

**KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEFİRİN *İN VİVO* ORTAMDAKİ AFLATOKSİN DETOKSİFİKASYONUNDA
ANTİOKSİDAN SAVUNMA İLE GSTM1 VE GSTT1 GEN EKSPRESYON
PROFİLLERİNE ETKİSİ**

**Arş. Gör. Barış ÖZTÜRK
Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı**

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Abamüslüm GÜVEN**

2009- KARS

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ

SAGLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEFİRİN *İN VİVO* ORTAMDAKİ AFLATOKSİN DETOKSİFİKASYONUNDA
ANTİOKSİDAN SAVUNMA İLE GSTM1 VE GSTT1 GEN EKSPRESYON
PROFİLLERİNE ETKİSİ**

Arş. Gör. Barış ÖZTÜRK

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Abamüslüm GÜVEN

**Bu çalışma, KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Yönetim Kurulu
Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.**

Proje No: 2007-VF-016

2009- KARS

T.C
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Araş. Gör. Barış ÖZTÜRK tarafından hazırlanmış olan *Kefirin in vivo Ortamdaki Aflatoksin Detoksifikasyonunda Antioksidan Savunma ile GSTM1 ve GSTT1 Gen Ekspresyon Profillerine Etkisi* adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek cybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:19/01/2009

Adı Soyadı

İmza

Başkan : Prof. Dr. Abamüslüm GÜVEN

Üye : Doç. Dr. M. Seyit MERCANLIGİL


Üye : Doç. Dr. Hakan KOCAMIŞ

Üye : Doç. Dr. Mehmet ELMALI

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nebahat Bilge ORAL



Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
26.10.2009 gün ve ...02/20.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Hakan KOCAMIŞ
Enstitü Müdürü Y.


ÖNSÖZ

Sağlıklı beslenme toplum sağlığının vazgeçilmez bir ögesi olduğu gibi kaliteli ve uzun yaşamın da önemli bir koşuludur. Mikrobiyolojik ve kimyasal kirlenmelere maruz kalan besinler hem besin ögesi değerini yitirmekte hem de birçok hastalığa zemin hazırlamaktadır. Son yüzyılın en önemli hastalıklarından biri olan kanserin nedenlerinin başında hatalı ve dengesiz beslenme gelmektedir. Gıdaların uygun olmayan ortamlarda depolanması ve hatalı yöntemlerle pişirilmesi başta karaciğer kanseri olmak üzere birçok komplikasyona zemin hazırlayan aflatoksinler ve heterosiklik aminler gibi karsinogenlerin oluşmasına neden olmaktadır. Son yıllarda bu konularda yapılan çalışmalar, olumsuz etkileri uzun yıllar sonra ortaya çıkan ve gen mutasyonlarına sebep olan bu tip karsinogenlerin etkisini tamamen ortadan kaldırmayı veya azaltmayı amaçlamaktadır. Özellikle aflatoksinler gibi doğal yolla sentezlenen karsinogenlerin detoksifikasyonu konusunda yapılan araştırmaların sayısında bir hayli artış olmasına rağmen bu toksinlerin etkisini tamamen ortadan kaldırma veya etkisini azaltma konusunda kesin bir başarı sağlanamamıştır. Aflatoksinlerin biyolojik yöntemlerle detoksifikasyonu konusunda geçmişten günümüze yapılan araştırmalarda laktik asit bakterileri ve probiyotik bakterileriyle büyük başarılar elde edilmiştir. Fonksiyonel gıdalar ve kefir gibi probiyotik içerikli besinlerin popüler olduğu günümüzde kefirin sağlık açısından sayısız yararları ortaya atılmış fakat bu konudaki araştırmalar sınırlı kalmıştır.

Moleküler tekniklerin ilerlemekte olduğu günümüzde insan genomu büyük oranda deşifre edilmiş ve bu gelişmelerin beslenme biliminin lehine kullanılması ile moleküler nutrisyon, nutrigenetik ve nutrigenomik adlı bilim dalları günümüz ve gelecek yüzyıla yönelik tıbbi beslenme tedavisine farklı bir bakış açısı kazandırmıştır. Probiyotik mikroorganizmalarla birlikte birçok yararlı organik bileşikleri içeren kefir içeceğinin antikanserojenik, antimutajenik etkilerini kanıtlamak amacıyla gerçekleştirilen bu tez çalışmasının aflatoksin gibi karsinogen ve mutajenlerin in vivo biyolojik

detoksifikasyonu konusuna bir katkı sağlamasını ve bu konudaki yeni çalışmalara ışık tutmasını diliyorum.

Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince bilimsel bakış açısını yaşamımın bir parçası haline getirmemi sağlayan danışman hocam Kafkas Üniversitesi (KAÜ) Rektörü Prof.Dr. Abamüslüm GÜVEN'e sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca tüm çalışmalarım ve akademik eğitimimde büyük katkılar sağlayan değerli hocam Doç.Dr. Murat GÜLMEZ'e, çalışmalarım ve eğitimimde emek sahibi olan Yrd.Doç.Dr. Leyla VATANSEVER ve Yrd.Doç.Dr. Nebahat Bilge ORAL'a; biyokimyasal analizlerdeki desteğinden dolayı Yrd.Doç.Dr. Aysel GÜVEN'e; PCR çalışmalarım ve bilgilerini esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. Hasan ÖZEN ve Yrd.Doç.Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'e; Histopalojik çalışmalarda desteğini esirgemeyen Doç.Dr. Kadir ÖZCAN ve Yrd.Doç.Dr. Musa KARAMAN'a; Planlama aşamasında bana kapılarını açan ODTÜ öğretim üyesi Prof.Dr. Meral YÜCEL ve Dr. Remziye YILMAZ'a; çalışma arkadaşlarım Yrd.Doç.Dr. Çiğdem SEZER ve Dr. Berna Duman AYDIN'a; Deneysel çalışmaların başından beri birlikte olduğumuz Arş.Gör. Turgay DEPREM ve Öğr. Gör. Seyit Ali BİNGÖL'e; ekonomik desteğinden dolayı KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Yönetim Kurulu Başkanlığı'na; Çalışmalarım ve emeklerini esirgemeyen arkadaşlarım Arş.Gör. İnan KAYA ve Bio. Kadir ALKIŞ'a; tezimin istatistiksel analizlerindeki katkısı ve psikolojik desteğinden dolayı eşim Arş. Gör. Ebru ÖZTÜRK'e ve adını yazamadığım emek sahibi tüm insanlara sonsuz teşekkürlerimi sunmaktan gurur duyuyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

SİMGELER	AÇIKLAMA
μ	Mü (Mikro)
μg	Mikrogram
A	Ay
Ca	Kalsiyum
D	Dakika
G	Gram
G	Gün
K	Potasyum
Kg	Kilogram
Mg	Miligram
Mg	Mağnezyum
N	Saniye
Ng	Nanogram
P	Fosfor
Pg	Pikogram
Ppb	Milyarda kısım
Ppm	Milyonda kısım
R_f	Alıkonma faktörü
S	Saat
Y	Yıl
A	Alfa
ζ	Zeta
θ	Teta
σ	Sigma
Ω	Omega
Π	Pi

KISALTMALAR	AÇIKLAMA
Ach	Asetil kolin
AFB1	Aflatoksin B ₁
AFB1-N7-Gua	8,9-dihidro-8-(N ⁷ -guanil)-9-hidroksiAFB ₁
AFB2	Aflatoksin B ₂
AFBO	AFB ₁ -8,9-epoksit
AFG1	Aflatoksin G ₁
AFG2	Aflatoksin G ₂
AFL	Aflatoksikol
AFM1	Aflatoksin M ₁
AFP1	Aflatoksin P ₁
AFQ1	Aflatoksin Q ₁
ALP	Alkalin fosfataz
ALT	Alanin aminotransferaz
ASP	Asit fosfataz
AST	Aspartat amino transferaz
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzoic acid
CYP450	Sitokrom P450
DCM	Diklorometan
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDB	Etilendibromid
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FAO	Dünya Tarım Örgütü
FAPY	Formadoprimidine
FMN	Riboflavin-5'-fosfat
GGT	Gammaglutamil transferaz
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon S transferaz
GSTM1	Glutasyon S transferaz M1
GSTT1	Glutasyon S transferaz T1
HBV	Hepatit b virüsü

HCC	Hepatosellüler Karsinoma
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu
IgA	İmmün globülin A
LDH	Laktik dehidrogenaz
MDA	Malondialdehit
MeC	Metilklorid
mEH	Mikrosomal epoksit hidrolaz
Mel	Metiliodid
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
NADP	Nikotinamid dinükleotid fosfat
NF	Nükleaz free
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
PDE	Nükleotid fosfodiesteraz
PHS	Prostaglandin-H-sentetaz
PNBC	P-nitrobenzil klorid
PNPB	P-nitrofenetil bromid
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
SGOT	Serum glutamik oksala asetik transaminaz
SGPT	Serum glutamik piruvik transaminaz
ST	Sülfotransferaz
TBA	Thiobarbutirik Asit
TCA	Triklor Asetik Asit
TLC	İnce tabaka kromatografi
TP53	Tümör supresör gen
UDP-GT	UDP-glukronosil-transferaz
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

İÇİNDEKİLER

Tablo Dizini	I
Şekil Dizini.....	III
Grafik Dizini	IV
Resim Dizini	V
1. Giriş ve Genel Bilgiler	1
1.1. Aflatoksinlerin Yapısı ve Sentezi.....	4
1.2. Aflatoksinlerin Emilimi ve Metabolizması	5
1.2.1. Faz I Metabolizma (Aktivasyon)	6
1.2.2. Faz II Metabolizma (Detoksifikasyon).....	8
1.3. Aflatoksinlerin İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri	14
1.4. Aflatoksinlerin Biyolojik Detoksifikasyonu	21
1.4.1. Kefirin Tarihçesi ve Etki Mekanizması.....	25
1.4.2. Kefirin Antimutajenik ve Antitümör Aktivitesi	27
2. Materyal Ve Metot.....	32
2.1. Materyal	32
2.1.1. Deney Hayvanı Materyali	32
2.1.3. Aflatoksin B ₁	33
2.1.4. Kefir.....	33

2.1.5.	Kullanılan Kitler Ve Kimyasal Malzemeler.....	34
2.1.5.1.	Otoanalizör Kitleri	34
2.1.5.2.	Spektrofotometrik Analizler İçin Kullanılan Kimyasal Malzemeler ..	34
2.1.5.3.	Moleküler Analizlerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler	36
2.1.7.	Kullanılan Gen Primerleri	38
2.1.7.1.	GSTM1 Gen Primeri	39
2.1.7.2.	GSTT1 Gen Primeri	40
2.1.8.	Kullanılan Alet ve Ekipmanlar	41
2.2.	Metot.....	42
2.2.1.	Farelerde Canlı Ağırlık Ölçümü	42
2.2.2.	Karaciğer ve Kan Örneklerinin Alınması.....	42
2.2.3.	Biyokimyasal Analizler.....	43
2.2.3.1.	ALT, AST, LDH ve Albümin Analizleri	43
2.2.3.2.	MDA Analizi	43
2.2.3.3.	GSH Analizi	45
2.2.3.4.	Doku Protein Miktarı Tayini.....	46
2.2.3.5.	GST Aktivite Ölçümü	47
2.2.4.	GSTM1 ve GSTT1 Gen Ekspresyon Analizleri.....	47
2.2.4.1.	Total RNA İzolasyonu.....	47
2.2.4.2.	mRNA Eldesi	49
2.2.4.3.	cDNA Eldesi	51

2.2.4.4.	Primer ve Mastermiks Hazırlanması	51
2.2.4.5.	Jel Hazırlama	52
2.2.4.6.	Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Jelde Koşturulması	53
2.2.5.	Histopatolojik Analizler	54
2.2.6.	İstatistik Yöntem	55
3.	Bulgular	56
3.1.	Farelerin Canlı Ağırlık Bulguları	56
3.2.	Biyokimyasal Bulgular	58
3.2.1.	Serum AST, ALT ve LDH Bulguları	58
3.2.2.	Serum Albumin Bulguları	61
3.2.3.	Lipit Peroksidasyon Bulguları	63
3.2.4.	Antioksidan Enzim Bulguları	64
3.3.	Gen Ekspresyon Bulguları	67
3.3.1.	GSTM1 Gen Ekspresyon Bulguları	67
3.3.2.	GSTT1 Gen Ekspresyon Bulguları	70
3.4.	Histopatolojik Bulgular	73
4.	Tartışma ve Sonuç	81
5.	Özet	91
6.	Summary	92
7.	Kaynaklar	93
8.	Özgeçmiş	111

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Gruplara Göre Deneysel Uygulamalar ve Beslenme Şekilleri	32
Tablo 2: Spektrofotometrik Analizlerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler	35
Tablo 3: Moleküler Analizlerde Kullanılan Malzemeler	36
Tablo 4: GSTM1 Geninin Moleküler ve Kimyasal Özellikleri.....	39
Tablo 5: GSTM1 Geninin Moleküler ve Kimyasal Özellikleri.....	40
Tablo 6: Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	41
Tablo 7: Deney öncesi ve sonrası ağırlık aritmetik ortalama ve standart sapma değerleri	56
Tablo 8: Deney öncesi ve sonrası ağırlıkların Anova sonuçları	57
Tablo 9: AST, ALT ve LDH Ortalama ve Standart Sapma Değerleri	59
Tablo 10: AST Bulguları İçin Deneysel Uygulamaların Kruskal Wallis H-Testi Sonuçları	59
Tablo 11: ALT Bulguları İçin Deneysel Uygulamaların Kruskal Wallis H-Testi Sonuçları	60
Tablo 12: LDH Bulguları İçin Deneysel Uygulamaların Kruskal Wallis H-Testi sonuçları	61
Tablo 13: Serum Albümin Ortalama ve Standart Sapma Değerleri	62
Tablo 14: Albümin Bulguları İçin Deneysel Uygulamaların Kruskal Wallis H-Testi sonuçları	62
Tablo 15: MDA Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.....	63
Tablo 16: MDA Bulguları İçin Deneysel Uygulamaların Kruskal Wallis H-Testi Sonuçları	63
Tablo 17: GSH ve GST Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.....	64
Tablo 18: GSH Bulguları İçin Deneysel Uygulamaların Kruskal Wallis H-Testi Sonuçları	65
Tablo 19: GST Bulguları İçin Deneysel Uygulamaların Kruskal Wallis H-Testi Sonuçları	65

Tablo 20: GSTM1 ve β -Aktin Dansitometre Ortalama ve Standart Sapma Değerleri	67
Tablo 21: GSTM1 ve β -aktin Gen Ekspresyon Bulguları İçin Deneysel Uygulamaların Kruskal Wallis H-Testi Sonuçları	69
Tablo 22: GSTT1 ve β -Aktin Dansitometre Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.....	70
Tablo 23: GSTT1 ve β -aktin Gen Ekspresyon Bulguları İçin Deneysel Uygulamaların Kruskal Wallis H-Testi Sonuçları	72

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Aflatoksinlerin toksikokinetiği	5
Şekil 2: AFB ₁ Biyotransformasyonuna Genel Bakış	7
Şekil 3: AFB ₁ -Glutasyon Konjugasyonunun Metabolik yolu	9
Şekil 4: Glutasyonun kimyasal yapısı	10
Şekil 5: Aflatoksin-GSH Konjugasyonu.....	11
Şekil 6: İnsan 1. Kromozomu ve GSTM1-GSTM5 Lokusu (a), μ Sınıfı Glutasyon S-Transferazlar ve GSTM1 Geni Ekzon ve İntron Bölgeleri (b)....	12
Şekil 7: Aflatoksinlerin Metabolik Etkileri	16
Şekil 8: 8,9-dihidro-8(N7-guanil)-9-hidroksi-AFB ₁	17
Şekil 9: AFB ₁ -FAPyr Halkasının Kimyasal Yapısı.....	18
Şekil 10: Kefirin Oral Alımı ile Gerçekleşen Antiproliferatif Mekanizma.....	29
Şekil 11: GSTM1 gen sekansı	39
Şekil 12: GSTT1 Gen Sekansı	40
Şekil 13: GSTM1 Dansite eğrilerinin kontrol genlerle karşılaştırılması	68
Şekil 14: GSTT1 Dansite eğrilerinin kontrol genlerle karşılaştırılması	71

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 1: GSH Standart Eğrisi.....	45
Grafik 2: Albümin Standart Eğrisi.....	46
Grafik 3: Ağırlık değişim grafiği	57
Grafik 4: MCF-7 (A) ve kefir ekstraktı ile tedavi edilmiş HMEC tümör hücrelerinde GSH konsantrasyonlarının karşılaştırılması.....	86

RESİM DİZİNİ

Resim 1: Kefir Taneleri.....	26
Resim 2: Doku Homojenizatında RNA ve DNA'nın Görünümü.....	48
Resim 3: RNA'nın Pelet Şeklinde Görünümü	49
Resim 4: Tüplerden Alkolün Uzaklaştırılması	49
Resim 5: PCR Sistemi.....	50
Resim 6: Jel Dökme İşlemi.....	53
Resim 7: Kalıbın Jel Elektroforez Tankına Yerleştirilmesi	53
Resim 8: Örneklerin Jeldeki Kuyucuklara Yüklenmesi	54
Resim 9: Jel Elektroforez Sistemi.....	54
Resim 10: GSTM1 ve Kontrol (β -aktin) Gene Ait Jel Görüntüsü.....	67
Resim 11: GSTT1 ve Kontrol (β -aktin) Gene Ait Jel Görüntüsü	70
Resim 12: Kontrol Grubundaki Bir Farede Normal Karaciğer Histolojisi, x185, H.E.	73
Resim 13: Kefir Grubundaki Bir Farede Normal Karaciğer Histolojisi, x185, H.E.	73
Resim 14: Sadece Aflatoksin Verilen Bir Farede Karaciğerde Şiddetli Derecede Hidropik Dejenerasyon İle Midzonal Bölgede Fokal Nekroz, x185, H.E.	74
Resim 15: Sadece Aflatoksin Verilen Bir Farede Hepatositlerde Perisentral Yerleşimli Vakuol Oluşumları, x370, H.E.....	75
Resim 16: Sadece Aftoksin Verilen Bir Farenin Karaciğerinde Midzonal Bölgede Fokal Nekroz (N), x185, H.E.	75
Resim 17: Sadece Aftoksin İle Birlikte Kefir Verilen Bir Farenin Karaciğerinde Hafif Derecede Hidropik Dejenerasyonu, x92, H.E.	76
Resim 18: Sadece Aftoksin İle Birlikte Kefir Verilen Bir Farenin Karaciğerinde Hafif Derecede Hidropik Dejenerasyonun Yakın Görünümü, x185, H.E.	77
Resim 19: Kontrol Grubundaki Bir Farede Böbreğin Normal Histolojik Görünümü, x370, H.E.....	77

Resim 20: Kefir Grubundaki Bir Farede Böbreğin Normal Histolojik Görünümü, x370, H.E.....	78
Resim 21: Sadece Aflatoksin Verilen Bir Farede Böbrek Tubuluslarında Orta Derece Hidropik Dejerasyon ve Tek Tük Epitellerde Nekroz, İntertubuler Bölgede Hiperemi, x370, H.E.....	79
Resim 22: Aflatoksin İle Birlikte Kefir Verilen Bir Farenin Böbreğinde Hafif Derecede Hidropik Dejenereasyon Ve İntertubuler Bölgede Hiperemi x370, H.E.	80

1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

Mikotoksinler, insanlarda ve hayvanlarda toksik, kanserojenik, mutajenik, teratojenik ve östrojenik etkiler gösteren ikincil fungal metabolitlerdir. Mikotoksinlerin insan ve hayvan sağlığı üzerinde sergilediği toksik etkiler mikotoksikozis olarak adlandırılmıştır (112, 120, 154). Bu toksinlerin biyolojik özellikleri ve canlılar üzerindeki etkilerindeki farklılıklar, farklı kimyasal yapılar sergilemeleriyle açıklanmıştır (105). Mikotoksinler ilk kez 1960'da İngiltere'de mikotoksinle kontamine yerfıstığı tüketen hindilerin toplu ölümüyle keşfedilmiş ve literatüre "Turkey X hastalığı" olarak geçmiştir (120). Bundan sonra yapılan çalışmalar, aflatoksinlerin dünyanın birçok bölgesinde gıda zincirlerini etkileyen potansiyel bir kanserojen olduğunu ortaya koymuştur (153). İlk mikotoksikozis vakalarının bildirilmesinin ardından 300'den fazla fungal metabolitin insan ve hayvanlar için toksik olduğu ve aflatoksinle maruz kalmanın insanlarda Kwashiorkor ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (49, 100).

Aflatoksinler mikotoksinlerin başlıca *Aspergillus Flavus*, *A. Paraciticus* ve *A. Nomius* tarafından üretilen sekonder fungal toksik metabolitlerdir (82,116). Aflatoksin B₁ (AFB₁) memeliler için bilinen en güçlü hepatokarsinojen olup, Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne bağlı Uluslararası Kansere Araştırma Kuruluşu (IARC: International Association of Research in Cancer) tarafından 1A kategorisinde kanserojen olarak sınıflandırılmaya alınmıştır. Aflatoksin M₁ (AFM₁) hidroksile AFB₁ metabolitidir ve IARC tarafından grup 2B insan karsinojeni olarak sınıflandırılmıştır (5).

Aflatoksin B₁'in Sitokrom P450 enzim sistemi ile aktive edilerek yüksek reaktif ara ürün olan AFB₁-8,9-epoksit'e dönüştüğü gösterilmiştir ki bu ürün daha sonra DNA'nın guanin kısmına bağlanarak 8,9-dihidro-8-(N⁷-guanil)-9-hidroksiAFB₁(AFB₁-N⁷-Gua)'yı meydana getirir (30, 45). Karsinojenlerin reaktif elektrofilik metabolitlerinin DNA ve diğer hücresel makro moleküllerle kovalent bağ kurması kanser oluşumunun temel basamağıdır (45). Aflatoksinler, insan ve hayvanlarda enzimatik/enzimatik olmayan

antioksidanları azaltarak lipid peroksidasyonuna ve bunun sonucunda da hücre veya dokuda oksidatif hasara neden olurlar (127). Hücredeki non-enzimatik antioksidanların (glutatyon, askorbik asit) ve enzimatik antioksidanların (glutatyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz) düzeyi hücrenin savunma mekanizmasının göstergesidir (25).

DNA, RNA, proteinler, karbonhidratlar ve lipitleri içeren hücrel makro moleküllerin bütünlüğü hücrelerin normal biyolojik özellikleri için önemlidir. Genetik bütünlüğün sağlanması özellikle genetik bilginin yeni hücrelere doğru bir şekilde aktarılması için oldukça önemlidir. DNA'daki herhangi bir moleküler değişiklik mutasyonlara neden olabilir ki bunlar kalıcı ve sonraki kuşaklara aktarılabilen değişikliklerdir. Hücreler şüphesiz ki çevresel kimyasal veya fiziksel ajanlardan kaynaklanan zararlı/ters moleküler değişikliklere verilen yanıtta gen ekspresyon profilleri ile farklılaşırlar/değişirler (55, 97).

Çok küçük miktarda alınmasının bile yukarıda saydığımız olumsuz etkileri tetiklediği bilinen bu kanserojenlerin günlük diyetimizden uzaklaştırılması veya vücuda alınmış olsalar dahi etkilerinin en aza indirilebilmesi birçok araştırmada olduğu gibi bizim de temel amacımızdır. Aflatoksin detoksifikasyonunda kullanılan fiziksel ve kimyasal yöntemler besin değeri kaybı, organoleptik özelliklerin değişmesi ve bazı reaksiyonlar sonucu sağlık açısından istenmeyen öğelerin oluşumu gibi sonuçlar doğurabilir. Tüm bu sebepler araştırmacıları biyolojik yöntemlerin kullanımına yöneltmiştir (11, 123, 148). Kefir içeceği çok eski yıllarda günlük diyetinde yaygın olarak tüketilmiş hatta alternatif tıpta antibiyotik rolünü üstlenmiştir. Buna rağmen Bilim ve Teknolojinin hızlı ilerlemesi karşısında antibiyotiklere yenik düşerek unutulmaya yüz tutmuştur. Fakat son 15-20 yıl içerisinde bilim adamlarının kefir ve diğer fermente süt ürünlerinin olumlu etkileri üzerine yoğunlaşmaları ile birlikte kefir ve içeriğindeki probiyotik mikroorganizmalara olan ilgi tüketicilerin de ilgisini çekmeyi başarmıştır.

Kefir ve diğer fermente süt ürünleri ve içeriğindeki laktik asit bakterileri ile diğer organik bileşiklerin antikanserojenik ve sağlıklı yaşamdaki diğer aktif rolleri konusundaki çalışmaların sayısı hızla artmaktadır. Bununla birlikte bu olumlu etkilerin mekanizması soru işareti olmaya devam etmektedir. Biz de

Çalışmamızda kefir ieinin toksin detoksifikasyonundaki olası rolünü biyokimyasal, fizyolojik, histopatolojik ve moleküler tekniklerle ortaya koymayı ve daha ileri düzeydeki çalışmalara zemin hazırlamayı amaçlamaktayız.

1.1. AFLATOKSİNLERİN YAPISI VE SENTEZİ

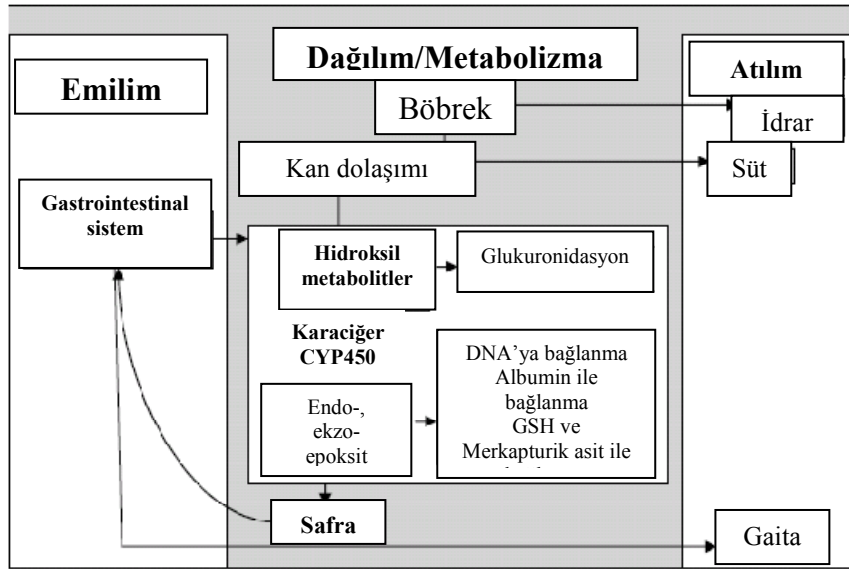
Aflatoksinler iki furan ile bir kumarin halkasına sahip oldukları için kimyasal olarak difurokumarin grubuna dahildirler ve kimyasal yapılarına göre, siklopentan halkası taşıyan **difurokumaro-siklopentan serisi** (AFB₁, AFB₂, AFM₁, AFM₂, AFM_{2A}, Aflatoksikol) ve lakton halkası taşıyan **difurokumarolakton serisi** (AFG₁, AFG₂, AFG_{2A}, AFGM₁, AFGM₂, AFGM₃, AFB₃) olmak üzere iki gruba ayrılırlar (53,139,164). Furan halkasının 8 ve 9. Karbonları arasında doymamış bir çift bağ vardır ve bu bölge yüksek reaktif epoksit yapıda olduğundan biyoaktivasyon için en uygun kısımdır (47, 48).

Aflatoksinler uygun koşullar altında *Aspergillus* türleri tarafından kontamine edilmiş karbonhidrattan zengin özellikle fındık, mısır, pamuk, buğday gibi ürünlerde üretilirler (120). Bunların dışında süt, peynir, fıstık, badem, incir, baharatlar ve diğer gıda ve yem çeşitlerinde bulunmaktadır. Süt, yumurta ve et ürünlerinin de aflatoksin bakımından kontamine olmaları hayvanların aflatoksin içeren yemlerle beslenmesi sonucu gözlenir. Bununla beraber aflatoksin kontaminasyonu bakımından en yüksek riske sahip gıdalar mısır, fıstık ve pamuk tohumudur (39, 107, 132, 162).

Toksin salınımı için küf gelişimi tek başına yeterli değildir. Toksin sentezi nem, ısı, substrat kompozisyonu, diğer mikroorganizmaların varlığı, oksijen ve genetik özelliklere de bağlıdır (28). Toksin gelişimi için %15'in üzerinde nem, 20-30°C sıcaklık ve yeterli oksijen en uygun koşullardır. Bunların yanında ortamdaki karbonhidrat, lipit, protein, A vitamini konsantrasyonları ve pH'ın 5'in üzerinde olması toksin gelişiminin diğer koşulları arasındadır (1, 169).

1.2. AFLATOKSİNLERİN EMİLİMİ VE METABOLİZMASI

Aflatoksinlerin metabolizması emilim, dağılım, biyotransformasyon ve atılım olmak üzere dört aşamada gerçekleşir (Şekil 1). Aflatoksinlerin düşük molekül ağırlıklı ve lipofilik moleküller olduğu için oldukça hızlı emilirler. İnce bağırsağın proksimal yüzeyi kimyasalların emilimi için en optimal kısımdır. Emilen aflatoksin ilk olarak mezenterik venöz kan ile hepatik portal vene geçer ve karaciğere ulaşır (81, 129).



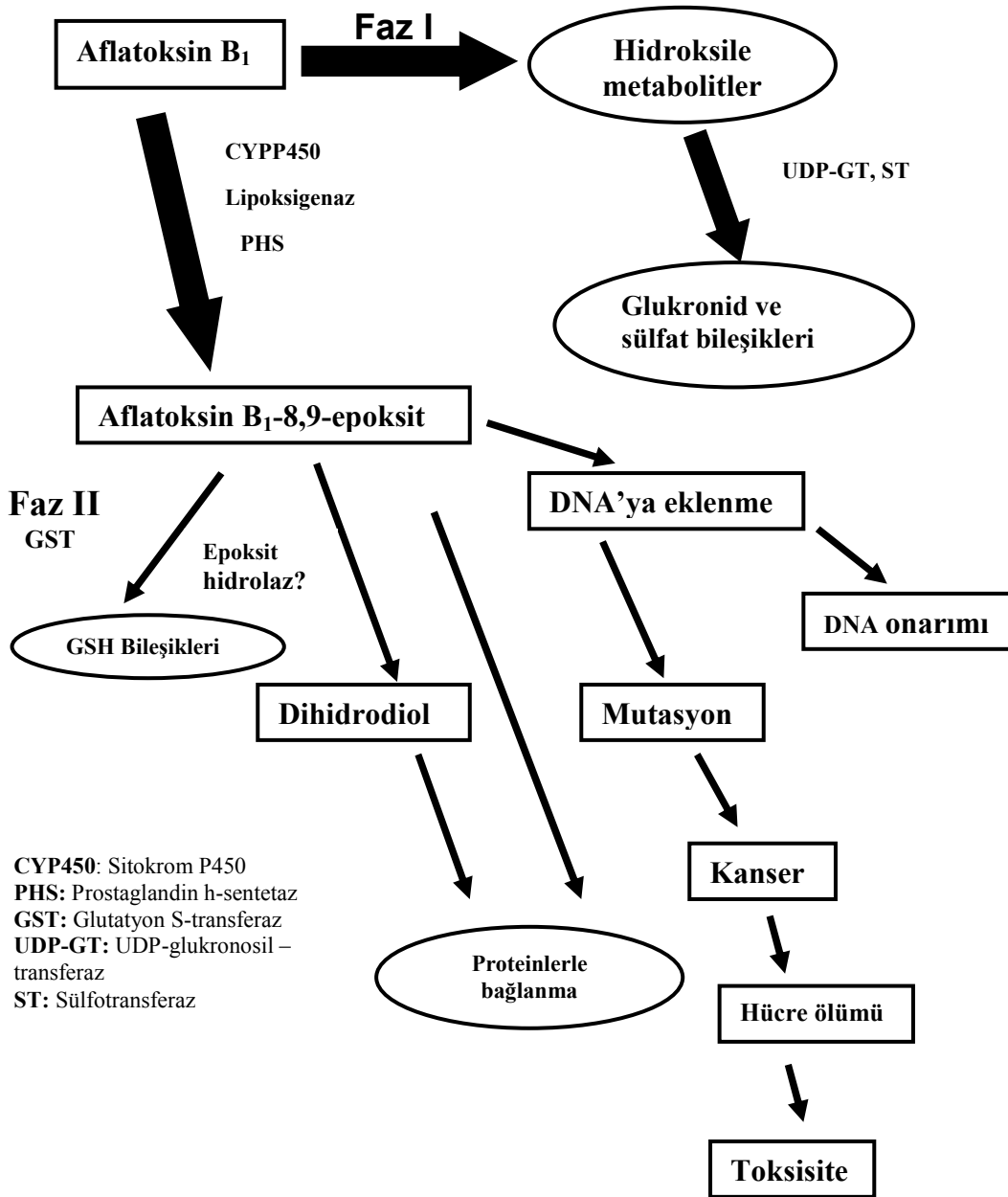
Şekil 1: Aflatoksinlerin toksikokinetiği (125)

Aflatoksinlerin karaciğerde kanserojenik etkisini gösterebilmesi için biyotransformasyona uğramaları gereklidir. AFB₁ metabolizmasının temel ürünleri AFM₁, AFQ₁ ve AFB₁-8,9-epoksit (**AFBO**)'dir. Son ürünler ise birer epoksidasyon ürünü olan AFB₁-endo-8,9-epoksit ve AFB₁-ekso-8,9-epoksit'tir. Sadece, son ürün olan AFB₁-8,9-epoksit genotoksiktir ve çoğunlukla DNA ile bağ yaparak (8,9-dihidro-N⁷-guanil)-9-hidroksi-AFB₁ (**AFB₁-N⁷-Gua**) kompleksini oluşturur (33, 34, 70, 76).

Diğer ksenobiyotikler gibi aflatoksinler de faz I (Aktivasyon) ve faz II (Detoksifikasyon) biyotransformasyona uğrayarak metabolize olurlar. Faz I ve faz II reaksiyonlarının ksenobiyotik metabolizmasındaki amacı, bu bileşiklerin sudaki çözünürlüğünü artırarak idrar veya safra ile vücuttan atımını kolaylaştırmaktır. Faz I reaksiyonda lipofilik ksenobiyotikler daha polar türevlerine dönüşürler ve faz II reaksiyonları ile bu polar metabolitler glukronik asit, sülfat, glutatyon gibi endojen maddelerle bağlanıp vücuttan atılırlar (33). Faz I (Aktivasyon) biyotransformasyon süresince metabolik yola bağlı olarak, AFB₁ ya aktive olur ya da toksisitesi daha düşük bileşiklere dönüşür. Faz II (Detoksifikasyon) metabolik yolda ise farklı transferaz enzimleri faz I metabolitlerinin detoksifikasyon reaksiyonlarını katalize eder (29).

1.2.1. Faz I metabolizma (Aktivasyon)

Aflatoksin metabolizması geniş ölçüde karaciğer ve vücuttaki diğer dokulardaki endoplazmik retikulumdan salınan sitokrom P450 (CYP450) enzimleri aracılığıyla gerçekleşir (Şekil2) (33). Sitokrom P450 enzimleri aflatoksinleri de içeren birçok ksenobiyotiklerin metabolizmasını katalize eden hemaprotein ailesine dahil bir enzim grubudur ve insan sitokrom P450 enzimleri birçok fonksiyona sahip mono-oksijenazlar üst enzim grubuna dahildir. Bu enzimler NADPH-P450 kofaktörlüğünde elektron transfer zincirinde terminal oksidaz vazifesi görürler. İnsan genomu 50'den fazla farklı CYP450 genlerini içerir ve bunlar 10 farklı gruba daha ayrılırlar (6, 90). Bu enzimler yağ asitleri, steroidler ve ksenobiyotiklerin metabolizmasından sorumludurlar. CYP450 ailesinin CYP1, CYP2 ve CYP3 grupları ksenobiyotik metabolizmasında ana rolü üstlenirler. CYP1 ailesinin üyeleri CYP1A1, CYP1A2 ve CYP1B1'dir. CYP1A1 bir dizi PAH (Polisiklik Aromatik Hidrokarbon) metabolizmasından sorumludur. Bu enzimlerin birçoğu polimorfiktir ve farklı metabolik aktivitelerle meydana gelirler. Enzim aktivitelerindeki genetik varyasyonlar endojen kimyasalların karsinogenesisini olumsuz etkileyebilirler (6, 144).



Şekil 2: AFB₁ Biotransformasyonuna Genel Bakış (37)

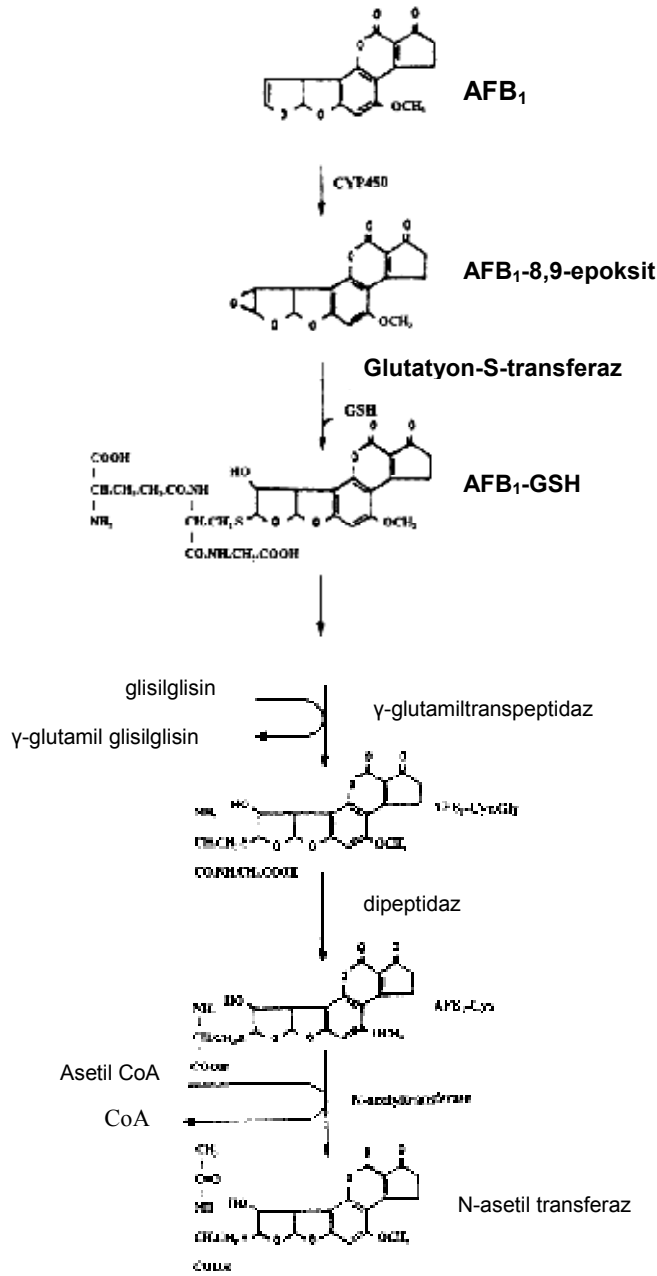
CYP1A2 ve CYP3A4 tarafından oluşturulan yüksek reaktif bileşik olan AFB-ekso-epoksit DNA'daki guanin N⁷ pozisyonuyla kovalent bağ oluşturarak somatik gen bozukluklarına neden olabilir. CYP1A2'nin çeşitli ajanlarla inhibe edilmesi AFB kaynaklı karsinogenesis riskini azaltabilir (54, 121). Aflatoksinlerin faz I biyotransformasyonu mikrosomal sitokrom P450

(CYP450) enzim sistemi tarafından gerçekleştirilerek reaktif **AFB₁-8,9-epoksit (AFBO)**, hidroksile AFB₁ olan **AFM₁** ve **AFQ₁**, O-metilasyon sonucu **AFP₁** indirgenmiş form olan **aflatoksikol** gibi metabolitler meydana gelir ki bu da bir detoksifikasyon reaksiyonudur (33).

1.2.2. *Faz II Metabolizma (Detoksifikasyon)*

AFB₁' in faz I metabolitleri glutatyon-S-transferaz (GST), β -glukronidaz ve sülfat transferaz enzimleri aracılığıyla faz II biyotransformasyona maruz kalarak sırasıyla AFB₁-glutatyon, AFB₁-glukronid ve AFB₁-sülfat bileşikleri meydana gelebilir. Buradaki başlıca AFB₁-epoksit (**AFBO**) formasyonu AFB₁-glutatyon bileşiğidir. Bu konjugasyon (Şekil 3) birçok memelide aktifleşmiş AFB₁'in başlıca detoksifikasyon yoludur (12, 108). AFB₁-epoksit detoksifikasyonunun enzimolojisi çok az bilinmekle birlikte AFBO detoksifikasyonunda GST'nin katalize ettiği glutatyon (GSH) ile konjugasyon önemli bir noktadır. İnsanlarda GST'nin M1-1 izoformu en önemli izoformdur. M1-1, M3-3, P1-1, A1-1 ve A2-2 gibi GST izoformlarının tümü AFBO ile konjugasyon yapma yeteneğine sahiptirler (119, 146).

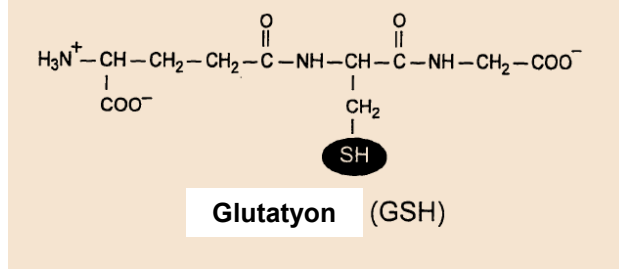
AFB₁ metabolizması 8,9-çift bağın epoksidasyonu, furan ve lakton halkalarının hidrosilasyonu ile beraber dimetilasyonunu içerir ve sonuçta oluşan polar metabolitler glukuronidler, sülfatlar veya GSH ile bağlanırlar. Bu metabolitlerin safra veya idrardan izole edilebilmesi mümkündür. AFB₁-GSH konjugasyonu rat safrasından izole edilen ana metabolit olarak bildirilmiştir (3). AFB₁-GSH bileşiğinin oluşum reaksiyonu AFB₁'in detoksifikasyonu ve AFB₁'in hepatokarsinojenik etkisinin önlenmesi için önemli bir metabolik yoldur. Detoksifikasyonun GST aracılığıyla gerçekleşmesi canlıların AFB₁' e karşı olan direncinin önemli bir göstergesidir (119).



Şekil 3: AFB₁-Glutatyon Konjugasyonunun Metabolik yolu (166)

Glutatyon ile konjugasyon, ksenobiyotikleri de içeren aflatoksin metabolizmasının en önemli basamağıdır. Glutatyon (γ-glutamyl sisteinil glisin), glutamik asit, sistein ve glisinden oluşur ve kısa adı **GSH** olarak bilinir (Şekil 4). Glutatyon molekülündeki sülfidril (-SH), molekülün elektron alışverişi yapan kısmıdır (143). Nükleofilik grup gibi hareket eden bu kısım

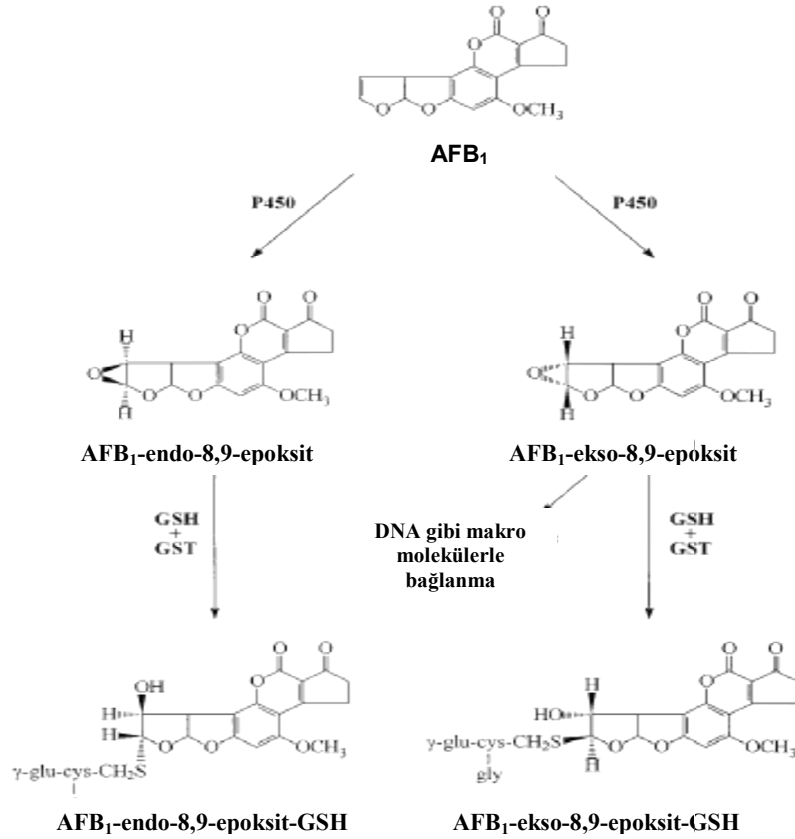
toksik metabolitlerin elektrofilik merkezlerine bağlanarak onları nötralize eder ve suda çözümlü hale getirir (54).



Şekil 4: Glutatyonun kimyasal yapısı (65)

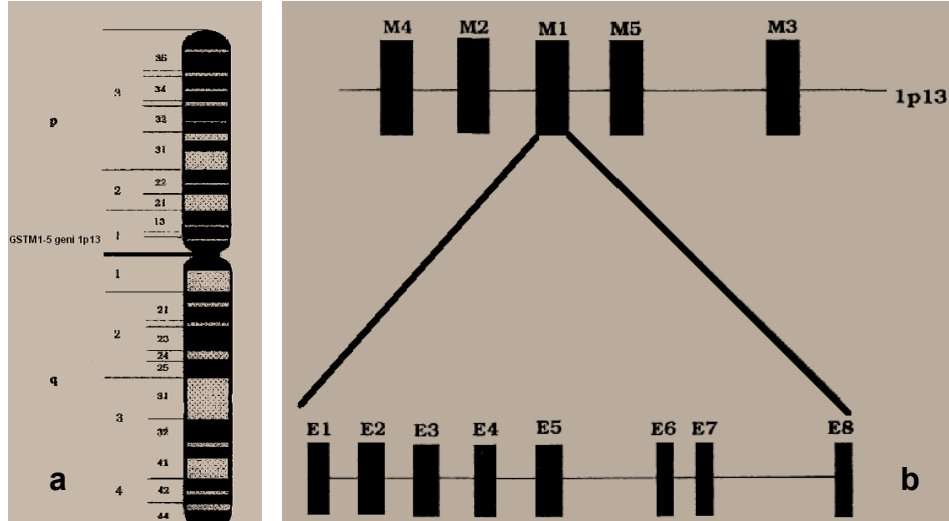
Ksenobiyotikler, GST katalizörlüğünde GSH ile bağlanamama durumunda DNA, RNA veya hücre proteinleri ile kovalent bağ yaparak ciddi hücre hasarlarına yol açabilirler (63, 91). Glutatyon ile ksenobiyotiklerin oluşturdukları bileşikler atılmadan önce glutatyona ait glutamil ve glisin grupları spesifik enzimler tarafından uzaklaştırılırlar ve geri kalan sisteinil kısmının amino grubuna asetil CoA kaynaklı bir asetil grubu eklenir. Bu ileri reaksiyonlar sonucunda meydana gelen bileşik idrarla atılıma uğrayan l-asetil sistein bileşiği olan **merkapturik asittir**. Merkapturik asit endojen toksinler, karsinojenler ve ilaçların metabolizması sonucu oluşan önemli bir atım ürünü olarak tanımlanabilir (58).

AFB₁-GSH ve diğer GSH S- konjugatlarının transportu ATP bağımlı GSH S-konjugat eksport pompası (GS-X pompası) olarak tanımlanan sistem tarafından gerçekleştirilir ki bu sistem faz III ilaç metabolik yolu eliminasyon sisteminin bir bölümüdür. GS-X pompasının diğer organ ve hücre tiplerinde de var olduğu bulunmuştur. Fakat AFB₁-GSH transportundan sorumlu protein veya proteinler fiziksel ve biyokimyasal olarak henüz yeterince tanımlanamamıştır (77, 92).



Şekil 5: Aflatoksin-GSH Konjugasyonu (92)

GST enzimlerini kodlayan genlerin sınıflandırılması primer yapılarına, enzimatik özelliklerine, antikorlarla ilgili reaksiyonlarına, yapısal karakteristiklerine, kimyasal affinitelerine, aminoasit dizilerine ve enzimlerin kimyasal davranışlarına göre yapılmıştır. GST enzim genleri **α (alfa)**, **μ (mu)**, **π (pi)**, **σ (sigma)**, **θ (teta)**, **ζ (zeta)**, **omega (Ω)** ve **mitokondrial** olmak üzere 8 grubu içerisine alan bir üst gruptur. Mitokondrial GST enzimleri kapa-class olarak da adlandırılırlar. **α** 6. kromozomda, **μ** 1. kromozomda, **π** 11. kromozomda, **θ** 22. Kromozomda, **Ω** 10. Kromozomda, **σ** 4. Kromozomda ve **ζ** 14. Kromozomda bulunmaktadır (62, 64, 146). **μ** sınıfı GST'ler (GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4 ve GSTM5) polisiklik aromatik hidrokarbonların epoksit türevlerine karşı gösterdikleri yüksek katalitik aktiviteleri nedeniyle ilgi çekmişlerdir. Bu enzimleri kodlayan genler 1. kromozom üzerindedirler. Genetik polimorfizm gösteren **μ (mu)** sınıfı GSTM1 geni 8 ekson ve 7 introndan oluşmaktadır (117) (Şekil 6).



Şekil 6: İnsan 1. Kromozomu ve GSTM1-GSTM5 Lokusu (a), μ Sınıfı Glutasyon S-Transferazlar ve GSTM1 Geni Ekzon ve İntron Bölgeleri (b) (124).

GST- μ , GSTM1 geni tarafından, GST- θ ise GSTT1 geni tarafından encode edilir. Bu gen bölgelerindeki homozigus delesyonlar (null genotip) enzim eksikliğiyle sonuçlanır ve bundan dolayı detoksifikasyon yeteneği azalır. Çeşitli çalışmalarda GSTM1 genotipinin yokluğunun HCC riskini artırdığı bildirilmiştir. **GST- μ** ve **GST- θ** izomerlerinin glutasyon ile AFB₁-8,9-ekso-epoksit konjugasyonunu en fazla etkileyen izomerler olduğu bildirilmiştir. GSTT1 geninin homozigus delesyonunun Afrika orijinli insanlarda %24-38 oranında olduğu kaydedilmiştir. GSTT1-null genotip ve aflatoksin-albümin konjugasyonu ile kronik hepatit B (HBV) virüsü arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (13, 23).

GSTM1, μ sınıfının bir üyesidir ve genel popülasyonda gen delesyonlarından dolayı yokluğuna yaklaşık %50 oranda rastlanır. GSTM1'in polimorfik ekspresyonu, AFB₁-8,9-epoksit gibi yüksek reaktif epoksitleri inaktive etme yeteneğiyle ilişkilendirilmiştir. Birçok çalışmada GSTM1 null genotip ile akciğer, mesane, larinks ve deri kanseri riskinin artması arasında ilişkiler ortaya konulmuştur. GSTM1 hepatosellüler karsinoma için duyarlı bir gendir. GSTT1 de GSTM1 gibi duyarlıdır. GSTT1 ve GSTM1 GST ailesinin üyeleridir ve harici kimyasalları detoksifiye etme yeteneğine sahiptirler. Bu

genlerin olmaması durumunda detoksifikasyon yeteneği ortadan kalkmaktadır (16, 93).

Yukarıda bahsedilen reaksiyonların ışığında detoksifikasyon enzimleri DNA-toksin formasyonlarını önlerken, DNA onarıcı enzimler gen bütünlüğünü koruyarak genomik mutasyonları ve hücrenel neoplastik transformasyonları önlerler. Çünkü detoksifikasyon enzimlerinin genetik polimorfizmi ve DNA onarıcı enzimler DNA hasarlarını ve gen mutasyonlarını etkileyebilirler, detoksifikasyonun bu dikkate değer noktası ve DNA onarım kapasitesi sık sık insan kanserleri ile ilişkilendirilmiştir.

1.3. AFLATOKSİNLERİN İNSAN SAĞLIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Aflatoksin B₁, identifiye edilen en güçlü genotoksik ve hepatokarsinojenik ajan olarak bildirilmiştir ve çoğunlukla küfle kontamine gıdaların tüketimiyle insan sağlığı açısından risk oluşturur (109). AFB₁, tüm hayvan türlerinde, kuşlarda, balıklarda akut toksisite göstermekle birlikte LD₅₀ düzeyi 0,3-9 mg/kg aralığında değişmektedir. Aflatoksin B₁ alımından 12-24 saat sonra süte AFM₁ olarak salınır (27, 94, 158).

Aflatoksinlerin gıda maddelerinde bulduklarında Hepatosellüler Karsinoma (**HCC**) için risk faktörü olduğu, Hepatit B virüsü (**HBV**) ile etkileşerek karaciğer kanseri modifikasyonunda önemli bir rol oynadığı iyi bilinmektedir. Toksin karaciğerde metabolize olduktan sonra DNA'da guanine bağlanarak TP53 tümör supresör geninin 249. kodonunda mutasyonlara yol açabilir (12, 33, 37).

Aflatoksine maruz kalma ile insanlardaki akut hepatotoksisite arasındaki ilişki konusundaki çalışmalar sınırlıdır. Fakat akut karaciğer hasarı vakaları, akut aflatoksikosis ile ilişkilendirilmiştir (38, 99). Kenya'da Haziran-Temmuz 2004 süresince 317 akut aflatoksikosis vakası bildirilmiş ve bu vakalardan 125'i ölümlle sonuçlanmıştır. Risk faktörleri araştırıldığında mısır örneklerinde aflatoksin konsantrasyonunun 4400 ppb yani tolere edilebilir limit olan 20 ppb'den 220 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Bu salgınların Asya ve Afrika'da periyodik olarak genişlediği bildirilmiştir (7).

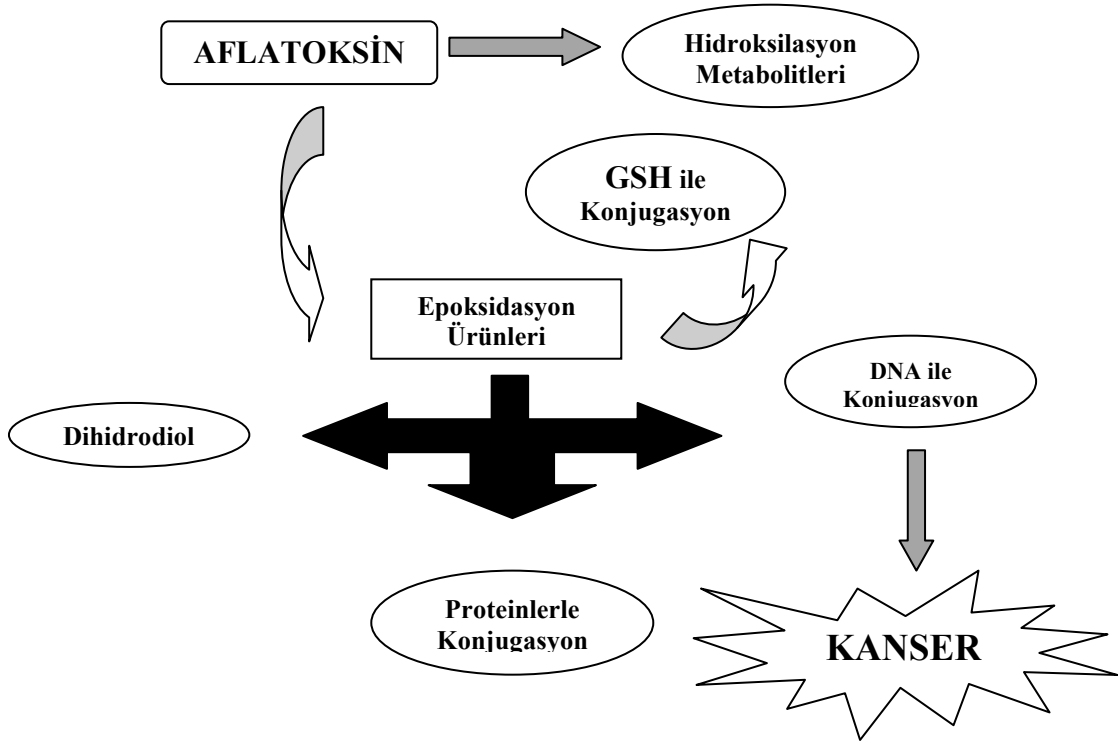
Peracia ve ark. (1999) insanlarda akut gastrointestinal toksisite semptomlarını kusma, diare, yüksek ateş, abdominal ağrı, ödem ve çeşitli gastrointestinal erozyonlar olarak açıklamıştır. Fakat bu etkilerin farmakolojik mekanizması açıklanamamıştır (120). Luzi ve ark. (2002) Guinea domuzlarından izole ileum'da aflatoksinlerin akut etkilerini araştırmışlar ve gastrointestinal etkilerin sebebini sinir terminallerindeki **ACh** (Asetil kolin) stimülasyonuna bağlamışlardır (99).

Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH) ve AFB₁ gibi genotoksik karsinojenlerin kansere sebep olmaları, DNA'daki bazlarla kovalent bağ yapma yeteneklerine bağlanmıştır. Bu gibi bileşiklerin metabolizması hücrel makro moleküllerle reaksiyona girebilme yeteneğine sahip ara ürünler oluşturabilen sitokrom P450 aracılığıyla gerçekleşir. Bu ürünler DNA'daki bazlarla kovalent bağ yaparak karsinojen-DNA bileşiğini oluştururlar. Hasarlı hücreler bu bileşiklere bağlanarak DNA kodlarında mutasyonlara neden olurlar. Aflatoksinlerin metabolik etkileri aşağıdaki gibi sıralanabilir (33, 88, 115, 120).

1. DNA sentezinin, DNA bağımlı RNA polimeraz aktivitesinin, mRNA sentezinin ve protein sentezinin inhibisyonu,
2. Kromozomal bozukluklar, programlanmamış DNA sentezi, kromozom kırıkları,
3. Hipoalbuminemi (Kwashiorkordaki hipoalbuminemiye de aflatoksinlerin sebep olduğu düşünülmektedir),
4. Pıhtılaşma faktörleri sentezinin inhibisyonu,
5. İmmün sistemin baskılanması,
6. Fibrozis ve safra kanalı proliferasyonuna bağlı olarak karaciğerde lipit dejenerasyonu,
7. Çeşitli enzimlerin aktivitelerinin azalması,
8. Glikoz metabolizmasının düzensizliği,
9. Lipit sentezinin (fosfolipitler, serbest yağ asitleri, trigliseritler, kolesterol ve esterleri) inhibisyonu,
10. P53 tümör supresör genlerinin mutasyonu,
11. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu (ROS), mutajenik malondialdehit (MDA) oluşumuyla lipit peroksidasyonu ve hücre hasarları.

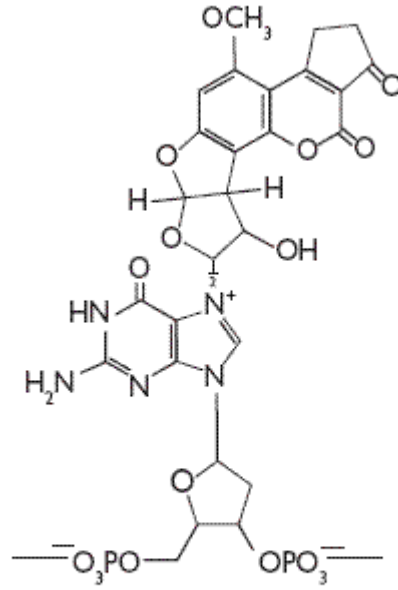
AFB₁-8,9-epoksit hücrel proteinlerle ve nükleik asitlerle kovalent bağ oluşturur. **AFB₁-DNA** bileşiği konsantrasyonları ile insan ve hayvanlardaki karaciğer kanseri arasında doğrusal bir ilişki vardır. Bu ilişki Şekil 7'de özetlenmiştir. AFB₁-epoksitin önemli bir miktarı glutatyon gibi çeşitli endojen

ve ekzojen bileşiklerle bağlanarak zararsız hale getirilebilmekle birlikte toksin ince bağırsaktan emildikten sonra kolayca plazma albümin ile bağlanır (125).



Şekil 7: Aflatoksinlerin Metabolik Etkileri

Reaktif ara ürün oluşumu sitokrom P450 vasıtasıyla 8,9 vinil bağının oksidasyonunu gerektirir ve ara ürün olan AFB₁-8,9-epoksit genotoksik özellik gösterir (71).

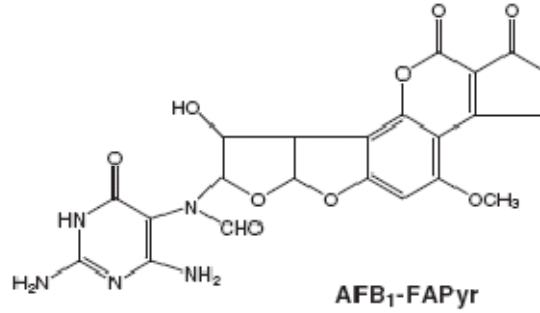


8,9-dihidro-8(N7-guanil)-9-hidroksi-AFB₁
(AFB₁-N⁷-Gua)

Şekil 8: 8,9-dihidro-8(N7-guanil)-9-hidroksi-AFB₁ (66).

AFB₁-N⁷-Gua kompleksi (Şekil 8) stabil değildir ve spontan depürinasyon sonucu apürinik bir kısım meydana gelir, eğer bu hasar onarılmazsa G→T ve G→A mutasyonları meydana gelir. Aflatoksin B₁'e maruz kalmış ratlarda oluşan karaciğer tümörlerinde yapılan çalışmada *ras onkogenlerin* 12. kodonunda G→T, G→A mutasyonları belirlenmiştir. Hepatosellüler karsinomlu insanlarda yüksek düzeyde aflatoksine maruz kalınan bölgelerde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda P53 tümör supresör geninin 249. kodonunda spesifik G→T mutasyonları belirlenmiştir (20). Sonraki reaksiyonda ise hidrolitik form ya abazik kısma alınır (AP) veya hidrolitik reaksiyona maruz kalarak guanindeki imidazol halkası açılarak stabilleşir ve kalıcı formadoprimumine (AFB₁-FAPY) derivatları meydana gelir. AFB₁-N⁷-Gua halkasının açılmasıyla oluşan formlardan en yaygın olarak izole edilmiş olanı **AFB₁-FAPY**'dir (Şekil 9). Ratlara AFB₁ injekte edilmesiyle hepatik DNA'nın yaklaşık %80'inde **AFB₁-N⁷-Gua**, %7'sinde ise

AFB₁-FAPyr oluşumu tespit edilmiştir. Bu formasyonlar, genetik mutasyonların ve tümör oluşumunun ilk göstergesi olarak sayılmaktadır (33).



Şekil 9: AFB₁-FAPyr Halkasının Kimyasal Yapısı (33)

AFB₁-DNA formasyonunun gerçekleşmesi AFB₁ kaynaklı hepatokarsinogenesis başlangıcı için kritik bir adımdır. Bu mekanizma tam olarak anlaşılacakla birlikte, toksisitenin AFB₁'in karaciğerde sitokrom P450 ile metabolizması süresince meydana gelen intrasellüler süperoksit anyon, hidroksil radikal ve hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi reaktif oksijen türlerinden (ROS) kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Bu türler membranlar gibi çözünebilir hücre bileşenlerine hücum eder ve sonuçta hücre fonksiyonları zayıflayarak sitolizis meydana gelir (152).

Hepatosellüler karsinoma gelişimi ile ilişkili majör etiyolojik faktörler, hepatit B ve hepatit C virüsleridir. Bazı çevresel faktörler ise AFB₁, diyet küf kontaminasyonu, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), çevresel kirleticilerdir. Üriner aflatoksin metabolit düzeylerinin ve AFB₁-guanin atımının ölçümü ve plazmada AFB₁-Albümin ölçümü ve karaciğer dokusunda AFB₁-DNA, 4ABP-DNA ve PAH-DNA bileşenlerinin ölçümleri çalışmalarda riskin gösterilmesinde kullanılan kriterler arasındadır (128, 157, 160, 168).

Aflatoksinler hepatik kanserle birlikte malnütrisyon prevalansının yüksek olduğu 3. Dünya ülkelerinde malnütrisyonla ilişkilendirilmiştir (149). Ayrıca aflatoksin ile Reye's Sendromu, kwashiorkor ve akut hepatit arasında da ilişki olduğu bildirilmiştir (100, 156).

Aflatoksinler serum, idrar, böbrek, karaciğer ve akciğerlerden kolaylıkla izole edilebilirler ve konsantrasyona bağlı olarak hastalıkların morbiditesini artırır. Aflatoksinlerin karaciğerin albümin üretme kapasitesini azaltarak kwashiorkor ile ilişkilendirildiği bildirilmiştir (100). Aflatoksin maruz kalan Batı Afrika çocuklarında büyüme ve gelişme önleyici, kilo kaybettirici ve immün sistem fonksiyonlarını baskılayıcı etkilere yol açtığı belirlenmiştir (156).

Alınan toksin düzeyine ve maruz kalma süresine bağlı olarak; aflatoksin alımı ile serum alkalen fosfataz (ALP), gamma glutamil transferaz (GGT), asit fosfataz, laktik dehidrogenaz (LDH), ornitin karbamoil transferaz, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat amino transferaz (AST), lipit peroksidaz ve izositrik dehidrogenaz etkinliği ile serum bilirubin düzeyi artarken, serum protein, protein kaynaklı olmayan azot, üre, hemoglobin ve pıhtılaşma faktörlerinin miktarı önemli ölçüde azalma gösterir (4). Ayrıca süksinat dehidrogenaz, glikoz-6-fosfataz, glutatyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon redüktaz enzim aktivitelerinde de azalma meydana gelir. Serum ALT, AST, ALP, asit fosfataz ve LDH düzeylerindeki artışlar karaciğer hasarının önemli göstergelerindedir. Karaciğer hücrelerindeki lezyonlarda ve parenşimal hücre nekrozlarındaki karaciğer hasarlarında olduğu gibi bu enzimler kan dolaşımına salınırlar (29, 36, 131).

Mitry ve ark. (2000) AFB₁'in ratlarda hepatik fosfotidilinositolkinaz ve protein kinaz-C hücre sinyal sistemlerinin anahtar enzimlerinin aktivitesini stimüle ettiğini bildirmişlerdir. Fosfotidilinositol halkasının stimülasyonu DNA sentezinin aktivasyonuna katkıda bulunur ve AFB₁'in olası toksik ve karsinogenik aktivitesine karşı uyarıcı rol oynar. Ayrıca özellikle akciğerler, dalak, karaciğer, beyin, böbrekler ve kalpteki cAMP ve cGMP hidrolizis enzimlerini de inhibe eder. Muhtemelen siklik nükleotid fosfodiesteraz (PDE)'in da inhibitörüdür. Hücrelik siklik nükleotid düzeylerinin değişiminin aflatoksin aktivitesinde önemli bir yol olduğuna inanılmaktadır (131).

Aflatoksin B₁'in tavşan karaciğeri üzerine olan etkilerinin histopatolojik ve biyokimyasal yöntemlerle araştırıldığı bir çalışmada; AFB₁ birinci gruptaki tavşanlara 5 µg/kg/gün, diğer gruptaki tavşanlara 7,5 µg/kg/gün olarak iki ayrı

dozda 12 hafta süre ile gün aşırı verilmiş, histopatolojik olarak parankimde vakuoler dejenerasyon, güve yeniği şeklinde nekroz görülmüş, portal alan ve çevresinde ise lenfositler ve bazı tavşanlarda eozinofil lökositleri de içeren iltihabi infiltrasyon ve safra duktus proliferasyonu izlenmiştir (147).

Epidemiyolojik çalışmalar, aflatoksin alımı ile hepatit B ve C virüs enfeksiyonlarının karaciğer kanseri ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (110, 146). 2004 yılında Kenya'da 317 akut aflatoksikosis vakasında akut hepatit olduğunu ve 125 ölümün gerçekleştiği bildirilmiştir (7). Epidemiyolojik veriler AFB₁'e maruz kalmış insanlarda CYP3A5 polimorfizmlerinin mutajenik AFB₁-8,9-epoksit düzeyleriyle ilişkili olduğunu (özellikle CYP3A4 düşük bireylerde) ortaya koymuştur (165). İnsanlarda AFB₁-ekso-epoksit'e karşı en yüksek aktiviteyi GST gösterir ki polimorfik hGSTM1-1'in çoğu insan popülasyonunun %50'sinde eksikliğine rastlanmıştır (143).

Arjantin'de karaciğer hastalığı olan 20 vakanın serum örneğinde AFB₁ konsantrasyonu 470 pg/ml olduğu bildirilmiş ve serum aflatoksin-albümin reaksiyonunun varlığı Gambia'da immün sistemi baskılanmış çocukların %93'ün de tespit edilmiştir (152, 161). Çinli yetişkinlerde diyetle AFB₁ alınması ile idrar AFM₁ düzeyleri arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir. HCC tespit edilen bireylerde kontrol grubuna göre idrardaki AFM₁'in 5,8 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. AFB₁'e maruz kalan bazı bireylerin idrarında ise AFQ₁ tespit edildiği rapor edilmiştir (126).

Aflatoksine maruz kalım yaşam boyu etkilidir ve yüksek dozda maruz kalma ile erken süreçte HCC ve büyüme geriliği arasında güçlü bir ilişki kurulmuştur. Gebelik süresince annenin aflatoksine maruz kalması uterusu etkiler ve anne sütünde aflatoksin M₁ görülmesine sebep olur. Aflatoksin-albümin kompleksi, Gambia, Guinea ve Benin gibi Batı Afrika ülkelerinde maruz kalan bireyler için spesifik biomarker olarak bildirilmiş ve bu bireylerin yüksek dozda aflatoksin aldığına işaret edilmiştir (120, 126).

1.4. AFLATOKSİNLERİN BİYOLOJİK DETOKSİFİKASYONU

Üretim ve depolama aşamalarında uygun küf üremesi ve aflatoksin oluşumu engellenemediğinden, araştırmalar gıda ve yem maddelerindeki mevcut aflatoksinin detoksifikasyonu üzerine yoğunlaşmıştır. Bununla birlikte, depolama koşulları ürünleri böceklerden koruyacak, nem artışını önleyecek, rüzgardan ve sıcaklık değişimlerinden etkilenmeyecek şekilde düzenlenmelidir. Ortam sıcaklığındaki ani düşüşler, ürün içinde nem kondansasyonuna neden olmakta, bu da yine ürün içinde “ıslak cep” olarak adlandırılan ıslak noktalar meydana getirmektedir ki, mikotoksinler bu ceplerde hızla gelişebilmektedir (9, 11, 169). Funguslar aerobik mikroorganizmalar oldukları için oksijensiz ortamda iyi gelişemezler. Özellikle patulin ve penisilik asit üretimi düşük oksijen konsantrasyonlarında hızla azalmaktadır. Fungal gelişime imkan vermeyecek şartlarda uzun süre depolama canlı fungus miktarında azalmaya neden olacaktır. Bu nedenle gıdaların depolandıkları atmosferik ortamın kompozisyonu fungus kontrolünde dikkate alınması gereken noktalardan birisidir (11, 106, 116, 145).

Risklerin azaltılmasındaki yaklaşımın gıdalardaki toksin seviyesinin en aza indirilmesi ile mümkün olacağı bildirilmiştir. Gelişmiş ülkelerde katı gıda yönetmelikleriyle başarılmasına rağmen, problemin daha yaygın olduğu gelişmekte olan ülkelerde kontrol ölçümlerinin başarısız olduğu açıkça görülmektedir. Gelişmekte olan ülkelerin yüksek riske sahip bölgelerinde önleyici stratejilerin kesinleştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu stratejilerin güvenli olması, pahalı olmaması teknolojik açıdan uygun olması gerekmektedir (44, 74, 96).

Aflatoksinlerin toksikolojik aktivitesi iki önemli noktadan ileri gelmektedir; bunlar fizikokimyasal ve biyokimyasal karakteristikler olarak tanımlanırlar. İlk nokta furfuran halkasının C:8,9 pozisyonundaki çift bağıdır. DNA-protein interaksiyonları bu noktada gerçekleşir ve bu makro moleküllerin

normal biyokimyasal fonksiyonları değişerek hücresele düzeyde sağlığa zararlı etkilere yol açar. İkinci reaktif grup ise kumarin bileşiklerindeki lakton zinciridir. Lakton zinciri, değredasyon için zayıf bir nokta olması nedeniyle kolaylıkla hidrolize olur. Buradan yola çıkarak değredasyon işlemlerinde temel amaç terminal furan halkasındaki çift bağın yok edilmesi veya lakton zincirinin parçalanmasıdır. Lakton zincirinin açılması terminal furan halkasının DNA ve proteinlerle etkileşiminin önüne geçer. Bu reaksiyonlar sonucunda AFB₁, aflatoksin Q₁, P₁, D₁, B_{2a}, B_{1S}, G₁ ve B₂' ye indirgenerek toksisitesi azalır (106, 108, 118, 133).

Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) gibi laktik asit bakterileri suşlarının biyolojik detoksifikasyon amacıyla kullanımı çok idealdir. Çünkü bu tip bakterilerin oral olarak kullanımı mümkün olan probiyotiklerdendir. LGG ve diğer birçok laktik asit bakterileri probiyotik özellikle olduklarından insan gastrointestinal sistemi için çok yönlü yararlar sağlarlar ve bunların sağlıklı diyetlerde güvenle kullanımları çok eskiye dayanır. Çeşitli çalışmalarda probiyotiklerin aflatoksinleri degrade ettikleri bildirilmiş olsa da bu konuda çok yönlü *in vivo* çalışmalara gereksinim vardır (85, 86, 111, 118).

El-Nezami ve ark. (1998) probiyotik laktobasillerin aflatoksinleri kontamine sıvı medyumdan uzaklaştırdığını göstermişlerdir. Bu olayın toksinin bakteri hücre duvarına hapsedilerek metabolik yıkımlanmasının gerçekleştiği şeklinde olduğu düşünölmektedir (42). Bu mekanizma henüz anlaşılmamakla birlikte Haskard ve ark. (2000) canlı bakterinin hücre duvarındaki protein ve karbonhidrat komponentlerinin etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir (60). Günümüzdeki çalışmalar probiyotiklerin aflatoksin bağlayıcı etkisini daha çok desteklemekte ve Avrupa Gıda Endüstrisinde süt ve probiyotik kültürlerin kullanıldığı aktarılmaktadır (41, 46, 118). Bazı araştırmacılar ise laktik asit bakterilerinin aflatoksin biyosentezini inhibe ettiğini fakat kontamine ortamdan geri almada etkisinin olmadığını ileri sürmüşlerdir (11, 72, 85). Altı farklı laktobasil ve bifidobakteri suşlarının kullanıldığı bir çalışmada bu suşların AFB₁'i bağlama kapasitesi *in vitro* koşullarda %5,8-31,3 olarak bulunmuştur (44).

El-Nezami ve ark. (2001-2007) yaptıkları çalışmalarda 250'den fazla laktik asit bakterisi izole etmişler ve bunlar arasında aflatoksinleri bağlamada en etkili suşların *Lactobacillus rhamnosus* GG ve LC-705 suşları olduğunu bildirmişlerdir (44, 117). *Lactobacillus rhamnosus* GG ve LC-705 suşlarının intestinal lümende AFB₁ bağlama yeteneği in vivo koşullara bir tavuk duodenumu kullanılarak araştırıldığı başka bir çalışmada ise *Lb. rhamnosus* GG suşunun AFB₁'i %54 oranında, LC-705 suşunun ise %44 oranında bağlandığı tespit edilmiştir (122). Aynı araştırmacılar *Lb. Rhamnosus* GG ve LC-705 suşlarının aflatoksin bağlama yeteneklerini sıvı ortamda karşılaştırmışlar ve her iki suşun da aflatoksini aynı oranda (%80) bağladığını bildirmişlerdir (40, 43). Canlı ve ısı ile inaktive *Lb. rhamnosus* GG ve LC-705 suşlarının AFM₁'i detoksifiye etme oranlarının karşılaştırıldığı başka bir çalışmada ise elde edilen sonuçlar canlı ve ısı ile inaktive suşların her ikisinin de aflatoksinleri detoksifiye ettiğini göstermiştir (87).

Yoğurt oluşumunun AFM₁ miktarını etkilemediği ileri sürülmüşken, Munksgaard ve ark. (1987) süte bağlı olarak AFM₁ miktarında bir artış gözlemlemişlerdir. Bazı çalışmalarda, yoğurttaki asitlik sebebiyle AFB₁'in tam bir transformasyonla hidroksi derivatı olan AFB_{2a}'ya dönüştüğü, bazı çalışmalarda ise, yoğurt ve asidifiye sütte AFM₁ miktarında %97 gibi yüksek oranlarda bir azalma olduğu ve durumun enzimatik, mikrobiyal ve asit koagülasyonu sonucu AFM₁'in degradasyona uğramasından kaynaklandığı ifade edilmiştir (103). Portekiz' de 96 ticari yoğurt örneğinin (48 normal, 48 çilekli) AFM₁ içeriği HPLC ile analiz edilmiş, örneklerin 18 (%18,8) 'inde 19-98 ng/kg AFM₁ bulunurken 78 (%81,2)'inde toksine rastlanmamıştır (103). AFM₁ ile 1,7-2,0 µg/l oranında kontamine edilmiş sütlerle yapılan peynirlerde, peynir oluşumundan sonra peynirdeki toksinde %60, peynir altı suyundaki toksin miktarında ise %40 oranında azalma görülmüştür (95). İki farklı dozda (708 ppb, 542 ppb) AFM₁ ile kontamine ettiğimiz sütlerle elde ettiğimiz kefir ve yoğurdun fermantasyon sonrası ve çeşitli depolama periyotlarındaki AFM₁ konsantrasyonu ölçerek gerçekleştirdiğimiz daha önceki çalışmamızda ise; fermantasyon sonrasında AFM₁'in yıkılma oranını kefirde % 51.57-88.17, yoğurtta % 33.71-70.24 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmamızda bir günlük

depolama sonrasında kefirde % 37-68,02, yoğurtta % 35,71-58,22 oranında; 15. günün sonunda ise kefirde %35,43-65,98 ve yoğurtta ise % 25.14-% 64.88 oranında detoksifikasyon gerçekleştiği tespit edilmiştir (114).

Karunaratne ve ark. (1990) *Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus* ve *Lb. planatarum* suşlarının küf gelişimini önlediğini ve aflatoksinleri degrade ettiğini göstermiştir (75). AFB₁ ile kontamine edilmiş yoğurt ve asit ilave edilmiş süt ile yapılan çalışmada yoğurttaki aflatoksinlerin %90-97 oranında azaldığı, sitrik, laktik ve asetik asit eklenmiş sütte ise %73-90 arasında azalma olduğu bulunmuş, yoğurttaki detoksifikasyonun daha fazla olması laktik asit bakterilerinin metabolik aktivitesine bağlanmıştır (130). Yoğurt, kefir ve ayranla yapılan başka denemeler de bu sonuçları desteklemiştir (163). *Lb. rhamnosus* GG suşunun AFB₁'i bağlama yeteneği Kankaanpaa ve Tuomola (2000)'nın *caco-2* adhesion (yapışma) modeliyle gösterilmiştir (72). Bu suşun aflatoksini bağlama yeteneği %5-30 olarak bulunmuştur. Buradan hareketle probiyotik bakterilerin adhesion özelliklerinin **aflatoksin–bakteri** kompleksini artırma yoluyla aflatoksinleri alıkoyabileceği ve incebağırsaktaki aflatoksin birikimini azaltabileceği düşünülmüştür. El-Nezami ve ark.(1998) Aflatoksin ile *Lb. rhamnosus* GG ve LC 705 suşları ve *Propionibacterium freudenrichii ssp. shermani* JS suşunun adhesion yeteneğini araştırdıkları çalışmada, AFB₁ ve laktobasil suşlarının kompleks formlarının stabilitesinin *in vitro* koşullarda 1 saat olduğunu bulmuşlardır. Canlı, ısı ile inaktive ve asit ile inaktive bakterinin benzer yanıt verdiği, *Bifidobakterium*'un AFB₁ üzerinde daha etkili olduğu başka çalışmalarda da belirtilmiştir (42).

Canlı bir bakterinin aflatoksini bağlama yeteneğine sahip olabilmesi için sayısının 10⁷'den fazla olması gereklidir ve bu bağlanma aflatoksin molekülünün bakteri hücre duvarındaki karbonhidrat ve proteinlerle hidrofobik bir bağ kurmasıyla gerçekleşir (141). Yirmi gönüllü üzerinde yapılan pilot bir çalışmada deneklerin 10 tanesine liyofilize LC705 kapsülü verilmiş ve fekal serbest AFB₁ miktarında azalma gözlenmiştir. Başka bir çalışmada ise 90 sağlıklı erkek 2 gruba ayrılarak, birinci gruba miks olarak LC705 ve *Propionibacterium freudenrichii subsp. shermanii* suşları 5 hafta süresince günde 2 kez verilmiş, diğer gruba ise plasebo içirilmiştir. Bu deneklerden

başlangıçta, 3 ve 5. haftaların başlangıcında ve 5. haftanın sonunda olmak üzere 4 kez idrar örnekleri alınarak AFB-N⁷-guanin analizi yapılmıştır. Sonuçta plasebo alan grubun idrarında AFB-N⁷-guanin atımında önemli bir farklılık görülmezken, probiyotik alan grupta 3. haftada %36 ve 5. haftada %55'lik bir azalma gözlenmiştir. Bu araştırmacılar probiyotik suplementasyonunun karaciğer kanseri riskini azaltabileceğini bildirmişlerdir (44).

Yoğurt ve kefir gibi temel fermente süt ürünleri hayvan sütlerinin ya laktik asit bakterileri ya da mayalar veya her ikisinin kombinasyonunun inkübasyonu sonucu elde edilirler (102). Sütteki tüm besin maddelerini içerdiği için kefirin besin değeri oldukça yüksektir. Inkübasyon aşamasında sinbiyotik bir yaşam sürdüren bakteriler ve mayalar, sütteki proteinleri pepton, peptit ve amino asitlere, laktozu da laktik asit ve etil alkole kadar parçaladıklarından sindirim problemlerini ortadan kaldırır. Bazı çalışmalarda kefir üretimi sonucu oluşan asetik asit, H₂O₂ (Hidrojen Peroksit) gibi antibakteriyel maddeler ve antibiyotiklerin *E. Coli* ve *Salmonella* gibi patojen bakterileri inhibe ettiği bildirilmiştir (142, 167).

1.4.1. Kefirin Tarihçesi ve Etki Mekanizması

Kefir, kefir tanelerinin süt ile inkübasyonu sonucu asidik ve alkolik fermantasyonların meydana getirdiği bir süt ürünüdür (140). Gorski (1994) tarafından 21. yüzyılın yoğurdu olarak tanımlanan kefir, kefir tanelerinin doğal mikroflorasının esansiyel komponentlerle fermantasyonu sonucu elde edilen bir eşsiz süt ürünüdür (14, 167). Tarihçesine bakıldığında kökeninin Kafkas Dağları olduğu görülmektedir. Kafkasya'da Elburus Dağları eteklerinde yapılmış ve yapımı uzun bir süre gizli tutulmuştur (84).

Taneler beyaz-sarımtırak renkte ve çapları 1-2 mm'den 3-6 mm'ye kadar değişmektedir (Resim 1). Fermantasyondan sonra süzülerek tekrar kullanılabilmesi en önemli özelliklerindedir (138).



Resim 1: Kefir taneleri

Kefir içeceği bileşiminde %0,5-1,5 etil alkol, yaklaşık %0,7 süt asiti ve kullanılan sütün yağ oranına bağlı olarak değişmekle birlikte, ortalama %3,2 yağ barındırmaktadır. Organoleptik bakımdan acılığa kaçmayan ekşimsi bir tat, hafif maya aroması, yumuşak kıvamlı ve CO₂ içeriğinden dolayı hafif köpüklü, ferahlatıcı niteliklere sahiptir (140).

Kefir tanesinde yer alan mikroorganizmalar incelendiğinde, en zengin koloniyi oluşturan kısmın, dışa yakın kısım olduğu görülmüştür. Bu kısımda bakteriler başta olmak üzere çok az sayıda mayalar bulunurken, tanenin merkezine yakın kısımlarda ise mayalar miktarca artarken bakterilerin azaldığı bildirilmiştir (68). Kefir taneleri, içerisinde simbiyoz halde yaşayan laktozu fermente eden ve etmeyen mayalar ile homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterileri ve asetik asit bakterilerinin farklı türlerini içeren kompleks bir mikrofloraya sahiptir (50). Taneler laktobasil, laktokok ve leukonostok türlerini içerir. Kefirdeki Laktobasil türleri *Lactobacillus caucasicus*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. kefiranofaciens*, *Lb. cellobiosus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. helveticus spp. jugurti* ve *Lb. Lactis*; laktokok türleri *Lactococcus lactis spp. lactis*, *Lact. lactis spp. lactis biovar diacetylactis*, *Lact. lactis spp. cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Lact. filant* ve *Streptococcus durans* ve yaygın leukonostoklardan *Leuconostoc dextranicum*, *Leu. mesenteroides* ve *Leu. kefir* olarak belirtilmiştir. Kefir tanelerindeki mayalar ise *Kluyveromyces lactis*,

K. marxianus, *K. fragilis*, *Torula kefir* ve *Saccharomyces kefir* gibi laktozu fermente eden mayalar ve *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergensis* gibi laktozu fermente edemeyen mayalar olarak bildirilmiştir (57,83, 137).

Kefirde fermantasyon sırasında gerçekleşen olaylar, laktozdan laktik asit oluşumu (Laktik asit fermantasyonu), laktozdan etil alkol ve CO₂ oluşumu (Alkol fermantasyonu), tipik kefir aroması oluşumu ve sınırlı ölçüde proteinin, pepton ve amino asitlere parçalanması şeklinde özetlenebilir (51). Buradan yola çıkılarak kefirin bilimsel araştırmalara dayanan sağlık açısından temel olumlu etkileri aşağıdaki şekilde sıralanabilir (46, 113).

1. *Laktoz intoleransını önler,*
2. *Antibakteriyel ve antifungal etkiye sahiptir,*
3. *Kan kolesterolünü düşürür,*
4. *Antioksidatif etki gösterir,*
5. *İmmün sistemi güçlendirir,*
6. *Antimutajenik ve antitümör aktivite gösterir.*

1.4.2. Kefirin Antimutajenik ve Antitümör Aktivitesi

Kefirin antitümör aktivitesi ilk olarak Kafkaslarda Kubo ve ark. (1992) tarafından keşfedilmiştir. *In vivo* koşullarda 100-150 mg/kg kefir tümorojenik farelere 10 gün süre ile verilerek Mitomycin C'nin teropatik etkisiyle kıyaslanmış ve tümör büyüklüğündeki azalmanın kontrol grubuna göre istatistik açıdan önemli olduğu bildirilmiştir (22, 80). Çevikbaş ve ark.'nın (1994) 20 günlük 0,5 ml/gün intraperitoneal ve Shiomi ve ark.'nın (1982) benzer uygulamaları da bu bulguları desteklemiştir (32, 138). Başka bir çalışmada ise farelere 2 g/kg liyofilize kefiri 9 gün süresince Lewis karsinoma hücreleriyle birlikte injekte edilmiş ve kefir verilen farelerde karsinoma hücresi gelişiminin kontrol grubuna göre %62 daha az olduğu ayrıca bu farelerde dalak ağırlığında ve lökosit sayısında artış olmadığı bildirilmiştir (22).

Fermente süt ürünlerindeki kazein, kalsiyum ve *Bifidobakteria* gibi bileşenlerin tek başlarına antimutajenik etkileri gösterilse de fermente ürünün

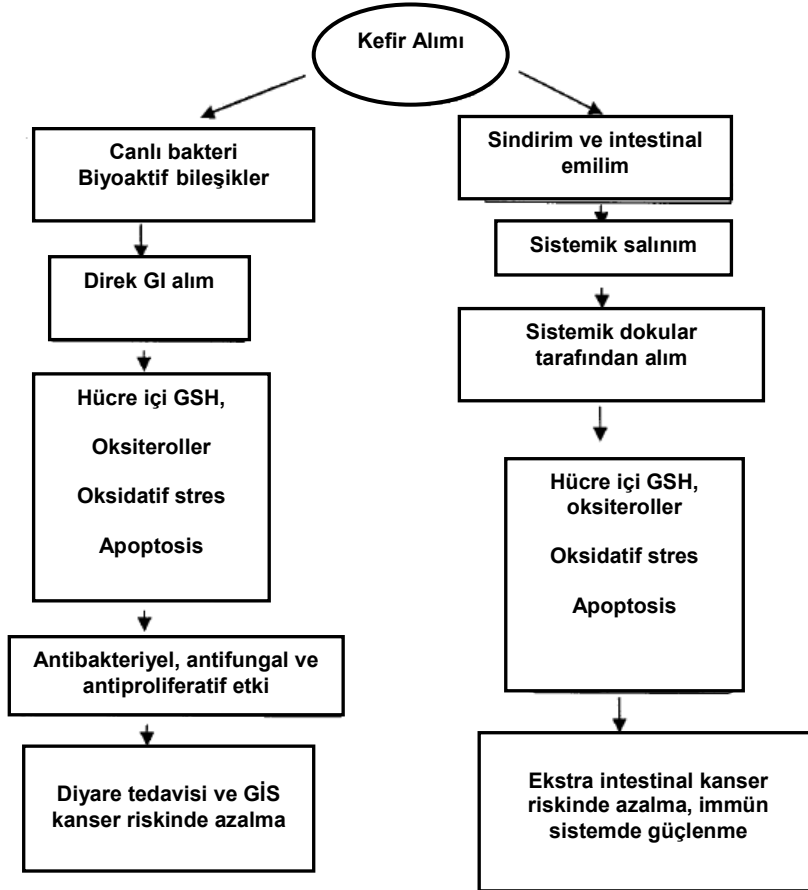
tamamının etkisinin çok daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Fermantasyon esnasında bakterilerin lineer çoğalma dönemindeki antimutajenik etki en yüksektir (89). Sıçanlarda laktik asit bakterilerinin ağız yoluyla verilmesinin mide ve kolon mukozasında kimyasal karsinojenlerden kaynaklanan DNA hasarlarını etkin bir şekilde azalttığı, bazı laktik asit bakteri türlerinin karsinojen kaynaklı preneoplastik değişiklikleri de önlediği ileri sürülmüştür. Tümör hücreleri injekte edilen farelerin fermente süt ürünleri ile beslendiklerinde tümör hücrelerinin çoğalmasının engellendiği gözlenmiştir (26). Laktik asit bakterileri ve fermente süt ürünleri tüketiminin bağırsak florasındaki kolon karsinogenesis ile ilişkili enzimlerin aktiviteleri üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir. Toksik ve karsinojenik bileşiklerin karsinojenik etkilerinin NADPH dehidrogenaz, nitroredüktaz, β -glukronidaz, β -glukozidaz ve 7- α -dehidroksilaz gibi bakteriyel enzimlerle ilişkili olduğu ve probiyotiklerin bu enzimlerin aktivitelerini azalttığı bildirilmiştir (136).

In vitro ve *in vivo* çalışmalarda fermente süt ürünleri ile bileşimindeki laktik asit bakterileri veya bunların çoğalmasını kolaylaştıran prebiyotiklerin genotoksik karsinojenleri detoksifiye ettikleri, probiyotiklerin mutasyonları engellediği, DNA zedelenmesini önlediği, ayrıca kolon dokusundaki kemopreventif sistemleri stimüle ettikleri gösterilmiştir (86).

Kefir ve diğer fermente süt ürünlerinin fermantasyonu süresince antitümör aktivite gösteren çok çeşitli bileşikler meydana gelebilmektedir. Laktik asit bakterilerinin fermantatif etkisiyle laktozun %20-30'u bakteriler tarafından kullanılmaktadır (89). Fermantasyonun ardından laktoz miktarı azalırken galaktoz, glikoz ve polisakkaritlerin miktarı artış göstermektedir. Proteinler peptitlere ve serbest amino asitlere dönüşürken yağlar ise uçucu ve uzun zincirli yağ asitlerine dönüşmektedir (136). Üre miktarı azalarak amonyak oluşumu artmaktadır. Vitamin B₁₂, C ve kolin miktarları azalma gösterirken folik asit miktarı artış göstermektedir. Bunların dışında organik asitlerden pirüvik ve orotik asitte azalma; süksinik, fümerik, benzoik, asetik ve laktik asit gibi organik asitlerde ise artış görülmektedir (22, 136).

Kefirin antiproliferatif mekanizması tam olarak açıklanamasa da elde kanıtlara dayanarak ileri sürülen mekanizma aşağıdaki şekilde özetlenmiştir

(Şekil 10). Kefirin oral alımını takiben çok sayıda canlı bakteri sindirim sistemine hücum ederek basit beslenmenin ötesinde antikanserojen ve kanserin tekrarlamasını önlemek gibi önemli yararlı etkiler gösterirler (151). Bu canlı bakteriler içerisinde en önemlileri laktik asit bakterileridir (LAB). Fermente süt ürünlerinin göğüs kanserini önleyici etkisi LAB'nin enterohepatik sirkülasyona karışarak intestinal floranın normal dengesini korumasından ileri gelebilmektedir. Deneysel çalışmalar LAB'nin kolonda metabolik, immünolojik ve koruyucu fonksiyonları etkileyerek insanlarda kolon tümörü riskini azalttığını göstermiştir. Kohwi ve arkadaşları (1978) canlı bifidobakterilerin sarkomalara injeksiyonunun farelerde lethal etkileri önlediğini ve tümör küçülmesine neden olduğunu bildirmişlerdir (79).



Şekil 10: Kefirin Oral Alımı ile Gerçekleşen Antiproliferatif Mekanizma (22).

Belirli miktarlarda alındığında bağırsak florasını dengeleyip konakçının sağlığını olumlu yönde etkileyen canlılar olarak tanımlanan probiyotik mikroorganizmalarla gerçekleştirilen uygulamalar “**bakteriyel replasman tedavisi**” olarak tanımlanmıştır (41, 78). Probiyotik bakteriler intestinal floranın dengelenmesinde ve gastrointestinal hastalıkların önlenmesinde kullanılırlar. Spesifik probiyotik suşların patojenlere karşı antagonistlik, rotavirüs bebek ishallerinin süresini kısaltması ve immün sistem modülasyonu gibi yararlı etkileri yayınlanmıştır (167). Bu suşları içeren fermente süt ürünlerinin antimutajenik ve antikarsinojenik özelliklerinin mekanizması henüz açıklığa kavuşmamakla birlikte, fekal bakteriyel enzim aktivitesindeki değişikliklerle birlikte, promotajenlerin ve prokarsinojenlerin temel karsinojenlere dönüşmesi yoluyla diyet mutajenlerinin ve diyet karsinojenlerinin bağlandığı ileri sürülmektedir (52). Laktik asit bakterileri, karbonhidrat kaynaklarından laktik asit ve asetik asit gibi organik asitler üretebilmektedir. Çoğu mikroorganizmalar bu asitlere ve pH düşüşüne hassastır. Laktik asit bakterileri tarafından aerobik gelişme sırasında üretilen hidrojen peroksit de birçok organizma üzerine inhibitör etki göstermektedir (111).

Çalışmanın Amacı:

Tüm bu bilgilerin ışığında geleceğin potansiyel yaklaşımı, aflatoksinlerin kontamine süt ürünlerinden ve insan intestinal sisteminden probiyotik bakterilerle geri alınması yönündedir. Fakat bundan önce yapılması gereken şey, bu olayın geniş bir skalada değerlendirilerek detoksifikasyon mekanizmalarının çözülmesi yönünde hareket edilmesidir. Bundan sonraki aşama ise bu yöntemlerin optimizasyonu ve etkili, ekonomik bir şekilde kullanımının gerçekleştirilmesidir (18, 22, 40, 111). Bu çalışmadaki temel amacımız, düşük dozda aflatoksin uygulanan deney farelerinde bu toksinin lipid peroksidasyonu, antioksidan enzim aktivitesi ve karaciğerin bazı fonksiyonel enzimleri ile dokudaki histopatolojik bulgular ve antioksidan enzimleri kodlayan genlerin ekspresyonları üzerindeki etkilerini gözlemleyerek fermente bir süt ürünü olan kefir içeceğinin bu etkileri azaltma

veya tamamen eliminasyonu yönündeki aktivitelerini değerlendirmektir. alışmanın mevcut bilgiler ışığında değerlendirilmesi, besin hijyeni, toplum beslenmesi, moleküler nutrisyon ve nutrigenetik bilimlerine katkıda bulunacak ve gelecekteki çalışmalarımıza bir temel oluşturacaktır.

2. MATERYAL VE METOT

Tüm deneysel uygulamalar Kafkas Üniversitesi (KAÜ) Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi AD., Histoloji ve Embriyoloji AD., Patoloji AD., Biyokimya AD. Laboratuvarları, KAÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Laboratuvarları ile KAÜ Hayvancılık Araştırma ve Uygulama Merkezi ve KAÜ Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir. Genetik çalışmalarda ise ODTÜ Moleküler Biyoloji Laboratuvarları uzman personellerinin danışmanlığından yararlanılmıştır.

2.1. MATERYAL

2.1.1. Deney Hayvanı Materyali

Çalışmada kullanılan deney hayvanları KAÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edildi. Ortalama 12 haftalık 41 adet *Swiss albino* fareler, 15 gün boyunca adaptasyon amacıyla standart fare yemi ve su ile *ad libitum* olarak beslendi. Daha sonra 4 eşit gruba ayrılarak 12 saat ışık ve 12 saat karanlık, yaklaşık 22 ± 2 °C ısı ve nem oranı ortalama $\%50\pm 5$ olan özel bir ortam sağlandı. Gruplara göre deneysel uygulamalar ve beslenme şekilleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Gruplara Göre Deneysel Uygulamalar ve Beslenme Şekilleri

Deney grupları	Beslenme şekli ve Deneysel uygulamalar
Grup A	Standart fare yemi + Su (Kontrol grubu)
Grup B	Standart fare yemi + Su+300 ng/kg Aflatoksin B ₁
Grup C	Standart fare yemi + Su+300 ng/kg Aflatoksin B ₁ + 30 ml/kg kefir
Grup D	Standart fare yemi + Su+30 ml/kg kefir

2.1.2. Standart Fare Yemi

Çalışmada kullanılan standart fare yemleri Bayramoğlu Yem Fabrikası A.Ş. (Erzurum)'den temin edildi. Kullanılan standart yemlerin bileşimi; % 10 Buğday, % 23 Mısır, % 15 Arpa, % 8 Kepek, % 26 Soya, % 8 Balık unu, % 4 Et-kemik unu, % 5 Melas, % 0,8 Tuz, % 0,2 Vitamin-mineral [Vitamin A, D3, E, K3, B1 ve B2, Nikotinamid, folik asit, Biotin, Mn, Fe, Cu, I, Co, Se, Ca ve Antioksidan (Buthilhidroksitoluol)]'dir.

2.1.3. Aflatoksin B₁

Farelere verilecek AFB₁ Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Ankara İl Kontrol Laboratuvarı'ndan 1µg/ml asetonitril/toluen(%98:%2) solüsyonu içerisinde temin edildi. Toksin kullanılmadan önce üzerine DMSO (Dimetilsülfoksit) ilave edildikten sonra asetonitril/toluen 40°C sıcak su banyosunda uçuruldu. Hazırlanan toksin solüsyonu, farelere oral gavaj yoluyla 6 hafta süresince gün aşırı olarak verildi.

2.1.4. Kefir

Kefir yapımında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden temin edilen kefir taneleri kullanıldı. Kefir içeceği, kefir granüllerinden Marshal ve Cole (1985)'nin belirttikleri yöntemle yapıldı (101). Bu yöntemle göre, çiğ süt bir su banyosunda 10 dakikada 90°C'ye kadar ısıtıldıktan sonra inokülasyon ısı olan 25°C'ye soğutuldu ve %5 kefir granülü eklendi. Kefir granülü eklenen süt 22 °C' de 20 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra granüller süzülerek alındı (Şekil 11). Hazırlanan içimlik kefir farelere 30ml/kg oranında 6 hafta süresince gün aşırı oral olarak verildi.

2.1.5. Kullanılan Kitler ve Kimyasal Malzemeler

2.1.5.1. Otoanalizör Kitleri

Kan serumunda AST analizi için *Olympus OSR6109*, ALT analizi için *Olympus OSR6110*, LDH analizi için *Olympus OSR6128* ve Albümin analizi için *Olympus OSR6202* marka ve kodlu ticari hazır kitler kullanıldı.

2.1.5.2. Spektrofotometrik Analizler için kullanılan Kimyasal Malzemeler

Spektrofotometrik yöntemlerle yapılan MDA, GSH ve GST analizlerinde kullanılan kimyasal malzemeler Tablo 2'de sıralanmıştır.

Tablo 2: Spektrofotometrik Analizlerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Kimyasalın Adı	Marka	Kod
Sodyum hidroksit	Merck	1.06462
Di-sodyum hidrojen fosfat	Merck	1.06586
Bakır sülfat	Merck	1.02790
Folin-ciocalteu	Merck	1.09001
Trikloroasetik asit	Merck	1.00807
Potasyum klorür	Merck	1.04936
Sodyum- Potasyum tartarat	Merck	1.08087
Potasyum hidroksit	Merck	1.05012
Methanol (%100)	Riedel-de haen (sigma)	24229
Hidroklorik asit (%37)	Riedel-de haen (sigma)	30721
Fosforik asit (%85)	Riedel-de haen (sigma)	04107
Ethanol (%100)	Riedel-de haen (sigma)	32221
2-thiobarbiturik asit (%98)	Sigma-aldrich	T5500
Bathophenonthroline	Sigma-aldrich (fluka)	11880
Perklorik asit (%60)	Merck	1.00518
Trisma	Sigma	T1503
Pyrogallol (%99)	Sigma-aldrich	254002
Iron (III) chloride	Sigma-aldrich	F7134
Sodyum karbonat	Riedel-de haen	13418
Hidrojen peroksit (%30)	Riedel-de haen	18312
Askorbik asit	Sigma	A7506
2,6 di tert bütül -4-methylphenol	Sigma aldrich	B1378
Sodyum klorid	Riedel de haen	13423
CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzoic acit)	Sigma-aldrich	138630
K ₂ HPO ₄	Merck	4871
DTNB (5-5''-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid))	Sigma	D 8130
L-Glutathione reduced SigmaUltra, 98-100%	Sigma-aldrich	G6529
Bovine Serum Albumin	Sigma	SIB6917.002S

2.1.5.3. Moleküler Analizlerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Moleküler analizlerde kullanılan kimyasal malzemeler Tablo 3'de sıralanmıştır.

Tablo 3: Moleküler Analizlerde Kullanılan Malzemeler

Kimyasalın Adı	Marka	Kod
Deoxynucleotide Set, 100 mM 0.25 mL each of 100 mM dATP, dCTP, dGTP and dT	Sigma	DNTP100
M-MLVREVERSE Transcriptase 10.000 unit	Promega	M1701
RIBONUCLEASE inhibitor 2500 U	Promega	N251A
Taq DNA Polymerase	Sigma	D6677
Oligo DT Primer (15)	Promega	C110A
PCR 100 bp low ladder 250 ul 50 lanes	Promega	G2101
Trizma® base Primary Standard and Buffer, ≥99,9% (titration), crystalline	Sigma	T1503
Rnaase - Dnase -free Water	Qbiogene	2450-204
Agarose Mol Bio Grade	Qbiogene	AGAH0100
Chloroform graded for nucleic acid purification	Sigma	C2432
Isopropanol graded for nucleic acid purification	Sigma	I9516
Ethanol graded for nucleic acid purification	Riedel	RH32221
Glacial Acetic Asit	Riedel	RH27225
Ethylenediaminetetraacetic acid solution BioUltra, for molecular biology, pH 8,0, ~0.5 M in H ₂ O 100 ML	Fluka	FL03690
Boric acid	Sigma	B6768
Ethidium bromide	Sigma	E7637-1G
6 x loading dye 1ml	Promega	G190A
Tri-Reagent 100ml	Sigma	T9424

2.1.6. Kullanılan Çözeltiler

2.1.6.1. Doku Homojenisyonda Kullanılan Çözeltiler

0,1 M Potasyum Fosfat Tamponu / 0,15 M Potasyum Klorür Çözeltisi:

17,418 g K_2HPO_4 ve 13,609 g KH_2PO_4 tartılarak KCl ile çözdürüldü. Çözelti pH'sı NaOH ile 7,4'e ayarlandıktan sonra çözelti KCl ile 1litreye tamamlandı.

2.1.6.2. Protein Analizinde Kullanılan Çözeltiler

A Çözeltisi: %2 Na_2CO_3

2 g Na_2CO_3 tartılarak 0,1 M NaOH ile 100 ml' ye tamamlandı.

B Çözeltisi: %1 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$

1 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ tartılarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

C Çözeltisi: %2 Na-K Tartarat

2 g Na-K tartarat tartılarak distile su ile 100 ml' ye tamamlandı.

D Çözeltisi: Protein renk reaktifi

50 ml B çözeltisine ilk olarak 0,5 ml %2 Na-K tartarat çözeltisi, daha sonra 0,5 ml %1 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ eklenerek hazırlandı.

E Çözeltisi: Folin-Ciocalteu

Kullanılacağı gün 1:1 oranında distile su ile sulandırılarak hazırlandı.

F Çözeltisi: %0,05 Bovine serum albümin (Stok protein standart çözeltisi)

0,05 g bovine serum albümini 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

2.1.6.3. MDA Analizinde Kullanılan Çözeltiler

%10'luk Triklor Asetik Asit (TCA):

10 g TCA tartılarak 100 ml'lik balon jojeye alındı ve 100 ml distile su içinde çözdürüldü.

% 0.675'lik Thiobarbutirik Asit (TBA):

0.675 g TBA tartılarak 100 ml'lik balon jojeye konuldu ve 100 ml distile su içerisinde çözdürüldü.

2.1.6.4. GSH Analizinde Kullanılan Çözeltiler

0,1 M Fosfat Tamponu:

17,418 g K_2HPO_4 ve 13,609 g KH_2PO_4 tartılarak KCl ile çözdürüldü. Çözelti pH'sı NaOH ile 7,4'e ayarlandıktan sonra çözelti KCl ile 1litreye tamamlandı. Ardından 5 mM EDTA çözeltisi eklenerek pH'sı NaOH ile 8'e ayarlandı.

5 µm DTNB (5-5"-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)) çözeltisi:

99 mg DTNB tartıldıktan sonra 500 ml distile su içerisinde çözdürüldü.

GSH standartları:

GSH stok standardı 20, 50, 75, 100 mg/dl olacak şekilde distile su ile çözdürülerek deney gününde hazırlandı.

%5'lik TCA çözeltisi:

5 ml TCA alınarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2.1.6.5. GST Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

30 mM CDNB (klorodinitrobenzen):

1,550 g CDNB 250 ml etanol içerisinde çözümlenerek hazırlandı.

30 mM GSH Çözeltisi:

800 mg GSH 100 ml distile suda çözdürülerek hazırlandı.

100 mM Potasyum Fosfat Tamponu (pH: 6,5):

17,41 g K_2HPO_4 ve 13,60 g KH_2PO_4 tartılarak distile su ile çözdürüldü. Çözelti pH'sı NaOH ile 6,5' e ayarlanarak çözelti hacmi distile su ile 1 litreye tamamlandı.

2.1.7. Kullanılan Gen Primerleri

GSTM1 ve GSTT1 gen sekansları esas alınarak ilgili Primer Dizayn Software programı yardımıyla dizayn edilen gen primerleri *Operon Molecules* firması tarafından üretildi. Kontrol geni olarak **β-aktin** kullanıldı.

2.1.7.1. GSTM1 Gen Primeri

Çalışmada kullanılan GSTM1 gen primerinin kimyasal ve moleküler özellikleri Tablo 4'de gösterilmiştir. GSTM1 geninin tam sekansı ve çalışmamızda kullanılan primerin sekans içerisindeki yeri Şekil 11'de görüldüğü gibidir (104).

Tablo 4: GSTM1 Geninin Moleküler ve Kimyasal Özellikleri

GSSM1 F (5'-3') : tctactctgagttcctgggca GSSM1 R (5'-3') : agagagaaccaggagccaca	PRODUCT SIZE: 359
OD	F:11,95; R: 12,78
Pmol	F: 63565,62; R: 58234,86
LENGTH	F: 21; R: 20
MW	F: 6388,23; R: 6178,05
µg	F: 406,07; R: 359,78
E260	F: 187994,7; R: 219456,2
Tm	F: 62,57; R: 62,45
Scale	50 nmole
µl / 100µM	F: 635,66; R: 582,35
Operon Molecules, Order No: 55183249	

```

CTGCCTTCCGCTTTAGGGTCTGCTGCTCTGGTTACAGACCTAGGAAGGGGAG
TGCCTAATTGGGATTGGTGCAGGGTTGGGAGGGACCCGCTGTTTTGTCCTGC
CCACGTTTCTCTAGTAGTCTGTATAAAGTCACAACCTCAAACACACAGGTCAG
TCCTGCTGAAGCCAGTTTGAGAAGACCACAGCACCAGCACCATGCCTATGAT
ACTGGGATACTGGAACGTCCGCGGACTGACACACCCGATCCGCATGCTCCTG
GAATACACAGACTCAAGCTATGATGAGAAGAGATACCCATGGGTGACGCTC
CCGACTTTGACAGAAGCCAGTGGCTGAATGAGAAGTTCAAGCTGGGCCTGG
ACTTTCCAATCTGCCTTACTTGATCGATGGATCACACAAGATCACCCAGAGC
AATGCCATCCTGCGCTACCTTGCCGAAAGCACCACCTGGATGGAGAGACA
GAGGAGGAGAGGATCCGTGCAGACATTGTGGAGAACCAGGTCATGGACACC
CGCATGCAGCTCATCATGCTTGTTACAACCCTGACTTTGAGAAGCAGAAGCC
AGAGTTCTTGAAGACCATCCCTGAGAAAATGAAGC5'TCTACTCTGAGTTCCTG
GGCAAGAGGCCATGGTTTGCAGGGGACAAGGTCACCTATGTGGATTTCTTG
CTTATGACATTCTTGACCAGTACCGTATGTTTGAGCCCAAGTGCGGACGCCTT
CCCAAACCTGAGGGACTTCTGGCCCGCTTCGAGGGCCTCAAGAAGATCTCT
GCCTACATGAAGAGTAGCCGCTACATCGCAACACCTATATTTCAAAGATGG
CCCCTGGAGTAACAAGTAGGCCCTTGCTACACGGGCACTCACTAGGAGGA
CCTGTCCACACTGGGGATCCTGCAGGCCCTGGGTGGGGACAGCACCCTGGC
CTTCTGCAC1GTTGGCTCCTGGTTCTCTCT3'CCTTCCCGCTCCCTTCTGCAGCTT
GGTCAGCCCCATCCTCACCTCTTCCCAGTCAAGTCCACACAGCCTTCATT
CTCCCAGTTTCTTTCACATGGCCCTTCTTCATTGGCTCCCTGACCCAACCT
CACAGCCCGTTTCTGCGAACTGAGGTCTGTCCTGAACTCAGCTTCTAGAAAT
TACCCCGATGGTCAACACTATCTTAGTGCTAGCCCTCCCTAGAGTTACCCGA
AGTCAATACTTGAGTGCCAGCCTGTTCTGGTGGAGTAGCCTCCCCAGGTCT
GTCTCGTCTACAATAAAGTCTGAAACACACTT

```

Şekil 11: GSTM1 gen sekansı

2.1.7.2. GSTT1 Gen Primeri

Çalışmada kullanılan GSTT1 gen primerinin kimyasal ve moleküler özellikleri Tablo 5'de gösterilmiştir. GSTM1 geninin tam sekansı ve çalışmamızda kullanılan primerin sekans içerisindeki yeri Şekil 12'de görüldüğü gibidir (104).

Tablo 5: GSTM1 Geninin Moleküler Ve Kimyasal Özellikleri

GST1 F (5'-3') : tccctgtttccttggtgag GST1 R (5'-3') : gggacagtccttcaccttca	PRODUCT SIZE: 305
OD	F:11,64; R: 13,06
Pmol	F: 68607,52; R: 71724,7
LENGTH	F: 20; R: 20
MW	F: 6081,05; R: 6052,99
µg	F: 417,21; R: 434,15
E260	F: 169660,7; R: 182085,1
Tm	F: 60,4; R: 62,45
Scale	50 nmole
µl / 100µM	F: 686,08; R: 717,25
Operon Molecules, Order No: 55183249	

```

ACACTTGGCTTGATAGGGATCCCTACTAGCCAGCCTGGACTTTTTGATAGTCT
GGCCAGTTACAGAAGTGGTTCGCCGCCCTATGCCATGGTTCTGGAGCTGTA
CCTGGATCTGCTGTCGCAGCCCTGTCGCGCCATTTATATCTTCGCCAAGAAG
AACAATATCCCGTTCCAGATGCACACGGTGGAGCTGCGCAAGGGTGAGCAC
CTCAGCGATGCGTTTGCCCGGGTGAACCCCATGAAGAGGGTACCAGCCATG
ATGGATGGTGGCTTACCCTGTGTGAGAGTGTGGCTATCTTGCTCTACCTGGC
ACACAAGTATAAGGTTCTGACCACTGGTACCCCAAGACCTGCAGGCTCGT
GCTCGTGTAGACGAGTACCTGGCATGGCAGCATACGGGCCCTTCGGAGAAGC
TGCTCAGGGCCCTGTGGCATAAGGTGATGT5'TCCCTGTTTCCTTGGTGAG
CAAATACCTCCTGAAACACTGGCAGCCACGTTGGCAGAACTGGATGTTAACC
TACAGGTGCTTGAAGACAAGTTCCTCCAGGACAAAGACTTCCTTGTGGGCC
CCACATCTCCCTGGCCGACTTGGTGGCCATCACAGAGCTGATGCATCCTGTA
GGTGGTGGCTGCCAGTCTTGAAGGGCATCCCAGGCTGCTGCATGGTACCA
GCGAGTGGAGGCAGCTGTGGGAAGGACCTCTTCGGGAAGCCCATGAAGT
CATCC6'TGAAGGTGAAGGACTGTCCC3'CCTGCTGACCTCATCATAAAGCAGAA
GCTGATGCCAGAGTGCTGGCAATGATCCAGTGACGTCAGACGCTTCATCCC
TGCACCAGCTGCGGCAGTTCACAACCTCACAGTTCACAATTCACAACCTTGCAAT
AACTGGGGATGCACCTCACTCCTCACACCATGATGGCTCTCAGGCTCAGCT
CCATCTTACCCTTTTTCTGTGATAGCCACACATGACCTCAACTATAATCACTA
CTTCCCCTTGAGTCTGGGTAATAAACTGGGGCTTGATTTGGGCTTTAAAAAA
AAAAAAA

```

Şekil 12: GSTT1 Gen Sekansı

2.1.7.3. β -aktin Gen Primeri

Çalışmada kullanılan β -aktin gen primeri (285 bp) (165);

F: TCATGAAGTGTGACG

R: CCTAGAAGCATTTGC' dir.

2.1.8. Kullanılan Alet ve Ekipmanlar

Tüm analizlerde kullanılan cihaz ve ekipmanların ad, marka ve modelleri Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6: Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Cihaz/ekipman adı	Marka	Model
Otoanalizör	Olympus	AU600 IVD
Termocycler	Techne Genius	FGENO5TD
Soğutmalı santrifüj	Universal Hettich	Zantrifugen
Mikrosantrifüj	Biofuge fresco	Heraeus
Spektrofotometre	UVWIN 5,0	T60U
Homojenizatör	Braun	Potter S
PH metre	Hanna	HI221
Hassas terazi	Precisa	XB220A
Magnetik karıştırıcı	Velp Scientifica	MSH basic
Sıcak su banyosu	Memmert	-
Etüv	Nüve	FN500
Vorteks	Velp Scientifica	Rx3
Mikrodalga fırın	Bosh	-
Jel Elektroforez	E-C Apparatus Corp.	EC 3000P
Jel Elektroforez Tankı	E-C Maxicell Primo	E-C 340, EC320
Laminal Hood	Nüve	LN 090
Dijital kamera	Sanyo	Xacti 6 mp E60
UV kabin	Vilber Lourmat	-
Mikropipet	Rainin	SL 1000
Mikropipet	Rainin	SL 200
Mikropipet	Rainin	SL 100
Mikropipet	Rainin	SL 10
Buzdolabı	Bosch	KSU 3621
Derin dondurucu	Bosch	freezer-no frost
Distile su cihazı	Şimşek Labortechnik	SS 200

2.2. METOT

2.2.1. Farelerde Canlı Ağırlık Ölçümü

Canlı ağırlık ölçümleri, deneysel uygulamaların başlangıcında ve bitiminde sabah saatlerinde, fareler hareket edemeyecekleri bir kap içerisine konularak hassas dijital terazi yardımıyla gerçekleştirildi.

2.2.2. Karaciğer ve Kan Örneklerinin Alınması

Çalışmanın 45. günü sol kalpten arterial kan alındıktan sonra servikal dekapitasyon ile ötenazi edilen deneklerden karaciğer, böbrek ve kan örnekleri alındı. Kan örneklerinin 15 d, 2500x g, +4°C'de santrijüf ile plazmaları ayrıldıktan sonra aynı gün analiz edildi. Karaciğer doğrudan alınarak soğuk serum fizyolojik su ile yıkandıktan sonra pH 7,4 buffer (Tris-HCL) içerisinde %10 oranında homojenize edildi. Homojenisyondan önce histopatolojik ve gen ekspresyonu analizleri için yeterli miktarda karaciğer örnekleri ayrıldı. Histopatolojik analizler için ayrılan karaciğer ve böbrek dokuları % 10 formalinde tespit edildikten sonra parafine gömüldü ve 5 µm'lik kesitler alınarak hematoksilin-eozin (H.E.) ile boyandı. Gen ekspresyonu için alınan 50-100 mg karaciğer dokusu 1 ml Tri-Reagent içerisine konuldu. İçerisine 1 ml Tri-Reagent konulan tabanı düz 2-3 ml'lik tüpler içerisinde doku homojenizatör yardımıyla iyice homojenize edildi. Homojenize edilen örnekler 1,5 ml'lik ependorf tüplere konularak analiz gününe kadar +4°C de depolandı (135).

2.2.3. Biyokimyasal analizler

2.2.3.1. ALT, AST, LDH ve ALBÜMİN analizleri

ALT, AST, LDH ve albümin analizleri Otoanalizör cihazına uygun ticari analiz test kullanılarak ve kan serumlarının alındığı gün KAÜ Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Biyokimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Analiz öncesinde jel içeren biyokimya tüplerine alınan kan örnekleri soğutmalı santrifüj kullanılarak 3500 RPM, 5 d, +4°C'de santrifüj edilerek süpernatantın ayrılması sağlandı. Alınan süpernatantlar kitlerle birlikte Otoanalizör cihazına yüklenerek okuma gerçekleştirildi. Sonuçlar AST, ALT ve LDH için IU/L ve albümin için gr/dl olarak değerlendirildi.

2.2.3.2. MDA Analizi

Aerobik şartlarda TBA (2-thiobarbitürik asit) ile 90°C'de inkübasyonu sonucu pembe renkli kompleks oluşturan MDA'nın absorbansı spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda okundu. Analizler ve analize ait değerlendirmeler, Draper and Hadley (1990) ve Hammouda ve ark. (1995)'a göre yapıldı (35, 59).

Deney tüplerinin her birine 2,5 ml % 10'luk TCA konulduktan sonra üzerine de 0,5 ml plazma eklendi. Vorteksle karıştırma işleminin ardından, tüplerin ağzı kapatılıp 90°C'deki su banyosunda 15 dakika bekletildi. Tüpler su banyosundan alındıktan sonra buz içerisinde 15 dakika bekletildi ve ardından oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Bu işlemlerden sonra 3000 rpm'de 10 d, +4°C'de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi.

Tüplerden 2 ml süpernatant alınarak başka tüplere aktarıldı ve üzerine 1 ml % 0.675'lik TBA eklenerek 90°C'deki su banyosunda 15 dakika bekletildi. Örnekler tekrar buz dolu kap içerisinde 15 dakika bekletildikten sonra, oda sıcaklığına gelmesinin ardından spektrofotometrede 532 nm'de kör tüpüne karşı absorbansları okundu. Kör tüpü hazırlanırken, deney başlangıcındaki plazma yerine 0,5 ml distile su konularak diğer tüplere uygulanan işlemlerin aynısı uygulandı.

MDA değerleri, MDA-TBA kompleksinin 532 nm'deki ekstinksiyon katsayısından ($n = 1.56 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) yararlanılarak nmol/ml cinsinden hesaplandı.

$$\text{Örnek absorbansı} = a \times b \times c$$

a = Ekstinksiyon Katsayısı ($1.56 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) bu sabit bir değerdir.

b = Işık Yolu (analizde kullandığımız küvetin ışık yolunun 1 cm olarak ayarlandı).

c = Örnek Konsantrasyonu

$$\text{Konsantrasyon} = \text{Absorbans} / 1.56 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \times 1 \text{ cm}$$

Analize ait dilusyon faktörü ile yukarıdaki denklem çarpıldı.

$$\text{Konsantrasyon} = \text{Absorbans} / 1.56 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \times 1 \text{ cm} \times \text{dilusyon faktörü}$$

Bu analizdeki dilusyon faktörümüz: 9'dur.

$$1. \text{ dilusyon: } (2,5 + 0,5) / 0,5 = 6$$

$$2. \text{ dilusyon: } (2 + 1) / 2 = 1,5$$

$$\text{Toplam: } 6 \times 1,5 = 9$$

Dilusyon faktörü, analizde kullanılan reaktiflerin ve örneğin ilave edilen ml değerlerine göre hesaplanır. Elde edilen değeri nmol / ml'ye dönüştürdüğümüzde

$$\text{Konsantrasyon (mol/l)} = [\text{Absorbans} / 1.56 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}] \times 9$$

$$\text{Konsantrasyon (nmol/l)} = \text{Absorbans} \times 57.69 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

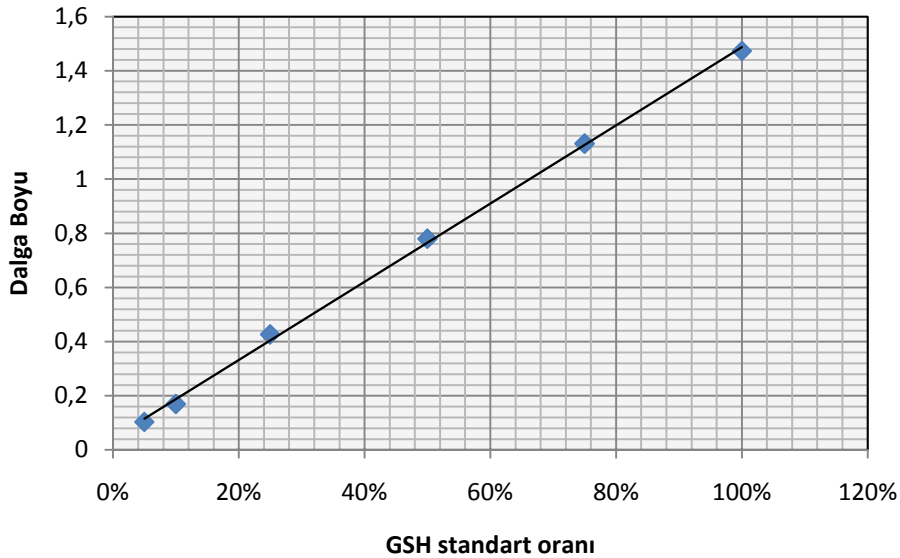
2.2.3.3. GSH Analizi

Redükte Glutasyon (**GSH**) Sedlak ve Lindsay (1968)'in belirttiği yöntemle göre Elman's Ayracı kullanılarak yapılmıştır (135). Doku homojenat süpernatantından 1ml santrifüj tüplerine alındıktan sonra 4 ml %5'lık TCA eklendi ve oda ısısında 5 d bekletildi. 1000 x g, 15 d, +4°C'de santrifüj işlemi yapılarak aşağıdaki protokol gerçekleştirildi.

Kör Tüpü: 2 ml fosfat tamponu (pH=8) + 0,25 ml DTNB çözeltisi + 200 µl distile su

Deney Tüpü: 200 µl Süpernatant + 2 ml fosfat tamponu (pH=8) + 0,25 ml DTNB çözeltisi

Yukarıdaki protokole göre hazırlanan karışımlardan 2 ml alınarak kuars tüpler içerisine aktarıldı ve 1-2 dakika içerisinde spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda köre karşı okundu. GSH standartları da aynı yöntemle çalışıldı ve GSH standart eğrisi oluşturularak (Grafik 1) doku örneklerindeki GSH miktarları hesaplandı.



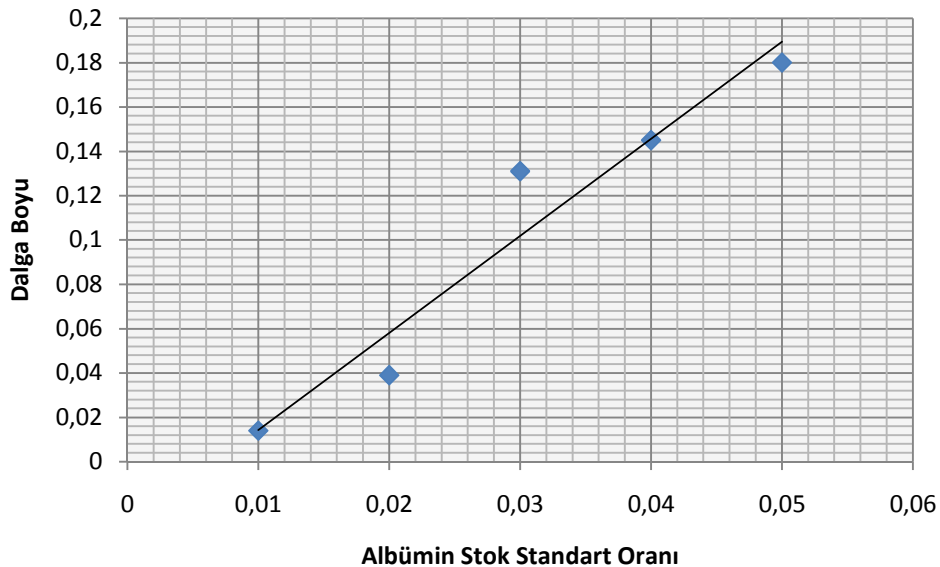
Grafik 1: GSH Standart Eğrisi

2.2.3.4. Doku Protein Miktarı Tayini

Proteinlerin alkali ortamda bakır iyonları ile biüret tepkimesi vermesi esasına dayanır. Peptit bağları alkali ortamda bakır tuzları ile mor renkli kompleks oluşturur. Dokudaki protein miktar tayinleri protein yapısındaki trozin ve triptofan amino asitleri fosfo molibdat-fosfotungustat çözeltilisi (folin-Cocalteu) ile indirgenme reaksiyonları baz alınarak gerçekleştirilmiştir (75).

Standart olarak % 0.05 gram sığır serum albümini içeren çözeltiden 0.010, 0.020, 0.030, 0.040, 0.050 ml ve numune olarak doku homojenizatından 0.005 ml ayrı ayrı tüplere pipetlendi. Hacimleri 0.075 ml'ye distile su ile tamamlandı. Her bir tüpe 1,5 ml Protein Renk Reaktifi eklendi. Tüpler 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

Karışımlara 1:1 oranında seyreltilmiş folin-ciocalteu çözeltilisinden 0.15 ml ilave edilerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra 750 nm'de köre karşı spektrofotometrede okundu. Kör, tüplere distile su konularak hazırlandı ve numunelerle aynı işlemlere tabi tutuldu. Sonuçlar oluşturulan standart eğri (Grafik 2) yardımıyla mg protein/ml doku homojenat olarak değerlendirildi.



Grafik 2: Albümin Standart Eğrisi

2.2.3.5. GST Aktivite Ölçümü

GST aktivite ölçümü Habig ve ark. (1974)'nin yöntemine göre yapıldı (58). Bu yöntemle göre kör tüpü ve deney tüpleri aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Kör Tüpü: 0,1 µl GSH çözeltisi + 0,1 µl CDNB çözeltisi + 2,2 µl Potasyum -fosfat tamponu + 0,6 µl Distile su

Deney Tüpü: 0,1 µl GSH çözeltisi + 0,1 µl CDNB çözeltisi + 2,2 µl Potasyum -fosfat tamponu + 0,6 µl Süpernatant

Şeklinde hazırlanan karışımların 340 nm'de absorbansları saptandı (A_1). Beş dakika sonra yeniden kör tüpüne karşı okuma yapıldı (A_2) ve absorbans farkı alınarak aşağıdaki formül ile spesifik aktivite hesaplandı.

$$\text{Spesifik aktivite} = \frac{\text{Absorbans farkı } (A_2 - A_1) / 5}{\text{Glutasyon Ekstraksiyon sabiti } (mM^{-1}cm^{-1}) \times \text{Küvetteki protein konsantrasyonu } (mg \text{ ml}^{-1})}$$

Spesifik aktivite = µmol/dk / mg protein

Glutasyon ekstraksiyon sabiti = 9,6 mM⁻¹ / cm⁻¹

2.2.4. GSTM1 ve GSTT1 Gen Ekspresyon Analizleri

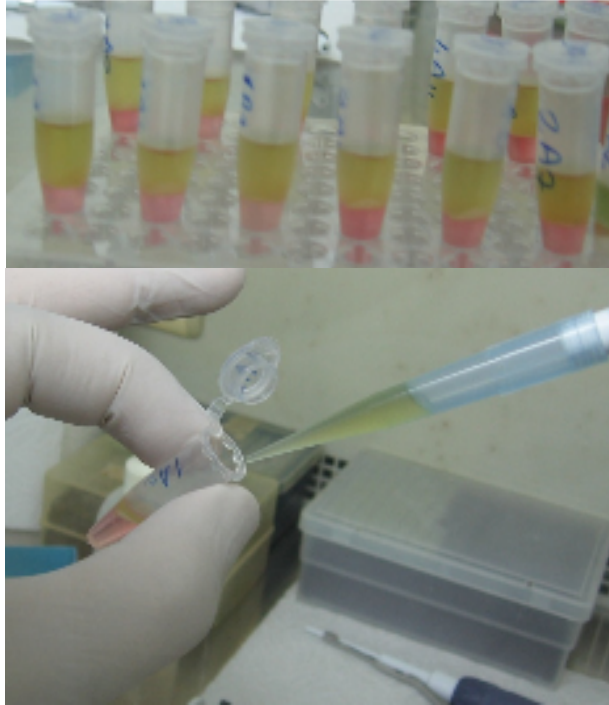
2.2.4.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA, Chomczynski ve Sacchi (1987) tarafından tanımlanan, guanidin isothiocyanate/Phenol-kloform metodunun modifikasyonu olan Tri-Reagent kullanılarak elde edildi (24).

Total RNA izolasyonu amacıyla Tri-Reagent içerisindeki doku +4°C de, 12000 g' de 10 dakika Santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra

İstenmeyen dokular içeren dipteki pelet alınmadan üstteki berrak sıvı (DNA-RNA içeren kısım) alındı. Süpernatant 1,5 ml'lik yeni steril ependorflara konuldu.

Süpernatant steril ependorfa alındıktan sonra üzerine 0,2 ml kloroform ilave edildi. 10-15 s çalkalandıktan sonra oda ısısında 10-15 d bekletildi. Bu aşamadan sonra +4°C, 12000 g'de 15 d santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra tüpte 3 tabaka oluştu. En üstteki şeffaf tabaka RNA, ortada pembe ince halka DNA ve dipte koyu kırmızı tabaka protein içermektedir. Mümkün olduğunca DNA'ya dokunmadan RNA alındı (Resim 2).



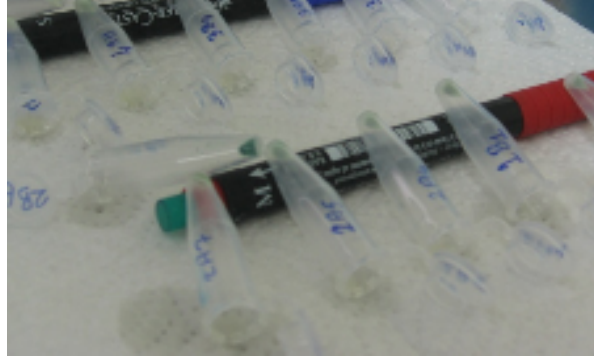
Resim 2: Doku Homojenizatında RNA ve DNA'nın Görünümü

Alınan RNA yeni ependorfa konuldu ve üzerine 0,5 ml İzopropanol eklenip 5-10 d oda ısısında bekletildikten sonra 10 d, 12000 g, +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra RNA pelet şeklinde tüpün dip kenarına yapıştı. Üstteki sıvı (süpernatant) tüp eğilerek uzaklaştırıldı. Peleti yıkamak için üzerine %75'lik Ethanolden 1 ml konuldu. Ardından 3-5 n vortekslenerek peletin yapıştığı yerden ayrılması sağlandı. 7500 g, +4°C'de 5 d santrifüj yardımıyla pelet çöktürüldü (Resim 3).



Resim 3: RNA'nın Pelet Şeklinde Görünümü

Ethanol ile yıkama aşamasından sonra üzerindeki alkol döküldü. Tüpün ağzı bir kağıt havluya hafifçe vurularak alkolün tamamının dökülmesi sağlandı (Resim 4).



Resim 4: Tüplerden Alkolün Uzaklaştırılması

Kalan alkolün uçması için tüpün ağzı açık bir şekilde oda ısısında 5-10 d bekletildi. Üzerine ortalama 30-40 μ l bidistile su konuldu. Tüpler 10-15 d, 55-60°C'deki su banyosunda bekletilerek peletin çözülmesi sağlandı. 1 μ l'deki RNA konsantrasyonu Spektrofotometre ile 260-280 nm dalga boyunda köre (NF su) karşı ölçüldü.

2.2.4.2. mRNA Eldesi

mRNA'lar çekirdekten çıkarken son uçlarına çok sayıda adenin (poly A) bağlanır. mRNA'nın bu özelliğinden faydalanılarak OligodT ile bağlanması sağlanır. Bu primerin çalıştığı en ideal ısı derecesi 70°C'dir. RNA'nın miktarı

her tüpte farklı olduğu için örneklere konulacak Oligo dT miktarı aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

$$\text{RNA miktarı} + \text{Oligo DT miktarı} + \text{Nükleaz Free Su Miktarı} = 15 \mu\text{l}$$

ÖRNEK: 1,8 (RNA miktarı) + 2 (oligo DT, sabit) + 11,2 (NF su miktarı) = 15 μl

Örnek tüpleri, her bir numunedeki RNA konsantrasyonu baz alınarak ve tüplere konulacak oligo DT miktarı (2 μl) sabit tutularak toplam tüp hacmini 15 μl 'ye tamamlayacak şekilde NF su eklenerek hazırlandı.

Örnekler hazırlandıktan sonra cDNA elde etmek için PCR cihazında 1. programa konuldu (Resim 5). Bu şekilde mRNA elde edilmiş oldu.

PCR 1. PROGRAM

- a. 70°C'de 5 d ısıtma
- b. 4°C'de 2 d soğutma



Resim 5: PCR Sistemi

2.2.4.3. cDNA Eldesi

cDNA elde etmek için öncelikle dNTP set ve MMLV master miks adlı karışımlar hazırlandı.

dNTP set hazırlanması:

dNTP set içerisinde her bir bazı içeren 4 ayrı tüp vardır (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Her bir tüpten 40 µl dört ayrı tüpe konuldu. Daha sonra her bir tüp üzerine 60 µl nükleazsız su eklenerek kısa bir süre vortekslendi.

MMLV master miks hazırlanması:

Her bir örnek için 8 µl MMLV enzim buffer, 2 µl dATP, 2 µl dCTP, 2 µl dGTP, 2 µl dTTP, 1 µl rRNA'sin, 1,6 µl MMLV-RT, 6,4µl Nükleazsız su eklenerek her bir tüp için 25 µl karışım elde edildi. PCR 1. programdan çıkarılan örneklerin her birine laminal hood içerisinde 25 µl master miks eklendi. Bu aşamadan sonra PCR 2. Program ile devam edildi.

PCR 2. PROGRAM
<p>a. 37°C 1 s ısıtma</p> <p>b. 95°C 5 d ısıtma</p> <p>c. 4°C soğutma</p>

İkinci programın tamamlanması ile cDNA'yı elde edilmiş oldu.

2.2.4.4. Primer ve Mastermiks hazırlanması

Primerlerin hazırlanması

Primer liyofilize olduğu için öncelikle birkaç dakika santrifüj edildi (7500 g, 1 d, +4°C). Üzerine 500 µl NF su ilave edilerek çözdürüldü. Çözdürülen primerler kısa bir süre vortekslenerek 7500 rpm'de 1 d tekrar santrifüj edildi.

Master Miks'in hazırlanması

Bir tüp için, 5 µl taq buffer, 1 µl dNTP, 1 µl Primer forward, 1 µl Primer revers, 1 µl Taq enzimi, 41 µl NF su eklenerek hacimler 50 ml'ye

tamamlandı. Hazırlanan mastermiks kısa bir süre vortekslendi. Daha sonra her bir tüp için 50 µl master miks, 2 µl örnek (cDNA'sı elde edilmiş örneklerden) ve 2 µl mineral oil ilave edildi. Hazırlanan tüpler PCR cihazında 3. programa konuldu.

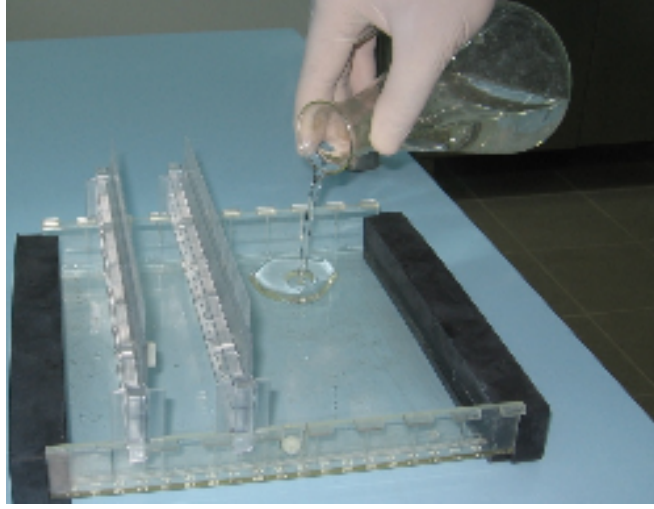
PCR 3.PROGRAM
<p>a. 94°C'de 5 d ısıtma b. 60°C'de 1 d ısıtma c. 72°C'de 1,5 d ısıtma d. 94°C'de 1 d ısıtma e. 60°C'de 1 d ısıtma f. c adımına dönülerek e adımına kadar gerçekleşen işlemler 30 kez tekrarlandı g. 72°C'de 10 d ısıtma h. 4°C'ye soğutulularak bekletme</p>

PCR cihazında yukarıdaki aşamalardan geçen ve son ürün olarak adlandırılan numuneler Jel Elektroforez işlemi için hazır hale gelmiş oldu. Cihazdan çıkarılan son ürünler jelde yürütme işlemine kadar -20°C'de depolandı.

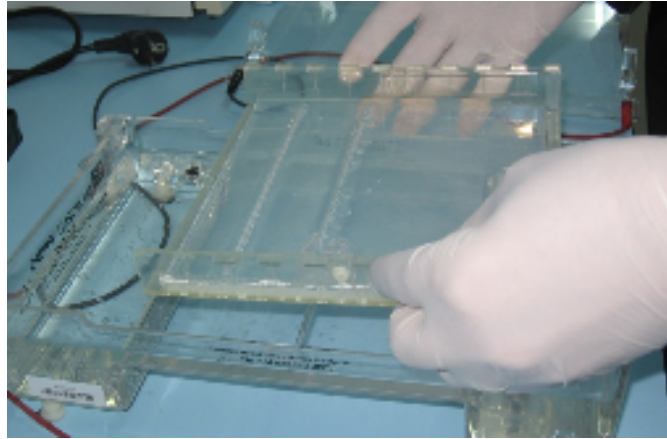
2.2.4.5. Jel Hazırlama

%1,5'lük jel hazırlamak amacıyla 3,75 g Agar (Agarose Mol. Bio. Grade) tartıldıktan sonra 245 ml TBE eklenerek hiç tortu kalmayacak şekilde mikrodalga fırında 5 d sürede eritildi. 1 µl ethidium bromide eklenip çalkalandı. Jel Elektroforez tankına ait 24 dişlik taraklar resimdeki gibi yerleştirildikten sonra, hazırlanan jel kalıba döküldü (Resim 6). Jel tankı oda ısısında 10 d bekletilerek jelin donması sağlandı. Kalıp içerisindeki jel renginin grileşmesiyle jelin donduğu anlaşıldı ve kalıp içerisindeki taraklar

yavaşça çıkarıldı. Taraklar çıkarıldıktan sonra kalıp, içerisinde TBE bulunan jel elektroforez tankına yerleştirildi (Resim 7).



Resim 6: Jel Dökme İşlemi

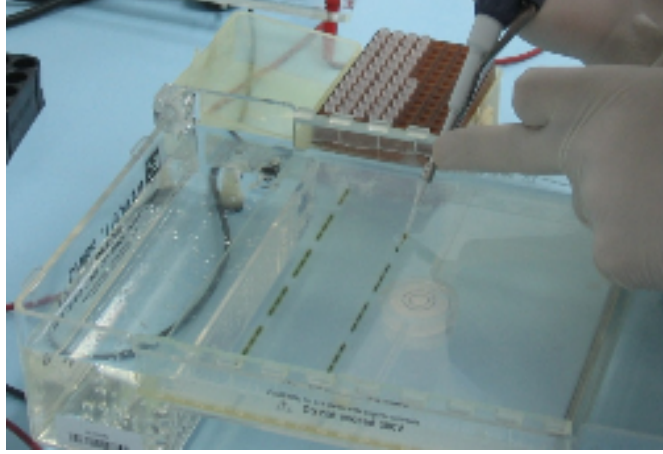


Resim 7: Kalıbın Jel Elektroforez Tankına Yerleştirilmesi

2.2.4.6. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Jelde Koşturulması

Tarakların çıkarılmasıyla jel üzerinde elde ettiğimiz kuyucuklardan en baştakine içerisine 2 μ l loading dyle (boya) eklenmiş 8 μ l DNA loading marker solüsyonu konuldu. Sonraki kuyucuklara ise 2 μ l loading dyle (boya) + 10 μ l örnekler yan yana Resim 8'deki gibi yüklendi. Tüm örnekler yüklendikten sonra, tankın üst kapağı kapatılarak Jel Elektroforez cihazı 100

volt'a ayarlandı ve 1 saat süresince yürütülme işlemi gerçekleştirildi (Resim 9).



Resim 8: Örneklerin Jeldeki Kuyucuklara Yüklenmesi



Resim 9: Jel Elektroforez Sistemi

2.2.5. Histopatolojik Analizler

Çalışmanın 45. günü bütün deneklerden sol kalpten arterial kan alındıktan sonra servikal dekapitasyon ile ötenazi edildi. Daha sonra sistemik nekropsileri yapılan bu farelerden karaciğer, böbrek, dalak ve bağırsaklarından doku örnekleri alınarak %10'luk tamponlu formalin

solüsyonunda tespit edildi. Tespit edilen dokular çeşme suyunda yıkanarak dereceli alkoller, ksilol ve parafin serilerinden geçirilerek parafinde bloklandı. Parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında alınan kesitler hematoksilin-eozin (H.E.) ile boyanarak oluşan Mikroskobik lezyonlar ışık mikroskobunda değerlendirildi (98).

2.2.6. İstatistik yöntem

Her bir grubun deney öncesi ve sonrası ağırlık değişimleri ile gruplar arasındaki ağırlık değişimlerini karşılaştırmak için tek faktörde tekrarlı ölçümler için iki faktörlü ANOVA modeli kullanılmıştır. Çünkü karışık desenler için iki faktörlü ANOVA, gruplar arası ve gruplar içi desenin birlikte yer aldığı karışık ölçümlerin analizinde sıklıkla kullanılan çok faktörlü bir analizdir (2, 17). Bahsi geçen desen iki faktörü içerir. Bu araştırmada, deneysel işlemler (kontrol, aflatoksin, aflatoksin+kefir ve kefir) birinci faktörü; canlı ağırlığı için yapılan ön ve son ölçümler (tekrarlı ölçümler) ise ikinci faktörü oluşturmaktadır.

Deneysel işlemlerin gruplar arasında herhangi bir fark yaratıp yaratmadığı Kruskal Wallis H-Testi kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen veriler, eşit evren ortalamaları hipotezini test etmek üzere kullanılan Tek Yönlü Varyans Analizinin gerektirdiği normallik ve varyansların homojenliği varsayımını karşılamadığı için Tek yönlü ANOVA yerine non-parametrik bir istatistik olan Kruskal Wallis H-testi tercih edilmiştir (2, 17). Gruplar arasında gözlenen anlamlı farkın hangi gruplar arasındaki anlamlı farklılara bağlı olarak ortaya çıktığı ise grupların ikili kombinasyonları üzerinden Mann Whitney U-testi uygulanarak farkın kaynağı incelenmiştir. Araştırmanın tüm istatistiksel işlemleri SPSS 15.0 paket programı ile gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Farelerin Canlı Ağırlık Bulguları

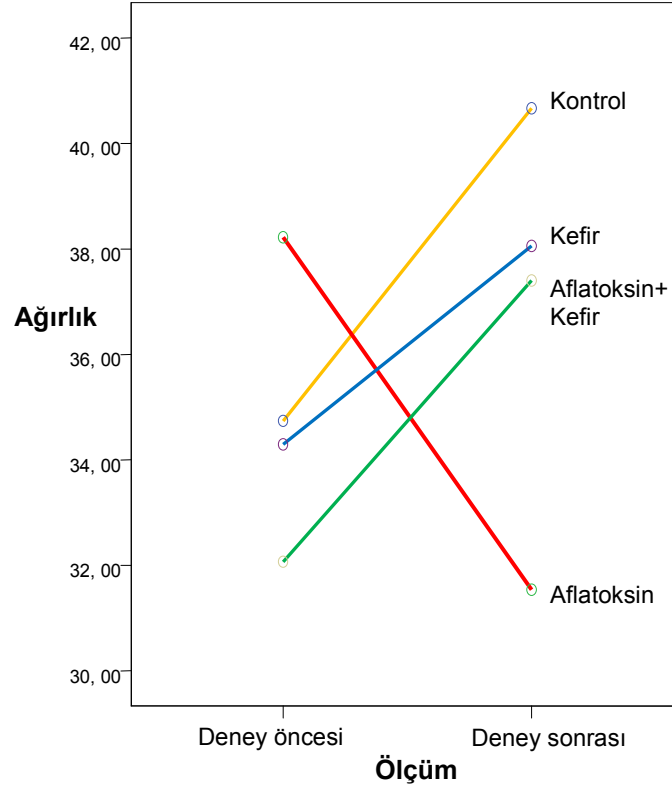
Deneyisel uygulamaların başlangıç ve bitiminde deney hayvanlarının ölçülen canlı vücut ağırlık ortalamalarının gruplara göre dağılımı Tablo 7' de gösterilmiştir.

Tablo 7: Deney öncesi ve sonrası ağırlık aritmetik ortalama ve standart sapma değerleri

Deney Grupları*	Deney öncesi ağırlık (gr)			Deney sonrası ağırlık (gr)		
	N	\bar{x}	S	N	\bar{x}	S
Kontrol (A)	10	34,74	5,03	10	40,67	3,85
Aflatoksin (B)	10	38,22	4,97	10	31,54	2,85
Aflatoksin+Kefir (C)	10	32,07	4,04	10	37,40	3,57
Kefir (D)	11	34,29	4,49	11	38,05	3,52

*A: Standart yem+su, Aflatoksin B: Standart yem+su+AFB₁(300ppb), C: Standart yem+su+AFB₁(300ppb)+Kefir (30ml/kg), D: Standart yem+su+ Kefir (30ml/kg)

Tablo 7'de görüldüğü gibi kontrol grubu ağırlık ortalaması deney öncesinde 34,74 iken deney bitiminde 40,67'ye yükselmiştir. Aflatoksin+kefir uygulanan grubun ağırlık ortalaması deney öncesinde 32,07 iken deney sonrasında 37,40' a yükselmiştir. Kefir grubunda ise 34,29 olan başlangıç ağırlık ortalaması deney sonunda 38,05 olarak ölçülmüştür. Kontrol, Aflatoksin+kefir ve Kefir uygulanan gruplardaki deney hayvanlarının ağırlıklarında deney süresince bir artış gözlenmesine karşın; Aflatoksin uygulanan grupta deney öncesi ağırlık ortalaması 38,22 iken bu değer deney sonrasında 31.54'e düşmüştür. Ağırlıklardaki bu değişim Grafik 3'de gösterilmiştir.



Grafik 3: Ağırlık değişim grafiği

Deneyel uygulamaların, deney öncesine göre deney sonrasında gözlenen söz konusu ağırlık değişmelerinin anlamlı bir farklılık gösterip göstermediğine ilişkin iki faktörlü Anova sonuçları Tablo 8’ de verilmiştir.

Tablo 8: Deney öncesi ve sonrası ağırlıkların ANOVA sonuçları

Varyansın Kaynağı		Kareler Toplamı	Sd	Kareler Ortalaması	F	P
Gruplararası	581,233					
Grup (Deneyel işlemler)		114,536	3	38,179	3,027	.042
Hata		466,697	37	12,613		
Denekleriçi	1378,349					
Ölçüm (Deney öncesi-sonrası)		88,937	1	88,937	4,310	.045
Grup*ölçüm		525,968	3	175,323	8,497	.000
Hata		763,444	37	20,634		
Toplam	1959,582					

Tablo 8'e göre deneysel uygulamaların deneklerin ağırlıkları üzerinde deney öncesinden sonrasına anlamlı farklılık gösterdiği, yani farklı deneysel gruplarda olmak ile tekrarlı ölçümler faktörlerinin ağırlık üzerindeki ortak etkilerinin anlamlı olduğu bulunmuştur [$F_{(1-37)} = 8,497$, $p < .01$]. Bu bulgu, deneysel işlemlerin deney hayvanlarının canlı ağırlıkları üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Yapılan bu açıklama iki faktörün (deneysel işlemler-ölçümler) ortak etkisine vurgu yapmaktadır. Ancak analiz ile aynı zamanda deneysel işlemler ve ölçümlerin ayrı ayrı temel etkileri de tespit edilebilmektedir. Bu durum şu şekilde yorumlanabilir. Deneysel işlemler 4 ayrı gruptaki deney hayvanlarının ağırlıkları üzerinde anlamlı bir farklılaşma yaratmıştır [$F_{(1-37)} = 3,027$, $p < .05$]. Ayrıca ölçüm temel etkisi ile ilgili olarak da deney öncesinden deney sonrasına deneklerin ağırlık ortalamaları arasında anlamlı bir farklılaşma olduğu görülmektedir [$F_{(1-37)} = 4,310$, $p < .05$].

3.2. Biyokimyasal bulgular

Gruplar arasındaki farklılaşmalar Kruskal Wallis H-Testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Yapılan istatistikler, deneysel işlemlerin tüm parametler için gruplar arasında anlamlı bir farklılaşmaya neden olduğunu ortaya koymuştur. Ortaya çıkan farkın hangi gruplar arasında olduğunu tespit etmek amacıyla non-parametrik ve grupları ikişerli olarak karşılaştırma esasına dayalı bir istatistik teknik olan Mann Whitney U-testi kullanılmıştır.

3.2.1. Serum AST, ALT ve LDH Bulguları

Deneysel uygulamalardan sonra alınan kan örneklerinin analizinde elde edilen AST, ALT ve LDH sonuçlarına ait grup ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 9' da verilmiştir.

Tablo 9: AST, ALT ve LDH Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Parametre	Deneysel Grupları*	n	\bar{x}	S
AST (IU/L)	Kontrol (A)	10	323,50	149,99
	Aflatoksin (B)	7	732,43	171,77
	Aflatoksin+Kefir (C)	8	734,50	123,33
	Kefir (D)	8	721,62	256,05
ALT (IU/L)	Kontrol (A)	10	191,50	127,05
	Aflatoksin (B)	8	272,25	85,39
	Aflatoksin+Kefir (C)	8	150,37	47,42
	Kefir (D)	8	203,25	76,73
LDH (IU/L)	Kontrol (A)	4	2712,50	990,72
	Aflatoksin (B)	8	4145,62	1157,84
	Aflatoksin+Kefir (C)	8	2915,12	630,59
	Kefir (D)	8	3581,25	1173,04

*A: Standart yem+su, Aflatoksin B: Standart yem+su+AFB₁(300ppb), C: Standart yem+su+AFB₁(300ppb)+Kefir (30ml/kg), D: Standart yem+su+ Kefir (30ml/kg)

Tablo 10’da deneysel uygulamaların AST enzimi üzerindeki etkisinin gruplara göre farklılaşması gösterilmektedir. Tablodaki “**anlamli fark**” sütununda belirtilen karşılaştırmalar, hangi gruplar arasında fark olduğunu ifade eden Mann Whitney U-testi sonuçlarını yansıtmaktadır.

Tablo 10: AST bulguları için Deneysel Uygulamaların Kruskal Wallis H-Testi sonuçları

Deney Grupları	N	Sıra Ortalaması	sd	χ^2	P	Anlamli Fark
Kontrol (A)	10	6,90	3	15,81	.001	A-B, A-C, A-D
Aflatoksin (B)	7	21,29				
Aflatoksin+Kefir (C)	8	20,50				
Kefir (D)	8	22,38				

Analiz sonuçları, AST değerlerinde deneysel uygulamalar sonrasında anlamlı bir fark oluştuğunu göstermektedir [$\chi^2_{(3)} = 15,81, p < .01$]. Bu bulgu, deneysel işlemlerin AST enzimi için gruplar arasında anlamlı bir fark oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Farkın kaynağı, grupların ikili kombinasyonları üzerinden Mann Whitney U-testi uygulanarak incelendiğinde

kontrol grubunun diğer deney gruplarına göre anlamlı şekilde farklı olduğu bulunmuştur. Ayrıca grupların sıra ortalamaları dikkate alındığında uygulama sonrasında en yüksek AST değerinin Kefir grubunda ($\bar{x}=721,62$), en düşük AST değerinin ise kontrol grubunda ($\bar{x}=323,50$) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 9). AST değerinin Kefir (D) grubunda en yüksek değeri alması kefir içeceğinin karaciğer hasarına neden olduğuna işaret etmemektedir. Böyle bir sonuç, ancak numune yetersizliğine bağlı olarak gerçekleşmiş bir analiz hatası olarak yorumlanabilir.

Tablo 11’de deneysel uygulamaların ALT enzimi üzerindeki etkisinin gruplara göre farklılaşması gösterilmektedir. Bu tablodaki “**anlamlı fark**” sütununda belirtilen karşılaştırmalar, hangi gruplar arasında fark olduğunu ifade eden Mann Whitney U-testi sonuçlarını yansıtmaktadır.

Tablo 11: ALT bulguları için Deneysel Uygulamaların Kruskal Wallis H-Testi sonuçları

Deney Grupları	N	Sıra Ortalaması	sd	χ^2	P	Anlamlı Fark
Kontrol (A)	10	15,55	3	8,06	.045	B-C
Aflatoksin (B)	8	25,38				
Aflatoksin+Kefir (C)	8	11,75				
Kefir (D)	8	17,81				

Analiz sonuçları, ALT değerlerinde deneysel uygulamalar sonrasında anlamlı bir şekilde fark oluştuğunu göstermektedir [$\chi^2_{(3)} = 8,06$, $p < .05$]. Bu bulgu, deneysel işlemlerin ALT enzimi için gruplar arasında anlamlı bir fark oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Farkın kaynağı, grupların ikili kombinasyonları üzerinden Mann Whitney U-testi uygulanarak incelendiğinde aflatoksin ile aflatoksin+kefir grupları arasında anlamlı bir fark olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Grupların sıra ortalamaları dikkate alındığında uygulama sonrasında en yüksek ALT değerinin Aflatoksin grubunda ($\bar{x}=272,25$), en düşük ALT değerinin ise Aflatoksin+Kefir grubunda ($\bar{x}=150,37$) olduğu tespit edilmiştir.

Aşağıdaki Tablo 12’de deneysel uygulamaların LDH enzimi üzerindeki etkisinin gruplara göre farklılaşması gösterilmektedir. Tablo 12’deki “anlamlı fark” sütununda belirtilen karşılaştırmalar, hangi gruplar arasında fark olduğunu ifade eden Mann Whitney U-testi sonuçlarını yansıtmaktadır.

Tablo 12: LDH bulguları için Deneysel Uygulamaların Kruskal Wallis H-Testi sonuçları

Deney Grupları	n	Sıra Ortalaması	sd	χ^2	P	Anlamlı Fark
Kontrol (A)	4	9,63	3	8,29	.04	B-C
Aflatoksin (B)	8	20,31				
Aflatoksin+Kefir (C)	8	9,75				
Kefir (D)	8	15,88				

Analiz sonuçları, LDH değerlerinin deneysel uygulamalar sonrasında anlamlı bir şekilde farklılaştığını göstermektedir [$\chi^2_{(3)} = 8,29$, $p < .05$]. Bu bulgu, deneysel işlemlerin LDH enzimi için gruplar arasında anlamlı bir fark oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Farkın kaynağı, grupların ikili kombinasyonları üzerinden Mann Whitney U-testi uygulanarak incelendiğinde aflatoksin ile aflatoksin+kefir grupları arasında anlamlı bir fark olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Grupların sıra ortalamaları dikkate alındığında uygulama sonrasında en yüksek LDH değerinin Aflatoksin grubunda ($\bar{x} = 4145,62$), en düşük ALT değerinin ise Aflatoksin+Kefir grubunda ($\bar{x} = 2915,12$) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 9).

3.2.2. Serum ALBUMİN Bulguları

Deneysel uygulamalar sonrasında alınan kan örneklerinin analizinde elde edilen albümin sonuçlarına ait grup ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 13’de verilmiştir.

Tablo 13: Serum ALBÜMİN Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Parametre	Deney Grupları*	n	\bar{x}	S
ALBÜMİN (gr/dl)	Kontrol (A)	10	3,03	0,15
	Aflatoksin (B)	8	2,46	0,35
	Aflatoksin+Kefir (C)	8	2,49	0,21
	Kefir (D)	8	2,65	0,24

*A: Standart yem+su, Aflatoksin B: Standart yem+su+AFB₁(300ppb), C: Standart yem+su+AFB₁(300ppb)+Kefir (30ml/kg), D: Standart yem+su+ Kefir (30ml/kg)

Tablo 14’de deneysel uygulamaların serum albümin üzerindeki etkisinin gruplara göre farklılaşması gösterilmektedir. Tablo 15’deki “**anlamlı fark**” sütununda belirtilen karşılaştırmalar, hangi gruplar arasında fark olduğunu ifade eden Mann Whitney U-testi sonuçlarını yansıtmaktadır.

Tablo 14: Albümin bulguları için Deneysel Uygulamaların Kruskal Wallis H-Testi sonuçları

Deney Grupları	n	Sıra Ortalaması	sd	χ^2	P	Anlamlı Fark
Kontrol (A)	10	28,30	3	18,03	.00	A-B, A-C, A-D
Aflatoksin (B)	8	11,25				
Aflatoksin+Kefir (C)	8	11,44				
Kefir (D)	8	16,31				

Elde ettiğimiz sonuçlar, deneysel uygulamaların her bir deneysel gruba ait ALBÜMİN değerlerini anlamlı bir şekilde farklılaştırdığını göstermektedir [$\chi^2_{(3)} = 18,03$, $p < .01$]. Farkın kaynağı, grupların ikili kombinasyonları üzerinden incelendiğinde kontrol grubunun ($\bar{x} = 3,03$), aflatoksin ($\bar{x} = 2,46$), aflatoksin+kefir ($\bar{x} = 2,49$), ve kefir ($\bar{x} = 2,65$), gruplarından anlamlı bir şekilde farklılaştığı sonucuna ulaşılmıştır (Tablo 13).

3.2.3. Lipit Peroksidasyon Bulguları

Deneyisel uygulamalar sonrasında alınan karaciğer dokularının analizi ile elde edilen MDA değerlerine ait grup ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 15’de verilmiştir.

Tablo 15: MDA Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Parametre	Deney Grupları*	n	\bar{x}	S
MDA (nmol/ml)	Kontrol (A)	10	1,06	0,36
	Aflatoksin (B)	10	4,94	2,45
	Aflatoksin+Kefir (C)	10	1,14	0,42
	Kefir (D)	11	1,03	0,75

*A: Standart yem+su, Aflatoksin B: Standart yem+su+AFB₁(300ppb), C: Standart yem+su+AFB₁(300ppb)+Kefir (30ml/kg), D: Standart yem+su+ Kefir (30ml/kg)

Tablo 16’da deneysel uygulamaların MDA seviyesine olan etkisinin gruplara göre farklılaşması gösterilmektedir. Tablo 16’daki “**anlamlı fark**” sütununda belirtilen karşılaştırmalar, hangi gruplar arasında fark olduğunu ifade eden Mann Whitney U-testi sonuçlarını yansıtmaktadır.

Tablo 16: MDA bulguları için Deneysel Uygulamaların Kruskal Wallis H-Testi sonuçları

Deney Grupları	n	Sıra Ortalaması	sd	χ^2	P	Anlamlı Fark
Kontrol (A)	10	16,45	3	22,66	.00	A-B, B-C, B-D
Aflatoksin (B)	10	36,50				
Aflatoksin+Kefir (C)	10	17,70				
Kefir (D)	11	14,05				

Elde ettiğimiz sonuçlar, deneysel uygulamaların her bir deneysel gruba ait MDA değerlerini anlamlı bir şekilde farklılaştırdığını göstermektedir [$\chi^2_{(3)} = 22,66$, $p < .01$]. Farkın kaynağı, grupların ikili kombinasyonları üzerinden istatistik olarak incelendiğinde kontrol grubu ($\bar{x} = 1,06$) ile aflatoksin ($\bar{x} = 4,94$) grubu, aflatoksin ($\bar{x} = 4,94$) ile aflatoksin+kefir ($\bar{x} = 1,14$) ve aflatoksin+kefir ($\bar{x} = 1,14$) ile kefir ($\bar{x} = 1,03$) grupları arasında anlamlı bir farklılaşma olduğu sonucuna varılmıştır (Tablo 15).

3.2.4. Antioksidan Enzim Bulguları

Deneysel uygulamalar sonrasında alınan karaciğer dokularının analizi ile elde edilen GSH ve GST değerlerine ait grup ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 17’de verilmiştir.

Tablo 17: GSH ve GST Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Parametre	Deneysel Grupları*	n	\bar{x}	S
GSH (nmol/ml)	Kontrol (A)	10	1,21	0,16
	Aflatoksin (B)	10	0,87	0,08
	Aflatoksin+Kefir (C)	10	1,81	0,69
	Kefir (D)	11	1,28	0,11
GST ($\mu\text{mol/dk/ mg}$ protein)	Kontrol (A)	10	1,90	0,64
	Aflatoksin (B)	10	9,28	7,65
	Aflatoksin+Kefir (C)	10	2,36	0,66
	Kefir (D)	11	1,73	1,39

*A: Standart yem+su, Aflatoksin B: Standart yem+su+AFB₁(300ppb), C: Standart yem+su+AFB₁(300ppb)+Kefir (30ml/kg), D: Standart yem+su+ Kefir (30ml/kg)

Tablo 18’de deneysel uygulamaların GSH seviyesine olan etkisinin gruplara göre farklılaşması gösterilmektedir. Tablo 18’deki “**anlamlı fark**” sütununda belirtilen karşılaştırmalar, hangi gruplar arasında fark olduğunu ifade eden Mann Whitney U-testi sonuçlarını yansıtmaktadır.

Tablo 18: GSH bulguları için Deneysel Uygulamaların Kruskal Wallis H-Testi sonuçları

Deney Grupları*	n	Sıra Ortalaması	sd	χ^2	P	Anlamlı Fark
Kontrol (A)	10	21,70	3	25,26	.00	A-B, A-C, B-C, B-D
Aflatoksin (B)	10	5,50				
Aflatoksin+Kefir (C)	10	31,05				
Kefir (D)	11	25,32				

Analiz sonuçlarına göre deneysel uygulamaların gruplar arasında GSH değerleri açısından anlamlı bir farklılaşma oluşturduğunu göstermektedir [$\chi^2_{(3)} = 25,26$, $p < .01$]. Farkın kaynağı, grupların ikili kombinasyonları üzerinden Mann Whitney U-testi uygulanarak incelendiğinde kontrol ($\bar{x} = 1,21$) ile aflatoksin ($\bar{x} = 0,87$) grubu, kontrol ($\bar{x} = 1,21$) ile aflatoksin+kefir ($\bar{x} = 1,81$) grupları arasında anlamlı bir farklılaşma olduğu görülmektedir. Ayrıca Aflatoksin ($\bar{x} = 0,87$) grubu ile aflatoksin+kefir ($\bar{x} = 1,81$), aflatoksin grubu ($\bar{x} = 0,87$) ile kefir ($\bar{x} = 1,28$) grubu arasında anlamlı bir farklılaşma olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Tablo 17).

Tablo 19’da deneysel uygulamaların GST aktivitesine olan etkisinin gruplara göre farklılaşması gösterilmektedir. Tablo 19’daki “**anlamlı fark**” sütununda belirtilen karşılaştırmalar, hangi gruplar arasında fark olduğunu ifade eden Mann Whitney U-testi sonuçlarını yansıtmaktadır.

Tablo 19: GST bulguları için Deneysel Uygulamaların Kruskal Wallis H-Testi sonuçları

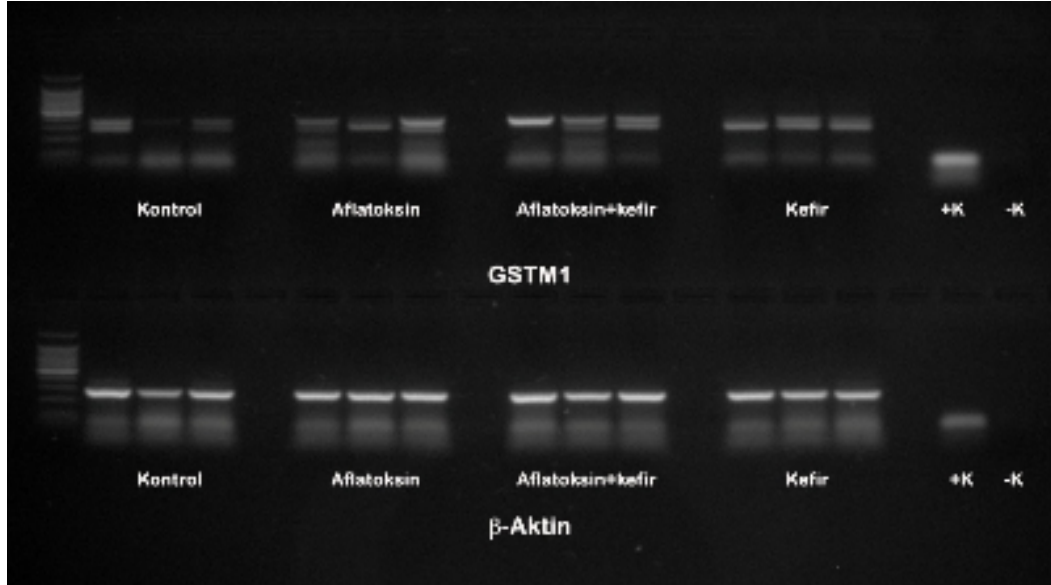
Deney Grupları	n	Sıra Ortalaması	sd	χ^2	P	Anlamlı Fark
Kontrol (A)	10	15,20	3	18,72	.00	A-B, B-C, B-D
Aflatoksin (B)	10	34,80				
Aflatoksin+Kefir (C)	10	19,90				
Kefir (D)	11	14,73				

Analiz sonuçları, deneysel uygulamaların gruplar arasında GST aktivitesi açısından anlamlı bir fark oluşturduğunu göstermektedir [$\chi^2_{(3)}=18,72$, $p<.01$]. Farkın kaynağı, grupların ikili kombinasyonları üzerinden Mann Whitney U-testi ile incelendiğinde; kontrol grubu ($\bar{x}=1,90$) ile aflatoksin ($\bar{x}=9,28$) grubu, aflatoksin ($\bar{x}=9,28$) grubu ile aflatoksin+kefir ($\bar{x}=2,36$) grubu ve Aflatoksin ($\bar{x}=9,28$) grubu ile kefir ($\bar{x}=1,73$) grubu arasında anlamlı bir farklılaşma olduğu görülmektedir (Tablo 17).

3.3. Gen Ekspresyon Bulguları

3.3.1. GSTM1 Gen Ekspresyon Bulguları

Numunelerin GSTM1 primerleriyle PCR cihazından elde edilen ürünlerin jel elektroforezde kontrol genimiz olan β -aktin ile koşturulması sonucu resimlenen görüntü Resim 10'da gösterilmiştir.



Resim 10: GSTM1 ve kontrol (β -aktin) gene ait jel görüntüsü

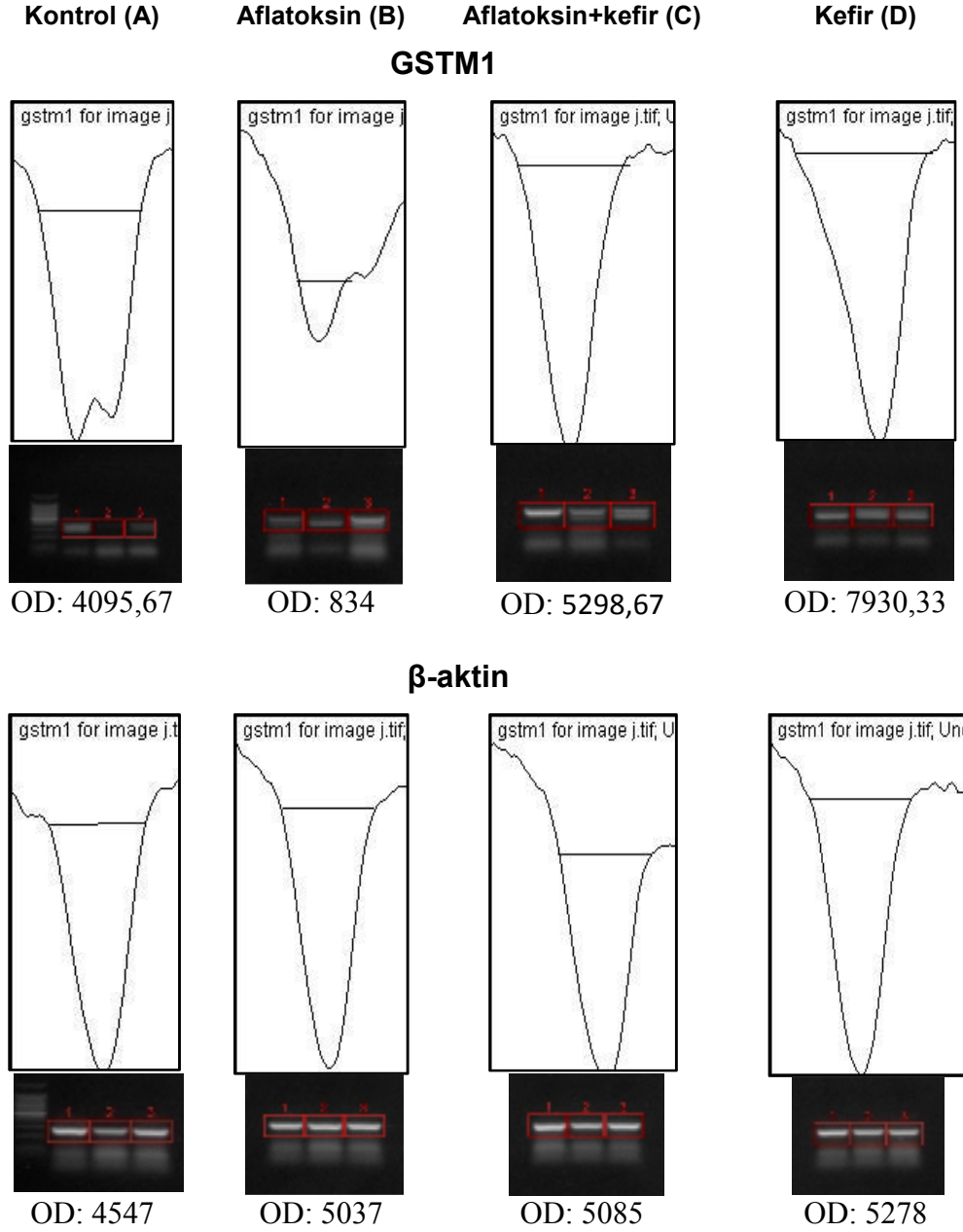
Deney gruplarına ait GSTM1 ve β -aktin dansitometre değerlerinin ortalama ve standart sapmaları Tablo 20'de gösterilmiştir.

Tablo 20: GSTM1 ve β -Aktin Dansitometre ortalama ve standart sapma değerleri

Parametre	Deney Grupları*	n	\bar{x}	S
GSM1	Kontrol (A)	3	4095,67	2190,03
	Aflatoksin (B)	3	834,00	222,72
	Aflatoksin+Kefir (C)	3	5298,67	2029,06
	Kefir (D)	3	7930,33	404,47
β -AKTİN	Kontrol (A)	3	4547,44	926,12
	Aflatoksin (B)	3	5037,76	405,17
	Aflatoksin+Kefir (C)	3	5085,98	208,01
	Kefir (D)	3	5278,16	915,84

*A: Standart yem+su, Aflatoksin B: Standart yem+su+AFB₁(300ppb), C: Standart yem+su+AFB₁(300ppb)+Kefir (30ml/kg), D: Standart yem+su+ Kefir (30ml/kg)

Deney gruplarına göre spesifik dansite ölçümleri sonucu elde edilen bant alanlarının grafiksel görünümü, ortalama dansite değerleri ve kontrol genleriyle karşılaştırılması şekil 13'de özetlenmiştir.



*A: Standart yem+su, Aflatoksin B: Standart yem+su+AFB₁(300ppb), C: Standart yem+su+AFB₁(300ppb)+Kefir (30ml/kg), D: Standart yem+su+ Kefir (30ml/kg)

Şekil 13: GSTM1 Dansite eğrilerinin kontrol genlerle karşılaştırılması

Tablo 21’de deneysel uygulamaların GSTM1 gen ekspresyonuna olan etkisinin gruplara göre farklılaşması gösterilmektedir.

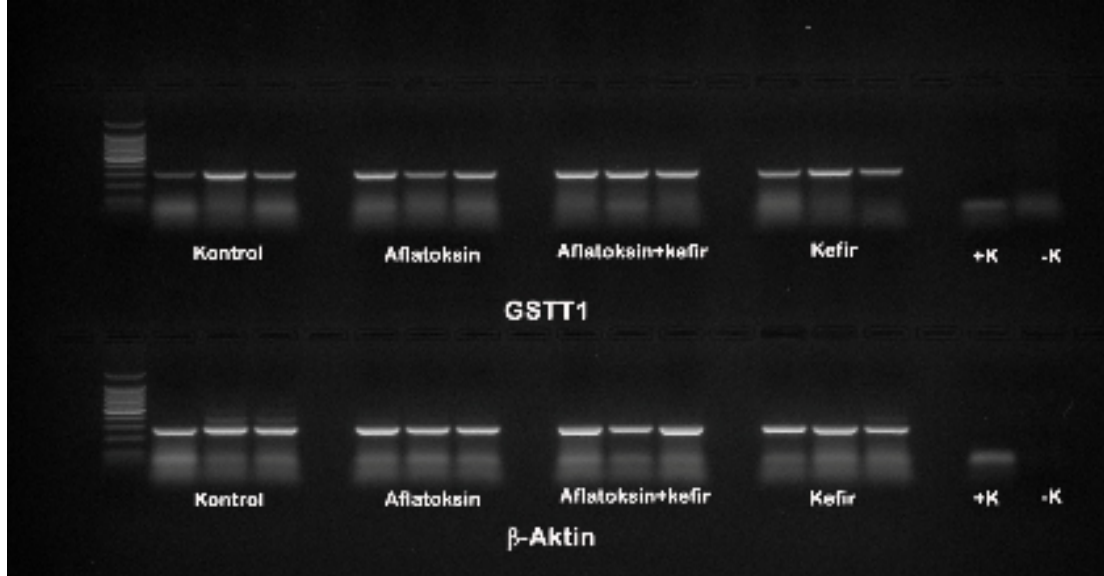
Tablo 21: GSTM1 ve β -aktin gen ekspresyon bulguları için Deneysel Uygulamaların Kruskal Wallis H-Testi sonuçları

	Deney Grupları	n	Sıra Ortalaması	sd	χ^2	P	Anlamlı Fark
GSTM1	Kontrol (A)	3	6	3	9,462	.024	A-B, B-C, B-D
	Aflatoksin (B)	3	2				
	Aflatoksin+Kefir (C)	3	7				
	Kefir (D)	3	11				
β -aktin	Kontrol (A)	3	5	3	0,744	,863	
	Aflatoksin (B)	3	6,67				
	Aflatoksin+Kefir (C)	3	7,33				
	Kefir (D)	3	7				

Analiz sonuçları, deneysel uygulamaların gruplar arasında GSTM1 gen ekspresyonu açısından anlamlı bir fark oluşturduğunu göstermektedir [$\chi^2_{(3)} = 9,462$, $p < .05$]. Farkın kaynağı, grupların ikili kombinasyonları üzerinden Mann Whitney U-testi ile incelendiğinde; kontrol grubu ($\bar{x} = 4095,67$) ile aflatoksin ($\bar{x} = 834$) grubu, aflatoksin ($\bar{x} = 834$) grubu ile aflatoksin+kefir ($\bar{x} = 5298,67$) grubu ve Aflatoksin ($\bar{x} = 834$) grubu ile kefir ($\bar{x} = 7930,33$) grubu arasında anlamlı bir farklılaşma olduğu görülmektedir (Tablo 20). Kontrol geni (β -aktin) ile ilgili sonuçlar değerlendirildiğinde gruplar arasındaki farkın anlamlı olmadığı açıkça görülmektedir ($\chi^2_{(3)} = 0,744$, $p > .05$).

3.3.2. GSTT1 Gen Ekspresyon Bulguları

Numunelerin çalışmada kullandığımız GSTT1 primerleriyle PCR cihazından elde edilen ürünlerin, jel elektroforezde kontrol genimiz olan β -aktin ile koşturulması sonucu resimlenen görüntü Resim 11'de görülmektedir.



Resim 11: GSTT1 ve kontrol (β -aktin) gene ait jel görüntüsü

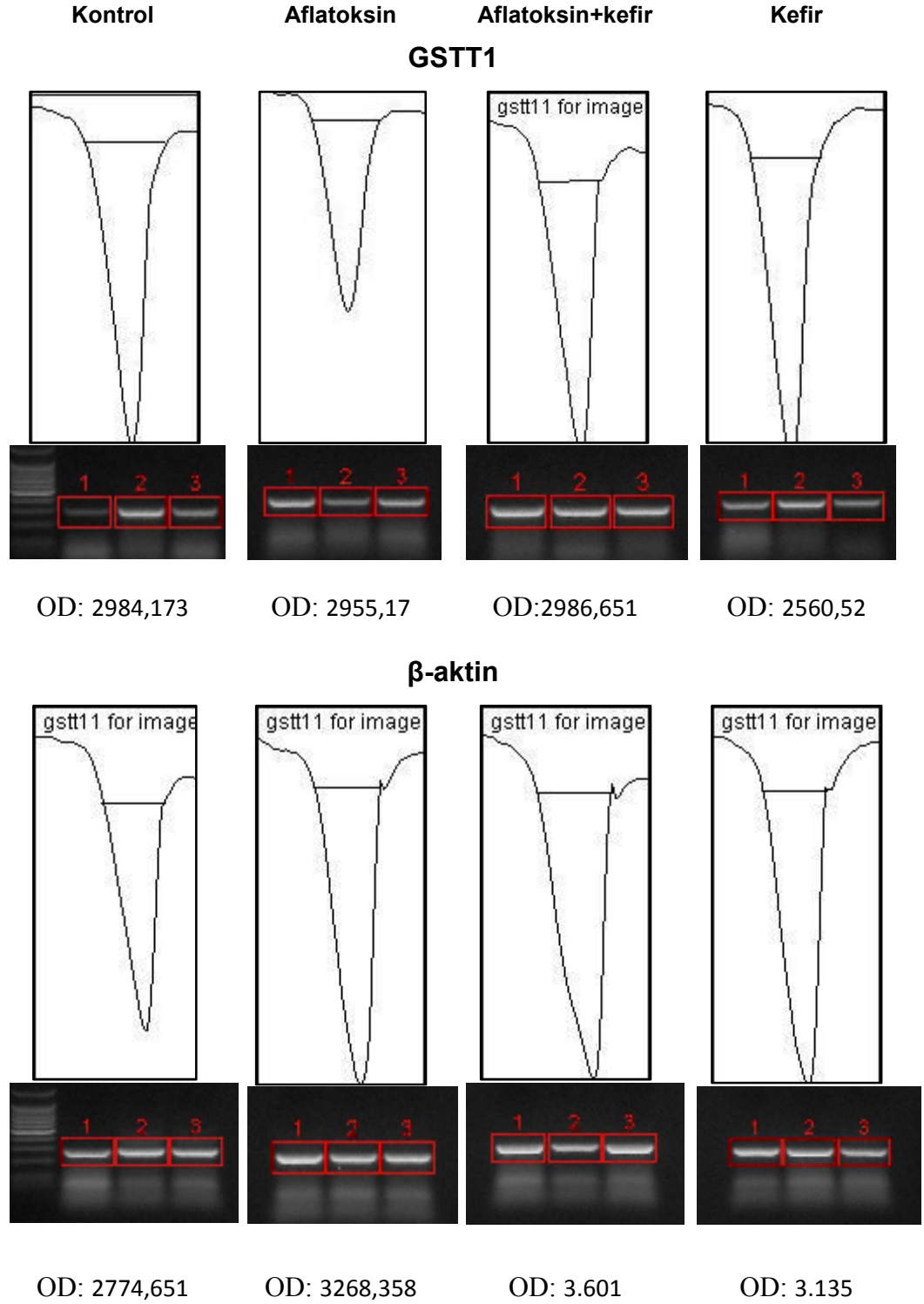
Deney gruplarına ait GSTT1 ve β -aktin dansitometre değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 22'de gösterilmiştir.

Tablo 22: GSTT1 ve β -Aktin Dansitometre ortalama ve standart sapma değerleri

Parametre	DeneySEL uygulamalar *	n	\bar{x}	S
GST1	Kontrol (A)	3	2984,17	632,72
	Aflatoksin (B)	3	2955,17	929,65
	Aflatoksin+Kefir (C)	3	2986,65	290,44
	Kefir (D)	3	2560,52	376,12
β -AKTİN	Kontrol (A)	3	2774,65	389,76
	Aflatoksin (B)	3	3268,36	309,05
	Aflatoksin+Kefir (C)	3	3600,84	340,58
	Kefir (D)	3	3134,65	494,23

*A: Standart yem+su, Aflatoksin B: Standart yem+su+AFB₁(300ppb), C: Standart yem+su+AFB₁(300ppb)+Kefir (30ml/kg), D: Standart yem+su+ Kefir (30ml/kg)

Deney gruplarına göre spesifik dansite ölçümleri sonucu elde edilen bant alanlarının grafiksel görünümü, ortalama dansite değerleri ve kontrol genleriyle karşılaştırılması Şekil 14'de özetlenmiştir.



Şekil 14: GSTT1 Dansite eğrilerinin kontrol genlerle karşılaştırılması

Tablo 23’de deneysel uygulamaların GSTT1 gen ekspresyonuna olan etkisinin gruplara göre farklılaşması gösterilmektedir. Tablodaki “**anlamli fark**” sütununda belirtilen karşılaştırmalar, kullanılan istatistik yöntemine dayanarak hangi gruplar arasında fark olduğunu ifade etmektedir.

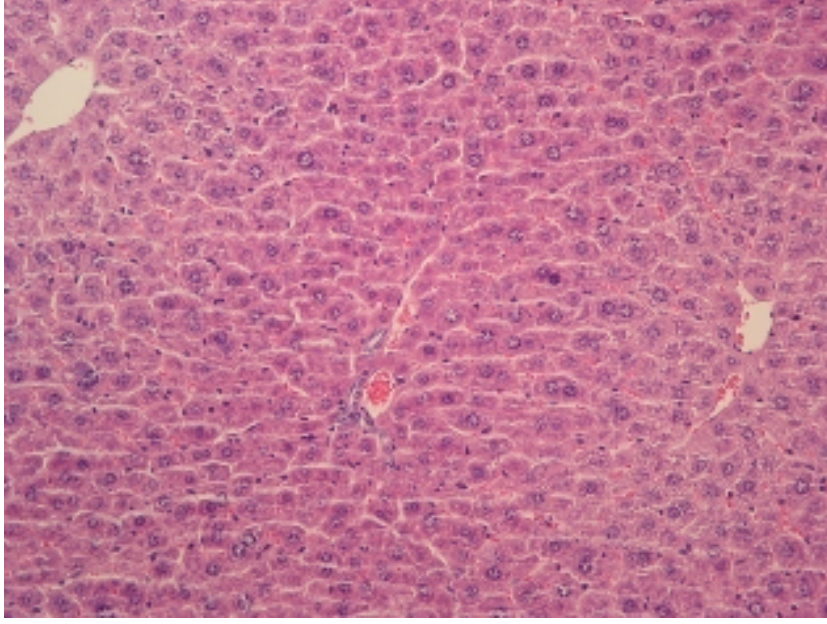
Tablo 23: GSTT1 ve β -aktin gen ekspresyon bulguları için Deneysel Uygulamaların Kruskal Wallis H-Testi sonuçları

	Deneysel uygulamalar	n	Sıra Ortalaması	sd	χ^2	P	Anlamli Fark
GSTM1	Kontrol (A)	3	7,67	3	1,974	.578	
	Aflatoksin (B)	3	7				
	Aflatoksin+Kefir (C)	3	7,33				
	Kefir (D)	3	4				
β -aktin	Kontrol (A)	3	2,67	3	5,872	.118	
	Aflatoksin (B)	3	7,33				
	Aflatoksin+Kefir (C)	3	9,67				
	Kefir (D)	3	6,33				

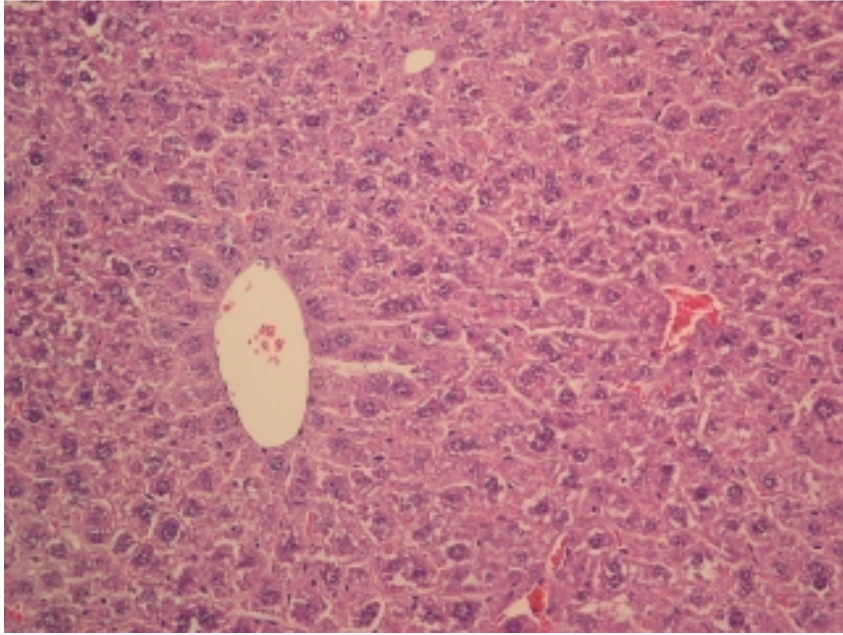
Analiz sonuçları, deneysel uygulamaların gruplar arasında GSTT1 gen ekspresyonu açısından anlamlı bir fark oluşturmadığını göstermektedir. Fakat P değeri 0,05 değerinden çok küçük bir oranda yüksek kalmıştır [$\chi^2_{(3)} = 1,974$, $p > .05$]. Kontrol geni (β -aktin) ile ilgili sonuçlar da GSTM1’de olduğu gibi değerlendirildiğinde gruplar arasındaki farkın anlamlı olmadığı açıkça görülmektedir ($\chi^2_{(3)} = 5,872$, $p > .05$).

3.4. Histopatolojik Bulgular

Çalışma gruplarında yer alan farelerde makroskopik bir bulgu görülmemiştir. Karaciğerin mikroskopik incelemesinde kontrol (Resim 12) ve sadece kefir (Resim 13) verilen deneklerde herhangi bir bulguya rastlanmadı.

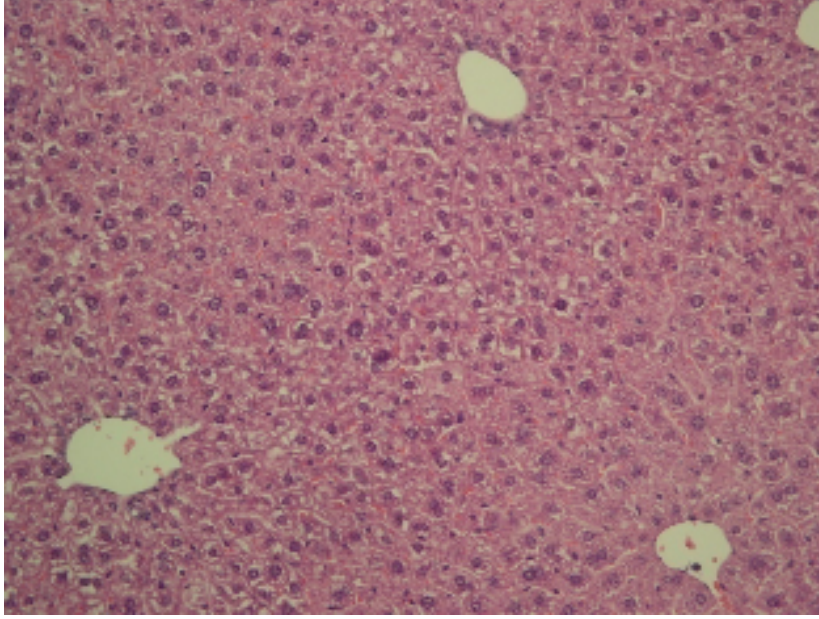


Resim 12: Kontrol grubundaki bir farede normal karaciğer histolojisi, x185, H.E.

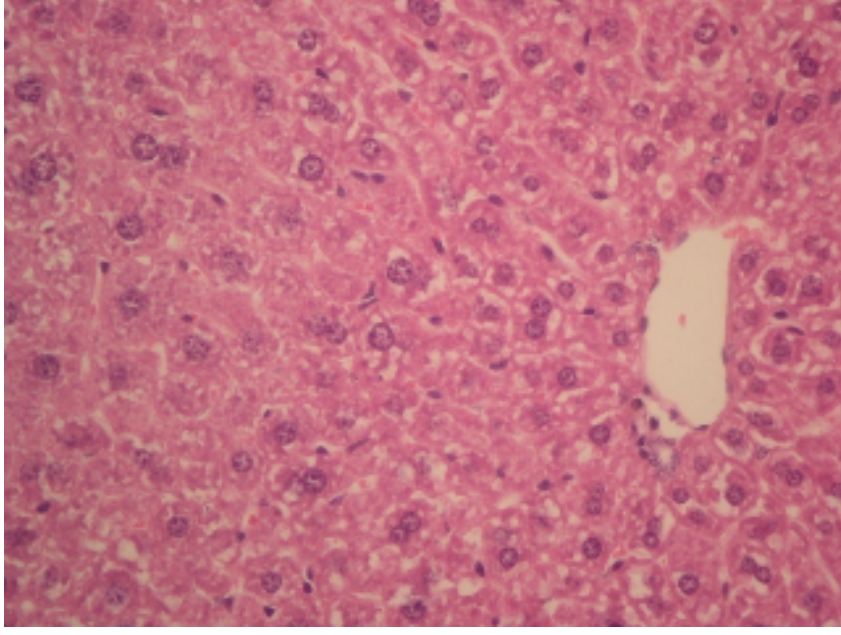


Resim 13: Kefir grubundaki bir farede normal karaciğer histolojisi, x185, H.E.

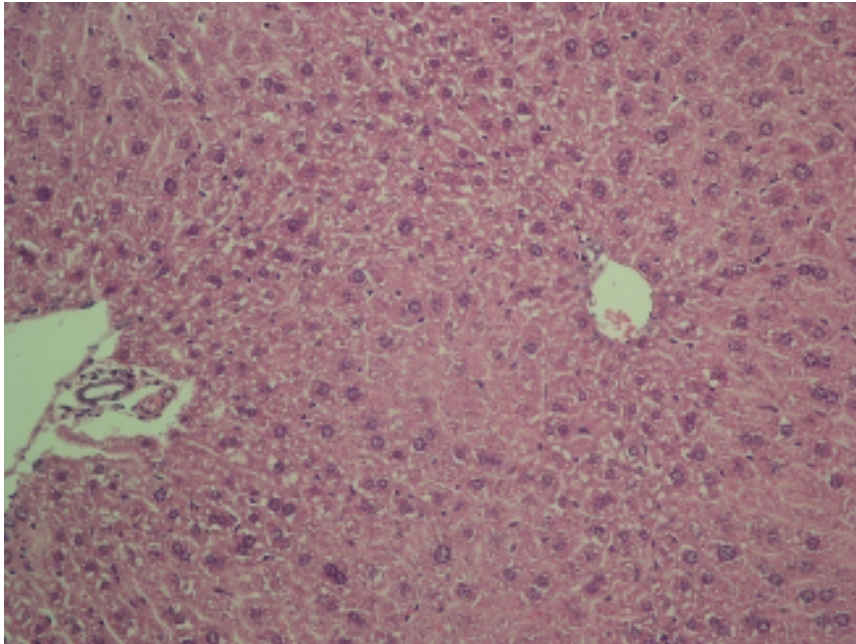
Toksisite grubu olan 300 ppb Aflatoksin B₁ verilen grupta karaciğerde hiperemi, hepatositlerde ortadan şiddetliye kadar değişen bulanık şişkinlik ve/veya hidropik dejenerasyon nedeniyle hepatik kordonlarda dissasiasyon gözlemlendi (Resim 14). Bazı hepatositlerde kesin kenarlı, içleri boş küçük vakuol oluşumları tespit edildi (Resim 15). Ayrıca genellikle midzonal yerleşim gösteren fokal koagülasyon nekrozlarına rastlandı (Resim 16).



Resim 14: Sadece Aftoksin verilen bir farede karaciğerde şiddetli derecede hidropik dejenerasyon ile midzonal bölgede fokal nekroz, x185, H.E.

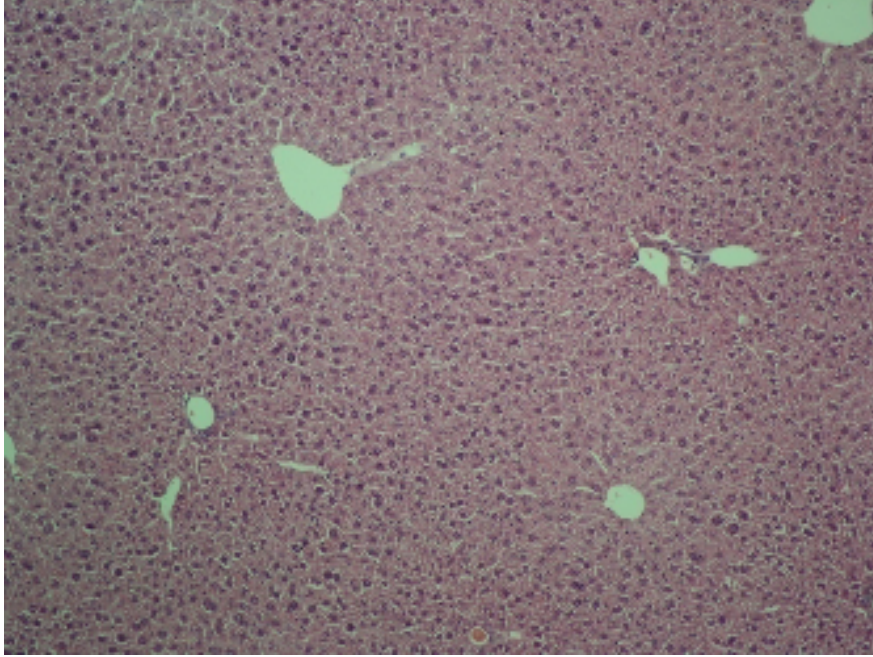


Resim 15: Sadece Aflatoksin verilen bir farede hepatositlerde perisentral yerleşimli vakuol oluşumları, x370, H.E

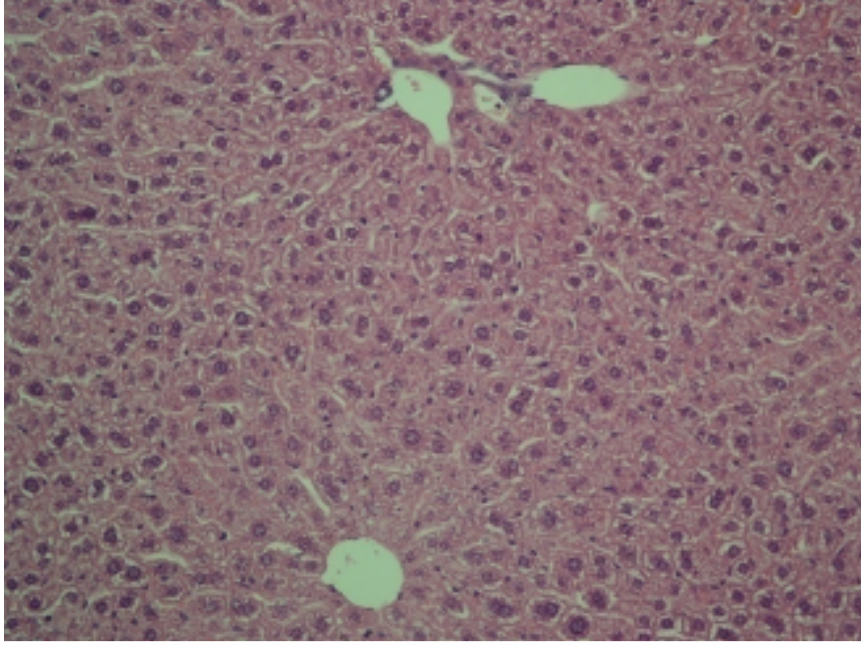


Resim 16: Sadece Aflatoksin verilen bir farenin karaciğerinde midzonal bölgede fokal nekroz (N), x185, H.E.

Aflatoksinle ile birlikte kefir verilen grup toksisite grubuyla kıyaslandığında oluşan lezyonların şiddetinde belirgin azalma olduğu, buna bağlı olarak karaciğer hepatik kordonların normal düzende seyrettiği, lob yapısının bozulmadığı görüldü (Resim 17). Hepatositlerde şekillenen hafif derecedeki bulanık şişkinlik ve/veya hidropik dejenerasyonun tüm lob boyunca eşit düzeyde yerleşim gösterdiği, toksisite grubunda oluşan vakuol ve nekroz oluşumlarının bu grupta şekillenmediği görüldü (Resim 18).

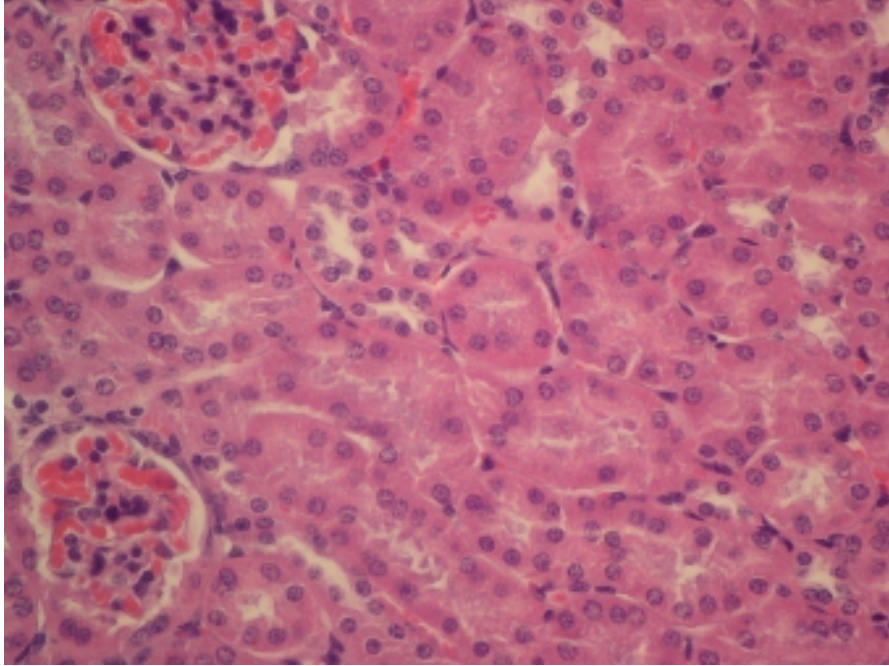


Resim 17: Sadece Aflatoksin ile birlikte kefir verilen bir farenin karaciğerinde hafif derecede hidropik dejenerasyonu, x92, H.E.

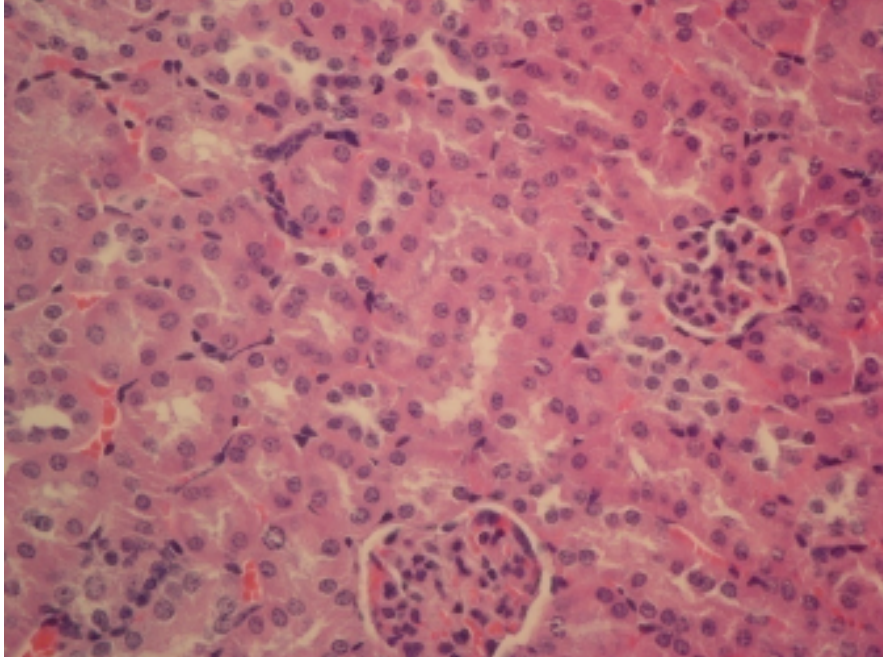


Resim 18: Sadece Aflatoksin ile birlikte kefir verilen bir farenin karaciğerinde hafif derecede hidropik dejenerasyonun yakın görünümü, x185, H.E.

Böbreklerin histopatolojik incelemesinde ise, kontrol (Resim 19) ve sadece kefir (Resim 20) verilen grupta histolojik yapıda değişiklik şikillenmediği görüldü.

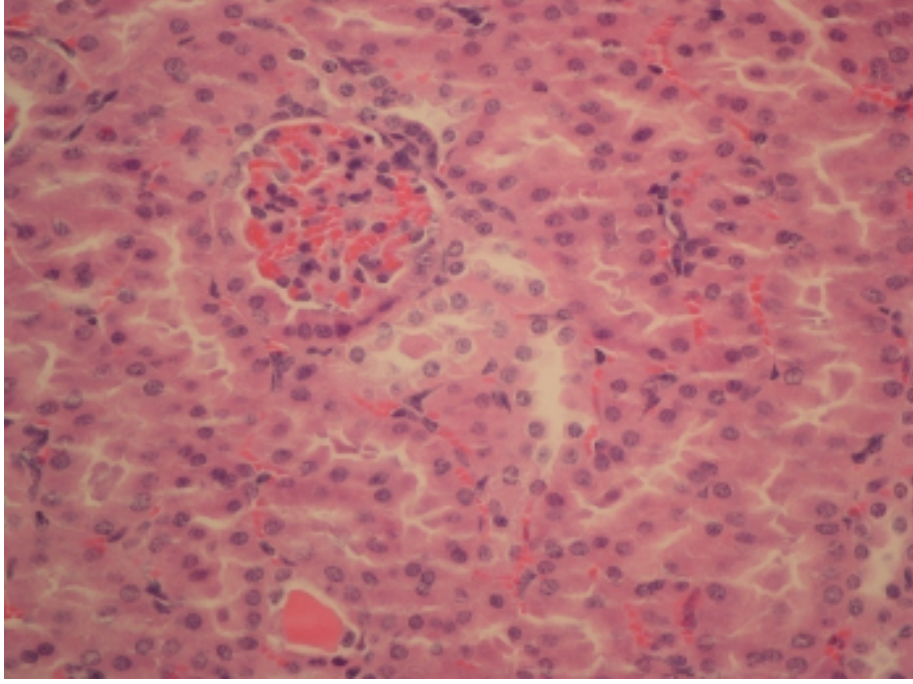


Resim 19: Kontrol grubundaki bir farede böbreğin normal histolojik görünümü, x370, H.E.



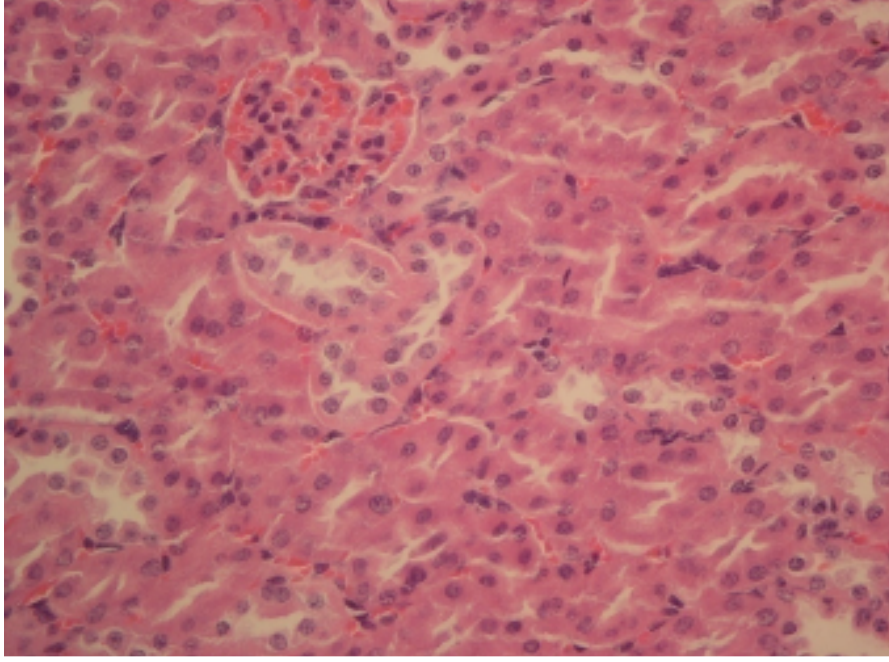
Resim 20: Kefir grubundaki bir farede böbreğin normal histolojik görünümü, x370, H.E.

Aflatoksin verilen grupta özellikle korteksteki tubul epitellerinde orta şiddette hidropik dejenerasyon, az sayıda epitelde nekroz, glomerular yumak ve intertubuler bölgede hiperemi belirlendi (Resim 21). Bazı tubul lümenlerinin genişlediği ve eozinofilik bir kitle ile dolu olduğu görüldü. Medullada ise yer yer intertubuler kanamalara rastlandı.



Resim 21: Sadece Aflatoksin verilen bir farede böbrek tubuluslarında orta derece hidropik dejerasyon ve tek tük epitellerde nekroz, intertubuler bölgede hiperemi, x370, H E.

Aflatoksin ile birlikte kefir verilen grupta ise sadece proksimal tubul epitellerinde hafif derecede hidropik dejenerasyon ile intertubuler bölgede hiperemi gözlemlendi (Resim 22).



Resim 22: Aflatoksin ile birlikte kefir verilen bir farenin böbreğinde hafif derecede hidropik dejenerasyon ve intertubuler bölgede hiperemi x370, H E.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Süt ve süt ürünleri, insanlar ve diğer memelilerin beslenmesi açısından tartışılmaz bir öneme sahiptir. Fermente süt ürünlerinin yaygın bir besin kaynağı olmasının en önemli dayanağı, eski çağlarda buzdolabı gibi soğutucuların olmamasına rağmen üretimden sonra uzun süre tüketilmesinin mümkün olmasıdır (18). Bazı araştırmacılar kefirli fermente süt ürünlerin şampanyası olarak tanımlamış ve hafif içkilere bir alternatif olabileceğini ileri sürmüştür (22, 46, 56, 80). Bununla birlikte kefirdeki probiyotik bakterilerin oral olarak verilen karsinogenlerin yarattığı DNA hasarlarını ve lipid peroksidasyonlarını önlediği de belirtilmiştir (32).

Probiyotik bakterilerin koruyucu etkileri, kendileri veya metabolitleri tarafından karsinogen ara reaktiflerin bağlanarak ortamdan uzaklaştırılmasının yanında karsinogenleri aktive veya deaktive eden enzimleri etkileyerek ortaya çıktığı düşünülmektedir (44). Aflatoksin ve heterosiklik aminler gibi toksik ve genotoksik bileşenlerin karsinogenik etkilerinin NADPH dehidrogenaz, nitroredüktaz, β -glukronidaz ve 7- α -dehidroksilaz gibi bakteriyel enzimlerle ilişkili olduğu ve laktik asit bakterilerinin ise bu enzimlerin etkisini azalttığı bildirilmiştir (22, 51).

En güçlü doğal gıda toksini olan AFB₁'in kronik dozunu (300 ppb) kullanarak gerçekleştirdiğimiz bu çalışma, aflatoksinin deney hayvanlarında yarattığı fizyolojik, biyokimyasal, histopatolojik ve moleküler etkilerini sergilemek ve yine oral yolla verilen kefir içeceğinin bu etkileri ne düzeyde elimine ettiğini araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Batı Afrika'da diyet yoluyla aflatoksine maruz kalan çocuklarda büyüme ve gelişme geriliği, kilo kaybı ve immün sistem fonksiyonlarında azalma gibi bulgulara rastlanmıştır (8, 15, 100). AFB₁ ile kontamine yemlerle beslenen domuzlarda vücut ağırlığı artışının düşmesi ve yem tüketiminde azalma; broilerler de ağırlık azalışı, bunun yanında karaciğer ve böbrek ağırlığında artış görülmüştür (67). Bizim çalışmamızın sonuçları da bu verileri

desteklemektedir. Deneysel uygulamamız süresince kontrol grubu farelerin canlı vücut ağırlık ortalaması 34,74'ten 40,67'ye yükselirken, AFB₁ uygulanan farelerde 38,22'den 31.54'e düşmüştür. Bunun yanında aflatoksinle birlikte kefir verdiğimiz farelerin ağırlık ortalaması 32,07'den 37,40'a yükselmiştir. Tek başına kefir tükettirdiğimiz D grubu farelerdeki ağırlık artışı da yine kontrol grubuna paralellik göstermiştir (Tablo 7, Grafik 3). İstatistiksel açıdan da anlamlı ($p < 0,05$) olan bu sonuçlar değerlendirildiğinde, altı haftalık düzenli kefir tüketiminin aflatoksinlerin büyüme ve gelişme üzerindeki olumsuz etkileri ortadan kaldırdığı görülmektedir. Karademir (2003) broilerde yaptığı çalışmada içme suyuna %7,5 oranında kefir eklenmesinin canlı ağırlık artışında anlamlı bir artış sağladığını bildirmiştir (73). Kefir ve probiyotik suşların canlı ağırlık kazanımı üzerine olumlu etkileriyle ilgili çalışmalar mevcut iken, aflatoksin ile birlikte verilen kefirin canlı ağırlık üzerindeki etkileri ile ilgili herhangi benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Aflatoksin alımı ile serum alkalen fosfataz (ALP), gammaglutamil transferaz (GGT), asit fosfataz, laktik dehidrogenaz (LDH), ornitin karbamoil transferaz, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat amino transferaz (AST), lipit peroksidaz ve izositrik dehidrogenaz etkinliği ile serum bilirubin düzeyi artarken, serum protein, protein kaynaklı olmayan azot, üre, hemoglobin ve pıhtılaşma faktörlerinin miktarı önemli ölçüde azalma göstermektedir (4). Serum ALT, AST, ALP, asit fosfataz ve LDH düzeylerindeki artışlar karaciğer hasarının önemli göstergelerindendir (31, 36, 131). Sıçanlara intraperitoneal olarak verilen değişik dozlardaki Aflatoksin B₁'in bazı serum enzim düzeylerine etkisi araştırılmış, AFB₁ verilmesinden sonraki 5. saatte asit fosfataz (ASP), serum glutamik oksala asetik transaminaz (SGOT), serum glutamik piruvik transaminaz (SGPT) değerlerinde artma, alkalen fosfataz (ALP)'da ise azalma; 5. gün ise bütün enzim değerlerinde artış gözlenmiştir. Bu enzimler üzerinde 1000 µg/kg aflatoksin B₁'in 500 µg/kg doza göre daha fazla etkili olduğu belirlenmiştir (148, 150).

Çalışmamızda kontrol grubundaki AST ortalaması 323,5 iken, aflatoksin uygulanan grupta bu değer 734,5'e yükselmiştir ($p < 0.01$). Fakat aflatoksin ile birlikte kefir uygulanan C grubu ile tek başına aflatoksin

uygulanan B grubu arasında herhangi bir fark ortaya çıkmamıştır. Buna karşın ALT değerlerinde B ve C grubu arasında anlamlı bir fark görülmüştür ($p<0,05$). Kontrol grubunda ALT değeri 191,5 iken aflatoksin uygulanan grupta ise 272,25'e çıkmıştır. Toksin ile birlikte kefir uygulanan grupta ise bu enzimin değeri 150,37'e düşmüştür. Kontrol (A) grubu ile aflatoksin+kefir (C) grubu arasında istatistik açıdan bir fark bulunmaması ($p>0,05$) kefir tüketiminin ALT değerlerindeki artışı yani karaciğer hasarını önlediğini göstermektedir (Tablo 9).

Çalışmamızdaki bulguları LDH (Laktik Dehidrogenaz) açısından değerlendirdiğimizde kontrol grubunda 2712,5 olan LDH ortalaması toksin uygulanan grupta 4145,62 olduğunu görüyoruz. Bu bulgu da yine AST ve ALT değerlerindeki artış gibi aflatoksinlerin karaciğer hasarlarını ne derecede tetiklediğini ortaya koymuştur. Aflatoksin ile birlikte kefir verdiğimiz C grubu farelerde LDH değerinin 2915 ($p<0,05$)' e düşmesi kefir tüketiminin ALT' de olduğu gibi LDH değerleri açısından da olumlu etkiler sergilediğini ortaya koymuştur. Kontrol (A) grubu LDH ortalaması ile aflatoksin+kefir (C) grubu LDH ortalaması arasında istatistik bir fark görülmemesi ($p>0,05$) toksin ile birlikte kefir tüketiminin LDH değerlerindeki olumsuzlukların önüne geçtiğini göstermektedir (Tablo 9,10,11). Bu konuda benzer bir deneysel çalışma ile karşılaşmamış olmamız çalışmamızı diğer çalışmalarla karşılaştırmamızı mümkün kılmamıştır.

Üriner aflatoksin metabolit düzeyleriyle birlikte AFB₁-guanin atımının ölçümü ve plazmada AFB₁-Albumin ölçümü ve karaciğer dokusunda AFB₁-DNA, 4ABP-DNA ve PAH-DNA bileşenlerinin ölçümleri çalışmalarda toksisite riskinin gösterilmesinde kullanılan kriterler arasındadır (100, 168). Çalışmamızda kontrol (A) grubunda 3,03 olan albümin değer ortalaması toksin uygulanan grupta (B) 2,46'ya düşmüştür (Tablo 13). B, C ve D grupları ile kontrol grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olması ($p<0,05$) ve B ile C grupları arasındaki farkın istatistik bir anlam taşıması ($p>0,05$) kefir kullanımının aflatoksinin albümin üzerindeki olumsuz etkiyi iyileştirmediğini göstermiştir. Bununla birlikte sadece kefir uygulanan D grubuna ait albümin değerinin de kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde

düşmesi bu konuda kesin bir yargıya varmamızın önüne geçmiştir. Ayrıca deney farelerinden kan almanın çok güç olması ve alınan kan örnek hacminin tüm analizler için yetersiz kalması özellikle AST ve Albümin analiz sonuçlarının sağlıklı olmayabileceğini düşündürmüştür.

Maruz kalım ile birlikte reaktif oksijen türlerinin oluşumu (ROS), mutajenik malondialdehit (MDA) oluşumuyla lipit peroksidasyonu ve hücre hasarlarının meydana gelmesi aflatoksinlerin en önemli metabolik etkilerindendir (53, 60, 69).

Antioksidan özellikteki biyolojik bileşikler hücrelerin ROS ve diğer serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı korunmasında önemli bir rol oynarlar (127). AFB₁ uygulanan ratlarda uygulama sonrası primer olarak rat hepatositlerinde ROS oluşturarak lipit peroksidasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (19). Bizim çalışmamızda da aflatoksinlerin lipit peroksidasyonu neden olduğunu gösteren en önemli gösterge karaciğer dokusundaki MDA (Malondialdehit) değerleridir. Kontrol (A) grubunda 1,06 olan MDA değeri aflatoksin uygulanan B grubunda 4,94'e yükselmiştir (Tablo 15, p<0,01). Bu sonuç çalışmamızda düşük dozda uygulanan AFB₁'in bile hücre hasarına neden olduğunu net bir şekilde göstermektedir. Kefir içeceğinin lipit peroksidasyonunu önlemedeki etkinliğini göstermek amacıyla Aflatoksin ile birlikte kefir uygulanan C grubunda MDA değeri 1,14'e düşmüştür. Bu değer sadece toksin uygulanan B grubu ile kıyaslandığında lipit peroksidasyonunun istatistik açıdan anlamlı bir şekilde önüne geçildiği sonucuna varılmıştır (p<0,01). C ve D (Kefir) gruplarındaki sonuçların A grubu ile benzer olması ve özellikle sadece kefir verilen D grubu değerinin aritmetik ortalamasının A grubundan küçük olması çalışmamızın temel amaçlarından birisini desteklemektedir (Tablo 15, 16).

Glutasyon molekülündeki nükleofilik grup gibi hareket eden sülfidril (-SH) kısım toksik metabolitlerin elektrofilik merkezlerine bağlanarak onları nötralize eder ve suda çözünür hale getirerek ksenobiyotiklerin (AFB₁ gibi) nükleofilik GSH ile konjugasyonunu sağlarlar (119). Ksenobiyotiklerin GST katalizörlüğünde GSH ile bağlanamaması durumunda DNA, RNA veya hücre

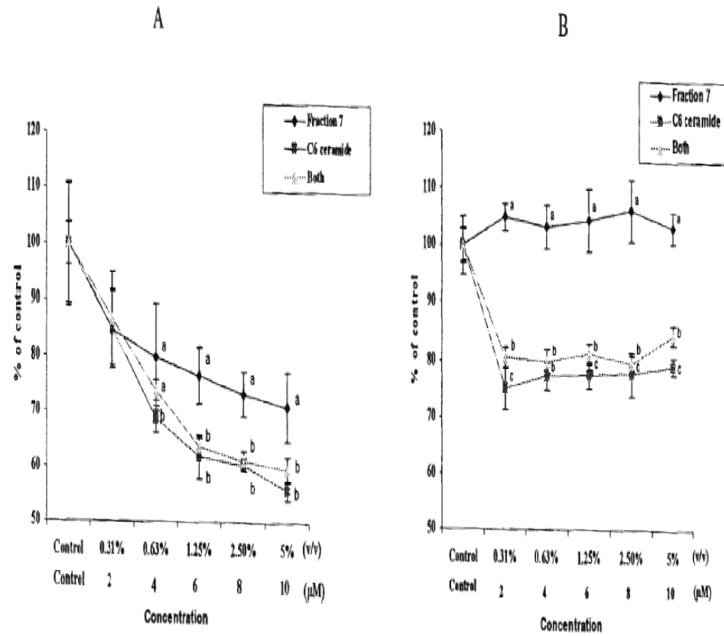
proteinleri ile kovalent bağ yapması ciddi hücre hasarlarıyla sonuçlanabilir (58).

Glutatyon-S-transferaz enzimleri AFB₁-8,9-epoksitlerin ekso ve endo izomerlerinin GSH ile konjugasyonunu katalize ederek biyoaktif edilmiş AFB₁'in oluşturacağı doku hasarına karşı korumada kritik bir rol oynar. Genotoksik ögelere karşı devreye giren hücresel savunma mekanizmaları bu ögelerin metabolik aktivasyonlarını azaltırlar veya metabolik detoksifikasyonu artırır. Çalışmamızdaki antioksidan enzim parametrelerini değerlendirdiğimizde, toksin uygulanan B grubunda glutatyon (GSH) konsantrasyonunun kontrol grubundaki 1,21'lik değerine karşın 0,87'e düştüğünü görüyoruz ($p < 0,01$). Aflatoksin uygulanan gruptaki lipid peroksidasyonu artışı bu bulguyu doğrulamaktadır. Aflatoksin ile birlikte kefir uygulanan C grubundaki GSH konsantrasyonunun ise kontrol grubundan daha yüksek bir değere ulaşması (1,81) ve B grubu ile arasındaki farkın istatistik açıdan anlamlı olması ($p < 0,01$) kefir tüketiminin antioksidan savunmayı güçlendirerek AFB₁ detoksifikasyonunu artırdığının önemli bir göstergesidir (Tablo 17).

Glutatyon-S-transferaz (GST) gibi GSH bağımlı enzimlerle gerçekleştirilen detoksifikasyon genetik hasara karşı hücresel savunmada majör rol oynamaktadır. Böylece dokularda GST ve GST 'nin izoformlarının konsantrasyonu önemli ölçüde artış gösterir (92). Bu bilgiye dayanarak bulgularımızı incelediğimizde, kontrol grubunda 1,9 olarak ölçülen GST aktivitesinin AFB₁ uygulanan grupta önemli bir artış göstererek 9,28'e çıktığı görülmüştür (Tablo17). Buna karşın Aflatoksin ile birlikte kefir uygulanan C grubunda ise 2,36 değerine düştüğü gözlenmiştir. Bu sonuç da kefirin AFB₁ kaynaklı hücre hasarlarının önüne geçerek glutatyon konsantrasyonundaki düşüşü önlediği böylece GST aktivitesinin kontrol grubuna daha yakın bir değere düştüğü söylenebilir.

Kefir içeceğinin antimutajenik ve antikarsinojenik özelliklerine birçok araştırmada değilmiş olmasına rağmen etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu mekanizma kefirdeki biyoaktif bileşikler hedef doku ve organlar tarafından alınarak hücre içi glutatyon ile apoptosis ve hücresel

proliferasyonda aktif rol üstlenen TNF- α gibi sitokinlerin düzeyinin modülasyonunda rol oynaması şeklinde yorumlanmıştır (10). İn vitro hücre kültürü ile yapılmış bir çalışmada kefir kullanılan tümör hücreleri ile kefir kullanılmayan tümör hücrelerindeki GSH konsantrasyon farkları Grafik 4'de görülmektedir. Grafikteki A kısmı kefir kullanılmayan tümör hücrelerini, B kısmı ise kefir ile tedavi edilen tümör hücrelerini göstermektedir (22).



Grafik 4: MCF-7 (A) ve kefir ekstraktı ile tedavi edilmiş HMEC tümör hücrelerinde GSH konsantrasyonlarının karşılaştırılması (22).

Hücrel GSH konsantrasyonlarının modülasyonu hücre proliferasyonunda ve tümör direncinde önemli bir rol oynamaktadır. Birçok çalışmada GSH-modülasyon tedavilerinde hücrel GSH yanıtının normal hücreler ile tümör hücrelerinde hücrel dayanıklılık ve proliferasyondan dolayı farklı olabileceği bildirilmiştir (3, 10, 143, 144).

GSTM1'in en önemli substratları arasında aril oksit, AFB₁ ve AFB₁-8,9-epoksit yer almaktadır (134). Enzim bu karsinojenleri glutatyon ile konjuge ederek detoksifiye etmektedir. GSTM1 null bireylerin teorik olarak daha fazla seviyede karsinojen-DNA bileşenlerine sahip olduğu bildirilmiştir (6). GSTT1 enzim geninin substratları arasında diklorometan (DCM), etilendibromid (EDB), p-nitrobenzil klorid (PNBC), p-nitrofenetil bromid (PNPB), metilklorid (MeC), metiliodid (MeI) ve değişik halojenize metan ve etanlar bulunmaktadır (159). GST izoenzimleri M1a-1a, T1-1, M3-3, P1-1, A1-1 ve A2-2 nin insanlarda AFB₀ ile konjugasyon yaptığı ve M1a-1a nin en aktif izoenzim olduğu bilinmektedir (155).

Bizim çalışmamızdaki GSTM1 ve GSTT1 gen ekspresyon bulgularını incelediğimizde, deneysel uygulamaların gruplar arasında GSTM1 gen ekspresyonu açısından anlamlı bir fark oluşturduğu görülmektedir [$\chi^2_{(3)} = 9,462$, $p < .05$]. Kontrol grubu ($\bar{x} = 4095,67$) ile aflatoksin ($\bar{x} = 834$) grubu, aflatoksin ($\bar{x} = 834$) grubu ile aflatoksin+kefir ($\bar{x} = 5298,67$) grubu ve Aflatoksin ($\bar{x} = 834$) grubu ile kefir ($\bar{x} = 7930,33$) grubu arasında anlamlı bir farklılaşma olduğu grupların ikili kombinasyonları üzerinden Mann Whitney U-testi ile incelendiğinde görülmektedir (Tablo 21). Kontrol geni (β -aktin) ile ilgili sonuçlar değerlendirildiğinde gruplar arasındaki farkın anlamlı olmadığı açıkça görülmektedir ($\chi^2_{(3)} = 0,744$, $p > .05$). Kontrol genimiz olan β -aktin'in hiçbir deneysel uygulamadan etkilenmediği için "housekeeping" gen olarak kullanılmıştır. Gruplar arasında β -aktin gen ekspresyonu açısından bir fark oluşmaması çalışma açısından bir pozitif kontrol rolü üstlenmektedir.

Aflatoksinlerin histopatolojik etkileri özellikle karaciğer ve safra kanalı hücrelerinde kendini göstermektedir. Bu etkiler başlıca safra kanalı hiperplazisi olmak üzere, çekirdek büyümesi, nükleus inklüzyonları ve hepatositlerde büyüme ile karakterizedir (61). Aflatoksin B₁'in tavşan karaciğeri üzerine olan etkilerinin histopatolojik ve biyokimyasal yöntemlerle araştırıldığı bir çalışmada; AFB₁ birinci gruptaki tavşanlara 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$, diğer gruptaki tavşanlara 7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$ olarak iki ayrı dozda 12 hafta süre ile gün aşırı verilmiş, histopatolojik olarak parankimde vakuoler dejenerasyon, güve

yeniği şeklinde nekroz görülmüş, portal alan ve çevresinde ise lenfositler ve bazı tavşanlarda eozinofil lökositleri de içeren iltihabi infiltrasyon ve safra duktus proliferasyonu izlenmiştir (4, 147). Biyokimyasal incelemede serum ALT düzeyinin deney öncesine göre yükseldiği ve karaciğer hasarı ile paralellik gösterdiği saptanmıştır (21, 147).

Bizim çalışmamızda ise kontrol grubuna kıyasla toksisite grubu olan 300 ppb Aflatoksin B₁ verilen grupta karaciğerde hiperemi, hepatositlerde ortadan şiddetliye kadar değişen bulanık şişkinlik ve/veya hidropik dejenerasyon nedeniyle hepatik kordonlarda dissiasiyon gözlemlendi (Resim 20). Bazı hepatositlerde kesin kenarlı, içleri boş küçük vakuol oluşumları tespit edildi (Resim 21). Ayrıca genellikle intermedier yerleşim gösteren fokal koagülasyon nekrozlarına rastlandı (Resim 22). Böbreklerin histopatolojik incelemesinde ise Aflatoksin verilen grupta özellikle korteksteki tubul epitellerinde orta şiddette hidropik dejenerasyon, az sayıda epitelde nekroz, glomerular yumak ve intertubuler bölgede hiperemi belirlendi (Resim 27). Bazı tubul lümenlerinin genişlediği ve eozinofilik bir kitle ile dolu olduğu görüldü. Medullada da yer yer intertubuler kanamalara rastlandı. Çalışmamızda ALT değerinin yükselmesi de bu bulguyu desteklemektedir.

Aflatoksinle birlikte kefir verilen grup toksisite grubuyla kıyaslandığında karaciğerdeki lezyonların şiddetinde belirgin azalma olduğu, buna bağlı olarak karaciğer hepatik kordonların normal düzende seyrettiği, lob yapısının bozulmadığı görüldü (Resim 23). Hepatositlerde şekillenen hafif derecedeki bulanık şişkinlik ve/veya hidropik dejenerasyonun tüm lob boyunca eşit düzeyde yerleşim gösterdiği, toksisite grubunda oluşan vakuol ve nekroz oluşumlarının bu grupta şekillenmediği görüldü (Resim 24). Böbreklerde ise Aflatoksin ile birlikte kefir verilen grupta sadece proksimal tubul epitellerinde hafif derecede hidropik dejenerasyon ile intertubuler bölgede hiperemi gözlemlendi (Resim 28).

Kefirin AFB₁ detoksifikasyonundaki rolünü in vivo ortamda biyokimyasal, histopatolojik ve moleküler parametrelerle kanıtlamak amacıyla gerçekleştirdiğimiz bu çalışma daha önce kefir ve yoğurt ile gerçekleştirdiğimiz in vitro çalışmanın takipçisi olarak gerçekleştirilmiştir

(114). Bulguları bütün olarak literatür bilgiler ışığında değerlendirdiğimizde, şiddetli bir toksin olan AFB₁'in düşük doza rağmen deney farelerinde beklenen olumsuz etkileri sergilediğini görmekteyiz. Buna göre çalışmamızdan elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

- AFB₁'in büyüme ve gelişme üzerindeki olumsuz etkilerinin bilinmesi nedeniyle deney farelerinde çalışmanın başlangıç ve bitiminde ağırlık ölçümü yapılmış ve kefir ile birlikte toksin uygulanan grupta bu olumsuz etkinin önüne geçilebilmiştir.
- Karaciğerin fonksiyonel enzimlerini olumsuz etkilediği bilinen AFB₁ düşük dozlarda bile bu etkilerini göstermiş fakat kefirin özellikle AST ve LDH açısından koruyucu etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.
- Vücudun antioksidan savunmasını olumsuz etkileyen AFB₁, glutatyon (GSH) mekanizmasını inhibe ederek lipid peroksidasyonuna ve dolayısıyla hücre hasarına neden olmuştur. Toksin verilen grubun kefir tüketmesi ile GST aktivitesi ve glutatyon mekanizmasının normal işleyişi sağlanarak lipid peroksidasyonun önüne geçilebilmiştir.
- Toksin uygulaması ile gerçekleşen histopatolojik defektler kefir verilen grupta ortaya çıkmamış, bu bulgular ALT enzimi ile paralellik göstermiştir. Ayrıca dokuların histopatolojik incelemeleri tüm biyokimyasal bulgularımızı desteklemiştir.
- GSTM1 ve GSTT1 gibi moleküler parametrelerle desteklenen çalışmamızda aflatoksin metabolizması ile primer ilişkisi olduğu düşünülen GSTM1 genindeki ekspresyonlar bu düşünceyi desteklemiş ve toksin verilemesi ile dansitedeki değişimler anlamlı bulunmuştur. Toksinle birlikte kefir verilen gruptaki bulguların kontrol grubu ile aralarındaki farkın anlamlı olmaması GSH, GST ve MDA bulgularındaki anlamlı farklılıkları desteklemek açısından önem taşımaktadır.

Elde edilen bu sonuçlar kefirin aflatoksin detoksifikasyonundaki rolünü kanıtlamak açısından in vitro çalışmalarla paralellik göstermekle birlikte,

detoksifikasyondaki rolünün aflatoksin ve benzer şekilde metabolize olan diğer ksenobiyotiklerin faz II reaksiyonlarını etkileyerek sergilediğini GSH, GST ve GSTM1 bulgularındaki olumlu etkilerine bağlayabiliriz. Buna rağmen bu olumlu etkilerin mekanizmasını açıklamak tam olarak mümkün değildir. Bundan sonraki çalışmaların bu mekanizma üzerindeki yoğunlaştırılması ve özellikle moleküler parametrelerin denek sayısı artırılarak tekrarlanması yararlı olacaktır. Ayrıca kefir içeceğinin olumlu etkilerinin probiyotik mikroorganizmalardan mı yoksa kefirin bileşimindeki organik bileşiklerden mi kaynaklandığını çözmeye yönelik kontrollü çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Kefirin detoksifikasyondaki rolünü çözmek amacıyla işaretlenmiş toksin veya işaretlenmiş probiyotik mikroorganizmalarla gerçekleştirilecek ileri düzeydeki çalışmalar bu olumlu etkilerin mekanizmasını çözebilmek açısından büyük bir önem arz etmektedir.

5. ÖZET

Bu çalışma, düşük dozda aflatoksin uygulanan deney farelerinde bu toksinin lipit peroksidasyonu, antioksidan enzim aktivitesi ve karaciğerin bazı fonksiyonel enzimleri ile dokudaki histopatolojik bulgular ve antioksidan enzimleri kodlayan gen ifadeleri üzerindeki etkilerini gözlemleyerek kefir içeceğinin bu etkileri azaltma veya tamamen eliminasyonu yönündeki aktivitelerini araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışma ortalama 12 haftalık *Swiss albino* farelere standart diyetle birlikte 45 gün süresince 300 ng/kg AFB₁, 300 ng/kg AFB₁+ 30 ml/kg kefir, 30 ml/kg kefir ve kontrol (standart diyet) uygulamalarıyla dört grup üzerinde gerçekleştirildi.

Çalışmada Oto-analizör ile ALT, AST, LDH ve albümin ölçümleri, Spektrofotometrik yöntem kullanılarak MDA, GSH ve GST aktivitesi ve RT-PCR yöntemi ile GSTM1ve GSTT1 gen ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. Histopatolojik farklılıkları değerlendirmek amacıyla dokular hematoksilen-eozin (H.E.) boyama ile incelendi

Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, AFB₁ uygulanan grupta ağırlık kaybı görülmesine karşın, AFB₁ ile birlikte kefir tüketen grupta ise ağırlık artışı kontrol grubu ile paralellik sergilemiştir. Aflatoksin ile birlikte kefir verilen grup ile aflatoksin verilen grupların ALT ve LDH değerleri arasındaki fark anlamlı (P<0,05) bulunmuştur. Aflatoksin uygulanan grupta lipit peroksidasyonu (MDA) kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artarken, aflatoksin ile birlikte kefir verilen grubun MDA değerindeki düşüş anlamlı bulunmuştur (P<0,01). Buna paralel olarak GSH konsantrasyonu ile GST aktivitesi istatistik açıdan her iki grup arasında farklı bulunmuştur. Aflatoksin ve aflatoksin+kefir gruplarında GSTM1 gen ekspresyon profilleri istatistik açıdan anlamlı (P<0,05) bulunmuştur. Karaciğer ve böbreğin histopatolojik incelemelerinde AFB₁ verilen grupta nekrozlara rastlanırken, AFB₁ ile birlikte kefir verilen grupta lezyonların şiddetinde belirgin bir azalma olmuştur. Bu olumlu etkiler, kefir içeceğindeki probiyotik mikroorganizmaların ve organik bileşiklerin ksenobiyotik metabolizmasının faz II reaksiyonunu etkileyerek vücuttaki antioksidan savunmayı güçlendirmiş olabileceğine bağlanmıştır.

6. SUMMARY

This study has been achieved to observe the effects of low dose aflatoxin in mice on lipid peroxidation, antioxidant enzyme activity, some functional hepatic enzymes together with histopathological findings in tissue and gene expressions that codes the antioxidant enzymes and investigate the activities on reducing or completely eliminating these effects of the kefir contents. Study has been performed on four groups by applying 300 ppb AFB₁, 300 ppb AFB₁+30 ml/kg kefir, 30 ml/kg kefir together with standard diet during 45 days and control (standard diet) to *Swiss albino* mice which are average 12 weeks age.

In the study, ALT, AST, LDH and albumin measurements were performed by auto-analyzer, MDA, GSH and GST activity by spectrophotometric method and GSTM1 and GSTT1 gene expressions were analyzed by using RT-PCR. Tissues were observed to evaluate the histopathological differences by haematoxylin-eosin (H.E.) staining.

When our findings have been considered, we observed a weight loss in AFB₁ group while weight gain was concordant with the control group in kefir consumed group together with AFB₁. We observed a significant difference ($P < 0,05$) between kefir given group together with aflatoxin and aflatoxin given group in ALT and LDH values. While the lipid peroxidation (MDA) increased significantly in aflatoxin given group with respect to the control group, the decrease in MDA was significant in kefir given group together with aflatoxin ($P < 0,01$). In parallel with this finding, we observed a statistically significant difference in GSH concentration and GST activity between two groups. GSTM1 gene expression profiles were statistically significant in aflatoxin and aflatoxin+kefir groups ($P < 0,05$). In histopathological investigations of the liver and kidney, necrosis were recognized in AFB₁ given group while there was an evident decrease in the intensity of lesions in the kefir given group together with aflatoxin. These positive effects might depend on the possibility that the probiotic microorganisms and organic compounds in the kefir drink might support the antioxidant defence in the body by effecting the phase II reaction of the xenobiotic metabolism.

7. KAYNAKLAR

1. **Akdemir, Ç., Altıntaş, A.:** Ankara'da işlenen sütlerde aflatoxin M₁ varlığının ve düzeylerinin HPLC ile araştırılması. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 51: 175-179, 2004.
2. **Akgül, A.:** Tıbbi Araştırmalarda İstatistiksel Analiz Teknikleri-SPSS Uygulamaları. Ankara, 2005.
3. **Allameh, A., Farahani, M., Zarghi, A.:** Kinetic studies of aflatoxin B₁-glutathione conjugate formation in liver and kidneys of adult and weanling rats. Mech. Ageing Dev. 115(1-2): 73-83,2000.
4. **Angsubhakorn, S., Get-Ngern, P., Miyamoto, M., Bhamarapravati, N.:** A single dose-response effect of aflatoxin B₁ on rapid liver cancer induction in two strains of rats. Int. J. Cancer. 46(4): 664-8,1990.
5. **Anon:** Aflatoxins. International Agency for Research on Cancer (IARC) 1993.
6. **Autrup, H.:** Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. Mutat. Res. 464(1): 65-76, 2000.
7. **Aziz-Baumgartner E, Lindblade K, Gieseke K, Rogers HS, Kieszak S, Njapau H, Schleicher, R., McCoy, L.F., Misore, A., DeCock, K., Rubin, C., Slutsker, L.:** Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. Environ. Health Perspect. 113(12): 1779-83, 2005.
8. **Bankole, S.A., Joda, A.O., Ashidi, J.S.:** The use of powder and essential oil of *Cymbopogon citratus* against mould deterioration and aflatoxin contamination of "egusi" melon seeds. J. Basic Microbiol. 45(1): 20-30, 2005.

9. **Bankole, S.A., Ogunsanwo, B.M., Osho, A., Adewuyi, G.O.:** Fungal contamination and aflatoxin B₁ of 'egusi' melon seeds in Nigeria. *Food Control*, 17: 814-818, 2006.
10. **Baruchel, S., Viau, G.:** In vitro selective modulation of cellular glutathione by a humanized native milk protein isolate in normal cells and rat mammary carcinoma model. *Anticancer Res.*16(3A): 1095-9, 1996.
11. **Bata, A., Lasztity, R.:** Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 223-228,1999.
12. **Bedard, L.L., Massey, T.E.:** Aflatoxin B₁-induced DNA damage and its repair. *Cancer Letters*, 241: 174-183, 2006.
13. **Bel, I D.A., Thompson, C.L., Taylor, J., Miller, C.R., Perera, F., Hsieh, L.L., Lucier, G.W.:** Genetic monitoring of human polymorphic cancer susceptibility genes by polymerase chain reaction: application to glutathione transferase mu. *Environ. Health Perspect.* 98: 113-7, 1992.
14. **Beshkova, D.M., Simova, E.D., Simov, Z.I., Frengova, G.I. Spasov, Z.N.:** Pure cultures for making kefir. *Food Microbiol.* 19(5): 537-544, 2002.
15. **Bhattacharya, R.K., Firozi, P.F., Aboobaker, V.S.:** Factors modulating the formation of DNA adduct by aflatoxin B₁ in vitro. *Carcinogenesis.* 5(10): 1359-62, 1984.
16. **Bian, J.C., Shen, F.M., Shen, L., Wang, T.R., Wang, X.H., Chen, G.C., Wang, J.B.:** Susceptibility to hepatocellular carcinoma associated with null genotypes of GSTM1 and GSTT1. *World J. Gastroenterol.* 6(2): 228-230, 2000.
17. **Büyüköztürk, Ş.:** Sosyal Bilimler için Veri Analizi El Kitabı. Ankara: Pegem A Yayıncılık, 2005.
18. **Cagindi, O., Otles, S.:** Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. *Pakistan Journal of Nutrition* 2(2): 54-59, 2003.

19. **Chan, H.T., Chan, C., Ho, J.W.:** Inhibition of glycyrrhizic acid on aflatoxin B₁-induced cytotoxicity in hepatoma cells. *Toxicology*. 188(23): 211-7, 2003.
20. **Chan, K.T., Hsieh, D.P., Lung, M.L.:** In vitro aflatoxin B₁-induced P53 mutations. *Cancer Lett.* 199(1): 1-7, 2003.
21. **Chattopadhyay, S.K., Taskar, P.K., Schwabe, O., Das, Y.T., Brown, H.D.:** Clinical and biochemical effects of aflatoxin in feed ration of chicks. *Cancer Biochem. Biophys.* 8(1): (1985): 67-75.
22. **Chen, C.:** Antitumor properties of kefir: Possible bioactive components and mechanisms. Dissertation Thesis. Montreal: McGill University, 2005.
23. **Chen, C.J., Yu, M.W., Liaw, Y.F., Wang, L.W., Chiamprasert, S., Matin, F., Hirvonen, A., Bell, D.A., Santella, R.M.:** Chronic hepatitis B carriers with null genotypes of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms who are exposed to aflatoxin are at increased risk of hepatocellular carcinoma. *Am. J. Hum. Genet.* 59(1): 128-34, 1996.
24. **Chomczynski, P., Sacchi, N.:** Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159, 1987.
25. **Choudhary, A., Verma, R.J.:** Ameliorative effects of black tea extract on aflatoxin-induced lipid peroxidation in the liver of mice. *Food Chem. Toxicol.* 43(1): 99-104, 2005.
26. **Conway, P.L., Gorbach, S.L., Goldin, B.R.:** Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* 70(1): 1-12, 1987.
27. **Cook, W.O., Richard, J.L., Osweiler, G.D., Trampel, D.W.:** Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis: rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxins B₁ and M₁. *Am. J. Vet. Res.* 47(8): 1817-25, 1986.

28. **Cotty, P.J., Bhatnagar, D.:** Variability among atoxigenic *Aspergillus flavus* strains in ability to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxin biosynthetic pathway enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(7): 2248-51, 1994.
29. **Creppy, E.E.:** Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett.* 127(1-3): 19-28, 2002.
30. **Croy, R.G., Essigmann, J.M., Reinhold, V.N., Wogan, G.N.:** Identification of the principal aflatoxin B₁-DNA adduct formed in vivo in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 75(4): 1745-9, 1978.
31. **Çelik, S.:** Karaciğer karsinojeni olan aflatoksinlerin biyokimyasal, histolojik etkileri ve sağıltım seçenekleri. *J. Fac. Vet. Med.* 20: 131-136, 2001.
32. **Çevikbaş, A., Yemni, E., Ezzeden, F.W., Yardimici, T., Çevikbaş, U., Stohs, S.J.:** Antitumoral antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. *PTR. Phytotherapy research* 8(2): 78-82, 1994.
33. **Dekker, M.:** Handbook of food toxicology. New York, USA: Madison Avenue, 2002.
34. **Donnelly, P.J., Stewart, R.K., Ali, S.L., Conlan, A.A., Reid, K.R., Petsikas, D., Massey, T.E.:** Biotransformation of aflatoxin B₁ in human lung. *Carcinogenesis.* 17(11): 2487-94, 1996.
35. **Draper, H.H.:** MDA Determination as a index of lipid prooxidation. Newyork, USA: Plenum Press, 1990.
36. **Dwivedi, Y., Rastogi, R., Mehrotra, R., Garg, N.K., Dhawan, B.N.:** Picroliv protects against aflatoxin B₁ acute hepatotoxicity in rats. *Pharmacol. Res.* 27(2): 189-99, 1993.
37. **Eaton, D.L., Gallagher, E.P.:** Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34: 135-72, 1994.
38. **Eichelberger, J.M.:** Aflatoxin B₁ Metabolism in Mammalian Pulmonary Tissue. Doktora Tezi. Utah: Utah State University, 1997.
39. **Elamin, N.H., Abdel-Rahim, A.M., Khalid, A.E.:** Aflatoxin contamination of groundnuts in Sudan. *Mycopathologia* 104: 25-31, 1988.

40. **El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S., Ahokas, J.:** Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, Aflatoxin B₁. *Food Chem. Toxicol.*, 36: 321-326, 1998.
41. **El-Nezami, H.S., Chrevatidis, A., Auriola, S., Salminen, S., Mykkänen, H.:** Removal of common Fusarium toxins in vitro by strains of Lactobacillus and Propionibacterium. *Food Addit. Contam.* 19(7): 680-6, 2002.
42. **El-Nezami, H.S., Kankaanpaa, P., Salminen, S., Ahokas, J.:** Physicochemical alterations enhance the ability of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *J. Food Prot.* 61(4): 466-468, 1998.
43. **El-Nezami, H.S., Nicoletti, G., Neal, G.E., Donohue, D.C., Ahokas, J.T.:** Aflatoxin M₁ in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. *Food Chem. Toxicol.*, 33(3): 173-179, 1995.
44. **El-Nezami, H.S., Polychronaki, N.N., Ma, J., Zhu, H., Ling, W., Salminen, E.K., Juvonen, R.O., Salminen, S.J., Poussa, T., Mykkänen, H.M.:** Probiotic supplementation reduces a biomarker for increased risk of liver cancer in young men from Southern China. *Am. J. Clin. Nutr.* 83(5): 1199-203, 2006.
45. **Essigmann, J.M., Croy, R.G., Nadzan, A.M., Busby, W.F. Jr, Reinhold, V.N., Büchi, G., Wogan, G.N.:** Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B₁ in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 74(5): 1870-4, 1977.
46. **Fuller, R.:** Probiotics 2. London: Chapman-Hall, 1997.
47. **Gallagher, E.P., Wienkers, L.C., Stapleton, P.L., Kunze, K.L., Eaton, D.L.:** Role of human microsomal and human complementary DNA-expressed cytochromes P4501A2 and P4503A4 in the bioactivation of aflatoxin B₁. *Cancer Res.* 54(1): 101-8, 1994.
48. **Galtier, P.:** Biotransformation and fate of mycotoxins. *J. Toxicol-Toxin Reviews*, 18(3): 295 – 312, 1999.

49. Galvano, F., Piva, A., Ritieni, A., Galvano, G.: Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *J. Food. Prot.* 64(1): 120-31, 2001.
50. Garrote, G.L., Abraham, A.G., De Antoni, G.L.: Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *J. Dairy Res.* 68(4): 639-52, 2001.
51. Garrote, G.L., Abraham, A.G., De Antoni, G.L.: Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. *J. Food Prot.* 63(3): 364-9, 2000.
52. Gratz, S., Mykkänen, H., Ouwehand, A.C., Juvonen, R., Salminen, S., El-Nezami, H.: Intestinal mucus alters the ability of probiotic bacteria to bind aflatoxin B₁ in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(10): 6306-8, 2004.
53. Guedes, R.C., Eriksson, L.A.: Theoretical characterization of aflatoxins and their phototoxic reactions. *Chemical Physics Letters*, 422: 328-333, 2006.
54. Guengerich, F., W.Johnson, W., Shimada, T., Ueng, YF., Yamazaki, H., Langouset, S.: Activation and detoxiation of aflatoxin B₁. *Mutat. Res.*, 402: 121-128, 1998.
55. Guo, Y., Breden, L.L., Fan, W., Zhao, L.P., Eaton, D.L., Zarbl, H.: Analysis of cellular responses to aflatoxin B₁ in yeast expressing human cytochrome P450 1A2 using cDNA microarrays. *Mutat. Res* 593: 121-142, 2006.
56. Guven, A., Kamiloglu, N.N.: Kefirin lipid peroksidasyonuna etkilerinin araştırılması. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.* 10(2): 165-169, 2004.
57. Gülmez, M., Güven, A.: Probiyotikler, Prebiyotikler ve Sinbiyotikler. *Kafkas Üniv. Vet.Fak.Derg.* 8(1): 83-89, 2002.
58. Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B.: Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249(22): 7130-9, 1974.

- 59. Hammouda, A. el-R., Khalil, M.M., Salem, A.:** Lipid peroxidation products in pleural fluid for separation of transudates and exudates. *Clin. Chem.* 41(9): 1314-5, 1995.
- 60. Haskard, C., Binnion, C., Ahokas J.T.:** Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* Strain GG. *Chemico-Biol. Interacts* 128(1): 39-49, 2000.
- 61. Hastings, C.E. Jr, Llewellyn, G.C.:** Reduced aflatoxicosis in livers of hamsters fed a manganese sulfate supplement. *Nutrition and Cancer* 10 (1-2): 67-77, 1987.
- 62. Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R.:** Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45: 51-88, 2005.
- 63. Hayes, J.D., Pulford, D.J.:** The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30(6): 445-600, 1995.
- 64. Hayes, J.D., Strange, R.C.:** Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology.* 61(3): 154-66, 2000.
- 65. <http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Glutathione-skeletal.png>.** 20 Augustos 2008.
- 66. <http://www.insp.mx/rsp/articulos/articulo.php?id=001976>.** 24 Temmuz 2008.
- 67. Huff, W.E., Kubena, L.F., Harvey, R.B., Phillips, T.D.:** Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A. *Poult. Sci.* 71(1): 64-9, 1992.
- 68. Irigoyen, A., Arana I., Castiella, M., Torre, P., Ibáñez, F.C.:** Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chem.* 90(4): 613-620, 2005.

- 69. Jodynis-Liebert, J., Matlawska, I., Bylka, W., Murias, M.:** Protective effect of *Aquilegia vulgaris* L. On aflatoxin B₁-induced hepatic damage in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 22(1): 58-63, 2006.
- 70. Johnson, W.W., Yamazaki, H., Shimada, T., Ueng, Y.F., Guengerich, F.P.:** Aflatoxin B₁ 8,9-epoxide hydrolysis in the presence of rat and human epoxide hydrolase. *Chem. Res. Toxicol.* 10(6): 672-6, 1997.
- 71. Judah, D.J., Hayes, J.D., Yang, J.C., Lian, L.Y., Roberts, G.C., Farmer, P.B., Lamb, J.H., Neal, G.E.:** A novel aldehyde reductase with activity towards a metabolite of aflatoxin B₁ is expressed in rat liver during carcinogenesis and following the administration of an antioxidant. *Biochem. J.* 15;292 (1): 13-18, 1993.
- 72. Kankaanpää, P., Tuomola, E., El-Nezami, H., Ahokas, J., Salminen, S.J.:** Binding of aflatoxin B₁ alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in a Caco-2 Model. *J. Food Prot.*, 63(3): 412-414, 2000.
- 73. Karademir, G.:** Broilerde kefirin probiyotik amaçlı kullanılması. Y.Lisans Tezi. KAÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars, 2003.
- 74. Karaman, M., Basmacioglu, H., Ortatli, M., Oguz, H.:** Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology. *Br. Poult. Sci.* 46(3): 394-400, 2005.
- 75. Karunaratne, A., Wezenberg, E., Bullerman, L.B.:** Inhibition of mold growth and aflatoxin production by *Lactobacillus* spp. *J. Food Prot.* 53(3): 230-236, 1990.
- 76. Kelly, E.J., Erickson, K.E., Sengstag, C., Eaton, D.L.:** Expression of human microsomal epoxide hydrolase in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a functional role in aflatoxin B₁ detoxification. *Toxicol. Sci.*, 65: 35-42, 2002.
- 77. Keppler, D.:** Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Radic. Biol. Med.* 27(9-10): 985-91, 1999.

78. **Kneifel, W., Mayer, H.K.:** Vitamin profiles of kefir made from milk of different species. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 26(4): 423-428, 1991.
79. **Kohwi, Y., Imai, K., Tamura, Z., Hashimoto, Y.:** Antitumor effect of *Bifidobacterium infantis* in mice. *Gann.* 69(5): 613-8, 1978.
80. **Kubo, M., Odani, T., Nakamura, S., Tokumaru, S., Matsuda, H.:** Pharmacological study on kefir--a fermented milk product in Caucasus. I. On antitumor activity. *Yakugaku Zasshi.* 112(7): 489-95, 1992.
81. **Kumagai, S.:** Intestinal absorption and excretion of aflatoxin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 97(1): 88-97, 1989.
82. **Kurtzman, C.P., Horn, B.W., Hesseltine, C.W.:** *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 53(3): 147-58, 1987.
83. **Kwak, H.S., Park, S.K., Kim, D.S.:** Biostabilization of kefir with a nonlactose-fermenting yeast. *J. Dairy Sci.*, 79(6): 937-942, 1996.
84. **La Rivière, J.W., Kooiman, P.:** Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Arch. Mikrobiol.* 59(1): 269-78, 1967.
85. **Lahtinen, S.J., Haskard, C.A., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J., Ahokas, J.T.:** Binding of aflatoxin B₁ to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Addit. Contam.* 21(2): 158-64, 2004.
86. **Lankaputhra, W.E., Shah, N.P.:** Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. *Mutat. Res.* 397(2): 169-82, 1998.
87. **Lee, Y.K., El-Nezami, H., Haskard, C.A., Gratz, S., Puong, K. Y., Salminen, S., Mykkänen, H.:** Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B₁ by viable and nonviable bacteria. *J. Food Prot.*, 66(3): 426-430, 2003.
88. **Liu, B., Yu, F.Y., Chan MH., Yang, Y.:** The effects of mycotoxins, fumonisin B₁ and aflatoxin B₁ on Primary Swine Alveolar Macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 180(3): 197-204, 2002.

89. **Liu, J.R., Chen, M.J., Lin, C.W.:** Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *J. Agric. Food Chem.* 53(7): 2467-74, 2005.
90. **Liu, L., Massey, T.E.:** Bioactivation of aflatoxin B₁ by lipoxygenases, prostaglandin H synthase and cytochrome P450 monooxygenase in guinea-pig tissues. *Carcinogenesis* 13(4): 533-9, 1992.
91. **Liu, Y.H., Taylor, J., Linko, P., Lucier, G.W., Thompson, C.L.:** Glutathione S-transferase mu in human lymphocyte and liver: role in modulating formation of carcinogen-derived DNA adducts. *Carcinogenesis*. 12(12): 2269-75, 1991.
92. **Loe, D.W., Stewart, R.K., Massey, T.E., Deeley, R.G., Cole, S.P.:** ATP-dependent transport of aflatoxin B₁ and its glutathione conjugates by the product of the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Mol. Pharmacol.* 51(6): 1034-41, 1997.
93. **Long, X.D., Ma, Y., Wei, Y.P., Deng, Z.L.:** The polymorphisms of GSTM1, GSTT1, HYL1, HYL1*2, and XRCC1, and aflatoxin B₁-related hepatocellular carcinoma in Guangxi population, China. *Hepatol. Res.*, 36: 48-55, 2006.
94. **Lough, D.:** Investigation of the milk of mammals fed on aflatoxin containing diet. *Nature* 202: 466-467, 1964.
95. **Lopez, C., Ramos, L., Ramadan, S., Bulacio, L., Perez, J.:** Distribution of aflatoxin M₁ in cheese obtained from milk artificially contaminated. *Int. J. Food Mic.*, 64: 211-215, 2001.
96. **Lopez-Garcia, R.:** Integrated mycotoxin management systems. *Alimentación, Nutrición y Agricultura*. (23): 38-48, 1999.
97. **Luccock, M.:** Molecular Nutrition and Genomics. Canada, USA: Wiley-Liss, 2007.
98. **Luna, L.:** Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. New York, USA.: McGraw-Hill Book Company, 1968.
99. **Luzi A., Cometa, M.F., Palmery, M.:** Acute effects of aflatoxins on guinea pig isolated ileum. *Toxicol. In Vitro*.16(5): 525-9, 2002.

100. **Mahoud, B.:** Aflatoxin and kwashiorkor. *Acta Paediatr.* 90(1): 103, 2001.
101. **Marshall, M.V., Cole, W.M.:** Methods for making and fermented milks based on kefir. *J. Dairy Res.*, 52: 451-456, 1985.
102. **Marshall, V.M., Cole, W.M. Brooker, B.E.:** Observations on the structure of kefir grains and the distribution of the microflora. *J. Appl. Bacteriol.*, 57(3): 491-497, 1984.
103. **Martins, M.L., Martins, H.M.:** Aflatoxin M₁ in yoghurts in Portugal. *Int. J. Food Microbiol.*, 91: 315-317, 2004.
104. **McGlynn, K.A., Hunter, K., LeVoyer, T., Roush, J., Wise, P., Michielli, R.A., Shen, F.M., Evans, A.A., London, W.T., Buetow, K.H.:** Susceptibility to aflatoxin B₁-related primary hepatocellular carcinoma in mice and humans. *Cancer Res.* 63(15): 4594-601, 2003.
105. **McKean, C., Tang, L., Tang, M., Billam, M., Wang, Z., Theodorakis, C.W., Kendall, R.J., Wang, J.S.:** Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ in animals and human cells. *Food Chem. Toxicol.* 44(6): 868-76, 2006.
106. **Mishra, HN., Das, C.:** A review on Biological Control and Metabolism of Aflatoxin. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 43(3): 245-264, 2003.
107. **Moubasher, A.H., Abdel-Hafex, S.I.I., El-Hissy, F.T., Hassan, S.K.M.:** Effect of temperature and moisture content on Egyptian peanut seed-borne fungi. *Mycopathologia* 70(1): 49-54, 1980.
108. **Neal, G.E., Eaton, D.L., Judah, D.J., Verma, A.:** Metabolism and Toxicity of Aflatoxins M₁ and B₁ in Human-Derived in Vitro Systems. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151(7): 152-158, 1998.
109. **Newberne, P.M., Butler, W.H.:** Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: a review. *Cancer Res.* 29(1): 236-50, 1969.

- 110. Ngindu A, Johnson BK, Kenya PR, Ngira JA, Ocheng DM, Nandwa H, Omondi, T.N., Jansen, A.J., Ngare, W., Kaviti, J.N., Gatei, D., Siongok, T.A.:** Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya. *Lancet*. 1(8285): 1346-8, 1982.
- 111. Nybom, S.M., Salminen, S.J., Meriluoto, J.A.:** Removal of microcystin-LR by strains of metabolically active probiotic bacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 270(1): 27-33, 2007.
- 112. Orti, D.L., Hil, I R.H. Jr, Liddle, J.A., Needham, L.L., Vickers, L.:** High performance liquid chromatography of mycotoxin metabolites in human urine. *J. Anal. Toxicol*. 10(2): 41-5, 1986.
- 113. Otles, S., Cagindi, O.:** Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. *Pakistan J. Nutr*. 2(2): 54-59, 2003.
- 114. Öztürk, B.:** Yoğurt ve Kefirde Aflatoksin Detoksifikasyonu Üzerine Araştırmalar. Y.Lisans Tezi. Kafkas Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars, 2004.
- 115. Palanee, T., Dutton, M.F., Chuturgoon, A.A.:** Cytotoxicity of aflatoxin B₁ and its chemically synthesised epoxide derivative on the A549 human epithelioid lung cell line. *Mycopathologia*.151(3): 155-9, 2001.
- 116. Park, D.L., Liang, B.:** Perspectives on aflatoxin control for human food and animal feed. *Trends in Food Science&Technology*, 4: 334-342, 1993.
- 117. Peltonen, K., El-Nezami, H.S., Haskard, C., Ahokas, J., Salminen, S.:** Aflatoxin B₁ binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria, *J. Dairy Sci.*, 84(10): 2152-2156, 2001.
- 118. Peltonen, K.D., El Nezami, H.S., Salminen, S.J., Ahokas, J.T.:** Binding of aflatoxin B₁ by probiotic bacteria. *J. Sci. Food Agric*. 80: 1942-1945, 2000.

- 119. Pemble S, Schroeder KR, Spencer, S.R., Meyer, D.J., Hallier, E., Bolt, H.M., Ketterer, B., Taylor, J.B.:** Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem. J.* 300: 271-6, 1994.
- 120. Peraica, M., Radica, B., Lucica, A., Pavlovica, M.:** Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull. World Health Organ.* 77 (9): 754-66, 1999.
- 121. Peterson, S., Lmpe, J.W., Bammler, T.K., Gross-Steinmeyer, K., Eaton, D.L.:** Apiaceous vegetable constituents inhibit human cytochrome P-450 1A2 (hCYP1A2) activity and hCYP1A2-mediated mutagenicity of aflatoxin B₁. *Food Chem. Toxicol.* 44: 1474-148, 2006.
- 122. Pierides, M., El-Nezami, H., Peltonen, K., Salminen, S., Ahokas, J.:** Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M₁ in a food model. *J. Food Prot.*, 63(5): 645-650, 2000.
- 123. Piva, G., Galvano, F., Pietri, A., Piva, A.:** Detoxification methods of aflatoxins, A review. *Nutr. Res.*, 15(5): 767-776, 1995.
- 124. Polat, M.:** Akciğer Kanseri Hastalarında Ve Sağlıklı Bireylerde GSTM1 Gen Delesyonunun Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemiyle Araştırılması. Isparta: Süleyman Demirel Üniv. Fen Bil. Enst. Y.Lisans Tezi, 2005.
- 125. Polychronaki, N.:** Biomarkers of Aflatoxin Exposure and a Dietary Intervention. Doctoral dissertation. Kuopio, Finland: University of Kuopio, School of Public Health and Clinical Nutrition, 2007.
- 126. Polychronaki, N., Wild, C.P., Mykkänen, H., Amra, H., Abdel-Wahhab, M., Sylla, A., Diallo, M., El-Nezami, H., Turner, P.C.:** Urinary biomarkers of aflatoxin exposure in young children from Egypt and Guinea. *Food Chem. Toxicol.* 46(2): 519-26, 2008.
- 127. Preetha, S.P., Kanniappan, M., Selvakumar, E., Nagaraj, M., Varalakshmi, P.:** Lupeol ameliorates aflatoxin B₁-induced peroxidative hepatic damage in rats. *Comp. Biochem. Physiol., part C*, 143: 333-339, 2006.

128. **Qian, G.S., Ross, R.K., Yu, M.C., Yuan, J.M., Gao, Y.T., Henderson, B.E., Wogan, G.N., Groopman, J.D.:** A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 3(1): 3-10, 1994.
129. **Ramos, A.J., Hernández, E.:** In situ absorption of aflatoxins in rat small intestine. *Mycopathologia.* 134(1): 27-30, 1996.
130. **Rasic, J.L., Skrinjar, M., Markov, S.:** Decrease of aflatoxin B₁ in yoghurt and acidified milks. *Mycopathologia*, 113: 117-119, 1991.
131. **Rastogi, R., Srivastava, A.K., Rastogi, A.K.:** Biochemical changes induced in liver and serum of aflatoxin B₁-treated male wistar rats: preventive effect of picroliv. *Pharmacol. Toxicol.* 88(2): 53-8, 2001.
132. **Rustom, I.Y.S.:** Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chem.* 59(1): 57-67, 1997.
133. **Samarajeewa, U., Sen, A.C., Wei, C.I.:** Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. *J. Food Prot.*, 53(6): 489-501, 1990.
134. **Scarpato, R., Migliore, L., Hirvonen, A., Falck, G., Norppa, H.:** Cytogenetic monitoring of occupational exposure to pesticides: characterization of GSTM1, GSTT1, and NAT2 genotypes. *Environ. Mol. Mutagen.* 27(4): 263-9, 1996.
135. **Sedlak, J., Lindsay, R.H.:** Estimation of total protein-bound and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Elman's Reagent. *Anal. Biochem.* 25: 192-205, 1968.
136. **Seydim, Z.:** Studies of microbial and biochemical properties of kefir and kefir grains. Dissertation Thesis. Clemson University, PHD Thesis, Clemson, 2001.
137. **Sezer, Ç.:** Kefirde Laktik Asit Bakterilerinin Tür Düzeyinde Araştırılması. Kafkas Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Y.Lisans Tezi, Kars, 2003.

138. **Shiomi, M., Sasaki, K., Murofushi, M., Aibara, K.:** Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from Kefir grain. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 35(2): 75-80,1982.
139. **Shotwell, O.L., Hesseltine, C.W., Stubblefield, R.D., Sorenson, W.G.:** Production of aflatoxin on rice. *Appl. Microbiol.* 14(3): 425-8, 1966.
140. **Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, Ts., Frengova, G., Spasov, Z.:** Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28(1): 1-6, 2002.
141. **Smith, J.E., Harran, G.:** Mikrobial degradation of mycotoxins. *Int. Biodet. & Biodeg.*, 32: 205-211, 1993.
142. **Steinkraus, K.H.:** Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Cont. Oxford, UK* 8(5/6): 311-317, 1997.
143. **Stewart, R.K., Smith, G.B., Donnelly, P.J., Reid, K.R., Petsikas, D., Conlan, A.A., Massey, T.E.:** Glutathione S-transferase-catalyzed conjugation of bioactivated aflatoxin B(1) in human lung: differential cellular distribution and lack of significance of the GSTM1 genetic polymorphism. *Carcinogenesis.* 20(10): 1971-7, 1999.
144. **Strange, R.C., Spiteri, M.A., Ramachandran, S., Fryer, A.A.:** Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat. Res.* 482(1-2): 21-6, 2001.
145. **Strosnider, H., Azziz-Baumgartner, E., Banziger, M., Bhat, R.V., Breiman, R., Brune, M.N., DeCock, K., Dilley, A., Groopman, J., Hell, K., Henry, S.H., Jeffers, D., Jolly, C., Jolly, P., Kibata, G.N., Lewis, L., Liu, X., Lubber, G., McCoy, L., Mensah, P.:** Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environ. Health Perspect.* 114(12): 1898-903, 2006.

- 146. Sun, C.A., Wang, L.Y., Chen, C.J., Lu, S.N., You, S.L., Wang, L.W., Wang, Q., Wu, D.M., Santella, R.M.:** Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases M1 and T1 associated with susceptibility to aflatoxin-related hepatocarcinogenesis among chronic hepatitis B carriers: a nested case-control study in Taiwan. *Carcinogenesis*. 22(8): 1289-94, 2001.
- 147. Tecimer, T., Tecimer, C., Emre, H., Temel, İ., Üstün, H., Karakaş, S., Otlu, A., Erpek, S.:** Aflatoksin B₁ (AFB₁)'in Tavşan Karaciğeri Üzerine Etkileri: Histopatolojik ve Biyokimyasal Değerlendirme. *Ege Tıp Derg.* 32 (1-2): 45-48, 1993.
- 148. Teniola, O.D., Addo, P.A., Brost, I.M., Farber, P., Jany, K.D., Alberts, J.F., Zyl, W.H., Steyn, P.S., Holzapfel, W.H.:** Degredation of aflatoxin B₁ by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoronthenivorans* sp. Nov. DSM44556. *Int. j. Food Microbiol.*, 105: 111-117, 2005.
- 149. Theumer, M.G., López, A.G., Masih, D.T., Chulze, S.N., Rubinstein, H.R.:** Immunobiological effects of AFB₁ and AFB₁-FB₁ mixture in experimental subchronic mycotoxicoses in rats. *Toxicology*. 186(1-2): 159-70, 2003.
- 150. Tomková, I., Sevcíková, Z., Levkut, M., Revajová, V., Conková, E., Laciaková, A., Lenhardt, L.:** Effect of aflatoxin B₁ on CD3 T cells and alkaline phosphatase in the intestine of mice. *Mycopathologia*. 154(1): 15-19, 2002.
- 151. Turbic, A., Ahokas, J.T., Haskard, C.A.:** Selective in vitro binding of dietary mutagens, individually or in combination, by lactic acid bacteria. *Food Addit. Contam.* 19(2): 144-52, 2002.
- 152. Ubagai, T., Tansho, S., Ito, T., Ono, Y.:** Influences of aflatoxin B₁ on reactive oxygen species generation and chemotaxis of human polymorphonuclear leukocytes. *Toxicol. In Vitro*. 22(4): 1115-20, 2008.
- 153. Ueno, Y.:** The toxicology of mycotoxins. *Crit. Rev. Toxicol.* 14(2): 99-132, 1985.

154. **Van Egmond, H.P.:** Mycotoxins in dairy products. *Food Chem.* 11: 289-307, 1983.
155. **Van Vleet, T.R., Klein, P.J., Coulombe, R.A. Jr.:** Metabolism of aflatoxin B₁ by normal human bronchial epithelial cells. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 63(7): 525-40, 2001.
156. **Vries, H.R., Maxwell, S.M., Hendrickse, R.G.:** Aflatoxin excretion in children with kwashiorkor or marasmic kwashiorkor--a clinical investigation. *Mycopathologia.* 110(1): 1-9, 1990.
157. **Wang, L.Y., Hatch, M., Chen, C.J., Levin, B., You, S.L., Lu, S.N., Wu, M.H., Wu, W.P., Wang, L.W., Wang, Q., Huang, G.T., Yang, P.M., Lee, H.S., Santella, R.M.:** Aflatoxin exposure and risk of hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Int. J. Cancer* 67(5): 620-5, 1996.
158. **Wangikar, P.B., Dwivedi, P., Sinha, N., Sharma, A.K., Telang, A.G.:** Effects of aflatoxin B₁ on embryo fetal development in rabbits. *Food Chem. Toxicol.*, 43: 607-615, 2005.
159. **Whittington, A., Vichai, V., Webb, G., Baker, R., Pearson, W., Board, P.:** Gene structure, expression and chromosomal localization of murine theta class glutathione transferase mGSTT1-1. *Biochem. J.* 337: 141-51, 1999.
160. **Wild, C.P., Yin, F., Turner, P.C., Chemin, I., Chapot, B., Mendy, M., Whittle, H., Kirk, G.D., Hall, A.J.:** Environmental and genetic determinants of aflatoxin-albumin adducts in the Gambia. *Int. J. Cancer* 86(1): 1-7, 2000.
161. **Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M., Aggarwal, D.:** Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am. J. Clin. Nutr.* 80(5): 1106-22, 2004 .
162. **Windham, G.L., Williams, W.P.:** Aspergillus flavus infection and aflatoxin accumulation in resistant and susceptible maize hybrids. *Plant. Dis.* 82(3): 281-84, 1998.
163. **Wiseman, D.W., Marth, E.H.:** Behavior of aflatoxin M₁ in yoghurt, buttermilk and kefir. *J. Food Prot.*, 46(2): 115-118, 1983.

- 164. Wong, J.J., Hsieh, D.P.:** Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73(7): 2241-4, 1976.
- 165. Yamamura, M., Uyemura, K., Deans, R.J., Weinberg, K., Rea, T.H., Bloom, B.R., Modlin, R.L.:** Defining protective responses to pathogens: Cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 254: 277-279, 1991.
- 166. Yatim, A.M.:** Mechanisms of Carnitine-Mediated Modulation of Aflatoxin B₁-DNA Adduct Formation. *Doktora Tezi.* Knoxville: University of Tennessee, 1996.
- 167. Yüksekadağ, Z.N., Beyatlı, Y.:** Kefir mikroflorası ile laktik asit bakterilerinin metabolik, antimikrobiyal ve genetik özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Derg.* 01(02): 49-69, 2003.
- 168. Zhang, Y.J., Rossner, P. Jr., Chen, Y., Agrawal, M., Wang, Q., Wang, L., Ahsan, H., Yu, M.W., Lee, P.H., Santella, R.M.:** Aflatoxin B₁ and polycyclic aromatic hydrocarbon adducts, p53 mutations and p16 methylation in liver tissue and plasma of hepatocellular carcinoma patients. *Int. J. Cancer* 119(5): 985-91, 2006.
- 169. Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debecnach, F., Angelini, S., De Santis, B., Faid, M., Benlemlih, M., Minardi, V., Miranglia, M.:** Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spces commercialized in morocco. *Food Control.*, 17: 868-874, 2006.

8. ÖZGEÇMİŞ

1975 İğdır doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi İğdır ve Kars illeri çevresindeki çeşitli eğitim-öğretim kurumlarında tamamladım. 1992 yılında başladığım Hacettepe üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü'nden 1996 yılında mezun olarak "Diyetisyen" ünvanını aldım. Aynı yıl HÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme Bilimleri Programı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım. 1997 yılında Sağlık Bakanlığı Kars Doğum ve Çocuk Bakımevi Hastanesi'ne diyetisyen olarak atanmam üzerine Yüksek Lisans eğitimimi tez aşamasında bırakmak zorunda kaldım. 2002 yılında tekrar Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi programında Yüksek Lisans eğitimime başlayarak 2004 yılında "Bilim Uzmanı" ünvanını aldım. 2004 yılında aynı anabilim dalında doktora programına başladım. Aynı yıl Kars Doğum ve Çocuk Bakımevi'ndeki görevimden ayrılarak KAÜ Kars Sağlık Yüksekokulu'na araştırma görevlisi olarak atandım. 2007 yılında KAÜ Tıp Fakültesi Hastanesi'nin aktif hizmet vermeye başlamasıyla bu hastanede Klinik ve poliklinik diyetisyeni olarak görevlendirildim ve aynı görevi halen sürdürmekteyim.. Bunların yanında KAÜ Müzik ve Şiir Kulübü'nün kurucu üyeleri arasında yer alarak sanatsal faaliyetlere katkıda bulunmayı sürdürmekteyim. Evli ve bir çocuk babasıyım.