

AFLATOKSİN B₁ ve G₁ İN DEĞİŞİK DOZLARDA İDRARLA
ATILIMI, VÜCUT AĞIRLIĞI ve LÖKOSİT SAYILARI ÜZERİNE
ETKİLERİ,

Ecir Ali ÇAKMAK

Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği Uyarınca
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman : Prof. Dr. Ayşe BAŞARAN

Eylül 1988

99754

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ecir Ali ÇAKMAK'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Aflatoksin B₁ ve G₁'in değişik dozlarda idrarla atılımı, vücut ağırlığı ve lökosit sayıları üzerine etkileri" başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Üye: Prof.Dr. Ayşe BAŞARAN (imza)

Üye: Prof.Dr. Nurettin BAŞARAN (imza)

Üye: Yrd.Doç.Dr. Hasan Veyisi GÜNEŞ (imza)

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 3.10.1988 gün ve 95/195 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

(imza)

Prof.Dr. Nurettin BAŞARAN
Enstitü Müdürü

ASLI GİBİDİR

3.10.1988

İsmet YILMAZ

Enstitü Sekreteri

Ö Z E T

38 adet *Rattus norvegicus* türü erkek sıçana intraperiton^a olarak 500 µg/kg ve 1000 µg/kg aflatoksin B₁, 500 µg/kg ve 1000 µg/kg aflatoksin G₁ verildikten sonra belirli aralıklarla idrarları toplanarak ekstre edildi ve ince tabaka kromatografisi uygulanarak idrarla atılan miktarları tesbit edildi. Aflatoksinlerin atılımı, vücut ağırlığı ve lökosit sayıları üzerine etkileri araştırıldı.

Her çeşit aflatoksinin vücut ağırlığı artışını engellediği, fakat aflatoksin B₁'in aflatoksin G₁'den etkili olduğu ve daha fazla vücut ağırlığı artışını engellediği saptandı.

500 µg/kg aflatoksin B₁ verilen grupta verilen dozun % 5.72 si, 1000 µg/kg aflatoksin B₁ verilen grupta % 7.83 ü aflatoksin M₁ olarak, 500 µg/kg aflatoksin G₁ verilen grupta % 2.37 si ve 1000 µg/kg aflatoksin G₁ verilen grupta % 4.10 u aflatoksin G₁ ve M₁ olarak idrarla atılmıştır. İdrarla atılım en fazla aflatoksin verilmesinden sonraki 6. saatte olmuştur.

Aflatoksinlerin intraperiton^a olarak verilmesinden 6 saat sonra nötrofil, bazofil, eozinofil sayıları artmış, lenfosit ve monosit sayısı ise azalmıştır. 30 gün sonra ise nötrofil, lenfosit ve monositler normal değerlerine ulaşmış bazofil ve eozinofiller sayıca artmışlardır.

Anahtar kelimeler: Aflatoksin B₁, Aflatoksin G₁,
Aflatoksinleri idrarla atılımı,
vücut ağırlığına etkisi, lökosit
sayısı üzerine etkileri.

S U M M A R Y

500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoxin B_1 , 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoxin G_1 have been enjected to 38 rats (*Rattus norvegicus*) intraperitonally and then their excretion amounts in the urine have been determined by extrating the urine periodically and applying thin layer chromatography. The excretion of aflatoxin and their effects to body weight and the number of leucocytes have been investigated.

It has been seen that altough all of the kinds of aflatoxin obstructed the increase of body weight, the effect of aflatoxin B_1 to the body weight was more than aflatoxin G_1 .

5.72 % in the 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoxin B_1 group, 7.83 % in the 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoxin B_1 group were excreted as aflatoxin M_1 , 2.37 % in the 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 4.10 % in the 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoxin G_1 group were excreted with urine as G_1 and M_1 . The most amount of excretion with urine has been obtained in sixth hour after enjection of the aflatoxin.

Six hours later aflatoxins were given rats, the number of neutrophil, basophil and eosinophil increased and lymphocyte and monocyte decreased. After 30 days, neutrophil lymphocyte and monocyte have been reacted to their normal levels, but basophil and eosinophil was still increased.

Key words: Aflatoxin B_1 , Aflatoxin G_1 , The excretion of aflatoxins with urine, The effects to the body weight, The effects to the number of leucocytes.

T E Ş E K K Ü R

Bu araştırmamın gerekleşmesi için gerekli gerelerin ve yntemlerin sağlanmasında, yazım sırasında sabırlı düzeltmeleri ve değerli katkılarıyla ve ayrıca bugüne kadar bütün çalışmalarımda rehberlik edip desteğini esirgemeyen, sürekli yakın ilgisiyle yetismemi sağlayan ve değerli bilgilerinden yararlandığım değerli hocam Prof.Dr. Ayse BASARAN'a en içten tesekkrlerimi sunarım.

Çalışmalarımı çok yakından sürekli olarak izleyen ve bana yol gösteren değerli hocam Prof.Dr. Nurettin BASARAN'a, aynı zamanda niversitemizde desteklenen bir proje olan bu çalışma için gerekli malzemenin temin edilmesinde yardımcı olan Anadolu Üniversitesi Rektörü Prof.Dr. Yılmaz BÜYÜKER-ŐEN'e, Tıp Fakültesi Dekanı Prof.Dr. İsmail BAğCILAR'a ve çalışma sürecinde yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç.Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ'e tesekkür ederim.

Ayrıca Őekillerin iziminde yardımlarını esirgemeyen Sağlık Teknisyeni Ayse ÇİMEN'e, plakların okunmasında yardımcı olan Tarım Orman ve KöyiŐleri Bakanlığı Ankara İl Müdürlüğü Aflatoksin laboratuvarı sorumlusu Yük.Zir.Müh. Nafi ÇOKSÖYLER'e ve aflatoksin laboratuvarı personeline de tesekkür ederim.

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
SUMMARY.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Gereç	16
3.1.1. Deney hayvanları	16
3.1.2. Kimyasal maddeler	16
3.1.3. Aygıtlar	16
3.2. Yöntem	17
3.2.1. Deney hayvanlarının bakımı.....	17
3.2.2. Uygulanan doz	18
3.2.3. Aflatoksinlerin verilmesi	19
3.2.4. İdrarların toplanması ve saklanması.	20
3.2.5. İdrarda inci tabaka kromatografisi	
çalışmaları	20
3.2.5.1. İdrarın ekstraksiyonu	20
3.2.5.2. Kolonun hazırlanması ve	
ekstraktın kolondan geçi-	
rilmesi	21
3.2.5.3. Ekstraktın damlatılması ve	
solventte yürütülmesi	22
3.2.5.4. Plakların okunması ve afla-	
toksin miktarının hesaplan-	
ması	23
3.2.6. Kan yayma frotisi çalışmaları	26
4. BULGULAR	27
4.1. Vücut Ağırlıkları	27

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.2. İdrarla Atılan Aflatoksin Miktarları	31
4.3. Lökosit Sayılarına Ait Bulgular	34
5. TARTIŞMA	40
5.1. Vücut Ağırlıkları	40
5.2. İdrarla Atılan Aflatoksin Miktarları	41
5.3. Lökosit sayılarına etkileri	42
6. SONUÇ	44
KAYNAKLAR DİZİNİ	45

S E K İ L L E R D İ Z İ N İ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Aspergillus flayus'un genel görünümü.....	5
2.2. Aflatoksin B ₁ ve B ₂ 'nin açık formülleri	8
2.3. Aflatoksin G ₁ ve G ₂ 'nin açık formülleri	8
2.4. Aflatoksin M ₁ ve GM ₂ 'in açık formülleri	9
2.5. Karaciğer hücresine giren aflatoksin B ₁ 'in metabolizması	10
3.1. Hayvan üretme kafesi	18
3.2. İdrar toplama kafesleri	19
3.3. Cam kolonlar	21
3.4. Aflatoksin B ₁ için kalibrasyon eğrisi	24
3.5. Aflatoksin G ₁ için kalibrasyon eğrisi	25
3.6. Aflatoksin M ₁ için kalibrasyon eğrisi	25
4.1. Kontrol ve deney gruplarında vücut ağırlığı artışları	28
4.2. İdrarla atılan aflatoksin miktarları	32
4.3. Kontrol ve aflatoksin G ₁ verilen gruplarda nötrofil yüzde değerleri	35
4.4. Kontrol ve aflatoksin G ₁ verilen gruplarda bazofil yüzde değerleri	36
4.5. Kontrol ve aflatoksin G ₁ verilen gruplarda eozinofil yüzde değerleri	37
4.6. Kontrol ve aflatoksin G ₁ verilen gruplarda lenfosit yüzde değerleri	38
4.7. Kontrol ve aflatoksin G ₁ verilen grupların monosit yüzde değerleri	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. Kontrol ve deney gruplarının vücut ağırlığı ortalamaları	27
4.2. Kontrol ve deney gruplarının vücut ağırlığı artışları	30
4.3. İdrarla atılan aflatoksin miktarları	31
4.4. Kontrol ve aflatoksin G ₁ verilen deney gruplarında ortalama lökosit değerleri	34.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
µl	Mikrolitre
g	Gram
µg/kg	Mikrogram / kilogram
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
ml	Mililitre
cm	Santimetre
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknik Arastırma Kurumu

1. G İ R İ Ş

İnsan sağlığı açısından gıda maddelerinin mikroorganizmalarla bulaşmamış ve kalite yönünden yüksek standartlara uygun olması gerekmektedir.

Gıda maddelerinin gelişimi ve depolanma sürecinde uygun sıcaklık ve nemde bunlarda bir takım küfler üreyebilir. Bu küflerin metabolizması sonucu metabolit adı verilen bir takım yan ürünler oluşur. Metabolitlerin bazıları insan sağlığında faydalı yönde kullanılabilirdiği (antibiyotikler gibi) halde bazıları da insan sağlığını ciddi şekilde tehdit etmektedir ki bu sonuncular mikotoksinler olarak adlandırılır (5, 29, 71).

Küflerden ve onların toksinlerinden ileri gelen zehirlenmeler ilk defa Gerlach tarafından bildirilmiştir (Yurtyeri, 1979). Mikotoksinlere ait ilk çalışmalar Japon ve Rus bilginleri tarafından yapılmıştır. Japonya'nın 1891 yılından sonra Çin Hindi'nden ithal ettiği bazı pirinç partilerini yiyen halkta karaciğer bozukluklarına raslanmış ve 1940 yılında bu durum daha da belirgin bir hal almıştır (Detroy et al, 1971).

Son yıllarda zararlı küf metabolitleri daha çok önem kazanmış olup 1942, 1943, 1944 yıllarında Rusya'nın Orenburg bölgesinde toprak altında saklanan buğdayların yemesi sonucu "septik anjin ve alimenter toksik anemi" görüldüğü, 1963 yılında Güney Amerika'da İngiliz Guyan'ında aflatoksinli yer fıstığı unundan zehirlenen yerli kabileden ölenlerin olduğu, yine 1968 yılında küflü (aflatoksinli) yer fıstığı yiyen batı Java'lılardan 60 kişinin öldüğü tesbit edilmiştir (53, 69, 71).

1960 yılında İngiltere'de 100.000 hindi palazının ani ölümü üzerine mikotoksinler ciddi olarak ele alınmış ve nedenleri üzerinde araştırmalar başlamıştır. Hindilerin topluca ölümüne neden olan bu bilinmeyen hastalığa "meçhul hindi hastalığı (turkey X disease)" adı verilmiştir (1, 14, 29). Bu olayın nedeni araştırılırken hindi palaz-

larının beslendikleri yemlerde ultra viole ışık altında parlak mavi floresan lekeler veren maddeler olduğu görülmüş bu maddelerin kimyasal analizleri sonucu aflatoksinler olarak adlandırılmıştır. Aflatoksinlerin B₁, B₂, G₁, G₂ olmak üzere dört ayrı çeşidi tayin edilmiştir (14,29,38).

Aflatoksinler *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus paraticus* gibi küflerin ikincil metabolit ürünleridir. *Aspergillus flavus*'un toksik karakterli metaboliti olan (aflatoksin" kelimesi, *Aspergillus*'un "A" sı ve *flavus*'un "fla" sı alınıp arkasına toksin kelimesi eklenmesi ile ortaya çıkmıştır (5, 27, 53).

Yer fıstığı, fındık, incir ve benzeri tarım ürünleri gibi gıda maddelerinde sıkça rastlanan aflatoksinler bu ürünlerin çokça üretildiği yurdumuzda halkımızın sağlığı ve yurdumuzun ekonomik durumunu etkilemesi bakımından önemli güncel konulardan biri haline gelmiştir. Yurdumuzda aflatoksin sorunu ilk kez 1967 yılında Kanada'ya ihraç edilen antep fıstıklarında aflatoksin tesbiti nedeniyle geri gönderilmesi sonucu ortaya çıkmıştır (5, 13, 71). Yine 1971 yılında Amerika'ya ihraç edilen antep fıstıkları ve 1972 yılında Danimarka'ya ihraç edilen kuru incirler aflatoksin kapsadıkları gerekçesiyle geri gönderilmiştir. Bunun üzerine memleketimizde aflatoksin üzerine çalışmalar başlamıştır. Bu çalışmalar sonunda bazı fındık, yer fıstığı, ceviz, mısır, incir ve buğday gibi gıda maddelerinde aflatoksin tesbit edilmiştir (4, 7, 8, 13, 14). Bir çok kuruluş yanında, bu konuda ortak projeye katıldığımız TÜBİTAK Marmara Bilimsel ve Endüstriyel Araştırma Enstitüsü Beslenme ve Gıda Teknolojisi Bölümünde de 1976 yılından beri küfler üzerine sistemli şekilde araştırmalar yapılmaktadır.(Alperden, 1985).

Deneysel olarak standart aflatoksin verilen koyunların karaciğer, böbrek ve idrarlarında, yine aflatoksin B₁ içeren saman ve yer fıstığı ile beslenen ineklerin sütünde aflatoksinler tesbit edilmiş ve bunların karaciğer lezyonlarına sebep oldukları saptanmıştır (2, 3, 27, 33).

Aflatoksin B₁ içeren gıdalarla beslenen kişilerde karaciğer kanseri riskinin yüksek olduğu bildirilmektedir (10, 39, 72). Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda aflatoksinlerin önce karaciğere gelip burada hepatosit hücreleri tarafından diğer aflatoksinlere dönüştürüldüğü, bir kısmının idrarla atıldığı ve bir kısmının da karaciğerde hücre infiltrasyonu, hepatik nekroz, safra kanalı proliferasyonu, interstisiyel fibroz yaptığı anlaşılmıştır (11, 22, 29, 32, 53, 55, 56, 61).

Yapılan literatür taramasında aflatoksin B₁ in vücut ağırlığı artışını önemli düzeyde düşürdüğü bir çok araştırmacı tarafından bildirilmektedir (20, 21, 24, 49, 61). Ancak aflatoksin G₁'in vücut ağırlığı artışına etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya raslanılmamıştır.

Aflatoksin B₁in idrarla atılımı pek çok araştırmacı tarafından çalışılmıştır (2, 17, 23, 26, 40, 63, 68, 70, 72). Ancak yapılan literatür taramasında aflatoksin G₁'in idrarla atılımı üzerinde bir çalışmaya raslanılmamıştır.

Elimizdeki imkanlarla yaptığımız literatür taramasında aflatoksin B₁'in kan hücreleri üzerine etkisinin sadece eritrositler üzerinde çalışılmış olduğuna raslanmış ve eritrositlerin % 4 oranında azaldığı bulunmuştur (Chattopadhyay et al, 1985). Diğer kan hücreleri bakımından herhangi bir çalışmaya raslanılmamıştır. Aflatoksin G₁'in kan hücrelerine etkisi üzerine de herhangi bir çalışmaya raslanılmamıştır.

Bu nedenlerle çalışmamızda aflatoksin B₁ ve G₁'in değişik dozlarda deney hayvanlarına verip belirli zaman aralıklarında hayvanların vücut ağırlıklarını ölçerek aflatoksin B₁ ve G₁'in vücut ağırlığı üzerine olan etkisini, idrarla atılma oranlarını ve aflatoksin G₁'in lökositler üzerine etkisini araştırmak için kan yayma frotisi yapılarak nötrofil, bazofil, eozinofil, lenfosit ve monositlerin sayılması planlanmış ve insan sağlığına bu yönden yararlı olabilecek ip uçları elde edilmesi amacı güdülmüştür.

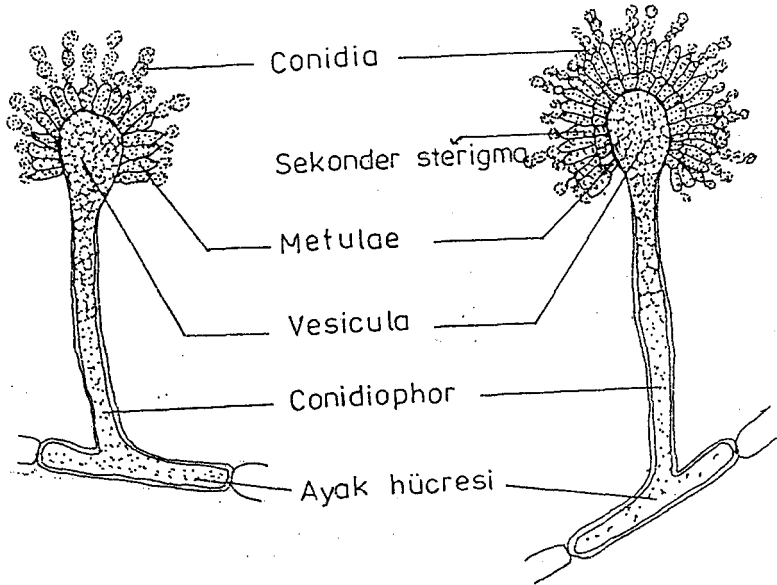
2. GENEL BİLGİLER

Aflatoksinler *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* gibi küflerin ikincil metabolit ürünleri olup onların mycel ve sporlarında bulunmaktadırlar (1, 5, 12, 38, 52).

Aflatoksinlerin *Aspergillus flavus* grubu dışında bazı küf mantarları tarafından da meydana getirildiği bildirilmekte ise de bu konudaki bilgiler çelişkilidir. Hodges ve arkadaşları *Penicillium puberulum*'un aflatoksin meydana getirdiğini bildirmişlerdir (Hodges et al, 1970). Kulik ve Holaday da yaptıkları çalışmalarla *Aspergillus niger*, *Aspergillus ruber*, *Aspergillus wentii*, *Penicillium puberulum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium frequentan*, *Penicillium variable*'nin aflatoksin B₁ meydana getirdiklerini bildirmişlerdir (Kulik and Holaday, 1967). Ancak bazı araştırmacılar 14 *Aspergillus* ve 8 *Penicillium* türünü temsil eden 166 suşun aflatoksin meydana getirme özelliğini saptamak amacıyla yaptıkları çalışmada *Aspergillus parasiticus*'un bütün suşlarının ve 26 *Aspergillus flavus* suşunun aflatoksin meydana getirmesine karşılık diğer *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin aflatoksin meydana getirmediklerini bildirmişlerdir (Parrish et al, 1966). Yine diğer bir grup araştırmacı 129 küf mantarı üzerinde yaptıkları çalışmada bunlardan sadece *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*'un aflatoksin meydana getirebildiğini diğerlerinin ise aflatoksin meydana getirmediklerini saptamıştır (Wilson et al, 1968). Baska bir grup araştırmacı da 232 farklı küf mantarı üzerinde yaptıkları çalışmada bunlardan sadece *Aspergillus flavus* küfünün aflatoksin yapma gücüne sahip olduğunu ortaya koymuşlardır (Trenk and Hartman, 1970).

Aflatoksin üretin küflerin sistematikteki yeri şöyledir (12, 16, 57, 58).

- Regnum : Plantae
 Divisio : Mycophyta
 Subdivisio : Eumycophyta
 Classis : Ascomycetes
 Subclassis : Euascomycetidae
 Seri I : Plectomycetes
 Ordo : Eurotiales
 Familia : Eurotiaceae
 Genus : Aspergillus
 Species : Aspergillus flavus (Sekil 2.1.)
 Species : Aspergillus paraticus



Şekil 2.1. Aspergillus flavus'un genel görünümü.

Aspergillus genusu dünyada çok geniş bir yayılış alanına sahiptir. Bunların sporları havada ve toprakta bol miktarda bulunur. Bu nedenle mikoloji ve bakteriyoloji laboratuvarlarında her zaman kontaminasyona sebep olmaktadır. Aspergillus türlerinin çok sayıda enzime sahip olmaları nedeniyle organik madde ve rutubet bulunan her yerde görülmeleri mümkündür. Bazı enzimler bu mantarların yardımıyla elde edilmektedir. Ayrıca bunlardan organik asitler, antibiyotikler ve alkol elde edilebilmektedir. Aspergillus türlerinin böyle faydalı faaliyetleri olmakla beraber zararlı faaliyetleri de vardır. Örneğin: Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, Aspergillus niger ve diğer bazı türler solunum yoluyla akciğerlere yerleşerek tümör benzeri kistlerle tanınan Aspergillozis hastalığına sebep olmaktadır (Baydar, 1979 ; Öner, 1971).

Aspergillus flavus'un gelişimi ve aflatoksin oluşumunda rol oynayan en önemli faktör doğal çevrenin bağıl nemidir. Aspergillus'un toksin oluşturması için % 85 ve daha yüksek bağıl neme ihtiyaç vardır. Bundan başka tanelerin nem içeriği de önemlidir. Tanelerin nem içeriği ancak % 15 -35 arasında olursa aflatoksin oluşmaktadır (Denizel, 1979 ; Detroy et al, 1971).

Küfler 0 - 60 °C arasında yaşayabilirler. Bunlardan Aspergillus flavus mezofilik bir küf olup minimum 6 - 8 °C de, optimum 36 - 38 °C de, maksimum ise 44 - 46 °C de ürer. Aflatoksin metaboliti için ise 11 - 37 °C arasındaki ısılar yeterlidir. Örneğin: pirinç tanelerinde aflatoksin B₁ ve G₁, 28 - 32 °C de oluşmaktadır. Düşük ısı derecelerinde aflatoksin B₁ ve G₁ eşit miktarlarda oluşurken yüksek ısılarda aflatoksin B₁ daha fazla meydana getirilir (Detroy et al, 1971).

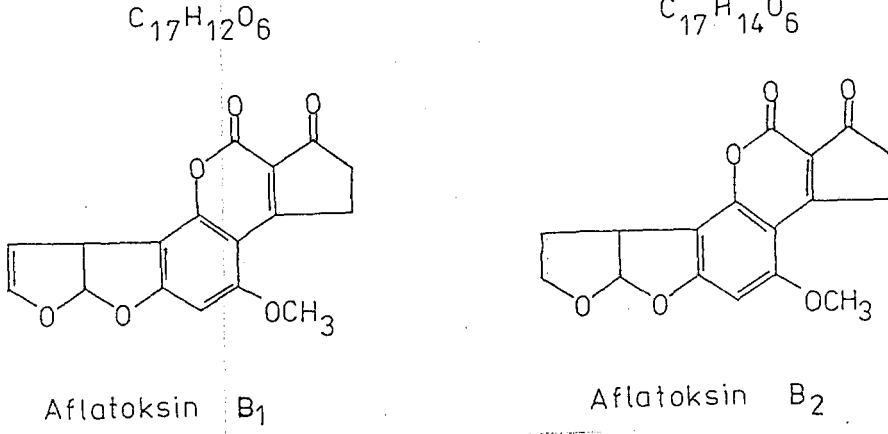
Mikotoksin üreten küfler aerobiktirler. Aspergillus flavus % 100 nitrojen veya % 100 karbondioksitli ortamda üremez, fakat sporlar canlıdır. Bunlar aerobik ortama

döndüğünde tekrar üreyebilmektedir. Karbondioksit yoğunluğunun % 0.03 den % 20 ye yükseltilmesi küf üremesini etkilememektedir. Fakat karbondioksit miktarı % 100 e yükseltildiğinde aflatoksin üretimi azalmaktadır. Oksijen miktarı % 5 den % 1 e düşürüldüğünde ise küf üremesi ve aflatoksin oluşumu oldukça azalmaktadır (Detroy et al, 1971).

1962 ve 1963 yıllarında Cambridge'de Wogan başkanlığında çalışan bir grup bilim adamı aflatoksinin kimyasal yapısını açıklamış ve kimyaca birbirine çok yakın olan dört ayrı aflatoksin komponenti olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Bunlar aflatoksine B₁, B₂, G₁, G₂ olarak adlandırılmışlardır (27, 38, 71).

Aflatoksinler kimyasal olarak fucocumarinlere dahildirler. Bu cumarin derivelerinin özellikle en önemli unsuru olan aflatoksine B₁, strüktürü bakımından doğal olarak farmakolojik aktivite gösteren bileşikler arasına girmektedir. Cumarin strüktürünün alfa, beta noktalarında doymamış olan lacton halkası, aflatoksine en aktif kısmını teşkil etmektedir. Cumarinli aflatoksinler arasında ultra viole ışınları altında floresan verme bakımından da benzerlikler vardır. Ultra viole ışınları altında mavi mor floresan verenlere B₁, B₂ ve sarı yeşil floresan verenlere de G₁, G₂ aflatoksinler denmektedir. Bu dört toksin komponentinin toksisiteleri arasında büyük farklar vardır (29, 41, 48, 69, 71).

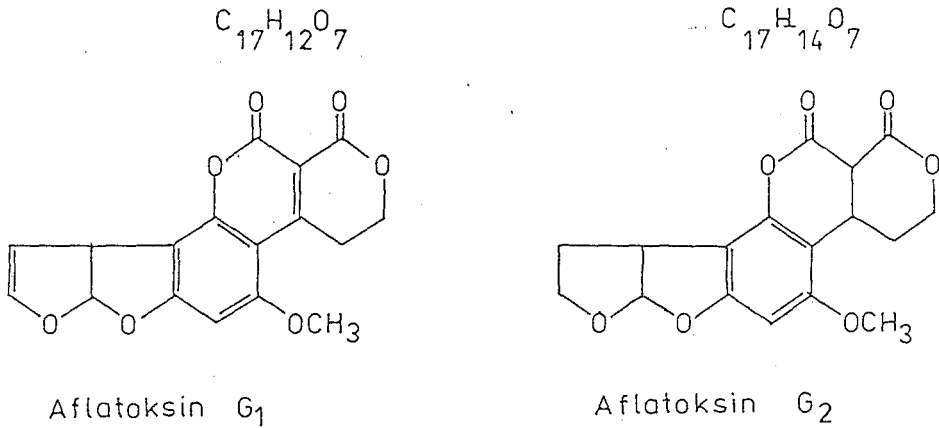
Aflatoksinlerin yapısında bulunan cumarin çekirdeğe bifuran denir. Aflatoksine B₁ ve B₂ de cumarinle sol tarafta ikişer furan halkası ve sağ üst tarafta birer cyclo - pentanon halkası bulunmaktadır (şekil 2.2.) (5, 29, 69).



Şekil 2.2. Aflatoksin B₁ ve B₂'nin açık formülleri.

Aflatoksin G₁ ve G₂'nin ortadaki cumarin çekirdeğinin sol taraflarına ikişer furan halkası ve yine sağ üst taraflarına birer lacton halkası girmektedir (Şekil 2.3.), (5, 29, 69)

Aflatoksin B₂ ve G₂, B₁ ve G₁'in dış furan halkalarındaki enol-eter bağının redükte olması ile meydana gelen dihidro bileşiklerdir (Wyllie and Morehouse, 1977).

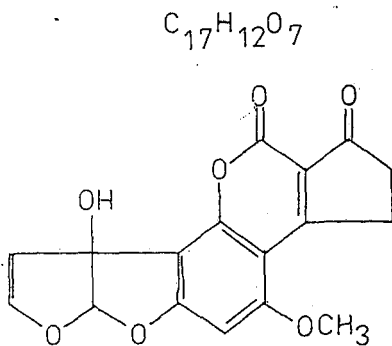


Şekil 2.3. Aflatoksin G₁ ve G₂'nin açık formülleri.

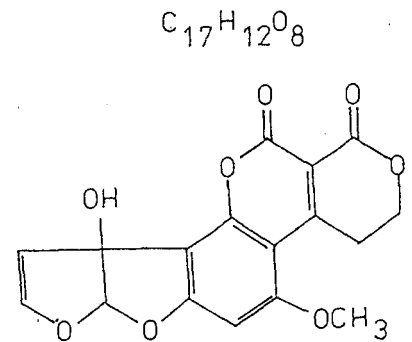
1960 yılında aflatoksinin tanımlanmasından sonra Allcroft ve Carnaghan aflatoksinli yemle beslenen sığırların sütlerinde toksik etkili bir madde olduğunu tesbit etmişlerdir (Allcroft and Carnaghan, 1963). Daha sonra bunun Rf değerinin saf aflatoksin B₁'in Rf değerinden daha düşük olduğunu saptamış ve bu bileşiğe sütte bulunduğu için "süt toksini (Milk toxin)" demişlerdir (De longh et al, 1964).

1966 yılında Allcroft ve arkadaşları aflatoksin B₁ verdikleri koyunların böbrek, karaciğer ve idrar örneklerinden elde ettikleri ekstraktlarda süt toksini ile aynı Rf değeri ve renk veren floresan lekeler görmüşlerdir. Bu lekelerin süt toksini ile aynı kromatografik özellikleri göstermesinden dolayı bu iki toksinin aynı madde olduğuna karar vermişler ve bu maddeye sütte olduğu kadar idrar, karaciğer ve böbreklerde de bulunması nedeniyle milk toxin yerine "aflatoksin M₁" adını vermişlerdir (Allcroft et al, 1966). Aflatoksin M₁, aflatoksin B₁'in hidroksi türevidir olup uzun dalga ultra viole ışık altında mavi mor floresan vermektedir (3, 19, 26, 33, 50, 69).

Aflatoksin G₁'in hidroksi türevinin analogu aflatoksin M₁ olmakla beraber buna GM₁ denilmiştir (Detroy et al, 1971). Aflatoksin M₁ ve GM₁'in açık formülleri şekil 2.4. de görülmektedir (5, 29, 69).



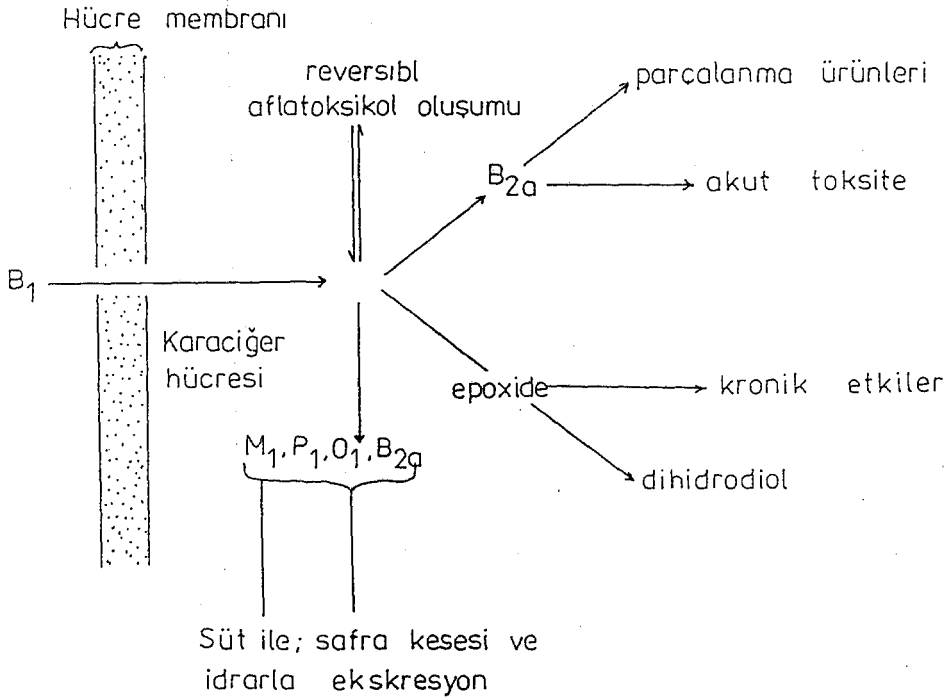
Aflatoksin M₁



Aflatoksin GM₁

Şekil 2.4. Aflatoksin M₁ ve GM₁'in açık formülleri.

Aflatoksinler canlı vücuduna çeşitli yollarla alındıktan sonra karaciğerde diğer aflatoksinlere dönüştürülmektedir. Koyun keçi, inek, sıçan, maymun, domuz ve tavuk gibi deney hayvanlarına farklı oranlarda aflatoksin içeren yemler verilerek bu hayvanlardan elde edilen süt, idrar, kan, karaciğer, böbrek ve yumurta örnekleri aflatoksin yönünden incelenmiştir. Yapılan deneyler sonunda hayvanın yemle birlikte aldığı aflatoksin B_1 , B_2 , G_1 ve G_2 'nin karaciğerde metabolize edilerek aflatoksin M_1 , M_2 , B_3 , P_1 , Q_1 gibi metabolitlere dönüştürüldüğü saptanmıştır (17, 19, 31, 33, 36, 43, 51, 56, 67, 68, 69). Ayrıca *invivo* ve *invitro* yöntemlerle sıçan ve insan karaciğerinde aflatoksin B_1 'in metabolizması incelenmiştir. Aflatoksin B_1 'in karaciğerdeki metabolizması Şekil 2.5. de görülmektedir (15, 19, 50, 69).



Şekil 2.5. Karaciğer hücresine giren aflatoksin B_1 'in metabolizması

Aflatoksinlerin moleküler formülü, fiziksel özellikleri ise aşağıdaki gibidir (5, 29, 69).

<u>Aflatoksin adı</u>	<u>Moleküler formülü</u>	<u>Moleküler ağırlığı</u>	<u>Erime noktası °C</u>	<u>Rf Değeri</u>
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269	0.56
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	0.53
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	0.48
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	0.46
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	0.34
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	0.23
GM ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₈	344	276	0.12

Aflatoksinler benzoyl peroxide, osmium tetroxide, ceric ammonium sulfate, sodyum hipochloride, potasyum permanganat ve sodyum borat gibi oksitleyici maddelerle detoxide olur ve kimyasal özelliklerini kaybederler. % 5 lik sodyum hipochloride aflatoksinleri hemen detoxide eder. Bu nedenle laboratuvarlarda aflatoksinle bulaşan malzemenin detoxikasyonu için her zaman hazır bulundurulur. Krom sülfürik asit ve kuvvetli sodyum hidroksit de aflatoksinleri tahrip eder (5, 69, 71).

Aflatoksinler su, metanol, etanol, dimethyl sülfokside ve özellikle kloroformda çözünürler. Benzen / asetonitril' de (98 / 2 : V / V) uzun süre saklanabilirler. Sulu çözeltilerde fazla saklanamazlar. Işıktan etkilenirler (5, 29, 69).

Aflatoksinlerin organizmada meydana getirdiği bozuklukların mekanizması, aflatoksin DNA'yı bağlayıp inaktif hale getirerek RNA polimeraz enzimini inhibe etmesi şeklindedir. Bu şekilde protein sentezi azalmakta ve mitoz bölünme engellenmektedir (29, 67, 69, 71). Bazı araştırmacılara göre karaciğerde mitoz bölünmeyi düzenleyen bir hormon bulunmaktadır ve aflatoksin tarafından bu hormonun biyosentez yapma yeteneği ortadan kaldırılmaktadır (41, 55, 69).

Aflatoksinlerin vücut ağırlığı artısına etkisi bazı araştırmacılar tarafından incelenmiştir. On ay süre ile aflatoksin B₁ verilen sıçanlarda vücut ağırlığı ve gonadal ağırlıkların kontrol grubuna göre önemli derecede azaldığı bildirilmektedir (Castelli et al, 1986). 18 ay aflatoksin verilen sıçanlarda da vücut ağırlığının önemli düzeyde düştüğü ve protein sentezinin azaldığı bildirilmektedir (Liewenllyn et al, 1985). Üç hafta süre ile aflatoksin B₁ verilen sıçanlarda da vücut ağırlığı artışı kontrollere göre azalmış, ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (Coulombe and Sharma, 1985). Aflatoksin B₁ ve ochratoksin A verilen diğer bir grupta da vücut ağırlığı artışının daha az olduğu bildirilmektedir (Tapia and Seawright, 1985). Tavuklarda yapılan diğer bir çalışmada da aynı şekilde aflatoksin B₁'in vücut ağırlığı artısını önemli derecede azalttığı bulunmuştur (Chattopadhyay et al, 1985).

Aflatoksinler, uzun süre gıdalarla veya solunum yoluyla düşük dozlarda alındığı zaman özellikle insanlarda kanser riskini artırmaktadır. 1963 - 1980 yılları arasında solunum yolu ile aflatoksin maruz kalan yağ fabrikası işçileri üzerinde bir araştırma yapılmış ve sonuçlar aflatoksin maruz kalmayan benzer bir grupta karşılaştırıldığında, bu periyotta toplam kanser ve akciğer kanseri ölümlerinin aflatoksin maruz kalan grupta diğer gruba göre beklenenden daha yüksek olduğu bulunmuştur (Hayes et al, 1984).

Çeşitli hayvanlarda uzun süre toksik dozun altındaki dozlarda uygulanan aflatoksinlerin mutagen özellik kazanabilecekleri, karaciğer tümörleri (hepatomlar), nekrozlar, safra kanalı hiperplazileri ve böbrek adenomları meydana getirebilecekleri ortaya konmuştur. Yine mide, akciğer, böbrek ve diğer organlarda da tümörler meydana geldiği bildirilmiştir (53, 69, 71).

Aflatoksinlerin yüksek miktarda ve tek dozda verilmesi halinde kanser oluşmamış ancak akut etki artmıştır. Bu akut toksisite karaciğer parankim hücre dejenerasyonu, safra kanalları proliferasyonu şeklinde görülmüştür (13, 29, 71). Ayrıca karaciğerdeki A vitamini miktarı da azalmaktadır (Detroy et al, 1971 ; Sing et al, 1966).

Aflatoksinli yem verilen sıçanlarda, yemdeki protein oranı azaldığında sıçanların karaciğerlerindeki patolojik bozuklukların daha çok artarak belirgin bir hale geldiği izlenmiştir (41, 54, 71).

Kan üzerine de etkili olan aflatoksinler, eritrositleri, hemoglobin konsantrasyonunu, ve eritrosit hücre hacmini % 4 oranında azaltmaktadır (Chattopadhyay et al, 1985).

Aflatoksin B₁ verilen sıçanlarda sinir dokusunda RNA konsantrasyonu ve fosfolipit baskılanırken DNA ve total protein artmıştır. Bu sonuçların, merkezi ve periferik sinir sistemindeki dejenerasyonla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Ikegwonu, 1983).

Aflatoksin verilmesinden sonra solunum fermentinin azaldığı, oksidasyon olaylarının yavaşladığı, serumdaki alkalik fosfataz transaminazın yükseldiği tesbit edilmiştir (21, 29, 60). Ayrıca aflatoksin B₁'in sıçanlarda glomerular filtrasyon hızını % 50 azalttığı buna karşılık elektrolitlerin idrarla atılımını artırdığı bildirilmektedir (Grosman et al, 1984).

Son zamanlarda aflatoksinlerin teratojen etkileri üzerine de araştırmalar yapılmıştır. 200 mikrogram aflatoksin verildiğinde sıçan fötüslerinin ve hatta hamile sıçanların kendilerinin de öldüğü, civcivlerde göz, gaga ayak felci, karaciğer ve kalp gelişiminde anomaliler olduğu görülmüştür (18, 28, 30).

Yer fıstığı ürünlerinin fazla tüketildiği Hindistan'da karaciğer sirozu görülen 16 çocukta yapılan bir araştırmada çocukların idrarında floresan spotlar bulunmuş ve bu spotların aflatoksin B₁ olduğu saptanmıştır (Yadgırı et al, 1970).

1983 - 1985 yıllarında Çin'de karaciğer kanseri insidansının yüksek olduğu bölgelerde yapılan bir araştırmada bu bölgedeki insanlarda alınan idrar örnekleri incelenmiş ve bu örneklerde aflatoksin B₁ ve M₁ saptanmıştır. Daha sonra sabah ve öğleden sonra toplanan insan idrarındaki aflatoksin M₁ konsantrasyonu ile yiyecek olarak kullanılan hububat içindeki aflatoksin B₁ konsantrasyonu arasında bir ilişkinin olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada aflatoksin B₁ alınması arttıkkça idrar içindeki aflatoksin M₁ miktarı da artmaktadır (Zhu et al, 1987).

Aflatoksinin insan sağlığını tehdit eden bir unsur olması nedeniyle, bazı ülkeler ithal edilen gıda maddeleri ve yemler için aflatoksin yönünden belirli sınırlar koymuslardır. Bu sınırların üzerinde aflatoksin içeren gıda maddeleri ve yemlerin ülkelere girişini yasaklayıp ihraç eden ülkeye gerisin geri göndermektedirler. Bu sınır Dünya Sağlık Teşkilatı tarafından 30 µg/kg olarak belirlerken Federal Almanya Hükümeti bu miktarı 10 µg/kg olarak belirlemiş ve bu miktarın üzerinde aflatoksin içeren besin maddelerini insan sağlığı açısından tehlikeli olarak nitelermiştir. Hatta sadece aflatoksin B₁ için bu miktar 5 µg/kg olduğu zaman bu besin maddelerinin satışını yasaklamıştır (9, 25, 29).

Aflatoksinlerin zararlarına ait bulgular arttıkça bu sınırlar daha da düşürülmektedir. Örneğin: Amerika Birleşik Devletleri 1965 yılında 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ olarak koyduğu sınırı 1969 yılında 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a düşürmüştür. Halen bu sınırın daha da düşürülmesi söz konusudur. Nitekim Danimarka, Hollanda ve Polonya'da gıda maddelerinde teshis edilebilir miktarda aflatoksin bulunmaması şartı konulmuştur (13, 25, 29).

Bugün hala aflatoksinlerin canlılar üzerindeki etkileri, canlılarda ne oranda atıldığı ve hangi şartlarda olduğu problemleri devam eden çeşitli araştırma ve değişik metodlarla açıklanmaya çalışılmaktadır.

3. G E R E Ç V E Y Ö N T E M

3.1. Gereç

3.1.1. Deneş hayvanları

Rattus norvegicus (Wistar albino) türü 7 adet erkek ve 8 adet dişi sıçan İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneşsel Tıp Araştırma Merkezi'nden getirilerek, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalımız Hayvan Laboratuvarında üretildi ve yeterli sayı sağlandıktan sonra deneşlere başlandı. Deneşlerde 10 aylık ve ortalama ağırlıkları 258.4 ± 3.56 g olan 38 adet erkek sıçan kullanıldı.

3.1.2. Kimyasal maddeler

- a) Chloroform (Merck)
- b) Methanol (Merck)
- c) Silica Gel 60 (Merck)
- d) Sodyum sülfat (Merck)
- e) Aseton (Merck)
- f) Diethylether (Merck)
- g) Dimethyl sülfokside (Merck)
- h) Fizyolojik tuz çözeltisi
- ı) Hidrochloric asid (Merck)
- i) Alkol (Yerli)
- j) Azot gazı
- k) Giemsa - Lösing (Merck)
- l) Sodyum hipochloride (Çamasır suyu)

3.1.3. Aygıtlar

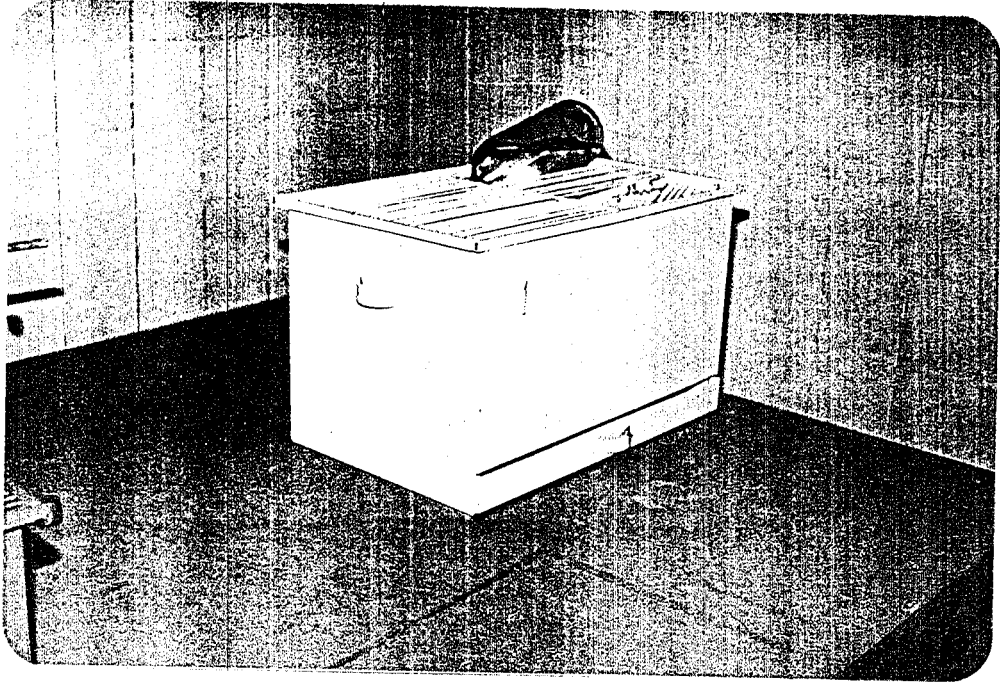
- a) Çeker ocak
- b) Etüv (Nüve EN 400)
- c) Rotary evaporatör (BJCHI-HB 140)
- d) Elektronik terazi (Mettler PE 3600)
- e) Floresan spektrofotometre (Pelkin-Elmer MPE 43 A)

- f) Yazıcı (Pelkin-Elmer Recorder 56)
- g) Ultra Viole lamba (Desega)
- h) Buzdolabı
- ı) Laboratuvar saati
- j) Hayvan operason takımı (bistüri, pens, makas vb.)
- k) Binoküler mikroskop (Carl Zeiss/ Jena)
- l) Hayvan üretme kafesleri
- m) İdrar toplama kafesleri
- n) Cam kolon (7 x 20 mm boyutlarında)
- o) Ayırma hunisi
- p) Siyah cam şişe (15 ml lik idrar toplamak için)
- r) Erlen
- s) Hazır cam plak (20 x 20 cm boyutunda 0.25 mm kalınlığında Silica Gel ile kaplanmış, Merck)
- ş) Cam yünü
- t) Vial
- u) Eldiven
- v) Lam, lamel
- y) Mezür, pipet
- z) Maske

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney hayvanlarının bakımı

Laboratuvarımızda üretilen sıçanlardan ağırlıkları birbirine yakın ve aynı yaşlarda olan erkek sıçanlar seçildi. Kafesler etiketlenerek bu hayvanlar kafeslere yerleştirildi.(Şekil 3.1.). Üretilmeleri sırasında olduğu gibi deneye alınan hayvanların da % 14 protein, % 11 selüloz, % 13 nem, % 0.8 Ca, % 0.6 P, ve A, C, D, E, K₃ ve B kompleksi vitaminlerini içeren standart kapsül fare yemi ile beslenmeleri sağlandı.



Şekil 3.1. Hayvan üretme kafesi.

3.2.2. Uygulanan doz

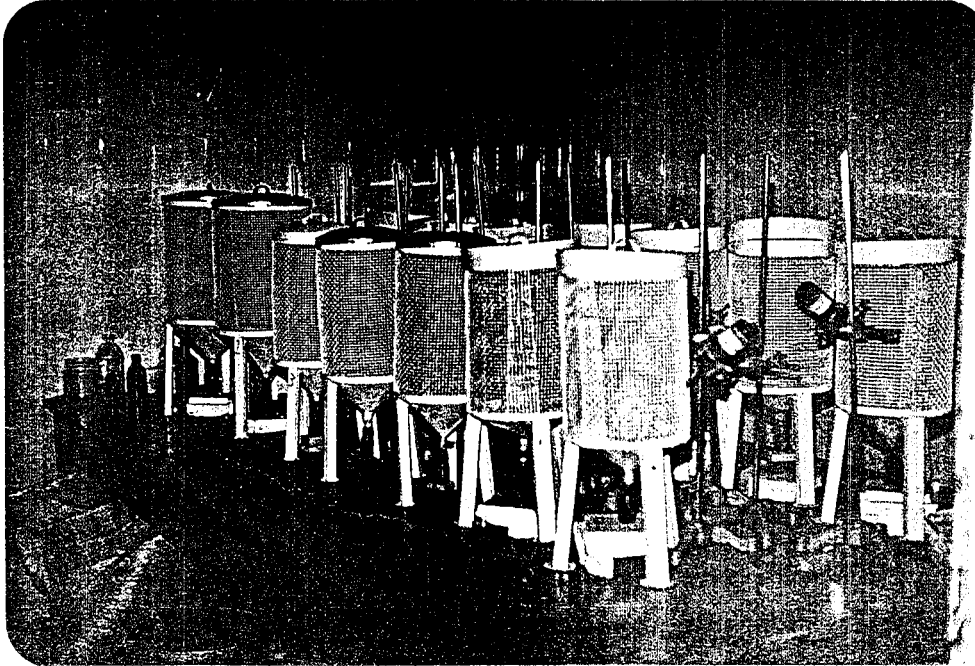
Buradan itibaren plaklara damlatma işlemine kadar olan çalışmalar çeker ocak altında ve eldiven kullanılarak yapıldı. Kullanılan tüm gereçler 24 saat çamaşır suyunda bekletildikten sonra yıkanıp kurutuldu.

Aflatoksin B₁ ve G₁ aşağıda belirtilen miktarlarda sıçanlara intraperiton^a olarak tek doz halinde enjekte edildi.

1. Doz: Aflatoksin B₁ 500 µg/kg
2. Doz: Aflatoksin B₁ 1000 µg/kg
3. Doz: Aflatoksin G₁ 500 µg/kg
44. Doz: Aflatoksin G₁ 1000 µg/kg

3.2.3. Aflatoksinlerin verilmesi

1. Sıçanlar tartılarak verilecek aflatoksin miktarı belirlendi ve sıçanlar işaretlendi.
2. Sigma şirketinin ürettiği saf aflatoksin B₁ ve G₁ 4 ml kloroformla çözündürüldü.
3. Çözünen aflatoksin standardından sıçanlara verilecek miktar kadar viale alındı.
4. Azot gazı altında kloroform uçuruldu.
5. Kalan kısma ise dimethyl sülfokside / fizyolojik tuz çözeltisi (1 / 3 : V / V) konularak bu çözelti içerisinde aflatoksinlerin çözünmesi sağlandı.
6. Sıçanların her birine 0.3 ml intraperitonal olarak tek doz halinde enjekte edildi ve hemen etiketlenen idrar toplama kafeslerine konuldu (Şekil 3.2.) (63, 64).



Şekil 3.2. İdrar toplama kafesleri

3.2.4. İdrarın toplanması ve saklanması

İdrar toplama kafeslerine teker teker yerleştirilen sıçanların idrarını toplamak için temiz küçük şişeler etiketlenerek kafeslerin altına yerleştirildi. İntraperitoneal olarak aflatoksin verilmesinden 6 saat sonra ilk, 12 saat sonra ikinci ve bundan sonra 12 saat ara ile aflatoksin verilmesinden itibaren 120. saate kadar diğer idrarlar toplandı.

Etiketlenen bu idrarlar buzlukta -15°C de analiz edilinceye kadar saklandı.

3.2.5. İdrarda ince tabaka kromatografi çalışmaları

Çalışmamızın bu bölümü belli bir sıra dahilinde birkaç aşamada tamamlandı.

3.2.5.1. İdrarların ekstraksiyonu

1. Ekstraksiyona başlamadan önce buzluktan çıkarılan idrarların oda ısısında erimesi sağlandı.

2. Eriyen idrardan 2 ml alınarak 125 ml lik ayırma hunisine aktarıldı.

3. 2 ml kloroformla iyice çalkalandı ve dinlenmeye bırakıldı. Kloroform fazının ayrılması sağlandı.

4. Alttaki kloroform fazı bir balonda toplandı.

5. Aynı işlem iki defa daha tekrar edilerek kloroform fazları aynı balonda toplandı.

6. Kalan sulu kısım aynı miktarda 0.2 N HCl ile karıştırıldı ve ağzı sıkıca kapatıldı.

7. Daha önce etüv 90°C ye yükseltildi. Bu karışım 90°C de iki saat hidroliz edildi (34, 35, 63, 64).

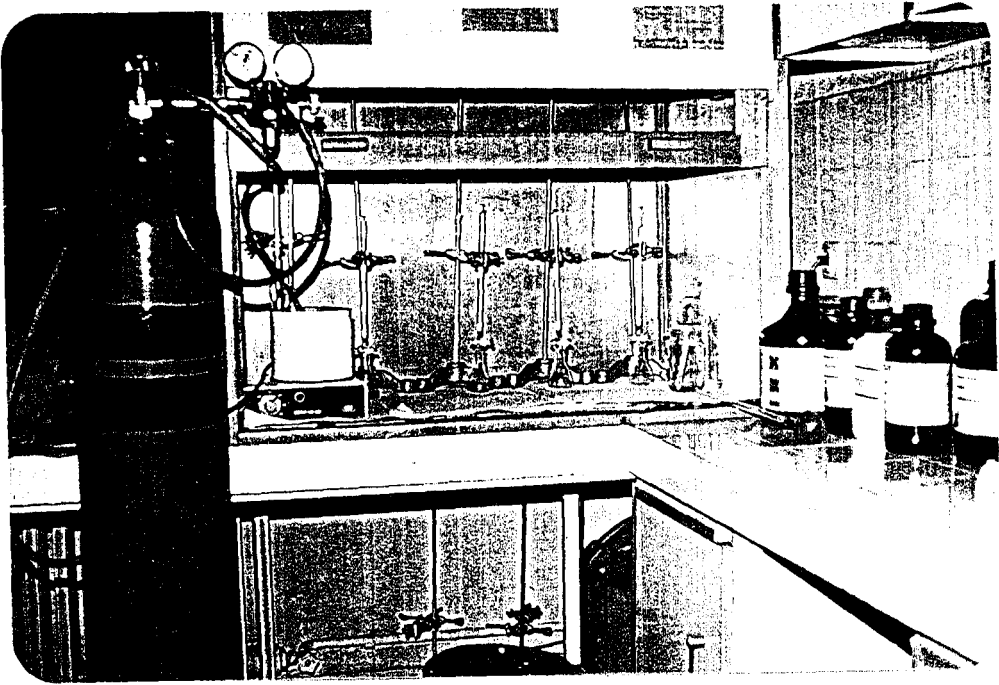
8. Hidroliz edilen idrar tekrar kloroformla üç defa ekstre edilerek kloroform fazları aynı balonda toplandı.

9. Toplanan bütün ekstraktlar 65°C de azot gazı altında rotary evaporator da kuruluğa kadar uçuruldu.

10. Bu kuru ekstrakt 2 ml kloroformla çözündürülerek kolondan geçirildi.

3.2.5.2. Kolonun hazırlanması ve ekstraktın kolondan geçirilmesi.

1. İdrar miktarları az olduğu için Anonymous (1980) deki kolon hazırlamak için gerekli olan kimyasal maddelerin miktarları beşte bir oranında düşürülerek Gregory ve Manley (1981) in kullandıkları cam kolonlar kullanıldı (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Cam kolonlar

2. Kolonun dibine cam yünü yerleştirildi.
3. Kolon yarıya kadar kloroformla dolduruldu.
4. 1 g sodyum sülfat yavaş yavaş kolona döküldü ve bunun dibine çökmesi beklendi.

5. 105 °C lik etüvde 1 saat aktive edilip soğuduktan sonra 100 g / 1 ml olacak şekilde distile su ile iyice karıştırılıp kullanılmadan önce 1 gece karanlıkta bekletilen aktifleştirilmiş Silica Gel 60 (6, 45, 53) den 2 g alınarak yavaş yavaş kolona döküldü.

6. Silica Gel'in kolonun dibine çökmesi beklendi. Kolonda hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi.

7. Çökme işlemleri durduktan sonra kolona yavaş yavaş susuz 3 g sodyum sülfat ilave edildi. Bu işlem sırasında Silica Gel ile sodyum sülfatın birbirine karışmasına dikkat edildi.

8. Kolondaki kloroform, sodyum sülfat tabakasının üst kısmına kadar akıtıldı.

9. Kuru ekstrakt 2 ml kloroformla çözündürüldü ve kolona dikkatlice döküldü.

10. Aynı işlem iki defa daha yapıldı ve kolona döküldü.

11. Kolona dökülen kloroform sodyum sülfatın üst kısmına kadar akıtıldı ve bu atıldı.

12. Kolondaki aflatoksinleri elue etmek için 15 ml Kloroform/ Metanol (97 / 3): V / V) karışımı döküldü.

13. Kolonun altına bir erlen konularak aflatoksinler elue edildi.

14. Elue edilen aflatoksinler 65 °C de azot gazı altında rotary evaporatorda kuruluğa kadar uçuruldu.

15. Erlen 1 ml kloroform ile yıkanarak aflatoksinler viale alındı.

16. Vialdeki ekstrakt 65 °C de sıcak su banyosunda ve azot gazı altında kuruluğa kadar uçuruldu.

17. Cam plaklara damlatılınca kadar karanlıkta buzlukta -15 °C de saklandı.

3.2.5.3. Ekstraktın damlatılması ve solventte yürütülmesi

1. Hazır cam plaklar kullanılmadan önce etüvde 105 °C de 1 saat aktive edildi ve soğutuldu.

2. Buzluktan çıkarılan ekstrakt 1 ml kloroformla çözündürüldü.

3. Plakın üst kenarından 4 cm ve yan kenarlarından 0.5 cm içeriden birer düz çizgi çizildi.

4. Plağın alt kenarından 2 cm içeriden 1.5 cm aralıklarla 5, 10, 15 µl örnekten damlatıldı. Spotların çaplarınının 0.5 cm yi geçmemesine dikkat edildi.

5. Aynı plağın her iki kenarına ve orta kısmına 5 µl aflatoksin standart karışımından damlatıldı.

6. Örnek ekstraktların uygulandığı plak, içinde Kloroform / Aseton (9 / 1 : V / V) bulunan tanka yerleştirildi (5, 6, 43, 63, 64).

7. Solventin plakta yürümesi için 45 dakika beklenildi.

8. Yürütme işlemi bittikten sonra plak çeker ocakta kurutuldu.

9. Kuruyan plak karanlık odada 365 nm dalga boyundaki ultra viole ışıpta örnekte bulunan aflatoksin spotları, standart aflatoksin spotları ile karşılaştırılarak örnekteki aflatoksin spotlarınının etrafı toplu iğne ile işaretlendi.

3.2.5.4. Plakların okunması ve aflatoksin miktarının hesaplanması

Plakların okunması Tarım Orman ve Köyisleri Bakanlığı Ankara İl Kontrol Müdürlüğü Aflatoksin laboratuvarında Floresan spektrofotometre ile yapılmıştır.

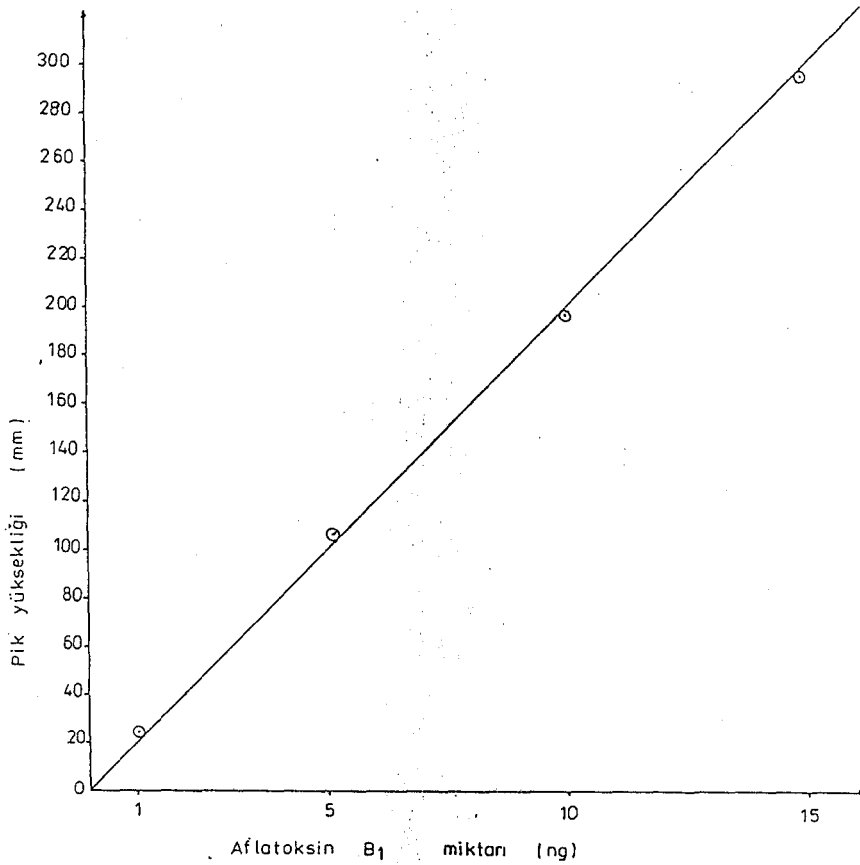
1. Aflatoksin standartları 1, 5, 10, 15 µl örnek ekstraktların damlatıldığı şekilde damlatıldı ve aynı solventte yürütüldü.

2. Plaklar çeker ocakta kurduktan sonra kalibrasyon eğrisi için floresan spektrofotometrede 365 nm dalga boyunda okunarak pikler çizdirildi. Bu piklerin yükseklikleri ölçülerek kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 3.4., 3.5., 3.6.).

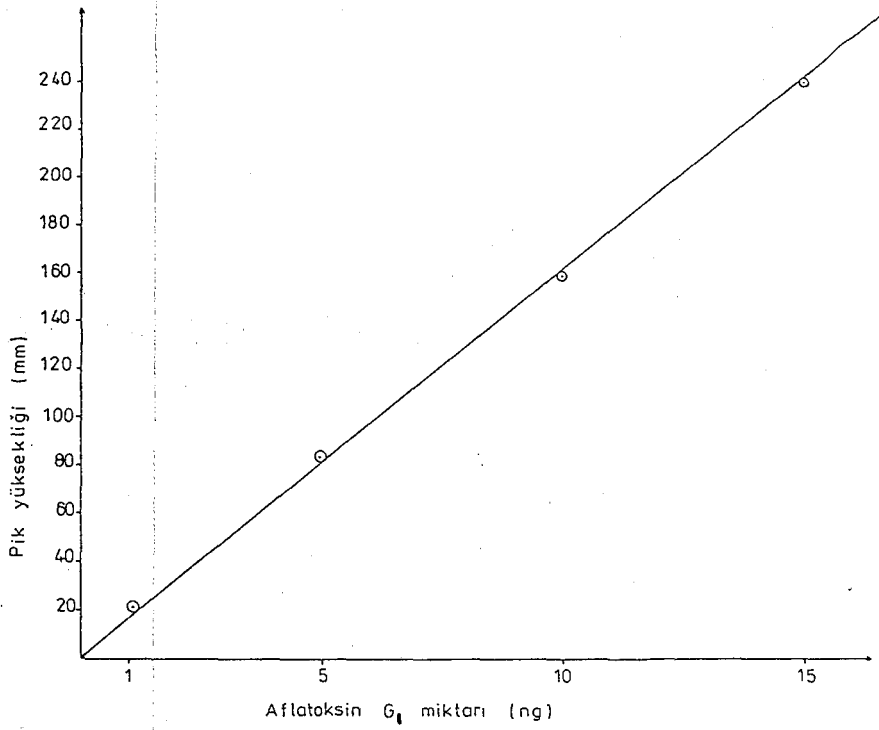
3. Daha sonra örneklerin damlatıldığı plaklar hemen okunarak pikler çizdirildi.

4. Çizdirilen bu pikler kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılarak damlatılan örnek içindeki aflatoksin miktarı bulundu.

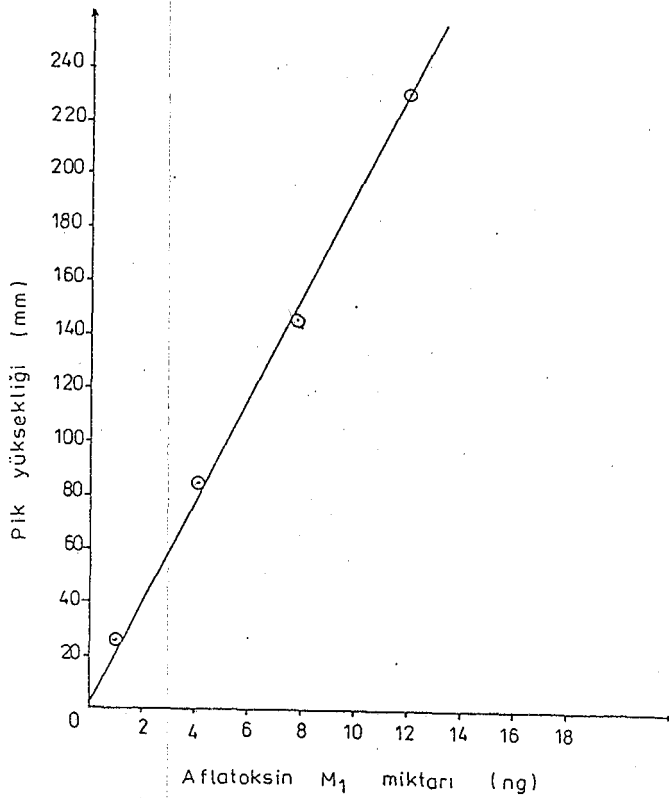
5. İdrarla atılan tüm aflatoksin miktarı ise , damlatılan örnek içindeki aflatoksin miktarı, kolondan geçen ekstrakt içindeki aflatoksin miktarı ve idrar miktarı arasında orantı kurularak hesaplandı.



Şekil 3.4. Aflatoksin B₁ için kalibrasyon eğrisi.



Şekil 3.5. Aflatoksin G₁ için kalibrasyon eğrisi.



Şekil 3.6. Aflatoksin M₁ için kalibrasyon eğrisi.

3.2.6. Kan yayma frotisi çalışmaları

Aflatoksin verildikten sonra 6. saatte ve 30. günde deney ve kontrol grubu sıçanların kuyruklarından alınan bir damla kan ile yayma preparatlar yapıldı. Giemsa ile boyandı. Nötrofil, bazofil, eozinofil, lenfosit ve monoleri sayıldı. Preparatlar şu işleme göre hazırlandı (Konuk, 1975).

1. Lamlar bir gece alkol /eter (5 / 5 : V / V) karışımında bekletilerek temizlenmeleri sağlandı.
2. Bu karışımdan çıkarılan lamlar temizlendi, kurulandı.
3. Lam üzerine bir damla kan damlatıldı.
4. Diğer bir lam ile kan damlasının bir kenarına değdirilerek 45 °lik bir açıyla bir defada düzgünce çekildi.
5. Lamlar, boyama tepsisine yerleştirildi ve 5 dakika oda ısısında kurutuldu.
6. Üzerine metanol konularak 5 dakika tesbit işlemi yapıldı.
7. Distile su ile yıkandı.
8. Giemsa stok solusyondan 50 ml alınıp 50 ml distile su ile karıştırıldı. Bu boyadan lam üzerine döküldü ve 30 dakika beklendi.
9. Çeşme suyu ile yıkanan preparatlar oda ısısında kurutuldu.
10. 40 ve 100 lük objektifle mikroskopi yapıldı.
11. Sayılan kan hücrelerinin yüzde değerleri hesaplandı. Bulunan değerler istatistiksel olarak iki yönlü varyans analizi ve Student t-testi ile değerlendirildi.

4. B U L G U L A R

4.1. Vücut Ağırlıkları

Gereç ve yöntemler bölümünde belirtildiği gibi kontrol ve deney grubunun vücut ağırlıkları Çizelge 4.1. de görülmektedir.

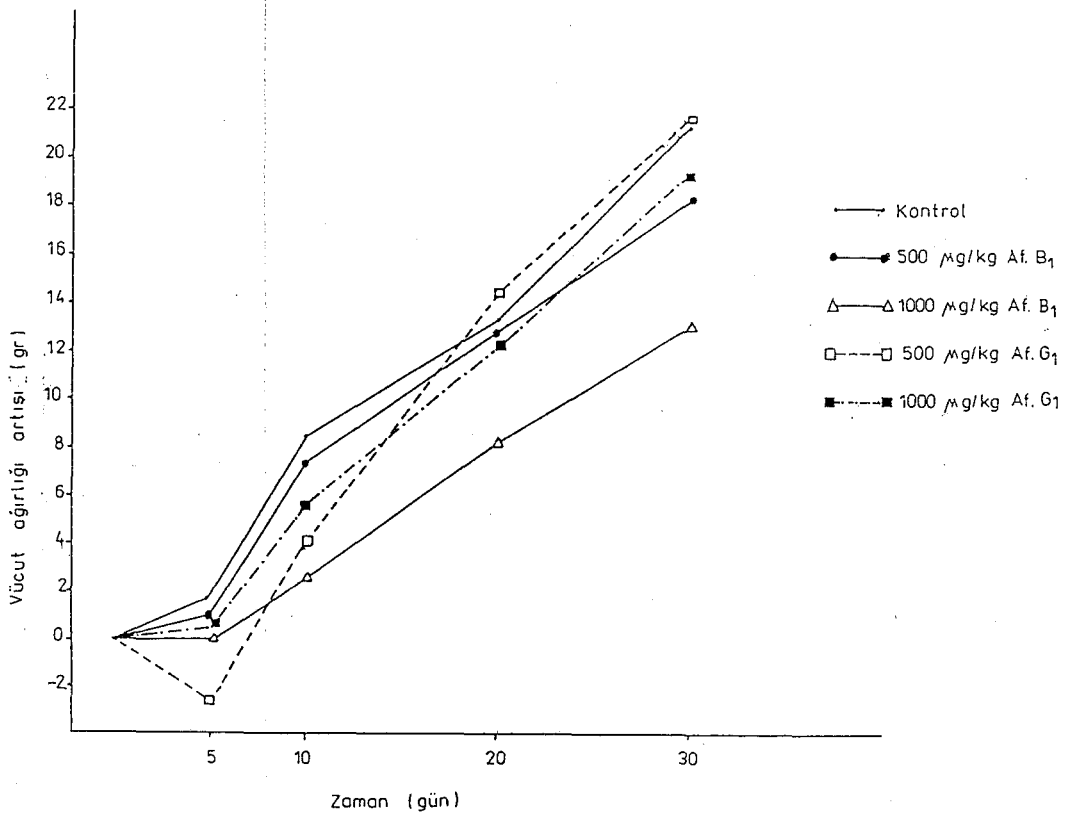
Çizelge 4.1. Kontrol ve deney grubu sıçanların vücut ağırlıkları (g).

	n	İlk günkü ağırlığı	5 gün son-raki ağır.	10 gün son-raki ağır.	20 gün son-raki ağır.	30 gün son-raki ağır.	30 gün son-raki % artış
Kontrol grubu	8	250.75±7.93	252.5±7.22	259.0±7.44	263.87±7.71	272.0±7.68	8.5
500 mg/kg Af.B ₁	8	259.25±3.12	260.25±3.31	266.63±3.11	272.13±2.92	277.75±3.46	7.14
1000 mg/kg Af.B ₁	7	233.14±3.14	233.0±4.31	235.57±4.23	241.28±4.47	246.28±4.56	5.63
500 mg/kg Af.G ₁	8	274.75±8.12	271.88±8.00	278.75±8.38	289.38±8.23	296.62±7.23	7.95
1000 mg/kg Af.G ₁	7	271.29±4.29	272.0±3.89	277.15±4.11	283.71±4.5	290.43±3.7	7.05

500 µg/kg aflatoksin B₁ uyguladığımız gün sıçanların ortalama ağırlığı 259.25 ± 3.12 g iken 5. günde bu ağırlık 260.25 ± 3.31 g, 10. günde 266.63 ± 3.11 g, 20. günde 272.13 ± 2.92 g ve 30. günde ise 277.75 ± 3.46 g'a yükselmiştir. İlk güne göre 30. günün sonunda ağırlık artışı toplam 18.5 g dır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında vücut ağırlığı artışının deney grubunda daha az olduğu (kontrol % 8.5, deney grubu % 7.14) fakat istatistiksel açıdan anlamsız olduğu görülmüştür (P > 0.05).

1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoksin B₁ uyguladığımız grupta ortalama vücut ağırlıkları ilk gün 233.14 ± 3.14 g iken 5. günde 233 ± 4.31 g, 10. günde 235.57 ± 4.23 g, 20. günde 241.28 ± 4.45 g ve 30. günde ise 246.28 ± 4.56 g bulundu. İlk güne göre 30. günün sonunda vücut ağırlığı artışı ortalama 13.14 g olmuştur.

Şekil 4.1. de görüldüğü gibi 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoksin B₁ uygulanan grupta vücut ağırlığı artışı kontrole göre deney başlangıcında önemli bir fark bulunamamıştır. Ancak 5. günden sonraki günlerde kontrole göre anlamlı bulundu ($P < 0.05$).



Şekil 4.1. Kontrol ve deney gruplarında vücut ağırlığı artışları.

500 µg/kg aflatoksin G₁ uygulanan grupta vücut ağırlığı ortalamaları ilk gün 274.75±8.12 g iken 5. günde 271.88±8.0 g, 10. günde 278.75±8.38 g, 20. günde 289.38±8.23 g ve 30 günde ise 296.62±7.23 g dır. Ortalama olarak vücut ağırlığı artışı 21.87 g bulundu ve bu artış kontrole göre istatistiksel olarak anlamsızdır (P>0.05).

1000 µg/kg aflatoksin G₁ uygulanan grupta ortalama vücut ağırlığı ilk gün 271.29±4.29 g iken 5.günde 272±3.89 g, 10. günde 277.15±4.11 g, 20. günde 283.71±4.5 g ve 30. günde ise 290.43±3.7 g dır. Bu grupta ortalama vücut ağırlığı artışı 19.14 g bulundu ve kontrole göre 5. ve 20. günlerde anlamlı (P<0.05) iken 10. ve 30. günlerde ise anlamsızdır (P>0.05).

Kontrol grubunda ise vücut ağırlığı ortalama ilk gün 250.75±7.93 g iken 5. günde 252.5±7.22 g, 10. günde 259±7.44 g, 20. günde 263.87±7.71 g ve 30. günde ise 272±7.68 g olmuş ve toplam 21.25 g artış göstermiştir. Kontrol grubunda deney gruplarına göre daha fazla vücut ağırlığı artışı görüldü.

Ayrıca vücut ağırlıkları Çizel 4.2. de görüldüğü gibi kontrol grubunda ilk beş gün içinde 1.75 g artarken 5-10 gün arası 6.5 g, 10-20 gün arası 4.87 g ve 20-30 gün arası ise 8.13 g artmıştır. 30 gün içinde toplam 21.25 g artış göstermiştir. Bu miktar % 8.5 dur.

500 µg/kg aflatoksin B₁ verilen grupta ilk bes gün içinde vücut ağırlığında 1 g artış olurken 5-10 gün arası 6.38 g, 10-20 gün arası 5.5 g ve 20-30 gün arası ise 5.62 g ve 30 gün içinde toplam 18.5 g artış oldu. Bu artış % 7.14 dür.

1000 µg/kg aflatoksin B₁ verilen grupta ilk bes gün içinde vücut ağırlığı 0.14 g azalırken 5-10 gün arasında 2.57 g, 10-20 gün arası 5.71 g ve 20-30 gün arası ise 5 g artmış ve toplam 13.14 g artış görüldü. Bu artış % 5.63 dür.

Çizelge 4.2. Kontrol ve deney gruplarının vücut ağırlığı artışları

	1-5 gün arası (g)	5-10 gün arası (g)	10-20 gün arası (g)	20-30 gün arası (g)	Toplam (g)	30 günde % artış
Kontrol Grubu	1.75	6.5	4.87	8.13	21.25	8.5
500 µg/kg Af.B ₁ Deney Grubu	1.00	6.38	5.5	5.62	18.53	7.14
1000 µg/kg Af.B ₁ Deney Grubu	-0.14	2.57	5.71	5.00	13.14	5.63
500 µg/kg Af.G ₁ Deney Grubu	-2.87	6.87	10.63	7.24	21.87	7.95
1000 µg/kg Af.G ₁ Deney Grubu	0.71	5.15	6.56	6.72	19.14	7.05

500 µg/kg aflatoksin G₁ verilen grupta ilk beş gün içinde vücut ağırlığı 2.87 g azalırken 5-10 gün arası 6.87 g, 10-20 gün arası 10.63 g ve 20-30 gün arası ise 7.24 g artmıştır. 30 gün içinde toplam 21.87 g artış gösterdi ve bu artış % 7.95 dir.

1000 µg/kg aflatoksin G₁ verilen grupta ise ilk beş gün içinde vücut ağırlığı 0.71 g artarken 5-10 gün arası 5.15 g, 10-20 gün arası 6.56 g ve 20-30 gün arası ise 6.72 g artmıştır. 30 gün içinde toplam 19.14 g artış olmuştur ve bu artış % 7.05 dir.

4.2. İdrarla Atılan Aflatoksin Miktarları

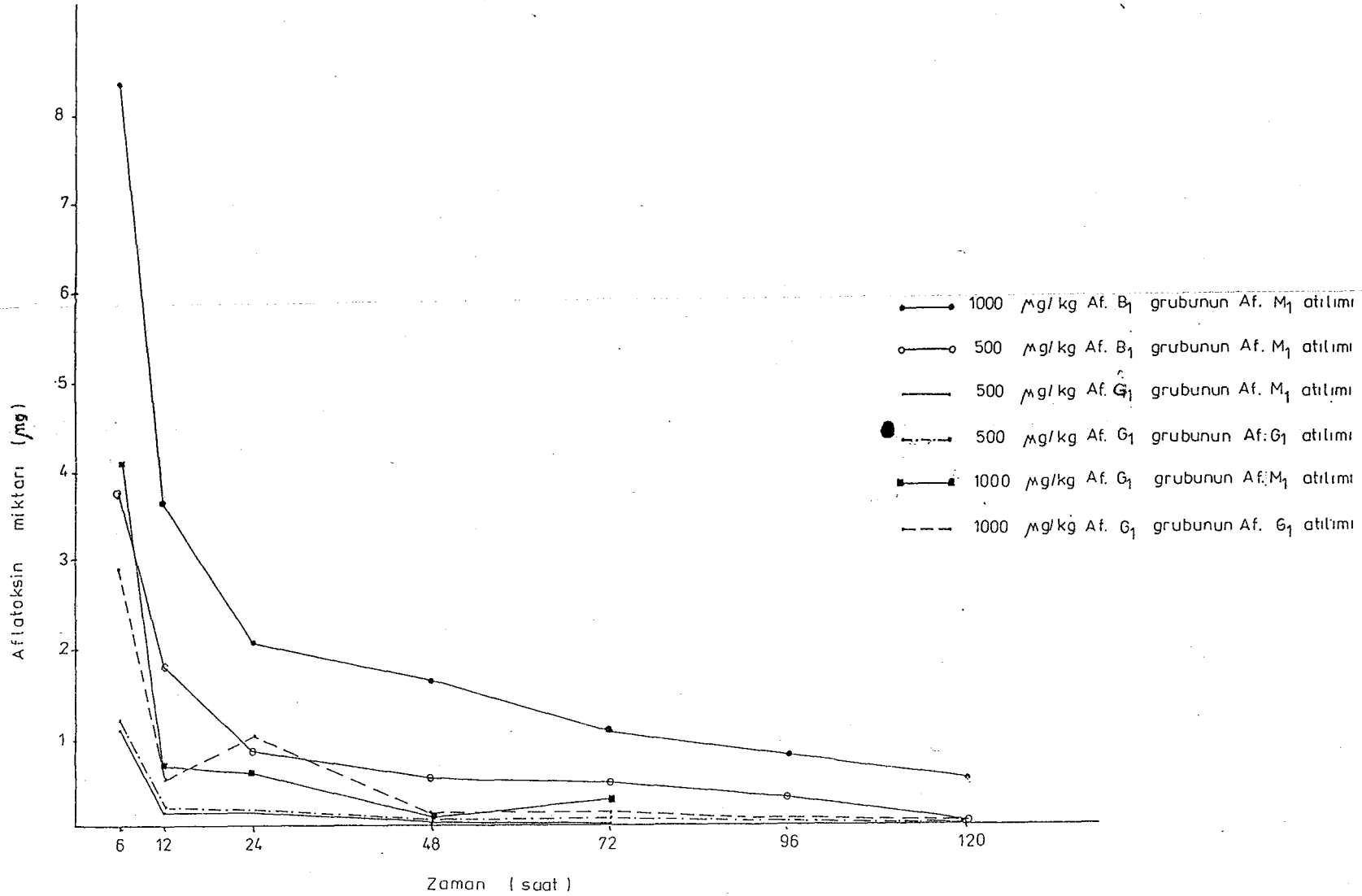
Gereç ve yöntemler bölümünde belirtildiği gibi deney grubunda idrarla atılan aflatoksin miktarları Çizelge 4.3. de görülmektedir.

Intraperiton^a olarak 500 µg/kg aflatoksin B₁ verildikten 6 saat sonra idrarla atılan aflatoksin M₁ atılımı 3.84 ± 0.3 µg iken 12 saat sonra 1.28 ± 0.27 µg, 24 saat sonra 0.85 ± 0.16 µg, 48 saat sonra 0.57 ± 0.13 µg, 72 saat sonra 0.53 ± 0.13 µg, 96 saat sonra 0.28 ± 0.06 µg ve 120 saat sonra ise 0.04 ± 0.01 µg dır.

Çizelge 4.3. İdrarla atılan aflatoksin miktarları (µg).

	n (8)	6 saat sonra	12 saat sonra	24 saat sonra	48 saat sonra	72 saat sonra	96 saat sonra	120 saat sonra	Toplam	Atıl. Afla- tok- sin % si
500 ug/kg Af. B ₁ deney grubu	M ₁	3.84±0.34	1.28±0.27	0.85±0.16	0.57±0.13	0.53±0.13	0.28±0.06	0.04±0.01	7.39	5.72
1000 ug/kg Af. B ₁ deney grubu	M ₁	6.34±0.64	3.6±0.63	2.04±0.42	1.69±0.3	1.06±0.1	0.69±0.16	0.62±0.15	18.24	7.83
500 ug/kg Af. G ₁ deney grubu	G ₁	1.08±0.2	0.21±0.02	0.2±0.03	0.06±0.02	0.08±0.03	0.04±0.01	0.01±	1.68	1.22
	M ₁	1.03±0.21	0.17±0.04	0.19±0.05	0.16±0.05	0.03±0.01	-	-	1.58	1.15
1000 ug/kg Af. G ₁ deney grubu	G ₁	2.96±0.54	0.61±0.21	1.09±0.42	0.16±0.05	0.24±0.07	0.06±0.01	0.02±0.01	5.14	1.90
	M ₁	4.1±0.6	0.63±0.16	0.64±0.19	0.22±0.04	0.37±0.13	-	-	5.96	2.20

Sekil 4.2. de görüldüğü gibi en çok 6 saat sonra aflatoksin M₁ atıldı. Daha sonra aflatoksin M₁ atılımı git-tikçe azaldı. 120 saat sonra toplam 7.39 µg aflatoksin M₁ atıldı. Bu miktar verilen dozun % 5.72 si kadardır. Aflatoksin atılımı saatler arasında önemli decede farklı bulundu ($F < 0.001$).



Şekil 4.2. İdrarla atılan aflatoksin miktarları

1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoksin B_1 verilen grupta 6 saat sonra aflatoksin M_1 miktarı $8.34 \pm 0.64 \mu\text{g}$ iken 12 saat sonra $3.6 \pm 0.3 \mu\text{g}$, 24 saat sonra $2.04 \pm 0.42 \mu\text{g}$, 48 saat sonra $1.69 \pm 0.3 \mu\text{g}$, 72 saat sonra $1.06 \pm 0.1 \mu\text{g}$, 96 saat sonra $0.89 \pm 0.6 \mu\text{g}$ ve 120 saat sonra ise $0.62 \pm 0.15 \mu\text{g}$ dir. Aflatoksin M_1 atılımı ilk saatlerde çok fazla iken daha sonraları bu miktar gittikçe azaldı. Dozun verilmesinden sonraki 120 saat içerisinde toplam $18.24 \mu\text{g}$ aflatoksin M_1 atıldı. Bu miktar verilen dozun % 7.83 ünü oluşturur. Aflatoksin M_1 atılımı saatler arasında anlamlı şekilde farklı bulundu ($P < 0.001$).

Aflatoksin B_1 verilen gruplarda çok az miktarda aflatoksin B_1 atılmıştır. Ancak bu miktarlar çok az olduğu için ölçülememiştir.

Aflatoksin G_1 verilen gruplarda aflatoksin M_1 in yanında hemen hemen aynı oranda aflatoksin G_1 de atılmıştır.

Intraperiton olarak 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoksin G_1 verildikten 6 saat sonra $1.08 \pm 0.2 \mu\text{g}$ aflatoksin G_1 ve $1.03 \pm 0.21 \mu\text{g}$ aflatoksin M_1 atılırken 12 saat sonra $0.21 \pm 0.02 \mu\text{g}$ G_1 , $0.17 \pm 0.04 \mu\text{g}$ M_1 , 24 saat sonra $0.2 \pm 0.03 \mu\text{g}$ G_1 , $0.19 \pm 0.05 \mu\text{g}$ M_1 , 48 saat sonra $0.06 \pm 0.02 \mu\text{g}$ G_1 , $0.16 \pm 0.05 \mu\text{g}$ M_1 , 72 saat sonra $0.08 \pm 0.03 \mu\text{g}$ G_1 , $0.03 \pm 0.01 \mu\text{g}$ M_1 atılmıştır. 72 saat sonra aflatoksin M_1 atılımı durdu. 96 saat sonra $0.06 \pm 0.01 \mu\text{g}$ G_1 ve 120 saat sonra ise $0.01 \pm 0.01 \mu\text{g}$ G_1 atıldı.

Aflatoksinlerin atılımı 6 saatin sonunda en yüksek düzeye ulaştı ve daha sonraki saatlerde gittikçe azaldı. 120 saat sonra ise in düşük seviyeye indi. 120 saat sonra toplam $1.68 \mu\text{g}$ aflatoksin G_1 ve $1.58 \mu\text{g}$ aflatoksin M_1 atıldı. Bu miktarlar verilen dozun % 2.37 sini oluşturmaktadır. Saatler arasında aflatoksin atılımı anlamlı şekilde farklı bulundu. ($P < 0.001$).

1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoksin G_1 verilen grupta ise idrarla 6 saat sonra $2.92 \pm 0.54 \mu\text{g}$ aflatoksin G_1 ve $4.1 \pm 0.6 \mu\text{g}$ aflatoksin M_1 atılırken 12 saat sonra $0.61 \pm 0.21 \mu\text{g}$ G_1 ,

0.63±0.16 µg M₁, 24 saat sonra 1.09±0.2 µg G₁, 0.64±0.18 µg M₁, 48 saat sonra 0.16±0.05 µg G₁, 0.22±0.04 µg M₁, 72 saat sonra ise 0.24±0.07 µg G₁ ve 0.37±0.13 µg M₁ atıldı. 96 saat sonra 0.06±0.01 µg G₁ ve 120 saat sonra 0.02±0.01 µg G₁ atıldı. yine bu grupta da 72 saat sonra M₁ atılımı durdu. Aflatoksin atılımı diğer gruplarda olduğu gibi en fazla 6 saat sonra oldu ve daha sonraki saatlerde gittikçe azaldı. Bu grupta 120 saat sonra 5.15 µg aflatoksin G₁ ve 5.96 µg aflatoksin M₁ atıldı ve bu miktar verilen dozun % 4.10 nu oluşturmaktadır. İdrarla aflatoksin atılımı bu grupta da saatler arasında anlamlı şekilde farklı bulundu (P<0.001).

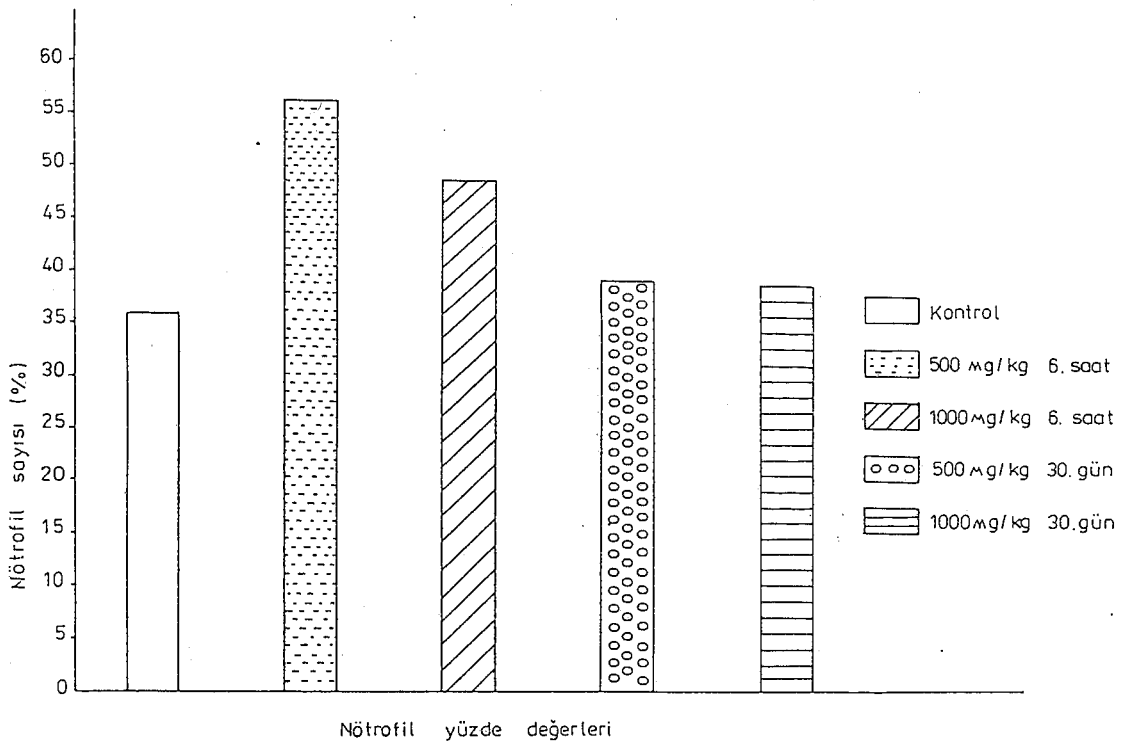
4.3. Lökosit Sayılarına Ait Bulgular

Gereç ve yöntemler bölümünde belirtildiği gibi kontrol ve deney grubuna ait lökosit yüzde değerleri Çizelge 4.4. de görülmektedir.

Çizelge 4.4. Kontrol ve Aflatoksin G₁ verilen deney gruplarında ortalama lökosit yüzde (%) değerleri.

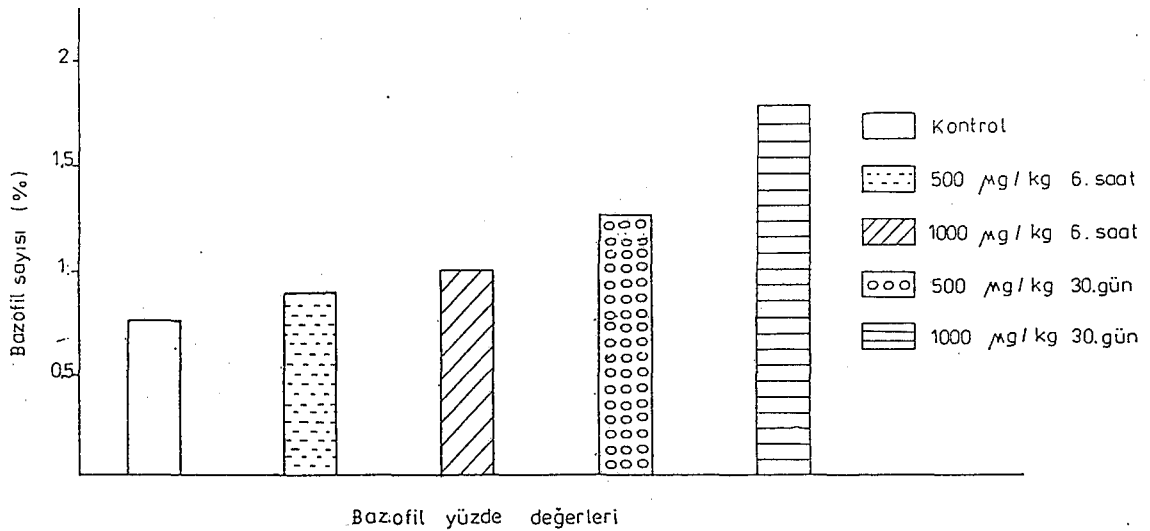
	n	Nötrofil %	Bazofil %	Eozinofil %	Lenfosit %	Monosit %
Kontrol grubu	7	36.14±1.61	0.74±0.09	3.43±0.48	53.97±2.41	5.72±0.77
500 ug/kg Af.G ₁ grubunun 6 saatteki değerleri	7	56.14±1.45	0.87±0.34	3.86±0.51	35.42±1.23	3.71±0.34
1000 ug/kg Af.G ₁ grubunun 6. saatteki değerleri	7	47.86±2.28	1.00±0.31	4.31±0.31	43.97±2.04	2.86±0.4
500 ug/kg Af.G ₁ grubunun 30. gün deki değerleri	7	38.6±2.54	1.25±1.08	4.86±0.4	49.19±2.04	6.10±0.61
1000 ug/kg Af.G ₁ grubunun 30. gün deki değerleri	7	37.74±1.35	1.52±0.92	5.02±0.43	50.24±1.91	5.48±0.65

Nötrofil sayısı kontrol grubunda % 36.14 iken 500 µg/kg aflatoksin G₁ verilen grupta aflatoksin verildikten 6 saat sonra % 56.14 ve 1000 µg/kg aflatoksin G₁ verilen grupta % 47.86 olarak bulundu. Aflatoksin verildikten 30 gün sonra ise nötrofil yüzdesi 500 µg/kg aflatoksin G₁ verilen grupta % 38.6 iken 1000 µg/kg aflatoksin G₁ verilen grupta % 37.74 olarak bulundu (Şekil 4.3.). 6 saat sonraki nötrofil değerleri her iki grupta kontrole göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($P < 0.001$). 30 gün sonra ise her iki grupta anlamsız bulundu ($P > 0.05$), (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Kontrol ve aflatoksin G₁ verilen gruplarda nötrofil yüzde değerleri.

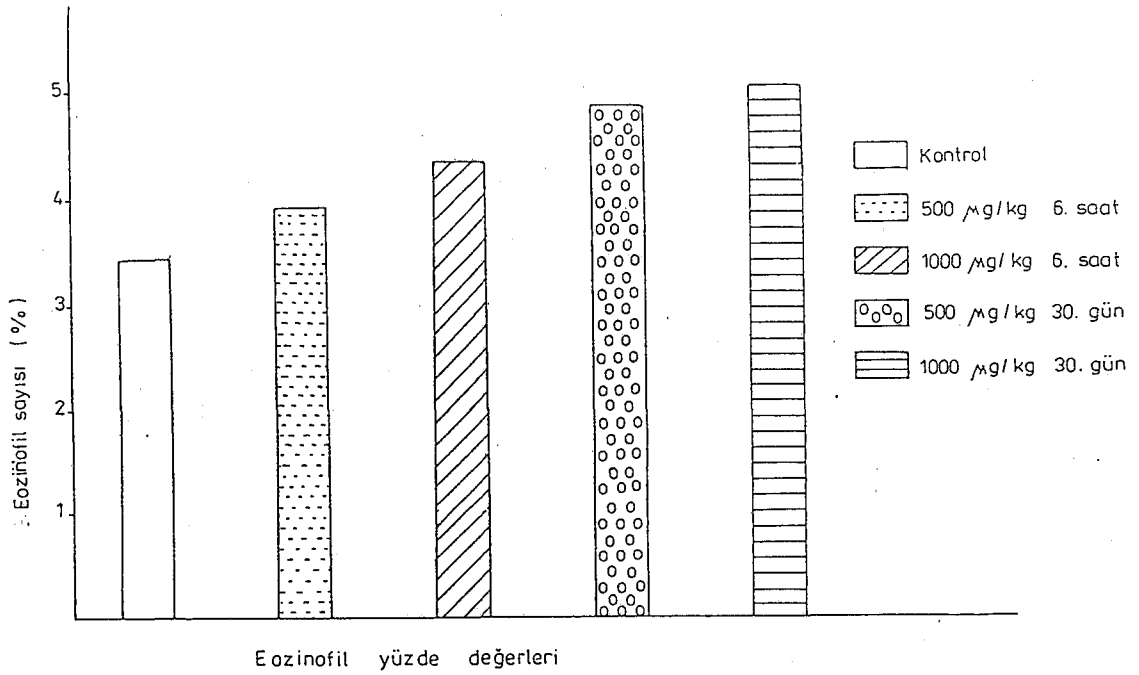
Bazofil yüzde değerleri kontrol grubunda % 0.74 iken 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoksin G_1 verilen grupta aflatoksin verildikten 6 saat sonra % 0.87 ve 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoksin G_1 verilen grupta ise % 1 bulundu. 30 gün sonra ise 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoksin G_1 verilen grupta % 1.25 ve 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoksin verilen grupta % 1.52 olarak bulundu. Aflatoksin verildikten 6 saat sonra bazofil değerleri kontrole göre her iki grupta da yüksek bulundu. Ancak istatistiksel açıdan anlamsızdır ($P > 0.05$). 30 gün sonraki bazofil değerleri kontrole göre her iki grupta da anlamlı şekilde yüksek bulundu ($P < 0.05$), (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Kontrol ve aflatoksin G_1 verilen gruplarda bazofil yüzde değerleri

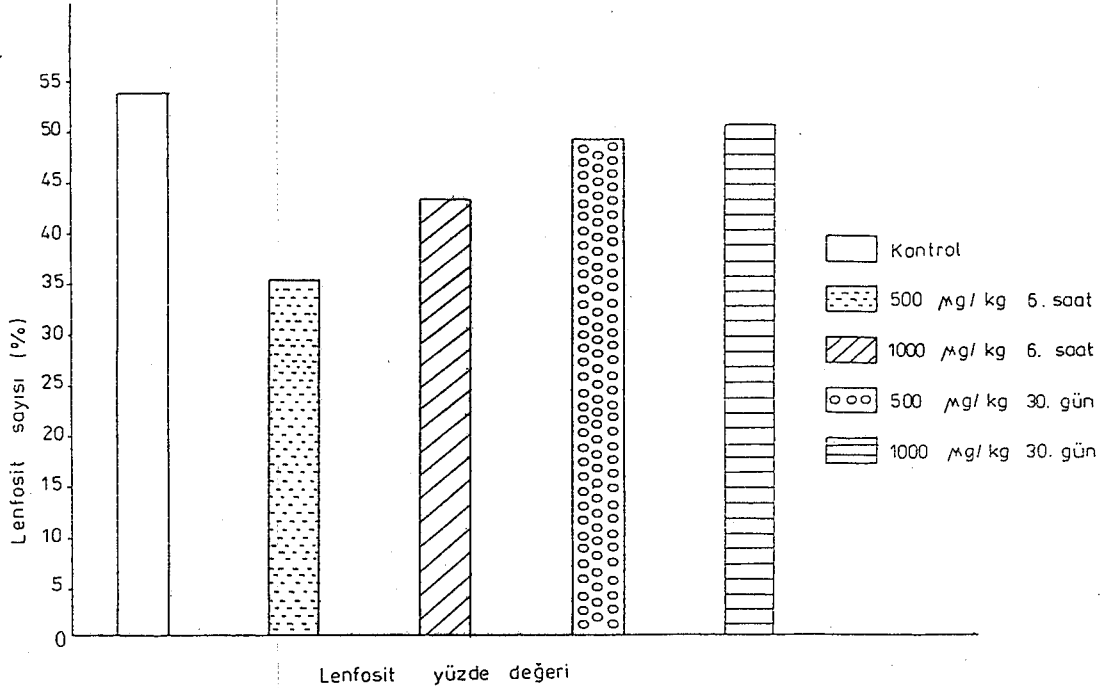
Eozinofil yüzde değerleri kontrol grubunda % 3.43 iken 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoksin G_1 verilen grupta 6. saatte % 3.86 ve 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoksin G_1 verilen grupta ise % 4.31 bulunmuştur. 30. günde ise eozinofil sayısı 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoksin G_1 verilen grupta % 4.86 ve 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$

verilen grupta % 5.02 olarak bulundu. Eozinofil sayısı her iki grupta 6. saatte ve 30. günde kontrole göre daha yüksek bulundu. Aflatoksin verildikten 6 sonraki yükselme anlamsız ($P > 0.05$) iken 30 gün sonraki yükselme ise anlamlı ($P < 0.05$) bulundu (Şekil 4.5.).



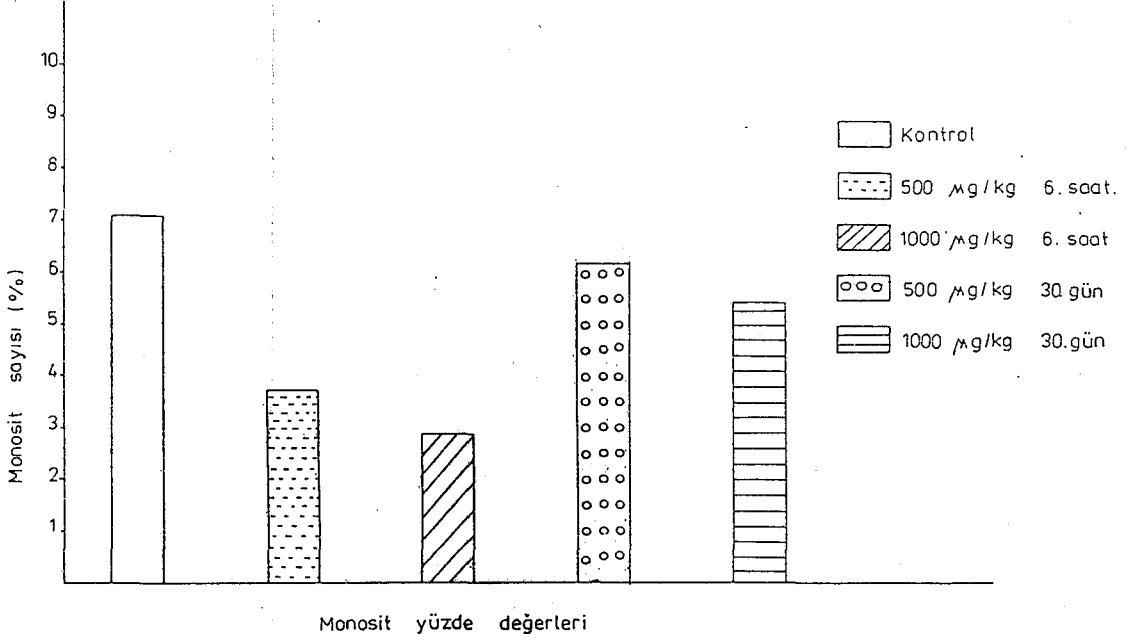
Şekil 4.5. Kontrol ve aflatoksin G_1 verilen gruplarda eozinofil yüzde değerleri.

Lenfosit yüzde değerleri kontrolde % 53.97 iken aflatoksin verildikten sonraki 6. saatte 500 µg/kg aflatoksin G_1 verilen grupta % 35.42 ve 1000 µg/kg aflatoksin G_1 verilen grupta ise % 43.97 olarak bulundu. 30. günde ise aflatoksin verilen gruplarda lenfosit sayısı yükseldi. 500 µg/kg grubunda % 49.19 ve 1000 µg/kg grubunda ise % 50.24 olarak bulundu. Lenfosit sayısı kontrole göre 6. saatte düştü. Bu düşme istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0.001$), (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Kontrol ve afl toksin G_1 verilen gruplarda lenfosit yüzde değerleri.

Monosit yüzde değerleri ise kontrol grubunda % 5.72 iken aflatoksin verilmesinden 6 saat sonra 500 µg/kg aflatoksin G_1 verilen grupta 3.71 ve 1000 µg/kg aflatoksin G_1 verilen grupta ise % 2.86 olarak bulundu. Aflatoksin verilmesinden 30 gün sonra ise 500 µg/kg aflatoksin G_1 verilen grupta % 6.10 a, 1000 µg/kg aflatoksin G_1 verilen grupta ise % 5.48 e yükselmistir. Aflatoksin verilmesinden 6 saat sonra her iki grupta da monosit sayısı anlamlı şekilde azalmış ($P < 0.05$), 30 gün sonra ise normal değerlere ulaşmıştır. (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Kontrol ve aflatoksin G₁ verilen gruplarda monosit yüzde değerleri.

5. T A R T I Ő M A

Aflatoksin B₁ ve G₁'e ilişkin bulgularımız Bulgular bölümünde izlenen sıraya göre tartışılacaktır.

5.1. Vücut ağırlığına etkileri

Aflatoksinin toksik etkisi deney hayvanlarının cinsine, yaşına, cinsiyetine ve beslenme faktörlerine göre değiştiğinden (18,41,53,66) bu faktörleri ortadan kaldırmak için deneylerimizde, yaşı, cinsiyeti, ağırlığı aynı olan ve başka hiçbir deneyde kullanılmamış sıçanlar seçilmiş ve hepsinin aynı şartlarda yaşamı sağlanmıştır.

Aflatoksin verilen gruplarda vücut ağırlığı Çizelge 4.2. de görüldüğü gibi kontrol grubuna göre daha az olmuştur. Kontrol grubunda % 8.5 lik bir artış gözlenirken, 500 µg/kg aflatoksin B₁ verilen grupta % 7.14, 1000 µg/kg aflatoksin B₁ verilen grupta ise % 5.63 lük bir artış olmuştur. 500 µg/kg aflatoksin G₁ uygulanan grupta vücut ağırlığı artışı % 7.95 iken 1000 µg/kg aflatoksin G₁ verilen grupta ise % 7.05 lik bir artış olmuştur. Vücut ağırlığı artışı, en az 1000 µg/kg aflatoksin B₁ verilen grupta olduğu halde 1000 µg/kg aflatoksin G₁ verilenlerde bu görülmemiştir. Bu durum aflatoksin B₁ in aflatoksin G₁ den daha toksik olmasıyla (Hendrickse, 1985) açıklanabilir.

Deney gruplarında en az vücut ağırlığı artışı aflatoksin verildikten sonraki ilk beş gün içinde olmuştur. Kontrol grubunda en fazla vücut ağırlığı artışı 20-30 gün arasında olurken, 500 µg/kg aflatoksin B₁ verilen grupta 5-10 gün arasında , 1000 µg/kg aflatoksin B₁ verilen grupta ve 500 µg/kg aflatoksin G₁ verilen grupta ise 20-30 gün arasında olmuştur (Çizelge 4.2).

Aynı şekilde aflatoksin B₁ uyguladığımız gruplara ilişkin bulgularımız, Chattopadhyay ve arkadaşlarının (1985) tavuklarda, Coulombe ve Sharma'nın (1985) sıçanlarda, Tapia ve Seawright'ın (1985) domuzlarda, Castelli ve arkadaşlarının (1986) sıçanlarda yaptıkları araştırma sonuçları ile uygunluk göstermektedir. Ancak yapılan literatür taramasın-

da aflatoksin G_1 'in vücut ağırlığına etkisi ile ilgili herhangi bir bulguya raslanılmamıştır.

Aflatoksin uyguladığımız gruplarda vücut ağırlığı artışının az olması, glukoz metabolizmasının baskılanması, fosfolipid, serbest yağ asitleri, trigliseritler, kolesterol ve bunların esterlerini içeren lipid metabolizmasının aksaması, DNA ve RNA sentezinin inhibisyonu, dolayısıyla protein sentezinin durması (Hendrickse, 1985) ve aflatoksin verilen hayvanların yem yemelerinin azalması ile (Chattopadhyay, et al. 1985) açıklanabilir.

5.2. İdrarla atılan aflatoksin miktarları

Aflatoksin B_1 idrarla yine aflatoksin B_1 olarak çok düşük oranda atılırken geriye kalan büyük kısmı M_1 halinde atılmaktadır (23,26,40,62). Bizim sonuçlarımızda da, kullandığımız Pelkin Elmer Floresan spektrofotometre ile ölçülemeyecek kadar az aflatoksin B_1 atılmış, geriye kalan B_1 ise M_1 'e dönüşerek, büyük oranda M_1 halinde atılmıştır. Bu M_1 atılımı en fazla aflatoksin B_1 verildikten 6 saat sonra olmuş, daha sonraki saatlerde gittikçe azalmış, 120 saatte sona ermiştir. Bu bulgularımız De longh ve arkadaşları (1964) ve Helferich ve arkadaşları (1986) tarafından da desteklenmektedir.

Çalışmamızda 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoksin B_1 verilen grupta verilen dozun % 5.72 sinin, 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoksin B_1 verilen grupta ise % 7.83 ünün idrarla aflatoksin M_1 olarak atıldığı görülmüştür. Helferich ve arkadaşlarının (1986) sıcanlarda yaptıkları bir araştırmada aflatoksin B_1 in % 8.66 sinin idrarla aflatoksin M_1 olarak atıldığını bildirmişlerdir. Wei ve arkadaşları (1985) yaptıkları bir araştırmada verilen dozun maymunlarda % 16.45 inin, farelerde ise % 3.4 ünün idrarla aflatoksin M_1 olarak atıldığını, yine Coulombe ve Sharma (1985) oral yolla aflatoksin B_1 verilen gruplarda verilen dozun 23 günde % 15 inin

aflatoksin M_1 , P_1 , Q_1 olarak idrarla atıldığını ve en fazla atılımın aflatoksin verildikten sonraki ilk saatlerde olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlar da bizim sonuçlarımız ile uygunluk göstermektedir. Buna karşılık Dalezios ve Wogan (1972) yaptıkları bir araştırmada bu atılımın ancak % 2.3 ünün aflatoksin M_1 olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuç bizim ve diğer araştırmacıların sonucuna göre biraz daha düşüktür.

Aflatoksin G_1 verilen gruplarda ise aflatoksin G_1 in yanında hemen hemen aynı oranda da aflatoksin M_1 atılmıştır. 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoksin G_1 verilen grupta 120 saatlik süre içinde verilen dozun % 1.22 si G_1 halinde, % 1.15 i M_1 halinde (toplam % 2.37), 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoksin G_1 verilen grupta ise % 1.90 ı G_1 ve % 2.20 si M_1 halinde (toplam % 4.10) idrarla atılmıştır. Aflatoksin G_1 verilen gruplarda da en fazla aflatoksin atılımı ilk 6 saat içerisinde olmasına karşın, 96. ve 120. saatler arasında bu değerler en düşük seviyeye inmiştir. Yapılan literatür taramasında aflatoksin G_1 in idrarla atılımına ait herhangi bir çalışmaya rastlanılmadığı için kendi bulgularımızı karşılaştırma imkanı olmamıştır.

5.3. Lökosit Sayısına Etkileri

Aflatoksinlerin kan hücrelerine etkisi üzerine yapılan literatür taramasında herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak Chattopadhyay ve arkadaşları (1985) yaptıkları bir araştırmada aflatoksin B_1 in hemoglobin konsantrasyonunu, eritrosit hücre hacmini ve eritrosit sayısını % 4 azalttığını rapor etmişlerdir.

Bizim bulgularımıza göre, nötrofil sayısı aflatoksin verilmesinden 6 saat sonra artmış ve 30 gün sonra ise normal seviyeye ulaşmıştır. Bunun ilk saatlerde yüksek olması aflatoksinin vücutta akut bir etkiye sahip olmasıyla açıklanabilir. Konuk (1975) akut etkilerde nötrofil sayısının arttığını bildirmektedir. Bizim bulgularımızda da nötrofil

sayısı arttığı için aflatoksinin akut bir etki yaptığı açıkça görülmektedir.

Bazofil sayısında aflatoksin verilmesinden sonra artmıştır. Bazofil sayısının artması da aflatoksinin akut etkisinin ve hayvanın vücudunda allerjik bir durum yarattığını ortaya koymaktadır.

Başaran (1985) ın da belirttiği gibi eozinofil sayısındaki artış vücuda giren antijen tipi maddelere karşı antikor oluşması ile açıklanabilir. Arastırmamızda eozinofil sayısındaki artış kontrole göre önemli derecede olmamakla birlikte bunun az da olsa düzenli bir şekilde artışı vücuda yabancı bir maddenin (aflatoksin) girdiğini ve bir antikor antijen kompleksi oluştuğunu dolayısıyla eozinofil sayısında bir artış olduğunu göstermektedir.

Lenfositler ve monositler aflatoksin verilmesinden 6 saat sonra azalmış ancak 30 gün sonra normale yakın bir düzeye gelmiştir. Lenfositlerdeki bu azalma aflatoksinlerin toksik etkisinin olduğunu doğrulamaktadır. Konuk (1975) un bildirdiğine göre, hastalığın yenilmesi döneminde monositler, iyileşme ve toparlanma döneminde ise lenfosit ve eozinofiller artmaktadır. Bizim bulgularımızda da ilk günlerde sayısı düşen lenfosit ve monositlerin 30. güne doğru normal değerlerine yakın sayıya ulaşmasını, aflatoksinin 30. güne doğru akut etkisinin hemen hemen ortadan kalktığı gerçeği ile açıklayabiliriz.

6. S O N U Ç

Bu çalışmada aflatoksin B₁ ve G₁ verilen sıçanlarda vücut ağırlığı artışı, idrarla aflatoksin atılımı ve lökosit sayıları üzerine olan etkileri araştırılmış ve su sonuçlara varılmıştır.

1. Aflatoksinlerin vücut ağırlığı artışı engellediği ve dozun yüksek olması halinde bu vücut ağırlığı artışının çok az olduğu görülmüş ve burada aflatoksin B₁'in aflatoksin G₁'den daha etkili olduğu saptanmıştır.

2. Aflatoksin B₁ ve G₁'in idrarla atılımının en fazla aflatoksin verilmesinden 6 saat sonra olduğu daha sonraki saatlerde gittikçe azalarak minimum seviyeye düştüğü görülmüştür.

3. Aflatoksin B₁ verilen gruplarda idrarla en çok aflatoksin M₁ atılırken, aflatoksin G₁ verilen gruplarda ise aflatoksin G₁ ve aflatoksin M₁'in hemen hemen aynı oranda atıldığı saptanmıştır.

4. Aflatoksin verilmesinden 6 saat sonra kandaki nötrofil, bazofil, eozinofil sayıları artmış, lenfosit ve monosit sayısı ise azalmıştır. 30 gün sonra ise nötrofil, lenfosit ve monositler normal değerlerine yaklaştığı halde, bazofil ve eozinofiller hem normale hemde 6 saat sonraki değerlere göre daha yüksek bulunmuştur.

K A Y N A K L A R D İ Z İ N İ

1. Allcroft, R. and Carnaghan, R.B.A.: Groundnut toxicity: An examination for toxin in human food products from animals fed toxic groundnut meal. The Vet. Rec., 75: 259-263, 1963.
2. Allcroft, R., Rogers, O.B.E., Rogers, H., Lewis, G., Navbey, J. and Best, P.E.: Metabolism of aflatoxin in sheep: Excretion of milk toxin. Nature, 209: 154-155, 1966.
3. Allcroft, R. and Roberts, B.A.: Toxic grownut meal: The relationship between aflatoxin B₁ intake by cows and excretion of aflatoxin M₁ in milk. The Vet. Rec., 82: 116-118, 1968.
4. Akşehirli, M. ve Bozkurt, M.: Memleketimizde fındık, fıstık, badem içi ve cevizlerde aflatoksin bakımından bir araştırma. Türk Hijyen ve Tecrübi Biyoloji Dergisi, 29: 103-108, 1969.
5. Alperden, İ.: Gıdalarda küfler ve mikotoksinlerin araştırılması. TÜBİTAK M&A.E., MBEAE Matbaası-Gebze, 1985.
6. Anonymous, : Mycotoxins Metodology Chapter 26. Natural Poisons in official methods of analysis in J. of A.O.A.C., 1980, pp.414-434.
7. Aşkın, O. ve Kösker, Ö.:İncirlerde aflatoksin tesekkülü üzerine araştırmalar. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Diploma sonrası yüksek okulu ihtisas tez özetleri. Ankara Univ. Basımevi, Ankara, 1980.
8. Atlı, A. ve Kösker, Ö.: Buğday un ve ekmekte aflatoksin oluşumu ve stabilitesi üzerine araştırmalar. A.Ü. Ziraat Fakültesi Diploma sonrası yüksek okulu ihtisas tez özetleri. Ankara Univ. Basımevi, Ankara, 1980.
9. Ayfer, M.: Alman Federal Sağlık Dairesinin Aflatoksin Tayin Metodları. Ankara, 1977,
10. Autrup, H., Wakhisi, J.y Vahakangas, K., Wasunarna, A., and Harris, C.C.: Detection of 8.9 Dihydra(7-guanyl)-9-hydroxyaflatoxin B₁ in human urine. Environmental Healt Perspectives, 62: 105-108, 1985.
11. Baker, D.C. and Green, R.A.: Coagulation defects of aflatoxin intoxicated rabbits. Vet. Pathol., 24: 62-70, 1987.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

12. Başaran, A.: Tıbbi biyoloji. Birinci baskı, Anadolu Univ. ESBAY Yayınları, No. 22, 1985.
13. Başaran, A., Başaran, N., Erdem, S., Gülbahar, K., Cingi, M.İ., Kalkandelen, G., Güneş, H.V.: Besin maddeleri olarak kullanılan bazı kuru yiyeceklerde ve kümes hayvanı yemlerinde aflatoksin araştırmalarına ilişkin bulgular. Anadolu Tıp Dergisi, 7: 1-12, 1985.
14. Başaran, A., Güneş, H.V., Başaran, N., Erdem, S., Kalkandelen, G.: Eskişehir'de bazı gıda maddeleri ve yemlerde aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ araştırılması. Anadolu Tıp Dergisi, 8: 51-60, 1986.
15. Başaran, A., Başaran, N., Erdem, S., Çakmak, E.A.: Eskişehir'de sütlerde aflatoksin B₁, M₁ aranması. Anadolu Tıp Dergisi, 8: 61-69, 1986.
16. Baydar, S.: Tohumuz bitkiler sistematigi II. Birinci baskı, Atatürk Univ. Yayınları, No. 554, 1979, s.141-150.
17. Bennett, R.A., Essigmann, J.M. and Wogan, G.N.: Excretion of an aflatoxin-guanine adduct in the urine of aflatoxin B₁ treated rats. Cancer Res, 41: 650-654, 1981.
18. Butler, W.H. and Wigglesworth, J.S.: The effects of aflatoxin B₁ on the pregnant rat. J. Exp. Pathol. 47: 242-247, 1966.
19. Campbell, T.C. and Hayes, J.R.: The role of aflatoxin metabolism in its toxic lesion. Toxic. and Appl. Pharmac., 35: 199-222, 1976.
20. Castelli, D., Seralini, G.E., Lafaurie, M., Krebs, B. and Stora, C.: Ovarian function during aflatoxin B₁-induced hepatocarcinogenesis in the rat. Res. Commun. Chem. Path. Pharm., 53: 183-194, 1986.
21. Chattopadhyay, S.K., Taskar, P.K., Schawabe, O., Das, V.T. and Brown, H.D.: Clinical and biochemical effects of aflatoxin in feed ration of chicks. Can. Biochem. Biophys., 8: 67-75, 1985.
22. Chaturvedi, A., Khanna, V.P., Taneje, S.K., Ventitasubromanian, T.A. and Raj, H.G.: Changes in liver polyamines due to aflatoxin B₁. Toxic. Lett. 34: 1-4, 1986.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

23. Coulombe, R.A. and Sharma, R.P.: Clearance and excretion of intratracheally and orally administered aflatoxin B₁ in the rat. *Fd. Chem., Toxic.*, 23: 827-830, 1985.
24. Coulombe, R.A. and Sharma, R.P.: Effect of repeated dietary exposure of aflatoxin B₁ on brain biogenic amines and metabolites in the rat. *Toxic. Appl. Pharmacol.*, 80: 496-501, 1985.
25. Çoksöyler, N. ve Kösker, Ö.: Süt ve süt mamüllerinde aflatoksin oluşumu üzerine araştırmalar. Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi Diploma sonrası yüksek okulu ihtisas tez özetleri, A.Ü. Basımevi, Ankara, 1980.
26. Dalezios, J. and Wogan, G.N.: Metabolism of aflatoxin B₁ in rhesus monkey. *Can. Res.*, 32: 2297-2303, 1972.
27. De Longh, H., Vles, R.O. and van Pelt, J.G.: Milk of mammals fed an aflatoxin-containing diet. *Nature*, 198: 466-467, 1964.
28. Denizel, T.: Mısırların depolanmaları sırasında oluşan bazı mikotoksinler ve bunların sinerjik etkileri üzerine çalışmalar. Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi Diploma sonrası yüksek okulu ihtisas tezi, 1979, (basılmamış).
29. Detroy, R.W., Lillehoj, E.B. and Ciegler, A.: Aflatoxin and related compounds, *Microbial Toxins IV*, Academic Press, New York and London, 1971, pp.4-155.
30. Fışkın, K. ve Atalay, A.: Aflatoksin B₂, G₂ tiplerinin damızlık yumurtalarda LD₃₀ ve LD₅₀ değerlerinin saptanması, teratojenik etkilerinin araştırılması. *Doğa Bilim Dergisi: Temel Bilim*, 7: 309-315, 1983.
31. Furtado, R.M., Pearsan, A.M., Hogberg, M.G., Miller, E.R., Gray, J.I. and Aust, S.D.: Withdrawal time required for clearance of aflatoxins from pig tissues. *J. Agric. Food Chem.*, 30: 101-106, 1982.
32. Giambrone, J.J., Drener, U.L., Dawis, N.D., Panangala, U.S. and Hoerr, E.J.: Effect of purified aflatoxin on turkeys. *Poult. Sci.*, 64: 859-865, 1985.
33. Goto, T. and Hsieh, D.P.H.: Fractionation radioactivity in milk of goats administered ¹⁴C-Aflatoxin B₁. *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 68: 456-460, 1985.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

34. Gregory, J.F. and Manley, D.: High performance liquid chromatographic determination of aflatoxins in animal tissues and products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64: 144-151, 1981.
35. Gregory, J.F., Goldstein, S.L. and Edds, G.T.: Metabolite distribution and rate of residue clearance in turkeys fed a diet containing aflatoxin B₁. *Fd. Chem. Toxic.*, 21: 463-467, 1983.
36. Gregory, J.F. and Edds, G.T.: Effect of dietary selenium on the metabolism of aflatoxin B₁ in turkeys. *Fd. Chem. Toxic.*, 22: 637-642, 1984.
37. Grosman, M.E., Elias, M.M., Comin, E.J. and Rodriguez, E.M.: Distal nephron function of rat during acute aflatoxicosis. *Toxic. Lett.*, 21: 263-270, 1984.
38. Hartley, R.D. and Nesbitt, B.F. and O'Kelly, J.: Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*, 198: 1056-1058, 1963.
39. Hayes, R.B., Van Nieuwenhuize, J.P., Raatgever, J.W. and Ten Kate, F.J.W.: Aflatoxin exposures in the industrial setting: On epidemiological study of mortality. *Fd. Chem. Toxic.*, 22: 39-43, 1984.
40. Helferich, W.G., Baldwin, R.L. and Hsieh, D.P.H.: ¹⁴C-Aflatoxin B₁ metabolism in lactating goats and rats. *J. Anim. Sci.*, 62: 697-705, 1986.
41. Hendrickse, G.R.: Aflatoxins and child health in the tropics. *Cronicle*, 15: 138-156, 1985.
42. Hodges, G.A., Zust, J.R. Smith, H.R., Nelson, A.A., Armbrrecht, B.H. and Campbell, A.D.: Mycotoxins: Aflatoxin isolated from *Penicillium puberulum*. *Science*, 145: 1439, 1964.
43. Huff, W.E., Doerr, J.A., Wabeck, C.J., Chaloupka, G.W., May, J.D. and Merkley, J.W.: Individual and combined effects of aflatoxin and ochratoxin A on bruising in broiler chickens. *Poult. Sci.*, 62: 1764-1771, 1983.
44. Ikegwonu, F.J.: The neurotoxicity of aflatoxin B₁ in rat. *Toxicology*, 28: 247-259, 1983.
45. Jones, B.D.: Methods of aflatoxin analysis. Tropical Products Institute. Report G. 70 London, 1972.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

46. Konuk, T.: Pratik fizyoloji I. Birinci baskı, Ankara Univ. Veteriner Fakültesi Yayınları No. 314, 1975, s.90-95.
47. Kulik, M.M. and Holaday, C.E.: Aflatoxin: A metabolic product of several fungi. Mycopathol. Mycol. Appl., 30: 137-140, 1967.
48. Lee, L.S., Dunn, J.J., Delucca, A.J. and Ciegler, A.: Role of lactone ring of aflatoxin B₁ in toxicity and mutagenicity. Experientia, 37: 16-17, 1981.
49. Liewellyn, G.C., Floyd, E.A., Hoke, G.D., Weekley, L.B. and Kimbrough, T.D.: Influence of dietary aflatoxin, zinc and copper on bone size, organ weight and body weight in hamsters and rats. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 35: 149-156, 1985.
50. Masrl, M.S. and Booth, A.N.: Comparative metabolic conversion of aflatoxin B₁ to M₁ and Q₁ by monkey, rat and chicken liver. Life Sciences, 15: 203-212, 1974.
51. Miller, D.M., Wilson, D.M., Wyatt, R.D., Mekinney, J.K., Crowell, W.A. and Stuart, B.P.: High performance liquid chromatographic determination and clearance time aflatoxin residues in swine tissues. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 65: 1-4, 1982.
52. Mislivec, P.B., Hunter, J.H. and Tuite, J.: Assay for the aflatoxin production by the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. Appl. Microbiol., 16: 1053-1055, 1968.
53. Moreau, C.: Moulds, Toxins and Food. John Wiley-Sons. New York, 1979, pp.104-143.
54. Newberne, P.M. and Wogan, G.N.: Sequential morphologic in aflatoxin B₁ carcinogenesis in rat. Cancer Res., 28: 770-781, 1968.
55. Newberne, P.M. and Butler, W.H.: Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals. Cancer Res., 29: 236-250, 1969.
56. Osweiler, G.D. Pho, D.W.N. and Trampel, D.W.: Aflatoxicosis in feetlot cattle. JAWMA, 187: 636-637, 1985.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

57. Öner, M.: Mikoloji I. Birinci baskı, Ege Univ. Fen Fakültesi kitaplar serisi No. 53, Bornova, 1971, s.116-118.
58. Öner, M.: Mikoloji II. Birinci baskı, Ege Univ. Fen Fakültesi kitaplar serisi No. 39, Bornova, 1971, s.7-8.
59. Parrish, F.W., Wiley, B.J., Simmons, E.G. and Long, C.: Production of aflatoxins and Kolic acid by species of *Aspergillus* and *Penicillium*. *Appl Microbiol.*, 14: 139, 1966.
60. Singh, J., Tiwari, R.P., Singh, G., Singh, S. and Vadehra, D.V.: Biochemical and immunological effects of aflatoxins in rabbits. *Toxic. Lett.*, 35: 225-230, 1987.
61. Tapia, M.O. and Seawright, A.A.: Experimental combined aflatoxin B₁ and ochratoxin A intoxication in pigs. *Aust. Vet. J.*, 62: 33-37, 1985.
62. Trenk, H.L. and Hartman, P.A.: Effects of moisture content and temperature on aflatoxin production in corn. *Appl. Microbiol.*, 19: 781-784, 1970.
63. Wei, C.I. and Marshall, M.R.: Characterization of Water soluble glucuronide and sulphate conjugates of aflatoxin B₁. I. Urinary excretion in monkey, rat, and mouse. *Fd. Chem. Toxic.*, 23: 809-819, 1985.
64. Wei, C.I. and Hsieh, D.P.H.: Characterization of water soluble glucuronide and sulphate conjugates of aflatoxin B₁. II. Studies in primary cultures of rat hepatocytes. *Fd. Chem. Toxic.*, 23: 821-825, 1985.
65. Wilson, B.J., Campbell, T.C., Hayes, A.W. and Hanlin, R.T.: Investigation of reported aflatoxin production by fungi outside the *Aspergillus flavus* group. *Appl. Microbiol.*, 16: 819-821, 1968.
66. Wogan, G.N.: Chemical nature and biological changes in aflatoxin B₁. *Bacteriol Rev.*, 30: 460-470, 1966.
67. Wolzak, A., Pearson, A.M., Coleman, T.H., Pestka, J. J., Gray, J.F. and Chen, C.: Aflatoxin carryover and clearance from tissues of laying hens. *Fd. Chem. Toxic.*, 24: 37-41, 1986.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

68. Wong, Z.A. and Hsieh, D.P.H.: The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin B₁ in the monkey rat and mouse. Toxic. Appl. Pharm., 55: 115-125, 1980.
69. Wyllie, T.D. Morehouse, L.G.: Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicosis I. New York and Basel, 1977, pp.159-185.
70. Yadgırı, B., Reddy, V., Tulpule, P.G., Srikantia, S.G. and Gopalan, C.: Aflatoxin and Indian Childhood Cirrhosis. The American Journal of Clin Nutri., 23: 94-98, 1970.
71. Yurtyeri, A.: Aflatoksinli gıda maddelerinin besin kontrolü ve insan sağlığı bakımından önemi. Et Balık Endüstrisi Dergisi, 19-28, 1979.
72. Zhu, J., Zhang, L., Hu, X., Xiao, Y., Chen, J., Xu, Y., Fremy, J. and Chu, F.S.: Correlation of dietary aflatoxin B₁ levels with excretion of aflatoxin M₁ in human urine. Cancer Res., 47: 1848-1852, 1987.