

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OKRATOKSİN A İÇEREN YEMLE BESLENMİŞ WİSTAR ÇEŞİDİ ERKEK
SIÇANLARIN [*Rattus norvegicus*] KARACİĞER VE BÖBREK DOKULARINDA
OKRATOKSİN BİRİKİMİ VE TESTOSTERON HORMON DÜZEYİ İLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Kemal URAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ BÖLÜMÜ ANABİLİM DALI

2012

**OKRATOKSİN A İÇEREN YEMLE BESLENMİŞ WİSTAR ÇEŞİDİ ERKEK
SIÇANLARIN [*Rattus norvegicus*] KARACİĞER VE BÖBREK DOKULARINDA
OKRATOKSİN BİRİKİMİ VE TESTOSTERON HORMON DÜZEYİ İLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Kemal URAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ BÖLÜMÜ ANABİLİM DALI**

**Bu tez 2011.02.0121.018 proje numarası ile Akdeniz Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.**

2012

ÖZET

OKRATOKSİN A İÇEREN YEMLE BESLENMİŞ WİSTAR ÇEŞİDİ ERKEK SIÇANLARIN [*Rattus norvegicus*] KARACİĞER VE BÖBREK DOKULARINDA OKRATOKSİN BİRİKİMİ VE TESTOSTERON HORMON DÜZEYİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Kemal URAN

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü Anabilim Dalı

Danışman: Yrd.Doç.Dr. M. Akif Kılıç

Haziran 2012, 53 Sayfa

Bu çalışmada; Okratoksin A (OTA) içeren yem ile beslenmiş erkek, kastre edilmiş erkek ve dişi sıçanların böbrek, karaciğer ve plazma OTA miktarları belirlenmiş ve OTA düzeylerinin organ, zaman, cinsiyet ve kastrasyon işlemine bağlı olarak değişimi araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda; 6 ve 12 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenmiş erkek sıçanlar, 24 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenmiş erkek, kastre edilmiş erkek ve dişi sıçanlar ile kontrol grubunu oluşturan OTA içermeyen yem ile beslenen sıçanlar olmak üzere 7 deney grubu oluşturulmuştur. Deney periyodu boyunca OTA içeren yem ile beslenen erkek ve dişi sıçanların böbrek, karaciğer ve plazma dokularındaki OTA analizleri HPLC cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Tespit edilen OTA seviyeleri organlara, zamana, cinsiyet ve kastrasyon işlemine bağlı olarak değerlendirilmiştir. Testosteron hormonu miktarı ise ELISA test tekniği ile ortaya konmuştur.

Sıçanların OTA seviyelerinin organlara bağlı değişimi incelenmiş ve yalnızca 12 ve 24 hafta OTA uygulaması yapılan erkek sıçanların böbrek ile karaciğerleri arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir ($P>0.05$). Bunun yanında diğer grupların (dişi, kastre erkek ve normal erkek 6. hafta) böbrek ve karaciğer OTA seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olduğu görülmüştür ($P<0.05$).

Erkek sıçanlarda OTA seviyesinin zamana bağlı değişimi incelenmiş, böbrek, karaciğer ve plazmalarda tespit edilen OTA değerlerinin 12. haftada 6. haftaya göre

yükseldiği, ancak 24. haftada düştüğü görülmüştür. Böbrek OTA düzeylerinin bu üç farklı zaman diliminde istatistiksel olarak farklılık gösterdiği belirlenmiştir ($P<0.01$). Karaciğer OTA değerleri zamana bağlı incelendiğinde; 6. haftada elde edilen OTA değeri ile diğer iki grup arasında herhangi bir farklılık tespit edilmezken ($P>0.05$), 12. ve 24. haftada elde edilen karaciğer OTA değerleri arasında anlamlı bir farklılık görülmüştür ($P<0.01$). Sıçanların plazma OTA seviyeleri zamana bağlı değerlendirildiğinde, 6 ve 12 hafta süresince OTA uygulanmış erkek sıçanların plazma OTA düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmayıp ($P>0.05$), 24 hafta süresince OTA ile beslenmiş erkek sıçanların plazma OTA seviyesinin diğer iki gruba oranla anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir ($P<0.01$).

Sıçanların OTA seviyelerinin cinsiyete bağlı değişip değişmediğini ortaya koymak amacıyla, 24 hafta süresince OTA uygulanan erkek ve dişi sıçanların böbrek, karaciğer ve plazma OTA seviyeleri tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler karşılaştırıldığında, dişi sıçanların her üç dokudaki OTA seviyelerinin erkeklere göre daha yüksek değerlerde olduğu bulunmuştur ($P<0.01$). Bu sonuç, cinsiyetin sıçanlardaki OTA seviyesi üzerine belirgin etkisinin olduğunu göstermektedir.

Sıçanlarda organ ve plazma OTA seviyelerinin testosteron hormonu ile ilişkili olup olmadığını ortaya koymaya yönelik olarak, bir grup erkeğin testisleri OTA alımlarının 6. haftasında uzaklaştırılmış (kastre edilmiş) ve 24 hafta OTA alımı sonrasında, organları ve plazmaları toplanmıştır. Normal erkek, OTA almış erkek ve kastre edilmiş erkeklerin kastrasyon öncesinde plazma testosteron hormon düzeylerinin benzer olduğu (3.61- 4.86 ng/ml) ve kastrasyonun testosteron hormon düzeyini belirgin bir şekilde azalttığı (0.19 ng/ml) görülmüştür. Kastrasyon işlemi, erkeklerin karaciğer ve plazma OTA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yaratmazken ($P>0.05$), böbrek OTA düzeylerinde farklılık yarattığı görülmektedir ($P<0.05$).

Bu çalışmadan elde edilen bulgular özetlendiğinde; 1- Sıçanların plazma ve organ OTA düzeyleri cinsiyete bağlı değişmiş ve dişilerde daha yüksek seviyede bulunmuştur, 2- Erkek sıçanlarda organ ve plazma OTA düzeyi 12. haftaya kadar artış göstermekte ve daha sonra azalmaktadır 3- Erkek sıçanların karaciğer ve böbrek OTA düzeylerinde organlara bağlı belirgin bir farklılık gözlenmemektedir ve 4- Erkek sıçanların plazma ve organ OTA düzeyleri testosteron hormon düzeyinden bağımsız gözükmemektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: Okratoksin A, Böbrek, Karaciğer, Plazma, Testosteron

JÜRİ: Yrd. Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ (Danışman)

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Prof. Dr. Burhan SAVAŞ

ABSTRACT

DETERMINATION OF OCHRATOXIN A ACCUMULATION IN KIDNEY AND LIVER OF WISTAR MALE RATS [*Rattus norvegicus*] FED WITH OTA CONTAINING DIET AND RELATION WITH TESTOSTERONE HORMONE LEVELS

Kemal URAN

Ms Thesis in Biology

Adviser: Mehmet Akif KILIÇ

June, 2012, 53 pages

In this study, plasma and organ (kidney and liver) OTA levels of OTA-treated normal male and female rats and castrated rats were determined and their OTA levels were evaluated according to sample types, time, sex and castration. For this purpose, rats were put in seven groups. For the determination of time-dependent OTA changes in organs and plasma, normal males were treated with OTA for 6, 12 and 24 weeks. Female rats were also treated with OTA for 24 weeks for the determination of sex-dependent OTA levels of organs and plasma. To find out the role of testosterone in organ and plasma OTA levels, a group of rats were castrated after 6 weeks of OTA treatment and then continued to be fed with OTA containing food for a further 18 weeks. OTA analysis of organs and plasma samples were carried out using HPLC with a fluorescence detector and testosterone levels of normal and castrated males' plasma samples were determined with an ELISA based technique.

The OTA levels of organs and plasma samples were evaluated according to organ type, OTA-treatment period, sex and castration. When OTA levels of kidney and liver of the rats were compared, there were statistically significant differences between the organs ($P < 0.05$), except in the organs of 12 and 24 week OTA-treated normal male rats ($P > 0.05$).

When organ and plasma OTA levels of the male rats were compared according to the OTA-treatment period, it was found that there was an increase in week 12

(compared to week 6) and then a decrease in week 24. The kidney OTA levels in three different time periods showed statistically significant differences ($P<0.001$). When liver OTA levels were compared, there were no statistical differences between week 6 and other weeks ($P>0.05$) but there were statistically significant differences between weeks 12 and 24 ($P<0.001$). When the plasma OTA levels of the male rats were compared according to their OTA-treatment period, there were no differences between weeks 6 and 12 ($P>0.05$) but in week 24, OTA levels of the plasma were significantly lower than the other two weeks ($P<0.001$).

In order to find out whether males and females' organ and plasma OTA levels differ, 24 weeks OTA treated males and females' organ and plasma OTA levels were compared and it was found that the organ and plasma OTA levels of females were significantly higher than males ($P<0.001$). The result showed that organ and tissue OTA levels in rats are sex dependent.

In order to find out whether males' organ and plasma levels are testosterone dependent, the testes of a group of males were removed (castrated) after receiving 6 weeks OTA treatment and then their organs and plasma samples were collected at the end of their 24 week OTA treatment. It was found that the testosterone levels of normal males, OTA-treated normal males and OTA-treated castrated males were similar to each other (3.61- 4.86 ng/ml) and the castration dramatically reduced the plasma testosterone level in castrated males (0.19 ng/ml). When OTA levels of normal and castrated males were compared, there were no significant differences in the liver and plasma OTA levels of the rats ($P>0.05$) but kidney OTA levels of the rats were statistically different ($P<0.05$).

In summary; 1- The plasma and organ OTA levels of rats changes according to sex, being higher in females, 2- Males' organ and plasma OTA levels increase up to week 12 and then they decrease, 3- There are no significant differences between the organ and plasma OTA levels of males and 4- It seems that organ and plasma OTA levels of male Wistar Rats are independent from their plasma testosterone levels.

KEY WORDS: Ochratoxin A, Kidney, Liver, Plasma and Testosterone

COMMITTEE : Asst. Prof. Dr. M. Akif KILIÇ (Adviser)

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Prof. Dr. Burhan SAVAŞ

ÖNSÖZ

Mikotoksinler, çeşitli küfler tarafından salgılanan ikincil metabolitler olup, insanlar ve hayvanlarda istenmeyen patolojik ve fizyolojik değişiklikler meydana getirmektedirler. Mikotoksinler içerisinde önemli bir yer teşkil eden okratoksinler, *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi küflerin birçok türü tarafından sentezlenebilmektedir. Bütün memelilerde akut ve kronik lezyonlara sebep olan okratoksin A (OTA), hem gıdalara, hem de hayvan yemlerine bulaşabilmektedir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda OTA'nın akut toksik, mutajenik, karsinojenik, teratojenik etkilere sahip olduğu ortaya konulmuştur.

Bu çalışmada farklı sürelerde OTA uygulaması yapılan sıçanların böbrek, karaciğer ve plazma OTA seviyeleri tespit edilmiştir. Bu veriler organ, zaman, cinsiyet ve kastrasyon işlemi bakımından karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, OTA'nın cinsiyete bağlı etkisinin aydınlatılması açısından önem taşımaktadır. Ayrıca araştırma bazı yönleri ile bu alanda yapılan ilk çalışma olup, bundan sonra yapılacak benzer çalışmalara kaynak oluşturacaktır.

Bana bu konuda çalışma olanağı sağlayan, çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen danışman Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. M. Akif Kılıç'a (Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü) Sayın Yrd. Doç. Dr. Firdevs Mor'a (Mehmet Akif Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi), Sayın Prof. Dr. Burhan Savaş'a (Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi) ve analizlerimde bana yardımcı olan Antalya Gıda Kontrol Laboratuvarı çalışanları Nurten Selçuk, Dr. Asuman Göncü Sürü ve Ufuk Erki'ye çalışmalarım esnasında her zaman yanımda olan ve desteğin hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Sibel Milci Uran'a, araştırmaya maddi destek sağlayan Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi yetkili ve çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI.....	2
2.1. Mikotoksinler	2
2.1.1. Aflatoksinler	3
2.1.2. Patulin	4
2.1.3. Fumonisinler.....	4
2.1.4. Zearalenon	5
2.1.5. Okratoksin	5
2.1.5.1. Okratoksin A.....	7
2.1.5.2. Okratoksin B	8
2.1.5.3. Okratoksin C	8
2.2. OTA Kontaminasyonu ve İzin Verilen Limitler	9
2.3. OTA'nın Hayvanlarda Emilimi, Organ Dağılımı ve Metabolizması	10
2.4. OTA Toksisitesi.....	11
2.4.1. OTA'nın kanserojen etkisi	12
2.4.2. OTA'nın teratogenez ve mutagenez etkisi	13
2.4.3. İmmunosupresyon etkisi.....	14
2.4.4. Mitokondriyal hasarlar	14
2.4.5. DNA, protein ve RNA üzerindeki etkileri.....	15
2.4.6. Nefrotoksisitesi	15
2.4.7. Hepatotoksisite	17
2.5. Alfa 2u Globulinler	18
2.6 Testosteron.....	19

3. MATERYAL VE METOD.....	21
3.1. Deney Hayvanları.....	21
3.2. Yöntem.....	22
3.2.1. Kastrasyon	22
3.2.2. Organların homojenizasyonu	22
3.2.3. Organlardan OTA ekstraksiyonu	23
3.2.4. Plazmadan OTA ekstraksiyonu	23
3.2.5. HPLC analizi	24
3.2.6. OTA standart çözeltinin hazırlanması.....	24
3.2.7. Validasyon çalışması	25
3.2.8. Testosteron hormonu miktar tayini.....	25
3.2.9. İstatistiksel analiz.....	25
4. BULGULAR	26
4.1. OTA Seviyesinin Organlara Bağlı Değişimi	26
4.2. OTA Seviyelerinin Zamana Bağlı Değişimi.....	29
4.3. OTA Seviyelerinin Cinsiyet ve Kastrasyon İşlemine Bağlı Değişimi.....	32
4.4. Validasyon Çalışması.....	37
4.4.1. Doğrusallık	37
4.4.2. Seçicilik	37
4.4.3. Tespit ve ölçüm limiti (LOD ve LOQ).....	39
4.4.4. Kesinlik.....	39
4.4.5. Gerçeklik.....	40
4.5. Erkek Sıçanların Plazma Testosteron Hormon Düzeyleri	41
5. TARTIŞMA.....	43
6. SONUÇ.....	47
7. KAYNAKLAR.....	48
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°C	Santigrat derece
dl	Desilitre
g	Gram
kg	Kilogram
mg	Miligram
ml	Mililitre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mM	Milimol
ng	Nanogram
nm	Nanometre
pg	Pikogram
ppm (mg/l)	Milyonda bir birim

Kısaltmalar

BEN	Balkan Endemik Nefropatileri
D-OTA-24H	24 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen dişi sıçanlar
E-OTA-6H	6 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanlar
E-OTA-12H	12 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanlar
E-OTA-24H	24 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanlar
E-KAST.-	6. hafta sonunda kastre edilip, toplamda 24 hafta süresince OTA içeren yem
OTA-24H	ile beslenen erkek sıçanlar
E-24H	24 hafta süresince OTA içermeyen yem ile beslenen erkek sıçanlar
D-24H	24 hafta süresince OTA içermeyen yem ile beslenen dişi sıçanlar
ELİSA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FAO	Gıda Tarım Örgütü
FB1	Fumonisin B1
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

IgA	Immunoglobülin A
IgG	Immunoglobülin G
IgM	Immunoglobülin M
KO	Kareler ortalaması
LOD	Tespit Limiti
LOQ	Ölçüm Limiti
OATP	Organik Anyon Transport Polipeptid Taşıyıcısı
OTA	Okratoksin A
OTB	Okratoksin B
OTC	Okratoksin C
PAH	Para Amino Hippürik Asit
RSD	Rölatif Standart Sapma
SD	Serbestlik derecesi
TDI	Tolere Edilebilir Günlük Alım Düzeyi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Okratoksin A'nın kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2.2. Okratoksin B'nin kimyasal yapısı	8
Şekil 2.3. Okratoksin C'nin kimyasal yapısı.....	9
Şekil 4.1. Sıçanların böbrek ve karaciğerlerinde tespit edilen OTA seviyeleri	28
Şekil 4.2. 6, 12 ve 24 hafta OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanların böbrek, karaciğer ve plazmalarında tespit edilen OTA seviyeleri.....	31
Şekil 4.3. 24 hafta OTA içeren yem ile beslenen sıçanların böbrek, karaciğerler ve plazmalarında tespit edilen OTA seviyeleri.....	34
Şekil 4.4. OTA'nın, cihaz tarafından ölçülen alanına karşılık regresyon eğrisi.....	37
Şekil 4.5. OTA içeren örneğe ait kromatogram	38
Şekil 4.6. OTA standartına ait kromatogram	38
Şekil 4.7. OTA içermeyen örneğe ait kromatogram	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Okratoksin üreten <i>Aspergillus</i> ve <i>Penicillium</i> türleri	6
Çizelge 2.2.	Okratoksin A, Okratoksin B, Okratoksin C, 4-hidroksiokratoksin A ve Okratoksin α 'nın kimyasal yapısı	7
Çizelge 2.3.	Farklı gıda maddelerindeki izin verilen Okratoksin A limitler.....	10
Çizelge 3.1.	Deney hayvanlarının gruplandırılması.....	21
Çizelge 3.2.	HPLC cihazının kromatografik çalışma koşulları.....	24
Çizelge 4.1.	Deney gruplarının böbrek, karaciğer ve plazmalarında tespit edilen OTA değerleri (ng/g-ml).....	26
Çizelge 4.2.	Deney gruplarının böbrek ve karaciğerlerinde tespit edilen OTA değerlerine ait varyans analiz sonuçları.....	29
Çizelge 4.3.	Deney gruplarının böbrek ve karaciğerlerinde tespit edilen OTA değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	29
Çizelge 4.4.	6, 12 ve 24 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanların böbrek, karaciğer ve plazmalarında tespit edilen OTA değerlerine ait varyans analiz sonuçları.....	32
Çizelge 4.5.	6, 12 ve 24 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanların böbrek, karaciğer ve plazmalarında tespit edilen OTA değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	32
Çizelge 4.6.	24 hafta süresince OTA içeren yemle beslenen erkek sıçanlar ile kastre edilmiş erkek sıçanlara ait varyans analiz sonuçları.....	35
Çizelge 4.7.	24 hafta süresince OTA içeren yemle beslenen erkek sıçanlar ile kastre edilmiş erkek sıçanların OTA değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	35
Çizelge 4.8.	24 hafta süresince OTA içeren yemle beslenen erkek sıçanlar ile dişi sıçanlara ait varyans analiz sonuçları.....	35
Çizelge 4.9.	24 hafta süresince OTA içeren yemle beslenen erkek sıçanlar ile dişi sıçanların OTA değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	36
Çizelge 4.10.	Tespit ve Ölçüm Limiti sonuçları	39

Çizelge 4.11. Aynı gün tekrarlanabilirlik çalışması	40
Çizelge 4.12. Farklı gün tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları	40
Çizelge 4.13. Geri alma çalışması değerleri.....	40
Çizelge 4.14. Plazma testosteron hormonu miktar tayini sonuçları	41
Çizelge 4.15. Plazma testosteron hormonu değerlerine ait varyans analiz sonuçları...	42
Çizelge 4.16. Plazma testosteron hormonu değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	42

1. GİRİŞ

Okratoksin A (OTA), *Penicillium* ve *Aspergillus* cinsi küflerin birçok türü tarafından sentezlenen ve çeşitli tahıl ürünleri, kuru meyveler, yer fıstığı, kahve, kakao, baharat, şarap, bira ve bazı hayvansal ürünlerde rastlanan bir mikotoksindir. Çeşitli araştırmalar OTA'nın kanserojenik, genotoksik, teratojenik, immünotoksik ve nefrotoksik olduğunu ortaya koymaktadır. Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (IARC) tarafından insanda muhtemel kanserojen madde (Grup 2B) olarak sınıflandırılan OTA, özellikle Balkan Ülkelerinde Tuna nehri kıyısı kırsal bölge insanlarında görülen Balkan Endemik Nefropati (BEN) hastalığından, Mısır'da ve Tunus'ta görülen ve etiyolojisi bilinmeyen nefropatilerden ve böbrek tümörlerinden sorumlu tutulmaktadır (Fuchs ve Peraica 2005).

Yapılan çalışmalarla OTA'nın kemirgenlerde kanserojenik etki gösterdiği renal neoplazmalar, karsinom ve adenomlara neden olduğu ve bu oranın erkeklerde dişilere göre daha yüksek seviyelerde bulunduğu bildirilmiştir (Bendele vd 1985). Toksikokinetik çalışmalar ile (Mantle 2008, Vettorazi vd 2009) dişi sıçanların plazma OTA konsantrasyonlarının erkek sıçanlara göre daha yüksek seviyelerde olduğu gösterilmişse de, OTA'nın erkeklerde daha fazla toksik etki gösterdiği, dişiler ile kıyaslandığında OTA kaynaklı böbrek kanserine erkek sıçanların yaklaşık 10 kat daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Boorman vd 1992). OTA'nın cinsiyete bağlı farklı etki mekanizmasının altında testosteron hormonu ve buna bağlı olarak alfa-2u globulin proteinlerinin rolünün olabileceği ileri sürülmektedir (Mantle ve Nagy 2008).

OTA içeren yem ile beslenmiş sıçanların böbrek, karaciğer ve plazma dokularındaki OTA seviyelerini belirlemek ve OTA düzeylerinin organ, zaman, cinsiyet ve kastrasyon işlemine bağlı olarak değişimini araştırmak için yapılmış bu çalışmada erkek, kastre edilmiş erkek ve dişi sıçanlardan oluşan deney gruplarına farklı sürelerde OTA uygulaması yapılmış ve her üç dokudaki OTA seviyeleri tespit edilerek karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Erkek sıçanlar ile kastre edilmiş erkek sıçanların testosteron hormon miktarları tespit edilerek karşılaştırılmıştır. Testosteron hormon miktarlarındaki farklılığın dokulardaki OTA seviyelerini nasıl etkilediği, ve cinsiyete bağlı farklı etkinin altında testosteron hormonunun rolü ortaya konmaya çalışılmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

2.1. Mikotoksinler

Mikotoksin terimi, yunanca küf anlamına gelen “mykes” ve Latince zehir anlamına gelen “toxicum” kelimelerinin birleşmesinden oluşmuştur. Mikotoksinler küflerin salgıladığı, insan ve hayvanlarda hastalık oluşturan, ikincil metabolizma ürünleridir (Turner vd 2009).

Küflerin ve diğer organizmaların birincil metabolitleri, büyümeleri için gerekli olan yapılardır. İkincil metabolitler ise asıl görevleri tam olarak aydınlatılamamakla birlikte, sentezleyen organizmanın metabolizması ya da gelişimi üzerine belirgin bir öneme sahip olmadığı düşünülmektedir. Söz konusu bu metabolitlerin diğer mikroorganizmalar ile besin ve ortam için rekabet etmelerine yardımcı olduğu ileri sürülmekte, bir başka görüşe göre ise; mikotoksin üretiminin fungal sporlar için uygun çimlenme koşullarının yaratılmasına katkı sağladığı belirtilmektedir (O’Brien ve Dietrich 2004).

Bu tür ikincil metabolitleri, çoğunlukla *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* ve *Fusarium* cinslerine ait üyeler tarafından sentezlenen uçucu organik maddeler ve mikotoksinler oluşturur. Üretilen uçucu organik maddeler ketonlar, aldehitler, alkoller ve çoklu modifiye edilmiş aromatik ve alifatik yapılardan meydana gelirler. Küflerde ikincil metabolitlerin sentezlenme yolları; poliketit biyosentez yolu, terpenoid ve temel aminoasitlerin kullanımı şeklindedir (Khomutov vd 2010).

Mikotoksinlerin kimyasal yapıları incelendiğinde, çoğunun aromatik yapıda olduğu, az bir kısmının ise alifatik bileşiklerden oluştuğu görülmektedir. Bazı mikotoksinler misel içerisinde birikirken, birçoğunun miselden substrata doğru salgılandığı ve difüze olduğu görülmektedir. Bu nedenle küflü gıda ve yemlerden miseller uzaklaştırılsa bile ürünün mikotoksin tehlikesi ortadan kalkmamaktadır.

Fungusların gelişimi ve toksin oluşturabilmesi için en önemli faktörler sıcaklık ve ürünün su aktivitesidir. Funguslar genel olarak diğer mikroorganizmalara kıyasla daha düşük su aktivitesinde gelişebilmekte ve 0.70 su aktivitesi değeri fungal gelişimin önlenmesi için sınır olarak kabul edilmektedir. Toksin oluşumu için ihtiyaç duyulan su aktivitesi fungus gelişimi için ihtiyaç duyulandan biraz daha fazla olup; çok yüksek

sıcaklıkların dışında fungusun gelişmesine imkan veren her sıcaklık derecesinde toksinin de oluştuğu belirtilmektedir (Gqaleni vd 1997).

Küflerin hemen her yerde bulunabilmeleri ve birçok gıda ve yem maddesinde gelişerek toksinlerini oluşturabilmeleri nedeniyle, mikotoksinler gıda güvenliği için önemli tehditlerden biri olarak kabul edilmektedir. Mikotoksinler, bitkisel ürünlere yetiştirme sürecinde, hasat sırasında, ürünün işlenmesi veya depolanması evresinde bulaşabildiği gibi, toksik maddelerin tüketiciye geçişinde hayvanlar da etken faktör olabilmektedir (Brase vd 2009).

Bugüne kadar 400 mikotoksin tanımlanmış olmasına rağmen bunlar arasında birinci derecede önemli olarak kabul edilenlerin sayısı 5-6 civarındadır. En sık karşılaşılan ve sağlık açısından önemli sorunlara neden olabilen mikotoksinler; aflatoksin, okratoksin, zearalenon, patulin, fumonisin ve trikotesendir (Muro vd 2003).

2.1.1. Aflatoksinler

Aflatoksinler, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından üretilen ikincil metabolizma ürünleridir. Bunların dışında *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Streptomyces* cinslerinin de aflatoksin ürettiği belirtilmiştir. 1987 yılında *A. flavus*’a fenotipik olarak benzeyen *Aspergillus nomius* ve son olarak da *Aspergillus pseudotamari* olarak isimlendirilen iki türün de aflatoksin ürettikleri belirlenmiştir (Ito vd 2001). Bu toksinler, insan ve hayvan sağlığı üzerinde kanserojenik, teratojenik ve mutajenik etkilere neden olur. Toksik ve kanserojenik potansiyeli nedeniyle üzerinde en fazla durulan mikotoksin grubunu oluşturmaktadır. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı’na göre “**Grup I**” kanserojen olarak değerlendirilmektedir (Passone vd 2004).

Aflatoksinler kimyasal yapı olarak bifuran halkası ve lakton bağı içeren kumarin türevi bileşiklerdir. On sekiz adet değişik aflatoksin tipi tanımlanmış olup B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ ve M₂ en yaygın olanlarıdır. Aflatoksinler arasında en yüksek toksisiteyi aflatoksin B₁, en düşük toksisiteyi ise aflatoksin G₂ göstermektedir (Dhanasekaran vd 2009). Toksisite sırası ile B₁ > G₁ > B₂ > G₂ şeklindedir. Genellikle aflatoksinlere genç hayvanlar yaşlı olanlara, erkek sıçanlar ise dişilere kıyasla daha fazla hassasiyet göstermektedir. 1 mg/kg aflatoksin B₁ verilen erkek sıçanlarda 35 hafta sonra karsinoma

gelişirken, dişi sıçanlarda 64 hafta sonra tümörlerin oluştuğu gözlenmiştir (Cassel vd 1988).

Aflatoksinler kanserojenik, mutajenik ve teratojenik etkilerinin yanı sıra, ısıtma işlemlere de dirençli olmaları nedeniyle sağlık açısından önem taşımaktadırlar (Govaris vd 2001). Aflatoksinler gıda ve yem maddelerinde oldukça dirençli bir yapı göstermektedir. Sıradan pişirme yöntemleri ve pastörizasyon işlemleri aflatoksinlerde çok az hasara neden olmakta veya hiç etkilememektedir. Ancak çok düşük veya yüksek pH'larda (3'ten az veya 10'dan büyük) ve oksijenli ortamlarda UV ışığına maruz kalmaları durumunda hızla aktivasyonlarını yitirmektedirler (Armstrong vd 1979).

2.1.2. Patulin

Patulin en fazla yüksek asitli meyve, sebze ve bunların mamullerinde bulunan *Penicillium*, *Aspergillus* ve *Byssosclamyces* gibi küflerin çeşitli türleri tarafından üretilen bir mikotoksindir. Genellikle elma, elma suyu ve işlem görmüş veya görmemiş çeşitli meyvelerde bulunmaktadır. Bu mikotoksinin daha çok meyve ve ürünlerinde üretilmesinin, bu gıdalarda meyve şekeri olarak bilinen fruktozun daha çok bulunuşu ile açıklanabildiği bildirilmiştir. Patulinin toksik etki alanının geniş olduğu ve hayvanlar üzerinde kanserojen, mutajen ve teratojen etkili bir mikotoksin olduğu bildirilmiştir (Puel vd 2010).

2.1.3. Fumonisinler

Fumonisinler, *Fusarium moniliforme* ve *Fusarium proliferatum* küfleri tarafından üretilen mikotoksinlerdir. Bir çok tipi tanımlanmış, bunlardan en bilineni fumonisin B1 (FB1)'dir. Mısır bitkisinde en yaygın olarak bulunan doğal kontaminant FB1'dir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'na göre "Grup IIB" kanserojen olan FB1'in yapılan çalışmalar sonucunda sıçanlarda böbrek tübüllerinde tümörlere neden olduğu, farelerde ise karaciğerde adenomlara ve karsinomlara sebebiyet verdiği gösterilmiştir (Howard vd 2001).

2.1.4. Zearalenon

Zearalenon, *Fusarium culmorum* ve *Fusarium graminearum* gibi *fusarium* cinsine ait bazı türler tarafından üretilen üzüm, mısır ve yüksek nem içeriği olan saman yığınlarında sıklıkla bulunan bir mikotoksindir (Abbes vd 2006). İnsan diyetinde ve hayvan yemlerinde zearalenon görülme sıklığı yüksek bulunmuştur. Zearalenon içerikli mısır, öğütülmüş arpa ve buğday gibi hububatların tüketilmesiyle, özellikle dişi domuzlarda vulvada yumru şeklinde ödem veya vajina ve rektumda sarkma şeklinde genital problemlere neden olduğu tespit edilmiştir. Doku ölümü, yavru kaybı, gelişim bozukluğu gibi üreme ile ilgili düzensizliklere de neden olabileceği bildirilmiştir. Zearalenon ayrıca karaciğer lezyonlarına neden olmakta, daha ileriki aşamada karaciğerde kanser oluşumunu tetikleyebilmektedir (Pitt 2000).

2.1.5. Okratoksin

Okratoksin molekülü, ilk kez 1965 yılında van der Merwe ve arkadaşları tarafından *Aspergillus ochraceus* suşunun bir metaboliti olarak bulunmuştur. Funguslar içinden iki cinsin okratoksin ürettiği bilinmektedir. Bu cinsler *Aspergillus* ve *Penicillium*'dur. Okratoksin üreten *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin bazıları Çizelge 2.1'de verilmiştir (Brase vd. 2009).

Çizelge 2.1. Okratoksin üreten *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri

<i>Aspergillus</i> Türleri	<i>Penicillium</i> Türleri
<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Penicillium viridicatum</i>
<i>Aspergillus melleus</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
<i>Aspergillus auricomus</i>	<i>Penicillium palitans</i>
<i>Aspergillus ostianus</i>	<i>Penicillium commune</i>
<i>Aspergillus petraki</i>	<i>Penicillium purpurescens</i>
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	<i>Penicillium variabile</i>
<i>Aspergillus sulphureus</i>	<i>Penicillium cyclopium</i>
<i>Aspergillus alliaceus</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>Aspergillus albertensis</i>	<i>Penicillium crustosum</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium funiculosum</i>

Okratoksin gıdalarda genellikle sitrinin ve penisilik asitle veya başka mikotoksinlerle beraber görülür. Çünkü okratoksin üreticisi *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri ikincil metabolitler olarak birkaç mikotoksini daha eş zamanlı sentezlerler (Sansing vd 1976).

Okratoksin üretiminde sıcaklık ve su aktivitesi önemli etkenlerdir. *Aspergillus ochraceus*'un optimum gelişme sıcaklığı 28°C dir. Okratoksin A (OTA) oluşumu için de 20 - 30 °C sıcaklığa ihtiyaç vardır. Maksimum düzeyde toksini 30 °C sıcaklıkta üretir. *Penicillium* türleri ise düşük sıcaklıklarda toksin oluşturabilirler. *Penicillium viridicatum* 5-10 °C sıcaklıkta okratoksin üretir.

Okratoksinler Asya, Avrupa ülkeleri ile Kuzey Amerika ve hatta Avustralya'ya kadar geniş bir alanda tahıl, baklagiller, üzüm, kahve, kakao, kuru meyveler ve soya fasulyesi gibi birçok üründe bulunur.

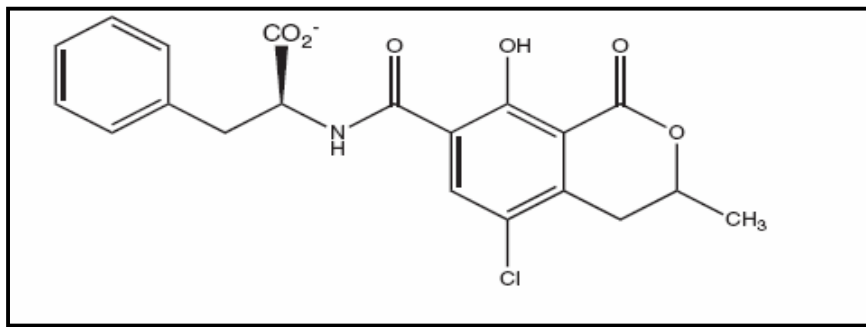
Merwe vd (1965) tarafından A, B ve C olmak üzere 3 tip okratoksin tanımlanmıştır. Gıdalarda ve yemlerde yaygın olarak bulunan ve zehirlenmeye neden olan OTA'dır. Okratoksin B, Okratoksin A'dan daha az toksiktir. Okratoksin C'ye doğada nadir olarak rastlanmaktadır.

Çizelge 2.2. Okratoksin A, Okratoksin B, Okratoksin C, 4-hidroksiokratoksin A ve Okratoksin α 'nın kimyasal yapısı (Ringot vd 2006).

Okratoksinler	R1	R2	R3
OTA	H	Cl	-NH-CH(COOH)-CH ₂ -Fenil
OTB	H	H	-NH-CH(COOH)-CH ₂ -Fenil
OTC	H	Cl	-NH-CH(COOC ₂ H ₅)-CH ₂ -Fenil
4-hidroksiokratoksin A	OH	Cl	-NH-CH(COOH)-C ₂ H-Fenil
OT α	H	Cl	-OH

2.1.5.1. Okratoksin A

Okratoksin A suda az, polar organik çözücüler ile seyreltik sulu sodyum bikarbonat çözeltisinde iyi çözünen, renksiz ve kristal yapıda bir bileşiktir. UV ışınları altında mavi renkte floresan verir. Okratoksin A, 7-karboksi-5-kloro-8- hidroksi-3,4 dihidro-3R-metil-izokumarin içerir ve L β -fenilalanine karboksi grup üzerinden bağlanır. Kimyasal yapısında fenilalanin, Cl ve OH içeren dihidroizokumarin bulunur. Okratoksin A'nın Cl içermeyen türevi Okratoksin B, etilester türevi ise okratoksin C'dir. Okratoksin B ve okratoksin C gıdalarda görülseler de düşük konsantrasyonda bulunduklarından fazlaca önem taşımazlar. Okratoksin A, pankreas ve ince bağırsakta α -kimotripsin ve karboksipeptidaz enzimleri ile okratoksin α 'ya hidroliz edilmektedir (Clark ve Snedeker 2006).



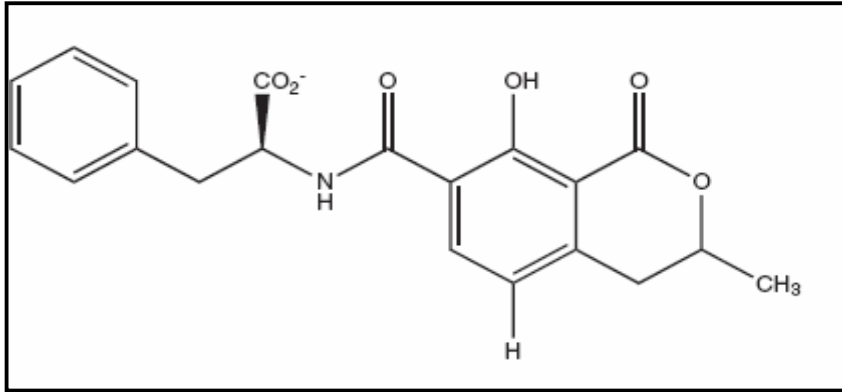
Şekil 2.1. Okratoksin A'nın kimyasal yapısı

Okratoksin A büyük miktarlarda üretilir ve sık sık gıda ve yemlerde doğal kontaminant olarak rastlanır. Farklı gıdalarda yapılan çalışmalar okratoksin A'nın sıcaklığa karşı dayanıklı olduğunu göstermiştir. Patterson (1977), Josefson ve Möller

(1980), Scott (1984), domuz eti ve sakatatların 150-160 °C sıcaklıkta pişirilmesiyle toksin miktarında % 20 azalma meydana gelirken, yağ dokusunda bulunan toksinde hiç kayıp olmadığını bildirmektedir. Okratoksinle kontamine olmuş un ile yapılan ekmekte pişirme işlemi neticesinde az bir kaybın olduğu gözlenmişken, bisküvi yapımında çok daha fazla toksinin parçalandığı bildirilmiştir (Metin 2006).

2.1.5.2. Okratoksin B

Okratoksin B (OTB) *A. ochraceus* tarafından üretilen sekonder bir metabolittir. OTA ile birlikte oluşabilir. OTB, moleküler yapının 5. pozisyonundaki klorun eksikliği nedeni ile OTA'dan ayrılmaktadır. Yapısal olarak OTA'ya çok benzer olmasına rağmen daha az toksisiteye sahip olduğu düşünülmektedir. OTB'nin OTA'ya göre daha hızlı metabolize olduğu rapor edilmiştir (Mally vd 2005).

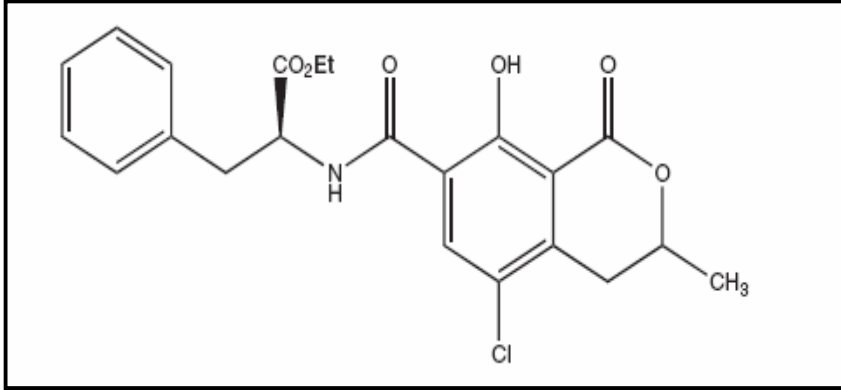


Şekil 2.2. Okratoksin B'nin kimyasal yapısı

2.1.5.3. Okratoksin C

OTA'nın etil esteri olan Okratoksin C'ye (OTC) gıda ve hayvan yemlerinde doğal kontaminant olarak ender rastlanır. Ancak çok yüksek konsantrasyonda OTA içeren yemlerde OTC varlığına rastlanmaktadır. Galtier ve Alvinerie (1976) tarafından yapılan bir çalışmada inek ve koyunlara ait işkembe sıvılarının OTA'yı hidrolize ettiği ve OTC'ye dönüştürdüğü tespit edilmiş ve araştırmacılar bu durumun geniş getiren

hayvanların ön midelerinde bulunan protozoa ve bakteriyel enzimler tarafından gerçekleştirildiğini ileri sürmüşlerdir. Bu nedenle hayvansal orijinli gıdalarda kalıntı olarak bulunan OTC'nin halk sağlığı problemlerine yol açabileceği sonucu ortaya çıkmaktadır (Fuchs vd 1984).



Şekil 2.3. Ochratoxin C'nin kimyasal yapısı

2.2. OTA Kontaminasyonu ve İzin Verilen Limitler

Ochratoxin A çoğunlukla subtropikal ve ılıman iklimlerdeki tahıllarda, kahve çekirdekleri, kakao, kuru incir, yaş ve kuru üzüm, fındık, yer fıstığı ve karışık yemlerde sıkça saptanan en önemli mikotoksinlerden biri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca bira, şarap ve üzüm suyu gibi yan ürünlerde de varlığı tespit edilmiştir. Bitkisel ürünler içerisinde buğday, arpa, yulaf, çavdar, mısır ve pirinç gibi tahıllar OTA'yı yüksek konsantrasyonda içermelerinden dolayı, hem insanlar hem de hayvanlar açısından en önemli kontaminasyon kaynağıdır (Tunail 2001).

Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO) tarafından OTA üzerinden belirlenen limitler Çizelge 2.3'de belirtilmiştir. Avrupa Birliği tarafından ise bebek mamaları için müsaade edilen düzey 1 µg/kg; tahıllar için ise 5 µg/kg olarak belirlenmiştir (Girgin vd 2001). İnsanlarda OTA için tolere edilebilir günlük alım düzeyi (Tolerable Daily Intake-TDI) Dünya Sağlık Örgütü tarafından 14 ng/kg olarak bildirilmiştir. Gıda Toksikolojisi ve Risk Değerlendirmesi Nordik Çalışma Grubu tarafından yapılan değerlendirmede kabul edilen TDI 5 ng/kg'dır. Kanada Uzmanlar Grubu ise TDI için 1.2-5.7 ng/kg değerini önermektedir (Barlow vd 2008).

Çizelge 2.3. Farklı gıda maddelerindeki izin verilen Okratoksin A limitleri

Ürün	Limit (µg/kg)
Çocuk ve bebek mamaları	0.5-5
Yiyecekler	2-50
Hayvan yemi	5-300
Şarap	0.2-1
Bira	0.2
Yeşil kahve tohumu	8
Kavrulmuş kahve ve ürünleri	4

2.3. OTA'nın Hayvanlarda Emilimi, Organ Dağılımı ve Metabolizması

OTA'nın gastrointestinal sisteme girişi gıdalar yolu ile olmaktadır. Geri emilimin hangi kısımda gerçekleştiği hakkında çeşitli görüşler bulunmakla birlikte, farelere ağız yolu ile verilen OTA'nın bağırsaklardan, esas olarak jejunumun başlangıç kısmında absorbe edildiği bildirilmiştir. OTA'nın emilim yerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir başka çalışmada ise, az bir miktarının mide ve özofagus epitel hücreleri tarafından gerçekleştirildiği, temel emilim yerinin ise duodenum ve jejunum olduğu ortaya konulmuştur (Lee vd 1984).

Genel olarak midede yüksek oranda besin bulunması, mide içeriğinin bağırsağa geçişini geciktirmekte ve bu gecikmenin, OTA'nın emilim hızını yavaşlattığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar, standart laboratuvar deneylerinde kullanılan pellet yemlerin içeriğinin toplam lif oranının yüksek olmasının, bu liflerin OTA'nın hayvanlarda gastrointestinal sistemden emilimini azaltıcı aktif adsorbant etkisi gösterdiğini düşündürmüştür. Bu olayın, bazı bitki hücre duvarı bileşenlerinin mikotoksini yakalayarak, gastrointestinal sistemden toksinin emilimini engelleyip, dışkı yolu ile atılımını sağlaması ile gerçekleştiği sanılmaktadır. Sonuç olarak midede yer alan yüksek oranda besin içeriği ile OTA'nın daha uzun süreli teması, emilimi etkileyen bir etmen olarak gösterilebilmektedir (Vettorazzi vd. 2010).

Emilim sonrası portal ven yolu ile lenfatik sisteme taşınan OTA yüksek bağlanma kapasitesine sahiptir. Dolaşım sistemine ulaştıca serum albumin ve diğer

makro moleküllere bağlanmakta ve yalnızca % 0,02'si bağlanmadan kalmaktadır (Ringot vd 2006)

Ağız yolu ile verilen toksinin yarılanma ömrü, intravenöz enjeksiyona göre daha kısadır. Toksinin bir bölümünün eliminasyona uğradığı bölge karaciğer olup daha sonra safra ile atılmaktadır. Karaciğerden toksinin uzaklaştırılması, karaciğer hücre membranında bulunan organik anyon transport polipeptid taşıyıcı (OATP) adı verilen safra asidi taşıyıcısına bağlıdır. Toksin atılımının gerçekleştiği bir diğer önemli organ ise böbrektir. OTA'nın, plazma proteinlerine yüksek bağlanma potansiyeli nedeni ile glomerüler filtrasyon ile değil, tübüler sekresyon ile idrara geçtiği düşünülmektedir. Bu işlem, proksimal tübül hücresinin bazolateral hücre membranında bulunan ksenobiyotik taşıyıcısı para amino hippürik asit (PAH) sistemi ile gerçekleşmektedir. OTA'ya uzun süreli temas, hücrenin genel fonksiyonunu etkilememekle beraber, organik anyon transportunu azalttığı düşünülmektedir. OTA, tüm nefron segmentlerinden geri emilmekte olup; bu durum toksinin böbrek dokusunda toksisitesinin artmasına neden olmaktadır. Toksinin kandan taşıyıcı aracılığı ile ayrılması organizma için toksisite riskini azaltmakta fakat aynı zamanda böbrek ve karaciğer gibi atılımın gerçekleştiği organlarda toksisite artışına neden olmaktadır (Girgin vd 2001).

OTA vücuda alındıktan sonra bir kısmı değişmeden, bir kısmı da metabolitleri şeklinde idrar ve dışkı yolu ile atılmaktadır. OTA'nın vücuttan atılımını belirlemek için yapılan bir çalışmada, sıçanlara ağız yolu ile verilen OTA'nın idrarda % 6'sının OTA, % 1.5'nin (4R)-4-hidroksiokratoksin A ve % 25-27'sinin ise okratoksin α şeklinde atıldığı belirlenmiş, dışkıda ise % 12 oranında OTA'nın değişmeden, % 9 oranındaki OTA'nın ise okratoksin α şekline dönüştürülerek atıldığı tespit edilmiştir (Storen vd 1982).

2.4. OTA Toksisitesi

Çeşitli araştırmalar OTA'nın kanserojenik, genotoksik, teratojenik, immünotoksik ve nefrotoksik olduğunu ortaya koymaktadır. OTA; DNA kırılmaları, protein sentezinin inhibisyonu ve glikoneogenezis, lipid peroksidasyonu, mitokondrideki oksidatif fosforilasyonun bozulmasına neden olmakta, ayrıca kanın

pıhtılaşmasının engellenmesi ve apoptotik etkisinden dolayı büyük önem taşımaktadır (Anonymous 1998).

OTA'nın toksisitesi hakkında çelişkili raporlar bulunmaktadır. Daha önce yayınlanmış olan bazı raporlar OTA'yı ana toksik ajan, metabolitlerini daha az toksik moleküller olarak gösterirken, bazı araştırmacılar da toksik etkilerin metabolitlerinden birine bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. OTA metabolitlerinin, toksisite üzerine etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır (Ringot vd 2005).

2.4.1. OTA'nın kanserojen etkisi

İnsanlarda OTA'nın kanserojen etkisi ile ilgili yeterli kanıt olmamakla birlikte, kemirgenlerde kanserojenik etki gösterdiği birçok derlemede sunulmuştur (Leszkowicz vd 2006). Bendele vd (1985) tarafından deney hayvanları ile yapılan bir çalışmada; 24 ay süresince 40 ppm doz uygulanan gruptaki erkek farelerde renal neoplazmalar, karsinom ve adenomlar gözlenmiştir. 20 ay boyunca hayatta kalan hayvanların %28,57'sinde renal karsinom görülmüştür. 40 ppm doz uygulanan gruptaki tüm erkek farelerde nefropati (renal tubeler genişleme, tübüllerde rejeneratif hücre çoğalması) gelişmiştir. 40 ppm doz uygulanan dişilerde de benzer, fakat daha az şiddette renal değişikliklere rastlanmış, fakat karsinom ve adenomlara rastlanmamıştır. 1 ppm doz uygulanmış olan gruplarda böbrek lezyonu oluşmamıştır. OTA içeren yem ile beslenen erkek ve dişi sıçanlarda karaciğer hücre neoplazmalarında belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu çalışma OTA'nın erkek farelerde renal kanserojen, dişilerde ise karaciğer kanserojeni olduğunu ortaya koymuştur.

Boorman ve arkadaşları (1989) yapmış oldukları kapsamlı bir çalışmada, her iki cinsiyeti içeren sıçanlara 16 gün, 13 hafta, 9 ay, 15 ay ve 2 yıl boyunca, haftada 5 gün değişen oranlarda ağızdan sonda yolu ile OTA vermişlerdir. İki yıllık çalışma süresince 9, 15 ve 24. aylarda idrar tahlilleri, kemik iliği, hematolojik ve serum kimyasal analizleri yapılmış, bakteri ve memeli hücreleri ile de genetik toksikoloji testleri uygulanmıştır. İki yıllık ağız yolu ile sonda uygulaması, erkek sıçanlarda oldukça artan düzeylerde beklenmedik tübüler hücre adenomları ve böbrek hücre karsinomları gibi OTA'nın kanserojen aktiviteleri için bariz kanıtlar sunmuştur. Dişi sıçanlarda da, böbreklerde yüksek oranlarda tübüler hücre adenomları ve karsinomalar ile meme

bezlerindeki fibro adenomaların çokluğu, OTA'nın kanserojen etkisi için birer kanıt oluşturmıştır. OTA uygulamasının ayrıca tübüler hücre hiperplazisi, tübüler hücre poliferasyonu, sitoplazmik değişimler, karyomegali ve böbrek hücrelerinde dejenerasyon gibi farklılaşmalara neden olduğu bildirilmiştir.

Stoev (2010) OTA bağımlı kanserlerin azaltılmasında L-fenilalenin'in (L-Phe) muhtemel koruyucu etkisini tespit etmek için, civcivler üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada, her grupta 5 erkek 5 dişi olacak şekilde hayvanları 3 gruba ayırmıştır. Birinci grup kontrol, diğerleri ise sırası ile 5 ppm OTA alan ve 5 ppm OTA ile birlikte 25 ppm L-Phe içeren yemlerle beslenen gruplardır. Yapılan incelemelerde böbreklerde adenokarsinomalar, üreterlerin belirli bölgelerinde ve karaciğerde kanserler tespit edilmiştir. İlginç bir şekilde L-Phe yokluğunda OTA uygulanan erkeklerin 4/5'inde tümör oluşumu gerçekleşirken, dişilerde bu oran 1/5'dir. Aksine L-Phe varlığında, OTA uygulanan erkeklerde tümör oluşumu gözlenmezken, dişilerin 3/5'inde tümörler gelişmektedir. Bu çalışma göstermiştir ki, L-Phe dozu erkek civcivlerde kanserin ortaya çıkışında koruyucu bir etki ortaya koyarken, dişilerde tümör oluşumunu arttırmış ve böylece OTA bağımlı kanserlerde cinsiyet farkının aydınlatılmasına yardımcı olacak bilgiler sunmuştur.

2.4.2. OTA'nın teratogenez ve mutagenез etkisi

OTA'nın sıçan, fare, hamster ve tavuklarda teratojen olduğu bilinmektedir. Domuzlarda ise teratojen etkisinin diğer türler kadar kuvvetli olmadığı sanılmaktadır. OTA'nın teratojenik etkisi türler arasında farklılıklar gösterir. Bu farklılığın OTA'nın türler arasındaki duyarlılık farkıyla ve kan-plasenta bariyerindeki farklılıktan dolayı meydana geldiği düşünülmektedir. OTA uygulanan sıçanların yavrularında özellikle merkezi sinir sistemi, göz ve iskelet yapısında anormalliklere rastlanmıştır (Girgin vd 2001). OTA'nın deney hayvanlarının immun sistemi, sinir sistemi ve iskelet yapısını etkilediği için teratojen olarak sınıflandırılmasında deneysel dayanaklar bulunmaktadır (Barlow vd 2008).

Mikroorganizma ve memeli hücreleriyle yapılan bir dizi mutasyon testlerinde, OTA'nın non-mutajenik çıkmasına rağmen, modifiye edilmiş Ames Testi, insan periferik lenfositleri ile yapılan *in vitro* kardeş kromatit değişimi testi ve *Escherichia*

coli ile yapılan SOS DNA onarım testinde mutasyonu indüklediği tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra OTA maruziyeti sırasında kromozom hasarı gözlenebilmekte; insanların karaciğer, böbrek, geniş getirenlerin işkembelerinde ve maymunların böbrek hücrelerinde DNA katım ürünlerine rastlanmaktadır (Neal 1995).

2.4.3. İmmunosupresyon etkisi

Okratoksin A'nın ng/ml düzeyindeki çok düşük konsantrasyonlarının bağışıklık sistemini etkileyebildiği ve immün sistemi baskılayan bir ajan olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Petzinger ve Weidenbach 2002).

Bu konuda yapılan pek çok çalışmada OTA'nın farelerde ve piliçlerde kandaki immünglobulin seviyesini etkilediği tespit edilmiştir. Chang ve Hamilton (1980) tarafından yapılan bir çalışmada; piliçlerde 20 gün boyunca yemlerine ilave edilen 0-8 mg/kg OTA'nın lenfoid hücrelerin sayısında azalmaya neden olduğu, serum ve lenfoid dokularda IgG, IgA ve IgM'yi baskıladığı tespit edilmiştir. Haubeck vd (1981) tarafından OTA'nın immünosupresif etkisi üzerine fenilalaninin nasıl bir rol oynadığını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada; fenilalanin konsantrasyonunun OTA konsantrasyonundan iki kat daha fazla olduğu durumlarda immnosupresif etki gözlemlenmediğini yada etkinliğinin azaldığını rapor etmişlerdir.

2.4.4. Mitokondriyal hasarlar

Yapılan çalışmalar, OTA'nın mitokondriyal fonksiyonu etkilediğini ve mitokondriyal hasara neden olduğunu göstermektedir. OTA, piliç ve bıldırcınların karaciğerinde ve böbreklerin proksimal tübüllerinde yer alan mitokondriyal yapıda patolojik değişimlere neden olarak, serbest radikallerin üretimine ve oksidatif strese sebebiyet vermektedir. OTA'nın mitokondriyal ATP üretimini engellediği ve lipid peroksidasyonunu teşvik ettiği rapor edilmiştir (Bennett ve Klich 2003).

OTA'nın izole edilmiş sıçan karaciğer mitokondrisinde, solunumu inhibe ettiği ve mitokondriyal morfolojiyi değiştirdiği gösterilmiştir. ATP azalması ile ilişkili olan bu olay, mitokondri iç membranında yer alan taşıyıcı proteinlerin kompetatif inhibasyonu neticesinde, mitokondri içerisine fosfat geçişinin inhibe edilmesinin ve elektron taşıma

sistemi üzerine doğrudan etkisinin bir sonucu olarak kabul edilmiştir (Meisner ve Chan 1974).

Renal korteksten izole edilen mitokondrilerde mikromolar seviyedeki OTA 'nın ATP sentezini engellediği bildirilmiş, yapılan bir başka hücre kültürü çalışmasında ise nanomolar konsantrasyondaki OTA'nın mitokondrial aktiviteyi baskıladığı belirtilmiştir. Bu bilgiler ışığında mitokondrial fonksiyon bozukluğunun OTA'nın kanserojen ve toksik etkisi üzerindende bir rolü olabileceği muhtemelsede, bu ilişkiyi açıklamak için daha fazla araştırmaya gerek duyulmaktadır (Schilter vd 2005).

2.4.5. DNA, protein ve RNA üzerindeki etkileri

Yapılan çalışmalar OTA'ya maruz bırakılan sıçanlarda dalak, böbrek ve karaciğer hücrelerinde DNA zincirinde kopmaların meydana geldiğini belirtmektedir. OTA'nın esas etkisinin fenilalenin metabolizması üzerine olduğu ve fenilalenin tRNA kompleksini engellediği belirtilmiştir. OTA, fenilalanin tRNA (Phe-tRNA) sentetaz tarafından katalizlenen Phe-tRNA aminoasilasyon reaksiyonunu fenilalenin ile rekabet ederek inhibe ettiği öne sürülmektedir. Protein sentezi inhibasyonuna ilaveten OTA tarafından DNA ve RNA sentezi de inhibe edilmektedir (Bennett ve Klich 2003).

Kane vd (1986) yaptıkları çalışmada, sıçanlarda 12 hafta boyunca toplamda 4 mg/kg alım seviyesine ulaşılacak şekilde oral yolla OTA verilmesi sonucunda böbrek ve karaciğer dokularında DNA'da tek iplik kopukluklarının meydana geldiğini bildirmişlerdir.

2.4.6. Nefrotoksitesi

Yapılan fizyolojik çalışmalar OTA'nın nefron boyunca farklı yerlerde toksik etki gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. OTA, bütün nefron segmentlerinden geri emilir. Bu süreç toksinin böbrek dokusunda toksisitesinin artmasına neden olur. Akut olarak OTA'ya maruz kalma, post proksimal nefron fonksiyonunda bozulmalara yol açmakta, özellikle toplama kanalında elektrolit ve titre edilebilen asit atılımında değişikliklere sebep olmaktadır. Hücrelerdeki pH dengesinin bozulması OTA'nın böbrek hücrelerine alınımı ile ortaya çıkmaktadır. Kronik olarak OTA'ya maruz kalma, ürenin

konsantrasyonunda azalmaya neden olmaktadır. OTA varlığında aminoasit gibi küçük moleküllerin emilme kapasiteleri daha az derecede etkilenmekte iken, albüminin endositotik alınımları oldukça azalmaktadır. OTA, doz ve zamana bağlı olarak renal fonksiyon üzerinde kompleks etkiler ortaya çıkarmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda OTA'nın, sıçan proksimal tübül hücre kültürüne nanomolar konsantrasyonlarda uygulandığında mutajenik potansiyele sahip olduğu, ancak mikromolar konsantrasyonlarda hücre gelişimini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Gekle ve Silbernaql 1996).

Yapılan çalışmalarda, uygun koşullarda depolanmayan yemlerdeki OTA kontaminasyon derecesi ile domuzlarda nefropati görülme sıklığı arasında pozitif bir ilişki olduğu ortaya konmuştur. İtalya'da Alp bölgesinde yapılan bir çalışmada, yüksek oranda OTA içeren yemlerle beslenen domuzların böbrek ve mesanelerinde birçok makroskopik ve mikroskopik lezyonların olduğu gösterilmiştir (Leszkowicz vd 2009).

Danimarka, Polonya ve Macaristan'daki birçok araştırma OTA'nın domuzlarda görülen nefropatilerde önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. 0.2, 1 ve 4 ppm OTA içeren yem ile beslenen domuzlarla yapılan bir çalışmada 1 ve 4 ppm doz uygulanan hayvanların 3-4 aylık süre içerisinde böbreklerinde renk kaybı, nekrozlar ve proksimal tübülün epitel hücrelerinde lezyonlar gözlenmiştir (Leszkowicz vd 2006).

Rasonryi vd (1998) yaptıkları bir çalışmada yedi gün süresince oral sonda yolu ile günlük 1mg/kg OTA uyguladıkları dişi ve erkek sıçanlarda, başlıca proksimal tübülün P3 segmentinde karyomegali, apoptatik nekroz ve tüm tübül boyunca hücre rejenerasyonunda artış gibi bir takım fark edilebilir değişiklikler gözlemlemişlerdir. Tüm bu bulgular ışığında, yüksek yada düşük dozdaki OTA'nın akut yada kronik etkisinin, bariz patolojik değişikliklere sebep olduğu, bununda akut nefropatlere ve böbrek tümörlerine yol açabileceği bildirilmiştir.

OTA, bütün memelilerde akut ve kronik lezyonlara sebep olan önemli bir nefrotoksindir. *In vivo* ve *in vitro* sistemlerde mutajenik etkisi kanıtlanmış, ancak etki mekanizması henüz açıklanamamıştır.

IARC tarafından insanda muhtemel kanserojen madde (Grup 2B) olarak sınıflandırılmıştır. Diğer taraftan OTA, özellikle Balkan Ülkelerinde Tuna nehri kıyısı kırsal bölge insanlarında görülen Balkan Endemik Nefropati (BEN) hastalığından, Mısır'da ve Tunus'ta görülen ve etyolojisi bilinmeyen nefropatilerden ve böbrek

tümörlerinden sorumlu tutulmaktadır. 1970’li yıllarda çoğunlukla domuzlarda ve kümes hayvanlarında görülen toksik etkilerle, bu endemik hastalığın klinik ve patolojik özellikleri arasındaki çarpıcı benzerlikleri görülmesi üzerine OTA ile BEN arasındaki ilişkiyi çözmeye yönelik çalışmalar yoğunlaştırılmıştır (Fuchs ve Peraica 2005).

Bulgaristan ve Hırvatistan daki endemik bölgelerde, gıdalarda OTA kontaminasyonu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Buğday, mısır, arpa, patates, buğday ekmeği gibi pek çok ürün ve hayvan yemleri analiz edilmiştir. Hem endemik hemde kontrol bölgelerinden toplanan tüm gıda örneklerinde ve yemlerde değişen oranlarda OTA bulunmuştur. Yapılan diğer bir çalışmada ise kontrol bölgelerine kıyasla endemik bölgelerde daha yüksek oranda OTA’lı örneklerle rastlanmıştır. Hırvatistan’da endemik bölgeden toplanan buğday ve mısır örneklerinin, dört ayrı kontrol bölgesinden toplanan örneklerle karşılaştırıldığı bir çalışmada, ortalama OTA konsantrasyonu ve OTA pozitif numunelerin bulunma frekansı daha yüksek oranda bulunmuştur (Fuchs ve Peraica, 2005).

Bulgaristan’da 1984, 1986, 1989 ve 1990 yıllarında endemik ve endemik olmayan bölgelerden 576 kan örneği toplanmış, araştırılan tüm gruplarda OTA’ya rastlanmış, fakat bölgeler karşılaştırıldığında, BEN ve idrar yolu tümörleri bulunan hastaların kanlarında OTA miktarı daha yüksek olarak bulunmuştur (Petkova vd 1991).

Yapılan çalışmaların neredeyse tümünde, endemik bölgelerde kontrol bölgelere oranla bölge sakinlerinin kanlarında ve gıdalarında daha sık oranda ve daha yüksek konsantrasyonda OTA tesbit edilmiştir. Her ne kadar yapılan tüm çalışmalar, endemik bölge sakinlerinin daha yüksek oranda OTA’ya maruz kaldığını gösterse de, tüm laboratuvar hayvanlarında OTA’nın nefrotoksik oluşu, insanlarda da aynı etkiyi yapabileceği beklentisini doğursa da, BEN görülmeyen ülkelerdeki insanların kanlarında da OTA tespit edildiği için, OTA ile BEN ve idrar yolu tümörleri arasında bir bağ kurmak hala tam olarak mümkün olamamaktadır (Fuchs ve Peraica 2005).

2.4.7. Hepatotoksisite

OTA’nın karaciğerde hücre ölümüne (apoptoz) neden olduğu Atroshi vd (2000) yapmış oldukları çalışmada ortaya konmuştur. Bir ve iki haftalık periyotlar boyunca haftada iki kez OTA uygulamasını takiben, fare karaciğerlerinde hücre ölümleri

gözlenmiştir. Işık mikroskobu ile yapılan incelemelerde karaciğer hücre stoplazmasında apoptotik yapılar içeren eozinofilik globüllerin sayısının iki haftalık periyotta kontrol değerlerine oranla sekiz kat arttığı görülmüştür. Ayrıca yapılan biyokimyasal ve histolojik analizler sonucunda birinci hafta sonunda hücrel nekrozlarla ilgili herhangi bir belirti tespit edilmemişken, ikinci haftada sentrilobular nekrozlar gözlemlenmiştir.

Storen vd (1982) tarafından sıçan yemlerine OTA ilave edilmesinden sonra yapılan glukoz tolerans testinde, kan glukoz değerlerinin normal değerlere ulaşmadığı, karaciğerdeki total karbonhidrat ve glukojen seviyeleri ile glikolitik enzimlerin aktivitesinde düşme gözlenirken, glukoneojenik enzim seviyesinde ise yükselme kaydedildiği belirtilmiştir.

2.5. Alfa 2u Globulinler

Alfa-2u globulin, kromozom 5 üzerinde kümelenmiş multi gen ailesi tarafından kodlanan ve androjenik kontrol altında sentezlenen, erkek sıçanlara özgü düşük molekül ağırlığına sahip bir proteindir. Alfa-2u globulin mRNA'sı yetişkin erkek sıçanların karaciğerlerinde albümininden sonra en çok bulunan mRNA'dır. Alfa 2u globulinler sentezlendikten hemen sonra karaciğerden hızlı bir şekilde salgılanmakta ve hepatik düzeyleri düşük ve sabit bir şekilde kalmaktadır (Swenberg ve Lehman-McKeeman 1999).

Dişi ratlar da alfa-2u globulin genlerine sahip olsalar da, östrojenin bu gen ifadesinde çok etkin bir represör olduğu düşünülmektedir. Vandoren vd (1983) tarafından yapılan bir çalışmada cinsiyet hormonlarının bu proteinin üzerindeki etkileri araştırılmış, bunun için erkek sıçanlara östrojen uygulaması yapılmış ve alfa-2u globulin düzeyinde düşüş gözlenmiştir. Dişilere testosteron uygulaması sonucunda ise alfa-2u globulin düzeyinde artış olduğu saptanmıştır. Yapılan bir diğer çalışmada ise ergin erkek sıçanlara kastrasyon uygulamasının, bu sıçanların serum alfa 2u globulin düzeylerini önemli ölçüde düşürdüğünü göstermiştir (Kulkarni vd 1985)

Alfa 2u globulinler, düşük moleküler ağırlığına sahip olmalarından dolayı glomeruluslar tarafından kolayca filtre edilebilmektedir. Filtre edilmiş alfa 2u globulinin % 40'lık bölümü idrar yolu ile atılmakta ve geriye kalan kısmı ise proksimal tübüllerin renal korteksinde P2 hücreleri tarafından geri emilmektedir. Tübüllerden geri

emilim, endositoz yolu ile gerçekleşir. Daha sonra lizozomal sindirim yolu ile enzimatik hidrolize uğrarlar.

Birçok kimyasalın d-limonene, 2,2,4-trimetilpentan gibi alfa-2u globulinin hidrofobik cebine sıkıca bağlandıkları bilinmektedir. Bu kimyasallar ile protein arasındaki bağlanma alfa-2u globulinlerin proteazlar tarafından sindirilmesini inhibe etmekte ve erkek sıçanlara özgü bu proteinin birikmesine neden olmaktadır. Bu birikim, nefropatilere ve böbrek tümörlerine yol açabilecek bir dizi olaylar serisini başlatır. Bu kimyasallardan hiçbirisi dişilerde yada diğer türlerde benzer nefropatilere yol açmamıştır (Rodgers ve Baetcke 1993, Swenberg 1993).

2.6. Testosteron

Testosteron, testisin intersitisyel ve leydig hücrelerinden salınan bir androjendir. Plazmadaki testosteronun %85'i testislerden salınır. Testosteron testislerde depolanmaz, sentezden hemen sonra salınmaktadır. Salınan testosteron %97-99 oranında plazma proteinlerine bağlanır. Yıkım esas olarak karaciğerde olur. Testosteron önce androstenediona çevrilmekte daha sonra bu bileşikten sırasıyla androsteron ve etiokonolon oluşmaktadır. Bunlar da glukronat ve sülfat ile konjuge edilerek idrarla atılmaktadır. İdrarda bulunan ketosteroidlerin %30'unun testosteron kaynaklı olduğu bildirilmektedir.

Üstün (2007) tarafından sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada; 4 hafta süreyle 5 mg/kg/gün testosteron propionat uygulanan grupta en yüksek plazma serbest ve toplam testosteron düzeyleri sırasıyla 16.05 pg/ml 310.60 ng/ml olarak tespit edilmiştir. En düşük testosteron düzeyleri 0.02 pg/ml ve 20 ng/ml değerleriyle kastrasyon grubunda belirlenmiştir. Kontrol grubunda ise bu değerlerin sırasıyla 5.20 pg/ml ve 195.80 ng/ml düzeyinde olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma, kastrasyon sonrasında testesteron seviyesinin önemli düzeyde azaldığını göstermektedir.

Prezant vd (1997) tarafından kastre edilmiş ve normal erkek sıçanlarda, testosteronun diyafram üzerindeki kısa ve uzun süreli etkisini araştırdıkları çalışmada haftada 5 gün ve günlük 5 mg tretosteron verilmiş, serum testosteron düzeyleri 2.5 ve 10. haftalarda ölçülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kastre edilmiş ve testosteron verilmemiş erkek bireylerde serum testosteron düzeyleri bariz bir şekilde

düşmüş (0.86 ng/dl ve 1.91 ng/dl), testosteron verilmiş normal ve kastre edilmiş erkeklerde ise serum testosteron düzeylerinde (>1.600 ng/dl) belirgin bir artış görülmüştür. 2,5 ve 10. haftalardaki kastrasyon işlemi serum testosteron düzeylerini neredeyse sıfıra düşürmüştür.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deney Hayvanları

Bu araştırmada, Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden temin edilen ve ağırlıkları yaklaşık 200 ± 20 g olan 16 haftalık 46 adet (37 adet erkek ve 9 adet dişi) Wistar-albino cinsi sıçanlar denek olarak kullanılmış olup; deney protokolü Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından 21.03.2011 tarih ve 81 sayılı karar ile onaylanmıştır. Rastgele gruplara ayrılarak paslanmaz tel kapakları bulunan plastik kafeslere yerleştirilmiş olan sıçanlar, araştırma süresince 12 saat aydınlık/karanlık ortamda, *ad libitum* su ve yem ile beslenmiştir. Kafeslerin içine altlık olarak talaş serilmiş ve talaşlar haftada bir değiştirilmiştir. Oda sıcaklığı 22 ± 2 °C ve bağıl nem 55 ± 10 değerlerinde sabit tutulmuş olup; havalandırma merkezi sistem ile sağlanmıştır. Çalışma 24 hafta sürmüştür. Çalışmada kullanılan sıçanlar deney aşamasından önce 7 gruba ayrılmıştır.

Çizelge 3.1. Deney hayvanlarının gruplandırılması

Grup No	Grup Kodu	Grupların İçeriği
Grup I	E-OTA-6H	6 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanlar (n = 8)
Grup II	E-OTA-12H	12 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanlar (n = 7)
Grup III	E-OTA-24H	24 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanlar (n = 9)
Grup IV	E-KAST.-OTA-24H	6. hafta sonunda kastre edilip, toplamda 24 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanlar (n = 8)
Grup V	D-OTA-24H	24 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen dişi sıçanlar (n = 6)
Grup VI	E-24H	24 hafta süresince OTA içermeyen yem ile beslenen erkek sıçanlar (n = 5)
Grup VII	D-24H	24 hafta süresince OTA içermeyen yem ile beslenen dişi sıçanlar (n = 3)

E: Erkek, D: Dişi, KAST.: Kastrasyon, H: Hafta

Araştırmada, OTA içermeyen yem ile beslenen sıçanlara, günlük 20 g normal yem verilmiştir. OTA içeren yem uygulaması yapılan gruplar ise günlük 20 g diyetlerinde 5 µg/g OTA içerecek şekilde hazırlanan yemlerle beslenmiş (5ppm OTA); böylece sıçan başına günlük yaklaşık 100 µg'lık OTA alımı sağlanmıştır. 6 hafta OTA verilmesinden sonra Grup IV'de bulunan erkek sıçanlar genel anestezi altında testislerinin uzaklaştırılması yolu ile kastre edilmiş ve 18 hafta daha OTA içeren yem ile beslenmeye devam edilmiştir. Grup I'in 6. haftanın sonunda, Grup II'nin 12. haftanın sonunda, diğer grupların ise 24 haftalık uygulamanın sonunda ötenazi uygulanarak böbrek ve karaciğerleri toplanmış, plazma verileri için ise deney gruplarından her hafta düzenli bir şekilde kan alımı yapılmış ve analiz yapılincaya kadar -40 °C'de depolanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kastrasyon

Deney hayvanlarında kastrasyon işlemleri, cerrahi olarak rompun (5 mg/kg) ve ketamin (60 mg/kg) kombinasyonu ile genel anestezi altında yapılmıştır. Anesteziden sonra skrotum derisi temizlenmiş ve ardından skrotum üzerinde küçük bir kesik açılarak kas kesesinde yer alan testisler açığa çıkartılıp, kesilerek alınmıştır. Daha sonra açılan kesik dikilerek operasyon tamamlanmıştır.

3.2.2. Organların homojenizasyonu

Sıçanlardan çıkartılan böbrek ve karaciğerler kandan uzaklaştırılmak amacıyla suyla yıkanmasının ardından, filtre kağıdı ile kurulanmış ve analize alınincaya kadar -40 °C'de depolanmıştır. Böbrek ve karaciğerde OTA miktar tayini için, dibi yuvarlak plastik bir tüp içerisinde 200-300 mg'lık doku parçaları tartılmıştır. Daha sonra üzerine mg başına 4 µl olacak şekilde sodyum fosfat tamponu (50 mM, pH 6.5) eklenerek, 15.000 devir/dakika'da 1 dakika süreyle homojenize edilmiştir (Heildolph SilentCrusher, Almanya). Her kullanımdan sonra homojenizatör, distile su ile yıkanmış

ve metanol ile durulanmıştır. Homojenize edilmiş olan örnekler, OTA ekstraksiyonu yapılmaya kadar -40 °C’de en az bir gün süresince bekletilmiştir.

3.2.3. Organlardan OTA ekstraksiyonu

Organlardan OTA ekstraksiyonu Vettorazzi vd (2008) tarafından uygulanan yöntem esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Ekstarksiyon işleminden önce örnekler oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Homojenize edilmiş 250 µl doku örnekleri üzerine buzda soğutulmuş 400 µl hacminde saf etanol ve 50 µl hacminde %20’lik triklorasetik asit ilave edilmiştir. Daha sonra örnekler, 1 dakika süresince vortekslenmiş (Fison, UK) ve 15 dakika boyunca oda sıcaklığında tutularak arada bir çalkalamak suretiyle karışması sağlanmıştır. Ardından örnekler 4 °C’de 12.000 devir/dakikada 15 dakika süreyle santrifüj (Centurion K2R, UK) edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen supernatant, 0.45 µm’lik membran filtreden geçirilerek OTA analiz yapılmak üzere HPLC-FLD sistemine enjekte edilmiştir. Yüksek miktarda OTA konsantrasyonuna sahip örnekler, gerek duyulduğunda 1:5:8 oranında hazırlanmış olan %20’lik trikloroasetik asit, sodyum fosfat tamponu ve saf etanol solüsyonu ile numunedeki son OTA konsantrasyonu 5-100 ng/ml değerleri arasında olacak şekilde seyreltilmiştir.

3.2.4. Plazmadan OTA ekstraksiyonu

Plazmadan OTA ekstraksiyonu için 20 µl plazma örneği 560 µl 1:8 oranındaki %20’lik trichloroasetikasit ve buzda soğutulmuş saf etanoldan oluşan ekstraksiyon solüsyonuna ilave edilmiştir. Örnek 1 dakika süresince vortekslenmiş, 15 dakika boyunca oda sıcaklığında bırakılmış ve düzenli olarak çalkalanmıştır. Bu karışım 12 000 devir/dakikada 4 °C 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen supernatant, 0.45 µm’lik membran filtreden geçirilerek OTA analiz yapılmak üzere viallere konmuştur.

3.2.5. HPLC analizi

Böbrek ve karaciğer dokuları ve plazma örneklerinin OTA analizleri; floresans dedektörlü (Model G1321A), Agilent 1100 serisi HPLC cihazı kullanılarak Vettorazzi vd (2008)'in validasyonunu yaptığı yöntemle göre tespit edilmiştir. Kromatografik çalışma koşulları, Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. HPLC cihazının kromatografik çalışma koşulları

Kolon	C ₁₈ (150 mm x 4.6 mm) 5 µm Tracer Extrasil ODS2 (Thermo)
Mobil faz	29:29:42 (v/v) Metanol:Asetonitril:Sodyum asetat (5 mM, pH'sı fosforik asitle 2.6'ya ayarlanmış)
Akış hızı	1 ml/dk
Enjeksiyon hacmi	50 µl
Kolon sıcaklığı	40°C
Dedeksiyon	Eksitasyon dalga boyu: 225 nm; Emisyon dalga boyu: 461 nm
Alıkonma zamanı	6.7 dakika

3.2.6. OTA standart çözeltinin hazırlanması

HPLC cihazında okutulan örneklerin OTA konsantrasyon düzeylerini tespit etmek amacıyla değişik konsantrasyonlarda hazırlanan OTA standart çözeltileri HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Kalibrasyonda 5, 10, 20 ,50, 75, 100 ppb olmak üzere 6 farklı konsantrasyonda OTA standart çözeltisi kullanılmıştır. Kalibrasyon çözeltisi için 1000 ng/ml lik stok standart çözeltiden 500 µl alınıp azot gazı ile buharlaştırılıp, üzerine 500 µl 1:5:8 (%20'lik trikloroasetik asit, sodyum fosfat tamponu ve saf etanol) solüsyonu ilave edilmiştir.

HPLC cihazına enjekte edilen standartlarına karşılık gelen pik alanlarına göre cihazda bulunan Chemstation Software (Agilent) yazılım paket programı kullanılarak 6 farklı noktadan kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur ($r^2=0.999$). Plazma, böbrek ve karaciğer dokularında OTA varlığının araştırılmasında hazırlanan bu kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır.

3.2.7. Validasyon çalışması

Bu çalışmada analiz yönteminin laboratuvar içi geçerliliğini ortaya koyabilmek için gerçeklik, kesinlik, seçicilik, tanımlama, ölçüm limiti ve doğrusallık ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bunun için, içerisinde OTA bulundurmeyen böbrek ve karaciğer örneklerine belli düzeylerde OTA standart solüsyonlarından eklemeler yapılmıştır. Ekleme yapılmış (spiked) böbrek ve karaciğer örnekleri, OTA konsantrasyonlarının belirlenmesi için paralelli olarak yukarıda belirtilmiş olan yöntem kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.8. Testosteron hormonu miktar tayini

Plazmada toplam testosteron hormon tayini, Roche Hitachi modüler E170 otomatik analizatör sistemi kullanılarak kemilüminisans esasına göre gerçekleştirilmiştir. Kitin okuma aralığı 0,06-0,82 ng/ml arasında olup, normal erkeklerin plazmaları 8 kat seyreltilmiş ve tüm plazma değerleri bu aralıkta okunmuştur. Elde edilen total testosteron düzeyleri ng/ml cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.9. İstatistiksel analiz

Araştırma bulguları, SAS Paket Programı (Sas Institute Inc., Cary, NC, USA) kullanılarak Varyans Analizine tabi tutulmuş, farklı bulunan sonuçlar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

Deney süresi boyunca OTA içeren yem ile beslenen erkek ve dişi sıçanların böbrek, karaciğer ve plazma dokularında tespit edilen OTA değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü üzere 24 hafta boyunca OTA içeren yem ile beslenen dişi sıçanların böbrek, karaciğer ve plazma OTA değerleri sırasıyla 855.04 ve 581.19 ng/g ve 12504.39 ng/ml olup; deney grupları içinde en yüksek OTA değerlerine sahip oldukları görülmüştür. Normal yem ile beslenen kontrol grublarında ise her üç dokudaki OTA miktarları ölçüm limitinin altında bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Deney gruplarının böbrek, karaciğer ve plazmalarında tespit edilen OTA değerleri (ng/g-ml)

Deney Grupları	Böbrek (ng/g)	Karaciğer (ng/g)	Plazma (ng/ml)
E-OTA-6H	511.69±28.09	426.44±20.63	14999.32±964.68
E-OTA-12H	667.62±42.27	552.63±81.35	15752.71±1939.56
E-OTA-24H	277.03±23.77	313.73±44.91	6344.18±629.70
E-KAST.-OTA-24H	407.27±45.35	252.03±46.35	8429.05±1475.50
D-OTA-24H	855.04±70.84	581.19±82.22	12504.39±1653.08
E-24H	< Ölçüm limiti	< Ölçüm limiti	< Ölçüm limiti
D-24H	< Ölçüm limiti	< Ölçüm limiti	< Ölçüm limiti

Değerler: ortalama ± standart hata Ölçüm limiti: 3.6 ppb Ölçüm limiti: 3.2 ppb Ölçüm limiti: 3.5 ppb

Yapılan bu çalışmadan elde edilen tüm veriler, OTA değerlerinin; organ çeşidi zaman, cinsiyet ve kastrasyon işlemine bağlı olarak değiştiğini göstermiş olup, bunların ayrıntısı aşağıda sunulmuştur.

4.1. OTA Seviyelerinin Organlara Bağlı Değişimi

6, 12, 24 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanların, 6. hafta sonunda kastre edilip, toplamda 24 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanların ve 24 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen dişi sıçanların böbrek ve karaciğerlerinde tespit edilen ortalama OTA değerleri aşağıda verilmiştir. Bu verilere ait

istatistiksel analizler yapılmış olup, varyans analiz sonuçları Çizelge 4.2’de, Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ise Çizelge 4.3’de sunulmuştur.

6 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanların böbrek ve karaciğer dokularında tespit edilen ortalama OTA değerleri sırasıyla 511.69 ve 426.44 ng/g düzeyinde bulunmuş olup, organlar arasında istatistiksel açıdan önemli derecede farklılık tespit edilmiştir ($P<0.05$).

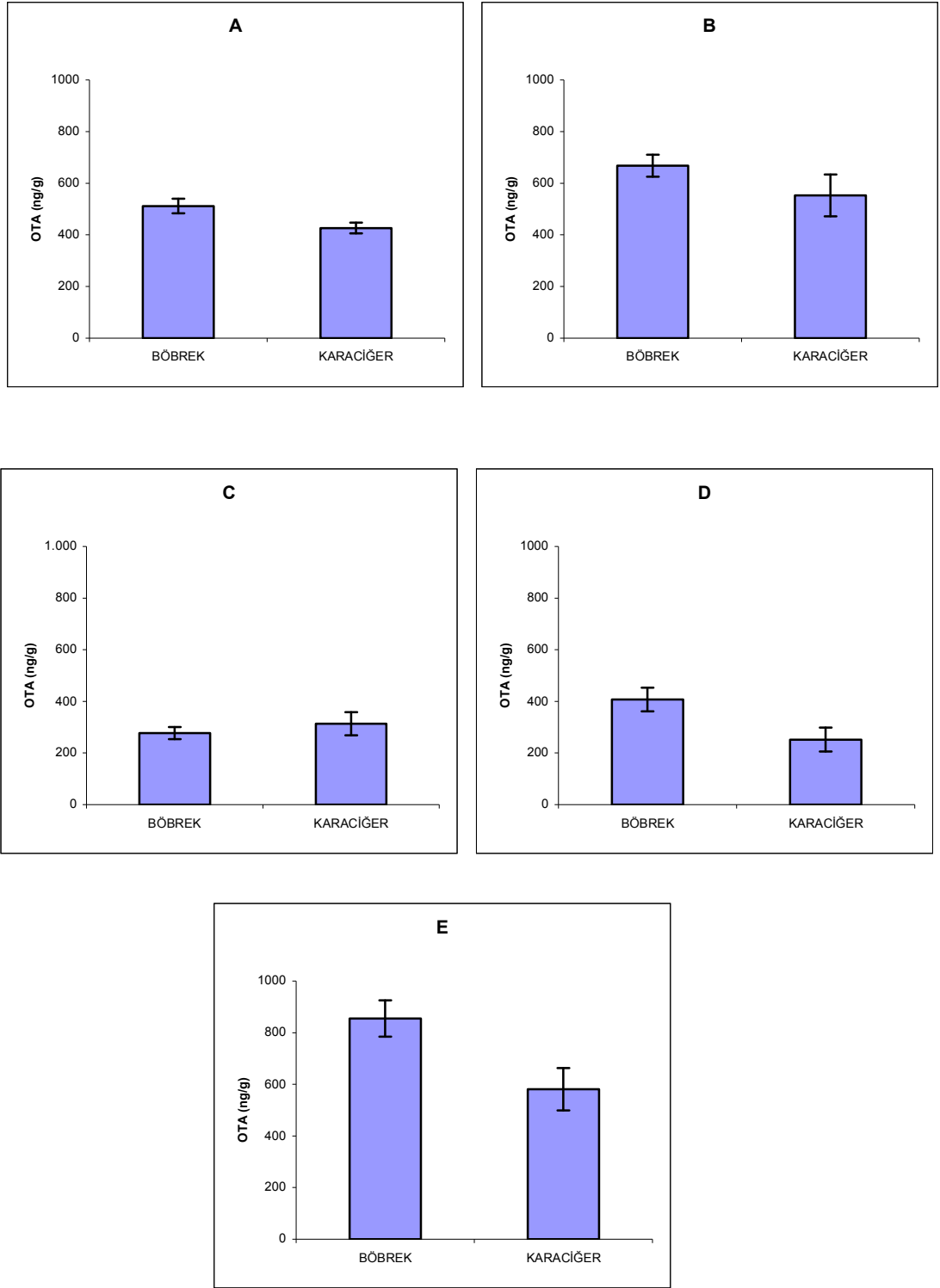
12 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanların böbreklerinde OTA değeri 667,62 ng/g seviyesinde tespit edilmişken, karaciğerlerinde ise bu değer 552,63 ng/g düzeyinde belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, bu organlar arasında OTA değerleri bakımından farklılığın olmadığı tespit edilmiştir ($P>0.05$).

24 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanların böbrek ve karaciğerlerinde tespit edilen OTA değerleri sırasıyla 277.03 ve 313.73 ng/g düzeyinde bulunmuştur. Bu iki veri arasında istatistiksel açıdan farklılık tespit edilmemiştir ($P>0.05$).

6. hafta sonunda kastre edilip, toplam 24 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanların böbrek ve karaciğerlerinde tespit edilen OTA değerleri karşılaştırıldığında, böbreklerde tespit edilen OTA değeri ile karaciğerde tespit edilen OTA değeri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0.05$). Kastre edilmiş erkek sıçanların oluşturduğu bu grupta tespit edilen ortalama OTA değerleri böbrek için 407.27 ng/g ve karaciğer için ise 252.03 ng/g seviyesinde bulunmuştur.

24 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen dişi sıçanların böbrek ve karaciğerlerinde tespit edilen OTA değerleri sırası ile 855.04 ve 581.19 ng/g olarak belirlenmiş olup, dişilerin tüm deney grupları arasındaki en yüksek OTA organ değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Dişi sıçanların böbreklerinde tespit edilen OTA değeri karaciğerde tespit edilen OTA değerine göre daha yüksek bulunmuştur. İstatistiksel analiz, dişilerin organ OTA değerleri arasında önemli derecede farklılığın olduğunu göstermiştir ($P<0.05$).

Deney gruplarını oluşturan sıçanların, böbrek ve karaciğerlerinde tespit edilen OTA seviyelerini gösteren grafikler Şekil 4.1’ de sunulmuştur.



Şekil 4.1. Sıçanların böbrek ve karaciğerlerinde tespit edilen OTA seviyeleri
A) 6 hafta OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanlar
B) 12 hafta OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanlar
C) 24 hafta OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanlar
D) Kastre edilmiş erkek sıçanlar
E) 24 hafta OTA içeren yem ile beslenen dişi sıçanlar

Çizelge 4.2. Deney gruplarının böbrek ve karaciğerlerinde tespit edilen OTA değerlerine ait varyans analiz sonuçları.

	Varyasyon Kaynağı	S.D.	K.O.	F
E-OTA-6H	Organ	1	29073.66	5.98*
	Hata	14	68042.28	* $P<0.05$
E-OTA-12H	Organ	1	46282.90	1.57
	Hata	12	29414.79	- ^a
E-OTA-24H	Organ	1	6061.00	0.52
	Hata	16	11621.29	- ^a
E-KAST.-OTA-24H	Organ	1	96396.27	5.73*
	Hata	14	16818.12	* $P<0.05$
D-OTA-24H	Organ	1	224984.20	6.37*
	Hata	10	35336.93	* $P<0.05$

^a: İstatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.3. Deney gruplarının böbrek ve karaciğerlerinde tespit edilen OTA değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Deney Grupları	Böbrek		Karaciğer	
E-OTA-6H	511.69	a	426.44	b
E-OTA-12H	667.62	a	552.63	a
E-OTA-24H	277.03	a	313.73	a
E-KAST.-OTA-24H	407.27	a	252.03	b
D-OTA-24H	855.04	a	581.19	b

4.2. OTA Seviyelerinin Zamana Bağlı Değişimi

6, 12 ve 24 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanların böbrek ve karaciğerleri ile plazmalarında tespit edilen OTA miktarları karşılaştırıldığında, OTA değerlerinin 12. haftada 6. haftaya göre yükseldiği, ancak 24. haftada düştüğü görülmüştür. Tespit edilen ortalama OTA değerleri aşağıda ayrıntılı

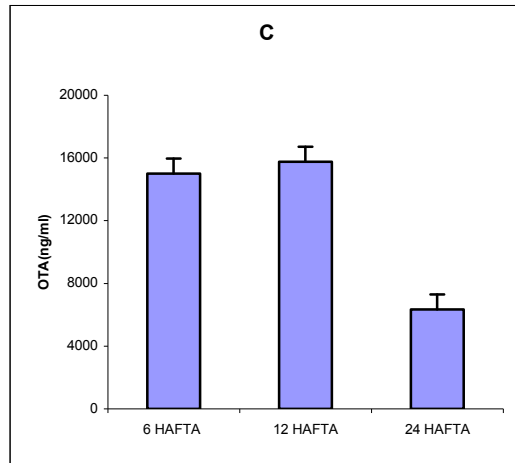
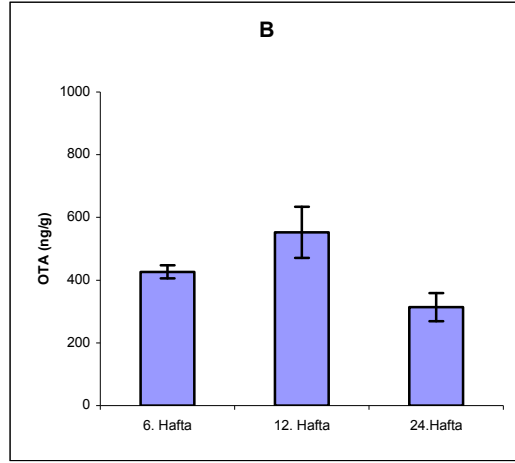
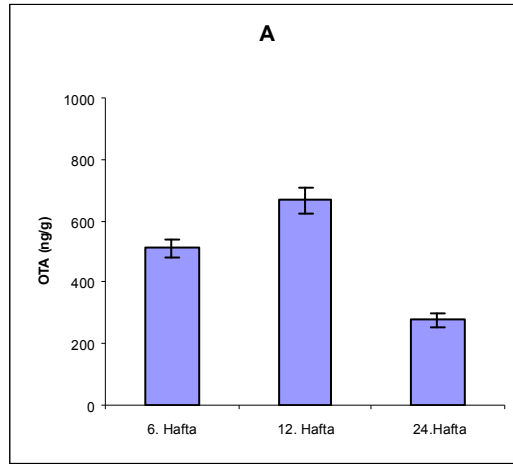
olarak verilmiş ve bu değerlere ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.4’de, Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ise Çizelge 4.5’de sunulmuştur.

6, 12 ve 24 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanların böbreklerinde tespit edilen OTA değerleri sırasıyla 511.69, 667.62 ve 277.03 ng/g olarak bulunmuştur. 12 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanların böbrek OTA değerleri en yüksek değer olarak görülmektedir. Bu sıçanların böbrek OTA değerlerinin istatistiksel analizi, zamana bağlı OTA değerinin değiştiğini göstermektedir ($P<0.01$).

Aynı deney gruplarına ait sıçanların, karaciğerlerinde tespit edilen OTA değerleri; 6. hafta için 426.44 ng/g, 12. hafta için 552.63 ng/g ve 24. hafta için ise 313.73 ng/g olarak bulunmuştur. Sıçanların karaciğer OTA değerleri zamana bağlı olarak değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılığın yalnızca 12 ile 24. haftalar arasında olduğu görülmüştür ($P<0.01$).

Farklı süreler (6, 12 ve 24 hafta) boyunca OTA almış erkek sıçanların plazma OTA değerleri sırası ile 14999.32 ng/ml, 15752.71 ng/ml ve 6344.18 ng/ml olarak tespit edilmiş olup, istatistiksel olarak 24 hafta süresince OTA almış sıçanların plazma OTA değerlerinin 6 ve 12 hafta süresince OTA almış sıçanlardan farklı olduğu görülmüştür ($P<0.01$).

Şekil 4.2’de 6, 12 ve 24 hafta OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanların böbrek, karaciğer ve plazmalarında tespit edilen OTA seviyelerindeki değişim görülmektedir.



Şekil 4.2. 6, 12 ve 24 hafta OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanların böbrek, karaciğer ve plazmalarında tespit edilen OTA seviyeleri
A) Böbrek
B) Karaciğer
C) Plazma

Çizelge 4.4. 6, 12 ve 24 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanların böbrek, karaciğer ve plazmalarında tespit edilen OTA değerlerine ait varyans analiz sonuçları.

	Varyasyon Kaynağı	S.D.	K.O.	F
BÖBREK	Zaman	2	311201.13	40.86**
	Hata	21	7615.65	** $P<0.01$
KARACİĞER	Zaman	2	112537.99	5.29*
	Hata	21	21287.22	* $P<0.05$
PLAZMA	Zaman	2	237664284.9	20.28**
	Hata	23	11717293.	** $P<0.01$

Çizelge 4.5. 6, 12 ve 24 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanların böbrek, karaciğer ve plazmalarında tespit edilen OTA değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

OTA Değeri (ng/g-ml)						
Zaman	Böbrek		Karaciğer		Plazma	
6. Hafta	511.69	b	426.44	ab	14999	a
12. Hafta	667.62	a	552.63	a	15753	a
24. Hafta	277.03	c	313.73	b	6344	b

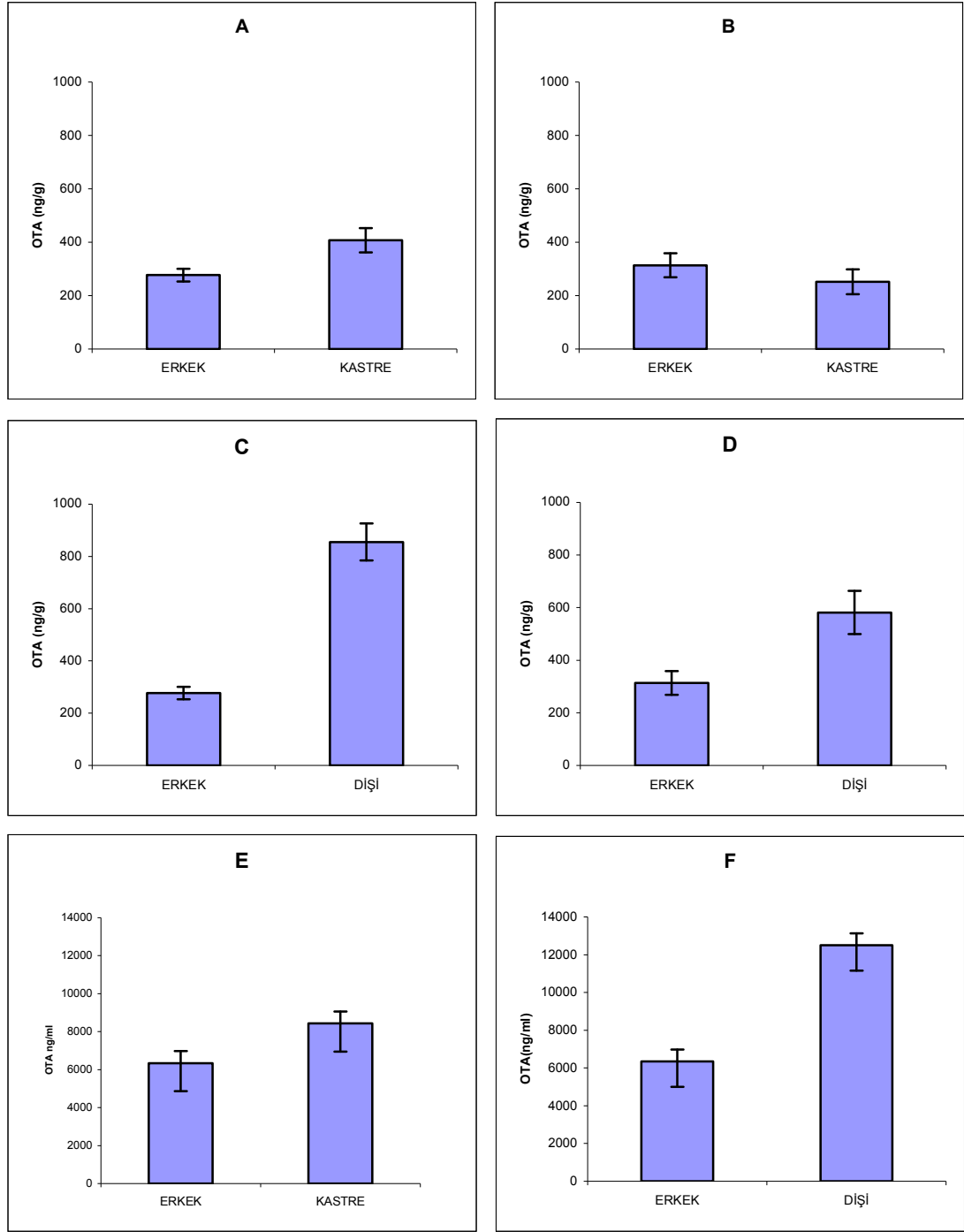
4.3. OTA Seviyelerinin Cinsiyet ve Kastrasyon İşlemine Bağlı Değişimi

Çalışmada 24 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanlar ile kastre edilmiş erkek sıçanların böbrek, karaciğer ve plazmalarında tespit edilen OTA değerleri karşılaştırılmıştır. Böbreklerde tespit edilen OTA değerleri erkek sıçanlarda 277.03 ng/g, kastrasyon grubunda ise 407.27 ng/g düzeyinde bulunmuştur. Her iki gruptaki bireylerin böbreklerinde tespit edilen OTA değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılığın olduğu görülmektedir ($P<0.05$). Söz konusu grupların karaciğerlerinde tespit edilen OTA değerleri sırasıyla 313.73 ve 252.03 ng/g olarak

belirlenmiş olup; bu değerler arasında istatistiksel açıdan farklılık tespit edilmemiştir ($P>0.05$). Bu gruplara ait plazma verileri incelendiğinde, kastrasyon grubunun plazma değerinin (8429,05 ng/ml), erkek sıçanların değerinden (6344,17 ng/ml) daha yüksek olduğu görülsede, bu değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($P>0.05$).

24 hafta süresince OTA içeren yem ile beslenen erkek sıçanlar ile dişi sıçanların böbrek, karaciğer ve plazma verileri karşılaştırıldığında, dişilerin OTA değerlerinin erkeklerinkinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu veriler bize sıçanlarda cinsiyet farklılığının OTA değerleri üzerinde belirgin bir etkisinin olduğunu göstermektedir. Böbreklerde tespit edilen OTA değerleri erkeklerde 277.03 ng/g, dişilerde ise 855.04 ng/g olarak bulunmuştur. Erkek ve dişi sıçanların böbreklerinden elde edilen ortalama OTA değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli derecede farklılık tespit edilmiştir ($P<0.01$). Karşılaştırılan gruplardaki erkek ve dişi sıçanların karaciğerlerinde tespit edilen OTA değerleri sırası ile 313.73 ng/g ve 581.19 ng/g seviyesinde olup, bu değerler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur ($P<0.01$). Erkek ve dişi sıçanların plazmalarında tespit edilen OTA değerleri incelendiğinde ise dişi plazmalarında tespit edilen OTA miktarı (12504 ng/ml), erkek plazmasında tespit edilen OTA miktarının (6344 ng/ml) yaklaşık iki katı kadar olduğu görülmüş ve istatistiksel açıdan aralarında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($P<0.01$).

24 hafta OTA içeren yem ile beslenen sıçanların böbrek, karaciğerler ve plazmalarında tespit edilen OTA seviyeleri Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3. 24 hafta OTA içeren yem ile beslenen sıçanların böbrek, karaciğerler ve plazmalarında tespit edilen OTA seviyeleri
A) Erkek sıçanlar ile kastre edilmiş erkek sıçanların böbrek OTA değerleri
B) Erkek sıçanlar ile kastre edilmiş erkek sıçanların karaciğer OTA değerleri
C) Erkek sıçanlar ile dişi sıçanların böbrek OTA değerleri
D) Erkek sıçanlar ile dişi sıçanların karaciğer OTA değerleri
E) Erkek sıçanlar ile kastre edilmiş erkek sıçanların plazma OTA değerleri
F) Erkek sıçanlar ile dişi sıçanların plazma OTA değerleri

Çizelge 4.6. 24 hafta süresince OTA içeren yemle beslenen erkek sıçanlar ile kastre edilmiş erkek sıçanlara ait varyans analiz sonuçları

	Varyasyon Kaynağı	S.D.	K.O.	F
BÖBREK	Kastrasyon	1	71841.15	6.91*
	Hata	15	10390.08	* $P<0.05$
KARACİĞER	Kastrasyon	1	16122.57	0.91
	Hata	15	17702.87	- ^a
PLAZMA	Kastrasyon	1	18409519.8	1.83
	Hata	15	10040208.9	- ^a

^a: İstatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.7. 24 hafta süresince OTA içeren yemle beslenen erkek sıçanlar ile kastre edilmiş erkek sıçanların OTA değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

	OTA Değeri (ng/g-ml)					
	Böbrek		Karaciğer		Plazma	
Erkek Sıçan	277.03	b	313.73	a	6344	a
Kastre Edilmiş Erkek Sıçan	407.27	a	252.03	a	8429	a

Çizelge 4.8. 24 hafta süresince OTA içeren yemle beslenen erkek sıçanlar ile dişi sıçanlara ait varyans analiz sonuçları

	Varyasyon Kaynağı	S.D.	K.O.	F
BÖBREK	Cinsiyet	1	1202732.45	81.75**
	Hata	13	14711.46	** $P<0.01$
KARACİĞER	Cinsiyet	1	257516.90	9.62**
	Hata	13	26773.91	** $P<0.01$
PLAZMA	Cinsiyet	1	105087704.8	18.84**
	Hata	11	5576567.4	** $P<0.01$

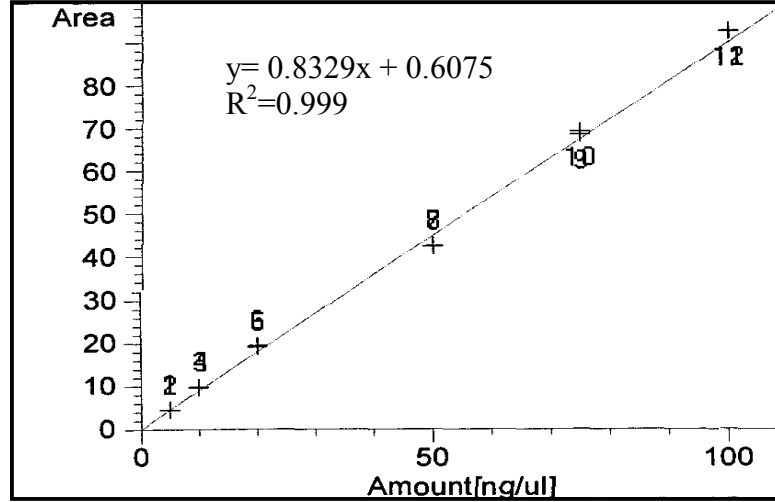
Çizelge 4.9. 24 hafta süresince OTA içeren yemle beslenen erkek sıçanlar ile dişi sıçanların OTA değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

	OTA Değeri (ng/g-ml)					
	Böbrek		Karaciğer		Plazma	
Erkek Sıçan	277.03	b	313.73	b	6344	b
Dişi Sıçan	855.04	a	581.19	a	12504	a

4.4. Validasyon Çalışması

4.4.1. Doğrusallık

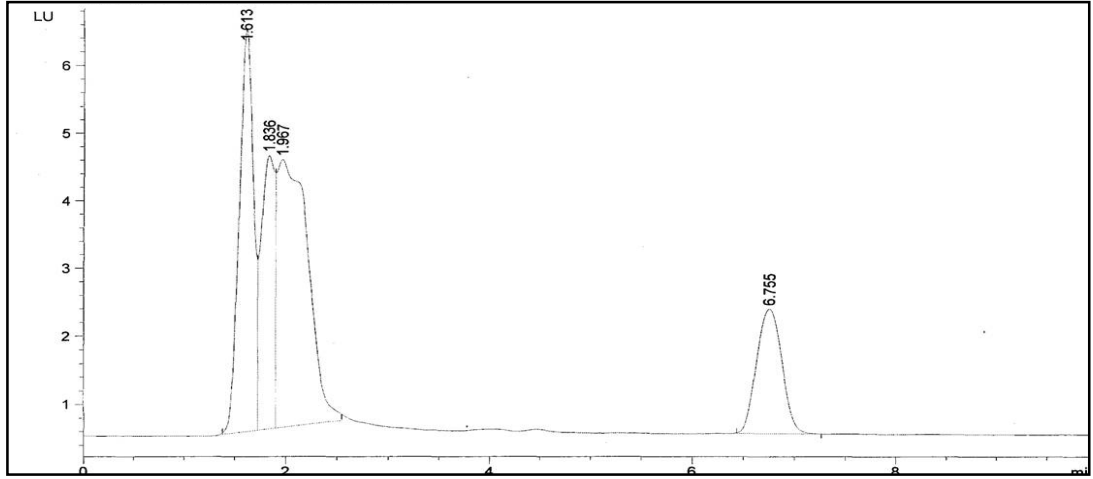
HPLC cihazına 6 ayrı konsantrasyonda hazırlanan standartlardan ikişer enjeksiyon yapılmış ve bu konsantrasyondaki okratoksin A'nın, cihaz tarafından ölçülen alanına karşılık regresyon eğrisi çizilmiştir.



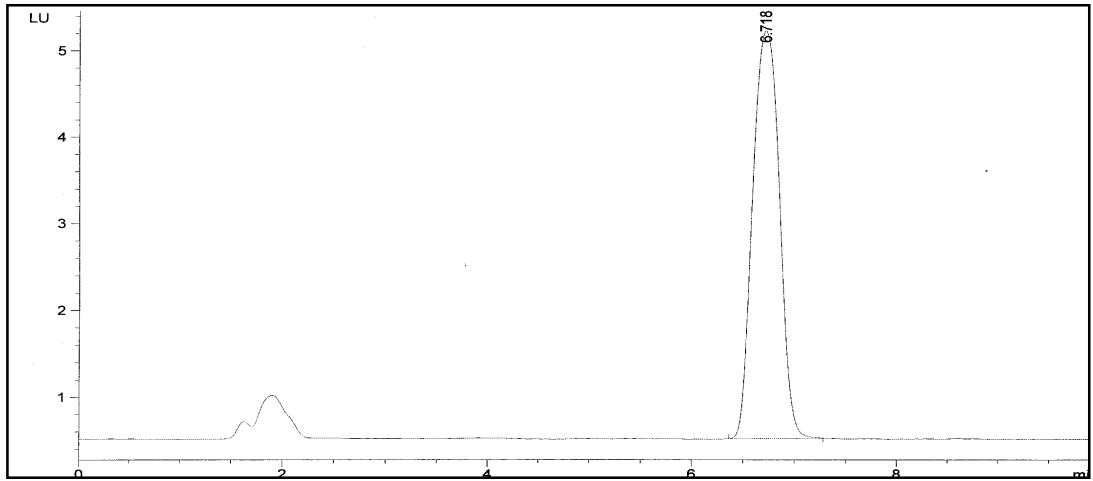
Şekil 4.4. OTA'nın, cihaz tarafından ölçülen alanına karşılık regresyon eğrisi

4.4.2. Seçicilik

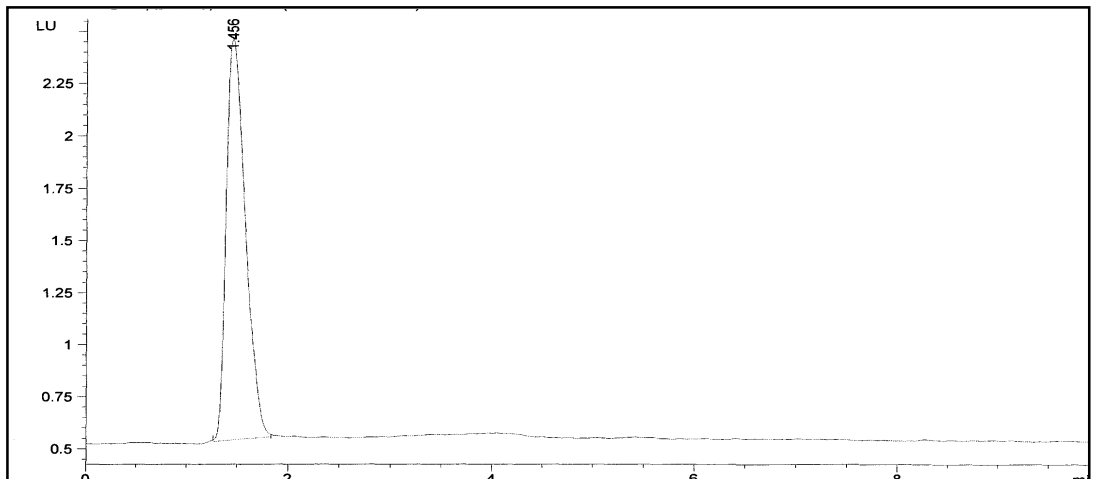
İçersinde okratoksin A bulunmayan sıçan numune örneklerine ait kromatogram ve içersine okratoksin A eklenmiş olan aynı örneklere ait kromatogramlar incelenmiş; boş örnekte OTA piki ile yakın alıkonma zamanlarında çıkan herhangi bir pik olmadığı görülmüştür (Şekil 4.5). Farklı zamanlarda enjeksiyonu yapılan OTA eklenmiş örnek, saf OTA standartı ve OTA içermeyen örneklere ait kromatogramlar Şekil 4.6 ve Şekil 4.7 de görülmektedir.



Şekil 4.5. OTA içeren örneğe ait kromatogram



Şekil 4.6. OTA standartına ait kromatogram



Şekil 4.7. OTA içermeyen örneğe ait kromatogram

4.4.3. Tespit ve ölçüm limiti (LOD ve LOQ)

Daha önce bilinen düzeyde okratoksin A içerdiği belirlenmiş olan böbrek, karaciğer ve plazma örnekleri onar paralel olarak analiz edilmiş, elde edilen değerlerin ortalaması ve standart sapması hesaplanmıştır. Tespit limiti (LOD) için; 3*standart sapma, ölçüm limiti (LOQ) için ise 10*standart sapma değerleri kabul edilmiştir. Böbreklere ait örnekler için ölçüm limiti 3.6 ppb, karaciğer için 3.2 ppb ve plazma için 3.5 ppb olarak bulunmuştur. Böbrek dokusuna ait ölçüm limiti sonuçları örnek olarak Çizelge 4.10'da görülmektedir.

Çizelge 4.10. Tespit ve Ölçüm Limiti sonuçları

Tespit ve Ölçüm Limiti (LOD ve LOQ)			
Paralel no	Ölçülen değer (ppb)	Paralel no	Ölçülen değer (ppb)
1	1.33	6	2.15
2	2.08	7	1.88
3	1.95	8	2.51
4	2.42	9	2.27
5	1.73	10	1.66

Ortalama: 1.99

Standart sapma: 0.36

Tespit Limiti: 1.08

Ölçüm Limiti: 3.60

4.4.4. Kesinlik

Okratoksin A içermediği bilinen böbrek ve karaciğer numunelerine, okratoksin A eklenerek (spiked samples) 2 ayrı konsantrasyonda hazırlanan numuneler, aynı gün ve farklı gün olmak üzere tekrarlanabilirlik koşullarında 8 paralel analiz edilmiş ve paraleller arasındaki ortalama, standart sapma (S.S) ve % RSD değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.11 ve Çizelge 4.12).

Çizelge 4.11. Aynı gün tekrarlanabilirlik çalışması

Aynı Gün (n=8)	Böbrek		Karaciğer	
	20 (ng/gr)	50 (ng/gr)	20 (ng/gr)	50 (ng/gr)
Ortalama	19.61	48.33	18.60	45.83
S.S	1.59	1.19	1.82	3.30
RSD (%)	8.11	2.45	9.79	7.19

Çizelge 4.12. Farklı gün tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları

Farklı Gün (n=8)	Böbrek		Karaciğer	
	20 (ng/gr)	50 (ng/gr)	20 (ng/gr)	50 (ng/gr)
Ortalama	19.73	48.29	19.38	45.84
S.S	1.78	1.33	1.98	3.56
RSD(%)	9.04	2.76	10.20	7.76

4.4.5. Gerçeklik

Böbrek ve karaciğer dokularında 2 farklı konsantrasyon düzeyinde yapılan geri alma çalışmalarında yüzde geri alma (recovery) değerleri hesaplanmıştır. Bulunan değerler Çizelge 4.13’de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Geri alma çalışması değerleri

Paralel No	Böbrek 20 ng/gr	Böbrek 50 ng/gr	Karaciğer 20 ng/gr	Karaciğer 50 ng/gr
1	20.30	49.67	17.49	48.28
2	17.49	46.65	19.38	46.00
3	19.35	48.10	21.37	40.88
4	20.77	49.14	16.37	48.68
5	16.84	46.62	20.52	45.86
6	20.60	49.11	16.74	48.13
7	20.75	49.28	19.35	40.67
8	20.77	48.07	17.59	48.17
Ort. Geri alma (%)	98.04	96.66	93.01	91.67

4.5. Erkek Sıçanların Plasma Testosteron Hormon Düzeyleri

OTA içermeyen yem ile beslenmiş erkek sıçanlar ile OTA'lı yem ile beslenen erkek ve kastre edilmiş erkek sıçanların 6., 12. ve 24. haftada plazma testosteron düzeyleri belirlenmiş ve Çizelge 4.14'de sunulmuştur.

Kastrasyon işlemi öncesi, yani 6. haftada, tüm deney guruplarının plazma testosteron düzeylerinin (4.43, 4.86 ve 3.61 ng/ml) birbirine yakın değerlerde olduğu görülmektedir ($P>0.05$). 12. ve 24. haftada bu değerler normal yem ile beslenen erkekler için 3.86 ve 3.44 ng/ml, OTA almış erkek sıçanlar için 3.54 ve 6.34 ng/ml ve kastre edilmiş sıçanlar içinde 0.19 ve 0.27 ng/ml olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar göstermektedir ki, kastrasyon erkek sıçanların plazma testosteron düzeylerini belirgin bir şekilde azaltmaktadır ($P<0.01$). Normal yem ve OTA içeren yem ile beslenmiş erkek sıçanların plazma testosteron seviyeleri karşılaştırıldığında, OTA alınınının plazma testosteron düzeyinde bir belirgin bir değişime neden olamadığı görülmektedir.

Çizelge 4.14. Plazma testosteron hormonu miktar tayini sonuçları

Plazma Testosteron Düzeyi (ng/ml)			
Zaman	E	E-OTA	E-KAST.-OTA
6. Hafta	4.43±1.82	4.86±2.38	3.61±0.41 [*]
12. Hafta	3.86±1.28	3.54±1.01	0.19±0.01 [#]
24. Hafta	3.44±1.89	6.34±1.38	0.27±0.14 [#]

^{*}Kastrasyon öncesi plazma testosteron seviyesi

[#]Kastrasyon sonrası plazma testosteron düzeyi

E: OTA almamış erkek sıçan

E-OTA: OTA almış erkek sıçan

E-Kast.-OTA: OTA alan kastre edilmiş erkek sıçan

Çizelge 4.15. Plazma testosteron hormonu değerlerine ait varyans analiz sonuçları

	Varyasyon Kaynağı	S.D.	K.O.	F
6. Hafta	Deney Grubu	2	1.22	0.40
	Hata	6	3.06	$P>0.05$
12. Hafta	Deney Grubu	2	12.41	9.29*
	Hata	6	1.33	$* P<0.05$
24. Hafta	Deney Grubu	2	27.68	15.03**
	Hata	6	1.84.	$** P<0.01$

Çizelge 4.16. Plazma testosteron hormonu değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Plazma Testosteron Düzeyi (ng/ml)						
Zaman	E		E-OTA		E-KAST.-OTA	
6. Hafta	4.43	a	4.86	a	3.61	a
12. Hafta	3.86	a	3.54	a	0.19	b
24. Hafta	3.44	b	6.34	a	0.27	c

5. TARTIŞMA

OTA'nın kemirgenlerde kanserojenik etki gösterdiği birçok çalışmada ortaya konulmuş olsa da (Bendele vd 1985, Boorman vd 1989) cinsiyete bağlı farklı etkisinin altında yatan sebepler hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu güne kadar her iki cinsiyeti içeren, uzun süreli, plazma ve organlardaki OTA konsantrasyonunu belirleyip karşılaştıran bir çalışma yayınlanmamıştır. Bu çalışma, erkek , kastre edilmiş erkek ve dişi sıçanlarda uzun dönem (6 ay) OTA uygulaması sonucu karaciğer, böbrek ve plazma OTA konsantrasyonları ile ilgili veriler sunmakta, organ farklılığı, zaman, cinsiyet ve kastrasyon işlemi bakımından bu verileri karşılaştırmaktadır.

Çalışmadan elde edilen veriler incelendiğinde, 24 hafta süresince OTA uygulaması yapılan sıçanlarda, en yüksek plazma OTA konsantrasyonu dişi sıçanlarda ortalama 12504,39 ng/ml seviyesinde tespit edilmiş olup, erkek sıçanların plazma OTA konsantrasyonundan (6344,17 ng/ml) %50,7 oranında daha yüksek bulunmuştur. Mantle (2008) tarafından yapılan benzer bir çalışmada 22 hafta boyunca toplamda 5 ppm OTA içeren yem ile beslenen dişi ve erkek sıçanların plazmalarında tespit edilen OTA konsantrasyonları sırası ile 11170 ng/ml ve 6030 ng/ml seviyesinde belirlenmiştir. Her iki çalışmada, deney hayvanları aynı konsantrasyonda OTA (5 ppm) içeren yem ile benzer sürelerde (22 ve 24 hafta) beslenmiş ve birbirine son derece yakın veriler elde edilmiştir. Vettorazi vd (2009) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise; her iki cinsiyetteki sıçanların plazma OTA konsantrasyonları arasında önemli derecede farklılık tespit edilmiş olup; dişilerdeki plazma OTA konsantrasyonu erkeklere oranla %34 daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar, elde edilen veriler ile paralellik göstermektedir.

Dişi sıçanlarda tespit edilen yüksek OTA konsantrasyonu, eşit miktarda yem verilen dişilerin daha düşük vücut ağırlığına sahip olması ile yani vücut ağırlığı/toksin oranı ile ilişkilendirilmektedir. Vettorazzi vd (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, besin tüketim miktarları vücut ağırlıkları ile dengelenmiş ve cinsiyetler arasında besin tüketim farklılığı bertaraf edilmiştir. Böylece vücut ağırlığının daha küçük olması, belirlenen OTA konsantrasyonu farklılığını açıklamakta yetersiz kalmıştır.

Tüm deney gruplarında tespit edilen plazma OTA konsantrasyon seviyelerinin karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen OTA konsantrasyon seviyelerine oranla bariz şekilde (20-30 kat) yüksek olduğu gözlenmiştir. Mally vd (2005) tarafından

yapılan bir çalışmada, 2 hafta süresince ağızdan sonda yolu ile 0, 0.25, 0.5, 1 ve 2 mg/kg OTA uygulanan erkek sıçanların böbrek, karaciğer ve plazmalarında bulunan OTA konsantrasyonunda doza bağlı bir artış tespit edilmiştir. Farklı doz uygulanan grupların hepsinde, plazma OTA konsantrasyonu, böbrek ve karaciğere oranla belirgin bir şekilde daha yüksek değerde bulunmuştur. Karaciğer ve böbrek OTA konsantrasyonları ise benzer seviyelerde tespit edilmiştir. Arbillaga vd (2007) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise, erkek sıçanlara 7 ve 21 gün süresince vücut ağırlığı başına 0.5 mg/kg seviyesinde OTA uygulanmıştır. Araştırma sonuçları incelendiğinde, karaciğer ve böbrek dokularında tespit edilen OTA konsantrasyonunun birbirine yakın seviyelerde olduğu ve plazma OTA konsantrasyonunun ise her iki dokuya oranla belirgin bir şekilde (9-12 kat) yüksek düzeyde olduğu görülmüştür. Bu veriler araştırma bulguları ile paralellik göstermektedir.

Araştırmada böbrek ve karaciğer OTA konsantrasyonları tüm deney gruplarında birbirine yakın değerlerde bulunmuş olup, böbrek/karaciğer OTA konsantrasyonu oranları 0.88 ile 1,61 arasında değişiklik göstermiştir. Bu benzerlik farklı doz ve sürelerde uygulanan diğer çalışmalarda da (Mally vd 2005, Arbillaga 2007, Rached vd 2007, Vettorazzi vd 2011) vurgulanmaktadır. Yapılan literatür taramalarında hedef organ olarak değinilen böbreklerde (Chopra vd 2010), OTA seviyesinin karaciğere göre daha yüksek oranlarda olacağı öngörülse de, araştırma sonuçları her iki organdaki OTA seviyelerinin birbirine yakın seviyelerde olduğunu göstermektedir.

Uzun süreli (24 hafta) OTA uygulaması yapılan gruplara ait veriler incelendiğinde, erkek sıçanlarda böbrek/karaciğer OTA konsantrasyon oranının 0.88 olduğu ve her iki organ arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı görülmektedir. Kastre edilmiş erkek ve dişi sıçanlarda ise bu oranlar sırası ile 1.61 ve 1.47 olarak belirlenmiş olup, her iki grupta da organlar arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($P<0.05$). Araştırmadan elde edilen bu veriler, erkek sıçanlarda kastrasyon işleminin böbrek/karaciğer oranı açısından dişilere benzerlik gösterdiği sonucunu ortaya koymaktadır.

Çalışmada; 6, 12 ve 24 hafta OTA uygulanan erkek sıçanların böbrek, karaciğer ve plazmalarında tespit edilen OTA konsantrasyonlarının 12. haftada 6. haftaya göre yükseldiği, fakat 24. hafta itibariyle düşüş gösterdiği görülmektedir. Her üç dokuda en yüksek OTA konsantrasyonu 12 hafta OTA uygulaması yapılan grupta tespit edilmiştir.

Rached vd (2007) tarafından yapılan benzer bir çalışmada; erkek sıçanlara 14, 28 ve 90 gün boyunca sonda yolu ile 0, 21, 70 ve 210 µg/kg OTA uygulamış, en yüksek doz uygulanan sıçanlarda 90. gün sonunda (yaklaşık 12 hafta) böbrek, karaciğer ve plazmalarındaki OTA konsantrasyonunun en yüksek değerlere ulaştığı bildirilmiştir. Çalışmadan elde edilen bu sonuçlar; OTA'nın dokularda devamlı artmadığını belirli bir zamandan sonra düşüş gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Erkek sıçanların karaciğer, böbrek ve plazmalarındaki OTA konsantrasyonu dişilere oranla daha düşük seviyelerde bulunmasına rağmen, OTA'nın erkeklerde daha fazla toksik etki gösterdiği bilinmektedir. Dişilerle kıyaslandığında OTA kaynaklı böbrek kanserine, erkek sıçanların yaklaşık 10 kat daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (Boorman vd 1992). Cinsiyete bağlı bu farklı etkinin altında yatan sebepler tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, bazı araştırmacılar bunun erkek sıçanlara özgü bir protein olan alfa2u-globülin kaynaklı olduğunu, OTA'nın bu proteine bağlanarak proksimal tübülde OTA birikimini arttırdığını ileri sürmektedirler (Mantle ve Nagy 2008). Bu görüşün aksine Rasonyi vd (1998) OTA'nın alfa2u-globülin proteinine bağlanmadığını, bu mekanizmanın erkek sıçanlarda yüksek oranda görülen böbrek tümörlerini açıklamada yetersiz olduğunu bildirmişlerdir. Vettorazzi vd (2009) ise erkek sıçanlara özgü bu protein varlığının, farklı kinetik profillerin elde edilmesinde bir etken olamayacağını belirtmektedir.

Yapılan testosteron hormonu analiz sonuçları incelendiğinde; kastre edilmiş sıçanların hormon düzeyleri işlem öncesi (6. hafta) 3.61 ng/ml seviyesinde bulunmuş iken; kastrasyon sonrasında 12. haftada 0.19 ng/ml, 24. haftada ise söz konusu bu değer 0.27 ng/ml düzeyinde olduğu tespit edilmiştir. Zhou vd (2009) tarafından yapılan bir çalışmada Wistar cinsi erkek sıçanların plazma testosteron düzeyleri kontrol grubunda 3.95 ng/ml, kastre edilmiş sıçanlarda ise 0.10 ng/ml olarak tespit edilmiştir. Baltacı vd (2006) tarafından yapılan benzer bir çalışmada ise Sprague-Dawley cinsi sıçanların testosteron seviyeleri belirlenmiş ve bu değerlerin kontrol grubunda 2.20 ng/ml, kastre edilen sıçanlarda ise 0.20 ng/ml düzeyinde olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada olduğu gibi, kastrasyon işleminin erkeklerde plazma testosteron seviyesini belirgin bir şekilde azalttığı Prezant vd (1997) ve Üstün (2007) tarafından da gösterilmiştir.

Kastre edilmiş hayvanların plazma (8429.05 ng/ml) ve organ (böbrek; 407.27 ng/g, karaciğer; 252.03 ng/g) OTA seviyeleri, OTA içeren yem ile beslenmiş normal erkeklerin plazma (6344.18 ng/ml) ve organ (böbrek; 277.03 ng/g, karaciğer; 313.73 ng/g) seviyeleri ile karşılaştırıldığında (bu sıçanların böbrek OTA seviyeleri arasında istatistiksel olarak bir fark gözükmeyle birlikte), plazma ve organ OTA düzeyleri üzerinde belirgin bir farklılığın olmadığı görülmektedir. Kastrasyon işlemi, kastre erkek ile normal erkek testosteron düzeylerinde belirgin bir fark meydana getirmekle birlikte, bu erkeklerin plazma ve organ OTA seviyelerinde belirgin bir fark yaratmamakta ve bu da erkek sıçanların organ ve plazma OTA düzeylerinin testosterondan etkilenmediğini işaret etmektedir.

Mantle ve Nagy (2008), OTA'nın nefrotoksik etkisinin erkek sıçanlarda yüksek olmasının nedenini, erkeklerde bulunan ve testosteron bağımlı alfa2u-globülin proteinin OTA'yı bağlayarak zarar vermesi şeklinde açıklamışlardır. Bu tez çalışmasında kullanılan plazma ve organ örneklerinin de elde edildiği projede, erkeklerin dişilere göre daha düşük düzeyde plazma OTA seviyesine sahip olmasının nedeni olarak alfa2u-globülin ile OTA'nın dışarı atılım olasılığı test edilmiştir. Alfa2u-globülin proteinin testosteron bağımlı bir protein olduğu (Vandoren vd 1983) ve kastrasyon işlemi sonrası hem plazma ve hem de idrar alfa2u-globülin protein düzeyinin ciddi şekilde azaldığı bilinmektedir (Kulkarni vd 1985, Eker vd 2010). Bu tez çalışmasında, kastre edilmiş erkek sıçanların plazma ve doku OTA seviyelerinin dişilere göre belirgin bir şekilde daha düşük olarak bulunmuş olması, erkek sıçanların düşük OTA seviyesinin ve erkek ile dişi sıçanların plazma ve dokularında gözlenen OTA konsantrasyon farklılığının alfa2u-globülin proteini ile ilişkili olmadığını işaret etmektedir.

6. SONUÇ

Farklı zaman dilimleri süresince OTA uygulaması yapılan Wistar cinsi sıçanların böbrek, karaciğer ve plazmalarında tespit edilen OTA düzeylerinin organ, zaman, cinsiyet ve kastrasyon işlemine bağlı olarak nasıl değiştiğini ortaya koymayı amaçlayan bu çalışmada, en yüksek organ ve plazma OTA değerleri dişi sıçanlardan elde edilmiştir. Erkek sıçanların plazma OTA seviyelerinin böbrek ve karaciğer OTA seviyelerinden 20-30 kat daha fazla olması, böbrek ve karaciğer OTA seviyelerinde belirgin bir farklılığın bulunmaması ve organ OTA seviyelerinin plazma OTA seviyesine paralel olarak artış veya düşüş göstermesi, literatürde ‘hedef organ’ olan böbrekte ‘biriktiği’ iddiasının tekrar değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir. Kastrasyon işleminin plazma testosteron seviyesini belirgin oranda azaltması, fakat bu azalışın plazma ve organ OTA düzeyi üzerine belirgin bir etkisinin olmaması, organ ve plazma OTA seviyelerinin testosteron hormonu ile doğrudan ilişkili olmadığını işaret etmektedir. Benzer şekilde, kastre edilmiş erkeklerde OTA düzeylerinin değişmemesi, cinsiyete bağlı OTA düzey farklılığının testosteron hormonundan kaynaklanmadığını göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

- ABBES, S., OUANES, Z., BEN SALAH-ABBES, J., A, HOUAS, Z., OUESLATI, R., BACHA, H. and OTHMAN, O. 2006. The protective effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate against haematological, biochemical and pathological changes induced by Zearalenone in mice. *Toxicon*, 47: 567–574.
- ANONYMOUS. 1998. Opinion on ochratoxin A. The Scientific Committee on Food, the European Commission.
- ARBILLAGA, L., VETTORAZZI, A., GIL, A.G., van DELFT, J.H., GARCIA-JALON, J.A. and LOPEZ de CERAIN, A. 2008. Gene expression changes induced by ochratoxin A in renal and hepatic tissues of male F344 rat after oral repeated administration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 230: 197-207.
- ATROSHI, F., BIESE, I. and SALONIEMI, H. 2000. Significance of apoptosis and its relationship to antioxidants after ochratoxin A administration in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 3: 281-291.
- BALTACI, A.K., MOGULKOC, R. and OZTURK, A. 2006. Testosterone and zinc supplementation in castrated rats: Effects on plasma leptin levels and relation with LH, FSH and testosterone. *Life Sciences*, 78: 746-752.
- BARLOW, S., BOLGER, P.M., PITT, J.I. and VERGER, P. 2008. Ochratoxin A in: World health organization, technical report series, safety evaluation of certain food additives and contaminants. *WHO Food Additives Series*, 59: 357-429.
- BENDELE, A.M., CARLTON, W.W., KROGH, P. and LILLEHOJ, E.B. 1985. Ochratoxin A carcinogenesis in the F1 mouse. *Journal of the National Cancer Institute*, 75(4): 732-742.
- BENNETT, J.W. and KLICH, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3): 497-516.
- BOORMAN, G.A. 1989. Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A in F344/N rats. *National Toxicology Program Technical Report Series*, 358. USA, 141 pp.
- BRASE, S., ENCINAS, A., KECK, J. and NISING, C.F. 2009. Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chemical Reviews*, 109: 3903-3990.
- CASSEL, E.K., BARAO, S.M. and CARMAL, D.K. 1989. Aflatoxicosis and ruminants. *Fact Sheet*, 507.
- CHANG, C.F. and HAMILTON, P.B. 1980. Impairment of phagocytosis by heterophils from chickens during ochratoxicosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(3): 572-575.

- CHOPRA, M., LINK, P., MICHELS, C. AND SCHRENK, D. 2010. Characterization of ochratoxin A-induced apoptosis in primary rat hepatocytes. *Cell Biological Toxicology*, 26: 239–254.
- CLARK, H.A. and SNEDEKER, S.M. 2006. Ochratoxin A: Its cancer risk and potential for exposure heather. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B*, 9: 265-296.
- DHANASEKARAN, D., SHANMUGAPRIYA, S., THAJUDDIN, N. and PANNEERSELVAM, A. 2009. Aflatoxins and aflatoxicosis in human and animals. *Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology*, 12: 222-254.
- FUCHS, R., HULT, K., PERAICA, M., RADIC, B. and PLESTINA, R. 1984. Conversion of ochratoxin C into ochratoxin A in vivo. *Applied and Environmental Microbiology*, 48: 41-42.
- FUCHS, R. and PERAICA, M. 2005. Ochratoxin A in human kidney diseases. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 22: 1, 53-57.
- GALTIER, P. and ALVINERIE, M. 1976. In vitro transformation of ochratoxin A by animal microbial floras. *Annals of Veterinary Research*. 7(1): 91-8.
- GEKLE, M. and SILBERNAGL, S. 1996. Renal toxicodynamics of ochratoxin A: a pathophysiological approach. *Kidney and Blood Pressure Research*, 19 (5): 225-235.
- GİRGİN, G. 2001.Dünyada ve Türkiye’de insan sağlığını tehdit eden mikotoksinler. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 58(3): 97-118.
- GOVARIS, V., ROUSSI, P., KOIDIS, A. and BOTSOGLOU, N.A. 2001. Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing, ripening and storage of telemes cheese. *Food Additives and Contaminants*, 18 (5): 437-443.
- GQALENI, N., SMITH, J.E., LACEY, J. and GETTIN, G. 1997. Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *aspergillus flavus* in surface agar culture. *Applied And Environmental Microbiology*, 63 (3): 1048-1053.
- HAUBECK, H.D., LORKOWSKI, G., KOLSCH, E. and ROSCHENTHALER, R. 1981. Immunosuppression by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Applied and Environmental Microbiology*, 41 (4): 1040-1042.
- HOWARD, P.C., EPPLEY, R.M., STACK, M.E., WARBRITTON, A., VOSS, K.A., LORENTZEN, R.J., KOVACH, R.M. and BUCCI, T.J. 2001. Fumonisin B1 carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F1 mice. *Environmental Health Perspectives*, 109: 277-282.

- ITO, Y., PETERSON, S.W., WICKLOW, D.T. and GOTO, T. 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *aspergillus* section *flavi*. *Mycological Research*, 105 (2): 233-239.
- JOSEFSSON, B.G. and MOLLER T.E. 1980. Heat stability of ochratoxin A in pig products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31(12): 1313-1315.
- KANE, A., CREPPY, E.E., ROSCHENTHALER, R. and DIRHEIMER, G. 1986. Changes of urinary and renal tubular enzymes caused by subchronic administration of ochratoxin A in rats. *Toxicology*, 61: 489-495.
- KHOMUTOV, R. M., DZHAVAKHIYA, V. G., KHURS, E.N., OSIPOVA, T. I., SHCHERBAKOVA, L.A., ZHEMCHUZHINA, N.S., MIKITYUK, O.D. and NAZAROVA, T.A. 2011. Chemical regulation of mycotoxin biosynthesis. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 436: 25-28.
- KULKARNI, A.B., GUBITS, R.M. and FEIGELSON, F. 1985. Developmental and hormonal regulation of alpha2u-globulin gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82: 2579-2582.
- LEE, S.C., BEERY, J.T. and CHU, F.S. 1984. Immunohistochemical fate of ochratoxin A in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 72 (2): 218-227.
- MALLY, A., VÖLKEL, W., AMBERG, A., KURZ, M., WANEK, P., EDER, E., HARD, G. and DEKANT, W. 2005. Functional, biochemical, and pathological effects of repeated oral administration of ochratoxin A to rats. *Chemical Research in Toxicology*, 18: 1242-1252.
- MANTLE, P.G. 2008. Interpretation of the pharmacokinetics of ochratoxin A in blood plasma of rats, during and after acute or chronic ingestion. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 1808-1816.
- MANTLE, P.G. and NAGY, J.M. 2008. Binding of ochratoxin a to a urinary globulin: A new concept to account for gender difference in rat nephrocarcinogenic responses. *International Journal of Molecular Science*, 9: 719-735.
- MEISNER, H. and CHAN, S. 1974. Ochratoxin A, an inhibitor of mitochondrial transport systems. *Biochemistry*, 13 (14): 2795-2800.
- METİN, R. 2006. Türk kahvesi örneklerinde okratoksin A varlığı. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 47 ss.
- MURO-CACHO, C.A., STEDEFORD, T., BANASIK, M., SUCHECKI, T.T. and PERSAD, A.S. 2004. Mycotoxins: Mechanisms of toxicity and methods of detection for identifying exposed individuals. *Journal Of Land Use*, 19 (2): 537-556.
- NEAL, G.E. 1995. Genetic implications in the metabolism and toxicity of mycotoxins. *Toxicology Letters*, 82 (83): 861-867.

- O'BRIEN, E. and DIETRICH, D.R. 2004. Mycotoxins affecting the kidney. In: J. B. Hook (Editors), *Toxicology of Kidney*, pp. 895-936 USA.
- PASSONE, M.A., RESNIK, S.L. and ETCHEVERRY, M.G. 2005. In vitro effect of phenolic antioxidants on germination, growth and aflatoxin B1 accumulation by peanut *Aspergillus* section *Flavi*. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 682-691.
- PATTERSON, D. 1977. Metabolism of aflatoxin and other mycotoxin in relation to their toxicity and accumulation of residues in animal tissues. *Pure and Applied Chemistry*, 49: 1723-1731.
- PETKOVA-BOCHAROVA, T. and CASTEGNARO, M. 1991. Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria. *IARC Scientific Publications*, 115: 135-137.
- PETZINGER, E. and WEIDENBACH, A. 2002. Mycotoxins in the food chain: The role of ochratoxins. *Livestock Production Science*, 76: 245-250.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A. 2009. Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 60: 465-483.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A. and MANDERVILLE, R.A. 2007. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51: 61-99.
- PITT, J.I. 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*, 56 (1): 184-192.
- PREZANT, D.J., KARWA, M.L., KIM, H.H., MAGGIORE, D., CHUNG, V. and VALENTINE, D.E. 1997. Short- and long-term effects of testosterone on diaphragm in castrated and normal male rats. *Journal of Applied Physiology*, 82: 134-143.
- PUEL, O., GALTIER, P. and OSWALD, I.P. 2010. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins*, 2: 613-631.
- RACHED, E., HARD, G.C., BLUMBACH, K., WEBER, K., DRAHEIM, R., LUTZ, W.K., ÖZDEN, S., STEGER, U., DEKANT, W. and MALLY, A. 2007. Ochratoxin A: 13-week oral toxicity and cell proliferation in male f344/N rats. *Toxicological Sciences*, 97: 288-298.
- RASONYI, T., SCHLATTER, J. and DIETRICH, D.R. 1999. The role of α_2 -globulin in ochratoxin A induced renal toxicity and tumors in F344 rats. *Toxicology Letters*, 104: 83-92.

- RINGOT, D., CHANGO, A., SCHNEIDER, Y. and LARONDELLE, Y. 2006. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions*, 159: 18-46.
- RODGERS, I.S. and BAETCKE, K.P. 1993. Interpretation of male rat renal tubule tumors. *Environmental Health Perspectives Supplements*, 101: 45-52.
- SANSING, G.A., LILLEHOJ, E.B., DETROY, R.W. and MILLER, M.A. 1976. Synergistic toxic effects of citrinin, ochratoxin A and penicillic acid in mice. *Toxicon*, 14: 213-220.
- SCHILTER, B., MARIN-KUAN, M., DELATOUR, T., NESTLER, S., MANTLE, P. and CAVIN, C. 2005. Ochratoxin A: Potential epigenetic mechanisms of toxicity and carcinogenicity. *Food Additives and Contaminants, Supplement*, 1: 88-93.
- SCOTT, P.M. 1984. Effects of food processing on mycotoxins. *Journal of Food Protection*, 47(6): 489-499.
- STOEV, S.D. 2010. Studies on carcinogenic and toxic effects of ochratoxin A in chicks. *Toxins*, 2: 649-664.
- STOREN, O., HOLM, H. and STORMER, F.C. 1982. Metabolism of ochratoxin A by rats. *Applied And Environmental Microbiology*, 44 (4): 785-789.
- SWENBERG, J.A. 1993. $\alpha_2\mu$ -Globulin nephropathy: Review of the cellular and molecular mechanisms involved and their implications for human risk assessment. *Environmental Health Perspectives Supplements*, 101: 39-44.
- SWENBERG, J. A. and LEHMAN-MCKEEMAN, L. D. 1999. $\alpha_2\mu$ -urinary globulin-associated nephropathy as a mechanism of renal tubule cell carcinogenesis in male rats. *IARC Scientific Publications*, 147: 95-117.
- TURNER, N.W., SUBRAHMANYAM, S. and PILETSKY, S.A. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica. Acta.*, 632: 168-180.
- TUNALI, N. 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını. Sim Matbaası, Ankara, 522 ss.
- ÜSTÜN, A. 2007. Ratlarda tek taraflı sürrenalektomi, kastrasyon ve testosteron uygulamasının leptin salınımına etkisi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 54 ss.
- VAN DER MERWE, K.J., STEYN, P.S., FOURIE, L., SCOTT, D.B. and THERON, J.J. 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* wilh. *Nature*, 205 (976): 1112-1113.

- VANDOREN, G., MERTENS, B., HEYNS, W., VAN BAELEN, H., ROMBAUTS, W. and VERHOEVEN, G. 1983. Different forms of α_{2u} -globulin in male and female rat urine. *European Journal of Biochemistry*, 134: 175-181.
- VETTORAZZI, A., GONZALES-PENAS, E., ARBILLAGA, L., CORCUERA, L.A. and LOPEZ DE CERAÍN, A. 2008. Simple high-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for plasma, kidney and liver of rat as a tool for toxicology studies. *Journal of Chromatography A*, 1215: 100-106.
- VETTORAZZI, A., GONZALES-PENAS, E., TROCONIZ, I. F., ARBILLAGA, L., CORCUERA, L.A., GIL, A.G. and LOPEZ DE CERAÍN, A. 2009. A different kinetic profile of ochratoxin A in mature male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 1921-1927.
- VETTORAZZI, A., TROCONIZ, I. F., GONZALES-PENAS, E., CORCUERA, L.A., ARBILLAGA, L., GIL, A.G., MAGY, J.M., MANTLE, P.G. and LOPEZ DE CERAÍN, A. 2010. Effects of fasting and gender on ochratoxin A toxicokinetics in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 3159–3166.
- VETTORAZZI, A., TROCONIZ, I. F., GONZALES-PENAS, E., ARBILLAGA, L., CORCUERA, L.A., GIL, A.G. and LOPEZ DE CERAÍN, A. 2011. Kidney and liver distribution of ochratoxin A in male and female F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 1935-1942.
- ZHOU, Y., XIAO, X.O., CHEN, L.F., YANG, R, SHI, J.D., DU, X.L., KLOCKER, H., PARK, I., LEE, C. and ZHANG, J. 2009. Proliferation and phenotypic changes of stromal cells in response to varying estrogen/androgen levels in castrated rats. *Asian Journal of Andrology*, 11, 451-459.

ÖZGEÇMİŞ

Kemal URAN 1978 yılında Balıkesir’de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini aynı ilde tamamladı. 2002 yılında Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2009 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.