 19, 4, 987-92.

Choudhury KR, Yagle KJ, Swanson PE, Krohn KA, Rajendran JG, 2010. A robust automated measure of average antibody staining in immunohistochemistry images. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society, 58, 2, 95-107.

Code EL, Crespi CL, Penman BW, Gonzalez FJ, Chang TK, Waxman DJ, 1997. Human cytochrome P4502B6. Drug Metabolism and Disposition, 25, 8, 985-93.

Coppock RW, Christian RG, Jacobsen BJ, 2018. Chapter 69 - Aflatoxins. In: Veterinary Toxicology (Third Edition). Eds: Gupta RC: Academic Press, p. 983-94.

Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, Palmas F, 1999. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. Letters in applied microbiology, 29, 2, 130-5.

Cutteridhe J, 1993. Free radicals in disease processes: a compilation of causes and consequences. Free Rad. Res. Commun, 19, 141-50.

Çelik A, 2007. Ratlarda deneysel olarak oluşturulan aflatoksikozisde çörek otu (nigella sativa)'nun karaciğer lezyonlarını engelleyici etkisinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniverstesi, Van.

Daba MH, Abdel-Rahman MS, 1998. Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. Toxicology Letters, 95, 1, 23-9.

Dawson KA, Evans J, Kudupoje M, 2001. Understanding the adsorption characteristics of yeast cell wall preparations associated with mycotoxin binding. Science and technology in the feed industry. Nottingham University Press, Nottingham, UK, 169-81.

Deng J, Zhao L, Zhang NY, Karrow NA, Krumm CS, Qi DS, Sun LH, 2018. Aflatoxin B1 metabolism: Regulation by phase I and II metabolizing enzymes and chemoprotective agents. Mutation research, 778, 79-89.

Dhanasekaran D, Panneerselvam A, Thajuddin N, Shanmugapriya S, 2011. Aflatoxins and aflatoxicosis in human and animals, INTECH Open Access Publisher, p.

di Masi A, De Marinis E, Ascenzi P, Marino M, 2009. Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. Molecular aspects of medicine, 30, 5, 297-343.

Diaz G, Murcia H, Cepeda S, 2010. Cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of aflatoxin B1 in chickens and quail. Poultry science, 89, 11, 2461-9.

Diaz GJ, Cortes A, Botero L, 2009. Evaluation of the ability of a feed additive to ameliorate the adverse effects of aflatoxins in turkey poults. Br Poult Sci, 50, 2, 240-50.

Diaz GJ, Murcia HW, Cepeda SM, 2010c. Bioactivation of aflatoxin B1 by turkey liver microsomes: responsible cytochrome P450 enzymes. Br Poult Sci, 51, 6, 828-37.

Diaz GJ, Murcia HW, Cepeda SM, Boermans HJ, 2010b. The role of selected cytochrome P450 enzymes on the bioactivation of aflatoxin B1 by duck liver microsomes. Avian pathology : journal of the W.V.P.A, 39, 4, 279-85.

Dong Y, Wang Z, Xie GF, Li C, Zuo WW, Meng G, Xu CP, Li JJ, 2017. Pregnane X receptor is associated with unfavorable survival and induces chemotherapeutic resistance by transcriptional activating multidrug resistance-related protein 3 in colorectal cancer. Molecular cancer, 16, 1, 71.

Drocourt L, Pascussi JM, Assenat E, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ, 2001. Calcium channel modulators of the dihydropyridine family are human pregnane X receptor activators and inducers of CYP3A, CYP2B, and CYP2C in human hepatocytes. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 29, 10, 1325-31.

Duan X-X, Ou J-S, Li Y, Su J-J, Ou C, Yang C, Yue H-F, Ban K-C, 2005. Dynamic expression of apoptosis-related genes during development of laboratory hepatocellular carcinoma and its relation to apoptosis. World journal of gastroenterology, 11, 30, 4740-4.

Düzel A, 2016. Piyasada hazır halde satılan pul biberdeki aflatoksin B1 miktarının amonyak ile azaltılması/Reduction aflatoxin B1 amounts of red pepper flakes which sold on the market by ammonia.

Eaton DL, Gallagher EP, 1994. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. Annual review of pharmacology and toxicology, 34, 1, 135-72.

Eaton DL, Gallagher EP, Bammler TK, Kunze KL, 1995. Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: implications for human variability in expression and enzyme activity. Pharmacogenetics and Genomics, 5, 5, 259-74.

El-Bahr SM, 2015. Effect of Curcumin on Hepatic Antioxidant Enzymes Activities and Gene Expressions in Rats Intoxicated with Aflatoxin B1. Phytotherapy Research, 29, 1, 134-40.

El-Dakhakhny M, Mady NI, Abdel Halim M, 2000. Nigella sativa L. Oil Protects against Induced Hepatotoxicity and Improves Serum Lipid Profile in Rats. Arzneimittelforschung, 50, 09, 832-6.

El-Mahmoudy A, Matsuyama H, Borgan MA, Shimizu Y, El-Sayed MG, Minamoto N, Takewaki T, 2002. Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. International Immunopharmacology, 2, 11, 1603-11.

El-Nagerabi SA, Al-Bahry SN, Elshafie AE, AlHilali S, 2012. Effect of Hibiscus sabdariffa extract and Nigella sativa oil on the growth and aflatoxin B 1 production of Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus strains. Food Control, 25, 1, 59-63.

EL-Sawi NM, Al-Seeni MN, Younes SH, AL-Jahdali SM, Ali SS, 2012. Biochemical and Histological Studies on the effect of Zearalenone Mycotoxin and Thymoquinone on Male Mice Kidney. Journal of American Science, 8, 10.

el-Sayed W, 2011. Upregulation of Chemoprotective Enzymes and Glutathione by Nigella sativa (Black Seed) and Thymoquinone in CCl4-Intoxicated Rats, p.

El–Dakhakhny M, 1963. Studies on the chemical constitution of egyptian nigella sativa l. Seeds. II[1]) the essential oil. Planta Medica, 11, 04, 465-70.

Elbarbry F, Ragheb A, Marfleet T, Shoker A, 2012. Modulation of hepatic drug metabolizing enzymes by dietary doses of thymoquinone in female New Zealand White rabbits. Phytotherapy Research, 26, 11, 1726-30.

Ellis EM, Judah DJ, Neal GE, Hayes JD, 1993. An ethoxyquin-inducible aldehyde reductase from rat liver that metabolizes aflatoxin B1 defines a subfamily of aldo-keto reductases. Proceedings of the National Academy of Sciences, 90, 21, 10350-4.

Farkhondeh T, Samarghandian S, Shahri AMP, Samini F, 2018. The Neuroprotective Effects of Thymoquinone: A Review. Dose Response, 16, 2, 1559325818761455-.

Farombi E, Nwaokeafor I, 2005. Anti-oxidant mechanisms of kolaviron: Studies on serum lipoprotein oxidation, metal chelation and oxidative membrane damage in rats. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 32, 8, 667-74.

Feng W-H, Xue KS, Tang L, Williams PL, Wang J-S, 2017. Aflatoxin B1-Induced Developmental and DNA Damage in Caenorhabditis elegans. Toxins, 9, 1, 9.

Firozi PF, Bhattacharya RK, 1995. Effects of natural polyphenols on aflatoxin B1 activation in a reconstituted microsomal monooxygenase system. J Biochem Toxicol, 10, 1, 25-31.

Fouad AM, Ruan D, El-Senousey HK, Chen W, Jiang S, Zheng C, 2019. Harmful Effects and Control Strategies of Aflatoxin B1 Produced by Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus Strains on Poultry: Review. Toxins, 11, 3, 176.

Freeman BA, Crapo JD, 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 47, 5, 412-26.

Galvano F, Piva A, Ritieni A, Galvano G, 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. Journal of food protection, 64, 1, 120-31.

Gao SS, Chen XY, Zhu RZ, Choi B-M, Kim SJ, Kim B-R, 2012. Dual effects of phloretin on aflatoxin B1 metabolism: Activation and detoxification of aflatoxin B1. BioFactors, 38, 1, 34-43.

Giambrone JJ, Diener UL, Davis ND, Panangala VS, Hoerr FJ, 1985. Effects of aflatoxin on young turkeys and broiler chickens. Poult Sci, 64, 9, 1678-84.

Godard CA, Smolowitz RM, Wilson JY, Payne RS, Stegeman JJ, 2004. Induction of cetacean cytochrome P4501A1 by beta-naphthoflavone exposure of skin biopsy slices. Toxicol Sci, 80, 2, 268-75.

Gomez-Espinosa D, Cervantes-Aguilar FJ, Del Rio-Garcia JC, Villarreal-Barajas T, Vazquez-Duran A, Mendez-Albores A, 2017. Ameliorative Effects of Neutral Electrolyzed Water on Growth Performance, Biochemical Constituents, and Histopathological Changes in Turkey Poults during Aflatoxicosis. Toxins (Basel), 9, 3.

Green DR, 2011. Apoptosis: physiology and pathology, Cambridge University Press, p.

Groopman J, Cain L, Kensler T, 1992. Exposure in human populations: measurements and relationship to cancer. CRC Crit. Rev. Toxicol, 19, 113-45.

Gross-Steinmeyer K, Eaton DL, 2012. Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxin B 1. Toxicology, 299, 2, 69-79.

Guengerich FP, Cai H, McMahon M, Hayes JD, Sutter TR, Groopman JD, Deng Z, Harris TM, 2001. Reduction of aflatoxin B1 dialdehyde by rat and human aldo-keto reductases. Chemical research in toxicology, 14, 6, 727-37.

Gyamfi MA, Aniya Y, 1998. Medicinal herb, Thonningia sanguinea protects against aflatoxin B1 acute hepatotoxicity in Fischer 344 rats. Human & experimental toxicology, 17, 8, 418-23.

Hameed KAS, Banumathi A, Ulaganathan G, 2015. Performance evaluation of maximal separation techniques in immunohistochemical scoring of tissue images. Micron, 79, 29-35.

Han F, Liu W, Xiao H, Dong Y, Sun L, Mao C, Yin L, Jiang X, Ao L, Cui Z, Cao J, Liu J, 2015. High expression of SOX30 is associated with favorable survival in human lung adenocarcinoma. Scientific reports, 5, 13630-.

Han X-Y, Huang Q-C, Li W-F, Jiang J-F, Xu Z-R, 2008. Changes in growth performance, digestive enzyme activities and nutrient digestibility of cherry valley ducks in response to aflatoxin B1 levels. Livestock Science, 119, 1, 216-20.

Hanafy M, Hatem M, 1991. Studies on the antimicrobial activity of Nigella sativa seed (black cumin). Journal of ethnopharmacology, 34, 2-3, 275-8.

Hari Kumar KB, Kuttan R, 2006. Inhibition of drug metabolizing enzymes (cytochrome P450) in vitro as well as in vivo by Phyllanthus amarus SCHUM & THONN. Biological & pharmaceutical bulletin, 29, 7, 1310-3.

Harvey RB, Kubena LF, Elissalde MH, Phillips TD, 1993. Efficacy of Zeolitic Ore Compounds on the Toxicity of Aflatoxin to Growing Broiler Chickens. Avian Diseases, 37, 1, 67-73.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR, 2005. Glutathione transferases. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 45, 51-88.

Hayes JD, Judah D, Neal G, Nguyen T, 1992. Molecular cloning and heterologous expression of a cDNA encoding a mouse glutathione S-transferase Yc subunit possessing high catalytic activity for aflatoxin B1-8, 9-epoxide. Biochemical Journal, 285, 1, 173-80.

Hayes JD, Judah DJ, Neal GE, 1993. Resistance to aflatoxin B1 is associated with the expression of a novel aldo-keto reductase which has catalytic activity towards a cytotoxic aldehyde-containing metabolite of the toxin. Cancer research, 53, 17, 3887-94.

Henderson CJ, Smith AG, Ure J, Brown K, Bacon EJ, Wolf CR, 1998. Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95, 9, 5275-80.

Horwitz W, 2000. Natural Toxins No. 990.33. In: Official methods of analysis of AOAC International. Eds, 17 th. Gaithersburg, Md.: AOAC International, p. 20-2.

Houghton PJ, Zarka R, de las Heras B, Hoult J, 1995. Fixed oil of Nigella sativa and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. Planta medica, 61, 01, 33-6.

Huang Z, Jiang Y, Yang Y, Shao J, Sun X, Chen J, Dong L, Zhang J, 2013. 3, 3′-Diindolylmethane alleviates oxazolone-induced colitis through Th2/Th17 suppression and Treg induction. Molecular immunology, 53, 4, 335-44.

Ihunnah CA, Jiang MX, Xie W, 2011. Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance. Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis., 1812, 8, 956-63.

Ilic Z, Crawford D, Egner PA, Sell S, 2010. Glutathione-S-transferase A3 knockout mice are sensitive to acute cytotoxic and genotoxic effects of aflatoxin B1. Toxicology and applied pharmacology, 242, 3, 241-6.

Ince S, Kucukkurt I, Demirel HH, Turkmen R, Sever E, 2012. Thymoquinone attenuates cypermethrin induced oxidative stress in Swiss albino mice. Pesticide Biochemistry and Physiology, 104, 3, 229-35.

Ip SP, Mak DH, Li PC, Poon MK, Ko KM, 1996. Effect of a Lignan-Enriched Extract of Schisandra Chinensis on Aflatoxin B1 and Cadmium Chloride-Induced Hepatotoxicity in Rats. Pharmacology & toxicology, 78, 6, 413-6.

Itoh M, Nakajima M, Higashi E, Yoshida R, Nagata K, Yamazoe Y, Yokoi T, 2006. Induction of human CYP2A6 is mediated by the pregnane X receptor with peroxisome proliferator-activated

receptor-gamma coactivator 1alpha. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 319, 2, 693-702.

Jaswal A, Sinha N, Bhadauria M, Shrivastava S, Shukla S, 2013. Therapeutic potential of thymoquinone against anti-tuberculosis drugs induced liver damage. Environmental toxicology and pharmacology, 36, 3, 779-86.

Jiang S, Hester PY, Hu JY, Yan FF, Dennis RL, Cheng HW, 2014. Effect of perches on liver health of hens. Poult Sci, 93, 7, 1618-22.

Kalus U, Pruss A, Bystron J, Jurecka M, Smekalova A, Lichius JJ, Kiesewetter H, 2003. Effect of Nigella sativa (black seed) on subjective feeling in patients with allergic diseases. Phytotherapy Research, 17, 10, 1209-14.

Kanter M, 2011. Thymoquinone attenuates lung injury induced by chronic toluene exposure in rats. Toxicology and industrial health, 27, 5, 387-95.

Karaman M, Basmacioglu H, Ortatatli M, Oguz H, 2005. Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology. British poultry science, 46, 3, 394-400.

Karaman M, Özen H, Tuzcu M, Ciğremiş Y, Önder F, Özcan K, 2010. Pathological, biochemical and haematological investigations on the protective effect of α-lipoic acid in experimental aflatoxin toxicosis in chicks. British poultry science, 51, 1, 132-41.

Karapehlivan M, Kart A, Yaman H, Atakişi E, Yapar K, 2011. Kazlarda Nigella Sativa (Çörek Otu) Tohumu Uygulamasının Plazma Nitrik Oksit, Malondialdehit ve Tam Kan Glutatyon Düzeyleri Üzerine Etkisi. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 6, 1, 55-61.

Karimi Z, Mirza Alizadeh A, Ezzati Nazhad Dolatabadi J, Dehghan P, 2019. Nigella sativaand its Derivatives as Food Toxicity Protectant Agents. Adv Pharm Bull, 9, 1, 22-37.

Karn S, 2013. Protective effects of N. sativa against the adverse effects of aflatoxicosis in ducklings. Nepal Journal of Science and Technology, 14, 2, 81-90.

Kawana K, Ikuta T, Kobayashi Y, Gotoh O, Takeda K, Kawajiri K, 2003. Molecular mechanism of nuclear translocation of an orphan nuclear receptor, SXR. Mol Pharmacol, 63, 3, 524-31.

Kensler TW, Groopman JD, Sutter TR, Curphey TJ, Roebuck BD, 1999. Development of cancer chemopreventive agents: oltipraz as a paradigm. Chemical research in toxicology, 12, 2, 113-26.

Keser O, Kutay H, 2009. Mikotoksinlerin Önlenmesinde Kullanılan Bazı Yöntemler II. Kimyasal ve Biyolojik Yöntemler. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 35, 1, 19-29.

Kew MC, 2003. Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. Liver international, 23, 6, 405-9.

Khan MA, 1999. Chemical composition and medicinal properties of Nigella sativa Linn. Inflammopharmacology, 7, 1, 15-35.

Kheir Eldin AA, Motawi TM, Sadik NA, 2008. Effect of some natural antioxidants on aflatoxin B1-induced hepatic toxicity.

Khosravi A, Minooeianhaghighi M, Shokri H, Emami S, Alavi S, Asili J, 2011. The potential inhibitory effect of Cuminum cyminum, Ziziphora clinopodioides and Nigella sativa essential oils on the growth of Aspergillus fumigatus and Aspergillus flavus. Brazilian Journal of Microbiology, 42, 1, 216-24.

Kiessling K-H, 1986. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. Pure and applied chemistry, 58, 2, 327-38.

Kim JE, Bauer MM, Mendoza KM, Reed KM, Coulombe Jr RA, 2010. Comparative genomics identifies new alpha class genes within the avian glutathione S-transferase gene cluster. Gene, 452, 2, 45-53.

Kim JE, Bunderson BR, Croasdell A, Reed KM, Coulombe Jr RA, 2013. Alpha-class glutathione S-transferases in wild turkeys (Meleagris gallopavo): Characterization and role in resistance to the carcinogenic mycotoxin aflatoxin B 1. PloS one, 8, 4, e60662.

Kishida T, Muto S, Hayashi M, Tsutsui M, Tanaka S, Murakami M, Kuroda J, 2008. Strain differences in hepatic cytochrome P450 1A and 3A expression between Sprague-Dawley and Wistar rats. The Journal of toxicological sciences, 33, 4, 447-57.

Knight LP, Primiano T, Groopman JD, Kensler TW, Sutter TR, 1999. cDNA cloning, expression and activity of a second human aflatoxin B1-metabolizing member of the aldo-keto reductase superfamily, AKR7A3. Carcinogenesis, 20, 7, 1215-23.

Kojima K, Nagata K, Matsubara T, Yamazoe Y, 2007. Broad but distinct role of pregnane x receptor on the expression of individual cytochrome p450s in human hepatocytes. Drug metabolism and pharmacokinetics, 22, 4, 276-86.

Koohi Mohammad K, Ghazi-Khansari M, Hayati F, Staji H, Keywanloo M, Shahroozian E, 2017. The Role of TNF-alpha in Aflatoxin B-1 Induced Hepatic Toxicity in Isolated Perfused Rat Liver Model. Acta medica Iranica, 55, 7, 416-21.

Kruk I, Michalska T, Lichszteld K, Kładna A, Aboul-Enein HY, 2000. The effect of thymol and its derivatives on reactions generating reactive oxygen species. Chemosphere, 41, 7, 1059-64.

Kumar R, Mishra AK, Dubey N, Tripathi Y, 2007. Evaluation of Chenopodium ambrosioides oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity. International Journal of Food Microbiology, 115, 2, 159-64.

Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell R, 2007. Robbins Temel Patoloji, 9. baskı, p. 12-16.

Kyle ME, Miccadei S, Nakae D, Farber JL, 1987. Superoxide dismutase and catalase protect cultured hepatocytes from the cytotoxicity of acetaminophen. Biochemical and biophysical research communications, 149, 3, 889-96.

Labbé RG, García S, 2013. Guide to foodborne pathogens, John Wiley & Sons, p. 10-25.

Lampe JW, King IB, Li S, Grate MT, Barale KV, Chen C, Feng Z, Potter JD, 2000. Brassica vegetables increase and apiaceous vegetables decrease cytochrome P450 1A2 activity in humans: changes in caffeine metabolite ratios in response to controlled vegetable diets. Carcinogenesis, 21, 6, 1157-62.

Lautenbacher L, 1997. Schwarzkummelol: eine neue quelle ungesattigter fettsauren. Deutsche Apotheker-Zeitung, 137, 50, 68-9.

Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Kliewer SA, 1998. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. The Journal of clinical investigation, 102, 5, 1016-23.

Li S, Muhammad I, Yu H, Sun X, Zhang X, 2019. Detection of Aflatoxin adducts as potential markers and the role of curcumin in alleviating AFB1-induced liver damage in chickens. Ecotoxicology and Environmental Safety, 176, 137-45.

Li Y, Daniel M, Tollefsbol TO, 2011. Epigenetic regulation of caloric restriction in aging. BMC medicine, 9, 1, 98.

Linda S, HARRISON DJ, HAYES JD, 1998. Molecular cloning, expression and catalytic activity of a human AKR7 member of the aldo–keto reductase superfamily: evidence that the major 2-carboxybenzaldehyde reductase from human liver is a homologue of rat aflatoxin B1-aldehyde reductase. Biochemical Journal, 332, 1, 21-34.

Lindemann M, Blodgett D, Kornegay E, Schurig G, 1993. Potential ameliorators of aflatoxicosis in weanling/growing swine. Journal of animal science, 71, 1, 171-8.

Liu J, Yang CF, Lee BL, Shen HM, Ang SG, Ong CN, 1999. Effect of Salvia miltiorrhiza on aflatoxin B1-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. Free Radic Res, 31, 6, 559-68.

Liu N, Ding K, Wang JQ, Jia SC, Wang JP, Xu TS, 2017. Detoxification, metabolism, and glutathione pathway activity of aflatoxin B1 by dietary lactic acid bacteria in broiler chickens. Journal of Animal Science, 95, 10, 4399-406.

Liu N, Wang J, Deng Q, Gu K, Wang J, 2018. Detoxification of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and hydrated sodium calcium aluminosilicate in broiler chickens. Livestock Science, 208, 28-32.

Liu N, Wang JQ, Liu ZY, Chen YK, Wang JP, 2018. Effect of cysteamine hydrochloride supplementation on the growth performance, enterotoxic status, and glutathione turnover of broilers fed aflatoxin B1 contaminated diets. Poultry Science, 97, 10, 3594-600.

Lu J-W, Yang W-Y, Lin Y-M, Jin S-LC, Yuh C-H, 2013. Hepatitis B virus X antigen and aflatoxin B1 synergistically cause hepatitis, steatosis and liver hyperplasia in transgenic zebrafish. Acta Histochemica, 115, 7, 728-39.

Luna LG, 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology.

Ma C, Marlowe JL, Puga A, 2009. The aryl hydrocarbon receptor at the crossroads of multiple signaling pathways. In: Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. Eds: Springer, p. 231-57.

Ma Q, Li Y, Fan Y, Zhao L, Wei H, Ji C, Zhang J, 2015. Molecular Mechanisms of Lipoic Acid Protection against Aflatoxin B1-Induced Liver Oxidative Damage and Inflammatory Responses in Broilers. Toxins, 7, 12, 5435-47.

Ma QG, Gao X, Zhou T, Zhao LH, Fan Y, Li XY, Lei YP, Ji C, Zhang JY, 2012. Protective effect of Bacillus subtilis ANSB060 on egg quality, biochemical and histopathological changes in layers exposed to aflatoxin B1. Poultry Science, 91, 11, 2852-7.

Ma X, Idle JR, Gonzalez FJ, 2008. The pregnane X receptor: from bench to bedside. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 4, 7, 895-908.

Maglich JM, Parks DJ, Moore LB, Collins JL, Goodwin B, Billin AN, Stoltz CA, Kliewer SA, Lambert MH, Willson TM, Moore JT, 2003. Identification of a novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes. J Biol Chem, 278, 19, 17277-83.

Maglich JM, Stoltz CM, Goodwin B, Hawkins-Brown D, Moore JT, Kliewer SA, 2002. Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. Molecular pharmacology, 62, 3, 638-46.

Mahmood MS, Gilani AH, Khwaja A, Rashid A, Ashfaq MK, 2003. The in vitro effect of aqueous extract of Nigella sativa seeds on nitric oxide production. Phytotherapy Research, 17, 8, 921-4.

Maraqa A, Al-Sharo'a NF, Farah H, Elbjeirami WM, Shakya AK, Sallal A-KJ, 2007. Effect of Nigella sativa extract and oil on aflatoxin production by Aspergillus flavus. Turkish Journal of Biology, 31, 3, 155-9.

Marin DE, Taranu I, 2012. Overview on aflatoxins and oxidative stress. Toxin Reviews, 31, 3-4, 32-43.

Mary VS, Valdehita A, Navas JM, Rubinstein HR, Fernandez-Cruz ML, 2015. Effects of aflatoxin B-1, fumonisin B-1 and their mixture on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A induction. Food and Chemical Toxicology, 75, 104-11.

Matsumoto Y, Ide F, Kishi R, Akutagawa T, Sakai S, Nakamura M, Ishikawa T, Fujii-Kuriyama Y, Nakatsuru Y, 2007. Aryl hydrocarbon receptor plays a significant role in mediating airborne particulate-induced carcinogenesis in mice. Environmental science & technology, 41, 10, 3775-80.

McKillop IH, Schrum LW, 2005. Alcohol and liver cancer. Alcohol, 35, 3, 195-203.

Meki A-RM, Abdel-Ghaffar SK, El-Gibaly I, 2001. Aflatoxin B1 induces apoptosis in rat liver: protective effect of melatonin. Neuroendocrinology Letters, 22, 6, 417-26.

Meki A-RM, Esmail EE-DF, Hussein AA, Hassanein HM, 2004. Caspase-3 and heat shock protein-70 in rat liver treated with aflatoxin B1: effect of melatonin. Toxicon, 43, 1, 93-100.

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

Meral I, Kanter M, 2003. Effects of Nigella sativa L. and Urtica dioica L. on selected mineral status and hematological values in CCl 4-treated rats. Biological trace element research, 96, 1, 263-70.

Meral I, Yener Z, Kahraman T, Mert N, 2001. Effect of Nigella sativa on glucose concentration, lipid peroxidation, anti-oxidant defence system and liver damage in experimentally-induced diabetic rabbits. Journal of Veterinary Medicine Series A, 48, 10, 593-9.

Merfort I, Wray V, Barakat H, Hussein S, Nawwar M, Willuhn G, 1997. Flavonol triglycosides from seeds of Nigella sativa. Phytochemistry, 46, 2, 359-63.

Merkley JW, Maxwell RJ, Phillips JG, Huff WE, 1987. Hepatic fatty acid profiles in aflatoxin-exposed broiler chickens. Poult Sci, 66, 1, 59-67.

Mohamed AM, Metvvally NS, 2009. Antiaflatoxigenic Activities of Some Plant Aqueous Extracts Against Aflatoxin-B1 Induced Renal and Cardiac Damage. Journal of pharmacology and toxicology, 4, 1, 1-16.

Monson MS, Coulombe RA, Reed KM, 2015. Aflatoxicosis: Lessons from Toxicity and Responses to Aflatoxin B1 in Poultry. Agriculture, 5, 3, 742-77.

Muhammad I, Wang H, Sun X, Wang X, Han M, Lu Z, Cheng P, Hussain MA, Zhang X, 2018. Dual Role of Dietary Curcumin Through Attenuating AFB(1)-Induced Oxidative Stress and Liver Injury via Modulating Liver Phase-I and Phase-II Enzymes Involved in AFB(1) Bioactivation and Detoxification. Frontiers in Pharmacology, 9, 554.

Murphy PA, Hendrich S, Landgren C, Bryant CM, 2006. Food mycotoxins: an update. Journal of food science, 71, 5, R51-R65.

Naaz F, Abdin MZ, Javed S, 2014. Protective effect of esculin against prooxidant aflatoxin B1-induced nephrotoxicity in mice. Mycotoxin research, 30, 1, 25-32.

Nagi MN, Mansour MA, 2000. Protective effect of thymoquinone against doxorubicin–induced cardiotoxicity in rats: A possible mechanism of protection. Pharmacological Research, 41, 3, 283-9.

Naseem MN, Saleemi MK, Abbas RZ, Khan A, Khatoon A, Gul ST, Imran M, Sindhu Z-u-D, Sultan A, 2018. Hematological and Serum Biochemical Effects of Aflatoxin B1 Intoxication in Broilers Experimentally Infected with Fowl Adenovirus-4 (FAdV-4). Pakistan Veterinary Journal, 38, 2, 209-13.

Nehar S, Kumari M, 2013. Ameliorating effect of Nigella sativa oil in thioacetamide-induced liver cirrhosis in albino rats. Ind J Pharm Edu Res, 47, 2, 135.

Ni S, Wang X, Wang J, Lu S, Zeng S, Zhao Z, Yu L, Chen S, 2008. Effects of intrauterine undernutrition on the expression of CYP3A23/3A1, PXR, CAR and HNF4alpha in neonate rats. Biopharmaceutics & drug disposition, 29, 9, 501-10.

Nickavar B, Mojab F, Javidnia K, Amoli MA, 2003. Chemical composition of the fixed and volatile oils of Nigella sativa L. from Iran. Z Naturforsch C, 58, 9-10, 629-31.

Nili-Ahmadabadi A, Tavakoli F, Hasanzadeh G, Rahimi H, Sabzevari O, 2011. Protective effect of pretreatment with thymoquinone against Aflatoxin B 1 induced liver toxicity in mice. Daru, 19, 4.

Noakes R, 2015. The aryl hydrocarbon receptor: a review of its role in the physiology and pathology of the integument and its relationship to the tryptophan metabolism. Int J Tryptophan Res, 8, 7-18.

Offord EA, Macé K, Avanti O, Pfeifer AM, 1997. Mechanisms involved in the chemoprotective effects of rosemary extract studied in human liver and bronchial cells. Cancer Letters, 114, 1-2, 275-81.

Oguz H, Kurtoglu V, 2000. Effect of clinoptilolite on performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. British Poultry Science, 41, 4, 512-7.

Oğuz H, 2017. Mikotoksinler ve Önemi. Turkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics, 3, 2, 113-9.

Omar H, 2013. Mycotoxins-induced oxidative stress and disease. Mycotoxin and Food Safety in Developing Countries. Rijeka, Croatia: InTech, 63-92.

Ortatatli M, Ciftci M, Tuzcu M, Kaya A, 2002. The effects of aflatoxin on the reproductive system of roosters. Research in veterinary science, 72, 1, 29-36.

Ortatatli M, Oğuz H, 2001. Ameliorative effects of dietary clinoptilolite on pathological changes in broiler chickens during aflatoxicosis. Research in Veterinary Science, 71, 1, 59-66.

Ortatatli M, Oğuz H, Hatipoğlu F, Karaman M, 2005. Evaluation of pathological changes in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. Research in veterinary science, 78, 1, 61-8.

Özen H, Karaman M, Çiğremiş Y, Tuzcu M, Özcan K, Erdağ D, 2009. Effectiveness of melatonin on aflatoxicosis in chicks. Research in veterinary science, 86, 3, 485-9.

Perry JE, Banker DE, Green RC, (1999). Broiler farms' organization, management, and performance.

Peter F, 1992. Glutathione conjugation of aflatoxin B1 exo-and endo-epoxides by rat and human glutathione S-transferases. Chem. Res. Toxicol, 5, 4, 470-8.

Pool-Zobel B, Veeriah S, Böhmer F-D, 2005. Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens—focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 591, 1, 74-92.

Porto YD, Trombete FM, Freitas-Silva O, de Castro IM, Direito GM, Ascheri JLR, 2019. Gaseous Ozonation to Reduce Aflatoxins Levels and Microbial Contamination in Corn Grits. Microorganisms, 7, 8, 220.

Pourbakhsh H, Taghiabadi E, Abnous K, Hariri AT, Hosseini SM, Hosseinzadeh H, 2014. Effect of Nigella sativa fixed oil on ethanol toxicity in rats. Iran J Basic Med Sci, 17, 12, 1020-31.

Premalatha B, Sujatha V, Sachdanandam P, 1997. Modulating effect ofsemecarpus anacardiumlinn. Nut extract on glucose metabolizing enzymes in aflatoxin b1-induced experimental hepatocellular carcinoma. Pharmacological research, 36, 3, 187-92.

Qian G-S, Ross RK, Yu MC, Yuan J-M, Gao Y-T, Henderson BE, Wogan GN, Groopman JD, 1994. A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 3, 1, 3-10.

Rai M, Varma A, 2010. Mycotoxins in food, feed and bioweapons, Springer, p.

Raj HG, Gupta K, Rohil V, Bose M, Biswas G, Singh SK, Jain SC, Parmar VS, Olsen CE, Wengel J, 1998. Aflatoxin B1-induced micronuclei and cell cycle alterations in lung and bone marrow cells and their modulation by Piper argyrophyllum extract. Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis, 18, 5, 249-61.

Rajalakshmi TR, AravindhaBabu N, Shanmugam KT, Masthan KMK, 2015. DNA adducts-chemical addons. J Pharm Bioallied Sci, 7, Suppl 1, S197-S9.

Rajput SA, Sun L, Zhang N, Khalil MM, Gao X, Ling Z, Zhu L, Khan FA, Zhang J, Qi D, 2017. Ameliorative Effects of Grape Seed Proanthocyanidin Extract on Growth Performance, Immune Function, Antioxidant Capacity, Biochemical Constituents, Liver Histopathology and Aflatoxin Residues in Broilers Exposed to Aflatoxin B(1). Toxins, 9, 11, 371.

Rastad A, Sadeghi A, Chamani M, Shawrang P, 2016. Effects of Thymoquinone on Interleukin-1 and Interferon Gamma Gene Expression and Antibody Titers against Newcastle Disease in Broiler Chickens under Oxidative Stress. Revista Brasileira de Ciência Avícola, 18, 4, 593-8.

Rastogi R, Srivastava AK, Rastogi AK, 2001. Biochemical changes induced in liver and serum of aflatoxin B1-treated male wistar rats: preventive effect of picroliv. Pharmacol Toxicol, 88, 2, 53-8.

Rastogi R, Srivastava AK, Rastogi AK, 2001. Long term effect of aflatoxin B1 on lipid peroxidation in rat liver and kidney: effect of picroliv and silymarin. Phytotherapy Research, 15, 4, 307-10.

Ratajewski M, Walczak-Drzewiecka A, Sałkowska A, Dastych J, 2011. Aflatoxins upregulate CYP3A4 mRNA expression in a process that involves the PXR transcription factor. Toxicology Letters, 205, 2, 146-53.

Raunio H, Rahnasto-Rilla M, 2012. CYP2A6: genetics, structure, regulation, and function. Drug metabolism and drug interactions, 27, 2, 73-88.

Rawal S, Kim JE, Coulombe R, Jr., 2010. Aflatoxin B1 in poultry: toxicology, metabolism and prevention. Res Vet Sci, 89, 3, 325-31.

Reddy L, Odhav B, Bhoola K, 2006. Aflatoxin B1-induced toxicity in HepG2 cells inhibited by carotenoids: morphology, apoptosis and DNA damage. Biological chemistry, 387, 1, 87-93.

Roze LV, Koptina AV, Laivenieks M, Beaudry RM, Jones DA, Kanarsky AV, Linz JE, 2011. Willow volatiles influence growth, development, and secondary metabolism in Aspergillus parasiticus. Applied microbiology and biotechnology, 92, 2, 359-70.

Sakuda S, Ono M, Ikeda H, Nakamura T, Inagaki Y, Kawachi R, Nakayama J, Suzuki A, Isogai A, Nagasawa H, 2000. Blasticidin A as an inhibitor of aflatoxin production by Aspergillus parasiticus. The Journal of antibiotics, 53, 11, 1265-71.

Salem ML, 2005. Immunomodulatory and therapeutic properties of the Nigella sativa L. seed. International Immunopharmacology, 5, 13, 1749-70.

Salem R, El-Habashi N, Fadl SE, Sakr OA, Elbialy ZI, 2018. Effect of probiotic supplement on aflatoxicosis and gene expression in the liver of broiler chicken. Environmental Toxicology and Pharmacology, 60, 118-27.

Sankaranarayanan C, Pari L, 2011. Thymoquinone ameliorates chemical induced oxidative stress and β-cell damage in experimental hyperglycemic rats. Chemico-Biological Interactions, 190, 2, 148-54.

Santurio J, 1999. Effect of sodium bentonite on the performance and blood variables of broiler chickens intoxicated with aflatoxins. British Poultry Science, 40, 1, 115-9.

Sayed-Ahmed MM, Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Al-Yahya AA, Al-Shabanah OA, Hafez MM, Nagi MN, 2010. Thymoquinone Attenuates Diethylnitrosamine Induction of Hepatic Carcinogenesis Through Antioxidant Signaling. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 3, 4.

Sayed-Ahmed MM, Nagi MN, 2007. Thymoquinone supplementation prevents the development of gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 34, 5-6, 399-405.

Shen H-M, Ong C-N, Lee B-L, Shi C-Y, 1995. Aflatoxin B1-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation in rat hepatic DNA. Carcinogenesis, 16, 2, 419-22.

Shi C-Y, Chua S-C, Lee H-P, Ong C-N, 1994. Inhibition of aflatoxin B1-DNA binding and adduct formation by selenium in rats. Cancer letters, 82, 2, 203-8.

Shokri H, 2016. A review on the inhibitory potential of Nigella sativa against pathogenic and toxigenic fungi. Avicenna Journal of Phytomedicine, 6, 1, 21.

Shotwell OL, Hesseltine CW, Stubblefield RD, Sorenson WG, 1966. Production of aflatoxin on rice. Applied microbiology, 14, 3, 425-8.

Shuaib FMB, Ehiri J, Abdullahi A, Williams JH, Jolly PE, 2010. Reproductive health effects of aflatoxins: A review of the literature. Reproductive Toxicology, 29, 3, 262-70.

Siloto EV, Oliveira EFA, Sartori JR, Fascina VB, Martins BAB, Ledoux DR, Rottinghaus GE, Sartori DRS, 2013. Lipid metabolism of commercial layers fed diets containing aflatoxin, fumonisin, and a binder. Poultry Science, 92, 8, 2077-83.

Squires EJ, Sueyoshi T, Negishi M, 2004. Cytoplasmic localization of pregnane X receptor and ligand-dependent nuclear translocation in mouse liver. J Biol Chem, 279, 47, 49307-14.

Stephen Hsia M, 1982. Toxicological significance of dihydrodiol metabolites. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 19, 6-7, 737-58.

Stockinger B, Hirota K, Duarte J, Veldhoen M. External influences on the immune system via activation of the aryl hydrocarbon receptor. Seminars in immunology, 99-105.

Stresser DM, Bailey GS, Williams DE, 1994. Indole-3-carbinol and beta-naphthoflavone induction of aflatoxin B1 metabolism and cytochromes P-450 associated with bioactivation and detoxication of aflatoxin B1 in the rat. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 22, 3, 383-91.

Sun L-H, Zhang N-Y, Zhu M-K, Zhao L, Zhou J-C, Qi D-S, 2016. Prevention of Aflatoxin B1 Hepatoxicity by Dietary Selenium Is Associated with Inhibition of Cytochrome P450 Isozymes

and Up-Regulation of 6 Selenoprotein Genes in Chick Liver. The Journal of Nutrition, 146, 4, 655-61.

Tang L, Guan H, Ding X, Wang J-S, 2007. Modulation of aflatoxin toxicity and biomarkers by lycopene in F344 rats. Toxicology and applied pharmacology, 219, 1, 10-7.

Tejada-Castañeda ZI, Ávila-Gonzalez E, Casaubon-Huguenin MT, Cervantes-Olivares RA, Vásquez-Peláez C, Hernández-Baumgarten EM, Moreno-Martínez E, 2008. Biodetoxification of Aflatoxin-Contaminated Chick Feed. Poultry Science, 87, 8, 1569-76.

Thorgeirsson SS, Grisham JW, 2002. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. Nature genetics, 31, 4, 339-46.

Timsit YE, Negishi M, 2007. CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors. Steroids, 72, 3, 231-46.

Tolson AH, Wang H, 2010. Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. Adv Drug Deliv Rev, 62, 13, 1238-49.

Türkdoğan M, Ağaoğlu Z, Yener Z, Sekeroğlu R, Akkan H, Avci M, 2001. The role of antioxidant vitamins (C and E), selenium and Nigella sativa in the prevention of liver fibrosis and cirrhosis in rabbits: new hopes. DTW. Deutsche tierarztliche Wochenschrift, 108, 2, 71-3.

Türkdoğan M, Ozbek H, Yener Z, Tuncer I, Uygan I, Ceylan E, 2003. The role of Urtica dioica and Nigella sativa in the prevention of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. Phytotherapy Research, 17, 8, 942-6.

Türker L, Bayrak A, 1997. Çörek otu (Nigella sativa L.)'nun sabit ve uçucu yağ kompozisyonunun araştırılması. Standard, 430, 128-37.

Uras SS, 2009. Nigella sativa L. (Ranunculaceae) Bitkisi Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar. , Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin.

Valchev I, Hristov T, Lazarov L, Kanakov D, Binev R, Nikolov Y, 2013. Investigations on production traits in broiler chickens with experimental aflatoxicosis. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 16, 4.

Verma R, 2004. Aflatoxin cause DNA damage. International Journal of Human Genetics, 4, 4, 231.

Verma R, Nair A, 2001. Ameliorative effect of vitamin E on aflatoxin-induced lipid peroxidation in the testis of mice. Asian J Androl, 3, 3, 217-21.

Vondracek M, Xi Z, Larsson P, Baker V, Mace K, Pfeifer A, Tjälve H, Donato MT, Gomez-Lechon MJ, Grafström RC, 2001. Cytochrome P450 expression and related metabolism in human buccal mucosa. Carcinogenesis, 22, 3, 481-8.

Wagner H, Hikino H, Farnsworth NR, 2012. Economic and medicinal plant research, Academic press, p.

Wang H, Muhammad I, Li W, Sun X, Cheng P, Zhang X, 2018. Sensitivity of Arbor Acres broilers and chemoprevention of aflatoxin B1-induced liver injury by curcumin, a natural potent inducer of phase-II enzymes and Nrf2. Environmental Toxicology and Pharmacology, 59, 94-104.

Wang XH, Li W, Wang XH, Han MY, Muhammad I, Zhang XY, Sun XQ, Cui XX, 2019. Water-soluble substances of wheat: a potential preventer of aflatoxin B1-induced liver damage in broilers. Poult Sci, 98, 1, 136-49.

Wang Y-M, Ong SS, Chai SC, Chen T, 2012. Role of CAR and PXR in xenobiotic sensing and metabolism. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 8, 7, 803-17.

Wild C, Turner P, 2002. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. Mutagenesis, 17, 6, 471-81.

Wild CP, Yin F, Turner PC, Chemin I, Chapot B, Mendy M, Whittle H, Kirk GD, Hall AJ, 2000. Environmental and genetic determinants of aflatoxin–albumin adducts in the Gambia. International Journal of Cancer, 86, 1, 1-7.

Willson TM, Kliewer SA, 2002. PXR, CAR and drug metabolism. Nature reviews. Drug discovery, 1, 4, 259-66.

Wogan G, Edwards G, Newberne P, 1971. Structure-activity relationships in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs. Cancer research, 31, 12, 1936-42.

Woo CC, Kumar AP, Sethi G, Tan KHB, 2012. Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. Biochemical pharmacology, 83, 4, 443-51.

Wyde ME, Bartolucci E, Ueda A, Zhang H, Yan B, Negishi M, You L, 2003. The environmental pollutant 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)ethylene induces rat hepatic cytochrome P450 2B and 3A expression through the constitutive androstane receptor and pregnane X receptor. Mol Pharmacol, 64, 2, 474-81.

Yang CF, Liu J, Wasser S, Shen HM, Tan CE, Ong CN, 2000. Inhibition of ebselen on aflatoxin B(1)-induced hepatocarcinogenesis in Fischer 344 rats. Carcinogenesis, 21, 12, 2237-43.

Yang H, Wang H, 2014. Signaling control of the constitutive androstane receptor (CAR). Protein & cell, 5, 2, 113-23.

Yang J, Bai F, Zhang K, Bai S, Peng X, Ding X, Li Y, Zhang J, Zhao L, 2012. Effects of feeding corn naturally contaminated with aflatoxin B1 and B2 on hepatic functions of broilers. Poultry Science, 91, 11, 2792-801.

Yarru LP, Settivari RS, Gowda NKS, Antoniou E, Ledoux DR, Rottinghaus GE, 2009. Effects of turmeric (Curcuma longa) on the expression of hepatic genes associated with biotransformation, antioxidant, and immune systems in broiler chicks fed aflatoxin. Poultry Science, 88, 12, 2620-7.

Yayla N, 2014. Ratlarda parasetamolle indüklenen akut karaciğer toksisitesi üzerİne Nigella sativa L. etanol ekstresinin etkilerinin araştırılması., Atatürk Üniversitesi Sağlik Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Ye Z, Song H, Higgins JP, Pharoah P, Danesh J, 2006. Five glutathione s-transferase gene variants in 23,452 cases of lung cancer and 30,397 controls: meta-analysis of 130 studies. PLoS Med, 3, 4, e91.

Yi T, Wang J, Zhu K, Tang Y, Huang S, Shui X, Ding Y, Chen C, Lei W, 2018. Aryl Hydrocarbon Receptor: A New Player of Pathogenesis and Therapy in Cardiovascular Diseases. BioMed research international, 2018, 6058784.

Yılmaz S, Kaya E, Comakli S, 2017. Vitamin E (α tocopherol) attenuates toxicity and oxidative stress induced by aflatoxin in rats. Adv Clin Exp Med, 26, 6, 907-17.

Yoshinari T, Akiyama T, Nakamura K, Kondo T, Takahashi Y, Muraoka Y, Nonomura Y, Nagasawa H, Sakuda S, 2007. Dioctatin A is a strong inhibitor of aflatoxin production by Aspergillus parasiticus. Microbiology, 153, 8, 2774-80.

Zhang BC, Zhu Y-R, Wang JB, Wu Y, Zhang Q-N, Qian G-S, Kuang S-Y, Li Y-F, Fang X, Yu L-Y, 1997. Oltipraz chemoprevention trial in Qidong, Jiangsu province, People's Republic of China. Journal of Cellular Biochemistry, 67, s 28-29, 166-73.

Zhang N-Y, Qi M, Zhao L, Zhu M-K, Guo J, Liu J, Gu C-Q, Rajput SA, Krumm CS, Qi D-S, Sun L-H, 2016. Curcumin Prevents Aflatoxin B1 Hepatoxicity by Inhibition of Cytochrome P450 Isozymes in Chick Liver. Toxins, 8, 11, 327.

8. ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Konya'da doğdu. 2003 yılında Konya Veteriner Sağlık Meslek Lisesini bitirdi. 2004 yılında Zonguldak Çaycuma İlçe Tarım Müdürlüğü'nde Veteriner Sağlık Teknisyeni olarak göreve başladı. 2007 yılında kazandığı Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2012 yılında birincilikle mezun oldu. 2014 yılında Konya Sarayönü İlçe Tarım Müdürlüğü'nde Veteriner Hekim olarak görev yapmakta iken, Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı ve 2015 yılında doktora eğitimini yapmak üzere Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne görevlendirildi. 2017 yılında açılan araştırma görevlisi sınavını kazanarak geçiş yaptığı Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır. Evli, 1 kız çocuğu babasıdır.