

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAYSERİ'DE TÜKETİME SUNULAN BAZI
TAHİL ÜRÜNLERİNİN OKRATOKSİN A MİKTARLARI**

**Tezi Hazırlayan
İbrahim Murat ŞEVİKTÜRK**

**Tezi Yöneten
Doç.Dr. Zafer GÖNÜLALAN**

**Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Temmuz 2007
KAYSERİ**

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAYSERİ'DE TÜKETİME SUNULAN BAZI
TAHİL ÜRÜNLERİNİN OKRATOKSİN A MİKTARLARI**

**Tezi Hazırlayan
İbrahim Murat ŞEVİKTÜRK**

**Tezi Yöneten
Doç.Dr. Zafer GÖNÜLALAN**

**Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 269 nolu
proje ile desteklenmiştir**

**Temmuz 2007
KAYSERİ**

Doç.Dr.Zafer GÖNÜLALAN danışmanlığında **İbrahim Murat ŞEVİKTÜRK** tarafından hazırlanan “**Kayseri’de Tüketime Sunulan Bazı Tahıl Ürünlerinin Okratoksin A Miktarları**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

20/07/2007

JÜRİ

Başkan : Doç.Dr.Zafer GÖNÜLALAN (Danışman)

Üye : Yrd.Doç.Dr.Yeliz YILDIRIM

Üye : Yrd.Doç.Dr.Osman SAĞDIÇ

İmza



ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU

TEŞEKKÜR

Sunulan çalıŐmayı hazırlamamda yardımlarını esirgemeyen, Besin Hijyeni ve Teknolojisi alanını bana sevdiren ve öğreten, özellikle üretime yönelik konularda oldukça yararlı bir kaynak olan, uygulamaya yönelik faydalı bilgiler aldığım ve her zaman kendisinin derin bilgilerinden yararlanmak istediğim saygı değer hocam **Doç. Dr. Zafer GÖNÜLALAN**'a sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

KAYSERİ'DE TÜKETİME SUNULAN BAZI TAHİL ÜRÜNLERİNİN OKRATOKSİN A MİKTARLARI

ÖZET

Okratoksin A (OA), fenilalanine peptid bağıyla bağlı isokumarin parçası içeren bir toksindir. Daha çok depolarda bulunan *Penicillium* (özellikle *P. verrucosum*) ve *Aspergillus* (özellikle *A. alutaceus*) türleri tarafından üretilmektedir. OA, Avrupa, Avustralya ve Kuzey Amerika'daki gıda, yem, hayvansal dokular ve insanların kanında tespit edilmiştir. OA Balkan endemik nefropatisine (BEN) sebep olmaktadır.

Çalışmada, Kayseri'deki farklı ambar ve farklı parti tahıl ürünlerinden alınan 25 adet buğday unu, 25 adet pirinç ve 25 adet bulgur numunesinde OA kontaminasyonları araştırıldı. Numunelerdeki OA düzeylerinin tespitinde ELISA testi kullanıldı. Çalışılan numunelerde OA seviyesinin 145.66 ppt ile 1011.84 ppt arasında olduğu saptandı.

Sunulan çalışmada elde edilen sonuçların, Türkiye'de OA için belirlenen düzeyin (3000 ppt) altında olmasına rağmen, özellikle tahıl ürünlerinin çeşitliliğiyle ünlü Kayseri'de OA ile ilgili çalışmaların periyodik olarak yapılmasının sağlık açısından önemli olduğu vurgulanabilir.

Anahtar kelimeler: Okratoksin A, tahıllar, mikotoksin, mikotoksikozis.

THE QUANTITIES OF OCHRATOXIN A OF SOME CEREAL PRODUCTS CONSUMED IN KAYSERI

ABSTRACT

Ochratoxin A (OA) is a toxin that contains an isocoumarin moiety linked by a peptide bond to phenylalanine. It is produced by certain *Penicillium* (mainly *P. verrucosum*) and *Aspergillus* (mainly *A. alutaceus*) species of storage fungi. OA has been detected in foods, feeds, animal tissue and human blood in Europe, Australia and North America. It has been implicated in the fatal human disease Balkan endemic nephropathy (BEN).

In this study, the contamination levels of OA have been investigated in the 25 wheat flour, 25 rice and 25 bulgur (boiled and pounded wheat) samples which were collected from different groups of grains and granaries in Kayseri. The determination of OA levels was performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). For studied samples, it was found that OA levels ranged between 145.66-1011.84 ppt.

Although the presented results indicate that the levels of OA were under the permission limit of Turkey (3000 ppt), periodic measurements of OA in especially Kayseri, which is well-known variety of cereal meals, is important for human health.

Key words: Ochratoxin A, cereals, mycotoxin, mycotoxicosis.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK	I
KABUL VE ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. OA ÜRETİMİNDE ETKİLİ OLAN FAKTÖRLER.....	5
2.2. OKRATOKSİNLERİN KİMYASAL YAPISI.....	7
2.3. OKRATOKSİNLERİN TOKSİSİTELERİ	8
2.4. OA’NIN ABSORBSİYONU	9
2.5. OA’NIN VÜCUTTA DAĞILIMI.....	9
2.6. OA’NIN ENZİM VE DİĞER BİYOKİMYASAL PARAMETRELERE ETKİSİ.....	10
2.7. OA’NIN VÜCUTTAKİ ETKİLERİ	11
2.7.1. OA’nın Akut Dönemdeki Etkileri	11
2.7.2. OA’nın Uzun Dönemdeki Etkileri	13
2.8. OA’NIN NEFROTOKSİK ETKİLERİ.....	14
2.9. OKRATOKSİNLERİN İMMUN SİSTEM ÜZERİNE ETKİLERİ	15
2.10. OA’NIN KANHÜCRELERİNE OLAN ETKİSİ	16
2.11. OA’NIN KARACİĞERE ETKİSİ.....	17
2.12. OA’NIN TERATOJENİK VE REPRODÜKTİF ETKİLERİ.....	17
2.13. OA’NIN GENOTOKSİK ETKİLERİ.....	18
2.14. OA’NIN KARBONHİDRAT METABOLİZMASINA ETKİSİ	18
2.15. OA’NIN İNSANLARDAKİ ETKİLERİ.....	19
2.16. OA’NIN METABOLİK BİYOTRANSFORMASYONU.....	21
2.17. OA’NIN VÜCUTTAN ATILIMI	22

	<u>Sayfa No</u>
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. GEREÇ.....	24
3.1.1. Örnekler	24
3.1.2. Kullanılan Malzemeler.....	24
3.1.3. Okratoksin A Test Kitleri.....	25
3.1.4. Elde Edilen Sonuçların Okutulması	26
3.2. METOD	26
3.2.1. Numunenin Hazırlanması	26
3.2.2. Yıkama Çözeltisi	26
3.2.3. Enzim Konjugatının Hazırlanması	26
3.2.4. ELISA Testinin Yapılışı.....	27
3.2.5. İstatistiksel Değerlendirme	28
4. BULGULAR	29
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	32
6. KAYNAKLAR.....	36
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO, ŞEKİL VE GRAFİK LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Tablo 2.1. Okratoksin üreten cinslere ait türler.....	4
Tablo 2.2. 30 günlük periyotta OA, OB ve sitrinin üretimine fungal türlerin ve substratın etkisi	6
Tablo 2.3. OA'nın farklı hayvan türlerinde uygulama yerine göre LD ₅₀ düzeyleri	12
Tablo 2.4. 1977 ile 1990 yılları arasında Avrupa'nın, OA yönünden endemik ve endemik olmayan bölgelerinde yaşayan insanlardan alınan numunelerdeki OA miktarları	20
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan test kitinin içerdiği malzemeler ve miktarları	25
Tablo 3.2. Numune sayısına göre enzim-konjugat miktarları.....	26
Tablo 4.1. Çalışmada un, pirinç ve bulgur numunelerine göre ayrı ayrı kaydedilen OA miktarları	30
Tablo 4.2. Un, pirinç ve bulgur numunelerindeki OA düzeylerinin Duncan testi ile karşılaştırılması	31
Şekil 2.1. Okratoksin A ve metabolitlerinin kimyasal yapısı	7
Grafik 3.1. ELISA okuyucusu ile okutulan sonuçların RIDAWIN programındaki standart eğrisi	27

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikotoksinler, gıda ve yemlerde bulunduğunda sağlığı tehdit eden önemli toksikolojik sorunlardan biridir. Birçok mantar türü sıcaklık, nem ve uygun besin ortamında kolaylıkla toksin sentezleyebilmektedir.

Günümüzde yaklaşık 100'den fazla mikotoksin olduğu bilinmesine karşılık bunların doğadaki yayılımı, gıda ve yemlerdeki miktarı ile insanlardaki toksisitesi hakkında oldukça sınırlı düzeyde bilgi mevcuttur. Mikotoksinler hakkında yapılacak çalışmalar, toksinlerin insan ve hayvanlarda meydana getirdikleri etkileri saptamak ve gerekli tedbirleri almak açısından oldukça büyük önem taşımaktadır. Çünkü mikotoksinler, sentezlenen toksinin özelliğine, miktarına ve maruz kalınan süreye göre, insan ve hayvanlarda farklılık gösteren akut, kronik ve subkronik hastalıklara yol açmaktadırlar.

Mikotoksinler içerisinde önemli bir yer teşkil eden okratoksinler, *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi küflerin birçok türü tarafından sentezlenebilmektedir. Bu funguslar, her yerde bulunan potansiyel kontaminantlardan olup, hem gıdalara, hem de hayvan yemlerine bulaşabilmektedir. Okratoksinlerin gıdalar içerisinde de özellikle tahıllarda bulunma oranı, kahve, soya fasulyesi ve kakao gibi tohumlu bitkilere göre çok daha yüksektir.

Yapılan araştırmalar, okratoksinlerin özellikle birçok Asya ve Avrupa lkesi ile Kuzey Amerika ve hatta Avustralya'da sorun olduğunu göstermektedir. Okratoksinlerin ülkelere göre dağılımını incelendiğinde ise kontaminasyon oranının % 2 ile 30 arasında değiştiği görülmektedir. Bu oranın yüksekliği, okratoksin üreten türlerden bazılarının 5 C 'ın altında bile toksin sentez edebilmesine bağlanmaktadır.

Yapılan saha çalışmalarında, okratoksinlerin insan ve çiftlik hayvanlarında nefrotoksik özellikleri olduğu ve toksinin hedef organının böbrekler olduğu belirlenmiştir. İnsanlarda Balkan Endemik Nefropatisi (BEN)'nin yaygın olduğu bölgelerde yapılan çalışmalarda nüfusun % 6-18'inin okratoksin A (OA) yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir.

Avrupa'da, OA ile kontamine gıdaların tüketildiği endemik bölgelerde BEN vakası da oldukça yüksektir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, OA'nın Avrupa'nın birçok ülkesinde insanların kan ve sütünde tespit edildiğini ortaya koymaktadır. BEN'in bu toksinle kontamine gıdaların tüketilmesi sonucu şekillendiği bildirilmektedir. BEN ile üriner sistem tümörleri arasındaki sıkı ilişki olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle OA'nın insan sağlığına olan etkileri incelenmeli ve değerlendirilmelidir.

Ülkemizde gıdalardaki okratoksin seviyelerinin belirlenmesiyle ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu alışma bu toksin hakkındaki bilgileri arttıracaağı gibi, Kayseri bölgesinde yapılacak diğer okratoksin çalışmalarına da ışık tutarak, alınacak tedbirler konusunda faydalı bilgiler sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Okratoksinler, doğada yaygın olarak bulunan ve insan sağlığını tehdit eden mikotoksinler içerisinde ilk sıralarda yer almaktadır. Okratoksinler ilk kez 1965 yılında *Aspergillus ochraceus* kültüründen izole edilmiş olup, bu sebeple aynı adı almış, ancak sonraları *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerine ait türler tarafından da sentezlendiği tespit edilmiştir (1).

Okratoksin üreten türleri tespit etmek amacıyla yapılan çalışmalarda (1, 2) okratoksinlerin *Penicillium* ve *Aspergillus* cinslerine ait türlerden sentezlendiği belirlenmiştir. Okratoksin ürettiği tespit edilen cins ve türlerin isimleri Tablo 2.1’de gruplar halinde sunulmuştur.

Tablo 2.1. Okratoksin üreten cinslere ait türler (2).

Penicillium cinsine ait türler	Aspergillus cinsine ait türler
P. glabrum	A. petrakii
P. purpurescens	A. sulphureus
P. commune	A. sclerotiorum
P. viridicatum	A. alliaceus
P. palitans	A. melleus
P. cyclopium	A. ochraceus
P. purpurogenum	A. ostianus
P. variabile	
P. verrucosum	

Aspergillus cinsine ait türlerden okratoksin sentezleyenleri arasında başlıcaları; *A. ochraceus* (*A. alutaceus*), *A. ostianus*, *A. melleus* (*A. quercinus*) ve *A. sulphureus* (*A. fresenii*)'dur. *A. ochraceus*, tahıllarda okratoksin üreten türler içerisinde en önemlisidir (3).

Penicillium cinsi içerisinde de *P. verrucosum* oldukça çok OA üreten tür olarak bilinmektedir. *P. verrucosum*'un OA üreten iki farklı alt türü vardır. *P. verrucosum* kemotip I OA, verrucolon ve sitrinin üretirken, *P. verrucosum* kemotip II ise sadece OA ve verrucolon üretir. Gıda kaynaklı *P. verrucosum* (kemotip II), sadece Danimarka, İsveç, Norveç, İngiltere, Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunmaktadır (4).

Okratoksin üreten *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri üzerinde yapılan diğer çalışmalarda ise (5, 6), *A. niger*, *A. auricomus*, *A. albertensis*, *A. carbonarius* ve *A. glaucus*'un da okratoksin üretebildiği belirlenmiştir.

Mikotoksin üreten türlerden biri olan *A. niger*, biyoteknolojik olarak okratoksin üretiminde kullanılmaktadır (7). Okratoksin biyosentezinin incelenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada (6), OA biyosentezinin *A. ochraceus*'taki poliketid sentetaz (pks) geni tarafından yönetildiği ve bu genin baskılanmasıyla mikotoksin üretiminin de sona erdirildiği saptanmıştır.

Günümüzde yapılan biyoteknolojik çalışmalarla, deneysel ve tanı amaçlı okratoksin üretiminin sadece yukarıda belirtilen funguslar tarafından değil, diğer birçok hücre kültürü tarafından da üretilbileceği bildirilmektedir (8).

2.1. OKRATOKSİN A ÜRETİMİNDE ETKİLİ OLAN FAKTÖRLER

Gıda ve yemlerde OA üretiminde etkili olan birçok faktör bulunmaktadır. Bunlardan başlıcaları;

- Su aktivitesi (a_w),
- Sıcaklık,
- Substratın cinsi,
- Ortamda rekabetçi mikrofloranın varlığı,
- Fungusun cinsi
- Tahılın bütünlüğü olarak sıralanabilmektedir.

Okratoksin üreten türlerin su aktivitesi üzerinde yapılan bir çalışmada (9), *A. ochraceus* ve *P. verrucosum* için minimum a_w değerlerinin sırasıyla 0.83 ve 0.90 olduğu, 24 °C'da ise bu değerlerin sırasıyla 0.95 ve 0.99 olduğu belirlenmiştir. Çalışmada, *A. ochraceus*'un gelişimi için gerekli optimum su aktivitesinin 12 °C ile 37 °C arasındaki sıcaklık derecelerinde, *P. verrucosum*'un gelişimi için gerekli optimum su aktivitesinin ise 4 °C ile 31 °C arasındaki sıcaklık derecelerinde gerçekleştiği belirlenmiştir.

Penicillium ve *Aspergillus* cinslerine ait türlerin okratoksin üretimi substrattan önemli ölçüde etkilenmektedir. *In vitro* ortamda yapılan deneylerde (10), *Penicillium* ve *Aspergillus* cinslerine ait türlerin OA, okratoksin B (OB) ve sitrinin üretimi için farklı besinlere ihtiyaç duydukları belirlenmiştir. Çalışmada, 30 gün süreyle iki gruba ayrılan tahıllardan ilk grupta; buğday ve mısır gibi tahıllar, ikinci grupta ise yağlı tohumlara sahip soya fasulyesi, yer fıstığı ve kolza gibi bitkiler yer almaktadır. Bu çalışmaya ait bulgular, Tablo 2.2'de gruplar halinde özetlenerek sunulmuştur.

Tablo 2.2. 30 günlük periyotta fungal türlerin ve substratın OA, OB ve sitrinin üretimine etkisi (10).

Okratoksin üreten Cins ve Ürediği ortam		OA (µg/g)	OB (µg/g)	Sitrinin (µg/g)	Fungal kitle (mg/g)
<i>Aspergillus alutaceus</i>					
Tahıllar	Mısır	74	0	0	2.5
	Buğday	72	0	0	8.3
Yağlı Tohumlar	Soya fasulyesi	243	389	0	7.6
	Yer fıstığı	342	132	0	25.6
<i>Penicillium verrucosum</i>					
Tahıllar	Mısır	21	0	126	3.6
	Buğday	98	0	102	10.1
Yağlı Tohumlar	Soya fasulyesi	7	0	0	6.4
	Yer fıstığı	18	0	0	6.4

Tablo 2.2' de görüldüğü gibi, *A. alutaceus*, yerfıstığı ve soya fasulyesinde OA ve OB üretiminde daha etkiliyken, *P. verrucosum* ise buğday ve mısırdaki OA ve sitrinin üretiminde daha etkilidir. OB ise sadece *A. alutaceus* tarafından yer fıstığı ve soya fasulyesi gibi yağlı tohumlarda üretilmekte, buğday ve mısır gibi tahıllarda ise daha az üretilmektedir.

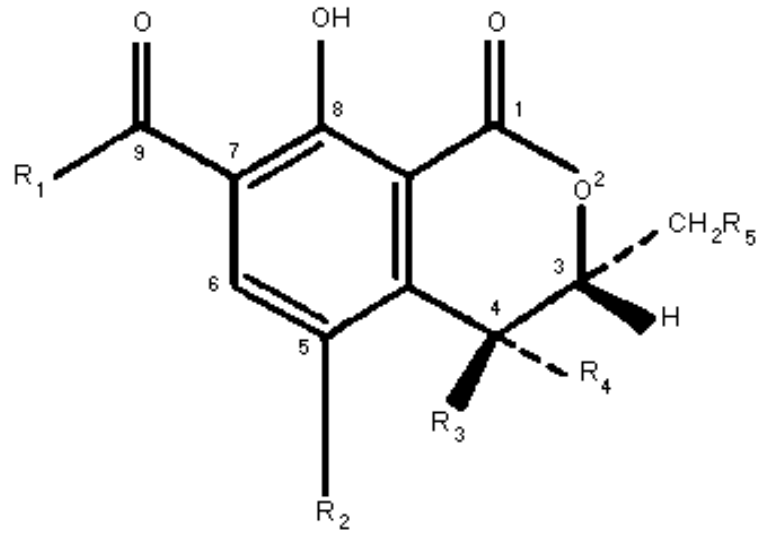
OA üretimi, ortamda OA üreten funguslarla rekabet eden mikroflora tarafından önemli ölçüde etkilenmektedir. Chelack ve ark. (11), *A. alutaceus* tarafından OA üretiminin, sterilize edilmiş arpaların bulunduğu ortamda, sterilize edilmemiş arpaların bulunduğu ortama göre çok daha fazla olduğu belirlemiştir.

Okratoksin üretiminde etkili olan faktörler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde coğrafi bölgelere göre, okratoksin üreten her türün her bölgede kolaylıkla toksin üretemeyeceği belirlenmiştir. İskandinav ülkeleri ve Kanada'da tahıllarda en sık görülen okratoksin üreten tür *P. verrucosum* olurken ılıman iklime sahip Yugoslavya ve Avustralya gibi ülkelerde ise en etkili türün *A. alutaceus* olduğu saptanmıştır (7).

2.2. OKRATOKSİNLERİN KİMYASAL YAPISI

Okratoksinler kimyasal yapıları, Şekil 2.1’de görüldüğü gibi L-fenilalanin’ e bağlı izokumarin derivatıyla yakın ilişkili olan ve biyosentetik orijinli poliketid olarak isimlendirilen pentaketidlerden oluşmaktadır (12).

OA molekülü ise, 7 – karboksil – 5 kloro – 8 – hidroksi – 3 , 4 – dihidro – 3 R – metilizokumarin (Oα)’in 7 - karboksil grubuna L – β – fenilalaninin peptid bağıyla bağlanmasıyla oluşmuştur (12).



Şekil 2. 1. Okratoksin A ve metabolitlerinin kimyasal yapısı.

R1	R2	R3	R4	R5	
Fenilalanin	Cl	H	H	H	Okratoksin A
Fenilalanin	H	H	H	H	Okratoksin B
Fenilalanin etil ester	Cl	H	H	H	Okratoksin C
Fenilalanin metil ester	Cl	H	H	H	Okratoksin A metil ester
Fenilalanin metil ester	H	H	H	H	Okratoksin B metil ester
Fenilalanin etil ester	H	H	H	H	Okratoksin A etil ester
OH	Cl	H	H	H	Okratoksin alpha
OH	H	H	H	H	Okratoksin beta
Fenilalanin	Cl	H	OH	H	4R-Hidroksi-okratoksin A
Fenilalanin	Cl	OH	H	H	4S-Hidroksi-okratoksin A
Fenilalanin	Cl	H	H	OH	10-Hidroksi-okratoksin A

Okratoksinlerin birçok kimyasal formu bulunmaktadır. OA ve OB'nin metil ve etil esterleri de bulunmaktadır. OA'nın hidroksil ilave edilmiş formları da tespit edilmiş olup, bu yapı (4R)-OH-OA ve 10-OH-OA şeklindedir (14).

Fizyolojik ortamlarda OA'nın iyonize olan ve iyonize olmayan iki ayrı grubu bulunmaktadır. Bunlar fenilalaninden gelen karboksil grubu ile 8-hidroksil gruplarıdır. 8-hidroksil grubunun asitlik sabitesi (pKa), okratoksinin yapısına göre değişmektedir. Buna göre OA'nın pKa değeri 7.05, iken, bu değer OB'de 8.0, OC'de 7.10 ve Oα'da ise 11.0'dır (14).

Deneysel koşullarda fungal kültürlerden 4-hidroksi-okratoksin A, metil ve etil esterleri ve OB'nin izokumarin bölümü elde edilmiştir. OA'nın asidik hidroliziyle fenilalanin ve izokumarin kısımları elde edilebilirken, OA içeren yemlerle beslenen kemirgenlerin barsak, gaita, idrar ve karaciğerinden Oα elde edilmektedir (15).

OA, bitkisel yapılarda OB'ye göre çok daha sıklıkla bulunabilen bir toksindir. Etanol içerisinde 4 °C'da ışısız ortamda yaklaşık bir yıl bozulmadan kaldığı, ancak florasan ışığında bir kaç gün içerisinde yapısının bozulduğu tespit edilmiştir (7).

2.3. OKRATOKSİNLERİN TOKSİSİTELERİ

Okratoksinlerin toksisiteleri, yapılarına katılan maddelerin özelliklerine göre değişmektedir. Okratoksinlerin yapısına katılan tirozin, valin, serin ve alanin oldukça toksik; metionin, triptofan ve glutamik asit analogları orta düzeyde toksik ve glutamat ile prolin analogları ise düşük toksik etkiye sahip olduğu bildirilmektedir. Okratoksinlerin serin, hidroksiprolin ve lizin analogları doğada yaygın olarak bulunurken, tirozin analogu ise yapay olarak fenilalanin hidroksilaz enzimiyle üretilmektedir (7).

Okratoksin toksikasyonlarında, okratoksinlerdeki hidroksil ve karboksil gruplarının açığa çıktığı reaksiyonlar şekillenmektedir. Simon ve ark. (16), okratoksin toksikasyonlarında 8-hidroksil grubunun molekülden ayrıldığını ve toksik etkinin bu şekilde ortaya çıktığını ileri sürmüşlerdir.

Yapılan literatür taramalarında, OA'nın parçalarından biri olan karboksil grubunun toksikasyondaki işlevi ya da toksik olup olmadığı konusunda herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır.

2.4. OKRATOKSİN A'NIN ABSORBSİYONU

OA'nın vücuda girişinden sonraki absorbsiyon yerinin tespit edilmesi, toksinin vücuttaki seyri ve yapacağı ilk etkilerin belirlenebilmesi için oldukça önemlidir. OA'nın vücuttaki absorbsiyon yerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada (17), ratlara tek dozda verilen 10 mg/ kg OA, 4 saat sonra mide duvarından izole edilmiş, ince ve kalın barsaklarda değişmeden ve az miktarda kaldığı belirlenerek toksinin absorbsiyon yerinin mide olduğu ileri sürülmüştür.

OA'nın absorbsiyon yerinin belirlenmesi üzerine yapılan bir başka çalışmada da (18), OA'nın absorbsiyon yerinin mide olduğu ve hatta midedeki asidik ortamın toksinin emilimini kolaylaştırdığı, toksinin maksimum absorbsiyon yerinin jejunum olduğu ve portal ven yoluyla lenfatik sisteme taşındığı belirlenmiştir.

OA'ya spesifik antikorların kullanıldığı peroksidaz-antiperoksidaz tespitine dayanan metodun kullanıldığı bir çalışmada (19) ise, 25 mg/kg dozda OA verilen farelerde 48 saat sonra yapılan incelemede, duodenumun lamina propriasındaki epitel hücreleriyle makrofajların OA'yı oldukça iyi absorbe ettiği saptanmıştır. Az miktardaki OA'nın jejunumdaki epitel hücreleri ve lamina propria tarafından ve daha az bir miktarın ise özofagus ve midedeki epitel hücreleri tarafından absorbe edildiği, ileumda ise hiç toksinin bulunmadığı belirlenmiştir. Bu bulgular, OA'nın temel absorbsiyon yerinin duodenum ve jejunum olduğunu ortaya koymaktadır.

2.5. OKRATOKSİN A'NIN VÜCUTTA DAĞILIMI

OA'nın vücuda alınmasından sonra ulaştığı organların belirlenmesi, toksinin sebep olduğu değişikliklerin belirlenmesi açısından önemlidir. Toksinin vücuttaki dağılımının belirlenmesi, aynı zamanda hedef doku ve organların yeri hakkında da bilgi vermesi açısından yararlıdır. Rosseau ve ark. (20), tek gözlü mideye sahip hayvanlar içerisinde gruplandırılan domuzlarda, OA içeren rasyon uygulamasından sonra hayvanların çeşitli dokularında yaptıkları incelemede, en fazla toksinin sırasıyla böbrek, karaciğer, kaslar ve yağ dokuda bulunduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar, domuzlarda OA'nın midede herhangi bir değişime uğramadığını ve buradan direkt olarak barsaklara geçtiğini kaydetmişlerdir.

Galtier (17) ratlara 10 mg/kg dozda oral yolla OA verdikten 96 saat sonra yaptığı incelemede, verilen dozun % 0.3'ünü böbreklerden, % 0.9' unu karaciğerden ve % 0.6' sını da kas dokusundan izole etmiştir. Chang ve Chu (21) ise, ratlara fenilalanin içerisinde ¹⁴C atomuyla işaretlenmiş OA'yı periton içi yolla verdikten 30 dakika sonra total dozun % 4-5'inin karaciğerde toplandığını saptamışlardır.

OA'nın vücuttaki kalıntılarını belirlemek amacıyla yapılan araştırmalar daha sonraki dönemde oldukça yoğunlaşmış ve bu toksinin spesifik olarak böbreklerde toplandığı ve çeşitli patolojilere sebep olduğu tespit edilmiştir. Lee ve ark. (19), vücuda alınan OA'nın en fazla böbreklerdeki proksimal tubullerde, daha az bir miktarın ise distal tubullerde, inen Henle kulpunda, glomerulus ve Bowman kapsülünde toplandığını görmüşlerdir. Çalışmada, az bir miktar toksin ise hepatositler ve safra kanallarının lumen epitellerinde bulunmuş, ancak bilier epitellerde tespit edilememiştir. Groves ve ark. (22) bu bulgulara paralel sonuçlar elde etmiş ve hatta OA'nın proksimal tubullere girişinde organik anyon transport sisteminin kullanıldığını belirlemişlerdir.

2.6. OKRATAOKSİN A'NIN ENZİM VE DİĞER BİYOKİMYASAL PARAMETRELERE ETKİSİ

OA'nın, doku ve organların yanında hücre düzeyinde de enzim ve diğer biyokimyasal parametreler üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır. OA, prokaryotlarda, memeli hücre kültürlerinde ve *in vivo* hayvan deneylerinde primer olarak DNA ve RNA sentezini, sekonder olarak da protein sentezini inhibe etmektedir (23, 24).

OA'nın protein sentezini inhibisyonunun mekanizması üzerinde yapılan incelemelerde (25), protein sentezinin OA'nın direkt etkisiyle transkripsiyon seviyesinden hemen sonra inhibe edildiği ve bunun da fenilalanin-tRNA sentetazın rekabetçi inhibisyonu şeklinde gerçekleştiği saptanmıştır. Mayalar üzerinde yapılan denemelerde ise, protein sentezinin ilk aşamasında fenilalanine bağlı pirofosfat değişiminin ve ikinci aşamasında ise tRNA'ya transfer işleminin inhibe edildiği belirlenmiştir

Memelilerde OA'nın protein sentezine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (26) farelere periton içi yolla 1 mg/kg dozda OA enjeksiyonundan 5 saat sonra karaciğer, böbrek ve dalaktaki etkileri incelenmiştir. Yapılan değerlendirmede OA'nın, kontrol grubuna göre protein sentezini karaciğerde % 26, böbrekte % 68 ve dalakta ise % 75 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Protein sentezi reaksiyonlarının, fenilalanin türevi olan OA tarafından rekabetçi olarak inhibe edilmesi, ortamdaki fenilalanin konsantrasyonunun arttırılmasıyla tersine dönüştürülebilmektedir. Bu amaçla farelere letal doz olarak intraperitoneal yolla verilen 0.8 mg OA'dan hemen sonra yapılan 1 mg fenilalanin enjeksiyonunun reaksiyonu tersine çevirerek letal etkiyi ortadan kaldırdığı bildirilmiştir (27).

OA, vücuttaki diğer enzimler üzerinde de fenilalanin gibi substrat olarak kullanılabilmesine karşın izole edilen diğer enzim sistemlerinde OA'nın direkt etkisi tespit edilememiştir (28). Bununla birlikte iki gün 2 mg/kg OA içeren yemle beslenen ratların böbreklerinden yapılan kesitlerde, glukoneogenetik yolda anahtar rol oynayan renal fosfoenolpiruvat karboksikinas enzim seviyesinin % 50 oranında düştüğü tespit edilmiştir (29).

2.7. OKRATOKSİN A'NIN VÜCUTTAKİ ETKİLERİ

OA ile ilgili toksisite çalışmaları incelendiğinde, OA'ya maruz kalma süresine ve OA miktarına bağlı olarak görülen etkilerin birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir. Buna göre toksinin akut dönemdeki etkileriyle, kronik dönemde yaptığı etkiler farklılıklar gösterirken, toksine maruz kalınan dozun da ayrıca önem taşıdığı görülmüştür (30).

2.7.1. Okratoksin A'nın Akut Dönemdeki Etkileri

Toksine kısa süreli olarak, ancak yüksek dozda maruz kalma sonucu etkilenen ilk organ böbrektir. OA'nın kısa süreli olarak yüksek dozda alınması ile böbrek fonksiyonları ve morfolojisi büyük ölçüde etkilenmekte, böbreklerde ağırlık artışı, idrar hacmi ve BUN (Blood Ure Nitrojen, kan üre azotu) seviyesinde artış olduğu bildirilmektedir. Dahlman ve ark. (31) ise, bu bulgulara ilave olarak glukozuri ve proteinurinin de görüldüğünü bildirmişlerdir.

Hayvan türlerine ve toksinin alınma şekline göre OA'nın toksisite düzeyleri farklılıklar göstermektedir. Çeşitli hayvan türlerinde toksinin veriliş şekillerine göre LD₅₀ düzeyleri belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 2.3'de özet halinde sunulmuştur (7).

Tablo 2. 3. OA'nın farklı hayvan türlerinde uygulama yerine göre LD₅₀ düzeyleri (7).

Hayvan Türü	Uygulama yerine göre LD ₅₀ düzeyleri (mg/kg vücut ağırlığı)		
	Oral	Periton içi	Damar içi
Fare	46-58.3	22-40.1	25.7-33.8
Rat	20-30.3	12.6	12.7
Rat (neonatal)	3.9	-	-
Köpek	0.2	-	-
Domuz	1	-	-
Piliç	3.3	-	-

Tablo 2.3 incelendiğinde, hayvan türlerine ve veriliş şekline göre OA'nın etkilerinin birbirinden oldukça farklı olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlar, akut toksisite yönünden OA'ya en duyarlı hayvanların köpek ve domuzlar, en az duyarlı hayvanların ise rat ve fareler olduğunu ortaya koymaktadır.

Albassam ve ark. (32), histopatolojik ve elektron mikroskopik çalışmalarda, 17 ve 22 mg/kg dozda 0.1 M sodyum bikarbonatın içerisinde çözdürülen OA'nın oral yolla gavaj şeklinde verilmesinden 48 saat sonra yapılan değerlendirmede, ilk değişikliklerin bir çok organda multifokal hemorajiler olduğu, dalakta fibrine bağlı trombus şekillendiği, beyinde pleksüs chorioideus, karaciğer, böbrek ve kalpte intravasküler koagülasyonların meydana geldiği tespit etmişlerdir. Organlarda şekillenen koagülasyonun, OA'nın ekstrinsik ve intrinsik faktörleri aktive etmesi sonucu geliştiği gözlenmiştir. Olgularda, aynı zamanda hepatik ve lenfoid nekroz, jejunumun ciddi şekilde villöz atrofi sonucu etkilendiği enteritis de kaydedilen bulgular arasındadır.

OA, tek mideli memelilerin hepsi için nefrotoksik etkilidir (33, 34). Munro ve ark. (35) yaptıkları çalışmada, süttten yeni kesilen ratlara 14 gün boyunca farklı dozlarda OA vermişler ve gelişme geriliğinden yem tüketiminin azalmasına kadar değişen farklı sonuçlar elde etmişlerdir. Çalışmada kullanılan ratlarda ayrıca serum BUN düzeyinin ve böbreklerde ağırlığın arttığı tespit edilmiştir. Hayvanlarda böbreklerde tubuler sistemin tamamında dejeneratif değişiklikler görülürken, OA'nın bütün dozlarında idrar hacminde azalma ve tubulus proksimalislerdeki hücrelerde karyomegali saptanmıştır.

Bernt ve Hayes (36), OA'nın akut dönemdeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında ise, rasyonlarına OA ilave edilen ratlarda vücut ağırlığında azalma, idrar hacminde artış, proteinuri ve glukozuri gözlemişlerdir. Çalışmada, böbreklerde yapılan incelemede proteinurinin tubulus hücrelerindeki dejenerasyondan kaynaklandığını ve bu dejenerasyonda erkek ratların dişilere göre daha çok etkilenmesi sebebiyle cinsiyet farkının da OA toksikasyonunda önemli bir etken olduğunu ortaya koymuşlardır.

Stormer ve ark. (37), gruplara ayırarak, oral gavaj yoluyla 0, 1, 4 ve 16 mg/kg dozda OA verdikleri ratlara 16 günlük dönem sonunda yaptıkları incelemede, en yüksek doz olan 16 mg/kg dozda OA verilen gruptaki ratlarda diare ve geniz akıntısı izlemişler ve bu gruptaki ratların çalışma süresini tamamlayamadan öldüklerini bildirmişlerdir. OA'nın 1 mg/kg'dan daha fazla dozda uygulandığı ikinci gruptaki hayvanlarda, böbrek, kalp ve beyinde ağırlık artışı, timusta atrofi, midenin başlangıç kısımlarında nekroz ve hiperplazi, adrenal bezlerde hemoraji saptanmıştır. Ayrıca OA'nın bütün dozlarında kemik iliğinde hipoplazi ile böbrek tubuluslarında dejeneratif ve rejeneratif değişikliklerle karakterize nefropati gözlenmiştir.

OA'nın 3-6 yaş arasındaki köpeklere 0.01 ve 0.2 mg/kg canlı ağırlığa göre 14 gün süreyle uygulanmasında ise her iki dozda da böbrek fonksiyonlarında bozukluk görülmezken, böbreklerde tubuler nekroz ve proksimal tubullerde ultrastruktural değişiklikler, timusun lenfoid dokusunda ve tonsillerde nekroz geliştiği bildirilmiştir (38).

2.7.2. Okratoksin A'nın Uzun Dönemdeki Etkileri

OA'nın etkilerinin araştırıldığı uzun süreli çalışmalarda, hedef doku ve organlar incelenmiştir. Yapılan bir çalışmada (39), inbred olarak yetiştirilmiş ırk içerisindeki hatlardan biri olan ddY hattındaki farelere rasyona ilave edilen 40 mg/kg OA, 44 hafta boyunca hayvanlara yedirilmiş ve bu uygulamadan 5 hafta sonra yapılan incelemede, hayvanlarda karaciğer hücre tümörleri, böbreklerde kistik adenomalar ve solid hücre tümörleri gözlenmiştir. Elde edilen bulgular, bu ırk ve hatta mensup farelerde karaciğer ve böbrek tümörlerine daha önce hiç rastlanmamış olması sebebiyle oldukça dikkat çekicidir.

2.8. OKRATOKSİN A'NIN NEFROTOKSİK ETKİLERİ

OA, birçok doku ve organda olumsuz etkileri olan bir mikotoksin olmakla beraber asıl hedef böbreklerdir. OA'nın ratlara 6-12 ay süreyle, vücut ağırlığına göre 210 µg/kg'lık dozda verilmesi, BUN seviyesini arttırmış, dişi ve erkek ratlarda idrarda glukoz ve kreatinin atılımına sebep olmamış, ancak idrar konsantrasyonunda orta dereceli azalma görülmüştür. Bu etki, erkek ratlarda canlı ağırlığa göre günlük 70 µg/kg ve dişilerde 21 µg/kg dozlarda ortaya çıkmaktadır (40).

OA'nın böbreklerdeki nefronlara olan spesifik toksik etkisi, Dahlman ve ark. (31) göre, OA'nın proksimal tubul hücreleri ve bazolateral membranında organik anyon transport mekanizmasının bozulmasını indüklemesine bağlanmıştır. Ayrıca, derialtı yolla verilen OA'nın böbreklerde öncelikle muramidaz enzim seviyesini düşürdüğü, ardından da laktat dehidrojenaz, alkalın fosfataz, glutamat dehidrojenaz ve asit fosfataz seviyelerini düşürdüğü belirlenmiştir.

Tubulus proksimalisin orta S₂ ve son uçtaki S₃ segmentleri OA'nın toksik etkisinden en fazla etkilenen kısımlardır. Yapılan bir araştırmada (41), buradaki hücrelerin 0.05 mM yoğunluğundaki OA'dan dahi oldukça etkilendiği bildirilmiştir. Çalışmada hücresel ve mitokondrial ATP dozunun da önemli derecede düştüğü ve bu şekilde de organ fonksiyonlarında azalmanın şekillendiği kaydedilmiştir.

Endou ve ark. (42), böbrek tubuluslarında 0.1 mM yoğunlukta OA'nın alanin peptidaz, lösin amino peptidaz ve alkalın fosfataz düzeylerini sırasıyla % 60, % 50 ve % 35 oranlarında azalttığını saptamışlardır. Meisner ve Polsinelli (43) ise, OA'nın böbrek tubulusları üzerindeki minimum etkisinin 0.1 mM OA'da başladığını bildirmişlerdir.

Meisner ve Selanik (44), canlı ağırlığa göre günlük 2 mg/kg dozda alanin peptidaz, lösin amino peptidaz ve alkalın fosfataz enzim seviyelerinin etkilenirken, piruvat karboksilaz, malat dehidrojenaz, heksokinaz ve gama-glutamil transpeptidaz seviyesinde değişme olmadığını tespit etmişlerdir.

Kuan ve ark. (45), ratlarda canlı ağırlığa göre 2 mg/kg OA'nın 8-12 hafta süreyle kullanımında, laktat dehidrojenaz, alkalın fosfataz, lösin aminopeptidaz ve gama-glutamil transferaz düzeylerinin önemli ölçüde düştüğünü saptamışlardır. Bu son üç enzimin yükselmesi, tubulus proksimalisin lizozomal bir enzim olan N-asetil β-D-glukosidaz enziminin artışı, böbreklerde proksimal tubulus hücrelerinde dejenerasyon

ve rejenerasyon faaliyetlerinin bozulduğuna işaret etmektedir. Çalışmada paraaminohippurat kleransının 2 hafta sonra % 56 ve 12 hafta sonra da % 8'e düştüğü ve bunun da böbreklerdeki hasara ve ardından oluşan rejenerasyona bağlı olduğu tespit edilmiştir.

Domuz böbreklerindeki enzimlerin aktivitesi, OA'ya çok duyarlıdır. Rasyonda 0.2-1 mg/kg OA bulunması (yaklaşık 0.008 - 0.041 mg/kg/gün/canlı ağırlık) glikoneogenik enzim (PEPCK) ve gama-glutamil transpeptidaz aktivitesinin böbrek fonksiyonlarına bağlı olarak düşmesine sebep olduğu kadar, tubullerde inulin ve artan glukoz atılımına bağlı olarak paraaminohippurat kleransının maksimum azalmasına da sebep olmaktadır (29).

2.9. OKRATOKSİNLERİN İMMUN SİSTEM ÜZERİNE ETKİLERİ

Özellikle böbrek ve karaciğer üzerinde neoplastik etkileri olan okratoksinlerin immün sisteme olan etkileri de oldukça fazladır. OA, birçok hayvan türü üzerinde immün sistemin yapısal içeriğine direkt olarak etki etmektedir. Chang ve Hamilton (46), rasyonlarına 2-4 mg/kg OA ilave edilmiş piliçlere 20 gün süreyle OA verilmesinin lenfoid hücrelerin sayısında azalmaya sebep olduğunu tespit etmişlerdir.

Farelere periton içi yolla 20 mg/kg enjekte edilen OA, timusta % 33 oranında hacim azalmasına sebep olmuş, aynı zamanda kemik iliğinde baskılanma, hematopoietik kök hücrelerinde azalma, eritropoiesisin düşmesi ve makrofajların fagositoz kapasitesinde artış tespit edilmiştir. OA'nın kemik iliği ve lenfatik hücrelere etkisinin, OA'nın protein sentezini inhibisyonunu indüklemesinden kaynaklandığı bildirilmiştir (47).

Piliçlerde 20 gün boyunca rasyona ilave edilen 2-4 mg OA'nın serum ve lenfoid dokularda IgG, IgA ve IgM'yi baskıladığı, rasyona 5-6 hafta boyunca 2 mg/ kg OA kullanımında da komplement aktivitesini etkilediği tespit edilmiştir (46).

Luster ve ark. (49), farelerde OA'nın immün sistem üzerine olan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, tümöral oluşumların OA varlığında kalıcı hale geçtiğini saptamışlardır. Araştırmacılar, T hücrelerinin veya makrofajların aracılık ettiği antitümör aktivitesinin etkilenmediğini, ancak doğal öldürücü (Natural Killer, NK) hücrelerin aktivitelerinin OA ile spesifik olarak inhibe edilmesi sonucu metastatik aktiviteli tümöral hücrelerin sayısında artış olduğunu belirlemişlerdir.

Yapılan diğler bazı çalışmalarda (46, 49) OA'nın gıdalarla alımının bir çok hayvan türünde lenfoid hücrelerde özellikle timus, bursa fabricius ve dalak lenfoid hücrelerde yıkımlanmalara sebep olduğu tespit edilmiştir. Timus OA tarafından yıkımlanmamakla birlikte, hipersensitivitenin geciktirilmesine sebep olduğu için immun sistemdeki hücresel bağışıklığın baskılanmasına yol açmaktadır (50-52).

Piliçlerin rasyonlarına ilave edilen OA, fagositozun, heterofil ve monositlerin hareketlerinin azalmasına sebep olmaktadır (46). Campbel ve ark. (48), piliçlerde uygulanan OA'nın, sirkülasyondaki heterofil hücre sayısında azalmaya neden olduğunu belirlemişlerdir. OA, aynı zamanda kemik iliğindeki ve dalaktaki hematopoietik kök hücre sayısının azalmasına ve makrofaj aktivitesinin de artmasına sebep olmaktadır (45).

Lea ve ark. (53), OA'nın B ve T lenfosit hücreleri üzerine inhibe edici etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Piliçlerde günlük canlı ağırlığa 2-4 mg/kg şeklinde ilave edilen OA'nın 20 gün süreyle kullanılmasının, lenfoid hücre popülasyonunda azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir (54). Bu bulgu, OA'nın immun sistemi baskılayıcı özellikte olduğunu da göstermektedir.

2.10. OKRATOKSİN A'NIN KAN HÜCRELERİNE OLAN ETKİSİ

OA, belirli dozlarda alındığında birçok hayvan türünde anemiye sebep olmaktadır. OA'nın sebep olduğu anemi, mikotoksikozislerde görülen hemorajik anemik sendroma bağılı olmayıp, daha farklı bir özellik arz etmektedir. Agawane ve Lonkar (55), OA toksikasyonlarında görülen aneminin, kanda hemoglobin konsantrasyonunda değışme olmaksızın eritrositlerdeki sayı ve hacim ile serum demir ve transferinin çözünürlüğü oranındaki azalmadan kaynaklanan hipokromik mikrositik anemi şeklinde olduğunu tespit etmişlerdir.

Huff ve ark. (56) ise, piliçler üzerinde yaptıkları çalışmada, rasyona 8 µg/g miktarında ilave ettikleri OA'nın 3 hafta kadar verilmesiyle kanda şekillenen değışikliklerin OA'nın verilen dozda demir eksikliğıne bağılı hipokromik mikrositik anemiye sebep olmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

2.11. OKRATOKSİN A'NIN KARACİĞERE ETKİLERİ

OA, karaciğer fonksiyonları üzerinde de oldukça etkilidir. Storen ve ark. (57), ratlarda rasyona OA ilave edilmesinden sonra yapılan glukoz tolerans testinde elde edilen değerlerin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, kan glukoz seviyesinin normal değerlere ulaşmadığını belirlemişlerdir. Çalışmada, OA uygulanan grupta karaciğerdeki total karbonhidrat ve glukojen seviyeleri ile glikolitik enzimlerin aktivitesinde düşme gözlenirken glukoneojenik enzim seviyesinde ise yükselme kaydedilmiştir.

OA'nın diabetojenik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada (58) ise, OA'nın pankreatik hücrelerde insulin salınımının veya sentezinin inhibe edildiği, bu şekilde de glikolizin ve glikogenezin baskılanırken, glukoneogenezin ve glikogenolizin de uyarıldığı ileri sürülmüştür.

2.12. OKRATOKSİN A'NIN TERATOJENİK VE REPRODÜKTİF ETKİLERİ

Okratoksinler, fare, rat, hamster ve piliçler için kuvvetli düzeyde teratojen etkilidir. Ancak domuzlarda OA'nın teratojen etkisinin diğer türler kadar kuvvetli olmadığı bildirilmiştir (52, 56, 59, 60). OA'nın teratojenik etkilerinin türler arasındaki farklılığı, kan-plasenta bariyerindeki farklılıklar ile OA'nın türler arasındaki duyarlılık farkıyla açıklanmaktadır (61).

Kontamine materyalle beslenmiş gebe hayvanlarda yapılan incelemelerde, OA'nın fetusun özellikle merkezi sinir sistemi, göz ve iskelet yapısını etkilediği belirlenmiştir (33). Fare ve ratlarda gebelik döneminde günde iki kez oral yolla ve vücut ağırlığına göre 1 mg/kg gibi düşük dozda verilen OA'nın fetusta önemli ölçüde malformasyonlara sebep olduğu belirlenmiştir. Gebe domuzlarda ise OA'nın yüksek dozlarının fetusta herhangi bir patolojiye sebep olmadığı bildirilmiştir (61).

Vesela ve ark. (63), tavuk rasyonlarına ilave edilen 2.5 mg/kg dozda OA'nın yumurtaya çok az geçtiği veya hiç geçmediği için embriyoda herhangi bir malformasyona sebep olmadığını, ancak hava kesesine enjekte edilen oldukça düşük miktardaki OA'nın bile embriyolardaki etkilerinin önemli olduğunu saptamışlardır.

Farelerde intravenöz yolla yüksek dozda verilen ¹⁴C ile işaretlenmiş OA'nın gebeliğin 8. ve 9. günlerinde plasentayı kolaylıkla geçebildiği ve verildikten sonra 20 dakika içerisinde uterus duvarında, plasental ve fetal dokularda tespit edilebildiği bildirilmiştir (64).

OA uygulaması ile gebe farelerdeki fetal rezidülerin tespit edilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada (61), gebeliğin 9. gününde periton içi yolla verilen OA'nın plasentayı kolayca geçebildiği, ancak gebeliğin 11. veya 13. günü verilen OA'nın ise fetal dokulara kolayca ulaşamaması sebebiyle enjeksiyondan ancak 30 ile 48 saat sonra fetal dokularda rezidülerinin saptanabileceği ileri sürülmüştür.

Ratlarda gebeliğin 12. gününde deri altı yolla ³H ile işaretlenmiş OA ile yapılan bir çalışmada (65) ise, maksimum fetal rezidünün enjeksiyondan 48-72 saat sonra ve verilen dozun % 0.1'i oranında olduğu bildirilmiştir.

Gebe domuzlarda ise 21-28. günlerde 0.38 mg/kg dozda uygulanan OA'nın plasental bariyeri geçemeyeceği bildirilmiştir (65). Bu bulgulara paralel olarak Mortensen ve ark. (62)'da gebelik süresi boyunca 7-11 mg/kg dozda OA ilave edilmiş rasyonla beslenen domuzların fetuslarında herhangi bir rezidüye rastlamamışlardır. Yapılan bir başka araştırmada (67) ise, doğal yolla kontamine olmuş rasyonla beslenen domuzların kanında 0.20 ng/ml, yavrularının kanlarında ise 0.075-0.12 ng/ml OA tespit edilmiştir.

2.13. OKRATOKSİN A'NIN GENOTOKSİK ETKİLERİ

Toksinlerin büyük bir bölümünün genler üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır. Okratoksinlerin ise mutajenik etkisinin olduğuna ilişkin herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. OA'nın memeli hücreleri üzerine mutajenik etkisi olmamakla birlikte, zayıf düzeyde genotoksik etkilerinin olduğu bildirilmektedir (33).

2.14. OKRATOKSİN A'NIN KARBONHİDRAT METABOLİZMASINA ETKİSİ

OA'nın, glikoz ve insulin metabolizması üzerinde de olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir (58). Waren ve Hamilton (68), OA'nın, karaciğerde glikogenolizisin siklik AMP'ye bağlı protein kinazı aktive etmesi sonucu glikojen birikimine sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Meisner ve Krogh (29), OA'nın böbreklerde anahtar rol oynayan PEPCK aktivitesini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte türler arasında da OA'nın karbonhidrat metabolizması yönünden farklar bulunmaktadır. Örneğin domuzlarda OA'nın 4 mg/kg dozda uygulanması PEPCK aktivitesinin % 50'sini inhibe ederken, ratlarda 1000-2000 µg/kg vücut ağırlığında uygulanan OA, PEPCK aktivitesini tamamen inhibe edebilmektedir.

2.15. OKRATOKSİN A'NIN İNSANLARDAKİ ETKİLERİ

BEN, böbreklerde nefropatiye sebep olan, öncelikli olarak kadınlarda etkili, yavaş seyirli, ölümcül ve kronik bir hastalıktır. Özellikle 40 yaşın üzerindeki kişilerde etkili olmaktadır. Erken yaşlarda ise 10-19 yaşlarında görülmeyle birlikte daha çok 50'li yaşların başlarındakilerde tespit edilmiştir (69, 70).

Ülkelere göre BEN'li hasta sayıları incelendiğinde, dağılımın belirli bölgelerde daha fazla, belirli bölgelerde ise oldukça nadir olduğu gözlenmektedir. Ancak BEN, tespit edilen endemik bölgelerin dışında sporadik olarak da görülebilmektedir.

Balkan ülkeleri, endemik nefropati için oldukça büyük önem taşımaktadır. Hastalığa adını veren bu bölgedeki birçok ülkede nefropati büyük bir sıklıkla görülmektedir. Bulgaristan'daki endemik bölgelerde 147.000 kişi üzerinde ve 10 yıllık dönemde yapılan bir araştırmada (7), hastalığın görülme sıklığının her 100.000 kişide 877 olduğu ve bunların 555'inin kadın, 322'sinin ise erkek olduğu belirlenmiştir. BEN'den ölen hastalar üzerinde yapılan otopsilerde, böbreklerin oldukça büyüdüğü gözlenmiştir. Histolojik olarak ise lezyonlarda intersitisyel fibroz, tubuler dejenerasyon ve korteksin bir çok yüzeysel bölgelerindeki glomeruluslarda hyalinizasyon şekillenmektedir. Hastalığın en önemli ve ilk sinyalinin ise tubuler fonksiyonun zayıflaması olduğu bildirilmiştir (69).

BEN ile üriner sistem tümörü görülme sıklığı arasında çok yakın bir ilişki bulunmaktadır. Bulgaristan'daki bir örnekte, üriner sistem tümörlü hastaların % 46.6'sında aynı zamanda endemik nefropati de görülmüştür. Üriner sistem tümörleri içerisinde pelvis renalis ve üreterlerdeki kanserlerde endemik nefropati görülme oranı, sidik kesesi tümörlerinde görülme sıklığından çok daha fazladır. Endemik olmayan bölgelerdekiyle endemik bölgelerdeki pelvis renalis ve üreterlerde kanser görülme sıklığının 88:1 olduğu tespit edilmiştir. Aynı grupta üriner sistemin herhangi bir yerinde tümöral oluşum görülme sıklığının ise 28:1 olduğu bildirilmiştir (7).

Eski Yugoslavya'da OA ile kontamine gıdaların (buğday, mısır ve domuz eti) oranı % 12.8, hastalığın olmadığı bölgelerde gıdalardaki kontaminasyon oranı ise % 7.3 olarak belirlenmiştir (69). Endemik bölgelerde mısırdaki OA konsantrasyonunun 5-90 µg/kg ve domuz etindeki konsantrasyon oranınının 5 µg/kg olduğu, domuz böbreğinde ise 27 µg/kg'dan fazla OA'nın bulunduğu saptanmıştır (72). Bulgaristan'daki endemik

bölgelerdeki kontaminasyon oranları fasulyede % 16.7 ve mısırdaki % 27.3 iken endemik olmayan bölgelerde bu oran sırasıyla % 7.1 ve % 9'dur (7).

Yugoslavya'da 5 yıllık periyot içerisinde evlerde üretilen un ve ekmekler üzerinde yapılan bir çalışmada (73), mevsimlere ve mahsulün elde edilme zamanına bağlı olarak kontaminasyon oranının % 8.7 olduğu bildirilmiştir.

Balkanlardaki kronik nefropati olguları incelendiğinde, kandaki OA miktarının gıdalarla alınan OA miktarı ile bu toksine maruz kalma süresine bağlı olduğu görülmektedir. Kan numunelerindeki OA miktarlarını değerlendirmek her bir analizin farklı metodlarla ve farklı duyarlılıklarda yapılmasından ötürü oldukça zordur. Yugoslavya'nın endemik bölgelerinde, bir yıl arayla yapılan çalışmalarda, OA yaygınlığı % 16.6 ile % 5.9 olarak tespit edilmiştir (74).

Bazı ülkelerde 1977 ile 1990 yılları arasında OA'ya maruz kalan hastaların kan serumu ve sütlerindeki OA miktarları Tablo 2.4.'de sunulmuştur (7).

Tablo 2. 4. 1977 ile 1990 yılları arasında Avrupa'nın, OA yönünden endemik ve endemik olmayan bölgelerinde yaşayan insanlardan alınan numunelerdeki OA miktarları (7).

İncelenen Numune	Numunelerin Alındığı Ülke	OA Vakası	OA seviyeleri (ng/g veya ng/ml)
Kan serumu (Üriner sistem tümörlü ve/veya BEN'li hastalardan)	Bulgaristan	26%	1-35
Kan serumu (Endemik olmayan bölgeden)	Bulgaristan	7.7%	1-2
Kan serumu (Endemik nefropatili köyden)	Yugoslavya	25/420 (5.9 %)	1-40
Kan serumu (Endemik olmayan bölgeden)	Yugoslavya	17/219 (7.7 %)	1-10
Kan serumu	Polonya	9/216 (4.1 %)	1.3-4.8
Kan serumu	Almanya	173/306 (56.5 %)	0.1-14.4
Süt (1986)	Almanya	4/36 (11.1 %)	0.017-0.03
Kan serumu (Kan bankasından 1986 ve 1987 yıllarında elde edilmiş)	Danimarka	-	<0.1-9.7 ortalama 1.5-2.3
Kan serumu	Çekoslovakya	35/143 (24.4 %)	<0.1-1.26

Petkova-Bocharova ve ark. (75), Bulgaristan'da BEN yönünden endemik bölgelerle endemik olmayan bölgelerde yaptıkları çalışmada serumlardaki OA miktarını belirlemişlerdir. Araştırmacılar, endemik olmayan bölgelerdeki kan serumlarında OA'ya rastlamazken, endemik bölgelerde serum numunelerindeki OA seviyesinin 2 ng/ml' nin üzerinde olduğunu belirlemişlerdir.

Yugoslavya'da 1980 yılında yapılan bir çalışmada (74), hiperendemik ve endemik olmayan bölgelerde 1 ng/ml'nin üzerinde OA içeren serum oranının sırasıyla % 6 ve % 7.8 olduğu, bunun yanında hiperendemik bölgelerde serum OA düzeyinin de oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Golinski ve ark. (72), yaptıkları çalışmada Polonya'da yaşayan insanların kan serumlarındaki OA miktarını tespit etmişlerdir. Yapılan incelemelerde, Polonyalılar da serum OA seviyesinin ortalama 0.27 ng/ml ve gıdalarla alınan ortalama OA seviyesinin ise 0.448 ng/kg olduğunu saptamışlardır.

BEN oluşumunda OA'nın önemi oldukça büyüktür. BEN'den ölen hastaların yaklaşık 1/3'ünün pelvis renalis, üreter veya idrar keselerinde papilloma ve karsinomaların olduğu belirlenmiştir. Bulgaristan'da bir endemik bölgede yaşayan BEN'li hastalarda üriner sistem tümörlerinin gelişiminin endemik olmayan bölgelere göre 90 kat daha fazla olduğu, ancak BEN oluşumunda OA'nın olması yanında genetik faktörlerin de etkili olduğu tespit edilmiş ve bu konuyla ilgili analitik epidemiyolojik ve onkolojik çalışmaların artırılmasının gerektiği bildirilmiştir (76).

2.16. OKRATOKSİN A'NIN METABOLİK BİYOTRANSFORMASYONU

OA, vücuda alındıktan sonra metabolik transformasyona uğrayana kadar serum albuminleriyle taşınmaktadır. OA, *in vivo* ortamda gerçekleşen hidrolizasyon reaksiyonuyla toksik olmayan bir yapı olan O α haline dönüşmektedir. Ratlarda bu detoksifikasyon işlemi serum mikroflorasındaki mikroorganizmalar yoluyla gerçekleşmektedir (17). Bu konuda yapılan çalışmalarda (77-80), OA'nın O α 'ya olan hidrolizinde sığır ve kemiricilerin, mide ve mikroflorasında bulunan karboksipeptidaz ve kemotripsin enzimlerinin etkin olduğu tespit edilmiştir.

OA'nın biyotransformasyonunda etkin enzimler ratların duodenum, ileum ve pankreasında yüksek düzeyde bulunurken, karaciğer ve böbreklerinde ise oldukça düşük düzeyde bulunmaktadır (13).

Sığırlarda OA'nın detoksifikasyonu, protozoer aktiviteden dolayı oldukça hızlıdır. In vitro ortamda yapılan deneylerde OA'nın hızlı bir şekilde O α 'ya dönüştürüldüğü tespit edilmiştir (81).

Sığırlar, rasyonlarına ilave edilen 12 mg/kg'lık OA'ya oldukça dirençlidir. Koyunların da sığırlardakine benzer şekilde OA'yı oldukça iyi detoksifiye etme kapasitelerinin olduğu ve hatta OA'yı henüz kana ulaşmadan hidrolize ettikleri belirlenmiştir (79).

OA'nın idrardaki bir başka metaboliti, rat ve tavşan karaciğeriyle ratların böbreklerindeki sitokrom P-450'nin etkisiyle metabolize edilen 4-OH- (4R ve 4S) epimerleridir. 4R-OH-OA epimeri insan ve ratlarda OA'dan daha az toksik olan iki önemli OA metabolitinden biri olmasına rağmen, domuzların karaciğer mikrozomlarında daha yoğun olduğu görülmüştür (13).

OA'nın 10-OH derivatı, tavşanların karaciğer mikrozomal sisteminde tespit edilmiştir (22). OA kadar toksik olan OC ise, rumen sıvısında tespit edilmiş bir metabolittir (79). OB, OA'nın dikloro derivatı olup, tahıllarda nadiren bulunabilmektedir. OA, ratlar için daha az toksiktir ve 4-OH-OB ile O β 'ye metabolize olmaktadır (82).

Storen ve ark. (57), ratlara oral veya intraperitoneal yolla verilen OA'nın %1-1.5' inin (4R)-4-hidroksi-okratoksin A olarak ve % 25-27'sinin de O α olarak idrarda tespit edilebildiğini bildirmişlerdir. İnsan, domuz ve rat karaciğer mikrozomları kullanılarak yapılan in vitro çalışmalarda, sitokrom 450'yi de içerisine alan hidroksilasyon ile hem (4R)- hem de (4S)-4-hidroksi-OA şekillenmiştir. 4-Hidroksi-okratoksin A'nın ratlarda 40 mg/kg dozda kullanılmasının bile toksik etki yaratmaması, mikrozomal hidroksilasyonun detoksifikasyon reaksiyonuna benzediğini ortaya koymuştur (13).

2.17. OKRATOKSİN A'NIN VÜCUTTAN ATILIMI

OA, vücuda alındıktan sonra ya direkt olarak OA, ya da metabolitleri şeklinde gaita ve idrar yoluyla atılmaktadır. OA'nın vücuttan atılımını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada (57), ratlara oral yolla verilen OA'nın idrarda % 6'sının OA şeklinde, % 1.5'sinin (4R)-4-hydroxyochratoxin A ve % 25-27'sinin de O α şeklinde atıldığı belirlenmiştir. Çalışmada, gaitada % 12 oranında OA'nın değişmeden ve % 9 oranındaki OA'nın ise O α şekline dönüştürülerek atıldığı tespit edilmiştir.

OA'nın ^{14}C atomuyla işaretlenerek hangi yolla ve ne oranda atıldığının belirlenmesi amacıyla yapılan bir başka çalışmada ise (83), ratlara 15 mg/kg dozda oral yolla verilen OA'nın 120 saat sonra gaitada % 11 oranında değişmeden, % 23 oranında O α şeklinde, idrarda % 11 OA, % 12 O α ve safrada ise % 33 oranında OA şeklinde değişmeden atıldığı saptanmıştır. Araştırmacılar aynı zamanda oral yolla verilebilecek OA'nın LD₅₀ oranının % 75'ini geçmemesi gerektiğini, aksi halde oluşacak enteritis sebebiyle barsaklardan emilimin azalmasının yanıtıcı sonuçlar vereceğini ileri sürmüşlerdir.

OA'nın vücuttan atılımı, başlıca gaita ve idrar yoluyla olmakla birlikte verilmiş yoluna göre de farklılıklar göstermektedir. Oral yol dışında verilen OA, idrar yoluyla atılmaktadır. Bu amaçla yapılan bir araştırmada (31), ^{14}C atomuyla işaretli OA'nın intraperitoneal yolla verilmesinden sonra primer olarak idrarla atıldığı belirlenmiştir.

Birçok toksin gibi OA da gaita ve idrar yolunun haricinde vücudun diğer sekresyonlarıyla da atılmaktadır. Laktasyon dönemindeki tavşanlarda yapılan bir çalışmada (17), iki gruba ayrılan tavşanlara 1 ve 4 mg/kg dozlarda intravenöz yolla OA uygulanmış ve çalışmanın sonunda 1 mg/kg dozda verilen OA'nın kan meme bariyeri tarafından tolere edildiği, ancak 4 mg/kg dozda verilen OA'nın 1 mg/litre olarak sütle atıldığı tespit edilmiştir.

Keçilerde yapılan bir çalışmada ise (85), trityumla işaretlenmiş OA'nın oral yolla verilmesinden sonraki 7 günde başlangıç dozunun % 53'ünün gaitada, % 38'inin idrarda, % 6'sının sütle ve % 2'sinin ise serumda bulunduğu kaydedilmiştir.

Almanya'da 36 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada (86), 4 hastada (% 11.1) 0.017-0.030 ng/ml (ortalama 0.024 ng/ml) OA'nın sütle geçtiği tespit edilmiştir.

Yapılan literatür taramalarında insan idrarı ve gaitasında OA seviyeleriyle ilgili herhangi bir veriye rastlanılmamıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Örnekler

Çalışmada, OA miktarlarının tespiti amacıyla 25 adet un, 25 adet pirinç ve 25 adet bulgur numunesi olmak üzere toplam 75 adet tahıl numunesi deney materyali olarak kullanılmıştır.

Kullanılan numuneler, Kayseri'de tüketime sunulan tahılların toptancı depolarından direkt olarak orijinal çuvallarından alınarak paçal yapılan numunelerdir.

3.1.2. Kullanılan Malzemeler

Sunulan çalışmada, gıda numuneleri aşağıdaki listede sıralanan malzemeler yardımıyla hazırlanmıştır. Bu malzemeler;

Santrifüj (Üçkar, Türkiye),

Çalkalayıcı (Nüve SL 350, Türkiye),

Grinder (Tefal, France),

Magnetik karıştırıcı (Velp, Switzerland),

Filtre kağıtları,
 Pastör pipetleri,
 Mikropipet (Socorex, Switzerland),
 Mikropipet uçları (50 µl ve 100 µl'lik),
 1 N HCl (Merck, Darmstadt, Germany),
 Diklormetan (Carlo Erba Reagenti, İtaly),
 0.13 M NaHCO₃ (Merck, Darmstadt, Germany), pH 8.1,
 Steril olmayan eldiven olarak sıralanabilir.

3.1.3. Okratoksin A Test kitleri

Çalışmada OA düzeyinin belirlenmesi amacıyla kantitatif okratoksin A ELISA kit (RIDASCREEN, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany) kullanılmıştır. Test kitlerinin bozulmadan saklanması için kullanmadan önce ve kullandıktan sonra kendi orijinal ambalajında ve +4 °C 'de buzdolabında saklanmış, ışık alarak bozulmamaları için özen gösterilmiştir.

Çalışmada kullanılan materyal 96 testlik olup, her bir kit, Tablo 3.1'te sunulan miktarda plate ve solüsyonları içermektedir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan test kitinin içerdiği malzemeler ve miktarları.

Malzeme adedi	Malzemenin içeriği	Tanımlama bilgisi
1	96 adet mikrotitrasyon playti	12 strip x 8 gözlü
6	Okratoksin A standart solüsyonları (1.3 ml), 0 ppt (0 standardı),	25 ppt, 75 ppt, 225 ppt, 675 ppt, 2025 ppt OA solüsyonu
1	Konjugat (0.7 ml)	Peroksidaz OA konsantre solüsyonu
1	Substrat (7 ml)	Urea peroksidaz
1	Kromojen (7 ml)	Tetrametilbenzidin
1	Stop solüsyonu (14 ml)	1N sülfürik asit
1	Buffer (7 ml)	Konjugat dilüsyon tamponu

3.1.4. Elde Edilen Sonuçların Okutulması

Çalışmada elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde Elx 800 Universal Microplate Reader, BIO-TEK ELISA okuma cihazı kullanılmıştır. Analizler, üç tekrarlı, iki paralelli olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. METOD

Sunulan çalışmada, pirinç ve bulgur numuneleri un halinde olmadığı için öğütücü yardımıyla öğütülerek un haline getirilmiş, buğday unları ise direkt olarak kullanılmıştır.

3.2.1. Numunenin Hazırlanması

Çalışma için un haline getirilmiş 5 g numune alınarak 100 ml 0.13 M sodyum hidrojen karbonat tamponu ilave edilmiş, çalkalayıcı veya manyetik karıştırıcı ile 15 dakika karıştırıldıktan sonra ekstrakt filtre edilmiş ve bu çözeltinin 50 µl'si analizde kullanılmıştır.

3.2.2. Yıkama Çözeltisi

Kit ile birlikte verilen fosfat buffer solüsyonu (PBS), 100 ml distile suda çözdürülmüş, elde edilen konsantre çözelti 20-25 °C'da 12 hafta süreyle kullanılmıştır. Konsantre çözelti kullanılacağı zaman 1:10 oranında seyreltilerek analiz süresince kullanılmıştır.

3.2.3. Enzim Konjugatının Hazırlanması

Çalışma sırasında, enzim konjugat numune sayısına göre, Tablo 3.2 'deki miktarlara göre hazırlanmış ve çalışma süresince kullanılmıştır.

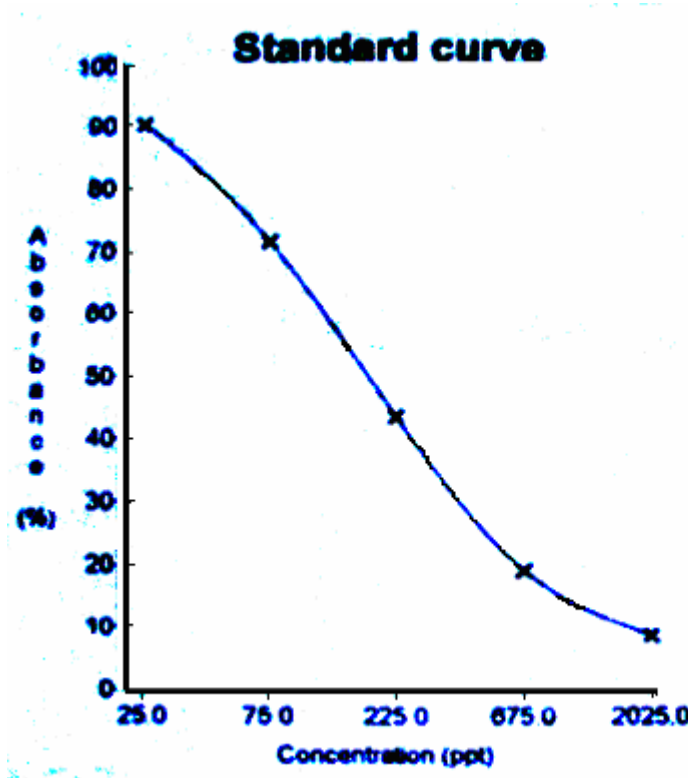
Tablo 3.2. Numune sayısına göre enzim-konjugat miktarları

Numune Sayısı	Konjugat Miktarı	Buffer Miktarı
1-4	50 µl	500 µl
4-14	100 µl	1000 µl
15-24	150 µl	1500 µl
25-35	200 µl	2000 µl

3.2.4. ELISA Testinin Yapılışı

Çalışmada kullanılan metodun prensibi, antijen antikor reaksiyonuna dayanan ELISA test metodudur. ELISA test metodunun işlem sırası, aşağıda maddeler halinde sunulmuştur.

1. Analiz için gerekli olacak sayıda kuyucuk, kendi özel çerçevesine yerleştirilerek, standart ve örneklerin konacağı kuyucuklar belirlenmiştir.
2. Kuyucuklara 50 µl standart ve örnekler otomatik pipetler yardımıyla damlatılmıştır.
3. Her bir kuyucuğa 50 µl seyreltilmiş konjugat ilave edilerek kuyucuklar hafifçe çalkalanmış ve 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır.
4. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar 3 kez 250 µl yıkama çözeltisi ile yıkanmıştır.
5. Her bir kuyucuğa 100 µl substrat/kromojen konularak hafifçe çalkalanmış, 15 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır.
6. İnkübasyon sonrasında her bir kuyucuğa 100 µl stop solüsyon ilave edilerek hafifçe çalkalanmış ve sonuç 30 dakika içerisinde 450 nm dalga boyundaki ELISA okuyucusu ile okunup RIDAWIN ile değerlendirilmiştir. RIDAWIN programına ait standart grafik aşağıda sunulmuştur.



Grafik 3.1. ELISA okuyucusu ile okutulan sonuçların RIDAWIN programındaki standart eğrisi

3.2.5 İstatistiksel Değerlendirme

Un, pirinç ve bulgur numunelerine ait veriler SPSS paket programı kullanılarak her bir gruba ait tanımlayıcı testler ile gruplar arası önem varyans analizi (ONE WAY ANNOVA) ile değerlendirilmiştir. Gruplar arası önemin tespitinde DUNCAN test kullanılmıştır (87).

4. BULGULAR

Sunulan çalışmada, 25'er adet buğday unu, pirinç ve bulgur numunesine ait OA bulguları Tablo 4.1'de tablo halinde sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.1'de sunulan RIDAWIN programındaki standartlara ait grafiğe göre değerlendirilmiştir.

Sunulan çalışmada elde edilen bulgular incelendiğinde, buğday ununa ait en yüksek değer $1011,84 \pm 0,08$ ppt olurken, en düşük değer $145,66 \pm 0,09$ ppt olarak tespit edilmiş, ortalama OA değeri 360.93 ppt olarak kaydedilmiştir. Pirinç numunelerinde yapılan değerlendirmede, en yüksek ve en düşük sonuçlar sırasıyla $381,93 \pm 0,08$ ppt ile $153,76 \pm 0,06$ ppt olup, ortalama değer 241.07 ppt olarak bulunmuştur. Bulgur numunelerin ise en yüksek OA değeri $548,80 \pm 0,06$ ppt, en düşük OA değeri $158,53 \pm 0,07$ ppt ve ortalama OA değeri 384.10 ppt olarak belirlenmiştir.

Çalışma sonucunda un, pirinç ve bulgur numunelerinin içerdikleri OA miktarları bakımından yapılan istatistiksel incelemede, pirinç numunelerinin sahip olduğu OA bakımından un ve bulgur numunelerinden istatistiksel açıdan önemli derecede farklılık gösterdiği ($p>0.01$) belirlenmiştir. Un ve bulgur örneklerinin sahip oldukları OA açısından farklı olmadıkları ($p<0.05$) tespit edilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışmada un, pirinç ve bulgur numunelerinde tespit edilen OA miktarları (n=6).

NO	NUMUNELERE GÖRE TESPİT EDİLEN OA MİKTARLARI (ppt)		
	UN	PİRİNÇ	BULGUR
1	332,14 ± 0,01	357,66 ± 0,05	421,38 ± 0,06
2	240,71 ± 0,05	165,62 ± 0,02	435,44 ± 0,08
3	1011,84 ± 0,08	257,45 ± 0,01	433,23 ± 0,04
4	667,53 ± 0,09	183,21 ± 0,04	401,82 ± 0,05
5	640,16 ± 0,03	315,19 ± 0,05	358,39 ± 0,08
6	350,01 ± 0,03	192,39 ± 0,02	417,34 ± 0,14
7	220,99 ± 0,05	340,27 ± 0,01	365,73 ± 0,03
8	228,57 ± 0,07	381,93 ± 0,08	333,28 ± 0,06
9	372,72 ± 0,08	176,34 ± 0,08	349,17 ± 0,02
10	416,93 ± 0,04	251,67 ± 0,07	411,18 ± 0,03
11	896,07 ± 0,02	298,69 ± 0,08	189,28 ± 0,05
12	447,49 ± 0,01	331,40 ± 0,05	158,53 ± 0,07
13	763,26 ± 0,05	187,50 ± 0,06	468,23 ± 0,07
14	202,37 ± 0,06	241,97 ± 0,04	346,56 ± 0,08
15	145,66 ± 0,09	213,11 ± 0,03	384,48 ± 0,15
16	157,30 ± 0,01	153,76 ± 0,06	513,47 ± 0,07
17	200,86 ± 0,03	180,51 ± 0,02	396,37 ± 0,06
18	261,42 ± 0,02	247,85 ± 0,04	445,42 ± 0,13
19	198,43 ± 0,02	211,30 ± 0,04	309,60 ± 0,06
20	186,29 ± 0,04	186,12 ± 0,05	338,40 ± 0,13
21	153,78 ± 0,05	279,51 ± 0,09	465,36 ± 0,12
22	189,94 ± 0,08	197,00 ± 0,07	548,80 ± 0,06
23	285,00 ± 0,01	193,65 ± 0,03	454,18 ± 0,06

Tablo 4.1. 'in devamı

NO	NUMUNELERE GÖRE TESPİT EDİLEN OA MİKTARLARI (ppt)		
	UN	PİRİNÇ	BULGUR
24	241,45 ± 0,03	319,00 ± 0,02	290,57 ± 0,04
25	212,37 ± 0,05	163,73 ± 0,04	366,35 ± 0,06
En düşük	145,66	153,76	158,53
En yüksek	1011,84	381,93	548,80
Ortalama	360.93	241,07	384.10

Tablo 4.2. Un, pirinç ve bulgur numunelerindeki OA düzeylerinin Duncan testi ile karşılaştırılması

Duncan

grup	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Pİ	25	241,0732	
UN	25		360,9316
BU	25		384,1024
Sig.		1,000	,598

Pİ: Pirinç, BU: Bulgur

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikotoksinler içinde önemli bir yer teşkil eden okratoksinler, insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen karsinojenik, genotoksik, bağışıklık sistemini baskılayıcı etkili mikotoksinlerdir. Okratoksinler, karaciğer üzerinde de toksik etkili olmakla birlikte en önemli etkilerini böbrekler üzerinde göstermektedirler.

İnsan sağlığını tehdit eden okratoksin seviyelerinin tespit edilmesi oldukça büyük önem taşımaktadır. Özellikle okratoksinlerin kimyasal yapılarının belirlenmesi sonucunda bu toksinler için birçok analiz metodu geliştirilerek dünyanın birçok yerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Okratoksinin asidik özellikli kısımları sebebiyle birçok organik çözeltide çözünmesi, birçok yolla ekstrakte edilmesinde temel prensibi oluşturmaktadır. Okratoksin analizinde en çok kullanılan metot, arpalardaki analiz metodunun geliştirilmesiyle elde edilen ve resmi olarak AOAC metotları içerisinde yer alan ince tabaka kromatografisi metodudur. Bu metoda göre OA ve OB asitleştirme işleminden sonra kloroform ile ekstrakte edilmektedir (7, 83).

Almanya'da HPLC prosedürü kullanılarak yapılan bir çalışmada (86), 306 serum numunesinden 173'ünün(% 56.6) OA içerdiği, ortalama toksin miktarının 0.2 ng/g ve sınırlarının 0.1-0.3 ng/g arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Yapılan birçok çalışmada (24, 71, 74, 76) BEN'nin oluşmasında predispoze faktörlerin yanında en büyük etkenin okratoksinler olduğu belirlenmiştir. Eski Yugoslavya' da yapılan bir araştırmada (74), iki köyde yaşayan insanların serumlarında 2-57 ng/g OA tespit edildiği ve popülasyonun OA yönünden % 6.6 oranında pozitif olduğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada enzimatik spektrofotometrik prosedürde pozitif çıkan sonuçlar serumlardaki OA'nın esterifikasyonu ve okratoksin alfanın enzimatik hidrolizi yapılmış ve elde edilen esterler yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle doğrulanmıştır. Çalışmada, hastaların 1/3 ünün BEN ve papillomlar ile pelvis renalis, üreter veya idrar kesesindeki tümöral oluşumlardan dolayı öldükleri kaydedilmiştir. Bulgaristan'daki endemik bir bölgede hastalarda üriner sistem tümörlerinin içinde BEN oluşumunun endemik olmayan bölgelere göre 90 kat daha fazla olduğu ortaya konulmuştur (76).

Almanya' da yapılan bir çalışmada, 306 adet insan serum örneğinin % 57'sinin OA yönünden pozitif olduğu ve serum konsantrasyonunun da 0.1-14.4 ng/g arasında olduğu tespit edilmiştir (86).

Breitholtz ve ark. (88), İsveçte Upsala Osternus ve Visby bölgelerinde yaşayan yerli halkta, kan serumlarında OA konsantrasyonunun sırasıyla 0.02, 0.03 ve 0.26 ng/ml olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar, Visby bölgesinde görülen plazma OA düzeyinin fazla olmasını, bölgedeki tahıl ürünlerinin OA ile kontamine olması kadar, OA ile kontamine domuz ve piliç etlerinin tüketilmesine de bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Bu bölgede yapılan diğer araştırmalara göre(71), domuzlarda kesim sonrası yapılan muayenelerde çeşitli organ ve dokularda yemden kaynaklanan OA'nın görülmesi, elde edilen bulguları doğrulamaktadır.

Kanada'da 159 insan serum numunesinde yapılan incelemede, % 40 oranında OA tespit edildiği bildirilmiştir (7). Çalışmadaki serum konsantrasyonu ve populasyon yüzdeleri değerlendirildiğinde, 0.3, 0.7, 2.2 ve 35 ng/ml OA' nın incelenen oranlarının sırasıyla % 28, 6, 5 ve 1 olduğu saptanmıştır. Bu bulgular, tahılların nemli ortamda OA'nın oluşması ve bölgede tüketilen domuz etlerinde de OA tespit edilmesine bağlanmıştır (89).

Krogh ve ark. (71), aralarında Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'nın da bulunduğu 13 ülkede okratoksinlerin dağılımı ile ilgili yaptığı araştırmada, okratoksinlerin gıda ve yemlerdeki kontaminasyon oranının % 1 'den 30'a kadar değişen oranlarda bulunduğunu bildirmişlerdir. Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri'nde ise kontaminasyon oranlarının % 1-14.2' ye kadar değişen oranlarda olduğu belirlenmiştir. OA konsantrasyonunun 1979 ile 1987 arası dönemde 1.035 µg/kg olduğu, % 83 oranındaki numunede ise 200 µg/ kg 'dan daha küçük oranda OA içerdiği, % 3 oranındaki numunenin ise 20.000 ile 30.000 µg/ kg düzeyinde kontamine olduğu, hayvan yemlerindeki kontaminasyon oranının, gıdalara göre çok daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Karagözlü ve Karapınar (90), buğday, mısır unu, yulaf gevreği, yulaf ezmesi, yulaf unu ve müsliden oluşan 100 adet gıda örneğinin 4'ünde 0.27-9.84 ppb düzeyinde OA tespit etmişler ve sonucun OA yönünden endemik ülkelerde tespit edilen düzeyden daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, Türkiye'de tüketime sunulan tahıl ürünlerinde OA yönünden herhangi bir tehlike olmadığını, ancak OA ile ilgili çalışmaların sayısının artmasının gerekliliğini vurgulamışlardır.

Baydar ve ark. (91) Ankara 'da tüketilen gıdalarda aflatoksin ve OA düzeylerinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada, 25 adet tahıl numunesinde sadece 3'ünün Türkiye'de kabul edilebilir sınır olan 3 ppb'nin üzerinde olduğunu (3.45, 3.69 ve 4.07 ppb) bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise, Kayseri'de tüketilen un, pirinç ve bulgurda en yüksek değerlerin sadece bir un numunesinde 1011.84 ppt olarak ölçülmüştür. Elde edilen bu değer, Türkiye'de kabul edilebilir sınırm oldukça altında olup, Baydar ve ark.(91)'na paralel özelliktedir.

Türkiye’de ise OA miktarlarının tespitiyle ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Yapılan literatür taramalarında, Türkiye’de, OA sonucu şekillenen böbrek ve karaciğer sorunları ile BEN sonucu meydana gelen ölümler konusunda herhangi bir bilgi bulunamamıştır. OA’nın etkilerinin Avrupa’nın endemik bölgeleri ile Kuzey Amerika ve Avustralya gibi ülkelerde daha yoğun olarak görülmesinin, bu bölgelerin coğrafi konumları itibariyle nemli iklimlere sahip olması ve depolama şartlarından kaynaklandığı bildirilmektedir (92-94).

OA ile ilgili ülkemizde yapılan çalışmalar sınırlı olmakla birlikte, Sonal ve Oruç (95) tarafından, Türkiye’deki tavuk eti ihtiyacının önemli bir bölümünü karşılayan Bursa ve çevresindeki broyler çiftliklerinde yapılan bir çalışmada yemlerle alınan OA miktarının ortalama 4.36 µg/kg olduğu, bunun ise insan sağlığı için sorun teşkil etmediği ortaya konulmuştur. Ülkemizde ayrıca dini inançlar gereği tek gözlü mideye sahip ve yemlerle aldığı OA’yı detoksifiye edemeyen hayvanlardan olan domuzun tüketilmemesi de, OA’nın sebep olduğu sorunların ülkemizde görülmemesinin bir başka sebebidir.

Araştırmada incelenen numuneler açısından bir değerlendirme yapıldığında, pirinç numunelerinin OA içeriklerinin daha az olması ile un ve bulgur numunelerine göre daha güvenli olduğunu söylemek mümkündür. Türkiye’de tahıllardaki OA miktarları, diğer ülkelerle karşılaştırıldığında çok daha düşük olup, kabul edilebilir sınırın (3 ppb) altındadır. Bununla birlikte, Avrupa’nın diğer ülkelerine kıyasla Türkiye’de fazla tüketilen tahıl ürünlerinin çeşitliliği sebebiyle daha da fazla tüketilmesinin, tahılların OA seviyesindeki minimum artışlarda bile büyük sağlık sorunlarına yol açabileceği hiç bir zaman unutulmamalıdır.

6. KAYNAKLAR

1. Bennet J W, Klich M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 2003; 16: 497-516
2. Varga J, Kevel E, Rinyu E, Teren J, Kozakiewicz Z. Ochratoxin production by *Aspergillus* Species. *Applied and Environmental Microbiology* 1996; 62: 4461-4464
3. Bayman P, Baker JL, Doster MA, Michailides TJ, Mahoney NE. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. *Applied and Environmental Microbiology* 2002 ; 68: 2326-2329
4. Pitt JI, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of Ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology* 1987; 53: 266-269
5. Abarca ML, Bragulat MR, Castella G, Cabanes FJ. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 1994; 60: 2650-2652
6. Callaghan JO, Caddick MX, Dobson DW. A polyketide synthase gene fequired for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus* 2003; 149: 3485-3491
7. Marquardt RR, Frohlich AA. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J Anim Sci* 1992; 70: 3968-3988

8. Schramek H, et al. Ochratoxin A-induced stimulation of extracellular Signal-regulated kinases $\frac{1}{2}$ associated with Madin-Darby Canine Kidney-C7 cell dedifferentiation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1997; 283: 1460-1468
9. Northolt, MD., Egmond HP, Paulsch WE. Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *J Food Prot* 1979; 42:485
10. Madhyastha MS, Marquardt RR, Frohlich AA, Abramson D. Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. *J Agric Food Chem* 1990; 38: 1506
11. Chelack WS, Borsa J, Marquardt RR, Frohlich A. Role of the competitive microbial flora in the radiation-induced enhancement of ochratoxin production by *Aspergillus alutaceus* var.*alutaceus* NRRL 3174. *Applied and Environmental Microbiology* 1991; 57: 2492-2496
12. Searcy JW, Davis ND, Diener L. Biosynthesis of Ochratoxin A. *Applied Microbiology* 1969; 18: 622-627
13. Stormer FC, Hansen CE, Pedersen JI, Hvistendahl G, Aasen A. Formation of (4R)-and (4S)-4-Hydroxyochratoxin A from Ochratoxin A by liver microsomes from various species. *Applied and Environmental Microbiology* 1981; 42: 1051-1056
14. Syvertsen C, Stormer F C. Oxidation of two hydroxylated Ochratoxin A metabolites by alcohol dehydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology* 1983; 45: 1701-1703
15. Xiao, H, Marquardt R R, Abramson D, Frohlich A. Metabolites of ochratoxins in rat urine and in a culture of *Aspergillus ochraceus* 1996; 62: 648-655
16. Simon P, Godin M, Fillastre JP. Ochratoxin A: a new environmental factor which is toxic for the kidney. *Nephrol Dial Transplant* 1996: 2389-2391
17. Galtier P. Contribution of pharmacokinetic studies to mycotoxicology-ochratoxin A. *Vet. Sci. Commun* 1978; 1: 349-358
18. Roth A, Chakor K, Creppy EE, Kane A, Roschenthaler R, Dirheimer G. Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. *Toxicology* 1988; 48: 293
19. Lee SC, Beery JT, Chu FS. Immunohistochemical fate of ochratoxin A in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 72: 218
20. Rousseau DM, et al. Detection of Ochratoxin A in porcine kidneys by a monoclonal antibody-based radioimmunoassay. *Applied and Environmental Microbiology* 1987; 53: 514-518

21. Chang FC, Chu FS. The fate of ochratoxin A in rats. *Food Cosmet Toxicol* 1977; 15: 199-204
22. Groves CE, Morales M, Wright HS. Peritubular transport of Ochratoxin A in rabbit renal proximal tubules. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1998; 284: 943
23. Mori H, Kawai K, Ohbayashi F, Kuniyasu T, Yamazaki M, Hamasaki T, Williams G M. Genotoxicity of variety of mycotoxins in the hepatocyt primary culture/DNA repair test using rat and mouse hepatocytes. *Cancer Research* 1984; 44: 2918-2923
24. Dorrenhaus A, et al. Induction of unscheduled DNA synthesis in primary human urothelial cells by the mycotoxin ochratoxin A 2000: 53; 271-277
25. Creppy EE, Stormer FC, Roschenthaler R, Dirheimer G. Effects of two metabolites of Ochratoxin A, (4R)-4-hydroxyochratoxin A and Ochratoxin α , on immune response in mice. *Infection and Immunity* 1983; 39: 1015-1018
26. Creppy EE, Roschenthaler RR, Dirheimer G. Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. 1984; 22: 883
27. Haubeck H, Lorkowski G, Kolsch E, Rosenthaler R. Immunsuppression by Ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Applied and Environmental Microbiology* 1981; 41:1040-1042
28. Roschenthaler R, Creppy E E, Dirheimer G. Ochratoxin A: On the mode of action of a ubiquitous mycotoxin. *J Toxicol* 1984; 3: 53-86
29. Meisner H, Krogh P. Phosphoenolpyruvate carboxykinase as a selective indicator of ochratoxin A induced nephropathy. *Dev Toxicol Environ Sci* 1986; 14: 199-206
30. Yiannikouris A, Jouany JP. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review *Animal Research* 2002; 51: 81-99
31. Dahlman A, Dantzler WH, Silbernagl S, Gekle M. Detailed mapping of ochratoxin A reabsorbtion along the rat nephron in vivo: the nephrotoxin can be reabsorbed in all nephron segments by different mechanisms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1998; 286: 157-162
32. Albassam MA, Yong SI, Bhatnagar R, Sharma AK, Prior MG. Histopathologic and electron microscopic studies on the acute toxicity of ochratoxin A in rats. *Vet Pathol* 1987; 424: 427-435

33. Kuiper-Goodman T, Scott PM. Risk Assessment of the Mycotoxin Ochratoxin A. *Biomed Environ Sci* 1989; 2: 179-248
34. Petzinger E, Ziegler K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2000; 91-98
35. Munro IC, Moodie CA, Kuiper-Goodman T, Scott PM, Grice HC. Toxicologic changes in rats fed graded dietary levels of ochratoxin A. *Toxicol Appl Pharmacol* 1974; 28: 180-188
36. Berndt WO, Hayes AW. In vivo and in vitro changes in renal function caused by ochratoxin A in the rat. *Toxicology* 1979; 12: 5-17
37. Stormer FC, Kolsaker P, Holm H, Rogstad A, Elling F. Metabolism of ochratoxin B and its possible effects upon the metabolism and toxicity of ochratoxin A in rats. *Applied and Environmental Microbiology* 1985; 49: 1108-1112
38. Kithen DN, Carlton WW, Tuite J. Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in beagle dogs. I. Clinical and clinicopathological features. *Vet Pathol* 1977; 14: 154
39. Kanisawa M, Suzuki S, Kozuka Y, Yamazaki M. Histopathological studies on the toxicity of ochratoxin A in rats 1. Acute oral toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1977; 41: 55-64
40. Zingerle M, Silbernagl S, Gekle M. Reabsorption of the nephrotoxin ochratoxin A along the rat nephron in vivo. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1997; 280: 220-224
41. Jung KY, Endou H. Nephrotoxicity assessment by measuring cellular ATP content. II. Intranephron site of ochratoxin A nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989; 100: 383-390.
42. Endou H, Koseki C, Yamada H, Obara T. Evaluation of nephrotoxicity using isolated nephron segments. *Dev Toxicol Environ Sci* 1986; 14: 207
43. Meisner H, Polsinelli L. Changes in renal mRNA species abundance by ochratoxin A. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 661-665
44. Meisner H, Selanik P. Inhibition of renal gluconeogenesis in rats by ochratoxin. *Biochem J* 1979; 180: 681-684

45. Kuan M, Nestler S, Verguet C, Bezencon C, Piguet D, Mansourinan R, Holwarth J, Grigorov M, Delatour T, Mantle P, Cavin C, Schilter B. A toxicogenomics approach to identify new plausible epigenic mechanisms of ochratoxin A carcinogenicity in rat. *Toxicological Science* 2006; 89: 120-134
46. Chang CF, Hamilton PB, Impairment of phagocytosis by heterophils from chickens during ochratoxicosis. *Environ Microbiol* 1980; 39: 572-575
47. Boorman GA, Hong HL, Dieter MP, Hayes HT, Pohland AE, Stack M, Luster MI. Myelotoxicity and macrophage alteration in mice exposed to ochratoxin A. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 72: 304
48. Campbell ML, May JD, Huff WE, Doerr JA. Evaluation of immunity of young broiler chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis. *Poult Sci* 1983; 62: 2138
49. Luster MI, Germolec DR, Burleson GR, Jameson CW, Ackermann MF, Lamm KR, Hayes HT. Selective immunosuppression in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A. *Cancer Research* 1987; 47:2259
50. Gentles A, Smith E E, Kubena L F, Duffus E, Johnson P, Thompson J, Harvey R B, Edrington T S. Toxicological evaluation of cyclopiazonic acid and ochratoxin A in broilers. *Poultry Science* 1999; 78: 1380-1384
51. Pecham JC, Doupnik B, Jones H. Acute toxicity of ochratoxins A and B chicks. *Applied Microbiology*, 1971; 21: 492-494
52. Doupnik B, Peckham C. Mycotoxicity of *Aspergillus ochraceus* to chicks. *Applied Microbiology* 1970; 19: 594-597
53. Lea T, Steien K, Stormer FC. Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathologia* 1989; 107: 153
54. Dwivedi P, Burns RB. Effect of ochratoxin A on immunoglobulins in broiler chicks. *Res Vet Sci* 1984; 36: 117-121
55. Agawane SB, Lonkar PS. Effects of probiotic containing *Saccharomyces boulardii* on experimental ochratoxicosis in broilers: hematobiological studies. *J Vet Sci* 2004; 5: 359-367
56. Huff, WE, Wyatt D, Hamilton PB. Nephrotoxicity of dietary ochratoxin A in broiler chickens. *Applied Microbiology* 1975; 30: 48-51
57. Storen O, Holm H, Stormer F C. Metabolism of Ochratoxin A by rats. *Applied and Environmental Microbiology* 1982; 44: 785-789

58. 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
59. Prior MG. Mycotoxin determinations on animal feedstuffs and tissues in Western Canada. *Can J Comp Med* 1976; 40: 75-79
60. Golinski P, Hult K, Szczesna J, Chelkowskii J, Kneblewski P, Szebiotko K. Mycotoxic porcine nephropathy and spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in kidney and blood of Polish swine. *Applied and Environmental Microbiology* 1984; 47: 1210-1212
61. Fukui Y, Hoshino K, Kameyama Y, Yashui 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
62. Mortensen HP, Hald B, Larsen AE, Madsen A. Ochratoxin A contaminated barley for sows and pigs. Pig performance and residues in milk. *Acta Agric Scand* 1983; 33: 349
63. Vesela D, Vesely D, Jelinek R. Toxic effects of ochratoxin A and citrinin, alone and in combination on chicken embryos. *Applied and Environmental Microbiology* 1983; 45: 91-93
64. Applegreen LE, Arora RG. Distribution of ¹⁴C-labelled ochratoxin A in pregnant mice. *Food Chem Toxicol* 1983; 21: 563-568
65. Ballinger MB, Philips TD, Kubena LF. Assessment of the distribution and elimination of ochratoxin A in the pregnant rat. 1. *Food Safety* 1986; 8: 11-24
66. Patterson DSP, Roberts BA, Small BJ. Metabolism of ochratoxins A and B in the pig during early pregnancy and the accumulation in body tissue of ochratoxin A only. *Food Cosmet Toxicol* 1976; 14: 439
67. Rutqvist L, Bjorklund N E, Hult K, Hokby E, Carlsson B. Ochratoxin A as the cause of spontaneous nephropathy in fattening pigs. *Applied and Environmental Microbiology* 1978; 36: 920-25
68. Waren MF, Hamilton PB. Inhibition of the glycogen phosphorylase system during ochratoxicosis in chickens. *Appl Environ Microbiol* 1980; 40: 522
69. Skaug MA. Levels of ochratoxin A and IGG against conidia of *Penicillium verrucosum* in blood samples from healthy farm workers. *Ann Agric Environ Med* 2003; 10: 73-77
70. Thuvander A, et al. Dietary intake of some important mycotoxins by the Swedish population. *Food Additives and Contaminants* 2001, 696-706

71. Krogh P, Hald B, Plestina R, Ceovic S. Balkan (endemic) nephropathy and food-borne ochratoxin A: Preliminary results of a survey of foodstuff. *Acta Path Microbiol Scand* 1977; 85: 238-240
72. Golinski P, Hult K, Szczesna J, Chelkowskii J, Szebiotko K. Spontaneous occurrence of ochratoxin A in porcine kidney and serum samples in Poland. *Applied and Environmental Microbiology* 1985; 49: 1014-1015
73. Pavlovic M, Plestina R, Krogh P. Ochratoxin A contamination of foodstuffs in an area with Balkan (endemic) nephropathy. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1979; 87: 243-246
74. Hult K, Plestina R, Habazin-Novak V, Radic B, Ceovic S. Ochratoxin A in human blood and Balkan endemic nephropathy. *Arch Toxicol* 1982; 51: 313-321
75. Petkova-Bocharova T, Chernozemsky IN, Castegnaro M. Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. *Food Addit Contam* 1988; 5: 299-301
76. Castegnaro M, Chernozemsky I. Endemic nephropathy and urinary tract tumors in the Balkans *Cancer Research* 1987;47: 3608-3609
77. Xiao, H, Marquardt R R, Frohlich A, Philips G D, Vitti T G. Effect of hay and grain diet on the rate of hydrolysis of ochratoxin A in the rumen of sheep. *J Anim Sci* 1991; 69: 3706-3714
78. Hohler D, Sudekum K H, Wolfram S, Frohlich A A, Marquardt R R. Metabolism and Excretion of ochratoxin A fed to sheep. *J Anim Sci* 1999; 77: 1217-1223
79. Kiesling KH, Petterson H, Sandholm K, Olsen M. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1984; 47: 1070-1073
80. Ribelin W E, Fukushima K, Still P E. The toxicity of ochratoxin to ruminants. *Can J Comp Med* 1977; 20: 172
81. Hult K, Teiling A, Gatenbeck S. Degradation of ochratoxin A by a ruminant. *Appl Environ Microbiol* 1976; 32: 443-444
82. Hansen CE, Dueland S, Drevon CA, Stormer FC. Metabolism of ochratoxin A by primary cultures of rat hepatocytes. *Applied and Environmental Microbiology* 1982; 43: 1267-1271
83. Blesa J, et al. Rapid determination of ochratoxin A in cereals and cereal products by liquid chromatography *Journal of Chromatography* 2004; 127-131

84. Suzuki S, Satoh T, Yamazaki M. The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats. *Jpn J Pharmacol* 1977; 27: 735-744
85. Nip WK, Chu FS. Fate of ochratoxin A in goats. *J Environ Sci Health* 1979; 14: 319-33
86. Bauer J, Gareis M. Ochratoxin A in food chain. *J Vet Med* 1987; 613-627
87. Düzgüneş O. İstatistik Metodları. Ankara üniv. Ziraat Fak. Yayın No: 578 Ankara 1975
88. Breitholtz AM, Olsen M, Dahlback ASA, Hult K. Plasma ochratoxin A level in three Swedish populations surveyed using an ion pair HPLC technique. *Food Addit. Contam* 1991; 8: 183
89. Maquardt RR, Frohlich AA, Sreemannarayana O, Abramson D, Bernatsky, A. Ochratoxin A in blood from slughter pigs in Western Canada *Can J Vet Res* 1988; 52:186
90. Karagözü N, Karapınar M. Bazı tahıl ürünlerinde Okratoksin A ve fungal kontaminasyon. *Tübitak Journal of Biol.* 2000; 24: 561-572
91. Baydar T, Engin A B, Girgin G, Aydın S, Şahin G. Aflatoxin and ochratoxin in various types of commonly consumed retail ground samples in Ankara, Turkey. *Ann Agric Environ Med* 2005; 12: 193-197
92. Birzele B, Parange A, Kramer J. Deoxynivalenol and ochratoxin A in German wheat and changes of level in relation to storage parameters. *Food Additives and Contaminants* 2000; 17: 1027-1035
93. Boudra H, Bars P, Bars J. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 1995; 61: 1156-1158
94. Bacon C B, Sweeney J G, Robbins J D, Burdick D. Production of penicillic acid and ochratoxin A on poultry feed by *Aspergillus ochraceus*: temperature and moisture requirements. *Applied Microbiology* 1973; 26: 155-160
95. Sonal S, Oruç H H. Bursa bölgesindeki tavuk çiftliklerinden sağlanan yemlerde mikotoksin düzeyleri. *YYÜ Vet Fak Derg* 2000; 11: 1-6

ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Ankara'da doğdu. İlk orta ve lise öğrenimini tamamladıktan sonra 1988 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 1993 yılında tamamlayarak aynı yıl Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimine başladı. 1998 yılında doktora eğitimini tamamladıktan sonra halen görev yaptığı T.C. Kara Kuvvetleri Komutanlığı'na muvazzaf subay olarak atandı.