

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OKRATOKSİN A VE MELATONİNİN
RATLARDA BAZI SERUM VE KARACİĞER
ENZİM DÜZEYLERİNE ETKİSİ

118848

MUSTAFA SOYÖZ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Tez No: 351
2002-İSPARTA

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OKRATOKSİN A VE MELATONİNİN
RATLARDA BAZI SERUM VE KARACİĞER
ENZİM DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

MUSTAFA SOYÖZ

118848

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK

Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından
351 Proje Numarası ile Desteklenmiştir.

Tez No: 351

2002-İSPARTA

KABUL VE ONAY

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji ve Genetik **Anabilim Dalı** Yüksek Lisans **Programı**
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans **Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 10/07/2002

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Nurten ÖZÇELİK Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp
Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : Prof.Dr.Nurten ÖZÇELİK

N. Özçelik

Üye : Prof.Dr.Sadettin ÇALIŞKAN

S. Çalışkan

Üye : Yrd.Doç.Dr.Mehmet AKDOĞAN

M. Akdoğan

Üye :

TEŞEKKÜR

Akademik kariyerimin başlangıcında bilgi ve deneyimlerinden yararlanmaktan onur duyduğum, yüksek lisans eğitimin ve yüksek lisans tez çalışmam süresince her zaman desteği, yardımları ve yönlendirmeleri ile yanımda olan sayın danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr.Nurten ÖZÇELİK'e,

Çalışmamda laboratuvar imkanlarını geniş anlamada istifademe sunan Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Doç.Dr. Namık Delibaş'a, ratların kan alımı, cerrahi işlemleri ve laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. İrfan Altuntaş'a, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Arş.Gör.Dr İbrahim Kılınç'a ve Arş.Gör.Dr.Zafer Yönden'e ve tüm biyokimya çalışanlarına, ratların bakımı ve cerrahi işlemlerde yardımını esirgemeyen Arş.Gör.Kanat Gülle'ye, tezin yazım aşamasında yardımlarını esirgemeyen Öğr.Gör.Dr.Efkan Uz'a teşekkür ederim.

Eğitim ve öğretim hayatımda maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
KISALTMALAR.....	iv
TABLolar, ŞEKİLLER VE GRAFİKLER İNDEKSİ.....	v
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Mikotoksinlerin tanımı ve tarihçesi	3
2.2. Mikotik infeksiyonlar ve mikotoksikozis.....	4
2.3. Mikotoksinlerin biyokimyasal etkileri	6
2.3.1. Reseptörler	6
2.3.2. Metabolik Aktivasyon ve Detoksifikasyon.....	7
2.3.3. Hedef bölgeler ve biyolojik etkileri.....	7
2.3.4. Enerji üretiminin engellenmesi	8
2.4. Türkiye’de Mikotoksin Sorunu.....	9
2.5. Okratoksinlerin Tarihçesi ve Genel Özellikleri	10
2.5.1. Biyosentezi ve Çeşitleri	12
2.5.2. Oluşumunu Etkileyen Faktörler	14
2.6. Okratoksin A’nın Organizmadaki Değişim Süreci	15
2.6.1. Absorbsiyonu	15
2.6.2. Dokularda parçalanması ve metabolik dönüşümü.....	15
2.6.3. Eliminasyonu ve Atılımı	16
2.7. Okratoksin A’nın Hayvanlar Üzerine Etkileri	17
2.7.1. Akut ve Kronik Etkiler	17
2.7.2. Biyokimyasal Etkileri	18
2.7.3. Mutajen Etkisi	19
2.7.4. Kansorejen Etkisi.....	21
2.8. Melatonin Hakkında Genel Bilgi	22
2.8.1. Tanımı ve Yapısı	22
2.8.2. Sentezi.....	23

2.8.3. Etki Mekanizması	24
2.8.4. Serbest radikallere karşı savunmada melatoninin rolü	24
2.9. Serbest Radikaller	26
2.9.1. Serbest radikallerin kaynakları	27
2.9.2. Geçiş Metalleri ve Serbest Radikal Oluşumu	29
2.9.2.1. Membran Lipitlerine Etkileri	29
2.9.3. Antioksidan Savunma Sistemleri	30
2.9.3.1. Antioksidan etki tipleri	31
2.9.3.2. Enzimatik Antioksidanlar	31
3. MATERYAL VE METOD	33
3.1. Materyal	33
3.1.1. Deney Hayvanları	33
3.1.2. Kullanılan Malzemeler	33
3.1.2.1. Cihazlar	33
3.1.2.2. Kimyasal Maddeler	33
3.1.2.3. Çözeltiler	35
3.2. Metod	35
3.2.1. Deney Grupları	35
3.2.2. Anestezi ve gerekli materyallerin eldesi	36
3.2.3. Homojenizasyon	37
3.2.4. Lipid peroksidasyon tayini	37
3.2.5. Antioksidan enzim aktivite düzeylerinin ölçümü	37
3.2.5.1. Süperoksid dismutaz	37
3.2.5.2. Katalaz	38
3.2.5.3. Glutatyon peroksidaz	39
3.2.6. Biyokimyasal Parametrelerin Tayini	40
3.2.7. İstatiksel Analiz	40
4. BULGULAR	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	51
ÖZET	58
SUMMARY	59
KAYNAKLAR	60

KISALTMALAR

OTA	: Okratoksin A
a_w	: Su aktivitesi
UDS	: Proplanmamış DNA sentezi
MDA	: Malondialdehit
NAT	: N-asetiltransferaz
HIOMT	: O-metil transferaz
SCN	: Suprakiyazmatik nukleus
NOS	: Nitrik oksit sentaz
SOD	: süperoksit dismutaz
CAT	: katalaz
GSH-Px	: glutatyon peroksidaz
GSH	: Redükte glutatyon
CCl_4	: Karbon tetraklorid
1O_2	: singlet oksijen
O_2^-	: süperoksit radikal anyonu
NO	: nitrik oksit
NO_2	: azot dioksit
OH^{\cdot}	: hidroksil radikali
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
ÇDYA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
ALP	: Alkalen fosfataz
ALT	: Alanin amino transferaz
AST	: Aspartat amino transferaz
LD	: Laktat dehidrogenaz
GGT	: Gama-glutamil transferaz
AlbG	: Albumin
AMFK	: N ¹ -asetil-N ² -formil-5-metoksikinuramine
INT	: 2-(4-iodophenyl)-3-4-(4-nitrophenol)-5-phenyl tetrazolium chloride

TABLolar, ŞEKİLLER VE GRAFİKLER İNDEKSİ

Şekil 1. Okaratoksin A'nın kimyasal yapısı	12
Şekil 2. Melatoninin yapısı	23
Şekil 3. Hücresel antioksidan enzim sistemi ve lipit peroksidasyon zincirini gösteren şema	32
Tablo 1. Çeşitli deney hayvanları ve hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda Okratoksin A'nın farklı etkileri	13
Tablo 2. Karaciğer dokusu antioksidan enzim ve MDA ortalamaları ve gruplar arası p değerleri.....	43
Tablo 3. Serum antioksidan enzim ve MDA ortalamaları ve gruplar arası p değerleri.....	44
Tablo 4. Karaciğer dokusu biyokimyasal parametre ortalamaları ve gruplar arası p değerleri.....	45
Tablo 5. Serum biyokimyasal parametre ortalamaları ve gruplar arası p değerleri ..	46
Grafik 1. Karaciğer dokusu antioksidan enzim aktivite ve MDA düzeyleri grafiği .	47
Grafik 2. Serum antioksidan enzim aktivite ve MDA düzeyleri grafiği	48
Grafik 3. Karaciğer dokusu biyokimyasal parametre grafikleri	49
Grafik 4. Serum biyokimyasal parametre grafikleri.....	50

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikotoksinler, çeşitli patojenik mantar türleri tarafından oluşturulan, alındıkları zaman insan ve hayvanlarda, latent, akut, subakut veya kronik toksikasyonlara neden olan sekonder metabolitlerdir (1).

Mikotoksinler çoğunlukla sindirim sisteminden girerek insan ve hayvan metabolizmasını etkiler. Toksin sindirim kanalına ulaştıktan sonra, barsaklardan emilmek suretiyle kana geçip, kan sirkülasyonu ile doku ve organlara yayılır (2).

Çeşitli araştırmalar bir mikotoksin olan okratoksin A (OTA)'nın, karsinojenik, genotoksik, teratojenik, immunotoksik ve nefrotoksik etkilerini ortaya koymuştur (3-8). OTA, DNA kırılmaları, protein sentezinin inhibisyonu, glikoneogenezis, lipid peroksidasyonu, mitokondrideki oksidatif fosforilasyonun bozulması, kanın pıhtılaşmasının engellenmesi ve apoptozise neden olması sebebiyle, insan sağlığı için büyük önem taşımaktadır (3).

Akut olarak okratoksin A'ya maruz kalma, postproksimal nefron fonksiyonunda bozulmaya yol açar, özellikle toplama kanalında, elektrolit ve titre edilebilir asit atılımında değişikliklere neden olur (9). Bunun yanında okratoksikozisin, bazı enzim seviyelerinde değişikliklere yol açtığı bildirilmiştir (10,11). Kronik olarak OTA'ya maruz kalma ise ürenin kıvamında ek bir azalmaya yol açar, ayrıca proksimal tubulün renal hemodinamiği ve salgı fonksiyonu da sürekli OTA ya maruz kalmadan etkilenir (9).

Okratoksin A, endemik nefropati ve ilişkili olduğu üriner sistem tümörlerinden sorumlu etiyolojik ajanlardan biridir. Gıdalarla bünyeye alınan OTA, başta albumin olmak üzere serum proteinlerine bağlanarak vücutta kan yoluyla dolaşmaktadır. Albumin-OTA şeklinde böbreklerde glomerular membranı geçip proksimal tubular hücrelerde pinositoz vasıtasıyla biriktirilmektedir. Uzun süreli birikim OTA'nın nefrotoksik etkisini arttırmaktadır (12-14). Hayvan deneylerinde OTA'ya bağlı nefropatik bulgular ile insanlarda spontan olarak gözlenen okratoksikozis bulgularının benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle OTA'nın, kan serumu ve bazı dokulardaki (karaciğer, böbrek) enzim seviyelerine etkilerinin önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Pineal bezden salgılanan indolaminlerin en önemlisi olarak bilinen melatonin, güçlü endojen antioksidan bir maddedir (15). Melatonin yüksek oranda toksik serbest radikalleri, ortamdan uzaklaştırma yeteneğine sahiptir (16). Ayrıca melatonin, yüksek dozlarda ve uzun süreli olarak kullanılsa bile toksik bir etkisi yoktur (15).

Bu çalışmanın amacı, ratlarda okratoksikozis oluşturarak serum ve doku enzimlerine bakmak ve bir antioksidan madde olan melatoninin bu değişikliklere etkisini araştırmaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinlerin tanımı ve tarihçesi

Bitkiler üzerinde mantarların ürediği ve zararlara neden olduğuna ait ilk bilgiler M.Ö 1200 yılından kalmadır. Romalılar zamanında depolarda saklanan tahıllarda mantarların ürediğine dair bilgiler ele geçmiştir. Pompei kazılarında bu dönemlerde çizilmiş bazı mantar resimlerine rastlanmıştır (17). XVI.asrın sonlarında yüksek yapılı fungusların tanıtılması ve sınıflandırılmasına başlanmış ve bir italyan botanikçisi olan Pier Antonia Micheli (1679-1737) mikoloji ilmini kurmuştur, fungusları ilk defa mikroskop altında incelemiş ve bulgularını 'Nova Plantarum Genera' adlı kitabında toplamıştır (18).

Mikotoksin terimi mykes (Yunanca: mantar) ve toksikum (Latince: zehir) kelimelerinin birleşmesinden oluşmuştur. Mikotoksinler, çeşitli patojenik mantar türleri tarafından oluşturulan, alındıkları zaman insan ve hayvanlarda, latent, akut, subakut veya kronik toksikasyonlara neden olan sekonder metabolitlerdir. Bu toksik maddeler, mantarların üzerinde veya içinde geliştikleri substratlara geçerler ve yayılırlar (1).

Toksijenik mantarların üremesi ve toksin sentezleyebilmesi için bazı koşullara gereksinim vardır. Bu koşullardan en önemlisi rutubettir. Genellikle %50-60 ın üstünde bulunan relatif rutubet mantarların üreme ve gelişmesi için uygundur. Bu sınırların altında da üreme olabilir, fakat bu türlere göre değişiklik gösterebilir. Diğer önemli bir faktörde optimal üreme ısıdır, yine türe göre değişiklik göstermek üzere 0-60 °C arasında üreme yeteneğine sahiptirler. Ancak, genel olarak 15°C nin üstü metabolizmaları için daha uygundur. Mantarların üzerinde veya içinde üredikleri substratın kimyasal yapısı ve pH'ı da üreme veya toksin sentezi üzerinde etkilidir. Mantarın türü de, sentezlenen toksinin çeşidi ve miktarına etkilidir (1). Küfler şartlar uygun olduğunda hemen her gıdada ürerler. Hayvanlara ve dolayısıyla insanlara topraktan da kolayca bulaşabilirler. Birinci derecede mikotoksinler, hububat, yağlı tohumlar, fındıkgiller, et ve süt ürünleri, yağ ve kuru sebzelerde oluşturulurlar (19).

Küf toksinleri ve toksik küflerin insan ve hayvan sağlığı yönünden önemleriyle tehlikeleri, 1960 yılında *Aspergillus flavus*'un ürettiği aflatoksinin

tanınmasıyla başlayan araştırmalarda aydınlatılmıştır. Kansorejen ve mutajen etkili mikotoksinler, ön planda araştırmalara girmektedirler.

Yiyeceklere ve yemlere mikotoksin kontaminasyonu dünya çapında problem olarak devam etmektedir. Birleşik devletler besin ve tarım organizasyonun tahminine göre dünya yiyeceklerinin %25 i etkili bir şekilde kontamine olmuştur (20).

Önemli mikotoksinlerin çoğunun *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinslerinin metabolik ürünleri olduğu kabul edilmektedir (21,22).

2.2. Mikotik İnfeksiyonlar ve Mikotoksikozis

Mikotoksikozis, mikotoksinlerin yol açtığı bir hastalıktır ve küflerin gelişebilmesi için uygun ortama sahip, sıcak ve nemli bölgelerde sıkça görülür (23,24). Mikotoksikozis, toksin içeren su veya çeşitli gıda maddelerinin sindirim sisteminden vücuda girdikten sonra toksinin türü, miktarı, alınan gün veya alınma miktarı, canlının veya organizmanın yaşı, cinsiyeti ve türü, çevresel koşullara bağlı olmak üzere, açık veya gizli infeksiyonlarla ortaya çıkar. Bir kez ve çok fazla miktarda alınan mikotoksinler, genellikle akut mikotoksikozislere neden olur. Latent infeksiyon gibi bazı durumlarda hiçbir klinik tablo görülmeyebilir veya atipik seyir izleyebilir (1). Epidemiyolojik, klinik ve histolojik bulgular, aflatoksin, ergot, tricothecenes, okratoksin A, 3-nitropropionik asit, zearalenone ve fumonisinlere maruz kalmanın, mikotoksikozise sebep olduğunu göstermiştir (23). *Claviceps purpurea*'nın sebep olduğu ergotizm, bilinen en eski toksikozis olayıdır. Rusya'da 1913-1947 yılları arasında meydana gelen ve "Alimentary-Toxic Aleukia" olarak adlandırılan mikotoksikozis, küflü hububatın yenilmesiyle ortaya çıkmıştır. Hastalık halkın %10 unu doğrudan etkilemiş ve çok sayıda ölüme neden olmuştur. Mikotoksikozisler bir canlıdan diğerine bulaşmazlar. Ancak, kanatlılarda toksin içeren gıdaların tüketilmesi sonucu çok sayıda toksikasyonlara rastlanmıştır. Buna örnek olarak, İngiltere'de, hindiler arasında X hastalığı gösterilebilir. Bu ülkeye 1960 yılında Brezilya'dan getirilen ve aflatoksin içeren yer fıstığı küspeleri hindiler arasında yüzbinin üzerinde ölüme neden olmuştur. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, 250 den fazla mantar türünün mikotoksin oluşturduğunu ve bunlar içinde 20 mikotoksinin insan ve hayvanlar için yüksek toksisiteye sahip olduğunu ortaya koymuştur (25,26).

Birçok mikotoksin bilimsel makalelerde tanımlansa da bunların çoğu laboratuvar koşullarında bulunmuştur. Gıda ve hayvan yemlerinde doğal olarak bulunan mikotoksinlerden en önemlileri;

Aflatoksinler; Organizmanın esas fonksiyonlarını etkiler, gelişmeyi durdururlar. Karaciğer ve böbrek başta olmak üzere çeşitli organlarda kanser oluştururlar. Afrika'da kanser etkeni olarak birinci sıradadır. Organizmada DNA ve RNA mekanizmasını karıştırır. Koyun hariç kasaplık hayvanlarda ve kanatlılarda şiddetli kansorejen tesirlidir. Çok küçük dozları dahi ördek civcivlerini öldürür.

Okratoksin; Başlıca üreticisi *Aspergillus ochraceus*'dur. A, B, C olmak üzere üç çeşidi vardır, bunlardan en şiddetli toksik olanı Okratoksin A'dır. Böbrekler üzerine çeşitli etkileri tespit edilmiş ve tedavisi imkansız nefrozlar geliştirdiği belirlenmiştir. Primer nekrotik ve hepatotoksik etkilidirler.

Sterigmatocistin; Bilhassa Afrika'da önemli kanser yapıcılar arasındadır. Sterigmatocistin oluşturan en önemli küf mantarı, *A.versicolor*'dur ve küf çok yaygındır. Başta hububat olmak üzere et ve süt ürünlerinde de *A.versicolor* bol bulunmaktadır.

Patulin ; İç organlarda ağır patolojilere ve kanseröz oluşumlara sebep olur. Sarkom geliştirdiği deneysel olarak ispat edilmiştir. Birinci sırada penicillium sınıfı küfler tarafından oluşturulmaktadır.

Penicillin asidi; Toksik ve kansorejen bileşiktir. Üreticileri, patulin gibi, birinci sırada Penicillium sınıfı küflerdir.

Citrinin; İlk olarak küflü pirinçten elde edilmiştir. Ratlardaki denemelerde, böbrek değişikliği, iç hemorajiler, nefroz, renal tübüllerde patolojik gelişmeler görülmüştür. Gram pozitif bakterilere etki eder. Birçok penicillium türü tarafından oluşturulur.

Penitrem; Deneysel olarak tavşanlara verildiğinde sinir sistemini etkileyerek epileptik adeli titremeler, hareket koordinasyon bozuklukları, kramplar belirir. Ölüm ağır intoksikasyonla beraber gelir. Üreticileri penicillium sınıfındadır (19).

2.3. Mikotoksinlerin biyokimyasal etkileri

Mikotoksinlerin biyokimyasal etkileri, mikotoksinlerin veya bunların metabolitlerinin hayvan hücrelerindeki kritik moleküllerle girdiği reaksiyonlarla tanımlanmaktadır. Bu kritik moleküllere ihtiyaç duyan yaşamsal biyokimyasal prosesin bozulması ile sonuçlanır. Bu moleküller, organizmaya etki eden toksinlerin moleküler reseptörü olarak bilinir. Yapısal ve fonksiyonel olarak değişikliğe uğrayan moleküler reseptörler, moleküler veya biyokimyasal lezyonlar olarak tanımlanırlar (27). Bu moleküllerin biyokimyasal etkilerini sırasıyla dört başlık altında toplayabiliriz (28);

- Reseptörler
- Metabolik aktivasyon ve detoksifikasyon
- Hedef bölgeler ve biyolojik etkileri
- Enerji üretiminin engellenmesi

2.3.1. Reseptörler;

Kimyasal yapıları farklı olan mikotoksinler çeşitli tipteki moleküler reseptörleri etkiler, bunlar, DNA, RNA, fonksiyonel proteinler, enzim kofaktörleri ve membran bileşikleridir. Mikotoksinler, bilgi taşıyan bu moleküllerin yapısal bütünlüğünü bozmanın yanında, hücre için yaşamsal önemi olan bu moleküllerin, proteinlerin ve diğer hücresel elemanların biyosentezini engeller.

Mikotoksinler ve moleküler reseptörleri arasındaki reaksiyon, kovalent-geri-dönüşümsüz veya non-kovalent-geri-dönüşümlü olur. Non-kovalent-geri-dönüşümlü reaksiyonda, mikotoksinlerin reseptörler ile oluşturduğu spesifik uyumlu kompleksler reseptörler ile substratlar arasındaki kompleksle karşılaştırılabilir. Bu tip reaksiyonda mikotoksinler, reseptör moleküllere özgü aktif bölgelerin üç boyutlu

yapısına yerleşir. Burada reaksiyona giren iki molekül arasında oluşan bağ, zayıf hidrojen, iyon ve non-polar bağlardır. Metabolik prosesin toksini reseptörün aktif bölgesinden uzaklaştırması, reseptör-mikotoksin kompleksinin ayrılmasıyla meydana gelen non-kovalent etkileşimlere örnektir.

Kovalent geri dönüşümsüz reaksiyonda, mikotoksinlerin reaktif formları reseptör ile birleşir ve birleşik formu oluşturur. Birçok önemli reaksiyon, reseptör moleküllerinin nükleofilik merkezlerine nonspesifik elektrofilik saldırılar neticesinde gerçekleşir, proteinler ve nukleik asitler içindeki nitrojen, oksijen ve sülfür heteroatomları, genellikle bu saldırılara maruz kalan nükleofilik merkezlerdir. Reseptörün aktif bölgesi ile mikotoksin arasında bileşik meydana geldiğinde veya reseptörün konformasyonel yapısında yeterli değişiklik olduğu zaman, kimyasal hasar oluşur ve reseptör fonksiyonu engellenir. Reseptör-mikotoksin bileşikleri hücreden, kovalent bağların spontan olarak düzenlenmesi, reseptör turnover ve spesifik onarım süreci ile uzaklaştırılır (28).

2.3.2. Metabolik Aktivasyon ve Detoksifikasyon

İlaç-metabolize edici enzimlerin kullanıldığı metabolizma veya biyolojik dönüşüm, mikotoksinler gibi yabancı moleküllerin polar duruma dönüştürülmesindeki esas mekanizmadır ve suyla karışık formları vücuttan dışarı atılarak uzaklaştırılır. İki çeşit biyolojik dönüşüm reaksiyonu vardır, Faz 1 ve Faz 2. Faz 1 reaksiyonları, genellikle oksidatif, indirgenme ve hidrolitik süreci kapsar ve Faz 2 reaksiyonları için gerekli kimyasal yapıyı sağlar, bunlar genellikle konjugasyon reaksiyonlarıdır. Faz 1 reaksiyonları, bileşiklerin detoksifikasyonu ile sonlanır. Faz 2 reaksiyonları hücresel içeriği birleştirir, detoksifikasyona veya biyokimyasal lezyonların oluşumuna öncülük eder (28).

2.3.3. Hedef bölgeler ve biyolojik etkileri

Mikotoksinler genellikle insan vücuduna besin yolu ile alınırlar. Toksin, emiliminden atılımına kadar, organizma içindeki iletiminde ve dönüştürülmesinde gerekli organlara karakteristik çeşitli tipte moleküllerle karşı karşıya gelir, iletim ve dönüştürülme işlemlerinin gerekli organda gerçekleşebilmesi için bu moleküller

toksin tanıma bölgelerine sahiptirler, bu nedenle toksinin potansiyel reseptörleridir (28).

Mikotoksinin oral uygulaması sırasında, etkileşimin en önemli bölgeleri; gastrointestinal mikroflora, intestinal epitel hücreleri, portal kan, karaciğer, safra, dolaşım kanı ve ekstrahepatik organlardır. Mikotoksinlerin toksisitesini etkileyen en önemli süreç ise bu bölgelerde bulunan enzimlerin metabolizmalarına etkileridir. Özellikle, karaciğer enzimleri, kanı oluşturan elemanlarla etkileşim, enterohepatik döngü ve hedef organlarda birikme önem taşımaktadır.

Mikotoksinler, oral olarak alındığında, birincil hedef organ olarak karaciğer görünmesine rağmen, mikotoksinlerin yapısal çeşitliliğinden dolayı diğer organlarda hedef olabilir. Gözlenen başlıca hedef organlar, karaciğer, böbrek, ince barsak, kan, üreme sistemi, merkezi sinir sistemi ve immün sistemdir (29).

Hedef organlar içinde mikotoksinler veya bunların reaktif metabolitleri, kritik moleküler reseptörlerle birleşir ve tepkimeye girer, sonuçta aşağıda verilen değişimler ortaya çıkar.

- a) spesifik ve overt hastalıklar
- b) normal fonksiyonların bozulması
- c) doğal dirençlilik ve immünite mekanizmasında azalma
- d) mutajenite, teratojenite ve karsinojenite gibi geri dönüşümsüz hücre sel transformasyon

Bazı mikotoksinlerin prototiplerinin biyokimyasal süreçteki etkileri araştırılmış, bunların toksik olarak sonlanan en önemli biyokimyasal etkilerinin, fonksiyonel makromoleküllerin aktivitesini ve biyosentezinin inhibisyonu ve hücreler içindeki enerji üretiminin inhibisyonu olduğu ortaya konmuştur (28).

2.3.4. Enerji üretiminin engellenmesi

Akut düzeyde maruz kalındığı zaman mikotoksinlerin önemli etkisi, hücre sel enerji üretiminin engellenmesidir. Buradaki moleküler reseptörler, TCA döngüsünde, oksijene elektron taşınmasında ve oksidatif fosforilasyon için ATP üretimindeki belirli anahtar reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir. Non-spesifik-geri dönüşümsüz kovalent ve spesifik geri dönüşümlü non-kovalent bağlanmanın her ikisi de bu enzimler ve toksinler arasında meydana gelir. Hücre, mikotoksinlerin biyokimyasal

etkileri sonucunda yetersiz gelen ATP'yi temin ederken, hücresel fonksiyonlar ve biyosentez azalır ve muhtemelen hücre ölümü ile sonlanır. Bazı mikotoksinler, plazma membranında önemli fonksiyonlara sahip ATPaz'ı değişikliğe uğratar (28).

Bazı mikotoksinler, oksidatif fosforilasyonda hasara yol açar. Oksidatif fosforilasyonun hasara uğramasıyla hücre içindeki ATP hızla boşalır. ATP'nin kaybıyla hücredeki sodyum-potasyum gradiyenti bozulur, bu da mitokondriyal şişmeye neden olur. Mikotoksinlerin, oksidatif fosforilasyonu hasara uğratmasıyla, hücresel elektron transportunu inhibe etme kabiliyeti arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir (28).

Mikotoksinlerin, hücresel enerji üretimini ve kullanımını etkilemesindeki bir diğer yol, ATPaz aktivitesinde meydana getirdiği değişikliklerdir. Membrana bağlı bu enzimlerin enerji üretmesi ATP'nin hidrolizine bağlıdır. Mikotoksinlerin bu enzimlerle bağlantı kurması, enzimin hücre membranı ile olan bağlantısını dolayısı ile ATP sentezi ve oksidatif fosforilasyonu etkiler. Mikotoksinlerin ATPaz'a bağlanması, transportun çeşitlerini veya geçirgenlikteki araçların fizyolojik durumunu etkileyebilir ve çeşitli tipteki hücrelerin biyokimyasal fonksiyonlarını bozabilir (28).

OTA'nın membranla yaptığı bağ, nefrotoksik etkisinin ortaya çıkmasında önemlidir. Böylece OTA, nefronun membran transport sistemindeki p-hippurik asite özel olarak etkir, bu da membrana bağlı alanin aminotranspeptidaz salınmasına neden olur, bunu lösin aminopeptid ve γ -glutamil transpeptidaz'ın salınımı takip eder (30). Bunların aktif bölgeleri nefronun fırçası kenar yüzeyinde lokalize olmuştur.

2.4. Türkiye'de Mikotoksin Sorunu

Türkiye'de mikotoksin sorunu, 1967'de Kanada'ya ihraç edilen fındıkların aflatoksin içermeleri nedeni ile geri gönderilmeleriyle gündeme gelmiştir. Yine 1971'de Amerika'ya ihraç edilen antep fıstıklarının ve 1972'de Danimarka'ya gönderilen kuru incirler aflatoksin kapsadıkları gerekçesiyle geri gönderilmişlerdir (31-33). Bu olaylar, Türkiye'de mikotoksin araştırmalarının başlamasına neden olmuştur.

Alperden ve arkadaşları (1976) piyasadan aldıkları et ve süt ürünlerini incelemişler, et ürünlerinden iki numunede aflatoksin, bir numunede sterigmatosistin, tulum peynirinde aflatoksin ve kaşar peynirinde sterigmatosistin tesbit etmişlerdir (34).

Denizel (1980) yaptığı bir çalışmada, Türkiyenin çeşitli bölgelerinden topladığı mısır örneklerinde aflatoksin ve okratoksin A bulunduğunu saptamıştır (35)

Tayfur (1991), 9 ildeki satış yerlerinden ve ailelerden topladığı bulgur örneklerinde yaptığı mikotoksin çalışmasında, numunelerde aflatoksin varlığını göstermiştir (36).

Kocabey (1995) yaptığı çalışmada, İzmir ili ve çevresindeki 4 yem fabrikasından farklı üç zamanda aldığı hayvan yemlerinde, aflatoksin, okratoksin A ve zearelenon toksinlerinin varlığını tespit etmiştir (37).

Özçelik ve arkadaşları, sağlıklı bireyler ve farklı böbrek hastalarının kan serum örneklerinde OTA düzeylerini araştırmışlar, diyaliz hastalarında diğer gruplara göre önemli ölçüde yüksek OTA düzeyleri tespit etmişlerdir ($p < 0,0001$). Mesane kanserli ve böbrek taşı olan hastalarda kontrol grubuna göre OTA konsantrasyonunu yüksek bulmuşlardır. Araştırmacılar diyaliz hastalarındaki yüksek OTA konsantrasyonunu, hastaların azalan glomerüler filtrasyon değeri ile açıklamışlar ve uzun süreli OTA ya maruz kalmanın insan üriner sistem patolojisinde rol oynayabileceğini belirtmişlerdir (38).

2.5. Okratoksinlerin Tarihçesi ve Genel Özellikleri

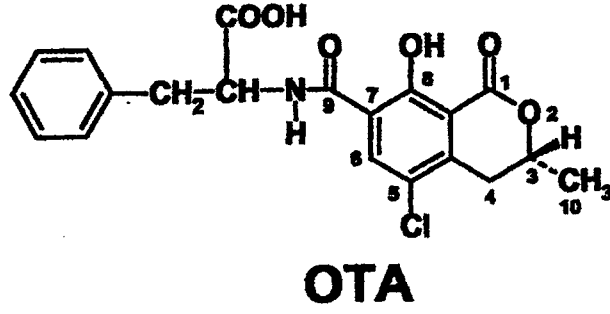
Okratoksin A (OTA), bazı *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilen (12,39-41), hayvan yemlerinde, insan gıdalarında ve bazı batı ülkelerinde insan kan örneklerinin %80' inde bulunmuş bir mikotoksindir (42). Hububatların, hububat ürünlerinin ve diğer bitkisel ürünlerin depolanması sırasında oluşturulur ve besin zincirine girer (43,44), kurutulmuş meyve, kahve ve kakaoda da bulunur (45).

Okratoksin A (OTA), 1960'ların ortalarında Güney Afrika'da, küflerde yeni toksik metabolitlerin araştırılması sırasında laboratuvar çalışmalarında bulunmuştur (46). Bulunduğu zaman, insan veya hayvan hastalıkları ile bağdaştırılamamıştır. 1969'da Amerika'da doğal olarak kontamine olmuş prinçte tesadüfen OTA'ya rastlanmıştır (47). Bu sıralarda, İskandinavya'da domuzlar üzerinde böbrek

hastalıklarında yapılan etiolojik çalışmalar, bunun küflü yemlerin tüketimi ve hava şartlarının değişmesiyle ilişkili prevalans varyasyonları, mikotoksinlerin hastalıkla ilişkili olduğu görüşünü ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmalar OTA'nın, şimdilerde mikotoksik porsin nefropati olarak adlandırılan hastalığın temel nedeni olduğunu da ortaya koymuştur (48). Bundan sonra birçok Avrupa ülkesinde toksin, buğdaya kontamine şekilde bulunmuştur. Benzer şekilde Kuzey Amerika'da ve birçok Avrupa ülkelerinde OTA bulunuşu, porsin nefropati ile ilişkilendirilmektedir. Birçok Avrupa ülkesinde, OTA insan kanında tespit edilmiştir ve toksin, balkan yarımadasının kırsal kesminde görülen nefropatinin nedeni olarak düşünülmüştür (28).

OTA, *Penicillium verrucosum* ve *Aspergillus ochraceus*, az miktarlarda da *Aspergillus niger* tarafından oluşturulur. Bu üç tür, ekolojik nişleri, etkiledikleri ürünler ve değişik coğrafik bölgelerde bulunma sıklıklarına göre farklılıklar göstermektedir. *P.verrucosum*, 30 °C sıcaklık ve su aktivitesi (a_w)= 0,80'nin altında gelişir. Dolayısıyla sadece ılıman bölgelerde bulunur, Kanada ve Avrupa'da, hububat ve hububat ürünlerinde bulunan OTA'nın kaynağıdır (49).

OTA, beyaz, kristal bir tozdur. Ksilen ile yeniden kristalize edilebilir. Kristal formda, ultraviyole altında, asit solüsyonda yeşil alkalın solüsyonda mavi fluoresans verir, bu kristallerin erime noktası 169°C dir. OTA'nın serbest asidi polar organik çözücüler içinde çözülebilir. OTA, ışık ve havada stabil değildir. Işık ve özellikle nemli koşullara maruz kaldığı zaman bozulabilir ve etkisini kaybedebilir. Etanol solüsyonunda, karanlık ve soğukta muhafaza edildiği zaman, bir yıldan fazla stabil kalabilir. OTA, sıcağa karşı oldukça stabildir; hububat ürünlerinin otoklavda (121 C°, 1 Atm) 3 saat kalması durumunda da toksinin %35 i etkinliğini sürdürür. Isıyla ayrıştırıldığı zaman toksinden, klorun toksik buharı ve nitrik oksit ortama verilir. Normal koşullar altında Okratoksin A ve B oluşturulur. Okratoksin B, Okratoksin A dan daha az toksiktir ve karaciğer hücrelerinde protein biyosentezini inhibe etmez. OTA, dihidro-metil-izokumarin halka sisteminde C5 üzerinde klor atomuna sahiptir, bu atom okratoksin B de bulunmaz ve klor atomuna fenolik OH eklenmesi toksisiteyi artırır. Fenilalanin ve dihidroizokumarin bileşikleri, amid bağı ile bağlanırlar, bu bağı ısıya ve hidrolize karşı çok stabildir (Şekil 1.) (50).



Şekil 1. Okaratoksin A'nın kimyasal yapısı

Çeşitli araştırmalar OTA'nın, karsinojenik, genotoksik, teratojenik, immunotoksik ve nefrotoksik etkilerini ortaya koymuştur (43,51-55). Deneysel hayvanları ve hücre kültürleri ile yapılan çalışmalara ait sonuçlar tablo 1 de verilmiştir (56-86). DNA kırılmaları, protein sentezinin inhibisyonu ve glikoneogenezis, lipid peroksidasyonu, mitokondrideki oksidatif fosforilasyonun bozulması, kanın pıhtılaşmasının engellenmesi ve apoptoza neden olması , OTA'nın insan sağlığı için büyük önem taşıdığını göstermektedir (43).

2.5.1. Biyosentezi ve Çeşitleri

Okratoksinin moleküler formülü 1965 yılında Van der Merwe ve arkadaşları tarafından 7-karboksi -5 kloro-8 hidroksi 3,4 dihidro 3 metilizokumarin olarak açıklanmıştır (46).

Okratoksinler, L-β fenilalanine amid bağı ile bağlı izokumarin türevleridir. Biyosentetik orijinine göre poliketidler grubu içinde pentaketidler olarak sınıflandırılmıştır (87). Pentaketitler, asetil ve malonil CoA'dan oluşur. Pentaketit, sikülizasyon ve aromatisasyon ile izokumarine dönüşür. Karboksi türevinin metilasyon, oksidasyon, klorinasyon ve asit aktivasyonları ile şikimik asit yolu sonrası oluşan fenil alanin ve fosfookratoksin A, Okratoksin A'yı (OTA) oluşturmaktadır.

Klorinasyon aşamasının kloroperoksidaz enziminin varlığı ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Kloroperoksidaz düşük substrat spesifitesi gösteren, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan ve doğal olarak bulunan ikiyüzden fazla halojenlenmiş maddelerin biyosentezini uyaran bir enzimdir. Okratoksin

Tablo 1. Çeşitli deney hayvanları ve hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda Okratoksın A'nın farklı etkileri
(Reich K. Doktora Tezi, Freien Üniversitesi Veteriner Fakültesi 1998 Berlin)

Deney Hayvanı	Okratoksın A dozu	Etkisi	Kaynak
Rat	21; 70; 210 g/kg KGW/d	Erkeklerde dişiye göre daha fazla böbrek tümörleri	BOORMANN, 1989 (57)
Rat	0,1-1 mg/kg Futur	Immünyüpresyon, T lenfositleri	JAHN ve PINK-GREMMELS, 1988 (58)
Rat	1,75 mg/kg KGW	Strotoksik	ALBASSAM et al., 1987 (59)
Rat, gebe	0,75-1 mg/kg KGW	Malformasyon	MAYURA et al., 1982 ve 1983 (60, 61)
Rat, gebe	0,75-1 mg/kg KGW	Yağların emilimi, gelişme geriliği	BROWN et al., 1976 (62)
Rat, Rat, Hamster, Tavuk		teratojen	FUKUI et al., 1987 (63)
Fare	1 g/kg KGW	Immünyüpresyon	CREPPY et al., 1983 (64)
Fare	5 mg/kg KGW	Lenfosit - stimülasyonu	PRIOR ve SISODIA, 1982 (65)
Fare	40 mg/kg KGW	Karaciğer ve böbrek tümörleri	KANIZAWA ve SUZUKI, 1978 (66)
Fare	40 mg/kg KGW	Böbrek tümörleri	BENDELE et al., 1985 (67)
Fare	0,34-13,4 mg/kg KGW	Ödintrud hücrelerin inhibisyonu	LUSTER et al., 1987 (68)
Fare	0,005 g/kg KGW	Immünyüpresyon	HAUBECK et al., 1981 (69)
Fare		Ödintrud hücreler, kanserojen	LOTZOVA ve HERBERMAN, 1986 (70)
Fare, gebe	5 mg/kg KGW	feotoksik, mutajen	HAYES et al., 1974 (71)
Fare, gebe	2-4 mg/kg KGW +T-2 Toxin	feotoksik, mutajen	HOOD et al., 1978 (72)
Fare, gebe	3-5 mg/kg KGW	embriyotoksik	SZCZECH ve HOOD, 1981 (73)
Hamster	5-20 mg/kg KGW	feotoksik, teratojen	HOOD et al., 1976 (74)
Tavuk	4 u. 8 µg/g Futur	Immünyüpresyon, Bursa fibroci	HARVEY et al., 1987 (75)
Tavuk	0,5-2 mg/kg KGW	Immünyüpresif	CHANG ve HAMILTON, 1980 CHANG, 1982 (76,77)
Tavuk	0,2 u. 4 mg/kg KGW	Hücreesel bağışıklık Timsu, Bursa fibroci u. Miltz	SINGH et al., 1990 (78)
Hindî	4 mg/kg KGW	Immünyüpresif	DWIVEDI ve BRUNS, 1984 (79)
Kıpçak	0,2-3 mg/kg KGW	Immünyüpresif	DWIVEDI ve BRUNS, 1985 (80)
Domuz	1-2 mg/kg KGW	Lenf dğğünü nekrozu	SZCZECH et al., 1973 a (81)
Domuz	2,5 mg/kg KGW	Lenf dğğünü nekrozu	SZCZECH et al., 1973 b (82)
Domuz	0,06-4 mg/l Blut	Hücreesel immüniti	HARVEY et al., 1992 (83)
Domuz lenfositli	100 M	Lenfosit-stimülasyonu	HOLMBERG et al., 1988 (84)
Idrar torbasi epitelî	100 pM - 100 nM	Immünglobulin sentezinin azalması	PINK-GREMMELS ve JAHN, 1992 (85)
		Kardes kromatid değişimi	DEGEN et al., 1995 (86)

sentezinde bu enzim alıcısı klorür iyonlarıdır. Kloroperoksidaz içeren organizmaların her klorine olmuş madde için, dekloro türevi üretmeleri bu organizmaların bir özelliğidir. Bu özellik okratoksini oluşturan mikroorganizmaları da kapsar. Okratoksindeki klorin fenolik grubu para formundadır. Okratoksin biyosentezindeki iki ana kısmın (fosfookratoksin a ve fenilalanin etil esteri) oluşmasını, bunların birleşme reaksiyonları takip eder. Birleşme reaksiyonu, okratoksin sentetaz kompleksi ile olur, ATP ve Mg^{++} reaksiyon için gereklidir (88).

Yapılan çalışmalar ışığında, okratoksinin beş türevi olduğu bilinmektedir. Bunlar; Okratoksin A, B, C, α ve β 'dir. Bunların içinde toksik açıdan en önemlisi OTA'dır, molekül ağırlığı 403,83, kimyasal formülü $C_{20}H_{18}C_1NO_6$.

2.5.2. Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Mikotoksin oluşumunu etkileyen temel faktörler su aktivitesi (a_w) ve ısıdır. Gıda içerisinde bulunan suyun mikroorganizmaların kullanımına açık olmaması gerekir. Gıda, mikroorganizma ilişkisi açısından faydalı su, a_w değeri ile belirlenir, Su aktivitesi değeri, substrattaki su buharı basıncının saf suyun buhar basıncına bölünmesiyle elde edilen bir parametredir. *A.ochraceus* ile yapılan üretim çalışmalarında, optimal üremenin 20-30 °C arasında olduğu görülmüştür. En yüksek üretimin 30 °C de ve su aktivitesinin 0,953 (%39 su içeriği, % kuru ağırlık) olduğu tespit edilmiştir. Düşük sıcaklıklarda örneğin 15 °C'de nem gereksinimi yüksektir ($a_w= 0,997$ veya %52 nem). *Penicillium* cinsi, düşük sıcaklıklarda gelişebilen türleri içerir. Düşük inkübasyon sıcaklıklarının etkilerinin araştırılması, *P.viridicatum* suşlarının, 5-10 °C'de OTA üretebildiklerini göstermiştir. Bunlar için a_w değeri 0,95-0,99 arasındadır. Optimum a_w -de ısı aralığı 4-31 °C'dir. Bu durum Kanada ve İskandinavya gibi soğuk iklime sahip ülkelerde, OTA kontaminasyonundan *Penicillium*, Yugoslavya ve Avusturalya gibi sıcak iklime sahip bölgelerde ise % 28-50 oranında OTA üretiminden *Aspergillus ochraceus* türlerinin sorumlu olduğunu gösteriyor (28).

Bu kriterlerin yanında okratoksinlerin üreyebilmesi için pH da önemli bir faktördür. Yukarıda belirtilen mantarların gelişebildikleri pH aralığı 3,9-9,1'dir (89). Ayrıca küfler aeorobik mikroorganizmalar olduklarından oksijensiz ortamlarda gelişemezler.

2.6. Okratoksin A'nın Organizmadaki Değişim Süreci

2.6.1. Absorbsiyonu

OTA'nın gastrointestinal sisteme girişi gıdalar vasıtasıyla olur, geri emilimin hangi kısımda gerçekleştiği hakkında çeşitli görüşler vardır. OTA konsantrasyonunun, ratlara yem ile verildikten sonra en yüksek düzeyde mide mukozasında bulunduğu, enjeksiyondan sonra barsak sisteminde en yüksek absorpsiyon değerinin ince barsakta olduğu gösterilmiştir (90). OTA'nın barsak sisteminde emiliminin, domuzlarda %65.7, tavşanda %55.6, tavuklarda %40.0 olduğu bildirilmektedir. OTA, kanda serum albuminine bağlanır ve organizmaya dağılır (91).

Tek doz 10 mg/kg OTA'nın gavaj ile ratlara verildiği bir çalışmada, ilk dört saat sonunda , değişikliğe uğramamış OTA'nın en yüksek seviyeleri mide duvarında bulunmuştur. İnce ve kalın barsak az miktarlarda değişikliğe uğramamış OTA içerir, OTA'nın absorpsiyonu başlıca midede olur. Çekum ve kalın barsakta az miktarlarda izokumarin kısım (okratoksin α) tespit edilmiştir, bu barsak mikroflorasının hidroliz etkisinin sonucudur (92). Aynı hayvan türleri kullanılarak barsak absorpsiyonu üzerine yapılan çalışmada ulaşılan sonuç; maksimum absorpsiyonun olduğu bölge proksimal jejunumdur, ve portal ven, intestinal yoldan OTA transportunda primer yol olmasına rağmen bazı transport işlemleri lenfatiklerden olur.

2.6.2. Dokularda parçalanması ve metabolik dönüşümü

Hold ve Krogh tarafından mezbahane örneklerinde yapılan mikotoksik porsin nefropati çalışmalarında, değişmemiş OTA artıkları çalışılan bütün dokularda (böbrek, karaciğer, kas) bulunmuştur. En yüksek seviyelerde OTA (67 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 'ya kadar) böbrekte tespit edilmiştir. OTA içeren yemlerle beslenen domuzlarla yapılan çalışmada, toksin artıkları başlıca böbrek, karaciğer, kas ve adipoz dokuda bulunmuştur (93). Daha sonra yapılan bir çalışmada, domuzdaki OTA atıklarının en yüksek konsantrasyonu, önceki dokularla karşılaştırıldığı zaman, kanda bulunmuştur (94). Ratlara 10mg/kg OTA uygulamasından 96 saat sonra, uygulanan dozun böbrekte %0.3'ü, karaciğerde %0.9'u, toplam kas dokusunda %0.6'sı tespit edilmiştir. Chang

ve Chu 1977 de rat başına 1 mg/kg OTA'nın (fenilalanin içinde işaretli C14) intraperitoneal enjeksiyonundan yarım saat sonra karaciğerden iki kat daha fazla değişmemiş OTA'yı total dozun %4-5'i kadar böbrekte bulmuşlardır.

2.6.3. Eliminasyonu ve Atılımı

OTA'nın eliminasyonu böbrekte ve barsakta gerçekleşir (95). Elling ve arkadaşları, dört domuza 5 gün boyunca 800 µg/kg OTA uygulamışlar, bu hayvanların üre ve safra salgılarında OTA ve OTA'nın çeşitli metabolitlerini tespit etmişlerdir (96).

Deneysel olarak, oral yolla verilen OTA'nın yarılanma ömrü, intravenöz enjeksiyona göre daha kısadır. Toksinin bir bölümünün eliminasyona uğradığı bölge karaciğerdir, daha sonra safrayla atılır ve sistemik kan dolaşımına girer. Karaciğerin temizlenmesi, karaciğer hücrelerinin membranında bulunan OATP (organic anion transporting polipeptid carrier) taşıyıcıları ile gerçekleşir (43). Eliminasyonun diğer önemli organı böbrektir (43,97-100). OTA'nın, doğal olarak bulunan doymamış konsantrasyon aralığı 1-100 nM dır, plazma proteinine %99 bağlanma potansiyeli gösterir. Bu yüzden OTA glomerüler filtrasyonla ortamdan uzaklaştırılmaz, daha çok tübular eliminasyon ile üreye geçer. Bu süreçte, proksimal tübül hücresinin bazolateral hücre membranındaki para-aminohippuronikasit taşıyıcı sistemi gibi diğer multispesifik ksenobiotik taşıyıcılar aracılık eder. Probenesid, bu taşıyıcı sistemin inhibitörüdür ve OTA'nın nefrotoksitesini azaltma eğilimindedir. Proksimal tübül kökenli böbrek hücrelerinin, uzun süreli nanomolar konsantrasyonda OTA'ya maruz kalması, hücrenin genel fonksiyonunu etkilememekle beraber organik anyon transportunu azaltır. Bu hücrelerden OTA'nın salgılanması azalırken, diğer ksenobiotik taşıyıcıların ve ilaçların dışarı atılması da azalır. OTA, bütün nefron segmentlerinden geri emilir. Bu süreç toksinin böbrek dokusunda birikmesine ve toksitesinin artmasına neden olur. Ara-taşıyıcıların toksini kandan ayırması organizmanın toksik yükünü azaltır, fakat aynı anda böbrek ve karaciğer üzerindeki eliminasyon yükünde artışa neden olur. Safra kesesinden uzaklaştırılan toksini ayıran ince barsaklardır. Bu yüzden özel toksik etkileri bu organlarda gözlenir (43).

2.7. Okratoksin A'nın Hayvanlar Üzerine Etkileri

2.7.1. Akut ve Kronik Etkiler

Patofizyolojik çalışmalar, OTA'nın nefron boyunca değişik bölgeleri etkilediğini göstermektedir (96-99). Akut olarak OTA ya maruz kalma, postproksimal nefron fonksiyonunda bozulmaya yol açar. Özellikle toplama kanalında elektrolit ve titre edilebilen asit atılımında değişikliklere sebep olur. Bu mekanizma; OTA'nın nanomolar konsantrasyonları ile kültür böbrek hücrelerinde görülen hücresel asit-baz dengesinin bozulması ve plazma membrandaki anyon iletiminin engellenmesi ile benzerlik göstermektedir. Hücresel pH dengesinin bozulması, OTA'nın kültür böbrek hücrelerine geçişi ile ortaya çıkabilir. Kronik olarak OTA'ya maruz kalma ürenin kıvamında azalmaya neden olur. OTA'ya kronik maruz kalma, proksimal tübülün renal hemodinamiği ve salgı fonksiyonunu etkilediği halde akut maruz kalma etkilememektedir. OTA, renal kan akışını ve glomerular filtrasyon oranındaki azalma ile vas efferens'in geçirgenliğini artırır. Proksimal tubuler hücreler, organik anyonların salınma kapasitesinde bir azalma ile OTA ya yanıt verir. Aminosit gibi küçük moleküllerin emilme kapasiteleri minör derecede etkilenir ancak albuminin endositotik alınımı oldukça azalır. OTA, rat proksimal tübül hücre kültürüne nanomolar konsantrasyonlarda uygulandığında mutajenik potansiyele sahiptir, ancak mikromolar konsantrasyonlarda hücre gelişimini inhibe eder. OTA, doz ve zamana bağlı olarak renal fonksiyon üzerinde kompleks etkiler ortaya çıkarır (42).

İki yaşında wistar ratlar, tek doz 1.25 mg/kg vücut ağırlığı (v.a.) OTA'ya maruz bırakıldıktan iki saat sonra, plazma konsantrasyonunun 89.7 ± 15.1 $\mu\text{mol/L}$ ve üredeki OTA konsantrasyonunun 22.4 ± 1.9 $\mu\text{mol/ml}$ olduğu gözlenmiştir. İç medulla ve böbrek papillasında yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kortikal ve dış medullar dokudaki konsantrasyonlar, en yüksek değerlerin yarısı kadardır. Altı gün süre ile 0.5 mg/kg v.a. OTA'ya maruz bırakılan iki yaşındaki ratlarda plazma konsantrasyonu 23.0 ± 0.4 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunmuş, ayrıca OTA iç medulla ve böbrek papillasında da yüksek oranlarda toplanmıştır. Birbirini takip eden altı günlük uygulama (0.5 mg/kg v.a. OTA günlük) yapılan altı haftalık ratların plazmalarındaki OTA konsantrasyonu,

iki yaşındakilere göre önemli derecede düşük bulunmuştur. Altı haftalık ratların böbreklerinde yüksek konsantrasyonda OTA papilla ve i medullada tespit edilmiştir. Kortikal dokudaki bir miktar OTA, akut maruz kalmaya göre önemli derecede düşüktür. 0.5 mg/kg OTA'ya maruz kalan yaşlı ve genç ratların relerindeki OTA konsantrasyonlarında önemli derecede farklılık olmadığı bildirilmektedir (100).

2.7.2. Biyokimyasal Etkileri

OTA, çeşitli mikroorganizmalarda (*Bacillus subtilis*, *B.stearothermophilus*, *Streptococcus faecalis*, mayalar) olduğu gibi, rat karaciğer hücrelerinde de tRNA sentetazın ve protein sentezinin inhibitörüdür. OTA'nın, tRNA sentetaz ve protein sentezi üzerindeki geri dönüşümlü inhibitör etkisi, fenilalanin tarafından engellenir, okratoksin A'nın hasara yol aması, bu engellemenin ölçütü ile bire bir ilişkilidir. OTA'nın (LD₁₀₀) farelerde akut intraperitonel etkisi, beraber enjekte edilen fenilalanin ile nlenmiştir(28); bu bulgular, hayvanlar üzerindeki kronik etkilerinin (nefropati), fenilalanin ile önlenebileceğini düşündürmektedir.

Belirli konsantrasyon (20-1667 µg/ml) aralığında çalışılan OTA, %47-50 oranında makrofaj migrasyonunun inhibe olmasına yol açar; bu etki, eş zamanlı fenilalanin eklenmesi ile önlenebilmektedir (28).

OTA, ratlarda karbonhidrat mekanizmasını etkiler. Tek doz 15 mg/kg oral OTA uygulamasından dört saat sonra karaciğerdeki glikojen seviyesinin azalmasına ve kalp glikojen seviyesinin artmasına yol açar. Ratlar zerindeki daha kapsamlı bir araştırmada, karaciğer glikojen seviyesindeki azalışın, serum glukoz seviyesinin artmasıyla ve karaciğer glukoz-6 fosfatın azalmasıyla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda, karaciğer glikojen sentetaz aktivitesi azalmış ve karaciğer fosforilaz aktivitesi artmıştır.  gün, 5mg/kg oral OTA uygulaması sonrası 4. gün karaciğer glikojen seviyesinin azaldığı gözlenmiştir. Bu azalmanın nedeni, karaciğerde glukozun aktif transportunun inhibisyonu, glikojen sentezinin glukoz tarafından baskılanması ve glikojen yıkımının hızlanmasıdır (28).

Rat karaciğer mitokondrisi ile yapılan in vitro çalışmalarda, OTA'nın, karaciğerde mitokondri iç membranında lokalize olmuş taşıyıcı proteinlerin taşıma işlevini inhibe ederek, mitokondrial solunumu hasara uğrattığı bildirilmiştir.

Mitokondrial örneklerle yapılan diğer çalışmalarda, OTA'nın mitokondriye alınmasının enerji kullanma sürecinde mitokondri içi ATP'nin tüketilmesine yol açtığı ve OTA'nın, mitokondri içi fosfat transportunu inhibe etmesinin mitokondrinin bozulmasıyla sonuçlandığı bildirilmiştir (28).

Domuzlarla yapılan bir çalışmada, 0.2 ve 1 ppm OTA beş hafta verilmiş ve uygulamanın başlangıcından sonraki 1., 3. ve 5. haftada toplanan renal biopsilerdeki enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Bir hafta sonunda renal PEPCK (fosfoenolpiruvat karboksikinaz) ve γ -glutamiltranspeptidaz aktiviteleri %40 azalmıştır. Bu enzimlerin aktivitelerinin azalması renal hasarın ağırlaşmasıyla ilişkilidir (28).

2.7.3. Mutajen Etkisi

Okratoksin A (OTA), deney hayvanlarına uygulandıktan sonra, DNA adduct formlarının oluşmasına yol açan nefrotoksik ve nefrokarsinojenik bir mikotoksindir. OTA, DNA çift zincirinde kırılmalara yol açar ve iki rodent türünde karsinojenik olduğu gösterilmiştir.

1985 Creppy et al., OTA'nın fare dalak hücre kültürlerinde DNA'nın çift zincir yapısında kırılmalara yol açtığını göstermiştir. Fare ve ratlara uygulanan tek doz veya kronik OTA uygulaması sonucunda (in vivo) böbrek, karaciğer ve dalak DNA'sında da bu kırılmalara rastlanmıştır. Bu sonuç Stetina ve Votava tarafından da doğrulanmıştır. Sonradan OTA uygulamasının değişik organlarda, değişik şekillerde DNA adductlarına hem farede hemde ratlarda yol açtığı gösterilmiştir. Yüksek seviyelerde DNA adductları fare karaciğeri ve idrar kesesinde bulunmuştur. Geç gebelik döneminde OTA uygulamasından sonra, DNA adductları yeni nesilde de gözlenmiştir. OTA ile muamele edilmiş değişik hücre kültürlerinde de DNA adductlarına rastlanmıştır; örnek olarak maymun böbrek hücreleri, insan bronşiyal epitel hücreleri ve domuz ağız epitel hücrelerinde. Rat böbreğindeki DNA adductları, OTA'nın renal karsinojenitesi ile ilişkilidir. Buna ek olarak, OTA'ya maruz kaldığı sanılan Balkan Endemik Nefropatili (BEN) hastalardan toplanan cerrahi doku örneklerindeki (böbrek, pelvis, mesane) DNA adductları, OTA uygulanan farelerin böbreklerdeki ile benzerdir (101).

Domuz mesane epitel hücre kültürlerinde SCE frekansını ve kültüre alınan X-trizomili insan lenfositlerinde kromozom anomalilerini artırır. Sığır seminal vezikül hücre kültürlerinde mikronükleus formlarının artmasına sebep olmaktadır. OTA'nın, kültüre alınan domuz mesane epitel hücrelerinde 25-1000nM konsantrasyon aralığında proglanmamış DNA sentezine (UDS) yol açtığı gösterilmiştir. OTA'nın nanomolar konsantrasyonu ile inkübasyona bırakılan böbrek toplama kanalından çoğaltılan MDCKC7 hücrelerinde de morfolojik farklılaşmaya yol açtığı tespit edilmiştir. Buna ek olarak, sayısal kromozom anomalilerinde genotipik değişiklikler gözlenir ki bu, renal adenom ve karsinomların insidansının artmasıyla ilişkilidir (101).

Manolava et al. (1990), 15 nm OTA konsantrasyonunda kültür insan lenfositlerini üreterek özellikle X kromozomu üzerinde kromozom anomalilerini tanımladı. Bundan başka Creppy et al. (1985), OTA'yı erkek BALB/c farelerine intraperitoneal enjekte ederek DNA hasarlarını böbrek, karaciğer ve dalakta çift sarmal kırıkları şeklinde tespit ettiler. Dalak hücrelerinde DNA hasarı in vitro olarak doğrulanmıştır. Kane 1986, OTA'yı az miktarlarda ratlara vererek renal ve hepatik dokularda DNA çift sarmal kırıklarını bildirmiştir. Maleville et al. (1991), OTA'nın, E.coli PQ37 suşunda SOS DNA tamirini uyardığını gösterdiler. Buna ilaveten OTA'nın rat hepatositlerinde mutajenik yanıtta aracılık ettiği, Salmonella typhimurium' un bazı suşları kullanılarak Hennig et al. tarafından da tespit edilmiştir (102).

OTA'nın genotoksik etkisinin daha iyi anlaşılması için OTA-DNA adduct formasyonları ve farelere 2,5 mg/kg oral OTA uygulamasından sonra ³²P işaretleme yöntemi kullanılarak ölçümler yapılmıştır. OTA uygulamasından 24 saat sonra, böbrek, karaciğer ve dalakta DNA içinde birçok değişmiş nükleotid açıkça tespit edilmiştir. Total DNA adductları 48 saat sonunda maksimum değere ulaşır, 10⁹ nükleotitte böbrekte 103, karaciğerde 42, dalakta 22 bulunmuştur. Görüldüğü gibi genotoksisitenin ve karsinojenitenin ana hedefi böbreklerdir (102).

OTA'nın mutajenitesi bakteri ve memeli hücrelerinde araştırılmış ve her iki testte de negatif sonuçlar elde edilmiştir. 0.5-500 µg/plak konsantrasyon aralığı kullanılarak, Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, TA1535, TA 1537 suşları ile yapılan testte bakteriyel mutasyonlar görülmemiştir. Diğer çalışmada S.typ. TA1535, TA1537 ve TA 1538, Saccharomyces cerevisie D-3 suşları kullanılmıştır. OTA ile

%85 OTA ve %15 OB karışımı 0.1, 1, 10 ve 100 µg/plak konsantrasyonlarında test edilmiş. Test sonuçlarına göre; OTA negatif fakat OTA ve OB karışımı, TA1538 suşunda frameshift mutasyonlara yol açtığı tespit edilmiştir (103).

Memeli hücrelerindeki mutajenik aktivitesi C3H fare, meme kanseri hücrelerinde 8-azaguanin direçliliği için araştırılmış. 10 ve 5 µg OTA/ml konsantrasyonlarında mutajenik aktivite gözlenmemiştir. Bunun yanında 10 µg/ml hücreler için toksik ve 5 µg/ml toksik değildir (103).

2.7.4. Kansorejen Etkisi

Üç fare ve bir rat türünde OTA'nın kanser oluşturma riskinin araştırıldığı bir çalışmada, böbrek ve bir bölümü olan tübüler epitel hücrelerin, lezyonların ortaya çıktığı birincil hedef bölgeler olduğu görülmüştür. Erkek ddY ve DDD farelerinde, atipik hücre çoğalmasına, renal tübüler hücrelerde epitelde gelişip yer yer kistik oluşumlar gösteren iyi ve kötü huylu tümör oluşumuna neden olmuş, karaciğerde tümör yapısında nodül ve karaciğer hücre tümörleri oluşturmuştur. B6C3F1 erkek farelerde, tübüler hücre adenomları ve karsinomlarına yol açmakta, karaciğer hücresi adenom ve karsinomlarının insidanslarını yükseltmektedir. Erkek ve dişi F344 ratlarda OTA, tümöral (adenomlar ve metastas gösteren karsinomlar) ve tümöral olmayan (dejenerasyon, çekirdek büyümesi, proliferasyon, sitoplazmik değişiklikler, hiperplazi), etkilere yol açmakta; dişi ratlarda, meme bezlerindeki fibroadenomların insidansını yükseltmektedir. Çeşitli gıdaların tüketimi ile OTA'ya maruz kalan insanlarda da toksik ve karsinojenik etkileri olduğu tahmin edilmektedir (54).

Yirmidört ay süren bir çalışmada, 50 erkek ve 50 dişi B6C3F1 fareleri gruplara ayrılmış ve grup başına 0.1 veya 40 ppm OTA ile beslenmiş, 40 ppm doz uygulanan gruptaki erkek farelerde renal neoplazmalar, karsinom ve adenomlar artmıştır. Renal karsinom görülen 49 hayvandan 14'ü en az 20 ay hayatta kalmış, 26 farede renal adenomlar görülmüştür. 40 ppm doz grubundaki farelerde nefropati (renal tubuler genişleme, astarlayan epitelde yassılaşıma veya hiperplazi ve rejeneratif tübüllerde hücre çoğalması) gelişmiştir. OTA ile beslenen erkek ve dişi farelerde karaciğer hücre neoplazmalarının insidansında az miktarda artış tespit edilmiştir. Bu

çalışma OTA' nın erkek B6C3F1 farelerde renal karsinojen olduğunu ayrıca erkek ve dişi farelerde zayıf karaciğer karsinojeni olduğunu ortaya koymuştur (104).

OTA, kemirgenlerde nefrotoksik ve kuvvetli renal karsinojendir. Çeşitli çalışmalar, OTA' nın oksidatif hasara yol açtığını göstermiştir. İn vitro olarak NADPH varlığında rat karaciğer mikrozomlarının inkübasyonu ile yapılan bir çalışmada, lipid peroksidasyonunun biomarkırı olan malondialdehit (MDA) oluşumunun arttığı bildirilmiştir. MDA, lipid peroksidasyonunun son ürünüdür, bu yüzden oksidatif ve hücrel hasarın geç biomarkırı olarak düşünülebilir. Lipid peroksidasyonunun diğer bir markırı da etan ekshalasyon oranındaki artıştır, yüksek dozda OTA (6mg/kg) uygulanan ratlarda gözlenmiştir. Oksidatif hasarda ve DNA bozulmalarında kullanılan diğer bir biomarkır 8-oxo-7,8 dihidro-2'-deksiguanozin (8-oxodG) dir ve ratlar bazı oksidantlara ve renal toksinlere maruz bırakıldığı zaman 8-oxodG' da artış olduğu belirtilmektedir (52).

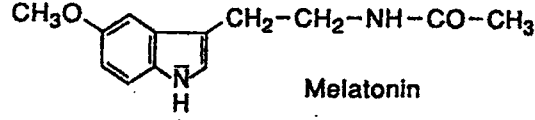
OTA, lastik sonda ile uygulandığında, erkek ve dişi ratların böbreklerinde tübüler hücre ve karsinomların insidansını yükseltmektedir. Aynı zamanda OTA, dişi ratların meme bezlerinde fibroadenomların insidanslarını ve çeşitliliğini artırır. OTA'lı yemlerle beslenen erkek farelerde renal adenomlar ve karsinomlar gözlenmiş, dişi farelerde karaciğer hücre karsinomlarına rastlanmıştır. Benzer bir çalışmada, erkek ratlarda hepatomlara ve renal hücre tümörlerine yol açtığı görülmüştür. OTA ile yapılan uzun süreli karsinojen çalışmalarında Kanisawa ve Suziki ve Bendele et al. tarafından renal adenom ve karsinomlar gözlenmiştir (50).

2.8. Melatonin Hakkında Genel Bilgi

2.8.1. Tanımı ve Yapısı

Pineal bezde sentezlenen bir nörohormon olan melatonin yapıcı N-asetil 5 metoksi triptamindir (Şekil 2). Melatoninin kandaki yarılanma ömrü 10-40 dakika civarındadır. İnsanda ortalama 28.4 dakika olduğu bildirilmiştir. Hormonun %90'ı karaciğerde hidrosillenir, kan ile tüm vücut sıvılarına nakledilir (105). Atılımı ise 6-hidroksimelatonin ve kinürenaminlerin glikuronid ve sülfat bileşikleri şeklinde %20

feçesle, %70 idrarla olur. Serbest melatonin halinde %'1'i ve 5 metoksiindolasetik asit olarak % 0.5'i geçmemek üzere idrarda bulunabilir (106).



Şekil 2. Melatoninin yapısı

2.8.2. Sentezi

Sentezin başlangıç basamağını, sistemik dolaşımdan triptofanın pinealosite aktif geçişi oluşturur. Triptofan, önce triptofan hidroksilaz ile orto pozisyonundan hidroksillenerek 5-hidroksitriptofana dönüşür. Bunu aromatik aminoasit dekarboksilazların kataliz ettiği dekarboksilasyon reaksiyonu izler. Oluşan ürün önemli bir biyolojik amin olan 5-hidroksitriptamin (serotonin) dir. Serotonin, N-asetiltransferaz (NAT) ve hidroksiindol O-metil transferaz (HIOMT)'ın birbirini takip eden aktiviteleri ile melatonine dönüşür.

Pineal bezde melatonin sentezi sirkadyen bir ritim gösterir ve karanlık faz boyunca maksimum noktasına ulaşır. Bu ritim suprakiazmatik nükleuslar tarafından algılanan aydınlık-karanlık dönüşümü ile sağlanır. Karanlığın başlamasıyla sinir uçlarından noradrenalin salgılanır, bu da pinealositlerdeki β -adrenerjik reseptörleri uyarır. Adenilat siklaz aktivitesinin artmasıyla oluşan cAMP, NAT sentezini uyarır. NAT'ın enzimatik aktivitesinin gece boyunca artışı serotonin düzeylerini düşürür, buna bağlı olarak N-asetilserotonin ve melatonin düzeylerini artırır. Melatonin sentezini uyarıcı diğer bir mekanizma, fosfoinozitol sistemiyle bağlantılı α -1adrenoreseptörler olup burada Ca^{+2} -fosfolipid bağımlı protein kinaz C yoluyla cAMP uyarılması gerçekleşir (107).

2.8.3. Etki Mekanizması

Melatonin, lipitte çözünebildiğinden hücre membranını kolaylıkla geçer ve tüm hücre organellerine geçebilir. Fizyolojik etkilerini, hem reseptör aracılığı ile hem de reseptörden bağımsız olarak gösterebildiği bildirilmiştir. Melatoninin etkileri genel olarak, organizmalarda baştan başa lokalize olan hücrelerin membranlarındaki reseptörlerle ilişkilidir. Pineal hormon için membran reseptörleri beyinde SCN (suprakiazmatik nukleus)'yi de içeren değişik alanlarda tanımlanmıştır (16).

Başlangıçta, melatonin için nükleer bağlanma bölgeleri, hepatik hücrelerin çekirdeklerinde tanımlanmasına rağmen, sonraki araştırmalar, onların santral sinir sistemi ve periferik yapıların her ikisinde de yaygın olduklarını göstermiştir.

Melatonin, çok sayıda olduğu görülen reseptör aracılı etkilerinin yanısıra, reseptör bağımsız etkilere de sahiptir. Melatonin, yüksek difüzyon kapasitesi ile hücrelerin içine kolayca girer ve kalmoduline bağlanır, bundan dolayı kalsiyuma bağlı çok sayıda hücre içi olayı etkiler.

Yapılan bir çalışmada melatoninin, yüksek oranda etkili serbest radikal süpürücü olduğu gösterildi. Melatoninin yüksek oranda toksik serbest radikalleri süpürme yeteneği, reseptör - bağımsız fonksiyondur (108).

Periferik immün hücrelerde melatonine ait membran reseptörlerinin varlığı saptanmıştır. Bunlar ikinci haberci olarak cAMP'i kullanır. Melatoninin nukleusta bağlandığı bölgeler hem merkez sinir sisteminde hemde periferik dokuda mevcuttur ve klonlanmıştır. Melatoninin reseptörden bağımsız etkileri de vardır. Bu etkilerinde aracı olarak kalmodulin kullanılır ve Ca⁺² ile ilişkili olan hücre içi olaylar değişikliğe uğrar. Bunun sonucunda kalmodulin bağımlı nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesi azalır (16).

2.8.4. Serbest radikallere karşı savunmada melatoninin rolü

Melatonin kuvvetli bir antioksidan özelliğe sahiptir. Serbest radikalleri tutup nötrale ederek ve antioksidan savunma enzimlerinin sentezini uyararak antioksidan sisteme etki eder. Melatoninin serbest radikalleri tutma yeteneği reseptörden bağımsızdır. Ancak antioksidan enzimlerin indol halkası tarafından uyarılması,

melatoninin nükleustaki reseptörlere bağlanmasından sonra gerçekleşmektedir. Melatoninin bu etkilerini inceleyen çalışmalarda çoğunlukla farmakolojik dozlar kullanılmıştır (108).

Serbest radikallerin oluşumunu sınırlamak veya oluştuklarında nötralize etmek için bir dizi reaksiyon gerçekleşir. Bu süreç toplu olarak "antioksidatif savunma sistemi" olarak adlandırılır. Toksik molekülleri inaktif maddelere metabolize eden çeşitli enzimler ve bunun yanında radikalleri nötralize eden veya süpüren moleküller vardır, bunlar sırasıyla, antioksidatif enzimler ve antioksidanlar olarak belirtilir. Antioksidatif enzimler, süperoksit anyon radikalini hidrojen peroksit (H_2O_2) katalitik olarak dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD) ve H_2O_2 'i suya metabolize eden iki enzim olan katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidazı (GSH-Px) içerir. Eğer, aşırı aktiviteyle CAT ve GSH-Px in yeterli derecede metabolize edemeyeceği miktarlarda H_2O_2 oluşursa, artmış SOD aktivitesi, daha yüksek derecede toksik radikal üretimine yol açabilir (109).

Serbest radikaller üretildiklerinde, bunları süpüren değişik moleküller vardır. Redükte glutatyon (GSH) gibi bir kısmı hücre içinde sentezlenirken, E ve C vitaminleri ve β -karoten gibi diğerleri besinlerle alınır. GSH ve C vitamini primer olarak sitozolde bulunur ve E vitamini, şartlara göre β -karoten hücrelerin membranlarında bulunmaktadır (108).

Tan ve arkadaşları, melatoninin oksijen kökenli radikallerden en toksik olan hidroksil radikali nötralize etme yeteneğini test etmişlerdir. Melatoninin, etkili bir hidroksil radikali süpürücüsü olmasının yanında, aynı zamanda bu toksik ajanları nötralize etme etkinliğinin endojen antioksidan GSH tan 5 kat daha büyük olduğu ve ekzojen süpürücü mannitolden yaklaşık 15 kat daha iyi olduğu kanıtlanmıştır (108).

Pieri ve arkadaşları, melatoninin yüksek lipitte çözünebilirliği karşısında, in vivo şartlarda E vitaminine eşit veya daha iyi bir antioksidan olduğunu kanıtlamışlardır (108).

Melatoninin, hidroksil ve peroksil radikallerini süpürme yeteneğinin yanısıra, diğer süpürücülerle etkileşime girerek etkinliklerini arttırdığı yönünde araştırmalar yapılmıştır. Melatoninin etkinliğinin, C vitamini, GSH ve trolox gibi zincir kırıcı antioksidanların varlığında daha iyi olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular gösteriyor ki,

melatonin umulandan daha düşük konsantrasyonlarda da etkin bir serbest radikal süpürücüsüdür (108).

Karbon tetraklorid (CCl_4), yaygın olarak kullanılan bir serbest solvent, temizleyici ajan ve herbisittir. Sindirim yolu ile alındığında özellikle hepatik dokuları tahrip eder. CCl_4 toksisitesinden kaynaklanan hasar, genellikle serbest radikal orijinli olarak kabul edilir. Karaciğer homojenatları veya mikrozoamları, CCl_4 ile inkübe edildiğinde, artmış lipit peroksidasyonun göstergeleri olan MDA+4HDA (4-hidroksilalken) düzeylerinde önemli artışlar ölçülmüştür. Melatoninin, bu artışları doza bağlı olarak indirgediği tespit edilmiştir (109).

Oksijenin aktive olmamış formu örneğin singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), çeşitli makromolekülleri hasara uğratan toksik bir ajandır. Melatoninin singlet oksijeni baskıladığı Poeggeler ve arkadaşları tarafından daha önceden bildirilse de ilk deneysel deliller Cagnoli tarafından ortaya konmuştur (109).

Bazı enzimler antioksidatif savunmada çok önemlidir çünkü bu enzimler, serbest radikaller veya reaktif oksijenin, non-radikal ürünlere metabolize edilmesine aracılık eder. Bu enzim ailesinden en iyi bilinenlerden bazıları, superoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon reduktazdır. Melatoninin farmakolojik seviyelerinin, beyinde GSHPx aktivitesini uyardığı bildirilmiştir(109).

2.9. Serbest Radikaller

Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftir.

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler, pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler.

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler, oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerin iyonları ve hidroksil radikalidir (110).

-Süperoksit radikali: Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu (O_2^-) meydana gelir. Hidrojen peroksidin kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olması bakımından önemlidir. Süperoksidin, fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO) ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir. Böylece NO'nin normal etkisi inhibe edilir. Ayrıca, peroksinitritlerin doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır ve azot dioksit (NO_2), hidroksil radikali (OH \cdot) ve nitronyum iyonu (NO_2^+) iyonu gibi daha başka toksik ürünlere dönüşürler.

Süperoksit anyonu hem oksitleyici hem de redükleyici özelliğe sahiptir. Redükthan olarak görev yaptığında, örneğin ferrisitokrom c'nin ya da nitroblue tetrazolium'un redüksiyonunda bir elektron kaybeder ve oksijene okside olur. Sitokrom C'yi indirgemesi SOD tarafından inhibe edilir. Bundan faydalanılarak SOD aktivitesi ve fagositler tarafından üretilen O_2^- tayini yapılır.

Hidrojen peroksit (H_2O_2): H_2O_2 membranlardan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi süperoksidin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Hidrojen peroksit, bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.

Hidroksil radikali: Hidroksil radikali (OH \cdot), hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle meydana gelir. Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur. Son derece reaktif bir oksidan radikalidir. Yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştugu yerde büyük hasara sebep olur (110).

2.9.1. Serbest radikallerin kaynakları

a- Biyolojik kaynaklar

- aktive olmuş fagositler
- antineoplastik ajanlar: nitrofurantoin, bleomisin, doxorubicine
- radyasyon
- alışkanlık yapan maddeler: alkol ve uyuşturucu maddeler

- çevresel ajanlar (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler;hiperoksi, pestisitler, sigara dumanı, solventler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar)
- Stres: Streste katekolamin düzeyi artar. Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır.

b) İntrasellüler kaynaklar

- küçük moleküllerin otooksidasyonu
- enzimler ve proteinler : ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, hemoglobin
- mitokondrial elektron transportu
- endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri (sitokrom P-450, sitokrom b₅)
- peroksizomlar : oksidazlar, flavoproteinler
- plazma membranı : lipoksijenaz, prostoglandin sentetaz, fagositlerde NADPH oksidaz, lipit peroksidasyonu
- oksidatif stres yapıcı durumlar : iskemi, travma, intoksikasyon

Hücrelerde serbest radikal üretimi, bazı yabancı toksik maddeler tarafından da büyük oranda artırılabilir. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler veya antioksidan aktiviteyi düşürürler. Bu tip maddeler dört grupta toplanabilirler;

- a- Toksinin kendisi bir serbest radikaldir. Kirli havanın koyu rengini veren azot dioksit gazı örnek olarak verilebilir. Bu radikal iyi bir lipit peroksidasyon başlatıcısıdır.
- b- Toksin bir serbest radikale metabolize olur. Mesela, toksik bir madde olan karbontetraklorür karaciğerde sitokrom P-450 tarafından triklorometil serbest radikale dönüşür. Bu radikalın oksijenle reaksiyonu sonucu meydana gelen peroksil radikali de kuvvetli bir lipit peroksidasyonu başlatıcısıdır. Böylece, reaktif serbest radikal üretimi, karaciğerde antioksidan savunmaları aşar. Bu da hücre membranlarının oksidatif yıkımı ve ciddi doku hasarı ile sonuçlanır.
- c- Toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir. bunun tipik bir örneği paraquatdır. Özellikle karaciğerde biriken

paraquat, bir serbest radikale indirgendikten sonra tekrar yükseltgenerek rejenere edilirken beraberinde oksijen indirgenir. Böylece bol miktarda süperoksit üretilmiş olur.

d- Toksin antioksidan aktiviteyi düşürür. Mesela parasetamolün karaciğerde sitokrom P-450 tarafından metabolizması, glutatyonla reaksiyona giren ve miktarını azaltan bir ürün meydana getirir.

2.9.2. Geçiş Metalleri ve Serbest Radikal Oluşumu

Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki asıl önemleri ise lipit peroksidasyonundaki etkileridir. Geçiş metalleri lipit peroksidasyonunu başlatmaktan ziyade sentezlenmiş olan lipit hidroperoksitlerinin parçalanmalarını ve lipit peroksidasyonun zincir reaksiyonlarını katalize ederler. Böylece zararlı olan radikalleri daha az zararlı hale getirirler.

2.9.2.1. Membran Lipitlerine Etkileri

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştuğu zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenirler, fakat lipitler en hassas olanlarıdır. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA)'nın oksidatif yıkımı, lipit peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerlerler. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür.

Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiobarbutirik asitle ölçülebilen malondialdehit (MDA) meydana gelir. Bu metot lipit peroksit seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, fakat lipit peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir.

Lipit peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt membran yapısına ve indirekt reaktif aldehytler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir.

Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar.

2.9.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar olarak bilinirler. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipit peroksidasyonunu inhibe ederler (Şekil 3).

Doğal (Endojen) Antioksidanlar

a- Enzimler

- Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi
- Süperoksit dismutaz
- Katalaz
- Glutasyon peroksidaz
- Glutasyon-S-transferaz
- Hidroperoksidaz

b- Enzim olmayanlar

- i- lipit fazda bulunanlar; α -tokoferol (E-vitamini), β -karoten
- ii- sıvı fazda (hücre sitozolünde veya kan plazmasında bulunanlar); askorbik asit, melatonin, urat, sistein, seruloplazmin, transferin, laktofenin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, metionin, albumin, bilirubin, glutasyon

Ekzojen Antioksidanlar (İlaçlar)

Ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH Oksidaz inhibitörleri, rekombinant süperoksit dismutaz, trolox-C.

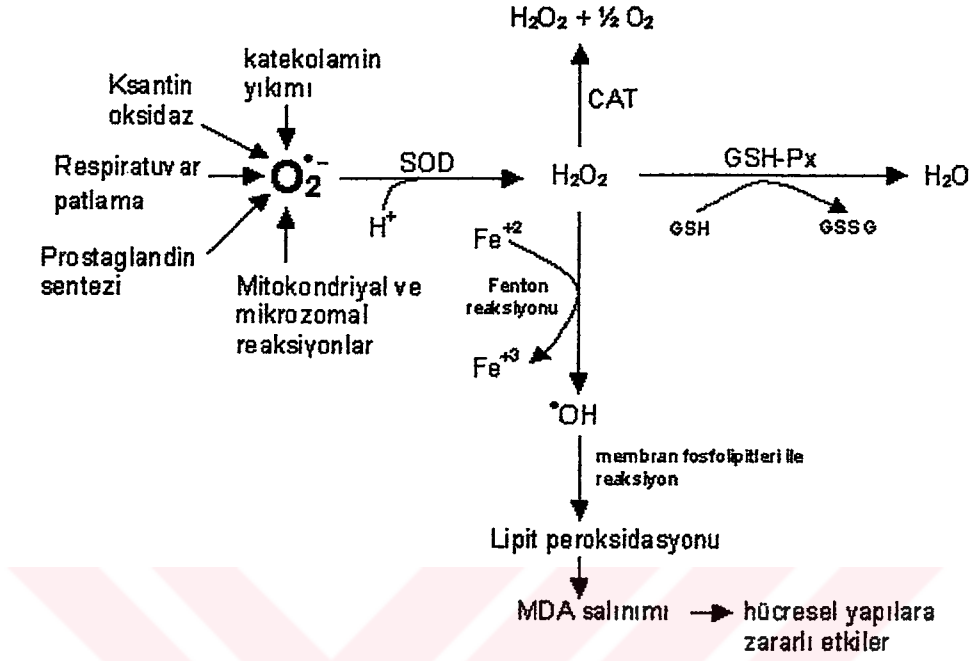
2.9.3.1. ANTIOKSİDAN ETKİ TİPLERİ

1. **Süpürücü Etki;** Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine denir.
2. **Bastırıcı Etki;** Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya denir.
3. **Onarıcı Etki;**
4. **Zincir Kırıcı Etki;** Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye denir.

2.9.3.2. Enzimatik Antioksidanlar

- a- **Süperoksit dismutaz (SOD);** Bu enzim süperoksidin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Oksijeni metabolize eden hücreleri, süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korur. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde intraselüler süperoksit düzeyleri düşük tutulur (Şekil 3.).
- b- **Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px);** Glutatyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. GSH-Px'in fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlar birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar (Şekil 3.).
- c- **Katalaz;** Dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Görevi hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalamaktır. Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak bu enzim, bir molekül hidrojen peroksidi elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. Katalazın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ve metil,

etil, hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipit hidroperoksitlerine ise etki etmez (Şekil 3.) (110).



Şekil 3. Hücresel antioksidan enzim sistemi ve lipit peroksidasyon zincirini gösteren şema (111).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Deneysel Hayvanları

Bu araştırmada ağırlıkları 110-150 gram arasında değişen, Wistar albino cinsi erkek ratlar kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Malzemeler

3.1.2.1. Cihazlar

1	Soğutmalı santrifüj	Eppendorf MR 5415 (Almanya)
2	Santrifüj	Heraus Labofuge 400 (Almanya)
3	Derin dondurucu	Facis (Fransa)
4	Hassas terazi	Scaltec (İsviçre)
5	Otoanalizör	Abbott Aeroset (IL, USA)
6	Vorteks	Nüve NM 100(Türkiye)
7	Otomatik pipetler	Eppendorf (Almanya), Gilson(Fransa)
8	Spektrofotometre	Shimadzu UV 1201V 1600 (Japonya)
9	Hemogram Cihazı	Coulter Max M (İngiltere)
10	Homojenizatör	Ultra Turrax T25 (Almanya)
11	pH metre	Hanna Instruments (Portekiz)
12	Manyetik karıştırıcı	Nüve (Türkiye)
13	Sonikatör	Bendelin Electronic (Almanya) Sonoplus UW 2070

3.1.2.2. Kimyasal Maddeler

Okratoksin A : Sigma Chemical (Almanya), *from Aspergillus ochraceus*,
C₂₀H₁₈CINO₆ FW 403,8 , EC No 206-143-7

Melatonin : Sigma Chemical (Almanya), C₁₃H₁₆N₂O₂ FW 232,3,
EC No 200-797-7

Sodyum Hidrojen Bikarbonat : NaHCO_3 Merck (Almanya), Kat no: 106323

Süperoksit Dismutaz tayini için kullanılanlar

- Potasyum dihidrojen fosfat KH_2PO_4 Merck, Kat no: 104871
- Disodyum hidrojen fosfat dihidrat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Merck, Kat no: 106586

Glutasyon Peroksidaz Tayini İçin Kullanılanlar

- Drabkin Solüsyonu

- Potasyum siyanür KCN Merck, Kat no: 104965
- Potasyum ferri siyanür $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, Kat no: 104982
- Potasyum bikarbonat KHCO_3 Sigma Kat no: S 6014
- **Katalaz Tayini İçin Kullanılanlar**
- Potasyum dihidrojen fosfat, KH_2PO_4 Merck, Kat no:105108
- Disodyum hidrojen fosfat dihidrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Merck, Kat no: 106586
- Hidrojen Peroksit, H_2O_2 Merck, Kat no: 108597

Lipid Peroksidasyonu İçin Kullanılanlar

- Trikloroasetik asit (TCA) ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$) Merck, Kat no: 100810
- Tiyobarbitürik asit (TBA) ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) Merck, Kat no: 108180

Glutasyon için kullanılanlar

- Metafosforik asit (HPO_3)_n Merck , Kat no: 100546
- Etilendinitrilo tetraasetikasit disodyumdihidrat (EDTA) $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Merck (Almanya), Kat no: 108421
- Sodyum klorür, NaCl Merck (Almanya), Kat no: 106404
- Disodyum hidrojen fosfat dihidrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Merck, Kat no: 106586
- DTNB [5,5' – Dithio-bis (2-nitrobenzoik asit)] $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Sigma (Almanya), Kat no: D 8130
- Sodyum sitrat, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 5.5\text{H}_2\text{O}$ Merck, Kat no: 106431

3.1.2.3. Çözeltiler

SOD tayini için kullanılanlar

- 3-Sikloheksilamino-1-propansulfonik asit (CAPS) tamponu (pH=10.2), 50mM: 5.5g CAPS (Sigma, Almanya, Kat No: C2632) tartılıp 400 ml distile suda çözülüp pH'ı 10.2' ye ayarlandıktan sonra hacmi 500 ml ye tamamlandı. 0.94 mM EDTA (0.35g)tartıldı ve tamponun son hacmi 1000 ml ye distile suyla tamamlandı.
- Substrat karışımı: 0.05 mM, 7.6 mg Ksantin ve 0.025 mM, 12.64 mg 2-(4-iodophenyl)-3-4-(4-nitrophenol)-5-phenyl tetrazolium chloride (INT), reaktif eklendi.

GSH-Px tayini için Kullanılanlar

Drabkin Solüsyonu (Double Drabkin): 50 mg potasyum siyanür, 1 g sodyum bikarbonat , 200 mg potasyum ferri siyanür tartılıp bir miktar distile suda çözüldü ve son hacim 500 ml ye tamamlandı.

Lipid Peoksidasyonu tayini için kullanılanlar

- TCA çözeltisi (%10): 10 g TCA tartılıp, bir miktar distile suda eritilir ve son hacim 100 ml'ye tamamlanır.
- TBA çözeltisi (%0.67): 0.67 g TBA tartılıp, bir miktar distile suda eritilir ve son hacim 100 mililitreye tamamlanır.

Katalaz tayini İçin kullanılanlar

- 50 mM fosfat tamponu: 2.7218 g KH_2PO_4 ve 5.3397 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılarak 500 ml suya tamamlandı.
- Substrat: 30 mM hidrojen peroksit, 0.34 ml (% 30 luk hidrojen peroksit) 100 ml fosfat tamponu ile dilüe edilerek hazırlandı.

3.2. Metod

3.2.1. Deney Grupları

Deney, Süleyman Demirel Üniversitesi Ethem Mumcu Hayvan laboratuvarında yürütülmüştür. Deney, her bir grupta 8 rat olmak üzere 3 grupta, toplam 24 ratdan oluşturuldu. Her çalışma grubundaki ratlar standart ışık (12 saat

gün ışığı / 12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (25° C) bulunduruldu. Her biri ayrı kafeslere konan ratlara yeteri kadar (ad libitum) su ve yem (Yem Kurumu Standart rat yemi) verildi.

I. Kontrol grubu; Bu grup ratlar standart diyet (pellet yem) ile 1ay süresince beslendi. Diyet kısıtlaması yapılmadı. İçme suyu olarak, diğer gruplarda kullanılan 0,5 M sodyum bikarbonat musluk suyunda hazırlanarak 1 ay süresince hergün 20 ml verildi, geriye kalan su ihtiyacı musluk suyu ile karşılanmıştır.

II. Okratoksin A grubu; Standart diyet (pellet yem) ile 1ay süresince beslenmişlerdir. 289 µg/kg OTA, 20 ml 0,5 M sodyum bikarbonat içinde çözülerek (musluk suyu kullanılmıştır), 1 ay süresince hergün içme suyu olarak verilmiştir.

III. Okratoksin A + Melatonin grubu; Standart diyet (pellet yem) ile 1ay süresince beslenmişlerdir. 289 µg/kg OTA, 20 ml 0,5 M sodyum bikarbonat içinde çözülerek, 1 ay süresince hergün içme suyu olarak verilmiştir. 17.00 - 9.00 saatleri arasında, 10 mg/kg melatonin 20 ml su (musluk suyu / %0,1 alkol) içinde çözülerek 1 ay süresince hergün içme suyu olarak verilmiştir.

Deneyin hazırlanma sürecinde, ratların günlük su tüketimi hesaplandı ve günde ortalama 40 ml olarak tespit edildi. II. Grupta 20 ml OTA ve 0,5 M sodyum bikarbonat tüketildikten sonra geri kalan içme suyu ihtiyacı musluk suyu ile karşılanmıştır.

3.2.2. Anestezi ve gerekli materyallerin eldesi

Eter anestezisi altında ratlar dekapite edildikten sonra kan ve doku örnekleri alındı. İntrakardiyak olarak, enjektörle 3-4 cc kan örneği alındı. Kan örneklerinden serum elde edildi. Karaciğer dokusu çıkarılarak tüplere konuldu ve soğuk zincire uygun biçimde laboratuvara ulaştırıldı, -80°C lik derin dondurucuda muhafaza edildi. Kan örnekleri, 3000g'de 5 dakika santrifuj edilerek serumları elde edildi.

3.2.3. Homojenizasyon

Karaciğer dokusu tartılarak, 1/9 oranlarında fosfat tamponuyla buz üzerinde, homojenizatörle 10.000 devir /dk da 30 sn homojenize edildikten sonra sonikatörde 30 sn sonike edildi . Homojenize edilen örnekler 3000 g' de +4°C de soğutmalı santrifüjde 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısımdan parametrelerin tayini gerçekleştirildi.

3.2.4. Lipid peroksidasyon tayini:

Doku lipid peroksidasyon düzeyleri, tiyobarbitürik asit reaktif substans (TBARS) konsantrasyonları ölçülerek saptandı.(112)

Deneyin prensibi: MDA ve yağ asitleri peroksidasyonunun yıkılım ürünlerinin kompleksinin TBA ile oluşturduğu rengin maksimum absorbansı 532 nm de ölçülerek hesaplandı.

Deneyin yapılışı: 0.5 ml doku homojenatı üzerine 2.5 ml %10 luk TCA eklenerek karıştırıldı. 15 dakika kaynatılıp soğutuldu.. 5000 devir/dk da 10 dk santrifüj edildi. 2 ml süpernatant alınıp, üzerine 1ml %0.67 lik TBA eklendi. Tüpler karıştırıldıktan sonra 15 dk kaynatıldı ve hemen soğutuldu. 532 nm de numune yerine distile su konularak hazırlanan köre karşı absorbansları okundu.

TBARS kompleksinin 532 nm deki ekstinsiyon katsayısından ($1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) yararlanılarak nanomol/ml cinsinden MDA değerleri bulundu.

3.2.5. Antioksidan enzim aktivite düzeylerinin ölçümü

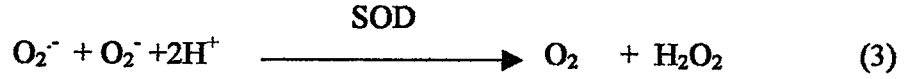
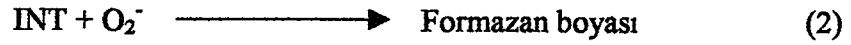
3.2.5.1. Süperoksid dismutaz

Deneyin prensibi Woilliams ve arkadaşlarının metoduna dayanmaktadır (113).

Deneyin Prensibi:

Süperoksit dismutaz çeşitli yollarla ortaya çıkan süperoksit (O_2^-) radikalinin H_2O_2 ' ye dismutasyonu reaksiyonunu katalizler. Ksantin – ksantin oksidaz (XOD) sistemi tarafından üretilen O_2^- radikallerinin (reaksiyon 1) 2-(4-iodophenyl)-3-4-(4-

nitrophenol)-5-phenyl tetrazolium chloride (INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazan boyasının (reaksiyon 2) 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanmaktadır. Bu reaksiyona dayanan optik dansitedeki azalmadan yararlanarak SOD tarafından reaksiyonun % inhibisyonu belirlendi.



Prosedür:

Ksantin oksidaz eklendikten hemen sonra 505 nm de 37°C sabit sıcaklıkta havaya karşı başlangıç absorbanı (A_1) okundu.

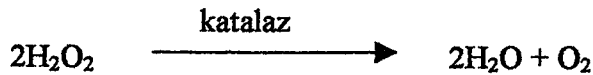
$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - \frac{\Delta A(\text{numune})/\text{dk} \times 100}{\Delta A(\text{kör})/\text{dk}}$$

daha önce standart çalışılarak hazırlanan % inhibisyon-konsantrasyon grafiğinden yararlanılarak konsantrasyonlar saptandı. Enzim aktivitesi U/ml olarak bulundu. Bu değerler dilüsyon katsayısı ile çarpılıp hemoglobine bölünerek U/gHb birimi şeklinde sonuçlar verildi.

Dokulardan hazırlanan homojenatlar aynı yöntemle göre çalışıldı ve sonuçlar U/mg protein cinsinden ifade edildi.

3.2.5.2. Katalaz :

Aebi metoduna dayalı olarak yapıldı.(114)



Deneyin Prensipleri:

Hidrojen peroksidin katalaz tarafından parçalanması temeline dayalı UV spektrofotometrik yöntem ile katalaz aktiviteleri tayin edilmiştir (70, 2, Lück).

Hazırlanan hemolizat fosfat tamponuyla 100 kat dilüe edildi. 2 ml hemolizat üzerine taze hazırlanan ve 30 mM H₂O₂ içeren fosfat tampon çözeltisinden 1 ml eklendi. 240 nm'de absorbansın azalması 15 sn aralıklarla, 3 dk boyunca okunup ve lineer regresyonlara göre her bir analiz için en uygun absorbanslar bulunarak, k değeri aşağıdaki şekilde hesaplandı:

$$k = 2.3 / \Delta t \times (\log A_1/A_2) = 0,076 (\log A_1 / A_2) (\text{sn}^{-1})$$

$$k / \text{ml} = k.a$$

$$k / \text{gHb} = k / \text{ml} (1000 / b) = (2.3 / 30) (a / b) (\log A_1 / A_2) (\text{sn}^{-1})$$

A₁: 240 nm deki başlangıç absorbansı (t₁=0)

A₂: 240 nm deki 30. sn'deki absorbansı (t₂=30)

a: dilüsyon faktörü

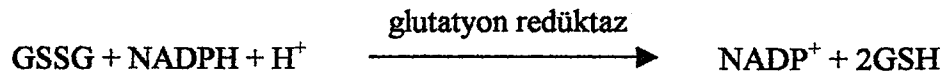
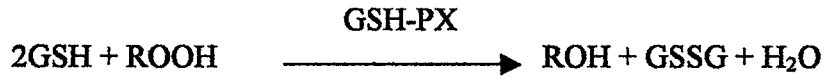
b: eritrosit sedimentinin hemoglobin miktarı

Beyin ve hipokampus dokusunda katalaz aktivitesi çok düşük olduğu için tayin edilemedi.

3.2.5.3. Glutasyon peroksidaz :

Deneyin prensibi Paglia ve Valentine' nin metoduna dayanmaktadır.(115)

Deneyin Prensibi: Glutasyon peroksidaz, cumen hidroperoksid tarafından glutasyon oksidasyonunu katalizler. Okside glutasyon, NADPH varlığında glutasyon redüktaz tarafından indirgenir. Bu arada NADPH, NADP⁺ ye oksitlenir.



NADPH nin azalmasına bağlı olarak 340 nm de meydana gelen absorbans değişimi ölçülerek enzim aktivitesi hesaplandı.

Deneyin yapılışı: Ticari kit (Randox, UK) kullanılarak GSH-Px aktivite düzeyleri saptandı. 50µl EDTA' lı kan örneğine kit içindeki diluting agent 1 ml eklendi. 5 dk inkübasyondan sonra Double Drabkin solüsyonundan 1 ml eklenerek

karıştırıldı. Aynı bir tüpe 1ml reagent konup dilüe örnekten 20µl eklendi. Ölçümden hemen önce 40µl cumen hidroperoksid eklenerek 340 nmde absorbans değışimi hesaplandı. U/L cinsinden bulunan enzim aktivitesi dilüsyon katsayısı 41 ile çarpıldıktan sonra Hb' e bölünerek sonuçlar U/gHb birimi olarak verildi.

Homojenatın protein miktarı Lowry yöntemine göre belirlendi ve sonuçlar U/mg protein cinsinden verildi.

3.2.6. Biyokimyasal Parametrelerin Tayini

Biyokimyasal parametreler [Alkalen fosfotaz (ALP), Alanin amino transferaz (ALT), Aspartat amino transferaz (AST), Laktat dehidrogenaz (LD), Gama-glutamil transferaz (GGT), Albumin (AlbG)], Abbott Aeroset (IL, USA) marka otoanalizör kullanılarak ölçülmüştür. Abbott Laboratuvarları tarafından üretilen kitler parametrelerin tayininde kullanılmıştır.

3.2.7. İstatiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler “ SPSS 9.05 for Windows “ paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Genel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek için Kruskal-Wallis varyans analiz testi kullanıldı. Grupların ikişerli karşılaştırılması ise Beenferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Sonuçlar ortalama \pm SD olarak verildi.

4. BULGULAR

Karaciğer ve serum ortalamaları ve sırasıyla tablo 2 ve 3'te verilmiştir.

Okratoksin A (OTA) uygulanan ratlarda (grup II) lipit peroksidasyon ürünlerinin (LPO) , karaciğer ve serumda arttığı gözlemlendi (grafik 1, 2). OTA + melatonin verilen III. deney grubundaki değerler, yalnız OTA uygulanan ratlara göre, LPO seviyelerinin karaciğer dokusunda azaldığı serumda arttığı görüldü. III. grupta, serum ve karaciğer dokusundaki LPO seviyelerinde kontrole göre anlamlı değişiklik olmadığı tespit edildi.

OTA uygulanan II. grupta, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) seviyesinde karaciğer ve serumda anlamlı artışlar tespit ettik (sırasıyla, $p<0.02$, $p<0.002$, grafik,1,2). Serumda katalaz (CAT) aktivitesinin anlamlı derecede arttığı, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ise anlamlı derecede azaldığı gözlemlenmiştir (sırasıyla $p<0.01$ $p<0.004$). Karaciğerde, SOD ve CAT aktivitelerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

OTA ve melatonin uygulanan III. Grupta, karaciğer dokusunda GSH-Px, CAT ve SOD enzim aktivitelerinde değişiklik gözlenmemiştir (grafik 1, 2). Serumda CAT aktivitesi farklı bulunmadı, SOD'nin kontrole göre azaldığı, GSH-Px'in ise arttığı gözlemlendi (grafik 2). II. ve III. Gruplar karşılaştırıldığında, III. Grupta karaciğerde ve serumda SOD, CAT, GSH-Px aktiviteleri azalmış, serumdaki SOD azalması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.002$).

Karaciğer ve seruma ait biyokimya parametreleri ortalamaları ve p değerleri, sırasıyla tablo 4, 5 'de verilmiştir.

OTA grubunda, karaciğerde alanin amino transferaz (ALT) seviyesi kontrole göre anlamlı derecede artmış ($p<0.01$), aspartat amino transferaz (AST) seviyesindeki artış anlamlı bulunmamıştır. Bu organda laktat dehidrogenaz seviyesi (LDH), kontrole göre anlamlı bir azalış göstermiştir ($p<0.03$). Grup III ile grup II'yi karşılaştırdığımızda LDH'in karaciğer dokusunda grup III'te anlamlı bir şekilde arttığını tespit ettik ($p<0.003$). Alkalen fosfotaz (ALP) ve gama glutamil transferaz (GGT)'in azalan seviyeleri anlamlı bulunmamıştır. Grup II'de ALT'nin artan seviyesi Grup III'te azalmış ve kontrol seviyesine yaklaşmıştır, bu iki grubu aralarında kıyasladığımızda grup III'teki azalışın anlamlı olduğunu saptadık ($p<0.005$) (grafik 4).

ALT, AST, LDH, GGT ve albumin seviyeleri, serumda kontrollere göre, OTA'lı grupta anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur (sırasıyla $p<0.008$, $p<0.004$, $p<0.002$, $p<0.009$, $p<0.002$). Albumin hariç tüm biyokimyasal parametrelerde OTA+melatonin grubunda, OTA grubuna göre anlamlı azalmalar görülmüş, yalnız albuminde anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.002$) (grafik 6).



Tablo 2. Karaciğer dokusu antioksidan enzim ve LPO ortalamaları ve gruplar arası p değerleri

	CAT (kU/mgprotein)	SOD (U/mgprotein)	GSH-Px (U/gprotein)	LPO (nmol/mgprotein)
GRUP I	0,23 ± 0,05	1,49 ± 0,32	82,51 ± 6,09	111,13 ± 20,98
GRUP II	0,24 ± 0,05	1,48 ± 0,27	95,96 ± 14,85	156,25 ± 45,19
GRUP III	0,24 ± 0,02	1,45 ± 0,15	91,83 ± 4,39	105,75 ± 22,47
p değerleri				
I / II	AD	AD	0,012	0,031
I / III	AD	AD	0,012	AD
II / III	AD	AD	AD	AD

AD. Anlamlı Değil

Tablo 3. Serum antioksidan enzim ve LPO ortalamaları ve gruplar arası p değerleri

	CAT (kU/L)	SOD (U/ml)	GSH-Px (U/L)	LPO (nmol/ml)
GRUP I	79,25 ± 28,66	1,025 ± 0,103	19,63 ± 1,69	9,620 ± 1,371
GRUP II	144,13 ± 49,56	0,786 ± 0,137	137,25 ± 22,91	16,375 ± 4,565
GRUP III	84,75 ± 64,63	0,620 ± 0,046	134,50 ± 2,83	18,875 ± 1,356
p değerleri				
I / II	0,009	0,003	0,001	0,002
I / III	AD	0,001	0,001	0,001
II / III	AD	0,001	AD	0,101

AD, Anlamlı Değil

Tablo 4. Karaciğer dokusu biyokimyasal parametreler ortalamaları ve gruplar arası p değerleri

	ALP (U/mgprot)	ALT (U/ mgprot)	AST (U/ mgprot)	LDH (U/ mgprot)	GGT (U/ mgprot)
GRUP I	0,0137 ± 0,0044	0,448 ± 0,046	1,626 ± 0,063	2,657 ± 0,399	0,00523 ± 0,00218
GRUP II	0,0118 ± 0,0034	0,564 ± 0,075	1,754 ± 0,129	2,258 ± 0,374	0,0037 ± 0,0018
GRUP III	0,0116 ± 0,0032	0,418 ± 0,057	1,743 ± 0,153	2,748 ± 0,261	0,0030 ± 0,0011
p değerleri					
I / II	AD	0,009	AD	0,027	AD
I / III	AD	AD	AD	AD	0,021
II / III	AD	0,005	AD	0,002	AD

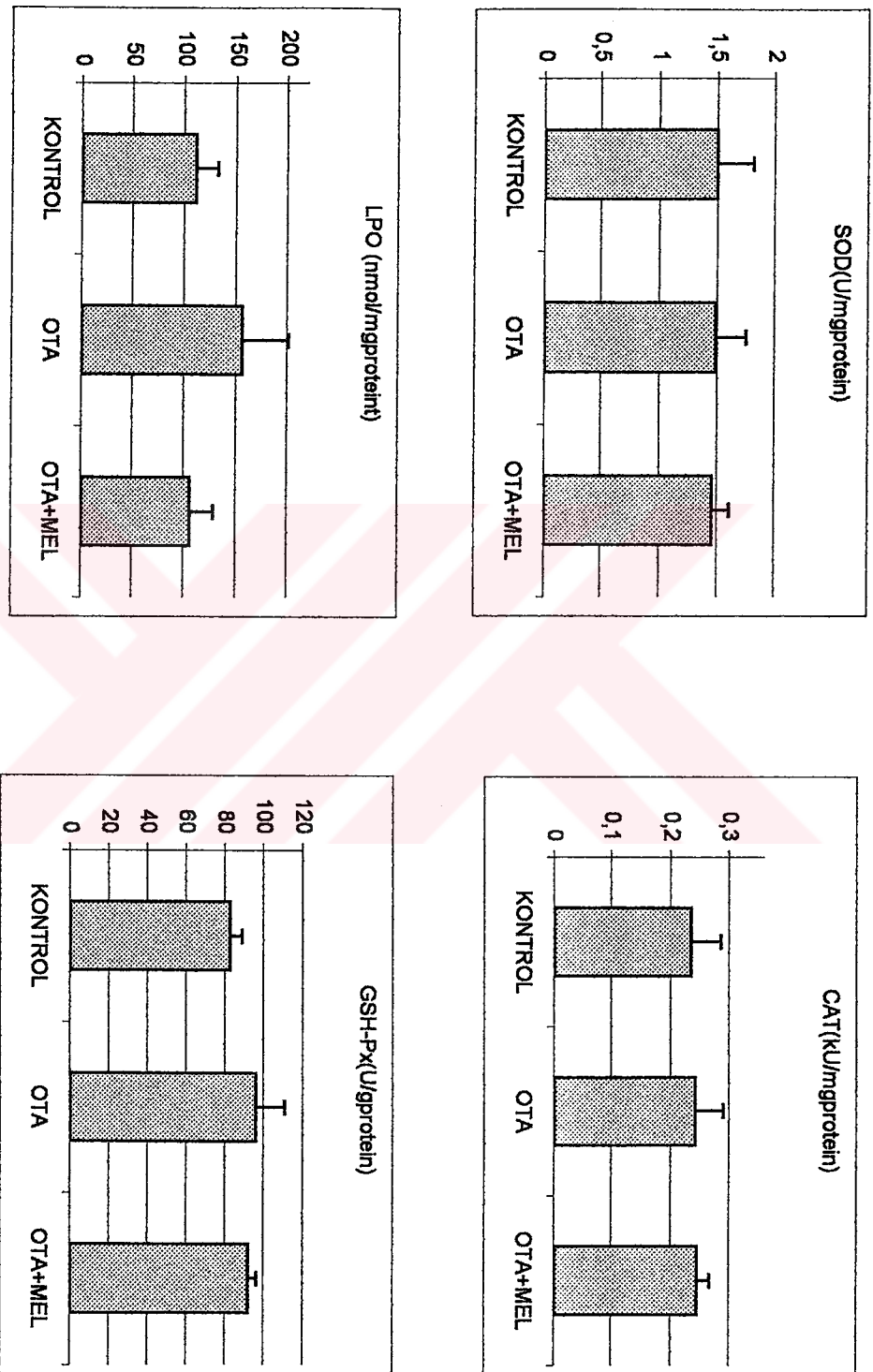
AD. Anlamlı Değil

Tablo 5. Serum biyokimyasal parametreler ortalamaları ve gruplar arası p değerleri

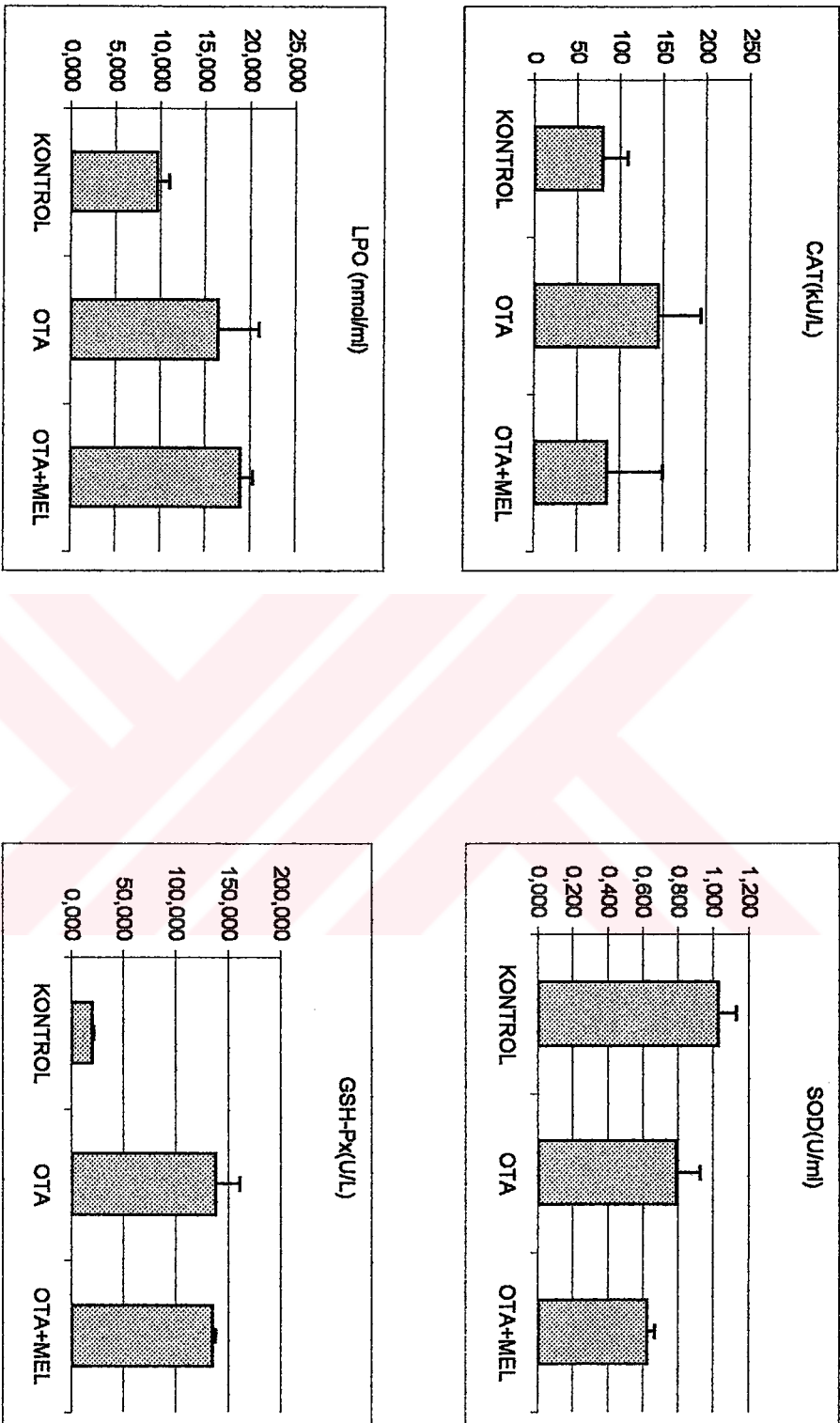
	ALT (U/L)	AST (U/L)	LDH (U/L)	GGT (U/L)	ALB (g/dl)
GRUP I	80,375 ± 30,794	290,5 ± 74,6	1787,13 ± 194,68	3,99 ± 1,44	4,41 ± 0,24
GRUP II	47,125 ± 6,490	137,5 ± 26,4	579,88 ± 225,92	2,16 ± 0,65	3,71 ± 0,30
GRUP III	40,375 ± 9,319	103,3 ± 20,1	447,38 ± 317,78	2,11 ± 1,01	4,18 ± 0,14
p değerleri					
I / II	0,007	0,003	0,001	0,008	0,001
I / III	0,002	0,001	0,001	0,017	AD
II / III	AD	0,009	AD	AD	0,001

AD, Anlamlı Değil

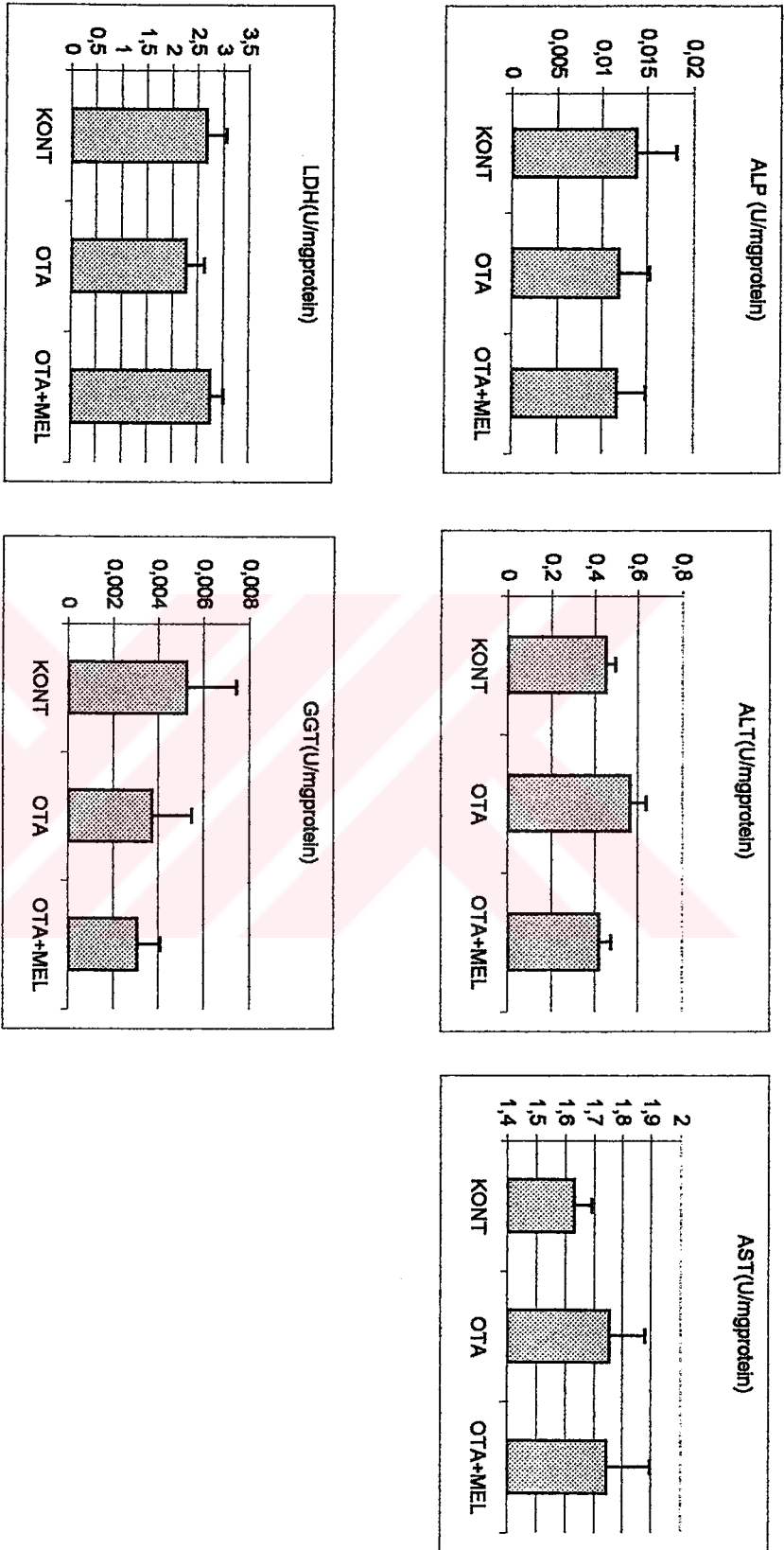
Grafik 1. Karaciğer dokusu antioksidan enzim aktivite ve LPO değerleri grafiği



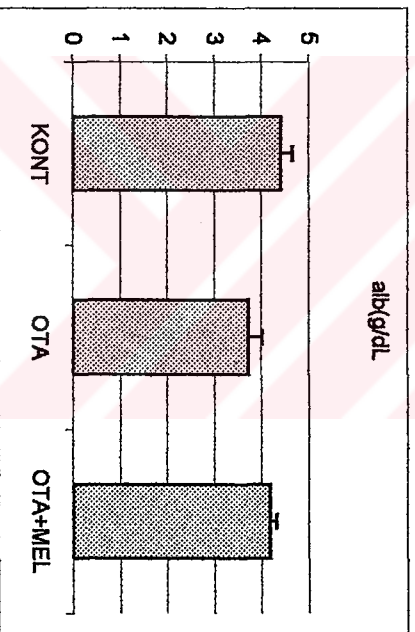
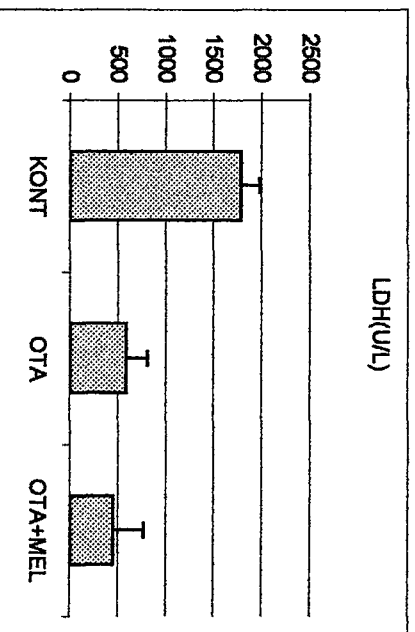
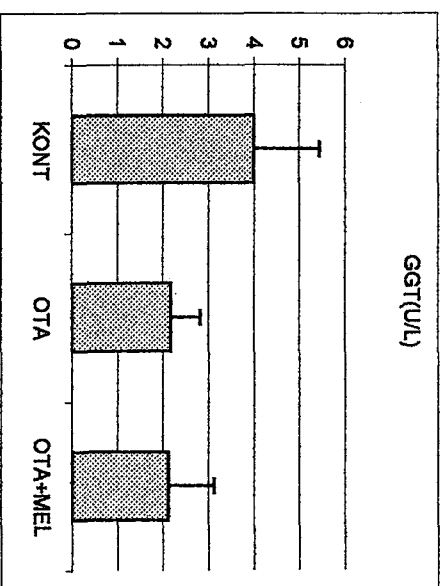
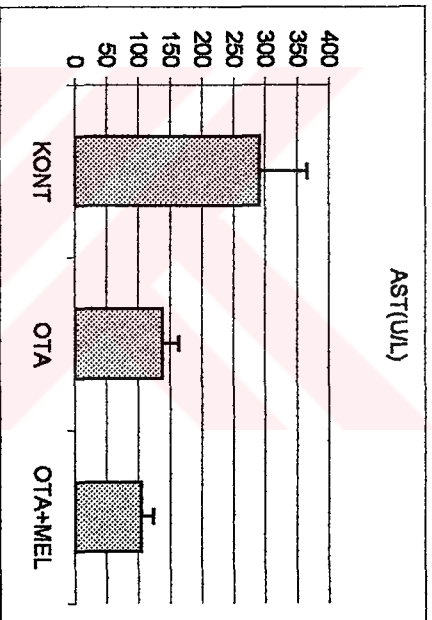
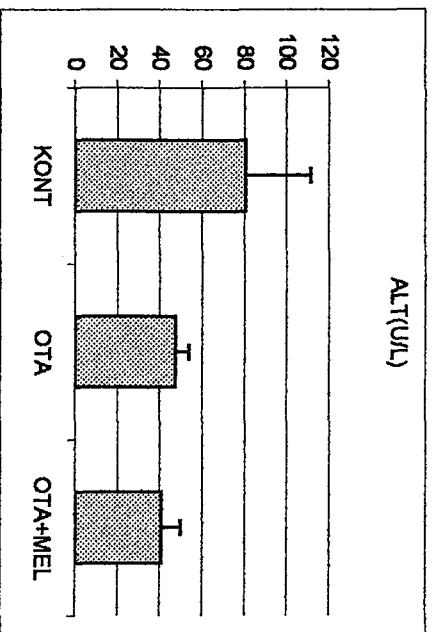
Grafik 2. Serum antioksidan enzim aktivite ve LPO değerleri grafiği



Grafik 3. Karaciğer dokusu biyokimyasal parametre grafikleri



Grafik 4. Serum biyokimyasal parametre grafikleri



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

OTA'nın rodentlerde, nefrotoksik ve renal karsinojen etkeni (116), insanlarda, Balkan endemik nefropati ile ilişkili olduğu ve üriner sistem tümörlerine yol açtığı bildirilmektedir (117). OTA'nın çeşitli hayvan türlerinde böbrek (118), karaciğer (11) ve beyin (71) gibi bazı dokularda hasara yol açtığı tespit edilmiştir.

Toksik yabancı bileşikler, hücrelerin serbest radikal üretiminde büyük artışlara neden olmaktadır (119). Mikotoksinler de, serbest radikal oluşturmak ve lipit peroksidasyonuna neden olmak suretiyle toksik etkilerini gösterirler. Toksisitede oksidatif hasarın merkez mekanizma olduğu görüşü yaygındır. Lipit peroksidasyonu, oldukça reaktif çoklu doymamış yağ asit (ÇDYA) radikallerinin yayılmasıyla sonuçlanan bir zincir reaksiyondur, membran fosfolipitlerinin doymamış bağları üzerine hidroksil radikallerin etkimesiyle başlar. Toksik ajanlar tarafından uyarılarak oluşan reaktif serbest radikaller, karaciğerde antioksidan savunma sistemini etkiler ve muhtemel bir doku hasarı ile sonuçlanır. Bu nedenle mikotoksinler de serbest radikal oluşumuna neden olarak toksisitelerini ortaya çıkarırlar (10).

OTA, lipit peroksidasyonunu arttırarak oksidatif hasara yol açar (120). Geçiş metalleri ve demir iyonları lipit peroksidasyonunda önemlidir (121). NADPH-CYP 450 redüktaz, EDTA, demir iyonları ve NADPH'ı içeren mikrozomal bir sistem oluşturulduğunda, OTA demir iyonlarını halkasal yapısına katar ve OTA-Fe⁺³ kompleksinin oluşmasıyla lipit peroksidasyonu uyarılır. OTA-Fe⁺³ kompleksi, NADPH-CYP 450 redüktaz tarafından OTA-Fe⁺² kompleksine indirgenir. OTA varlığında Fe⁺³'ün Fe⁺²'ye indirgenmesi artar (120). OTA'nın toksik etkisi ile oluşan hidrojen peroksit (H₂O₂), ortamda artan Fe⁺² iyonları Fenton reaksiyonu ile daha potent olan hidroksil radikaline dönüştürülmekte, bu da lipit peroksidasyonunu hızlandırmaktadır. Hücresel çevre içinde ÇDYA ve oksijenin bulunduğu yerde bu sürecin başlaması kaçınılmazdır. Oksijen vasıtasıyla, lipitlerin oksidasyonu, radikal zincir reaksiyonlarında devam eder. Bu biyokimyasal prosesin sonucunda, MDA ve diğer oksidasyon ürünleri gibi, yüksek oranda indirgenmiş bileşikler oluşur. Bu ürünlerin bir çoğu kimyasal olarak reaktiftir ve yapısal doku hasarlarını oluştururlar (122). Sonuçlarımız, OTA uygulanan ratlarda (grup II), karaciğer, ve serumdaki lipit peroksidasyon ürünlerinin, kontrol ile kıyaslandığında önemli derecede arttığını

gösterdi. Buna göre, OTA verilen grupta yapısal doku hasarından bahsedebiliriz. Melatonin+OTA verilen III.grupta, LPO seviyesi OTA'lı gruba göre düşmüş ve kontrol seviyelerine yaklaşmış olması, melatoninin antioksidan savunma sisteminde rol oynadığını, lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan serbest radikallerin ve diğer oksidanların melatoninin süpürücü etkisiyle ortamdan uzaklaştırıldığını söyleyebiliriz. Melatoninin, OTA üzerine direkt herhangi bir etkisi olmayabilir, etki daha çok OTA'nın uyardığı lipid peroksidasyonunda ortaya çıkan toksik ajanların süpürülmesi ve/veya bu toksik ajanları nötralize etmek suretiyle ortaya çıkabilir. Serbest radikal mekanizması ile farklı organ hasarlarına yol açan bir endotoksin olan bakteriyel lipopolisakkarit ile rat dokularının inkübasyonu sonucu verilen melatoninin artan MDA seviyesini azalttığı bildirilmiştir (123).

Yaygın olarak çözücü ve kimyasal deterjan olarak kullanılan karbon tetraklorit (CCl_4), karaciğer dokusunda serbest radikal kaynaklı hasara yol açar. Karaciğer homojenatlarının veya mikrozomlarının CCl_4 ile inkübasyonu lipid peroksidasyon ürünlerini artırır. Melatonin uygulamasının bu lipid peroksidasyonu ürünlerini azalttığı tespit edilmiştir (124). Retina veya beyin doku homojenatlarının H_2O_2 ve $FeSO_4$ ile inkübasyonu ile oluşan LPO'nunun, melatoninin farmakolojik dozlarının uygulanmasıyla anlamlı bir şekilde inhibe olduğu tespit edilmiştir (125).

SOD, yüksek derecede reaktif ve potansiyel toksik süperoksit radikallerinin (O_2^-), H_2O_2 ' e dönüşümünden sorumlu bakır ve çinko içeren bir enzimdir (109). Çalışmamızda OTA, bu enzimi serumda anlamlı olarak, karaciğer ise kısmen inhibe etmiştir. Büyük bir olasılıkla OTA dokulardaki SOD içinde bakır ve çinko moleküllerini etkilemekte ve enzim aktivitelerinin ortaya çıkmasını inhibe etmektedir (126). Bu etki barsaktan iyon emiliminin azalması ile olabilir.

CAT, prostatik grup olarak hematinin yanında demir de içeren diğer bir antioksidan enzimdir. Sitokrom sisteme sahip bütün aerobik hücrelerde bulunur. Karaciğerde fazla miktarda bulunan CAT, hidrojen peroksitin oksijen ve suya parçalanmasından sorumludur (127). OTA uygulaması ile katalaz aktivitesinin azalması, bu enzimin aktivitesi için gerekli elementin absorpsiyonunun azalması ile açıklanabilir (126).

GSH-Px, lipid peroksitlerinin ve hidrojen peroksitin, detoksifikasyonunu katalizleyen bir antioksidan enzimdir. Selenyum GSH-Px için gerekli bir kofaktördür

ve selenyumdaki herhangi bir hasar GSH-Px aktivitesinin azalması ile sonuçlanır (126). Serumda GSH-Px önemli derecede artmıştır. Lipit peroksidasyonundan hasar gören hücrelerin, içeriklerini dolaşım kanına boşaltmış olması ve/veya dokunun geçirgenliğini yitirmesiyle sentezlenen GSH-Px'in direkt kana geçmesi serumdaki GSH-Px artışını açıklayabilir. Diyaliz hastalarında azalan glomerüler filtrasyonla kana geçen OTA miktarının çok yüksek olması da böbrekteki geçirgenliğin ortadan kalktığının bir göstergesidir (38). Karaciğerin detoksifiye özelliğinden dolayı, bu dokuda, lipit peroksidasyonundan oluşacak hasarın en aza indirgenmesi için, oluşan hidrojen peroksitler, artan GSH-Px aktivitesi ile parçalanıyor olabilir.

Beyinde önemli bir antioksidatif enzim olan GSH-Px aktivitesinin melatonin tarafından uyarıldığı bildirilmiştir. Bunu, hidrojen peroksit ve lipit peroksit mekanizmasını ilerleterek yapar, sonuçta serbest radikallerin hasarı azaltılmış olur (127).

Sekiz hafta süre ile 145µg/kg OTA ile beslenen erkek wistar ratların üriner enzimlerine bakılan çalışmada, dördüncü haftanın sonunda OTA verilen grupta kontrollere göre GGT, LDH ve ALP'nin önemli derecede yükseldiğini tespit etmişlerdir. Bu artışın ALP için %70, LDH ve GGT için %100 olduğu belirtilmektedir. Aynı çalışmada on iki hafta sonunda böbrek tübüllerindeki LDH, GGT ve ALP seviyelerinin azaldığını bulmuşlardır. GGT ve ALP'nin normalden %75, LDH'nin ise %60 daha az olduğu bildirilmektedir. Buradaki enzim seviyeleri haftalık olarak takip edilmiş ve artışın sabit olmadığı gözlenmiştir. 5-7 hafta arasında enzim seviyelerinde dördüncü haftaya göre azalma görülmüş, bunu hücrelerin dejenerasyon ve rejenerasyon döngüsüyle açıklamışlardır. Bu hipotez, Wachsmuth'un sonuçlarıyla korelasyon göstermektedir. Wachsmuth, yaşlı hücrelerin parçalanmasıyla idrara daha çok enzim verildiğini, rejenere olmuş genç hücrelerin ise idrara daha az enzim salgıladığını bildirmektedir (8). Rejenere olan hücreler bir süre sonra OTA'dan etkilenerek, üreye enzim salınımını yeniden arttırır. Bu nedenle belli haftalarda üredeki enzim miktarlarında değişiklik meydana gelir. Ratlara OTA uygulaması sonucu üredeki enzim düzeylerini araştıran Ngaha, ALP'nin üriner atılımının arttığını saptamış ve bunu böbrek proksimal tübül hücrelerindeki olası bir hasara bağlamıştır (11). Çalışmamızda ALP, OTA uygulanan grupta karaciğer dokusunda azalmıştır. OTA'dan başka etilamin ve merkurik klorit gibi diğer

nefrotoksik ajanlar ile yapılan çalışmalarda, bu enzimlerin seviyelerinin rat üresinde arttığı ve böbrek tübüllerini hasara uğrattığı görülmüştür. OTA 145µg/kg, diğer nefrotoksik ajanlar mg düzeyde verildiği halde OTA'nın çok daha toksik etki gösterdiği görülmüştür (8).

Creppy ve arkadaşları ratlara, altı haftalık OTA uygulaması sonucu, OTA verilen grupta üredeki GGT ve LDH seviyelerini değerlendirmişler ve anlamlı artışlar tespit etmişlerdir. Serum sonuçlarımızda, OTA verilen grupta kontrollere göre LDH ve GGT'nin seviyelerinde anlamlı azalışlar tespit ettik (sırasıyla $p < 0,005$, $p < 0,01$). Daha öncede belirtildiği gibi OTA uygulaması sonucu böbrekte meydana gelen hasar, böbreğin geçirgenlik hassasiyetini bozmuş, bunun sonucunda da kan dolaşımındaki LDH ve GGT direkt üreye geçmiş olabilir. Wachsmuth'da hasara uğramış böbrek hücrelerinin üreye daha fazla enzim salgıladığını bildirmiştir (8). Çalışmamızda, serumda elde ettiğimiz azalan enzim seviyeleri, Creppy ve Kane'in ürede yüksek oranda LDH ve GGT buluşları ile uyum göstermektedir.

Atroschi ve arkadaşları OTA ve T-2 toksini kullanarak ratlarda karaciğer enzim aktiviteleri üzerine yaptıkları bir çalışmada, AST, ALT, ALP ve GGT seviyelerini incelemişlerdir. OTA ve T-2 toksinin enzim aktivitelerinde benzer değişiklikler meydana getirdiğini tespit etmişlerdir. Bütün enzim seviyelerinin karaciğer dokusunda kontrole göre OTA'lı grupta arttığını, OTA'lı gruba vitamin E ve selenyum verildiğinde artan enzim seviyelerinde azalmalar olduğunu bulmuşlardır (10).

OTA uygulanan ratlarla yapılan bir çalışmada, kan glukoz seviyesinin arttığı gözlenmiş, bu artış azalan serum insülin seviyelerine bağlanmıştır. OTA toksikozisi süresince insülinin sentezi engellenebilir ve/veya pankreatik β hücrelerinden salınımı azalabilir. Bunun sonucunda insülin seviyesinin azalması, kan glukoz seviyesinin artmasına neden olabilir. Bir çalışmada terreik asit ve penitrem A gibi mikotoksinler ile oluşan hipergliseminin, hipoinsülinemi ile bağıntılı olduğu bildirilmektedir. Deneyde kullanılan ratların, karaciğerindeki laktat ve piruvatın azalması, muhtemel bir glikoliz inhibisyonunu göstermektedir (40).

Karaciğerden hazırlanan preparatlarda, heksokinaz, aldolaz ve laktat dehidrogenaz gibi glikolitik enzim aktivitelerinin tokzikozis süresince azaldığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, OTA'nın insülin seviyesine etkiyerek, karbonhidrat

mekanizmasını etkilediğini belirtmişlerdir (40). Sonuçlarımızda da karaciğerde görülen LDH azalması, muhtemel bir glikoliz inhibisyonu ve azalan insülin seviyesi ile açıklanabilir. Glikoliz evresinde fosfofruktokinaz enziminin çalışabilmesi için Mg^{+2} -ATP kompleksine ihtiyaç vardır. Benzer şekilde, enolazın ve piruvat kinazın çalışabilmesi için de Mg^{+2} ve Mn^{+2} iyonları gereklidir. Yukarıda da bahsedildiği gibi OTA iki ve üç değerlikli iyonlarla bağ yapabilme (özellikle Fe^{+3}) özelliğine sahiptir. Bize göre OTA, demir gibi iyonları bağlayabiliyorsa, ortamda bulunan Mg^{+2} ve Mn^{+2} gibi iyonları da bağlayabilir. Ortamda bu iyonların azalması enzim aktivitesini yavaşlatabilir, glikolizde oluşan piruvat miktarını azaltabilir. Piruvatın azalması, ihtiyaç duyulan LDH'ın da az sentezlenmesiyle sonuçlanabilir. Bu hipotezin, OTA'nın karbonhidrat mekanizması üzerine olan etkileri arasında değerlendirilmesinin uygun olacağı görüşündeyiz.

Alloksanın, serbest radikal mekanizması aracılığı ile insülin salgılayan β -hücrelerinde harabiyete yol açtığı bilinmektedir. Alloksan uygulanan farelerde, melatoninin koruyucu rolü incelenmiş ve kan glukoz artışını sınırladığı tespit edilmiştir (128).

OTA toksikasyonunda böbrek ve karaciğer hedef organlardır. Artan karaciğer enzimleri, yaygın klinik problemlerin göstergesidir. AST ve ALT aktiviteleri, insanlarda karaciğer hastalıklarının hassas belirteci olarak uzun zamandan beri kullanılmakta ve gerçekte karaciğere özgü olduğu kabul edilmektedir. Bu enzimler ratların doğasında daha az spesifik olmasına rağmen, artan plazma aktivitelerinin oksidatif hasarla ilişkili olduğu bildirilmektedir (10).

Kimyasal karsinojen olan safrol, nükleer toksik serbest radikalleri etkileyerek DNA hasarına yol açar. Safrolle eş zamanlı uygulanan melatoninin karaciğer hücre DNA'sını serbest radikal hasarından koruduğu tespit edilmiştir (129).

OTA'nın fenilalanin analogu olması, protein sentezini inhibe etmesine neden olur (45). OTA uygulanan ratların barsaklarında, hücresel makromoleküller (glikojen, protein, RNA, DNA) ve membrana bağlı enzim seviyeleri (ATP_{Paz} , Na^+-K^+ ATP_{Paz} , ALP) azalmaktadır. Araştırmacılar, Genel olarak nükleik asit içeriğinin ve RNA seviyesinin buradaki azalışının, azalan protein sentezi seviyesinin sonucu olabileceğini bildirmişlerdir. Membrana bağlı enzimlerin aktivitesinde gözlenen

azalma, enzim molekülleri üzerine OTA'nın toksik etkisi veya bu enzimlerin lokalize olduğu membran yapısındaki değişiklikten veya protein/enzim sentezi ile ilişkili nükleik asitlere OTA'nın sekonder etkisi ile meydana gelmiş olacağı bildirilmektedir(130).

Böbrek hücrelerinde ATP'nin yüksek oranda tüketilmesi ve hücre içi ATP'deki değişiklikler, nefrotoksisitenin hassas belirteçidir. OTA, ATP'yi özellikle proksimal tübül hücrelerinde azaltır (131). Depo enerjisinin tükenmesi ile birlikte membranda transport işlemleri yapılamaz, hücre membranı statik değil dinamik bir organel olduğundan yeni moleküller kontrollü olarak hücre membranının yapısına girip çıkamaz, hücre içi ve dışı ortamlar arasında mevcut olan kimyasal ve elektriksel farklılıklar korunamaz ve membran yavaş yavaş bütünlüğünü kaybetmeye başlar. Bu mekanizma, serum sonuçlarından yola çıkarak belirttiğimiz böbrekteki doku hasarının oluşmasında rol oynayabilir.

Melatonin, lipitte ve suda oldukça iyi çözülebildiğinden hücreler tarafından kolayca ve hızla alınır. İn vitro model kullanılarak yapılan çalışmalarda, melatoninin trolox'tan iki kat daha etkili peroksil radikal süpürücüsü olduğu bildirilmiştir (132). Birbirinden bağımsız yürütülen bütün çalışmalar, serbest radikallere karşı savunmada melatoninin daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Serbest radikal süpürücüleri, eşlenmemiş bir elektrona sahiptirler, serbest radikalleri nötralize ederken bu elektronu verir. Bunun sonucunda serbest radikal süpürücüsü serbest radikal haline geçebilir! Melatonin ise toksik hidroksil radikalleri nötralize ettiğinde daha az toksisiteye sahip indol katyon radikaline dönüşür. Bu radikal süperoksit anyon radikallerini süpürme yeteneğine sahiptir daha sonra N¹-asetil-N²-formil-5-metoksikinuramine (AMFK) dönüşür ve hidroksil radikalleri nötralize eden sekonder mekanizmayı kullanmış olur (125).

Yakın geçmişte toplanan veriler, melatoninin antioksidan özelliklerini açıkça ortaya çıkarmıştır, bu durum önemli derecede organizmanın lehinedir. Çünkü melatoninin bilinen bir toksisitesi yoktur ve organizma tarafından kolayca emilir. Şimdiye kadar ortaya çıkan bulgular, melatoninin koruyucu etkisinin fizyolojik dozdan ziyade yalnız farmakolojik dozda ortaya çıktığı yönündedir.

Nefropatili ve sağlıklı insan serum örneklerinde OTA düzeyleri, Kanada, Tunus, Cezayir, İtalya ve Türkiye gibi çeşitli ülkelerde araştırılmıştır. Özellikle

Cezayir (133), Türkiye (38) ve Tunus'ta (134) yapılan çalışmalarda nefropatili hasta serumlarında yüksek düzeyde OTA bulunmuştur. Bu bulgular OTA'nın üriner sistem patolojisinde rolü olduğunu düşündürmektedir. Kontamine tahıl tüketiminin, endemik nefropati gözlenen bölgelerde diğer bölgelere göre daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Özellikle OTA içeren kontamine gıdaların fazla tüketildiği endemik bölgelerde insan enzim düzeylerinin araştırılmasının da anlamlı olacağını düşünmekteyiz.



ÖZET

Çeşitli araştırmalar bir mikotoksin olan Okratoksin A' nın (OTA), karsinojenik, genotoksik, teratojenik, immunotoksik ve nefrotoksik olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışmada, ratlarda okratoksikozis oluşturarak serum ve doku enzim düzeyleri belirlenmiş ve bir antioksidan olan melatoninin bu enzim düzeylerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla her grupta 8 rat olmak üzere; kontrol, Okratoksin A (OTA) ve Okratoksin A+Melatonin grupları oluşturulmuş, okratoksin A ve melatonin oral olarak uygulanmıştır.

OTA grubunda, karaciğerde alanin amino transferaz (ALT) seviyesi kontrole göre anlamlı derecede artmış ($p<0.01$), aspartat amino transferaz (AST) seviyesindeki artış anlamlı bulunmamıştır. Bu organda laktat dehidrogenaz seviyesi (LDH), kontrole göre anlamlı bir azalış göstermiştir ($p<0.03$). Serumda kontrollere göre, ALT, AST, LDH, gama glutamil transferaz (GGT) ve albumin seviyeleri, OTA'lı grupta anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur (sırasıyla $p<0.008$, $p<0.004$, $p<0.002$, $p<0.009$, $p<0.002$).

OTA uygulanan ratlarda, lipid peroksidasyon ürünlerinin, karaciğer ve serumda arttığı gözlemlendi. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) seviyesinin, karaciğer ve serumda anlamlı şekilde arttığı tespit edildi (sırasıyla $p<0.02$, $p<0.002$). Serumda katalaz (CAT) seviyesinin anlamlı derecede arttığı ($p<0.01$), süperoksit dismutaz (SOD) seviyesinin ise anlamlı derecede azaldığı ($p<0.004$) gözlenmiştir.

OTA + melatonin verilen III. deney grubundaki değerlerin, yalnız OTA uygulanan ratlara göre, lipid peroksidasyon ürünlerinin karaciğerde azaldığı serumda arttığı görüldü. III. Deney grubunda dokularda, GSH-Px, CAT ve SOD enzim seviyelerinde değişiklik gözlenmemiştir. II. ve III. gruplar karşılaştırıldığında, III. Grupta karaciğerde ve serumda SOD, CAT, GSH-Px seviyeleri azalmış, serumdaki SOD azalması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$).

Sonuçlarımız, OTA'nın karaciğerde yapısal doku hasarına yol açtığını göstermektedir. Melatoninin, antioksidan savunma sistemini destekleyerek ve/veya radikal süpürücü etkisi ile hasar oluşumunu en aza indirgediği görülmektedir.

SUMMARY

Various studies indicate that the mycotoxin Ochratoxin A (OTA) is carcinogenic, genotoxic, teratogenic immunotoxic and nephrotoxic. In the present study, a serum and tissue enzyme level determined during ochratoxicosis in rats and the effects of melatonin, which is an antioxidant, on this enzyme levels, was investigated. For this purpose, rats were divided into three equal groups each consisting of eight rats; control (group I), OTA (group II) and OTA+melatonin (group III) groups were formed, OTA and melatonin applied orally.

In OTA treated group, alanin amino transferase (ALT) level was significantly increased in liver when compared with controls ($p < 0.01$); aspartat amino transferase (AST) level was not significantly changed in comparison with control group. In this tissue, lactate dehidrogenaz (LDH) level was significantly decreased when compared with controls ($p < 0.03$). ALT, AST, LDH, gama glutamyl transferase (GGT) and albumin levels were significantly decreased in serum when compared with controls.

In OTA-treated rats, lipid peroxidation product, levels were increased in liver and serum in comparison with control group. Glutatyon peroxidase (GSH-Px) level was increased in liver and serum when compared with controls (respectively $p < 0.02$, $p < 0.002$). Catalase (CAT) level was significantly increased and superoxide dismutase (SOD) was significantly decreased in serum when compared with controls (respectively $p < 0.01$, $p < 0.004$).

In group III which was given OTA + Melatonin, lipid peroxidation product levels were decreased in liver and increased in serum when compared with OTA treated rats. In-group III, GSH-Px, SOD and CAT levels were not significantly changed in liver. GSH-Px and CAT levels were decreased and SOD level was significantly decreased ($p < 0,001$) in serum when compared with OTA-treated rats. Our results showed OTA induced structural tissue damage in liver. Melatonin decreases the formation of damage to support antioxidant defence system and/or with free radical scavenger action.

KAYNAKLAR

1. Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Akay Ö. Özel Mikrobiyoloji : Epidemiyoloji, Bakteriyel ve Mikotik İnfeksiyonlar. Erzurum: Atatürk Üniversitesi Basımevi. 1992: 169-90 ;629-635;645.
2. Di Paolo, Guarnieri A, Garosi G, Sachi G, Mangiorotti AM, Di Paolo M. Inhaled mycotoxins lead to acute renal failure. *Nephrol Dial Transp* 1994; 9(Suppl 4):116-120.
3. Petzinger E, Ziegler K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. *J Vet Pharmacol Therap* 2000; 23: 91-98.
4. Rasonyi T, Schlatter J, Dietrich DR. The role of α -2u-globulin in ochratoxin A induced renal toxicity and tumors in F344 rats. *Toxicology Letters* 1999: 104; 83-92.
5. Gautier J-C, Holzhaeuser D, Markovic J, Gremaud E, Schilter B, Turesky J. Oxidative damage and stress response from ochratoxin A exposure in rats. *Free Radical Biology & Medicine* 2001; 30(10): 1089-1098.
6. Zepnik H, Pahler A, Schauer U, Dekant W. Ochratoxin A induced tumor formation: Is there a role of reactive Ochratoxin A metabolites?. *Toxicological Sciences* 2001; 59(1): 59-67.
7. Huff JE. Carcinogenicity of Ochratoxin A in experimental animals. *IARC Sci Publ* 1991; 115: 229-44.
8. Kane A, Creppy EE, Rösenthaller R, Dirheimer G. Changes in urinary and renal tubular enzymes caused by subchronic administration of Ochratoxin A in rats. *Toxicology* 1986; 42: 233-243.
9. Gekle M, Silbernagl S. Renal toxicodynamics of Ochratoxin A: A Pathophysiological Approach. *Kidney Blood Press RES* 1996; 19:225-235.
10. Atroshi F, Rizzo A, Sankari S, Biese I, Westermarck T, Veijalainen P. Liver enzyme activities of rats exposed to Ochratoxin A and T-2 toxin with antioxidant. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2000 ;64:586-592.
11. Ngaha EO. Biochemical changes in rat during experimentally induced acute ochratoxicosis. *Enzyme* 1985; 33:1-8.
12. Özçelik N, Soysal D. Okratoksin A: Endemik nefropati ile ilişkisi. *Genel Tıp Derg* 1998;8(4):173-6.
13. Hult Karbondioksit, Gatenback S, Retquist T, Selley S. Ochratoxin A in pig blood method of analysis and use a tool for feed studies. *Appl Environ Microbiol* 1984;36:314-6.
14. Zofair SM, Mathew S. Ochratoxin induced hemolysis in rabbits. *Indian J Exp Biol.* 1996;34:592-593.
15. Özgüner FM, Delibaş N, Özçankaya R, Karaca H, Koyu A. Yaşla azalan melatoninin oksidatif hasar ve mental yetilerle ilişkisi.
16. Reiter RJ. Fuctional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *European Journal of Endocrinology* 1996;134:412-20.
17. Arda M. Mikoloji, Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Yayınları No: 366. 1980; 11-20.
18. Baydar S. Tohumuz Bitkiler Sistematiği. Karadeniz Tek. Üniv Yayınları No:151. 1990; 5-7.

19. Alperden İ. Hayvansal ürünlerde mikotoksin araştırmaları ve kalite kontrol esasları. Tübütak, Marmara bilimsel ve enüstriyel araştırma enstitüsü, Beslenme gıda teknolojisi ünütesi. 1978; 7-15.
20. Smith JE, Lewis CW. et al. Mycotoxins in human nutrition and health, European Comission DGXII, Science Research and Development, EUR 16048 EN. 1994.
21. Coker RD. Mycotoxins. Training Manual, National Research Instute, England. 1984.
22. Özçelik S. Gıdalarda oluşan mikotoksinler ve zararlı etkileri. Gıda sanayinin sorunları ve serbest bölgelerin gıda sanayiine beklenen etkileri sempozyumu, Adana. 1986:285-295.
23. Peraica M, Radic B, Lucic A, Pavlovic M. Toxic effects of mycotoxins in humans. Bull World Health Organ 1999; 77: 754-66.
24. Ostry V. Micromycetes, mycotoxins and human health. Cas Lek Cesk 1999; 138: 515-21.
25. Van Rensburg SJ. Role of epidemiology in the elucidation of mycotoxin health risks, In: Mycotoxins in human and animal health, edited by Rodrics JV., Hesseltine CW, Mehlmen M.Pathdox Publ. Inc. Illinois. 1977: 699-711.
26. Joffle AZ. Alimentary toxic aleukia, In: Mycotoxins, Edited by Purchase, I.F.K, Elsevier.Sci. Publ.Holland. 1974: 229.
27. Synder R, Parke DV, Kocsis JJ, Jollow DJ, Gibson GC & Witmer C. (eds). Biological reactive intermediates-II: Chemical Mechanism and Biologic Effects. Plenum Press, Newyork and London. 1982.
28. Krogh P. Mycotoxins In Food. Academic Press, London. 1987: 97; 149-193.
29. Watson SA, Mirocha CJ, Hayes AW. Analysis for trichothecenes in samples from Southeast Asia associated with "Yellow Rain" Fund. Appl.Toxicol. 1984: 4 ; 700-717.
30. Endou H. Proc.Japan Assoc. Mycotoxicol. 1983:18;21-23.
31. Güray Ö, Vural N. Mikotoksinlerle meydana gelen besin zehirlenmeleri münasebeti ile aflatoksinler üzerine bir araştırma, Ank.Üniv.Tıp Fak. Mec. 1968:21;1030
32. Akşehirli M, Bozkurt M. Memleketimiz Fındık, Fıstık, Badem içi ve cevizlerde Aflatoksin bakımından bir araştırma. Türk Hij.Tec.Biyo. 1969: 29; 103.
33. Bozkurt M, Göksoy N., A study of Aflatoxins in Turkish Pistacho Nuts, Türk Hij.Tec.Biyo. 1972: 32; 221.
34. Alperden I., Hayvansal gıda maddeleri ile mamullerinde mikotoksin araştırmaları ve kalite kontrol esaslarının tesbiti, 1.Felişme Raporu, Yayın No:16,6-11. 1976.
35. Denizel T., Mısırların depolanmaları sırasında oluşan bazı mikotoksinler ve bunların sinerjistik etkileri üzerinde araştırmalar. A.Ü. Ziraat Fakültesi. 1980.
36. Tayfur M., Tüketim aşamasındaki bulgur örneklerinde aflatoksin B1, B2, G1, G2 ve okratoksin A taraması üzerine bir araştırma. Hacettepe Üniv. Sağlık Bilimleri Enst. Doktora Tezi. Ankara, 1991.
37. Kocabay M., İzmir ili ve çevresindeki bazı yem fabrikalarında kullanılan değişik yem hammddelerinde aflatoksin B1, okratoksin A ve Zearelenon içeriklerinin saptanması. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yüksek lisans tezi. 1995.
38. Özçelik N, Koşar A, Soysal D. Ochratoxin A in human serum samples collected in Isparta-Turkey from healthy individuals and individuals suffering from different urinary disorders. Toxicology Letters 2001; 121: 9-13.

39. Atroshi F, Rizzo A, Sankari S, Biese I, Westermarck T, Veijalainen P. Liver enzyme activities of rats exposed to Ochratoxin A and T-2 Toxin with antioxidants. *Bull Environ Contam Toxicol* 2000; 64: 586-92.
40. Subramanian S, Kanthasamy A, Balasubramanian N, Sekar N, Govindasamy S. Ochratoxin A toxicity on carbohydrate metabolism in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 1989; 43:180-184.
41. Creppy EE. Human ochratoxicosis. *Journal of Toxicology* 1999;18: 277-293.
42. Gekle M, Silbernagl S. Renal toxicodynamics of Ochratoxin A: A pathophysiological approach. *Kidney Blood Pressure Res* 1996; 19: 225-235
43. Petzinger E, Ziegler K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. *J Vet Pharmacol Therap* 2000; 23: 91-98.
44. Ferrufino- Guardia EV, Tangni EK, Larondelle Y, Ponchaut S. Transfer of Ochratoxin A during lactation: exposure of suckling via the milk of rabbit does fed a naturally- contaminated feed. *Food Additives and Contaminants* 2000; 17: 167-175.
45. Creppy EE, Baudrimont I, Betbeder A-M. Prevention of nephrotoxicity of Ochratoxin A, a food contaminant. *Toxicology Letters* 1995; 82/83: 869-877.
46. Van der Merwe KJ., Steyn PS, Fourie L., Scott De.B, Theron JJ., Ochratoxin A, atoxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*. 1965;205;1112-1113.
47. Shotwell OL, Hesseltine CW, Goulden ML. Ochratoxin A: occurrence as natural contaminant of a corn sample. *Applied Microbiol.* 1969;17;765-766.
48. Krogh P. Casual associations of mycotoxic nephropathy. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect.A.* 1978b;269;1-28.
49. Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* 2002; 28;127(1-3):19-28. Review.
50. Ninth report on carcinogenesis; Ochratoxin A. CAS No. 303-47-9.
51. Rasonyi T, Schlatter J, Dietrich DR. The role of α -2u-globulin in ochratoxin A induced renal toxicity and tumors in F344 rats. *Toxicology Letters* 1999; 104; 83-92.
52. Gautier J-C, Holzhaeuser D, Markovic J, Gremaud E, Schilter B, Turesky J. Oxidative damage and stress response from ochratoxin A exposure in rats. *Free Radical Biology & Medicine* 2001; 30: 1089-1098.
53. Zepnik H, Pahler A, Schauer U, Dekant W. Ochratoxin A induced tumor formation: Is there a role of reactive Ochratoxin A metabolites?. *Toxicological Sciences* 2001; 59: 59-67.
54. Huff JE. Carcinogenicity of Ochratoxin A in experimental animals. *IARC Sci Publ* 1991; 115: 229-44.
55. Kane A, Creppy EE, Röschenthaier R, Dirheimer G. Changes in urinary and renal tubular enzymes caused by subchronic administration of Ochratoxin A in rats. *Toxicology* 1986; 42: 233-243.
56. Boorman GA. NTP technical report on the toxicology and carcinogenic studies of Ochratoxin A in F344/n rats (gavage studies); 1989.
57. Jahn HN, Fink-Gremmels J. Wirkung von Ochratoxin A im Lymphozytentransformationstest. *Kulmbach, Mitteilungsbl. Bundesanst. Fleischforsch* 1988; 101.

58. Albassam MA, Young SI, Bhatnagar R, Sharma AK, Prior MG. Histopathologic and electron microscopic studies on the toxicity of Ochratoxin A in rats. *Vet. Pathol.* 1987; 24: 427-435.
59. Mayura K, Reddy RV, Hayes AW, Berndt WO. Embryocidal, fetotoxic and teratogenic effects of ochratoxin in rats. *Toxicology* 1982; 25: 175-185.
60. Mayura K, Hayes AW, Berndt WO. Effects of dietary protein on teratogenicity of Ochratoxin A in rats. *Toxicology* 1983; 27: 147-157
61. Brown MH, Szczech GM, Purmalis BP. Teratogenic and toxic effects of Ochratoxin A in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1976; 37: 331-338.
62. Fukui Y, Hoshino K, Kameyama Y, Yasui T, Toda C, Nagano H. Placental transfer of ochratoxin A and its cytotoxic effect on the mouse embryonic brain. *Food Chem. Toxicol.* 1987; 25: 17-24.
63. Creppy EE, Stoermer FC, Kern D, Rösenthaller R, Dirheimer G. Effects of Ochratoxin A metabolites on yeast phenylalanyl-tRNA synthetase and on the growth and in vivo protein synthesis of hepatoma cells. *Chem. Biol. Interact.* 1983; 47: 239-247.
64. Prior MG, Sisodia CS. The effect of Ochratoxin A on immune response of swiss mice. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 1982; 42: 172-176.
65. Kanisawa M, Suzuki S. Induction of renal and hepatic tumors in mice by Ochratoxin A, a mycotoxin. *Gann.* 1978; 69: 599-600.
66. Bendele AM, Carlton WW, Krogh P, Lillehoj EB. Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6J x C3H) F1 mouse. *J. Natl. Cancer Inst.* 1985; 75: 733-742.
67. Luster MI, Germolec DR, Burleson GR, Jameson CW, Ackerman MF, Lamm KR, Mayer HT. Selective immunosuppression in mice of natural killer cell activity by Ochratoxin A. *Cancer Res.* 1987; 47: 2259-2263.
68. Haubeck HD, Lorkowski G, Kölsch E, Rösenthaller R. Immunosuppression by Ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Appl. Environ. Mikrobiol.* 1981; 41: 1040-1042.
69. Lotzova E, Hebermann RB. Immunobiology of natural killer cells. Boca Raton, 1986 Vol. I-II; CRC Press Inc.
70. Hayes AW, Hood RD, Lee HL. Teratogenic effects of Ochratoxin A in mice. *Teratology* 1974; 9: 93-97.
71. Hood R, Kuczuk MH, Szczech GM. Effects in mice of simultaneous prenatal exposure to Ochratoxin A and T-2 Toxin. *Teratology* 1978; 17: 25-30.
72. Szczech GM, Hood RD. Brain necrosis in mouse fetuses transplacentally exposed to the mycotoxin Ochratoxin A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1981; 57: 127-137.
73. Hood RD, Naughton M J, Hayes AW. Prenatal effect of Ochratoxin A in hamsters. *Teratology* 1976; 13: 11-14.
74. Harvey RB, Kubena LF, Lawhorn DB, Fletcher OJ, Phillips TD. Feed refusal in swine fed ochratoxin contaminated grain sorghum: Evaluation of toxicity in chicks. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1987; 190: 673-675.
75. Chang CF, Hamilton PB. Impairments of phagocytosis by heterophils from chickens during ochratoxicosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980; 39: 572-575.
76. Chang CF. Impaired phagocytosis by monocytes from fowls with ochratoxicosis. *J. Chin. Soc. Vet. Med.* 1982; 8: 19-25.
77. Singh GSP, Chauhan HVS, JHA, GJ, Singh KK. Immunosuppression due to chronic Ochratoxicosis in broiler chicks. *J. Comp. Path.* 1990; 103: 399-410.

78. Dwivedi P, Burns RB. Pathology of ochratoxicosis in young broiler chicks. *Res. vet. Sci.* 1984; 36: 92-103.
79. Dwivedi P, Burns RB. Immunosuppressive effects of ochratoxin A in young turkeys. *Avian Path.* 1985; 14: 213-225.
80. Szczech GM, Carlton WW, Tuite J. Ochratoxicosis in beagle dogs. 2. Pathology. *Vet. Pathol.* 1973 a; 10: 219-231.
81. Szczech GM, Carlton WW, Tuite J, Caldwell R. Ochratoxin A toxicosis in swine. *Vet. Pathol.* 1973 b; 10: 347-364.
82. Harvey RB, Elissalde MH, Kubena LF, Weaver EA, Corrier DE, Beverly AC. Immunotoxicity of ochratoxin A to growing gilts. *Am. J. Vet. Res.* 1992; 53: 1966-1970.
83. Holmberg T, Thuvander A, Hult K. Ochratoxin A as a supressor of mitogen-induced blastogenesis of porcine blood lymphocytes. *Acta Vet. Scand.* 1988; 29: 219-223.
84. Fink-Gremmels J, Jahn M. Multifaktorial diseases in pigs: model experiments with ochratoxin A. The Hague, The Netherlands. 12th IPVS Congress, August 1992: 17-20, 667.
85. DEGEN GH, Gerber MM, Hillebrand IE, Föllmann W. Untersuchung zur Gentoxizität von Ochratoxin A in Zellkulturen von Schwein und Schaf. 1995 Braunschweig, 17. Mykotoxin-Workshop, 1.
86. Seegers JC, Lottering M-L, Garlinski PJ. The mycotoxin Ochratoxin A causes apoptosis-associated DNA degeneration in human lymphocytes. *Med. Sci. Res.* 1994; 22: 417-419.
87. Krogh P., Role of ochratoxin A in disease causation. *Fd.Chem.Toxicol.* 1992;3;213-224.
88. Huff W., Hamilton PB., Mycotoxins their biosynthesis in fungi ochratoxins:metabolites of combined pathways. *J.Food Protec.* 1979;42(10);815-820.
89. Wilson BJ., Mycotoxins and Toxic Stress Metabolites of Fungus Infected Sweet Potatoes. *Nutritional Toxicology.* 1982;1:174.
90. Reich K. Feldstudie zum Vorkommen von Ochratoxin A und Zearalenon in Futtermitteln und im Blut von Zucht- und Mastschweinen mit besonderer Berücksichtigung der Futterherkunft und -lagerung. Doktora Tezi, Freien Üniversitesi Veteriner Fakültesi 1998 Berlin. Journal-Nr. 2188.
91. Galtier P, Alvinerie M, Charpentreau JL. The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. *Fd Cosmet Toxicol* 1981; 19: 735-738.
92. Galtier P, Alvinerie M. In vitro transformation of ochratoxin A by animal microbial floras. *Ann. Rech.Veter.* 1976;7; 91-98.
93. Krogh P, Hald B, Gjertsen P, Myken F. Fate of ochratoxin A and citrinin during malting and brewing experiments. *Appl Microbiol.* 1974a;28;31-34.
94. Mortensen HP, Hald B, Madsen A., *Acta Agric Scand.* 1983;33;235-239.
95. Kühn I, Breves G, Valenta H, Rohr K. Ochratoxin A Ausscheidung beim Schwein nach langfristiger oraler Applikation. Gießen, 14. Mykotoxin-Workshop, 1992: 47-48.
96. Elling F, Nielsen JP, Lillehoj EB, Thomassen MS, Stoermer FC. Ochratoxin A-induced porcine nephropathy : enzyme and ultrastructure changes after short-term exposure. *Toxicon* 1985; 23: 247-254 .

97. Sokol PP, Ripich G, Peter D, Ross H-CR. Mechanism of Ochratoxin A transport in kidney. *Journal of Pharmacology and Exp Therap* 1988; 246 ; 460-465.
98. Dahlmann A, William H, Silbernagl D-S, Gekle M. Detailed mapping of ochratoxin A reabsorption along the rat nephron in vivo: the nephrotoxin can be reabsorbed in all nephron segments by different mechanisms. *Journal of Pharmacology and Exp Therap* 1998; 286: 157-162.
99. Zingerle M, Silbernagl S, Gekle M. Reabsorption of the nephrotoxin Ochratoxin A along the rat nephron in vivo. *Journal of Pharmacology and Exp Therap* 1997; 280: 220-224.
100. Schwerdt G, Bauer K, Gekle M, Silbernagl S. Accumulation of ochratoxin A in rat kidney in vivo and in cultivated renal epithelial cells in vitro. *Toxicology* 1996; 114: 177-185.
101. Obrecht-Pflumio S., Dirheimer G., In vitro DNA and dGMP adducts formation caused by ochratoxin A. *Chemico-Biological Interactions*. 2000:127; 29-44.
102. Pfhol-Leszkowicz A., Grosse Y., Kane A, Creppy EE., Dirheimer G., Differential DNA adduct formation and disappearance in three mouse tissues after treatment with the mycotoxin OTA. *Mutation Research*. 1993: 289; 265-273.
103. Bendele AM., Carlton WW., Probst GS., Evaluation of OTA for mutagenicity in a Battery of bacterial and mammalian cell assays. *Food Chem Toxic*. 1985: 23; 911-918.
104. Bendele AM. Studies of the carcinogenicity and mutagenicity of ochratoxin A. *Diss Abstr Int(Sci)* 1985 ;46:364-5B UI:86622862.
105. Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrin Rev* 1991;12:151-180.
106. Touitou Y., Bogdan A., Auzeby A., Selmaoui B., Melatonine et vieillissement. *Therapie* 1998: 53; 473-478.
107. Stehle JH., Failkes NS., Maolina CA., Simonneaux V, Pevet P, Sassone-Corsi P. Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* 1993:365;314-318.
108. Bettahi I., Pozo D., Osuna C., Reiter RJ., Acuna-Castroviejo D., Guerrero JM. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J Pineal Res*. 1996;20:205-210.
109. Reiter R., Tang Lei., Garcia JJ., Munoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sciences* 1997; 60(25): 2255-2271.
110. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları Konya, 1995.
111. Akyol Ö., İşçi N., Temel İ., Özgöçmen S., Uz E., Özyurt H., Murat M. et al. The relationship between plasma and erythrocyte antioxidant enzymes and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2001; 68 : 311-7.
112. Drapper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 421-431.
113. Williams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the blood in various breed crosses of sheep. *Res. Vet. Sci*. 1983; 253-256.
114. Aebi H. catalase in vitro. *Enzymol*. 1984; 105: 121-126.

115. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70(9): 158-169.
116. Kuiper-Goodman T., Scott PM. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sci.* 1989; 2:179-248.
117. IARC Evaluation of carcinogen risks to humans. Some naturally occurring substances; foods, items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 1993; 56:489-521.
118. Krogh P., Axelsen NH., Elling F., Gyrd-Hansen N., Hald B. et al. Experimental porcine nephropathy: changes of renal function and structure induced by ochratoxin A-contaminated feed. *Acta Pathol Microbiol. Scand., A, Pathol., suppl.* 1974;246:1-21.
119. Cheesman KH., Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *British Med Bull.* 1993;49:481-493.
120. Omar RF., Rahimtula AD., Bartsch H. Role of cytochrome P450 in ochratoxin A stimulated lipid peroxidation. *J. Biochem Toxicol.* 1991; 6(3): 203-209.
121. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.* 1991; 91:14-22.
122. Van Ginkel G., Sevanian A. Lipid peroxidation-induced membran structural alterations. *Methods Enzymol.* 1994;233:273-288.
123. Ghezzi P., Saccardo B., Bianchi M. Role of reactive oxygen intermediates in the hepatotoxicity of endotoxin. *Immunopharmacology* 1986;12:241-244.
124. Daniels WM., Reiter RJ., Melchiorri D., Sewerynek E., Pablos MI., Ortiz GG. Melatonin counteracts lipid peroxidation induced by carbon tetrachloride but doesn't restore glucose-6-phosphatase activity. *J Pineal Res.* 1995;19:1-6.
125. Sewerynek E., Melchiorri D., Ortiz GG., Poeggeler B., Reiter RJ. Melatonin reduces hydrogen peroxide induced lipid peroxidation in rat brain homogenates of different rat brain regions. *J Pineal Res.* 1995;19:51-56.
126. Meki MA., Hussein AA. Melatonin reduces oxidative stress induced by ochratoxin A in rat liver and kidney. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C.* 2001;130:305-313.
127. Reiter RJ., Tan D., Osuna C., Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed. Sci.* 2000;7:444-458.
128. Pierrefiche G., Topall G., Courbain G., Henriot I., Laborit H. Antioxidant activity in mice. *Res. Commun Chem. Pathol. Pharmacol.* 1993; 80:211-223.
129. Miller JA. Structure activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occurring and synthetic alkenylbenzene derivatives related to safrole and estragole. *Cancer Research* 1983;43:1124-1134.
130. Subramanian S., Balasubramanian N., William S., Govindasamy S. In vivo absorption of ¹⁴C-glucose and ¹⁴C-glycine by the rat intestine during OTA toxicosis. *Biochemistry Int.* 1991;23(4):655-661.
131. Endou H. Recent advances in molecular mechanisms of nephrotoxicity. *Toxicology Letters* 1998;102-103:29-33.
132. Pieri C., Marra M., Moroni F., Decchioni R., Marcheselli F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more potent than vitamin E. *Life Sciences* 1994;55:271-276.
133. Khalef A, Zidane C, Charef A, Gharbi A, Tadjerouna M, Betbeder AM, Creppy EE. Ochratoxicose humaine en Algerie. In Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer

- G (eds): Human ochratoxiosis and its pathologies. Montrouge, France:Colloque INSERM/ John Libbey Eurotext Ltd, . 1993; 231:123-127.
- 134.Maaroufi K, Achour A, Betbeder AM, Hammani M, Ellouz F, Creppy EE, Bacha E Foodstuffs and human blood contamination by the mycotoxin ochratoxin A: correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia. Arch Toxicol. 1995; 69: 552-558.

