



**AFLATOKSİN B1 İLE OLUŞTURULAN  
KARACİĞER HASARI ÜZERİNE BORUN  
KORUYUCU ETKİSİNİN ERKEK RATLARDA  
ARAŞTIRILMASI**

Serkan KARATEKELİ

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Sinan İNCE

Tez No: 2021-006

Afyonkarahisar

**SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
BESİN/GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**AFLATOKSİN B1 İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER HASARI  
ÜZERİNE BORUN KORUYUCU ETKİSİNİN ERKEK  
RATLARDA ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan  
Serkan KARATEKELİ**

**Danışman  
Prof. Dr. Sinan İNCE**

**Tez No: 2021-006**

**AFYONKARAHİSAR**

## TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda Serkan KARATEKELİ tarafından hazırlanan "Aflatoksin B1 ile Oluşturulan Karaciğer Hasarı Üzerine Borun Koruyucu Etkisinin Erkek Ratlarda Araştırılması" adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 07/09/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği / oy çokluğu** ile **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir

### Başkan

Doç. Dr. Zeki GÜRLER

### Üye

Prof. Dr. Sinan İNCE

### Üye

Doç. Dr. Ulaş ACARÖZ

### Üye

Doç. Dr. Halil YALÇIN

### Üye

Dr. Öğr. Üyesi Savaş ASLAN

Afyon Kocatepe Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
..... / ..... / .....tarih ve  
.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Esmâ KOZAN  
Enstitü Müdürü

## BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

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

İmza

Serkan KARATEKELİ

## ÖZET

### AFLATOKSİN B1 İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER HASARI ÜZERİNE BORUN KORUYUCU ETKİSİNİN ERKEK RATLARDA ARAŞTIRILMASI

Mikotoksinler içerisinde önemli yeri olan aflatoksinlerin gıda ve yem kaynaklı bulaşmaları insan ve hayvan sağlığı üzerinde ciddi sağlık problemlerini beraberinde getirmektedir. Bunların alınması sonucu karaciğer başta olmak üzere doku ve organlarda özel zehirli etkiler (kanserojen, teratojen ve mutajenik etkiler) ile hepatotoksik, nefrotoksik, genotoksik ve immünoşüpresif etkiler ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle aflatoksinlerden kaynaklı istenmeyen zararların önüne geçilmesinde antioksidan özellik gösteren çeşitli maddeler öncelikle tercih edilmektedir. Bor ve bileşiklerinin antioksidan, hücre koruyucu, antigenotoksik etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Yapılan bu tez çalışmasında subakut Aflatoksin B1 (AFB1) ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda borun koruyucu etkisinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada erkek Sprague Dawley cinsi ratlara AFB1 0,125 mg/kg ve borik asit 5, 10 ve 20 mgBor/kg dozları 21 gün süresince verildi. AFB1 uygulamasının karaciğer enzim aktiviteleri (AST, ALT ve ALP) ve lipid peroksidasyon (MDA) düzeylerini artırdığı, diğer taraftan glutatyon (GSH) ve antioksidan enzim aktivitelerinde (SOD ve CAT) ise azalma meydana getirdiği belirlendi. Ayrıca, karaciğer dokusunda apoptotik (*Bax*, *Caspase 3*, *Caspase 8*, *Caspase 9* ve *p53*) ve proinflamatuvar (*TNF- $\alpha$*  ve *NF $\kappa$ B*) genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin arttığı ve antiapoptotik gen olan *Bcl-2*'nin mRNA ekspresyonunun azaldığı tespit edildi. AFB1 uygulamasının DNA hasarını artırdığı ve karaciğer dokusunda ise histopatolojik değişiklikler oluşturduğu gözlemlendi. AFB1 ile birlikte verilen 5, 10 ve 20 mg/kg dozda bor uygulamalarının ise oluşan bu olumsuz değişiklikleri tersine çevirdiği tespit edildi. Sonuçta borun AFB1 ile indüklenen karaciğer hasarına karşı antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkisi ile birlikte hepatoprotektif etki sergilediği belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Aflatoksin B1, Biyokimyasal parametreler, Bor, Karaciğer hasarı, Rat

## SUMMARY

### THE INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF BORON AGAINST AFLATOXIN B1 INDUCED LIVER INJURY IN MALE RATS

Contamination of aflatoxins, which has an important place among mycotoxins, from food and feed brings serious health problems on human and animal health. Because of their intake, special toxic effects (carcinogenic, teratogenic, and mutagenic effects) and hepatotoxic, nephrotoxic, genotoxic, and immunosuppressive effects occur in tissues and organs, especially in the liver. For this reason, various substances with antioxidant properties are primarily preferred to prevent undesirable damage caused by aflatoxins. It has been reported that boron and its compounds have antioxidant, cell protective, and antigenotoxic effects. In this thesis, it was aimed to investigate the protective effect of boron in rats with subacute Aflatoxin B1 (AFB1) liver damage. In the study, 0,125 mg/kg AFB1 and 5, 10, and 20 mg Boron/kg doses of boric acid were given to male Sprague Dawley rats for 21 days. It was determined that AFB1 treatment increased liver enzyme activities (AST, ALT, and ALP) and lipid peroxidation (MDA) levels, on the other hand, it caused a decrease in glutathione (GSH) and antioxidant enzyme activities (SOD and CAT). In addition, it was determined that the mRNA expression levels of apoptotic (*Bax*, *Caspase 3*, *Caspase 8*, *Caspase 9*, and *p53*) and proinflammatory (*TNF- $\alpha$*  and *NF $\kappa$ B*) genes in liver tissue increased and the mRNA expression of the antiapoptotic gene (*Bcl-2*) decreased. It was observed that AFB1 treatment increased DNA damage and caused histopathological changes in the liver tissue. It was determined that boron applications at doses of 5, 10, and 20 mg/kg given with AFB1 reversed these negative changes. As a result, it was determined that boron exhibited hepatoprotective effect together with antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic effects against AFB1-induced liver damage.

**Keywords:** Aflatoxin B1, Biochemical parameters, Boron, Liver damage, Rat

## ÖNSÖZ

Mikotoksinler tarih boyunca birçok epidemi ile binlerce insanın ölümüne ve ayrıca büyük ekonomik kayıplara neden olmuştur Doğada yaygın olarak bulunan küf mantarları sıcak ve nemli koşullarda gıda ve yemlerde kolayca üreyerek mikotoksin üretirler. Mikotoksinler insanlar ve hayvanlarda ciddi sağlık problemlerine neden olurlar. Aspergillus türü mantarlar tarafından oluşturulan Aflatoksinler doğal olarak oluşan en güçlü hepatik karsinojen maddelerdir. Yapılan bu çalışmada AFB1 ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda borun koruyucu etkisinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla bazı biyokimyasal parametreler (AST, ALT, ALP), lipid peroksidasyon (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeyleri ile antioksidan enzimlerin (SOD ve CAT) aktivite tayini ve DNA hasarı (ssDNA) belirlendi. Ayrıca karaciğer dokusunda apoptotik (*Caspase-3*, *Caspae-8*, *Caspase-9*, *Bax*, *p53* ve *Bcl-2*) ve yangısal sitokinlerin (*NFκB* ve *TNF-α*) mRNA ekspresyonları ile karaciğer dokusunun histopatolojik incelemeleri gerçekleştirildi

Tez çalışmamın seçilmesi ve yürütülmesi esnasında yardımlarını esirgemeyen başta danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sinan İNCE, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Doç. Dr. Zeki GÜRLER, değerli hocalarım Doç. Dr. Recep KARA ve Doç Dr. Ulaş ACARÖZ'e ayrıca Dr. Öğr. Üyesi Hasan Hüseyin DEMİREL, Dr. Öğr. Üyesi Fahriye ZEMHERİ NAVRUZ, Öğr. Gör. Ali SOYLU, Laborant Fahriye KAN, Biyolog Ezgi Nur DEMİRKAPI'ya, bu çalışmamın gerçekleşmesinde rol alan Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim. Bunun yanında eşim Veteriner Hekim Ülkü KARATEKELİ ve aileme de teşekkürü borç bilirim.

Serkan KARATEKELİ

Afyonkarahisar

2021

## İÇİNDEKİLER

	SAYFA
<b>KABUL VE ONAY SAYFASI</b>	<b>II</b>
<b>BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI</b>	<b>III</b>
<b>ÖZET</b>	<b>IV</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>V</b>
<b>ÖNSÖZ SAYFASI</b>	<b>VI</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>VII</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	<b>X</b>
<b>ŞEKİLLER</b>	<b>XII</b>
<b>RESİMLER</b>	<b>XIV</b>
<b>ÇİZELGELER</b>	<b>XV</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Aflatoksinler	1
1.1.1. Aflatoksin Üreten Mantarlar	2
1.1.2. Aflatoksijenik Mantarların Üreme Koşulları	4
1.1.3. Aflatoksin Kaynakları	4
1.1.4. Aflatoksinlerin Kimyasal Özellikleri	5
1.1.5. Aflatoksinlerin Metabolizması	6
1.1.6. Aflatoksinlerin Etkileri	8
1.1.7. Antioksidan Savunma Sistemi	10
1.1.8. Aflatoksinlerden Korunma Yöntemleri	12
1.2. Bor	14
1.2.1. Borun Genel Özellikleri	14
1.2.2. Borun Tarihçesi	14
1.2.3. Borun Bitkilerdeki Önemi	15
1.2.4. Borun İnsan ve Hayvan Sağlığındaki Önemi	15
1.2.5. Bora Maruziyet ve Diyet	20
1.2.6. Borun Farmakokinetiği	21
1.2.7. Borun Toksisitesi	23
1.2.8. Toksikasyonlara Karşı Bor Bileşiklerinin Kullanımı	24



<b>2. MATERYAL ve METOT</b>	<b>27</b>
2.1. Materyal	27
2.1.1. Araç ve Gereçler	27
2.1.2. Hayvan Materyali	27
2.2. Metot	27
2.2.1. Deneysel Aşama	27
2.2.1.1. Deneysel Aşamanın Planlanması ve Uygulanması	28
2.2.1.2. Deneysel Aşamanın Sonlandırılması	29
2.2.1.2.1. Anestezi aşaması	29
2.2.1.2.2. İntrakardiyak Kan Alımı, Sakrifikasyon ve Alınan Örneklerin Saklanması	29
2.2.2. Histopatolojik Değerlendirme	30
2.2.3. Lipid Peroksidasyon ve Antioksidan Parametreler	31
2.2.3.1. Doku Homojenizasyonu	31
2.2.3.2. Hemolizat Hazırlanması	31
2.2.3.3. Süperoksid Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini	31
2.2.3.4. Katalaz Aktivite Tayini	33
2.2.3.5. Malondialdehit (MDA) Aktivite Tayini	34
2.2.3.6. Redükte Glutasyon (GSH) Tayini	35
2.2.3.7. Protein Ölçümü	37
2.2.3.8. Kanda Hemoglobin Düzeyinin Belirlenmesi	37
2.2.4. Biyokimyasal Parametreler	38
2.2.5. Moleküler Analizler	39
2.2.5.1. RNA İzolasyonu, RNA'ların Kalite Kontrolü, DNaz Uygulaması ve cDNA Eldesi	39
2.2.5.2. Primer Tasarımı	39
2.2.5.3. Real-time PCR	39
2.2.6. İstatistiksel Analiz	40
<b>3. BULGULAR</b>	<b>42</b>
3.1. AST, ALT ve ALP Düzeyleri Üzerine Etkisi	42
3.2. MDA ve GSH Düzeyleri Üzerine Etkisi	43
3.3. SOD ve CAT Düzeyleri Üzerine Etkisi	45

3.4. Yangısal ve Apoptotik Gen Ekspresyonları ile DNA Kırılımı Üzerine Etkisi	46
3.5. Karaciğer Dokusunda Histopatolojik Değişiklikler	51
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>54</b>
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>59</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b>	<b>60</b>
<b>7. EKLER</b>	<b>74</b>
7.1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	74



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AFB</b>	: Aflatoksin B
<b>AFG</b>	: Aflatoksin G
<b>AFM</b>	: Aflatoksin M
<b>AFP</b>	: Aflatoksin P
<b>AFQ</b>	: Aflatoksin Q
<b>ALP</b>	: Alkalin fosfatazlar
<b>ALT</b>	: Alanin aminotransferaz
<b>ANOVA</b>	: Analysis of Variance (ANOVA)
<b>aPTT</b>	: Aktive olmuş parsiyel tromboplastin süresi
<b>AST</b>	: Aspartat aminotransferaz
<b>ATSDR</b>	: Toksik Maddeler ve Hastalık Kayıt Ajansı
<b>aw</b>	: Su aktivitesi
<b>B</b>	: Bor
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>cc</b>	: Santimetreküp
<b>cm<sup>2</sup></b>	: Santimetrekare
<b>CYP</b>	: Sitokrom P450 enzimleri
<b>°C</b>	: Derece santigrat
<b>dl</b>	: Desilitre
<b>DNA</b>	: Deoksiribo nükleik asit
<b>ECHA</b>	: Avrupa Kimyasallar Ajansı
<b>g</b>	: Gram
<b>GGT</b>	: Gama-glutamil transferaz
<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>GST</b>	: Glutasyon S-transferaz
<b>HCC</b>	: Hepatoselüler karsinom
<b>HepG2</b>	: Karaciğer kanseri hücre hattı
<b>ICD</b>	: İzositrat dehidrogenaz
<b>Ig</b>	: İmmüoglobulin
<b>IU</b>	: Uluslararası Ünite

<b>kg</b>	: Kilogram
<b>LD<sub>50</sub></b>	: Popülasyonun yarısını öldürmek için gereken doz.
<b>m<sup>3</sup></b>	: Metreküp
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>mg</b>	: Miligram
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>μ</b>	: Mikron
<b>μmol</b>	: Mikromol
<b>μl</b>	: Mikrolitre
<b>n</b>	: Örneklem büyüklüğü
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>OCT</b>	:Ornitin karbamil transferaz
<b>P</b>	:Anlamlılık (önemlilik) testine ilişkin olasılık değeri
<b>pH</b>	: Asit veya bazlık derecesini tarif eden ölçü
<b>ppb</b>	: Milyarda bir birim
<b>ppm</b>	: Milyonda bir birim
<b>PT</b>	: Protrombin zamanı
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>rpm</b>	: Dakikadaki devir sayısı
<b>SDH</b>	: Sorbitol dehidrogenaz
<b>SDS</b>	: Sodyum dodesil sülfat
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>Vd.</b>	: Ve diğerleri
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>%</b>	: Yüzde

## ŞEKİLLER

	SAYFA
Şekil 1.1. AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2'nin Kimyasal Yapıları	6
Şekil 3.1. Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların plazma AST düzeyleri üzerine etkisi	42
Şekil 3.2. Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların plazma ALT düzeyleri üzerine etkisi.	43
Şekil 3.3. Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların plazma ALP düzeyleri üzerine etkisi.	43
Şekil 3.4. Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların karaciğer dokusunda <i>Bax</i> 'ın mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi.	47
Şekil 3.5. Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların karaciğer dokusunda <i>Caspase 3</i> 'ün mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi.	47
Şekil 3.6. Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların karaciğer dokusunda <i>Caspase 8</i> 'in mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi.	48
Şekil 3.7. Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların karaciğer dokusunda <i>Caspase 9</i> 'un mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi.	48
Şekil 3.8. Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların karaciğer dokusunda <i>p53</i> 'ün mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi.	49
Şekil 3.9. Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların karaciğer dokusunda <i>Bcl-2</i> 'nin mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi.	49
Şekil 3.10. Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg	50

miktarlarında uygulanan borun ratların karaciğer dokusunda *TNF- $\alpha$* 'nın mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi.

**Şekil 3.11.** Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların karaciğer dokusunda *NF $\kappa$ B*'nin mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. **50**

**Şekil 3.12.** Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların karaciğer dokusunda ssDNA düzeyleri üzerine etkisi. **51**



## RESİMLER

### SAYFA

**Resim 3.1.** Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların karaciğer dokusu üzerine etkisinin histopatolojik değerlendirmesi.

**52**



## ÇİZELGELER

	<b>SAYFA</b>
<b>Çizelge 1.1.</b> Aflatoksin Üreten Aspergillus Türleri	<b>3</b>
<b>Çizelge 2.1.</b> Bor Diyetinin Hazırlanması	<b>29</b>
<b>Çizelge 2.2.</b> Moleküler analizler için kullanılan genler, oligonükleotid dizilimleri, boyutları ve gen bankası numaraları	<b>40</b>
<b>Çizelge 3.1.</b> Erkek ratlarda aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun tam kan ve karaciğer dokularında MDA düzeyi üzerine etkisi.	<b>44</b>
<b>Çizelge 3.2.</b> Erkek ratlarda aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun tam kan ve karaciğer dokularında GSH düzeyi üzerine etkisi	<b>44</b>
<b>Çizelge 3.3.</b> Erkek ratlarda aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun tam kan ve karaciğer dokularında SOD aktivitesi üzerine etkisi	<b>45</b>
<b>Çizelge 3.4.</b> Erkek ratlarda aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun tam kan ve karaciğer dokularında CAT aktivitesi üzerine etkisi	<b>46</b>
<b>Çizelge 3.5.</b> Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun rat karaciğer histopatolojisinin istatistiksel değerlendirmesi	<b>53</b>



## 1. GİRİŞ

Aflatoksin gıda endüstrisinde oldukça sık görülen ve önemli zararlı etkilerinin olduğu bilinen bir mikotoksindir. Özellikle Aflatoksin B1 (AFB1) en yüksek toksisiteye sahip olan aflatoksindir. Aflatoksin üreten mantarlar; buğday, mısır, fasulye, pirinç gibi mahsuller sağlıklı koşullarda depolandığı zaman toksin üretirler ve bu toksinlerin alınması sonucu karsinojenik, teratojenik ve mutajenik etkilerin ortaya çıkmasına neden olurlar. Bunun yanı sıra hepatotoksik, nefrotoksik, genotoksik ve immünoşüpresif etkiler ile karaciğer, böbrek ve kalp hasarına neden olmaktadır (Verma ve Mathuria, 2009; Coppock vd., 2018). Yapılan çalışmalarla borun antioksidan, hücre koruyucu ve antigenotoksik etkilerinin olduğu bildirilmiştir (İnce vd. 2012; 2014).

### 1.1. Aflatoksinler

Küf mantarları olarak da bilinen ipliksi mantarlar doğada yaygın olarak bulunur. Nemli ve sıcak ortamlarda gıda ve yem maddelerinde kolayca üreyebilirler. Hem besin değerini azaltarak hem de sekonder metabolitleri ile gıda ve yemlerin kalitesini olumsuz yönde etkilerler. *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* gibi küf mantarlarının sekonder metabolitleri olan mikotoksinler, insan ve hayvanlarda çeşitli ve güçlü toksik etki gösterirler (WHO, 2018; Steyn ve Stander, 1999).

1879'da DeBary, iki organizmanın yan yana büyüdüğünde, birinin diğerinin büyümesini engellediğini bildirmiştir (Skinner vd., 1947). Bunu takip eden süreçte Alexander Fleming penisilini keşfetmiştir. Bu antibiyotiğin, önemli hastalıklar için sağladığı iyileştirici etkisi nedeniyle antibiyotik endüstrisi hızla gelişmiştir. Antibiyotiklerin geliştirilmesi sırasındaki yapılan hayvan toksisitesi çalışmaları bu metabolitlerin insan ve hayvanlarda hastalık yapabileceğine dair ipuçları sağlamıştır. Tahılların mantarlar tarafından bozulmasıyla ilgili tahıl depolama çalışmaları sonucunda mantarların hem depolanan tahıllara zarar verdiği hem de bu tahılları tüketen hayvan ve insanlarda toksik sorunlara neden olma potansiyeli oluşturduğu anlaşılmıştır (Richard, 2000). İkinci Dünya Savaşı'nın ilk yıllarında Rusya'da insanlarda sıklıkla ölümle sonuçlanan salgınlar meydana geldiği, "Alimentary Toxic

Aleukia" olarak isimlendirilen; nekrotize edici, hemorajik ve merkezi sinir sistemini etkileyen hastalığa, küflerle kontamine tahılların tüketiminin neden olduğu anlaşılmıştır (Richard, 2003).

Aflatoksin ismini *Aspergillus flavus* toksininden alır (Samson vd., 2002). Aflatoksinler, ilk olarak 1960'ların başında İngiltere'de, hindilerde 100.000'den fazla ölüme neden olmuş ve "Turkey X Disease" nedeni olarak tanımlanmıştır. Hastalığa yemlere katılan aflatoksinle kontamine yerfıstığının neden olduğu bildirilmiştir (Allcroft ve Lewis, 1963; Richard, 2007). ABD'de yapılan çalışmalar aflatoksinlerin köpeklerde epizootik hepatit, domuzlarda küflü mısır zehirlenmesi ve gökkuşağı alabalıklarında kansere neden olduğunu ortaya çıkarmıştır (Newberne vd. 1966a, Newberne vd., 1966b; Newberne ve Butler, 1969). Araştırmacılar aflatoksijenik ve diğer mantarlar tarafından üretilen diğer mantar metabolitlerinin, gözlenen toksikolojiye katkıda bulunduğuna inanmaktadırlar (Coppock ve Jacobsen, 2009). Aflatoksinlerin suda yaşayan, çiftlik ve kümes hayvanlarında, insanlarda ve diğer türlerde güçlü hepatotoksin, mutajen, kanserojen, immünosupresan, teratojen etkilere sahip oldukları bildirilmiştir (Allcroft ve Lewis, 1963; Eaton ve Gallagher, 1994; Shuaib vd., 2010). Aflatoksinler doğal olarak oluşan en güçlü hepatik karsinojenlerdir. Aflatoksin kontaminasyonu mısır, pamuk tohumu, yer fıstığı, sorgum, buğday, pirinç, fındık, baharatlar, çeşniler, diğer hammadde ve işlenmiş gıdalarda ekonomik kayıplara neden olur. Yaygınlıkları ve toksisiteleri nedeniyle, aflatoksinler dünya çapında halk sağlığı açısından çok önemlidir. İnsan popülasyonundaki aflatoksikozis, özellikle bitkilerin yoksulluk, kuraklık gibi olumsuz koşullarda yetiştirildiği bölgelerde önemli bir halk sağlığı sorunudur ve bitkiler üzerindeki iklim stresi arttıkça durum daha da kötüleşebilir. (Coppock vd., 2018).

### **1.1.1. Aflatoksin Üreten Mantarlar**

En yaygın olarak kabul edilen aflatoksijenik mantarlar *Aspergillus flavus* (*A.flavus*), *Aspergillus parasiticus* (*A.parasiticus*) ve *Aspergillus nomius* (*A.nomius*)'tur. Diğer *Aspergillus* türlerinin de aflatoksin ürettiği bildirilmiştir.

**Çizelge 1.1.** Aflatoksin Üreten *Aspergillus* Türleri (Varga vd. 2009; 2011)

Tür	Kaynak	Tespit Edilen Mikotoksin	Referans
<i>A. bombycis</i> (F)	Japonya, Endonezya	AFB, AFG, KA, diğer	Peterson vd. 2001
<i>A. flavus</i> (F)	Dünya çapında	AFB1, AFB2, KA, CPA, diğer	Codner vd. 1963
<i>A. nomius</i> (F)	ABD, Tayland, Japonya, Hindistan, Brezilya	AFB, AFG, KA, diğer	Kurtzman vd. 1987
<i>A. parasiticus</i> (F)	ABD, Uganda, Hindistan Japonya, Avustralya, G.Amerika	AFB, AFG, KA, diğer	Schroeder, 1966
<i>A. parvisclerotigenus</i> (F)	Nijerya	AFB, AFG, CPA, KA, diğer	Frisvad vd. 2005
<i>A. pseudocaelatus</i> (F)	Arjantin	AFB, AFG, CPA, KA	Varga vd. 2011
<i>A. minisclerotigenes</i> (F)	ABD, Nijerya, Avustralya, Arjantin	AFB, AFG, KA, CPA, diğer	Pildain vd. 2008
<i>A. arachidicola</i> (F)	Arjantin	AFB, AFG, KA, CPA, diğer	Pildain vd. 2008
<i>A. pseudonomius</i> (F)	ABD	AFB1, KA, diğer	Varga vd. 2011
<i>A. pseudotamarii</i> (F)	Japonya, Arjantin	AFB1, KA CPA	Ito vd. 2001
<i>A. ochraceoroseus</i> (O)	Fildişi Sahili	AFB1, AFB2, ST, diğer	Frisvad vd. 2005
<i>A. rambellii</i> (O)	Fildişi Sahili	AFB1, AFB2, ST, diğer	Frisvad vd. 2005
<i>E. astellata</i> (N)	Ekvator	AFB1, ST, diğer	Frisvad vd. 2004
<i>E. olivicola</i> (N)	İtalya	AFB1, ST, diğer	Zalar vd. 2008
<i>E. venezuelensis</i> (N)	Venezuela	AFB1, ST, diğer	Frisvad ve Samson, 2004

Tür: F, Flavi; O, Ochraceorosei; and N, Nidulantes. Tespit Edilen Mikotoksin: AFB, aflatoksin B; AFG, aflatoksin G; CPA, siklopiazonik asit; ST, sterigmatosistin; KA, kojic asit.

Aflatoksijenik *Aspergillus* türleri genellikle topraktaki bitki kaynaklı döküntülerde ve ayrıca hayvan gübresinde ürerler. Böcekler ve hava akımları aflatoksijenik mantarların sporlarını bitkilere yayar ve bu mantarlar genellikle çiçek organlarını ve böceklerin neden olduğu hasarlı alanları kolonize eder. Bitki artıklarına ek olarak aflatoksijenik mantarların sporları, miselleri veya sklerotileri genellikle toprakta, hammadde depolama alanlarında, işleme tesislerinde ve üretilen ürünlerin dağıtım sistemlerinde de bulunur. *A. flavus* B gurubu aflatoksin üretir. *A. flavus* ve diğer türler de siklopiazonik asit üretebilir. *A. parasiticus* suşları genellikle AFB1 ve değişen miktarlarda AFB2, AFG1 ve AFG2 üretir. *A. nomius* tarafından üretilen aflatoksin profili *A. parasiticus* gibidir. Aflatoksijenik *Aspergillus* suşları da sterigmatosistin üretebilir. Aflatoksijenik mantarlar ve ürettikleri mikotoksinler Çizelge 1.1.'de gösterilmiştir (Coppock vd., 2018).

### 1.1.2 Aflatoksijenik Mantarların Üreme Koşulları

Aflatoksin üretimi ile ilişkili mantarlar *A. flavus*, *A. parasiticus* ve *A. nomius*'tur. Bu mantarlar toprakta yaygın olarak bulunur ve genellikle bitkisel materyallerin çürümmesine katkıda bulunurlar (Jacobsen vd., 2007). Aflatoksijenik türler için genel üreme koşulları, %80-85 veya daha fazla bağıl nem içeriği ile optimum 25-37°C'de olmak üzere 13-42°C arasındaki sıcaklıktır. *A. flavus*'un üremesi ve toksin üretebilmesi için sırasıyla minimum 0,80 ve 0,82 su aktivitesi (aw); *A. parasiticus*'un üremesi ve toksin üretebilmesi için ise minimum 0,84 ve 0,87 aw gereklidir. Aflatoksin üretimi için *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un optimum 33°C sıcaklık ve 0,99 aw değerlerine ihtiyacı vardır. (Sweeney ve Dobson, 1998; Murphy vd., 2006).

Sıcaklık ve bağıl neme ek olarak, aflatoksin üretimini etkileyen diğer faktörler substratlardaki karbon, nitrojen, bitki metabolitleri ve şekerlerdir. Yüksek aflatoksin üretimi genellikle mantar tohum embriyosunda ürettiği zaman ortaya çıkar. Hasat sırasında ve hammadde işleme sistemlerinde hasar gören tohumlar, *Aspergillus* ve diğer mantar türleri tarafından istilaya karşı daha hassastır. Aflatoksijenik mantarların üremesi ve aflatoksin üretimi, özellikle hasar görmüş yüksek nemli tohumlarda hızla ortaya çıkabilir (Coppock vd., 2018). Hasarlı mısır taneleri (%57) üzerinde deneysel çalışmada, 6,5 günde 25 ppm AFB1 saptandığı bildirilmiştir (Seitz vd., 1982).

*A. flavus* ve *A. fumigatus* hayvanlarda ve insanlarda patojen olarak da tanımlanmıştır. Aflatoksijenik mantarlar, tipik olarak immün yetmezliği olan hayvanları ve insanları enfekte eder. Dokulardan izole edilen, kültüre edilmiş *A. flavus* ve *A. fumigatus* üzerinde yapılan çalışmalar, bu mantarların aflatoksin üretebileceğini ve yapılan kimyasal analizler enfekte dokularda aflatoksinlerin mevcut olduğunu göstermiştir (Pepeljnjak vd., 2004).

### 1.1.3. Aflatoksin Kaynakları

Aflatoksijenik mantarların üremesini destekleyebilen hemen hemen her gıda veya yem maddesi aflatoksin içerebilir. Aflatoksinler ve metabolitleri yenilen yemlerle

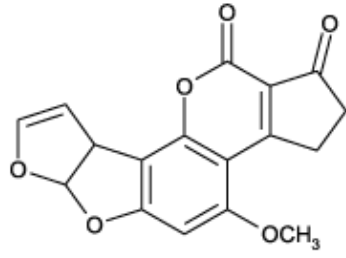
hayvansal ürünlere aktarılabilir. AFB1'in hayvan metaboliti olan AFM1, inek, keçi ve insan sütünde tespit edilmiştir. Doğal koşullarda, esasen tüm evcil hayvan türleri aflatoksinlerle zehirlenmektedir. Evcil hayvan yemlerindeki aflatoksin kaynakları başlıca mısır ve mısır yan ürünleri, pirinç, darı ve yer fıstığı yan ürünleridir. Artık yemek, küflü ekmek ve hayvan yemlerine yönlendirilen diğer yiyecekler aflatoksin kaynağı olabilir. Sert kabuklu yemişler, yer fıstığı, incir, yağlı tohumlar, tütün, hindistancevizi, çeşniler ve baharatlar, tahıl taneleri, yumurta ürünleri, peynir ve diğer pek çok hammadde, yem ve gıda maddelerinin aflatoksin içerdiği gösterilmiştir (Coppock vd., 2018).

#### **1.1.4 Aflatoksinlerin Kimyasal Özellikleri**

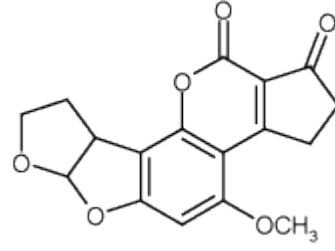
Günümüzde en önemli aflatoksin türleri olarak B1, B2, G1 ve G2 olan 20'den fazla molekülü ve bunların izole edilmiş türevleri bilinmektedir. Aflatoksinlerin kimyasal yapıları benzerdir ve hepsinde bifuranoid bir yapıya bağlı bir kumarinik merkezi çekirdek vardır (Şekil 1.1.). Aflatoksin B molekülünde bir siklopentan halkası, aflatoksin G'de bir lakton halkası vardır (WHO, 2002).

Aflatoksinler ve diğer heterosiklik bileşikler floresan özelliğe sahip maddelerdir. Ultraviyole ışık altında AFB1 ve AFB2 mavi, AFG1 ve AFG2 yeşil floresan verir. AFB1, gıda maddelerinde en sık bulunan ve en yüksek toksijenik güce sahip olan aflatoksindir (Leeson vd., 1995). Toksik güç AFB1>AFG1>AFB2>AFG2 şeklindedir. Hidroksillenmiş aflatoksin metabolitleri olan AFM1 ve AFM2 sırasıyla AFB1 ve AFB2'den oluşur (Coppock vd., 2018).

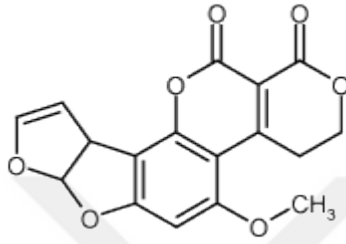
Kristal formdaki aflatoksin metanol ve kloroform benzeri çözücülerde çözünür. Oksitleyicilerin varlığında, pH 3'ün altında ve pH 10'un üzerinde stabil değildir ve saf iken UV radyasyonda parçalanır (Miraglia vd., 2004). Toksin 100°C'nin üstündeki ısı derecelerinde bozulmaz. Bundan dolayı pastörizasyon gibi işlemlerden etkilenmezler (Park, 2002). Aflatoksinler, yapısındaki lakton halkası nedeniyle hipoklorit ve amonyak gibi alkalilere karşı hassastır. Bu özellik nedeniyle alkaliler, aflatoksinlerin gıdalardan elimine edilmesine yönelik çalışmalarda kullanılmaktadır (Deshpande, 2002).



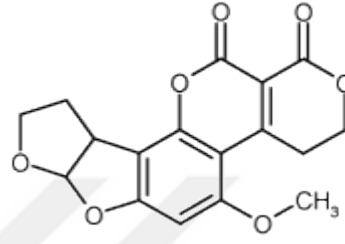
a. AFB1



b. AFB2



c. AFG1



d. AFG2

Şekil 1.1. AFB1(a), AFB2 (b), AFG1(c) ve AFG2(d)'nin kimyasal yapıları

### 1.1.5. Aflatoksinlerin Metabolizması

Ağız yoluyla alınan aflatoksinler gastrointestinal sistemden pasif difüzyonla etkili bir şekilde emilir ve esas olarak bağırsaktan hepatic portal kana aktarılır. Ratlarda AFB1'in emilim hızı konsantrasyona bağlıdır. Aflatoksinler genç hayvanlarda yaşlı hayvanlara göre daha etkili bir şekilde emilir. Yapılan bir çalışmada AFB1'in 2,5 haftalık ratlarda 4-5 haftalık ratlara göre 15 kat daha fazla emildiği gösterilmiştir. Ratlarda AFB1 en fazla duodenum ve jejunumdan emilir. Laktasyon emilimini etkileyebilir (Coppock vd., 2018). Ayrıca sığırlarda yapılan bir çalışmada aflatoksinlerin rumenden hızlı şekilde emildiği de gösterilmiştir (Cook vd., 1986).

Aflatoksinler esas olarak karaciğerde ayrıca böbrek ve bağırsakta biyotransformasyona uğrar. Karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi (CYP) yoluyla biyotransformasyona uğrayan aflatoksinler süt, yumurta, idrar, meni, safra ve dışkı ile atılır. Biyotransformasyonda oksidatif hidroksilasyon, O-dimetilasyon ve epoksidasyon reaksiyonları sonucu AFB1-8,9-epoksit, Q<sub>1</sub>, M<sub>1</sub>, ve P<sub>1</sub> gibi ara ürünler oluşmaktadır. AFB1-8,9-epoksit dışında, diğer biyotransformasyon ürünleri AFB1'den daha az toksiktir. CYP, AFB1'in AFB1-8,9-epoksite biyotransformasyonunda anahtar bir role sahiptir ve oluşan AFB1-8,9-epoksit DNA,

RNA ve proteinler ile eklentiler oluşturur. AFB1-8,9-epoksidin glutatyon (GSH) ile konjugasyonu önemli bir detoksifikasyon yoludur. AFB1'in diğer biyotransformasyon ürünleri, AFH1'e metabolize edilebilen AFQ1'dir. AFB1 ayrıca AFP1, AFM1, aflatoksikol ve diğer metabolitlere de metabolize edilir. AFP1, AFM1, AFQ1 ve aflatoksikol, glukuronid ve sülfat konjugatları oluşturur. Glutatyon S-transferazlarının (GST) AFB1-8,9-epoksit için afinitesi de önemlidir (Cary vd., 2000; Bhatnagar ve Garcia, 2001; Murphy vd., 2006).

Yapılan bir çalışmada sığırlara ağız yoluyla aflatoksin (%42 AFB1 ve %27 AFB2) verildikten 2 saat sonra rumen içeriğinde AFM1'in rumendeki flora ve fauna tarafından oluşturulduğu ortaya koyulmuştur (Cook vd., 1986). Bingham vd. (2004) köpek idrarında AFM1 ve AFP1'i tanımlamıştır. Sığırlar AFB1'i ağırlıklı olarak dışkıyla AFM1'i ise ağırlıklı olarak idrarla atarlar (Stubblefield vd., 1983).

Aflatoksinlerin metabolizması toksikasyonla bağlantılıdır (Eaton ve Gallagher, 1994). AFB1, CYP'ye bağlı bir reaksiyonla, hücrede makromoleküllerle eklentiler oluşturan AFB1-8,9-epokside metabolize edilir. AFB1-8,9-epoksidin makromoleküllere olan affinitesi sırasıyla DNA>RNA>protein şeklindedir. DNA eklentisi, N<sup>7</sup>-guanin ile oluşturulur ve bu eklenti, DNA onarım işlemlerine nispeten dirençlidir. AFB1-8,9-epoksit ve DNA arasındaki bağ, toksinin yapısını ve biyolojik aktivitesini, dolayısıyla birincil mutajenik ve karsinojenik etkilerini değiştirir. Rat karaciğeri modellerinde, AFB1-N<sup>7</sup>-guanin eklentileri oluşumdan sonra kaldırılabilir ve bu da DNA molekülünde adenin ile doldurulma eğiliminde olan apuridik bölgelere yol açar. Bu guaninden timine transversiyon, hücre DNA'sında oldukça önemli bir mutasyon noktasını temsil eder (Aguillar vd., 1993). CYP sisteminin yukarı regülasyonu aflatoksinlerin toksisitesini artırır. AFB1 karaciğer, bağışıklık sistemi ve muhtemelen vücuttaki tüm sistemlerde genetik ifadeyi değiştirir. Aflatoksinlere karşı türlerin hassasiyeti biyoaktivasyon ve detoksifikasyon oranı ile bağlantılıdır. AFB1-8,9-epoksit esas olarak GSH ile Faz II sentetik reaksiyonlarında detoksifiye edilir. Memelilerde, GST aracılı konjugasyon, önemli bir detoksifikasyon yolağıdır ve enzim aktivitesindeki tür farklılıkları, tür duyarlılığındaki farklılıkları kısmen açıklayabilir. Aflatoksinlerin toksisitesini azaltan diğer Faz II yolları, glukuronid ve sülfat oluşumudur (Coppock vd., 2018). AFM1, AFQ1 ve AFP1

epoksidasyon için iyi substratlar değildir, dolayısıyla AFB1'den daha az genotoksikler ve detoksifikasyon ürünleri olarak kabul edilirler. Bununla birlikte, AFM1 için bildirilen yüksek toksisite dikkate alındığında, bu metabolitin bir "detoksifikasyon ürünü" olarak düşünülmemesi gerektiği bildirilmiştir (Neal vd., 1998).

#### **1.1.6. Aflatoksinlerin Etkileri**

Aflatoksinlerin toksik etkileri doza ve maruz kalma süresine bağlıdır. Akut toksik sendrom, yüksek konsantrasyonda aflatoksin içeren yiyecekler tüketilerek ortaya çıkar ve etkileri kısa sürede görülür. Genel durumunun hızla bozulması, iştahsızlık, akut hepatit, sarılık, kanama ve ölüm ile karakterizedir. Karaciğer etkilenen ana organdır; hemorajik nekroz, sentrilobüler tıkanıklık, safra kanallarında hücre proliferasyonu ve hepatositlerin yağlı infiltrasyonuna bağlı lezyonlar görülür (De Oliveira ve Corassin, 2014). Aflatoksinlerin toksik etkilerine duyarlılığı türler arasında önemli ölçüde değişiklik gösterir. Ticari kümes hayvancılığı endüstrisinde kullanılan türlerle ilgili olarak, ördeklerde duyarlılık daha fazladır, bunu hindi, kaz, sülün ve tavuk izlemektedir. Aynı türün bireyleri arasında bile, doz-yanıt ilişkisi diğer faktörlerin yanı sıra ırk, cinsiyet, yaş ve diyet kompozisyonuna göre değişebilir. Çoğu tür için erkekler dişilere göre daha hassastır, ancak genel olarak duyarlılık gençlerde yetişkinlere göre belirgin şekilde daha yüksektir (WHO, 2002). Kronik aflatoksikoz genel olarak, düşük seviyelerde aflatoksin ile kontamine olmuş yiyeceklerin uzun süre yenilmesinden kaynaklanır ve en belirgin klinik belirti, genç hayvanların büyüme hızındaki azalmadır. Doğal koşullarda aflatoksikozisin esas etkisi budur. Bu hastalığın teşhis edilmesi zordur ve hayvansal üretimde önemli ekonomik kayıplara neden olur (Leeson vd., 1995).

Aflatoksinler doğal olarak oluşan en güçlü hepatik karsinojenlerdir. Hepatoselüler karsinom (HCC), en çok ölüme neden olan kanser türlerindedir (Kew, 2002; Chacko ve Samanta, 2016). Diyetle AFB1'e maruz kalma ve hepatit B virüsü ile enfeksiyon HCC'nin iki ana nedenidir. Güneydoğu Asya ve Sahra Altı Afrika bölgeleri, insanların hem hepatit B virüsü hem de AFB1 maruziyetinden muzdarip olduğu HCC açısından sorunlu yerlerdir. Hindistan'da, HCC hastalarının %58'inin



karaciğer biyopsilerinde AFB1 saptandığı bildirilmiştir. Ayrıca AFB1 maruziyeti, atılan AFB1 metabolitleri ve HCC riski arasında pozitif bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (Asim vd., 2011; Williams vd., 2010).

Aflatoksinler serumdaki karaciğer enzimlerinin aktivitelerinin artmasına neden olur. Artan aktivite karaciğer hasarının göstergesidir. Serumdaki artan hepatik enzimlerin aktiviteleri arasında gama-glutamil transferaz (GGT), aspartat aminotransferaz (AST), alkalın fosfatazlar (ALP), sorbitol dehidrogenaz (SDH), ornitin karbamil transferaz (OCT) ve izositrat dehidrogenaz (ICD) bulunur. Seruma salındığında, metabolik süreçler hepatik enzimi serumdan uzaklaştırdıkça hepatik enzimlerin aktiviteleri azalır. Aflatoksikozda en tutarlı şekilde yükseldiği bildirilen serumdaki hepatik enzimlerin aktiviteleri GGT, AST, alanin aminotransferaz (ALT) (ruminant olmayanlar) ve SDH'dir. Serum bilirubin seviyeleri de yükselir ve geviş getiren hayvanlarda fotosensitizasyon meydana gelebilir. Aflatoksikozda serum proteinleri azalabilir veya albümin ve  $\beta$ -globulinler azalır ve  $\gamma$ -globulinler artar. Gıda kaynaklı aflatoksikoz olgusu bulunan 50 köpek üzerinde yapılan bir çalışmada yüksek serum bilirubin ve ALT, düşük kolesterol, köpeklerde aflatoksikozun ölümcül sonucunun bir göstergesi olabileceğini göstermiştir. Yaygın laboratuvar bulguları arasında AST (%86), ALP (%84) ve ALT (%79) aktivitelerinin artması; hipoantitrombinemi (%86), uzamış protrombin (PT, %82) ve aktive olmuş parsiyel tromboplastin süreleri (aPTT, %80), hiperbilirubinemi (%73), hipokolesterolemi (%60) hipoalbüminemi (%47) ve trombositopeni (%42) bulunmuştur (Bruchim vd., 2012). Kanatlı hayvanlarda eritrosit sayısında ve hemoglobinde azalma, heteropeni ve lenfopeniden oluşan lökopeni meydana gelebilir. Aflatoksikoz patogenezi açısından hepatik enzim tayinlerinin zamanlaması da önemlidir. Hepatik hücrelerden salınan enzim oranı ve serumdaki yarı ömrü yanı sıra enzimlerin hepatik olmayan kaynakları da dikkate alınmalıdır. Serumdaki GGT aktivitesi AST'den daha yavaş düşer. Serum proteinlerinin yorumlanmasında dehidrasyon düşünülmelidir ve ileri aflatoksikozda çoklu organ yetmezliği meydana gelebilir. Kanama, kan parametrelerini değiştirebilir. Klinik belirtiler ve patolojik görünüm değişebilir ve bu durum saha koşullarında çoklu mikotoksinlere maruz kalmaya bağlı olabilir. Hayvanlarda aflatoksikoz ile eş zamanlı bulaşıcı hastalıklar da olabilir (Coppock vd., 2012).

Aflatoksinler immünotoksiktir ve hastalıklara karşı doğal direnci azaltır ve aşırıya bağlı bağışıklığı da bozar. Bulaşıcı hastalıklarda iyileşme uzun sürebilir ve ek tedaviler gerektirebilir. İmmün disfonksiyon belirtisi, genellikle yüksek patojenler olarak kabul edilmeyen organizmaların neden olduğu enfeksiyonlar olabilir. AFB1 lenfoid hücre popülasyonlarını düşürür, lenfoblastogenezi bastırır ve hem kutanöz gecikmiş tipte aşırı duyarlılığı hem de greft-konakçı reaksiyonunu azaltır ve doğuştan gelen bağışıklığı baskılar. AFB1, fagositik aktivite ve oksidatif radikal üretimi dahil olmak üzere doğal öldürücü sitoliz ve makrofaj fonksiyonlarını azaltır. AFB1, doğuştan gelen ve edinilmiş bağışıklık yanıtlarının genetik ifadesini değiştirir (Coppock vd., 2018). Kümes hayvanlarında ve diğer hayvan modellerinde gösterilen immünosupresyonun etkileri arasında bursa fabricius ve timus aplazisi, T-hücrelerinin sayısı ve aktivitesinin azalması, antikör yanıtın azalması, fagositik aktivitenin baskılanması ve komplement (C4), interferon, IgG ve IgA gibi humoral bileşenlerin azalması bulunur (De Oliveira ve Corassin, 2014).

Yapılan çalışmalarda AFB1'in Reaktif Oksijen Türlerini (ROS) indükleyerek hücrelere ve DNA'ya zarar vererek oksidatif strese neden olduğu, ayrıca DNA hasarına ve mitokondriyal geçirgenlik değişikliklerine yol açan genetik değişiklikleri de indüklediği ifade edilmiştir (Liu ve Wang, 2016). AFB1'in karaciğerde apoptotik genlerden *Bax* ve *Caspase-3* ekspresyonunu arttırdığı ve *Bcl-2* ekspresyonunda önemli bir azalma oluşturduğu ve böylece mitokondriyal yol ile apoptozu indüklediği ifade edilmektedir (Abdel-Wahab ve Al-Harizy, 2013; Abdel-Aziem vd, 2014). Ayrıca AFB1'in *NFκB* geni ve protein ekspresyonunu arttırdığı ve Nükleer faktör-E2 ile ilişkili faktörün (*Nrf2*) baskılanması yoluyla belirgin bir proinflamatuvar etkiye sahip olduğu da bildirilmiştir (Taranu vd., 2019).

### **1.1.7. Antioksidan Savunma Sistemi**

İnsan vücudunda kompleks bir yapıdan oluşan, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemi vardır. Fizyolojik olarak mitokondriyal enerji üretimi sırasında devamlı olarak serbest radikaller üretilir. Hücrede serbest radikallere karşı ana savunma hattını katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) oluşturur. Serbest radikal miktarının artışı oksidatif strese ve

hücrede hasara sebep olur. (Aslankoç vd. 2019). Normal koşullarda ROS ile vücudun antioksidan sistemi arasında bir denge vardır. Bu durumun ROS lehine bozularak süperoksit miktarının artması oksidatif strese neden olur (Sies ve Cadenas, 1985; Halliwell, 2007). Stres; hücredeki yağ, protein ve hücre içi sinyalizasyona zarar verir (Lopez-Alarcona ve Denicola, 2013). Kanser, diyabet, kalp-damar hastalıkları, Alzheimer, Parkinson gibi birçok hastalığa oksidatif stresin sebep olduğu ileri sürülmektedir (Pisoschi ve Pop, 2015). Antioksidanlar organizmada doğal olarak sentezlenir, ayrıca gıdalar yoluyla dışarıdan da alınabilir (Lobo vd. 2010). En dış yörüngesinde eşlenmemiş bir veya daha çok elektron bulunduran moleküller olan serbest radikaller, güçlü oksidan özelliğe sahip ve kısa ömürlü oksijen metabolitleridir. Bu moleküller organizmada birçok ajanla birleşerek değişik biyolojik etkilere neden olurlar (Poljsak vd.,2011). Vücuttaki metabolik olaylar ve ilaçlar, toksinler, sigara, alkol, UV radyasyon gibi dış etkiler sonucu serbest radikaller devamlı olarak üretilir (Poljsak vd.,2013; Sen vd., 2010 ).

Hücre zarındaki yağ asitleri ve kolesterolün serbest radikallerle reaksiyonu sonucu lipit peroksidasyonu gerçekleşir. Bunu takip eden bir dizi reaksiyonla lipit peroksitleri oluşur. Lipit peroksitlerinin yıkımlanması ile 4-hidroksinonenal, akrolein ve malondialdehit (MDA) oluşur (Young ve Woodside, 2001; Ayala vd. 2014). Lipid peroksidasyonunun spesifik bir göstergesi olmamasına rağmen, oksidatif stresle arasındaki korelasyon nedeniyle stres seviyesini belirlemede MDA için değişik yöntemler geliştirilmiş ve kullanılmıştır (Frankel ve Neff, 1983). Oksidatif stres hücre zarına zarar vererek MDA miktarının artmasına neden olur. MDA, DNA'daki bazlarla etkileşime girerek mutajeniteye sebep olur. Hidroksil radikalleri de DNA bazları ile etkileşerek DNA hasarına ve zincirde kopmaya neden olarak kanser oluşumuna yol açar (Pisoschi ve Pop, 2015).

Antioksidanlar; a) Serbest radikalleri tutarak veya daha zararsız hale dönüştürerek, b) Serbest radikallere elektron ekleyerek zararsız hale getirerek veya etkilerini ya da hızlarını düşürerek (Flavonoidler ve vitaminler bu şekilde etki eder), c) Serbest radikallerin neden olduğu hasarı tamir ederek, d) Oksijen radikalleri tutup zincirlerini kırarak işlevsiz hale getirerek etkilerini gösterirler (Valko vd. 2007). Vücut tarafından üretilen GSH-Px, CAT ve SOD birinci basamak antoksidanları oluşturur

(enzimatik). Ayrıca gıdalarla ağız yoluyla alınan (enzimatik olmayan) antioksidanlar da vardır (Ighodaro ve Akinloye, 2018). Enzimatik olmayan antioksidanlara lipoik asit (Smith vd. 2004), karotenoidler (Sharoni vd., 2004), C vitamini (Kojo, 2004; Saygin vd. 2018), kateşin (Lotito ve Fraga 1998), resveratrol (Aslankoç vd., 2018) ile kuersetin (Postaci vd. 2018) gibi maddeler örnek gösterilebilir.

### **1.1.8. Aflatoksinlerden Korunma Yöntemleri**

Aflatoksinlerden en iyi korunma yolu, insan kontrolü altındaki aşamalarda toksin oluşumunu engellemek ve mümkünse aflatoksin tüketiminden kaçınmaktır. Aflatoksikoz için henüz spesifik bir tedavi tanımlanmamıştır. Aflatoksin içeren tüm kaynakların diyetten çıkarılması ve etkilenenlere semptomatik tedavi önerilmektedir. Farklı maddelerin aflatoksinlerin toksik etkilerini azalttığı da bildirilmiştir (Coppock vd., 2018).

Bazı doğal bileşikler veya detoksifiye edici enzimler, AFB1'in neden olduğu oksidatif stres ve hepatotoksiteye korunma amacıyla kullanılmıştır. Bunlardan bazılarında değinilecek olunursa; AFB1 uygulanan farelerde oral quercetin takviyesinin serum laktat dehidrogenaz seviyelerini düşürdüğü, hepatik GSH seviyelerini ve SOD aktivitesini artırdığı ve hem karaciğerde hem de böbrekte lipid peroksidasyonunu azalttığı bildirilmiştir.(Choi vd., 2010). AFB1 uygulanan ratlarda probiyotik fermente süt ve chlorophyllinin, tiyobarbitürik asit-reaktif maddelerinin düzeylerini düşürerek ve GPx, SOD, katalaz ve GST gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırarak önemli bir hepatoprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir (Kumar vd. 2012). AFB1 ile birincil karaciğer kanseri indüklenmiş ratlara kaempferol uygulaması sonucunda; bozulmuş lipid peroksidasyon aktiviteleri, azalan enzimatik ve enzime bağlı olmayan antioksidan seviyeleri ve değişmiş ksenobiyotik enzim seviyelerinin önemli ölçüde standarta yakın seviyelere geri döndüğü bildirilmiştir (Kulanthaivel vd., 2012).

Vipin vd. (2017), fenoliklerden zengin zencefil ekstresinin AFB1 kaynaklı oksidatif stres ve hepatotoksiteye karşı *in vitro* ve *in vivo* koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmada, HepG2 hücrelerinin zencefil ekstresi ile ön işleme tabi tutulması,

AFB1'in neden olduğu hücre içi ROS üretimini, DNA sarmalı kırılmasını ve sitotoksisteyi önemli ölçüde inhibe ettiğini bildirmiştir. Ayrıca erkek Wistar ratlara 28 gün boyunca oral olarak AFB1 (200 mg/kg) ve zencefil ekstresinin (100 ve 250 mg/kg) verilmesi sonucu zencefilin AFB1 kaynaklı toksisteye bağı karaciğer hasarındaki serum belirteç düzeylerini önemli ölçüde azalttığı, ayrıca lipid peroksidasyonunu azaltarak ve antioksidan enzim aktivitelerini artırarak önemli hepatoprotektif etki gösterdiği belirtilmiştir. Bunlara ek olarak, zencefil ekstresi uygulamasının *Nrf2/HO-1* yolağını yukarı regüle ederek, AFB1 kaynaklı hepatotoksisteyi inhibe etme etkinliğini artırdığı bildirilmiştir. *Nrf2*, hücresel homeostazın ana düzenleyicisi olan redoksa duyarlı bir transkripsiyon faktörüdür. *Nrf2*, öncelikle karaciğer gibi metabolik olarak aktif organlarda ifade edilir. Bu nedenle, karaciğer hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde *Nrf2*'nin , mühim bir yeri vardır (Lee ve Surh, 2005; Egger vd., 2008; Zhu vd., 2016). Gıdalarda bulunan *Nrf2*'yi aktive edebilen fitokimyasalların AFB1 kaynaklı karaciğer hasarına karşı korunmada faydalı olabileceği bildirilmiştir (Costa vd., 2007; Cavin vd., 2008; Hayes vd., 2010).

Hathout vd. (2011), aflatoksinlerin neden olduğu oksidatif strese karşı *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus reuteri*'nin etkilerini araştırdıkları çalışmada bunların aflatoksinleri gastrointestinal sistemde bağlayarak biyoyararlanımını azalttığını böylece karaciğerin tüm biyokimyasal parametrelerinde ve histolojik tablosunda önemli bir iyileşme sağladığını bildirmişlerdir.

Aflatoksinlerin biyotransformasyonunu değiştirmek için doğal ürünlerden polifenollerden zengin yeşil çayın AFB1 kaynaklı hepatokarsinogenezin başlamasını azalttığı veya bloke ettiği bildirilmiştir (Coppock ve Dziwenka, 2016). Ayrıca melatonin (Abdel-Wahhab vd., 2005; Soyoz vd., 2004), likopen (Tang vd., 2007), propolis (Varanda vd., 1999), sarımsak (Abdel-Wahhab ve Aly, 2003; Guyonnet vd., 2002), kahve (Cavin vd., 1998), su yosunu (Abdel-Wahhab vd., 2006), kil mineralleri (Miazzo vd., 2000), beyaz biber ekstraktları (Hussein vd., 2019) gibi doğal maddelerin yanı sıra butilhidroksitolüen ve butilhidroksianisol (Soni vd., 1997), etoksiquin (Mandel vd., 1987), N-asetil sistein (Valadiviva vd., 2001) gibi

maddelerin de değişik yollarla mikotoksinlerin neden olduğu olumsuzluklara karşı etkili olduklarını bildiren çalışmalarda bulunmaktadır.

## 1.2. Bor

### 1.2.1. Borun Genel zellikleri

Periyodik tablonun 3A grubunda yer alan Bor'un, (B), atom numarası 5, atom ağırlığı 10,811, yoğunluğu 2,34 g/cc, ergime noktası 2300°C ve kaynama noktası 4002°C'dir. Yarı iletken yapıda, metalle ametal arası bir elementtir. Bileşik halde iken ametal gibi davranan bor, saf halde elektriği iletir. Doğada saf halde bulunmayan, oksijenle reaksiyonu sonucu oluşan mineraller halinde bulunan bor, metal ve ametallerle bileşikler oluşturur. Doğada 230'dan fazla bor minerali bulunur. Bor doğada toprak (10-20ppm), deniz suyu (0,5-9,6ppm) ve tatlı sularda (0,01-1,5ppm) yaygın olarak bulunur. Bor bileşiklerinin en basitleri bor oksit ( $B_2O_3$ ) ve borik asit ( $H_3BO_3$ )'tir. Kalsiyumlu olan kolemanit ( $Ca_2B_6O_{11} \cdot 5H_2O$ ), kalsiyum-sodyumlu olan leksit ( $NaCaB_5O_9 \cdot 8H_2O$ ) ve sodyuma bağlı olana tinkal ( $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ ) denir (şaylı, 2000; İnt. Kay. 1). Dünyadaki bor yataklarının yaklaşık %73' Türkiye'dedir. Türkiye'de rezerv olarak en çok kolemanit ve tinkal bulunur. Bor; cam, seramik, temizlik, tekstil, metalürji, enerji, yalıtım, tarım ve sağlık gibi birçok sektörde de kullanılmaktadır (İnt. Kay. 1).

### 1.2.2. Borun Tarihçesi

Babillilerden beri kullanıldığına inanılan inorganik boratların yaklaşık 6000 yıldır bilindiği bildirilmektedir. Mısırlılar, Araplar, Tibetliler ve Çinliler de bu bileşikleri kullanmışlardır. Araplar, boraks içeren birçok mineral için "buraq" terimini kullanmışlardı. Babiller tarafından altın madenciliğinde, eski Mısırlılar tarafından mumyalama, metalürji ve sağlık alanlarında, Eski Yunan ve Romalılar tarafından arena temizliği için kullanılmıştır. Araplar, MS. 875 yıllarında ilaç yapımında bor tuzlarını kullanmışlardır (Travis ve Cocks, 1984; Woods, 1994; Yiğitbaşioğlu, 2006). XIII yüzyılda Marco Polo boru Tibet'ten Avrupa'ya getirmiştir. William Homberg tarafından 1702 yılında ilk kez borik asit elde edilmiştir. 1771 yılında katı borik asit

olan sassolit, İtalya'nın Toscana bölgesindeki sıcak su kaynaklarında bulunmuştur. Elemental bor, Fransız kimyagerler Joseph Louis Gay-Lussac ve Louis-JacquesThe'-nard ve ayrıca İngiliz kimyager Sir Humphry Davy tarafından 1808'de keşfedilmiştir. Türkiye'deki bor madenlerinin Doğu Roma İmparatorluğundan beri kullanıldığı tahmin edilmektedir. Yurdumuzda ilk işletme 1865 yılında bir Fransız şirketi ile faaliyete başlamıştır (İnt. Kay. 3;Yünlü, 2016).

### **1.2.3. Borun Bitkilerdeki Önemi**

Bor, bitkilerin büyüme ve veriminde önemli etkilere sahiptir. Büyük oranda bitki hücre duvarlarında bulunan bor, gerek bitki büyümesi gerekse patojenlere karşı bitki direncinde önemli roller üstlenir. Bitkilerde kök büyümesi için ortamda yeterli miktarda bor bulunması gereklidir. Ayrıca polen canlılığı ve dölleme içinde bor gereklidir. Bitkilerde tohum, çiçek ve meyve bor eksikliğine karşı daha fazla hassastır (Güneş vd.,2017).

### **1.2.4. Borun İnsan ve Hayvan Sağlığındaki Önemi**

İnsan vücut kütlelerinin %98'inin metalik olmayan yedi makromineralden (karbon, oksijen, nitrojen, kükürt, hidrojen, fosfor ve klor) oluştuğu tahmin edilmektedir. Dört ana alkali metal, özellikle sodyum, magnezyum, potasyum ve kalsiyum yaklaşık %1,89'unu oluştururken, geri kalan %0,02 (veya ortalama bir yetişkin insanın 8,6 g'ı) 11 adet mikromineralden oluşur: Bu mikromineraler beş iz element (demir, çinko, bakır, manganez ve florin) ve altı ultra iz element (kobalt, iyot, selenyum, bor, molibden ve krom) ihtiva eder (Prashanth vd., 2015). Ultra iz elementler organizmanın büyümesi, gelişimi ve fizyolojisi için ppb düzeyinde ihtiyaç duyulan diyet mikromineraleridir (Arakawa, 2016; Al-Fartusie ve Mohssan, 2017).

Esansiyel ultra iz elementler, hücre büyümesinde ve çoğu proteinlerin, karbonhidratların ve lipidlerin metabolizmasında rol oynayan belirli enzimler için bir kofaktör olarak önemli rol oynarlar. Ayrıca büyüme, gelişme, kas ve sinir işlevi, normal hücresel işlev ve bazı hormonların ve bağ dokusunun sentezi için de

gereklidirler (Fox ve Zimba, 2018). Biyolojik süreçlerde ultra iz elementlerin rolü, kanser gibi bazı hastalıkların etiyojisini anlamak için hayati ipucu sağlayabilir. İz elementlerin, homeostazisin düzenlenmesi ve serbest radikal hasarının önlenmesi gibi yaşam için gerekli çeşitli süreçlerde önemli bir işlev görme yeteneği, ultra iz elementler ile birçok yaygın hastalık arasındaki pozitif korelasyona bir cevap sağlayabilir (Drago, 2017).

Ultra iz elementler biyolojik aktivitelerin temel bileşenleri olmasına rağmen, bu elementlerin vücuttaki aşırı seviyeleri toksik olabilir ve maligniteler gibi birçok ölümcül hastalığa yol açabilir. Aslında, bu elementlerin birikmesi, hatta eksiklikleri, hastalıklara neden olabilecek alternatif bir yolu harekete geçirebilir. Bu unsurlar arasındaki etkileşim, birçok beslenme bozukluğunun etiopatogenezinin dayandığı bir köprü görevi de görebilir (Arakawa, 2016).

Bor bitki, hayvan ve insan metabolizmasında hayati derecede önemli rollere sahip bir mineraldir. Osteogenezde, borun önemli bir yeri vardır. Bor noksanlığının kemik sağlığında olumsuzluklara neden olduğu bildirilmiştir (Nielsen, 2008). Bor, steroid hormonlarının üretimini ve aktivitesini etkileyerek kalsiyum kaybının ve kemik demineralizasyonunun önlenmesinde rol oynar. Bor takviyesinin peri ve postmenopozal kadınlarda idrarla atılan kalsiyum ve magnezyumu azalttığı, serum östradiol seviyeleri ile kalsiyum emilimini artırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Nielsen vd.,1987; Beattie ve Peace, 1993). Bor ayrıca D vitamini kullanımını olumlu yönde etkiler. Bor takviyesi, hayvanlarda mineral metabolizmasındaki D vitamini noksanlığına bağlı bozuklukları azaltır ve kemik yapımını uyarır (Hunt, 1994). Hayvan çalışmaları, bor eksikliği olan ratlarda çenelerdeki dişleri tutan alveolar kemiğin iyileşmesinin engellendiğini ortaya koymuştur. Bu da bor eksikliğinin osteogenezde belirgin bir azalma nedeniyle kemik iyileşmesinin bozulmasına neden olabileceğini göstermiştir (Gorustovich vd.,2008; Nielsen ve Stoecker, 2009).

2010 yılında yayınlanan bir araştırma, borun, kemik yapımına katılan D vitamini, testosteron ve 17 $\beta$ -estradiölü [E2] etkileyerek ve doku mineralizasyonunu sağlayan genlerin ekspresyonunu düzenleyerek osteoblastların mineralizasyonunu uyardığını



göstermiştir. Ayrıca borun doku mineralizasyonunu indüklemesi ile yara iyileşmesi üzerinde yararlı etkiler gösterdiği de belirtilmiştir (Hakkı vd.,2010). Derin yaralara %3 borik asit solüsyonu uygulamasının iyileşme için gereken süreyi azalttığını göstermiştir (Blech vd.,1990). İnsan fibroblastlarının kullanıldığı çalışmalar, yara iyileşmesinin borik asitin ekstraselüler matriksi etkilemesi yoluyla hızlandırıldığını göstermiştir (Benderdour vd.,2000). Yapılan bazı *in vitro* araştırmalar, borun faydalı etkilerinin, fibroblastlardaki kollajenaz, elastaz, alkalın fosfataz ve tripsin benzeri enzimler, gibi enzimleri doğrudan etkileyerek oluştuğunu göstermiştir (Nzietchueng vd., 2002).

Yapılan bir çalışma, borun çeşitli hücre dışı matriks proteinlerinin mRNA ekspresyonunu düzenlediğini, yara iyileşmesine katılanların yanında kolajen tip 1, osteopontin, kemik sialoprotein ve osteokalsin gibi mineralize doku ile ilişkili proteinlerin mRNA ekspresyonunu da düzenlediğini göstermiştir (Hakkı vd.,2010). Borun ayrıca alkalın fosfataz ve Bone morphogenic proteinin mRNA ekspresyonunu arttırdığı ifade edilmiştir (Ying vd.,2011).

Bor östrojen, testosteron gibi cinsiyet hormonlarını ve D vitamini kullanımını olumlu yönde etkiler. Bor ilavesini takiben hem kadınlarda hem de erkeklerde plasma steroid cinsiyet hormon seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (Nielsen vd.,1987; Naghii vd., 2011). Testosteron moleküllerinin tahminen %98'i kandaki proteinlere bağlanır ve bu şekildeki hormonların kılcal damarlardan çıkamadığından biyoyararlanımının olmadığı bilinmektedir (Morgentaler, 2009). Bu sebeple, bor ilavesi ile artan bağlanmamış serbest testosteronun yükselmesinin, serbest testosteronun düştüğü yaşlı erkeklerde yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır (Chueh vd.,2012). D vitamini eksikliği olan bireylerde yapılan hayvan (Hunt,1994; Dupre vd., 1994) ve insan (Nielsen vd., 1990; Miljkovic vd., 2009) çalışmalarında borun; 25-hidroksivitamin D3 (25[OH]D3) serum seviyelerini artırdığı gösterilmiştir. Bor, hormonal etkilerini cinsiyet hormonlarının ve D vitamininin yarılanma ömrünü ve biyoyararlanımını artırarak gösterir. Borun kemik metabolizması üzerindeki faydalı etkileri, kısmen hem östrodiol hem de D vitamininin üretimi ve biyolojik yarılanma ömrünü arttırmasına bağlıdır. 17 $\beta$ -estradiol üretimi için en basit ve tercih edilen yol, östronun keto grubunun bir tetrahidroborat tuzu olan potasyum borohidrür ile indirgenmesidir

(İnt. Kay. 2). D vitamini ile ilgili olarak, borun, 25(OH)D3'ün katabolizmasından sorumlu olan mikrozomal enzim olan 24-hidroksilazın aktivitesini bastırıldığı ileri sürülmüştür (Miljkovic vd., 2004; Pizzorno, 2015).

Yapılan insan deneylerinde bor takviyesinden sonra plazma bor konsantrasyonlarında önemli bir artış meydana gelirken, hs-CRP ve TNF- $\alpha$  seviyelerinde önemli düşüşler görülmüştür. Yayınlanan bir dizi makale borun inflamatuvar biomarker seviyelerini azalttığını bildirmiştir. (Naghii vd.,2011; Nielsen, 2000; Armstrong ve Spears, 2003)

Epidemiyolojik kanıtlar, vaka raporları, *in vivo* araştırmalar, borun osteoartrit tedavisinde etkili olabileceğine ilişkin kanıtlar sağlamıştır (Newnham, 1994; 2004; Scorei vd., 2011). Dünyada bor uygulaması ile osteoartrit yaygınlığı arasındaki bağlantıyı araştıran çalışmalar, 1 mg/gün ve üzeri bor alınan yerlerde tahmini artrit görülme sıklığının %20-70 olduğunu; 3-10 mg/gün olduğu yerlerde ise insidansın %0-10 olduğunu bildirmişlerdir (Korkmaz vd., 2007). Osteoartrit vakalarında sinoviyal sıvı ve kemiklerde bulunan bor miktarının daha düşük olduğu bildirilmiştir (Helliwell vd., 1996).

İnsanlarda bor yoksunluğu ve doygunluğu araştırmaları sonucunda eritrosit SOD aktivitesinin bor ilavesi ile kayda değer şekilde yükseldiği bildirilmiştir (Nielsen, 1994). Hayvan çalışmalarının sonuçlarına dayanarak araştırmacılar, borun anti-enflamatuvar etkilerinin, oksidatif salgı yapan hücrelerin (lökositler) ve dolaşım sistemi dışındaki nötrofiller ile istilacılar tarafından oluşturulan aşırı tepkinin inhibisyonu sayesinde oluştuğunu varsaymışlardır (Scorei vd., 2010). Bor ayrıca, kandaki ve hücrelerdeki SOD, katalaz ve GSH-Px gibi antioksidan enzimlerin düzeyini yükselterek serbest radikallerin temizlenmesini de artırır. Yapılan bir çalışmada kalsiyum fruktoboratın osteoartrit semptomları üzerinde oldukça olumlu etkileri olduğu bulunmuştur. (Miljkovic vd., 2009). Borun, bitki kaynaklı kalsiyum ile kombinasyon halinde, kalsiyum fruktoborat olarak, insanlarda C reaktif protein (CRP)'nin kandaki seviyelerini önemli ölçüde düşürdüğü gösterilmiştir (Scorei ve Scorei, 2013).

Bazı bor bileşiklerinin ağır metallerin neden olduğu genotoksisite üzerindeki etkilere ilişkin yapılan bir araştırmada; ağır metal uygulamalarının hem kardeş kromatid değişimini hem de mikronukleus insidansını ve plazmadaki MDA seviyelerini arttırdığı ve toplam GSH seviyesi ile antioksidan enzim aktivitelerini düşürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca, uygulanan bor bileşiklerinin düşük dozlarda bile ağır metallere bağlı genotoksisiteyi belirgin şekilde azalttığı bildirilmiştir (Turkez vd., 2012).

Hem hayvanlarda hem de insanlarda beyin elektriksel aktivitesinin değerlendirilmesi, bor yoksunluğunun beynin elektrik aktivitesinin azalmasına neden olduğunu göstermiştir. İnsanlarda, bor yoksunluğunun dikkat, kısa süreli hafıza, el becerisi ve motor hızında performans azalmasına neden olduğu bildirilmiştir (Penland, 1998).

Bor, riboz içeren S-adenosil metiyonin, diadenozin fosfatlar ve nikotinamid adenin dinükleotid gibi biyomoleküllerin oluşumunu ve aktivitesini de etkiler. Bu biyomoleküller, çok sayıda temel biyokimyasal süreçte rol alır (Nielsen, 2014; Bolaños vd., 2004 ).

Bor fosfoinositidler, glikoproteinler ve glikolipidlerle boroester kompleksleri oluşturur. Glikolipidler, hücre zarı bütünlüğünü ve işlevini etkileyen biyomoleküllerdir (Wimmer vd., 2009). Fosfoinositidler, lipid kinazların düzenlenmesinde rol oynar (Grabon vd., 2015). Glikoproteinler, hücre-hücre etkileşimlerinde rol oynayan önemli integral membran proteinleridir. Tüm ökaryotik hücre zarlarının dış yüzeyinde bulunan glikolipidler, çift katlı fosfolipid tabakasından hücre dışındaki sulu ortama uzanır ve belirli kimyasallar için bir tanınma yeri görevi görür, zarın stabilitesini korumaya yardımcı olur ve hücreleri dokuları oluşturmak için başka hücrelere bağlar. Bu biyomoleküllerle oluşan boroester kompleksleri sayesinde bor, yukarıdaki tüm eylemleri etkiler (Pizzorno, 2015).

Bazı bor bileşikleri histon deasetilaz inhibitörleridir (HDI). HDI'lar, gen ekspresyonunu değiştirme, tümör hücrelerinin büyümesini durdurma veya apoptozunu indükleme ve normal hücre farklılaşmasını uyarma yeteneklerinden

dolayı kanser ve nörolojik hastalıklar için potansiyel terapötik ajanlardır. (Schroeder ve Westendorf, 2005).

Doğal ve sentetik bor içeren bileşiklerinin antikanser ajanları olarak kullanımı, özellikle ameliyat edilemeyen kanserlerde ve yüksek maligniteli kanserlerde artış göstermiştir. Bor bileşiklerinin farklı yollarla kanser hücrelerinin çoğalmasına ve fizyolojisine etki ettiği bildirilmiştir (Scorei ve Popa, 2010). Diyetteki bor miktarı ile prostat kanseri insidansı arasında ters orantı olduğu bulunmuştur (Cui vd. 2004). Borik asit, *in vitro* olarak kanserli insan prostat hücrelerinin proliferasyonunu engeller (Gallardo-Williams vd. 2003; Barranco ve Eckhert, 2004). Borun, akciğer kanserini azalttığı bilinen hormon replasman tedavisine benzer şekilde kanser önleyici etkilere sahip olduğu ileri sürülmüştür (Pesatori vd.,20013; Yao vd., 2013). Boronik asit ve bor içeren fenoksiasetanilit türevlerinin de Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör (HIF) 1'i büyük ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir (Shimizu vd., 2010). Şeker-borat esterleri, normal hücrelere göre kanser hücrelerinin içindeki borat konsantrasyonunu artırarak, bor taşıyıcısı olarak görev yapar. Artmış hücre içi borat konsantrasyonu, sadece borat taşıyıcılarını aktive etmekle kalmaz, aynı zamanda büyüme inhibisyonuna ve apoptozise de yol açar. Normal hücrelerde, sağlıklı bir diyetle bulunan borat miktarı, (1-10 mg/gün), hücrelerden kolayca uzaklaştırıldığından hücrede zararlı etkiler meydana gelmez. Bu durum şeker-borat esterlerini kansere karşı ümit verici kemopreventif ajanlar haline getirmiştir. (Scorei ve Popa, 2013). Bor bazlı ilaçlar antikanser, antiviral, antibakteriyel, antifungal ve diğer bazı hastalıklara karşı terapötik ajanlar olarak kullanılmak üzere geliştirilmektedir. Aktif bor içeren bortezomib, multipl miyelom ve non-Hodgkin lenfoma tedavisi için onaylanmıştır (Genadieva-Stavric vd., 2014). Meme, yumurtalık ve akciğer kanserlerini tedavi etmek için kullanılan bir antikanser ilaç olan Paclitaxel'in lenfositler üzerindeki genotoksisitesinin borik asit sayesinde önlenebileceği de bildirilmiştir (Turkez vd., 2010).

### **1.2.5. Bora Maruziyet ve Diyet**

Memelilerin bora, genellikle borik asit veya boratlar olarak maruz kalması, gıda ve suyun ağız yoluyla alınması veya bor bileşikleri içeren pestisitlerin kullanımı, bor

içeren tozların solunması veya kozmetik, farmasötik müstahzarlarda bor kullanımı yoluyla meydana gelir. Bora maruziyetin asıl kaynağı öncelikle gıda ve içme suyudur (Murray, 1995; Moore, 1997; Hubbard 1998; Fail vd. 1998; ATSDR, 2010). Bor, insanlar için belirlenmiş esansiyel besin maddesi değildir ve hayvanlarda veya insanlarda bor için spesifik bir biyokimyasal fonksiyon tanımlanmamıştır.

İnsan diyetinin bileşenlerinden olan borun gıdalarla alınan miktarı, topraktaki konsantrasyonuna ve alınan besin çeşidine bağlı olarak değişkenlik gösterir (Nielsen, 1988). Çeşitli bitkisel besinler yönünden zengin bir diyet ile günde tahmini olarak 1,5-3 mg arası bor alınmaktadır. Bitkisel kökenli yiyecekler sebzeler, meyveler, sert kabuklu yemişler ve baklagiller ile şarap ve bira gibi bitkilerden üretilen fermente içecekler bor bakımından zengindir. Avokado, yer fıstığı, ve kuru üzüm de yüksek miktarda bor içeren gıda maddeleridir. Ancak et, balık ve süt ürünleri gibi hayvansal gıdalar bor açısından fakir kaynaklardır (Rainey ve Nyquist, 1998; Richold,1998).

Borun yetişkinler için 20 mg/gün'lük bir üst alım düzeyi bildirilmiştir (Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients, 2001). Dünya Sağlık Örgütü günlük alınması gereken bor miktarını 1-13 mg olarak belirlemiştir (WHO, 1996). İnsanların günde en az 0,2 mg bor ihtiyacı olduğu ve diyetin yaklaşık 1-2 mg/gün bor içermesi gerektiği öne sürülmesine rağmen, borun kemik (Meacham vd.,1994), cinsiyet steroidleri (Naghii vd., 2011) ve vitamin D (Miljkovic vd., 2009) üzerindeki yararlı etkileri 3 mg/gün'den daha düşük bor alımlarında görülmez.

### **1.2.6. Borun Farmakokinetiği**

Çoğu inorganik borat, fizyolojik pH'da seyreltik sulu çözeltide esas olarak ayrılmamış borik asit şeklinde bulunur, memelilerin plazmasındaki ana çeşidin ayrılmamış borik asit olması muhtemeldir ve doz elemental bor olarak hesaplandığında benzer etkilere sahiptir (Culver vd., 1994; Hubbard, 1998; Murray, 1995). Ağız yoluyla alınan bor bileşikleri, sindirim sistemde borik aside dönüştürülerek, büyük kısmı borik asit şeklinde emilir ve kan yoluyla dokulara iletilir (Karadağ ve Türközü, 2014). Diyetle vücuda alınan borun %84-85'inin idrar

yoluyla atıldığı bildirilmiştir (Sutherland vd., 1999; Naghii ve Samman, 1997). Sağlıklı, sağlam cilt yoluyla emilen borik asit miktarı çok düşüktür, ancak yanık veya aşınmış cilt yoluyla önemli miktarlar emilebilir (Moseman, 1994). Bazı çalışmalar, inhalasyon yoluyla alınan boratların büyük bir yüzdesinin emildiğini ileri sürmüştür. 17 mg/m<sup>3</sup> bor triflorüre maruz kalmanın renal toksisite ile sonuçlandığı, 6 mg/m<sup>3</sup>'e maruz kalmanın ise florür miktarlarında artışa rağmen toksisiteye neden olmadığı bildirilmiştir (Rusch vd. 1986). Boraks üretiminde çalışan işçilerin, solunan borun emildiği ve sistemik olarak dağıldığı varsayılarak, bir vardiyanın sonunda, vardiya başlamadan öncekine kıyasla, kan ve idrardaki bor konsantrasyonlarının çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Culver vd., 1994; Garabrant vd, 1985).

Borik asit, insanlarda ve hayvanlarda vücut sıvılarına hızla dağılır ve memeli plasentasını da geçebilir. Bor 28 gün boyunca 61 mg B/kg/gün (9 000 ppm borik asit) ile beslenen erkek ratların böbrek, karaciğer, kas, beyin, adrenaller, epididimis, testisler, seminal veziküller ve kanına eşit olarak dağılmasına rağmen, yağ dokusuna dağılmamıştır (Ku vd., 1991; Moseman, 1994). Borik asidin büyük kısmı ilk 24 saat içinde renal yolla atıldığından (Ku vd., 1991), sürekli maruziyetin ikinci gününden sonra organizmada borik asit birikimi olmaz. Bu durum insanlar için de geçerlidir (ECHA, 2010).

İnorganik bir kimyasal olan bor, memelilerde metabolize olmaz. Bor-oksijen bağı kırılmak için gereken yüksek enerji gereksinimi nedeniyle biyolojik sistemler tarafından boratların metabolizması mümkün değildir. Hayvan ve insanların boratlara maruz kalması üzerine yapılan çalışmalar; kan, dokular ve idrardan sadece boratın geri kazanıldığını göstermiştir (Moseman, 1994; Treinen ve Chapin, 1991; Culver vd., 1994; Draize ve Kelley, 1959; Jansen vd., 1984; Ku vd., 1991). Yapılan çalışmalar, borik asidin cis-hidroksi gruplarına karşı güçlü bir afiniteye sahip olduğunu göstermektedir. Bu durum, hidroksiapatitin cis-hidroksi gruplarına bağlanma nedeniyle borik asidin kemikte daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmasını açıklayabilir. Bu reversible ve konsantrasyona bağlı bağlanma, borik asidin biyolojik etkileri için makul bir etki mekanizması da sağlayabilir (Murray, 1995).

Borik asidin insanlarda (Culver vd., 1994; Jansen vd., 1984), tavşanlarda (Draize ve Kelley, 1959), ratlarda (Ku vd., 1991), ve farelerde (Farr ve Konikowski, 1963) <24 saatlik bir yarılanma ömrü ile glomerüler filtrasyon ile idrar yoluyla değişme uğramadan hızla atıldığı bildirilmiştir.

### **1.2.7. Borun Toksisitesi**

Bazı araştırmacılar, diyetle doğal olarak bulunması nedeniyle düşük düzeyde bor alımının sağlığa yararlı etkileri olduğunu belirtmişlerdir ve mikro besin araştırmaları, borun insanlar ve hayvanlar için gerekli olabileceğini düşündürmektedir (Hunt, 1998; İnce vd., 2010; İnce vd., 2014). Buna karşı bora aşırı maruz kalmanın (genellikle borik asit veya bor bileşiklerinin kazara veya kasıtlı olarak yutulması yoluyla) önemli olumsuz sağlık etkileri ile ilişkili olabileceği kabul edilmektedir (Price vd., 1997).

Boratların memelilerde akut toksisitesi tipik olarak düşüktür. Test edilen boratlar için ratlarda oral LD<sub>50</sub> 2000-5000 mg/kg vücut ağırlığı aralığındadır. Hayvanlarda görülen akut toksisitenin klinik belirtileri ataksi, konvülsiyonlar ve merkezi sinir sistemi depresyonudur (Hubbard,1998). İnsanlarda bu konu hakkında sınırlı veri bulunmaktadır. Bazı araştırmalara göre, kaza sonucu oluşan zehirlenmelerden elde edilen veriler borik asidin LD<sub>50</sub> değerlerinin bebeklerde 2-3 g, çocuklarda 5-6 g ve yetişkinlerde 15-20 g olduğunu göstermektedir (Moore, 1997; Hubbard, 1998; Bakırdere vd., 2010; ATSDR, 2010). Aksine, Litovitz vd., (1988) 88 g'a kadar oral dozlarda, Locksley ve Sweet (1954), 20 g'lık intravenöz dozda bor için öldürücü etkiler kaydetmemişlerdir.

Borik asit için en düşük letal doz enjeksiyon yoluyla 29 mg/kg, ağız yoluyla 640 mg/kg'dır. 500 mg/gün ve üzeri alımlarda insanlarda halsizlik, bulantı, ishal, karın ağrısı, kusma, şok, merkezi sinir sistemi ve sindirim sistemi bozuklukları, deri lezyonları ve salgı bezleri fonksiyon bozuklukları görülmüştür (Doğan vd., 2015).

Çin'de bor madeni işçilerinde yapılan çalışmada, ortalama 31,3 mg/gün bora maruz kalan işçilerde sperm örneklerinde ve reproduktif fonksiyonlarda bir olumsuzluk

tespit edilmemiştir (Scialli vd., 2010). Günlük bor alımı Türkiye’de borik asit üretiminde çalışan işçilerde, herhangi bir yan etki olmaksızın ortalama 12,6 mg olarak ölçülmüştür. (Başaran, vd., 2012; Çöl ve Çöl, 2003).

### **1.2.8. Toksikasyonlara Karşı Bor Bileşiklerinin Kullanımı**

Yakın zamanlı yapılan araştırmalar toksikasyonlarda bor bileşiklerinin yararlı etkilerinin olduğunu ortaya koymaktadır. Taşdemir vd. (2020), ratlarda Lithium metaborate dihydrate’ın (LMBDH) kadmiyum klorür ( $CdCl_2$ ) ile indüklenen oksidatif strese ve bazı biyoelementlerin dengesizliğine karşı koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmada  $CdCl_2$  uygulamasının kontrol grubuna göre kan MDA düzeyini artırdığını, antioksidan enzim aktivitelerini ve kan GSH düzeyini azalttığını göstermiştir. Buna karşın LMBDH verilmesinin MDA seviyelerini önemli ölçüde azalttığı ve SOD aktivitesini artırdığı bildirilmiştir.

Ratlarda borun siklofosfamid kaynaklı mesane hasarı ve oksidatif stres üzerindeki koruyucu etkilerine yönelik araştırmada; siklofosfamid uygulanan grubun mesanelerinde geçici epitel incelmeleri, ödem, belirgin yangısal reaksiyon ve kanama gözlenmiş, ayrıca *Bax* ve *Caspase-3*-pozitif hücrelerin aktivitesi artarken, *Bcl-2*-pozitif hücre sayısı azaldığı, öte yandan, bor-siklofosfamid grubunda, bor mesane dokusunu korumuş ve *Bcl-2*’yi artırmış, *Bax* ve *Caspase-3*’ü azalttığı bildirilmiştir. Çalışma sonunda borun siklofosfamidle indüklenen toksisiteye karşı antiapoptotik etki gösterdiği ifade edilmiştir (Ayhancı vd. 2019).

Cikler-Dulger ve Sogut, (2020) ratlarda borik asit uygulamasının etanolün neden olduğu böbrek hasarı üzerine koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Etanol grubuna göre Etanol + Borik asit grubunda toplam oksidan durum, oksidatif stres indeksi ve MDA seviyeleri azalırken, toplam antioksidan durum seviyesinin arttığı tespit edilmiştir. Etanol + Borik asit grubunda TUNEL (TdT-mediated dUTP nick-end labeling) ve *caspase-3* aktivitesinin Etanol grubuna göre azaldığı, borik asitin, etanolün kronik kullanımının neden olduğu renal tübül hasarına karşı bir antioksidan



görev gördüğü, bu sayede oksidatif hasarı azaltarak renal tübüllerde apoptoza karşı koruyucu etki sergilediği rapor edilmiştir.

Coban vd. (2015), yaptıkları bir çalışmada borun, gıdalar yoluyla düşük dozlarda alınsa bile insanlarda oksidatif strese neden olan ve yaygın olarak kullanılan bir pestisit olan malathion kronik olarak maruz kalmış hayvanları koruduğunu bildirmişlerdir. Ratlara mide sondası yoluyla 100 mg/kg/gün malathion uygulaması MDA, nitrik oksit ve 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) seviyelerini ve karaciğer hasarını artırdığı, kan, karaciğer, böbrek ve beyin dokularındaki asetilkolinesteraz seviyelerini düşürdüğü ve GSH, SOD, ve CAT aktiviteleri azalttığı buna karşın 5, 10 ve 20 mg/ kg/gün bor uygulanmasının malathion kaynaklı oksidatif stresi, lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitesinin baskılanmasını tersine çevirdiği bildirilmiştir.

İnce vd. (2012), farelerde karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>) ile indüklenen hepatotoksisiteye karşı borik asidin koruyucu etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında borik asit uygulamasının, farelerde CCl<sub>4</sub> tarafından indüklenen, serum AST, ALP, ALT ve karaciğer MDA seviyesindeki yükselmeyi önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir. Borik asit uygulamasının karaciğerdeki süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerinin yanı sıra glutatyon içeriğini de önemli ölçüde artırdığı belirtilmiştir. Sonuç olarak borik asidin farelerde CCl<sub>4</sub> ile indüklenen karaciğer hasarı üzerinde güçlü hepatoprotektif etkiler gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacının aynı zamanda yaptığı diğer çalışmalarda ratlarda siklofosamid (CYC) ve gentamisin kaynaklı oksidatif stres üzerine borun koruyucu etki gösterdiğide rapor edilmiştir (İnce vd. 2014; 2020).

Aflatoksin ve bor ile ilgili yapılan bir *in vitro* çalışmada Turkez ve Geyikoglu (2010), insan tam kan kültürlerinde AFB1'e maruziyetin ardından borik asidin etkinliğini araştırmışlardır. AFB1 uygulamasının kandaki MDA seviyesini artırarak antioksidanların aktivitelerini önemli ölçüde azalttığını, borik asidin ise AFB1'in neden olduğu oksidatif hasara karşı DNA direncini arttırarak etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Boraksın insan lenfositlerinde aflatoksin B<sub>1</sub> kaynaklı genetik hasara karşı kemoprotektif etkisi üzerine yapılan diğer bir *in vitro* çalışmada; boraksın AFB<sub>1</sub> tarafından indüklenen mikronükleus ve kardeş kromatid değişim oluşumlarını inhibe etme kabiliyeti değerlendirilmiştir. Kontrollere kıyasla AFB<sub>1</sub> (3 ve 12 ppm) uygulanan kültürlerde hem kardeş kromatid değişim hem de mikronükleus görülme sıklığının arttığı, bununla birlikte, boraks (1, 2 ve 5 ppm) ve AFB<sub>1</sub>'in birlikte uygulanmasının tek başına AFB<sub>1</sub> uygulanan gruba kıyasla kardeş kromatid değişim ve mikronükleus görülme oranlarında düşüş meydana getirdiği bildirilmiştir. Çalışmanın sonunda boraksın, AFB<sub>1</sub> kaynaklı mikronükleus ve kardeş kromatid değişimine karşı %30-50 arasında koruma sağladığı, hedef dokulardaki AFB<sub>1</sub> riskini azaltabildiği ve toksikasyonlarda erken iyileşme sağlayabileceği ifade edilmiştir (Turkez vd. 2012).

Yapılan bu tez çalışmasında, ilk kez *in vivo* olarak aflatoksin verilen erkek ratlarda oluşan karaciğer hasarına karşı borun olası koruyucu etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla bazı biyokimyasal parametreler (AST, ALT, ALP), lipid peroksidasyon (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeyleri ile antioksidan enzimlerin (SOD ve CAT) aktivite tayini ve DNA hasarı (ssDNA) belirlendi. Ayrıca karaciğer dokusunda apoptotik (*Caspase-3*, *Caspae-8*, *Caspase-9*, *Bax*, *p53* ve *Bcl-2*) ve yangısal sitokinlerin (*NFκB* ve *TNF-α*) mRNA ekspresyon düzeyleri ile karaciğer dokusunun histopatolojik (Hemotoksilen-Eosin) incelemeleri gerçekleştirildi.

## **2. MATERYAL ve METOT**

### **2.1. Materyal**

#### **2.1.1. Araç ve Gereçler**

Cam malzemeler [Erlenmayer (50-100 ml), beher (25-50-100 ml), mezür, tüp]

Cerrahi malzemeler (pens, makas)

Distile su cihazı

Hassas terazi (Precisa 205 ASCS)

Otomatik pipetler (Socorex-Acura 825; 10–100 µl; 100–1000 µl)

Real Time PCR (Applied Biosystems™ StepOnePlus™ Real-Time PCR System)

Santrifüj (Neofuge 13R-Refrigerated Centrifuge-Heal Force Bio)

Spekrofotometre (Shimadzu 1601 Uv-Visible)

#### **2.1.2. Hayvan Materyali**

Çalışmada toplamda 36 adet 200-300 g ağırlığında erkek Sprague Dawley cinsi ratlar kullanıldı. Bu hayvanlar Afyon Kocatepe Üniversitesi Deneysel Hayvanları Ünitesinden temin edildi ve çalışmanın deneysel aşaması bu merkezde yapıldı. Temin edilen ratlar gruplara ayrıldı ve deney sürecine alınmadan önce 7 gün süreyle ortama alışması sağlandı. Ratlar %50-55 nem içeren oda sıcaklığında (25°C) barındırıldı, ratlara bor içeriği düşük yem (ICP ile analizi sonucu içerdiği bor miktarı 0,15 mg/kg olarak tespit edilmiştir) ve ad libitum deiyonize su verildi. Günlük bakımları ve uygulamalar belirtilen süre içerisinde özenle sürdürüldü. Çalışma öncesi Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulundan (AKUHADYEK) çalışma için 49533702/137 sayı ile onay alındı (EK-1).

### **2.2. Metot**

#### **2.2.1. Deneysel Aşama**

### 2.2.1.1. Deneysel Aşamanın Planlanması ve Uygulanması

Deneysel aşamada kullanılan AFB1 Acros Organics (Geel, Belgium) ve bor kaynağı olarak kullanılan borik asit Sigma-Aldrich (MO, USA) firmalarından temin edildi. AFB1 (Abdel-Wahhab vd., 2016) ve bor (İnce vd., 2020) için seçilen dozlar daha önceden yapılmış çalışmalar incelenerek belirlendi. Hayvanlar her grupta 6'şarlı olacak şekilde 6 gruba ayrıldı ve gruplara aşağıdaki şekilde uygulama yapıldı.

Grup I- Kontrol grubu- düşük bor içeren yem ve deiyonize su verildi.

Grup II- Mısır Yağı grubu- 0,5 ml gastrik gavaj ile verildi.

Grup III- AFB1 grubu- AFB1 0,125 mg/kg 0,5 ml mısır yağında çözdürülerek gastrik gavaj ile verildi.

Grup IV- AFB1 0,125 mg/kg + Bor 5 mg/kg grubu- AFB1 0,5 ml mısır yağında çözdürülerek ve borik asit ise 0,5 ml suda çözdürülerek gastrik gavaj ile verildi.

Grup V- AFB1 0,125 mg/kg + Bor 10 mg/kg grubu- AFB1 0,5 ml mısır yağında çözdürülerek ve borik asit ise 0,5 ml suda çözdürülerek gastrik gavaj ile verildi.

Grup VI- AFB1 0,125 mg/kg + Bor 20 mg/kg grubu- AFB1 0,5 ml mısır yağında çözdürülerek ve borik asit ise 0,5 ml suda çözdürülerek gastrik gavaj ile verildi.

**Çizelge 2.1.** Bor diyetinin hazırlanması (Bourgeois vd., 2007)

<b>İçindekiler</b>	<b>Miktar (g/kg)</b>
Asitle yıkanmış mısır <sup>1</sup>	743.4
Vitaminden yoksun kazein <sup>2</sup>	140
Trace mineral karışımı <sup>3</sup>	10
Makromineral karışımı <sup>4</sup>	25.4
Vitamin karışımı <sup>5</sup>	4
Mısır yağı <sup>6</sup>	75
DL-alfa tokoferol <sup>7</sup>	0.2
Kolin bitartarat <sup>8</sup>	2

<sup>1</sup> Asitle yıkanmış mısır [Mısırlar (kg) 2,8 L 2 N HCl ile 30 dk yıkanarak, üstteki kısım atıldı. Sonrasında 1,2 L deiyonize su ile 3 kez yıkandı, yıkama sonrası 75 °C de 48 saat kurutulmasıyla diyete ilave için hazır hale getirildi.]

<sup>2</sup> Kazein

<sup>3</sup> İz element karışımı (g/kg): [Asitle yıkanmış mısır, 8.497; NaCl, 1.3000; (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mn·4H<sub>2</sub>O, 0.0450; Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.0340; demir silgi, 22 çaplı, 0.0350; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.0240; Na<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Si·9H<sub>2</sub>O, 0.0510; Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0050; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.0003; (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>7</sub>Cr<sub>3</sub>(OH)<sub>2</sub>, 0.0020; NiCl<sub>2</sub>, 0.0020; NaF, 0.0020; KI, 0.0002; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.0005; NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>, 0.0003; 3.5 g demir tozu (26 mL çift distile suda hazırlanan 6 mol/L HCl ile çözdürüldü)].

<sup>4</sup> Makromineral karışımı (g/kg): [ (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg·4H<sub>2</sub>O, 4.4; KCl, 4.0; CaHPO<sub>4</sub>, 17.0. ]

<sup>5</sup> Vitamin karışımı (g/kg): [D-dekstroz, 3.7855; inositol, 0.050; nikotinik asid, 0.030; D-pantotenik asid, 0.016; riboflavin, 0.027; tiamin-HCl, 0.010; piridoksin-HCl, 0.015; vitamin B<sub>12</sub> (%0.1'lik mannitoldeki çözeltisi), 0.050; 1-5 dihidroksikolekalsiferol (400.000 IU/g), 0.0025; para-aminobenzoik asid, 0.005; retinil palmitat (500.000 IU/g), 0.005; folik asid, 0.002; D-biotin, 0.001; menadion, 0.001.]

<sup>6</sup> Mısır yağı

<sup>7</sup> DL-alfa tokoferol

<sup>8</sup> Kolin bitartarat

## **2.2.1.2. Deneysel Aşamının Sonlandırılması**

### **2.2.1.2.1. Anestezi aşaması**

Ratlar deney aşaması olan 21 günlük sürenin tamamlanmasından sonra sakrifiye edilmeden önce 87 mg/kg i.m. ksilazin uygulamasıyla preanesteziye alındı, daha sonra 13 mg/kg dozunda i.m. ketamin uygulanarak tam anestezi uygulandı.

### **2.2.1.2.2. İntrakardiyak Kan Alımı, Sakrifikasyon Ve Alınan Örneklerin Saklanması**

Anestezi sonrasında göğüs kafesi açılarak intrakardiyak olarak etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) enjektörle 3-5 cc kan alındı. Bunun hemen sonrasında servikal dislokasyon yapılarak sakrifikasyon işlemi yapıldı. Alınan kanların 3000 devirde (10 dakika) santrifüjü yapılarak plazmaları ayrıldı ve analizleri yapılmaya kadar -80 °C de saklandı. Ratların sakrifiye edilmesinden sonra daha önce açılmış göğüs kafesi yanında batin bölgesi cerrahi yöntemlerle açılarak karaciğerleri alındı. Dokuların birer parçası biyokimyasal ile moleküler incelemeler için -80°C de saklanırken diğer kısımları histopatolojik takibe alındı. Belirtilen doku örnekleri alındıktan sonra kalan hayvansal atıklar, tıbbi atık ünitesi tarafından temin edilen özel ambalajlara konularak usulüne uygun yok edilmesi için tıbbi atık ünitesine teslim edildi.

### **2.2.2. Histopatolojik Değerlendirme**

Alınan karaciğerler histolojik doku takibine hazır hale getirildi. Bu amaçla yaklaşık 0,5-1 cm<sup>2</sup> kadar büyüklüklerde organın büyüklüğüne göre farklı bölgelerden 3-5 adet küçük doku örneği alındı ve doku takip kasetlerine kondu. Hazırlanan bu örnekler fiksasyon için %10 nötral formalin içine kondu. Günlük olarak değiştirilip tazelenen fiksatif içinde 5 gün süreyle bekletilen doku örnekleri bu basamaktan sonra histolojik olarak klasik doku takibine alındı. Akarsuda 30 dakika bekletilmek suretiyle üzerindeki fazla formaldehiden arındırılan örnekler daha sonra artan derişimlerde birer saatlik alkol serilerinden geçirilerek dehidrate olmaları sağlandı ve bu basamaktan şeffaştırma için ksilen içine kondu. Önce 30 dakika sonra 1 saat ksilende tutulduktan sonra dokular önce yumuşak parafinde her saat değışmeli olmak üzere 3 saat ve son olarak 2 saat sert parafinde tutuldu. Daha sonra dokular yine parafin ile bloklandı. Parafine gömülen örneklerden mikrotom aracılığıyla 5 µ kalınlığında alınan kesitler klasik doku değıerlendirmeleri için normal lamlara alındı. Alınan kesitler daha sonra boyanmak üzere gruplandırıldı. Bu amaçla doku üzerinde mevcut olan/değışen genel histolojik özellikleri görüp değıerlendirmek için Hematoksilen-Eozin (HE) boyaması ile boyama yapıldı. Boyanan örnekler ışık mikroskobu altında değıerlendirilerek dokularda gruplar arasında görülen farklılıklar ve kontrol grubu ile aralarındaki farklar değıerlendirildi.

### **2.2.3. Lipid Peroksidasyon ve Antioksidan Parametreler**

#### **2.2.3.1. Doku Homojenizasyonu**

Hazırlanan soğuk  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (50mM; PH=7) 0.5 g doku üzerine 5 ml olacak şekilde ilave edildi. Hem Mekanik ve hem de 20k Hz ultrasonik homojenizatör ile homojenizasyonları yapıldı ve 5000 devirde 15 dk santrifuj edildi. Elde edilen süpernatant biyokimyasal analizlerde (MDA, GSH, SOD ve CAT tayininde) kullanıldı.

#### **2.2.3.2. Hemolizat Hazırlanması**

Plazmaları alınan örnekler üzerine eşit miktarda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tampon solüsyonu ilave edildi ve 3 defa 3000 devirde (5 dk) santrifüj edildi. Sonunda üsteki kısım atıldı ve eşit miktarda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tampon ve eritrositlerden 0,5 ml çekilerek ependorflara aktarıldı. Hazırlanan örnekler analizler yapılncaya kadar  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  de saklandı. Hemolizat için eritrosit paketinden 0,8 ml alındı ve üzerine soğuk distile su eklenerek hemolizat eldesi sağlanmış olunur. Bu hemolizatlar süperoksit dismutaz ve katalaz enzim aktivite tayininde kullanıldı (Winterbourn vd., 1975).

#### **2.2.3.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini**

Aktivite tayini, ortamdaki nitroblue tetrazolium (NBT) indirgemesinin örnekte bulunan SOD ile engellenmesi prensibine dayanır. Süperoksit grupları ksantin oksidaz enzimi ile reaksiyona girerek maddeyi indirger ve sonuçta 560 nm'de absorbans veren formazon oluşur. Ortama ilave edilen enzim süperoksit gruplarını dismutasyona uğratar ve NBT indirgeme tepkimesi yavaşlar. Sonuçta spektrofotometredeki absorbans değerleri düşer (Sun vd., 1988). Bu aktivitenin ölçümü için aşağıdaki metot uygulandı.

\* Kullanılan Çözeltiler:

1. Fosfat Tamponlu Tuz çözeltisi (PSB): 8,06 g NaCl, 0,201 g KCl, 12,636 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> bir litre tridistile suda çözülür ve pH'sı 7,4 e ayarlanır.

2. Ksantin stok çözeltisi (3 milimol/L): 23 mg ksantin, 50 ml'lik bir balon joje içinde 5 ml 0,1 N NaOH ile hafifçe ısıtılarak çözülür. Distile su ile 50 ml'ye tamamlanır. Kullanılacağı zaman 10 kez sulandırılır.

3. EDTA çözeltisi (0,6 milimol/L) : 0,249 g EDTA (dihidrat) bir litrelik balon joje içinde distile su ile çözülür ve hacim litreye tamamlanır.

4. Nitroblue tetrazolium (NBT) çözeltisi ( 150 milimol/L) : 12,3 mg NBT 100 ml'lik bir balon jodede distile su ile çözülür ve hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

5. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi (400 µmol/L) : 4,2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 ml'lik bir balon jodede distile su ile çözülür ve hacim distile su ile 100 mlye tamamlanır.

6. Sığır albümini çözeltisi (1g/L) : 100 mg sığır albümini 100 ml'lik balon jodede çözülür ve hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

7. CuCl<sub>2</sub> ( 0,8 mmol/L) : 10,7 mg CuCl<sub>2</sub> 100 ml'lik balon jodede çözülür ve hacim distile suyla 100 ml'ye tamamlanır.

8. Ksantin oksidaz enzim çözeltisi: 20 U/ml aktiviteye sahip ksantin oksidaz enzim çözeltisinden 20 µmol alınarak 2 ml 2 M amonyum sülfat çözeltisi ile karıştırılır.

9. Reaktif Karışımı: 20 tüplük bir seri analiz için 100 ml'lik bir erlen içerisine 20 ml 10 kez sulandırılmış ksantin stok çözeltisi, 10 ml EDTA çözeltisi, 10 ml NBT çözeltisi, 6 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi ve 3 ml sığır albümini çözeltisi konur ve iyice karıştırılır.

\* Uygulanan metot: Test ve kör tüplerine aşağıdaki şemada gösterildiği sırayla çözeltiler ilave edilir. Reaksiyon karışımının son hacmi 3 ml'dir.

1. Kör ve test işaretli tüplere 2,45 ml reaktif karışımı konur.

2. Kör tüpüne 0,5 ml bidistile su, test tüpüne 0,5 ml numune konur.



3. Bütün tüplere 50 µl ksantin oksidaz konur ve karıştırılır.
4. 20 dakika 20 °C de su banyosunda inkübe edilir.
5. İnkübasyon süresi sonunda tüplere 1 ml CuCl<sub>2</sub> eklenerek reaksiyon durdurulur ve oluşan rengin absorbansı 560 nm de okunur.
6. Bir SOD ünitesi, NBT redüksiyonunu %50 oranında inhibe eden aktivite olarak kabul edilmektedir. Reaksiyon ortamında bulunan enzim aktiviteleri, bu ünite cinsinden hesaplanır.

#### 2.2.3.4. Katalaz Aktivite Tayini

Tampon çözelti içinde bulunan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> örnekte bulunan CAT etkisi ile yıkımlanır ve bunun spektrofotometredeki (570 nm) absorbansında azalma meydana gelir. Bu azalma hızı CAT aktivitesi ile orantılıdır (Sinha, 1972). Katalaz aktivitesinin belirlenmesinde aşağıdaki metot uygulandı.

\* Kullanılan Çözeltiler:

Fosfat tamponu; 0,3 g Sodyum Hidrojen Fosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) tartılır ve 1 litreye tamamlanır.

Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ; %30); 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alınır ve üzerine 49 ml su eklenir

Potasyum bikromat (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>); %5'lik K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> den 5 g alınır, 100 ml de çözündürülür.

Glasiyel asetik asit

Dikromat solüsyonunun hazırlanması:

%5 lik K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	1ml	} bunlar 1:3 oranında karıştırılır
Glasiyel Asetik Asit	3 ml	

Numune hazırlama

Doku homojenatı için: 10 µl numune 490 µl distile su karıştırılır

Eritrosit lizati için: 5 µl numune 95 µl distile su karıştırılır

\* Uygulanan metot:

1. 0,1 ml hazırlanan dilüe numune ependorf tüpe konulur. Kör için numune yerine distile su konulur
2. Üzerine 0,1 ml Fosfat Tamponu (0,01 M) eklenir
3. Üzerine 0,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenir
4. Üzerine 0,1 ml dikromat solüsyonu eklenir
5. 10 dakika kaynar su banyosunda bekletilir
6. 570 nm de distile suyla sıfırlanarak okunur.

#### **2.2.3.5. Malondialdehit (MDA) Aktivite Tayini**

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA miktarı tam kanda Draper ve Hardley (1990)'in çift kaynatma yöntemi ile belirlendi. Metot MDA'nın TBA ile reaksiyona girmesi ve 532 nm dalga boyunda absorbans vermesi prensibine dayanmaktadır. MDA tayini için aşağıdaki metot uygulandı.

\* Kullanılan Çözeltiler:

%10'luk Triklorasetik asit (TCA): 10 g TCA 100 ml distile suda çözündürülür.

% 0,8'lik Tiyobarbitürik asit (TBA): TBA önce 1 g NaOH 500 ml. dH<sub>2</sub>Oda çözündürülür. 4 g TBA 500 ml'lik NaOH çözeltilisinde çözündürülür.

\* Deneyin Yapılışı:

0,5 ml erirosit paketi üzerine 2,5 ml %10'luk TCA eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra 10 dk kaynatıldı. Hemen soğutuldu ve 10 dk 4000 rpmde santrifüj edildi. Elde edilen berrak homojenizattan 2 ml temiz bir deney tüpüne alınarak üzerine %0,8'lik

TBA eklendi. 10 dk kaynatılarak tekrar buzlu su içinde soğutuldu. Pembe renkli kısmın 532 nm de adsorbansı distile suya karşı ölçüldü.

Dokulardaki MDA miktarı Ohkawa vd. (1979)'nin metoduna göre belirlendi.

\* Kullanılan Çözeltiler:

1. 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 3,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  500 ml'ye tamamlanır.

2. Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi: %8,1 lik SDS 2,02 g SDS 250 ml distile suda çözündürülür.

3. Glasiyel asetik asit: %20'lik glasiyel asetik asit 500 ml hazırlanır.

4. % 0,8'lik Tiyobarbitürik asit (TBA): TBA önce 1 g NaOH 500 ml.  $\text{dH}_2\text{O}$ 'da çözündürülür. 4 g TBA 500 ml'lik NaOH çözeltisinde çözündürülür.

5. N butanol pirin karışımı: 750 ml n- butanol 50 ml piridinle karıştırılır.

\* Uygulanan metot:

0,2 ml süpernatant bir tüpe konur. Üzerine sırasıyla; 0,2 ml % 8,1 lik SDS, 1,5 ml % 20 lik glasiyel asetik asit, 1,5 ml %0,8 lik TBA konur ve 0,6 ml distile suyla karıştırılır. 1 saat  $95^\circ\text{C}$  de kaynatılır. Hemen soğutulur. Üzerine 1 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  + 5 ml n-butanol piridin karıştırılıp çalkalanır. 4000 rpm 10 dakika santifuj edilir. Organik kısım atılır. Pembe renkli kısmın 532 nm.de adsorbansı ölçülür.

Hesaplama: Numune Absorbansı X std kalibrasyonundan elde edilen değer= .... mmol/L

### 2.2.3.6. Redükte Glutasyon (GSH) Tayini

Yöntemde 5-5-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) sülfidril bileşikleri ile tepkimeye girer ve disülfid bileşiği sarı renkli bir kompleks yapı oluşur. Bu bileşiğin absorbansı spektrofotometrede (412 nm) okunarak GSH miktarı saptanır (Beutler vd., 1963). Dokularda ve eritrosit paketinde GSH tayini aşağıdaki metotla yapıldı.

Kullanılan Çözeltiler:

Çöktürücü: 5 g. metafosforik asit+ 1 g EDTA+90 g NaCl 300 ml dH<sub>2</sub>Oda çözdürülür.

Fosfat çözeltisinde 0,3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 40,02 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 500 ml. dH<sub>2</sub>Oda çözdürülür.

DTNB; 40 mg DTNB 100 ml'lik Na sitrat çözeltisiyle çözdürülür.

GSH standardı: 10 mg GSH, 25 ml dH<sub>2</sub>Oda çözülür.

Uygulanan metot:

- \* 0,2 ml doku homojenizatı ya da tam kan alınır.
- \* Üzerine 3 ml çöktürücü ile karıştırılır. 5 dk beklenir
- \* Daha sonra adi süzgeç kâğıdından süzdürülür.
- \* 2 ml filtrat başka bir tüpe alınır. Üzerine 8 ml fosfat pamponu (ya da 1 ml filtrat+ 4 ml fosfat tamponu).
- \* Üzerine 0,5 ml DTNB ayıracı katılır. İyice karıştırılır.
- \* Daha sonra 412 nm de 10 dakika içerisinde değerlendirilir.
- \* Standart tüpünde doku homojenizatı yerine 0,2 ml GSH standardı kullanılır.
- \* Kör tüpüne 2 ml distile su + 3 ml çöktürücü konur. Adi süzgeç kâğıdından filtre edilir.
- \* Kör: 2 ml distile su+ 3 ml çöktürücü; Standart:0,2 ml GSH Standardı+ 1,8 ml distile su + 3 ml çöktürücü iyice karıştırılır,

Hesaplama (mg/dl): Numune Absorbansı X 40 /Standartın Absorbansı

### 2.2.3.7. Protein Ölçümü

Proteinlerdeki peptid bağları ile bakır iyonu ( $\text{Cu}^{+2}$ ) alkali ortamda bir kompleks oluşturur ve  $\text{Cu}^{+}$  indirgenir. İndirgenmiş kompleksin yan zincirinde yer alan aminoasitler(Tyr, Trp ve Cys) Folin-Fenol reaktifini indirger ve renk oluşumuna neden olur. Bu rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve spektrofotometrik olarak 660 nm de ölçülmesi ile miktar belirlenir (Lowry vd., 1951).

Uygulanan yöntem:

1. Örnek ve standart tüplerine 1 ml homojenizat çözeltisi ve standart çözeltiler, kör tüpüne de 1 ml saf su koyulur.
2. Tüm tüplere 3 ml C reaktifi eklenir. (C reaktifi 100:1 oranında A ve B reaktifi karışımından oluşturulur. A reaktifi %2  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , %1 NaOH, %0.16 Na-tartarat; B reaktifi ise %4  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dır)
3. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletilir.
4. Tüm tüplere 300 ml Folin-Fenol reaktifi vortekslenerek eklenir.
5. Oda sıcaklığında 45 dakika bekletilir.
6. Absorbanslar 660 nm de köre karşı okunur.
7. Protein miktarları oluşturulan standart kalibrasyon grafiğinden yararlanarak hesaplanır.

### 2.2.3.8. Kanda Hemoglobin Düzeyinin Belirlenmesi

Hemoglobindeki demirin yükseltgenmesi ( $\text{Fe}^{+2}$  ferrisiyanür tarafından  $\text{Fe}^{+3}$ 'e yükseltgenir) ile hemoglobin methemoglobine dönüşür. KCN eklenmesiyle methemoglobin siyanomethemoglobine ve bunun absorbansı 540 nm de ölçülerek miktar belirlenir (Drabkin ve Austin, 1935).

Reaktifler:

Drabkin çözeltisi: Sırasıyla 0,2 g potasyum ferrisiyanür ( $K_3Fe[CN]_6$ ), 0,05 g KCN ve 1 g  $NaHCO_3$  distile suda çözülür ve 1 litreye tamamlanır. Reaktifler 4 °C da koyu renkli cam şişede tutulmalıdır. Bu koşullarda çözelti en az 4 ay dayanır.

Siyanomethemoglobin standardı (Std): Bilinen konsantrasyonda hemoglobin çözeltisi (g/dl) kullanılır.

Uygulanan yöntem:

Spektrofotometre 540 nm'ye ayarlanır. Tüpler; kör, standart ve numune olarak işaretlenir. Tüm tüplere 6 ml Drabkin çözeltisi koyulur. Standart tüpüne 0,02 ml standart çözeltisi, kör tüpüne 0,02 ml distile su koyulur. Kan numunesinden 0,02 ml numune tüpüne koyulur. Tüpler hücre lizisinin (hücre membranının bütünlüğünün bozularak hücrenin parçalanması) oluşması ve hemoglobinin siyanomethemoglobine dönüşmesini sağlamak için karıştırılır ve 5 dk bekletilir. Kör çözeltisi ile spektrofotometre 0 noktasına ayarlanır. Standart tüpü spektrofotometrede ölçülür ve absorbansı okunur (StdOD). Numune tüpünün absorbansı ölçülür ve kaydedilir (NmOD).

Hesaplama: Hb konsantrasyonu (g/dl) = (NmOD x Std konsantrasyonu) / StdOD

#### **2.2.4. Biyokimyasal Parametreler**

Alınan plazma örneklerinde AST, ALT ve ALP miktarları temin edilen ticari kitlerle (Human, Max-Planck-Ring, Wiesbaden Germany) spektrofotometrik olarak belirlendi. DNA hasarının belirlenmesi ise ticari olarak temin edilen ELISA kiti (ABP/N014-iQuant™ ssDNA Assay KiT) ile gerçekleştirildi.

## 2.2.5. Moleküler Analizler

### 2.2.5.1. RNA İzolasyonu, RNA'ların Kalite Kontrolü, DNaz Uygulaması ve cDNA Eldesi

Uygulama sonrasında ratlardan alınan karaciğer örnekleri RNAlater içerisine (ThermoFisher Scientific) alınarak -80°C'de uygulama yapılana kadar saklandı. RNA izolasyonu için -80°C'den çıkartılan dokular GeneJet RNA Purifikasyon Kiti (ThermoFisher Scientific) ile yapıldı. RNA'ların kalitesi ve miktarı Multiskan™ FC Mikroplate Fotometre (Thermo) cihazında A260/A280 UV dalga boylarında ölçülerek belirlendi. İzole edilen RNA'lar cDNA eldesi için toplamda 1µg olacak şekilde hesaplanarak kullanıldı. RNA'lardan DNA'yı uzaklaştırmak için DNaz I (Thermo Scientific) eklenip ve DEPC (diethyl pirokarbonat) ile toplam hacim 10 µl'ye tamamlandı ve 30 dk 37°C ve 10 dk 65°C'de inkübasyona bırakıldı. DNaz I uygulanan RNA'dan RevertAid H Minus Single Strand cDNA Sentez Kit (Thermo Scientific) yardımıyla cDNA elde edildi.

### 2.2.5.2. Primer Tasarımı

Deneyde kullanılan tasarladığımız primerler *Rattus norvegicus*'a özgü (NCBI)  $\beta$ -aktin, p53, Bcl-2, Caspase-3, Caspase -8, Caspase -9, NFκB, TNF-α ve Bax genlerine ait mRNA dizileri kullanılarak ve FastPCR 6.0 (Kalendar vd., 2009) bilgisayar paket programından yararlanılmış ve kontrol edilmiştir. Primer dizileri, toplam baz uzunlukları ve gen bankası numaraları Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

### 2.2.5.3. Real-time PCR

Ratların karaciğer dokularından alınan örneklerde seçilen genler ve housekeeping gen ( $\beta$ -Aktin) ekspresyonu real-time PCR cihazında incelenmiştir. Amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu ile hesaplandı (Pfaffl, 2001). Bu hesaplamada;

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{beta aktin}})_{\text{denek grubu}} - (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{beta aktin}})_{\text{kontrol grubu}}$$

formülünden yararlanıldı. Hesaplanan değer her bir gen için  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  formülünde yerine konularak mRNA ekspresyon düzeyi misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlendi. Endojen kontrol olarak  $\beta$ -aktin geni kullanıldı ve her bir örneğe ait  $\beta$ -aktin gen düzeyine göre diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulandı.

**Çizelge 2.2.** Moleküler analizler için kullanılan genler, oligonükleotid dizilimleri, boyutları ve gen bankası numaraları

Genler		Oligonükleotid dizilimi	Ürün boyutu (bp)	Gen Bankası Numarası
<i><math>\beta</math>-Aktin</i>	F	GAGGGAAATCGTGCGTGACAT	452	NC_005111.4
	R	ACATCTGCTGGAAGGTGGACA		
<i>p53</i>	F	TGCAGAGTTGTTAGAAGGCCCA	397	NM_030989.3
	R	GTCACCATCAGAGCAACGCTC		
<i>Caspase-3</i>	F	ACCCTGAAATGGGCTTGTGTA	427	NM_012922.2
	R	GCCATATCATCGTCAGTTCCAC		
<i>Bcl-2</i>	F	GGGTATGATAACCGGGAGATCG	508	NM_016993.1
	R	ACTCAGTCATCCACAGAGCGA		
<i>NF<math>\kappa</math>B</i>	F	TCCCCAAGCCAGCACCCCCAGC	334	NM_199267.2
	R	GGCCCCCAAGTCTTCATCAGC		
<i>Caspase-8</i>	F	TTGCTGAACGTCTGGGCAACG	502	NM_022277.1
	R	TCGTCGATCCTTCCCAGCAAGC		
<i>Caspase-9</i>	F	AGAAACACCCAGGCCGGTGGA	327	NM_031632.1
	R	ACCACGAAGCAGTCCAGGGCAC		
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	F	CGAGTGACAAGCCCGTAGCC	368	NM_012675.3
	R	GGATGAACACGCCAGTCGCC		
<i>Bax</i>	F	AGGACGCATCCACCAAGAAGC	363	NM_017059.2
	R	CAGTGAGGACTCCAGCCACAA		
	R	CTTCACTCTTGACTGCCGGGA		

### 2.2.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences ver. 22.0 SPSS Inc, Chicago Illinois, USA ) programı kullanıldı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi. İstatistiksel analiz öncesinde verilerin normal dağılım kalıbına uygunluk testi yapıldı ve verilerin normal dağılım içerisinde olduğu belirlendi. İstatistiksel analiz için gruplar arası karşılaştırmada tek yönlü varyans analizi (One



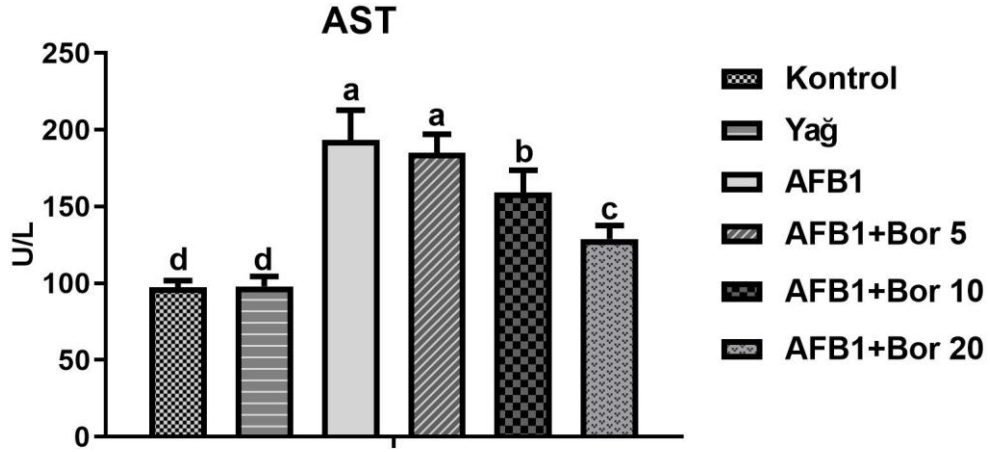
way ANOVA) ve önemliliklerin belirlenmesinde post-hoc Duncan testi kullanıldı.  $P < 0,05$  anlamlı olarak kabul edildi.



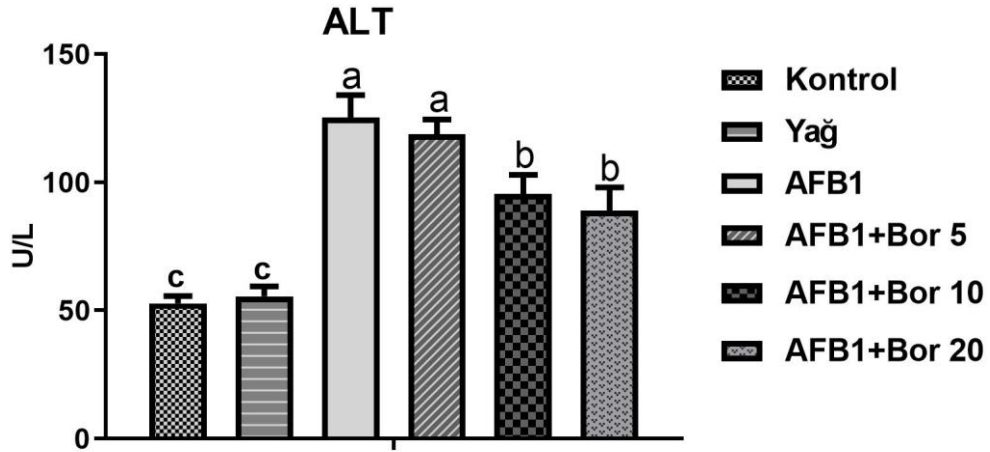
### 3. BULGULAR

#### 3.1. AST, ALT ve ALP Düzeyleri Üzerine Etkisi

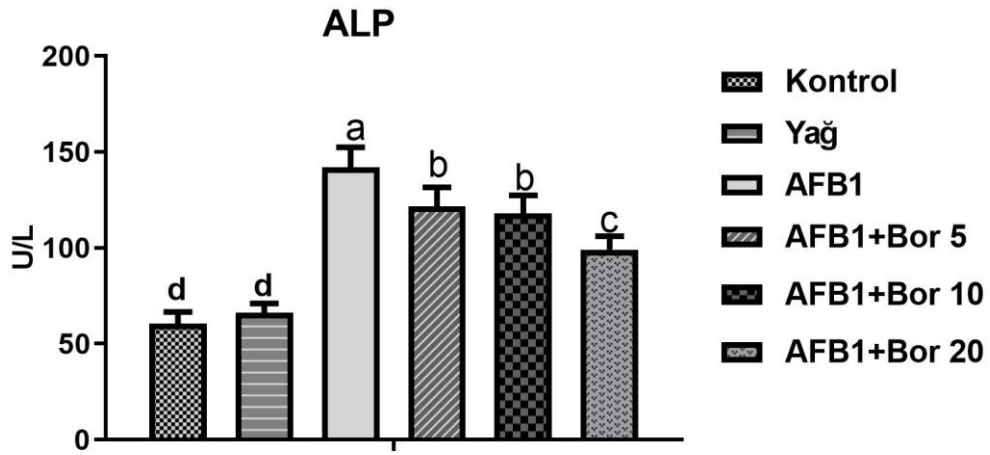
Ratların plazmalarından ölçülen AST (Şekil 3.1) , ALT (Şekil 3.2) ve ALP (Şekil 3.3) değerlerinin kontrolle kıyaslandığında aflatoksin grubunda en yüksek seviyede olduğu belirlendi ( $p<0,001$ ). Buna karşın AFB1 ile birlikte bor verilen gruplarda artan dozlara bağlı olarak bu yüksek değerlerin azaldığı gözlemlendi ( $p<0,001$ ). Ayrıca, bu değerlerin kontrolle karşılaştırıldığında yağ grubunda önemli bir fark meydana getirmediği belirlendi ( $p>0,05$ ).



**Şekil 3.1.** Aflatoxin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların plazma AST düzeyleri üzerine etkisi. <sup>a,b,c,d</sup> farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ( $p<0,001$ ).



**Şekil 3.2.** Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların plazma ALT düzeyleri üzerine etkisi. <sup>a,b,c</sup>: farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ( $p < 0,001$ ).



**Şekil 3.3.** Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların plazma ALP düzeyleri üzerine etkisi. <sup>a,b,c,d</sup>: farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ( $p < 0,001$ ).

### 3.2. MDA ve GSH Düzeyleri Üzerine Etkisi

Ratların tam kan ve karaciğer dokularında ölçülen MDA değerlerinin (Çizelge 3.1.) kontrolle kıyaslandığında aflatoksin grubunda en yüksek seviyede olduğu belirlendi ( $p<0,001$ ). Buna karşın AFB1 ile birlikte bor verilen gruplarda artan dozlara bağlı olarak bu yüksek değerlerin azaldığı gözlemlendi ( $p<0,001$ ). Ayrıca, bu değerlerin kontrolle karşılaştırıldığında yağ grubunda önemli bir fark meydana getirmediği belirlendi ( $p>0,001$ ). Bununla birlikte GSH değerlerinin (Çizelge 3.2.) AFB1 uygulaması sonucu azaldığı gözlenirken ( $p<0,001$ ), AFB1 ile birlikte artan dozlarda bor uygulamalarının azalan GSH düzeylerini artırdığı ve kontrole yaklaştırdığı belirlendi. Yağ grubunda ise bu değerlerin kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark oluşturmadığı tespit edildi.

**Çizelge 3.1.** Erkek ratlarda aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun tam kan ve karaciğer dokularında MDA düzeyi üzerine etkisi.

Gruplar	Kan (nmol/ml)	Karaciğer (nmol/g doku)
<b>Kontrol</b>	6,81 ± 0,43 <sup>c</sup>	2,54 ± 0,15 <sup>e</sup>
<b>Yağ</b>	7,81 ± 0,99 <sup>c</sup>	2,66 ± 0,34 <sup>e</sup>
<b>AFB1</b>	21,03 ± 3,96 <sup>a</sup>	13,07 ± 1,99 <sup>a</sup>
<b>AFB1 + Bor 5</b>	19,82 ± 2,99 <sup>a</sup>	11,11 ± 1,29 <sup>b</sup>
<b>AFB1 + Bor 10</b>	12,73 ± 3,32 <sup>b</sup>	9,13 ± 0,83 <sup>c</sup>
<b>AFB1 + Bor 20</b>	8,66 ± 1,13 <sup>c</sup>	6,03 ± 0,92 <sup>d</sup>

Ortalama ± standart sapma; n=6

<sup>a,b,c,d,e</sup>: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir ( $p<0,001$ ).

**Çizelge 3.2.** Erkek ratlarda aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun tam kan ve karaciğer dokularında GSH düzeyi üzerine etkisi

Gruplar	Kan (nmol/ml)	Karaciğer (nmol/g doku)
<b>Kontrol</b>	53,42 ± 4,25 <sup>a</sup>	41,34 ± 7,29 <sup>a</sup>
<b>Yağ</b>	50,40 ± 4,41 <sup>ab</sup>	40,86 ± 5,54 <sup>a</sup>
<b>AFB1</b>	26,91 ± 3,96 <sup>d</sup>	14,53 ± 2,47 <sup>c</sup>
<b>AFB1 + Bor 5</b>	39,13 ± 5,28 <sup>c</sup>	18,73 ± 2,44 <sup>c</sup>
<b>AFB1 + Bor 10</b>	43,93 ± 6,62 <sup>bc</sup>	29,99 ± 3,16 <sup>b</sup>
<b>AFB1 + Bor 20</b>	47,28 ± 8,72 <sup>ab</sup>	30,65 ± 5,30 <sup>b</sup>

Ortalama ± standart sapma; n=6

<sup>a,b,c,d</sup>: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir ( $p<0,001$ ).

### 3.3. SOD ve CAT Düzeyleri Üzerine Etkisi

Ratların eritrosit ve karaciğer dokularında ölçülen SOD (Çizelge 3.3) ve CAT (Çizelge 3.4.) enzim aktivite değerlerinin kontrolle kıyaslandığında AFB1 verilen grupta en düşük seviyede olduğu ( $p<0.001$ ), AFB1 ile birlikte artan dozlarda bor verilen gruplarda ise bu azalan değerlerin arttığı belirlendi ( $p<0,001$ ). Ayrıca, bu değerlerin kontrolle karşılaştırıldığında yağ grubunda önemli bir değişiklik meydana getirmediği belirlendi ( $p>0,05$ ). Bununla birlikte CAT değerlerinin (Çizelge 2) AFB1 uygulaması sonucu azaldığı gözlenirken ( $p<0,001$ ), AFB1 ile birlikte artan dozlarda bor uygulamalarının azalan CAT değerlerini artırdığı ve kontrole yaklaştırdığı belirlendi. Yağ grubunda ise bu değerlerin kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark oluşturmadığı tespit edildi ( $p>0,05$ ).

**Çizelge 3.3** Erkek ratlarda aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun tam kan ve karaciğer dokularında SOD aktivitesi üzerine etkisi

Gruplar	Eritrosit (U/gHb)	Karaciğer (U/ $\mu$ g protein)
<b>Kontrol</b>	31,77 $\pm$ 5,60 <sup>a</sup>	7,56 $\pm$ 0,97 <sup>a</sup>
<b>Yağ</b>	30,95 $\pm$ 4,33 <sup>a</sup>	7,40 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>
<b>AFB1</b>	9,11 $\pm$ 0,89 <sup>d</sup>	1,94 $\pm$ 0,67 <sup>d</sup>
<b>AFB1 + Bor 5</b>	12,17 $\pm$ 2,03 <sup>d</sup>	3,83 $\pm$ 0,91 <sup>c</sup>
<b>AFB1 + Bor 10</b>	18,77 $\pm$ 2,12 <sup>c</sup>	5,49 $\pm$ 0,45 <sup>b</sup>
<b>AFB1 + Bor 20</b>	24,79 $\pm$ 3,85 <sup>b</sup>	6,11 $\pm$ 0,67 <sup>b</sup>

Ortalama  $\pm$  standart sapma; n=6

<sup>a,b,c,d</sup>: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir ( $p<0,001$ ).

**Çizelge 3.4.** Erkek ratlarda aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun tam kan ve karaciğer dokularında CAT aktivitesi üzerine etkisi

Gruplar	Eritrosit (U/gHb)	Karaciğer (U/µg protein)
Kontrol	58,51 ± 4,75 <sup>a</sup>	12,75 ± 1,71 <sup>a</sup>
Yağ	57,49 ± 5,25 <sup>a</sup>	12,08 ± 1,78 <sup>a</sup>
AFB1	18,88 ± 3,66 <sup>e</sup>	5,48 ± 0,80 <sup>e</sup>
AFB1 + Bor 5	33,49 ± 5,42 <sup>d</sup>	7,85 ± 0,91 <sup>d</sup>
AFB1 + Bor 10	44,15 ± 5,19 <sup>c</sup>	8,18 ± 0,96 <sup>cd</sup>
AFB1 + Bor 20	51,47 ± 5,89 <sup>b</sup>	9,47 ± 0,84 <sup>b</sup>

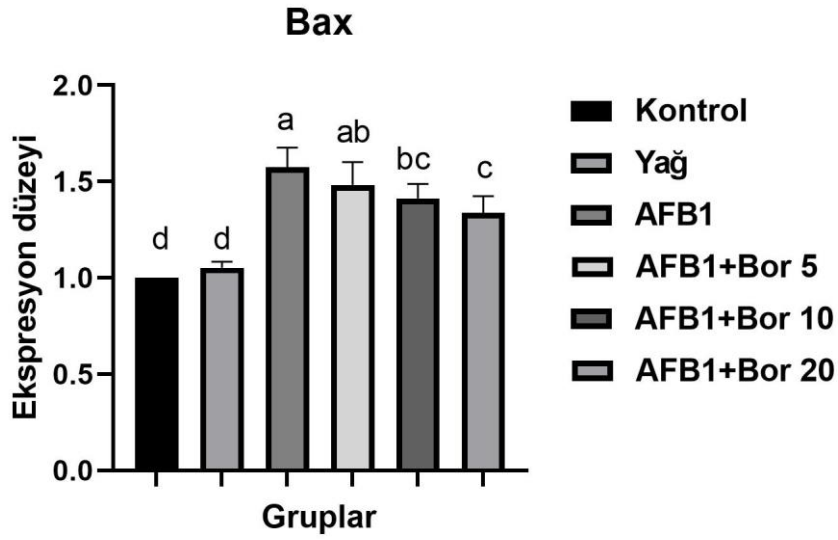
Ortalama ± standart sapma; n=6

<sup>a,b,c,d,e</sup> Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir ( $p<0,001$ ).

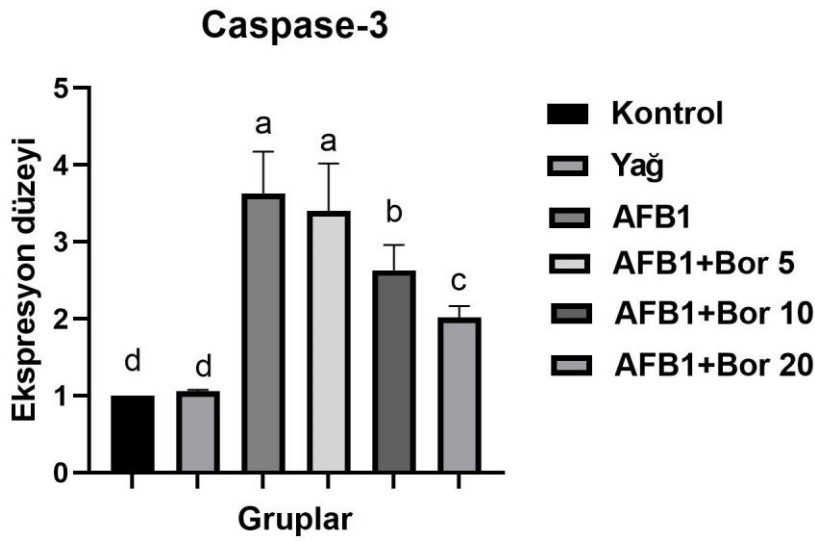
### 3.4. Yangısal ve Apoptotik Gen Ekspresyonları ile DNA Kırılımı Üzerine Etkisi

AFB1 uygulaması sonucunda ratların karaciğer dokusunda apoptotik gen ekspresyonlarından *Bax* (Şekil 3.4), *Caspase 3* (Şekil 3.5), *Caspase 8* (Şekil 3.6), *Caspase 9* (Şekil 3.7), ve *p53* (Şekil 3.8) mRNA ekspresyon düzeylerinin arttığı ve buna karşı antiapoptotik gen olan *Bcl-2*'nin (Şekil 3.9) mRNA ekspresyonunun azaldığı tespit edildi ( $p<0,001$ ). Yangısal süreçte etkili genler olan *TNF-α* (Şekil 3.10) ve *NFκB* (Şekil 3.11) mRNA ekspresyon düzeylerinin AFB1 uygulaması ile arttığı belirlendi ( $p<0,001$ ). AFB1 uygulaması ile birlikte 5, 10 ve 20 mgB/kg dozlarda bor uygulamasının AFB1 ile uyarılan bu gen ekspresyonlarını düzenlediği tespit edildi. Ayrıca, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yağ grubundaki hayvanların karaciğer dokusunda bu genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde bir değişikliğin olmadığı gözlemlendi.

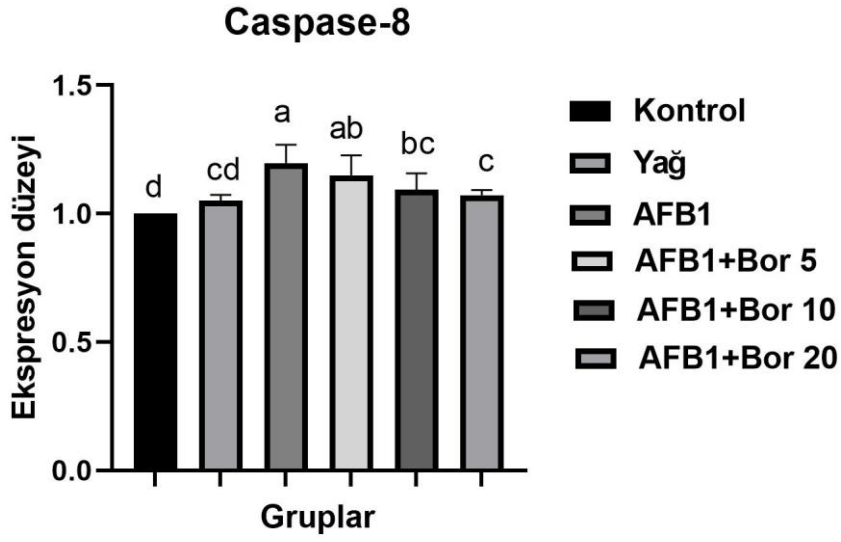
Çalışma sonunda her bir deney grubundan alınan kanlardan ssDNA ng/µl olarak ölçüldü ve ssDNA oranı % olarak değerlendirildi (Şekil.3.12). Deney grupları arasındaki DNA kırılım hasarı incelendiğinde en yüksek DNA hasarının AFB1 uygulanan grupta olduğu ve borun artan dozuna bağlı olarak AFB1 ile oluşan DNA kırılımını azalttığı belirlendi ( $p<0,05$ ).



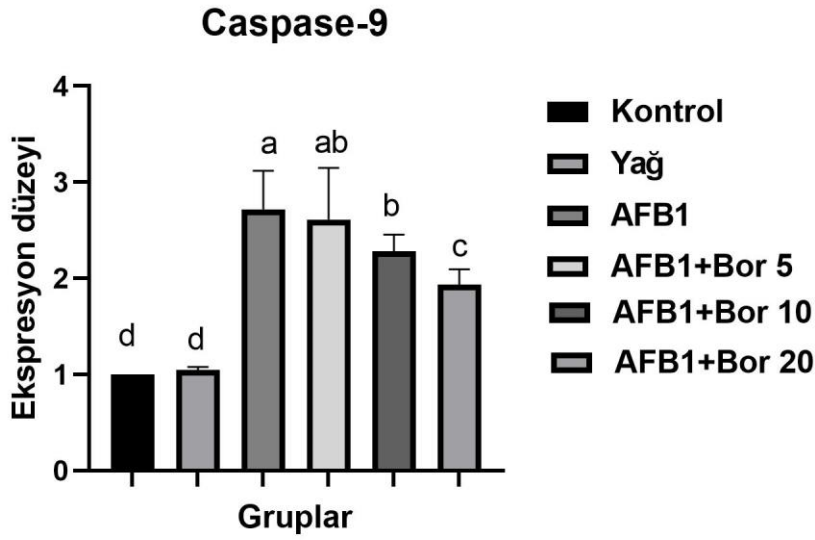
**Şekil 3.4.** Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların karaciğer dokusunda *Bax*'ın mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. <sup>a,b,c,d</sup> farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ( $p < 0,001$ ).



**Şekil 3.5.** Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların karaciğer dokusunda *Caspase 3*'ün mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. <sup>a,b,c,d</sup> farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ( $p < 0,001$ ).

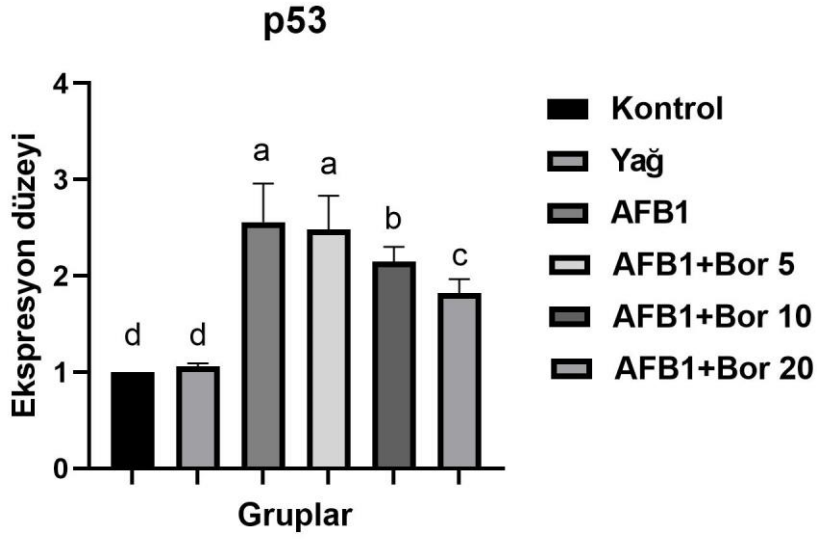


**Şekil 3.6.** Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların karaciğer dokusunda *Caspase 8*'in mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. <sup>a,b,c,d</sup> farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ( $p < 0,001$ ).

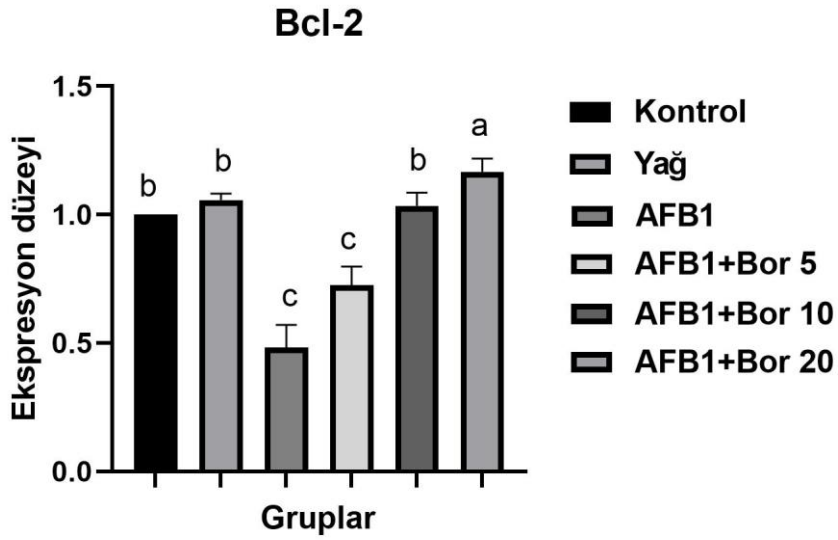


**Şekil 3.7.** Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların karaciğer dokusunda *Caspase 9*'un mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. <sup>a,b,c,d</sup> farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ( $p < 0,001$ ).

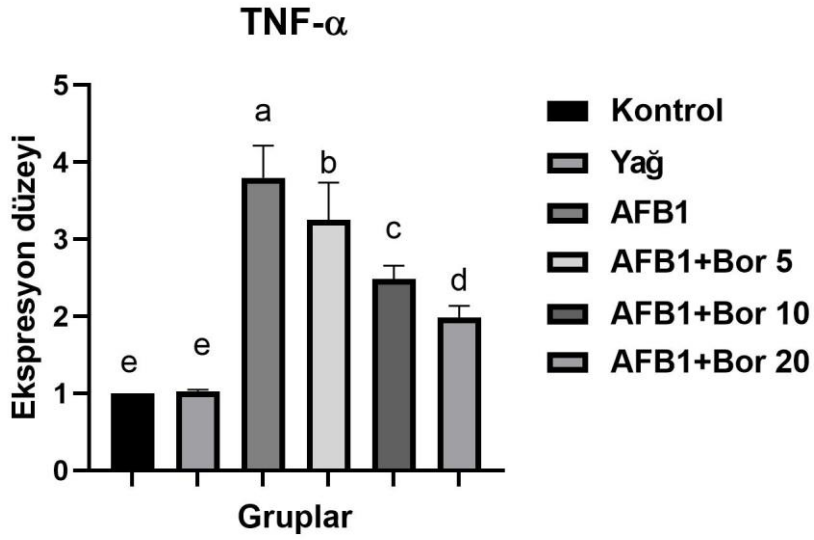




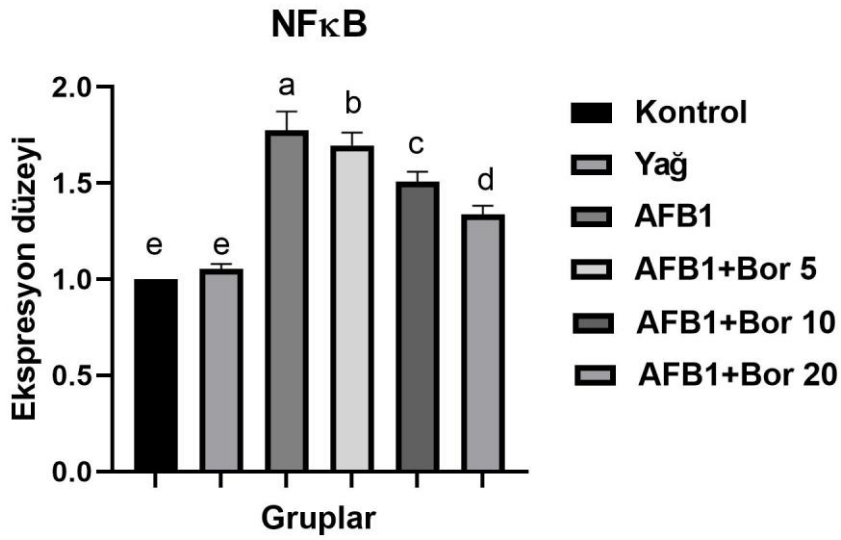
**Şekil 3.8.** Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların karaciğer dokusunda *p53*'ün mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. <sup>a,b,c,d</sup> farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ( $p<0,001$ ).



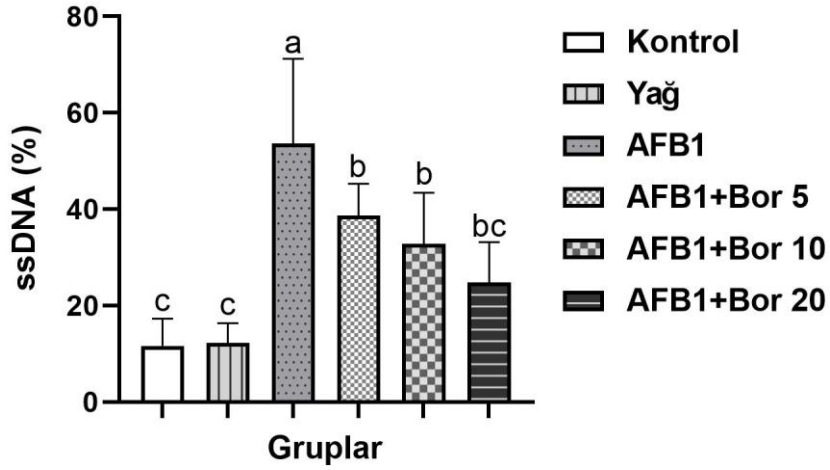
**Şekil 3.9.** Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların karaciğer dokusunda *Bcl-2*'nin mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. <sup>a,b,c,d</sup> farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ( $p<0,001$ ).



**Şekil 3.10.** Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların karaciğer dokusunda *TNF- $\alpha$* 'nin mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. <sup>a,b,c,d</sup> farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ( $p < 0,001$ ).



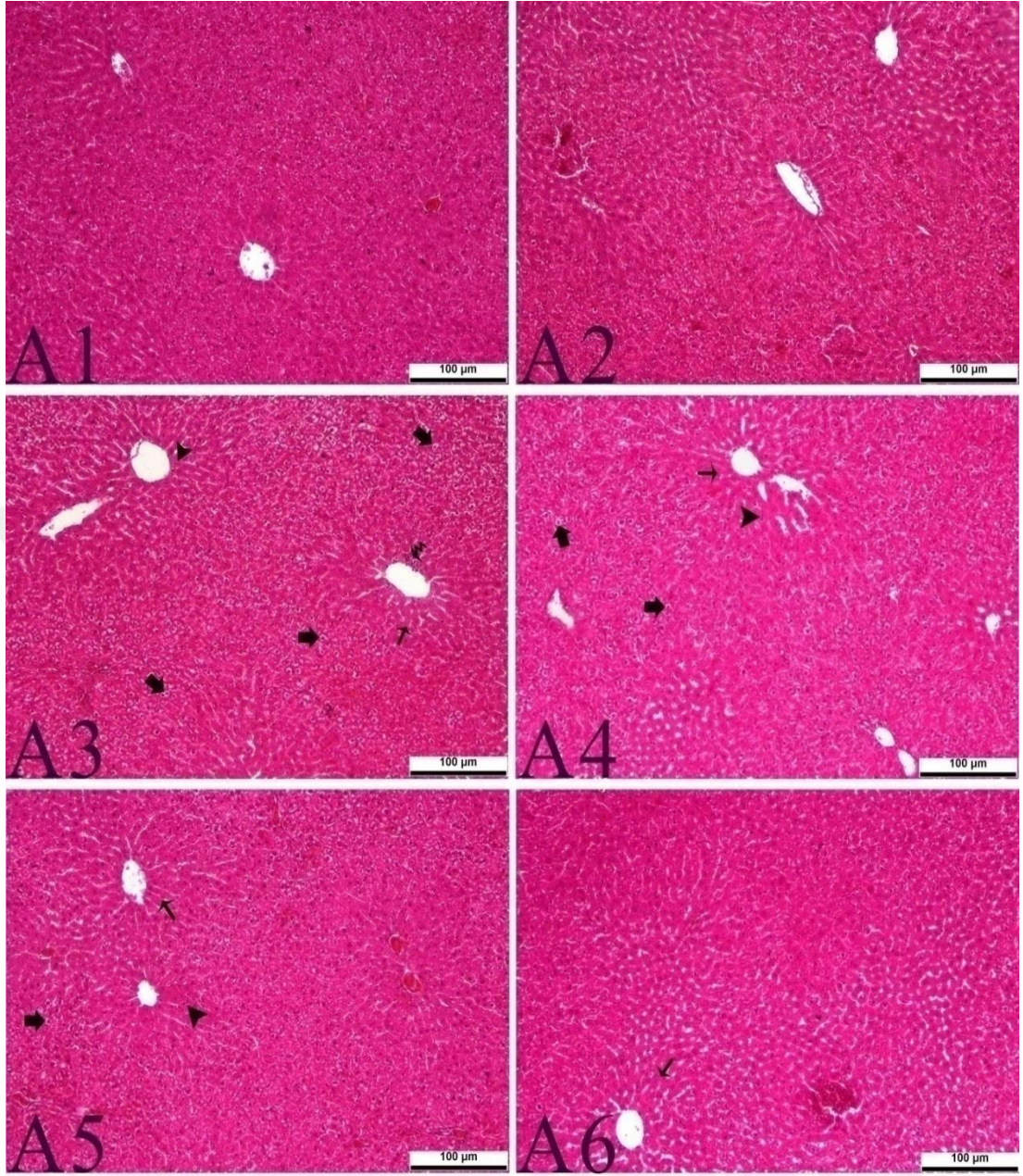
**Şekil 3.11.** Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların karaciğer dokusunda *NF $\kappa$ B*'nin mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. <sup>a,b,c,d</sup> farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ( $p < 0,001$ ).



**Şekil 3.12.** Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların karaciğer dokusunda ssDNA düzeyleri üzerine etkisi. <sup>a,b,c</sup> farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir (p<0,05).

### 3.5. Karaciğer Dokusunda Histopatolojik Değişiklikler

Ratların karaciğer dokusunun H-E boyaması ile yapılan histopatolojik değerlendirmesi Resim 3.1'te gösterildi. AFB1 verilen ratların karaciğer dokusunun histopatolojik incelemesinde, perisentral bölgedeki hepatositlerde dejeneratif ve mononükleer hücre infiltrasyonu alanı, çift çekirdekli hepatosit oluşumları ve remark kordon yapısında bozulmalar gözlemlendi. AFB1 ile birlikte, 5, 10 ve 20 mgB/kg bor uygulaması yapılan gruplarda ise bu değişimlerin artan bor uygulamalarına bağlı olarak azaldığı belirlendi. Ayrıca yağ verilen gruptaki hayvanların karaciğerlerinde herhangi bir histopatolojik değişiklik saptanmadı. Ayrıca Çizelge 3.5'te karaciğer histopatolojisinin istatistiksel değerlendirmesi gösterildi.



**Resim 3.1.**Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun ratların karaciğer dokusu üzerine etkisinin histopatolojik değerlendirilmesi. A1. Kontrol, A2. Yağ, A3. AFB1, A4. AFB1+ 5 mgBor/kg, A5. AFB1+ 10 mgBor/kg, A6. AFB1+ 20 mgBor/kg Kalın ok: Perisentral bölgedeki hepatositlerde dejeneratif değişiklikler, ince ok: Remark kordon yapısında bozulma; kıvrımlı ok: Perisentral bölgede mononükleer hücre infiltrasyonu alanı; okbaşı: Çift çekirdekli hepatosit oluşumlarını göstermektedir.

**Çizelge 3.5.** Aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB1 ile beraber 5, 10 ve 20 mg/kg miktarlarında uygulanan borun rat karaciğer histopatolojisinin istatistiksel değerlendirmesi.

Histopatolojik Bulgu	Kontrol	Yağ	AFB1	AFB1+ Bor 5	AFB1+ Bor 10	AFB1+ Bor 20	“P” DEĞERLERİ
Perisentral bölgedeki hepatositlerde dejeneratif değişiklikler	0,00±0,00 <sup>c</sup>	0,00±0,00 <sup>c</sup>	2,60±0,55 <sup>a</sup>	2,08±1,13 <sup>a</sup>	0,88±1,03 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>c</sup>	0,000
Remark kordon yapısında bozulma	0,00±0,00 <sup>c</sup>	0,00±0,00 <sup>c</sup>	1,60±0,55 <sup>a</sup>	1,40±1,08 <sup>b</sup>	0,55±0,60 <sup>c</sup>	0,18±0,45 <sup>c</sup>	0,000
Perisentral bölgede mononükleer hücre infiltrasyonu alanı	0,00±0,00 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>b</sup>	1,77±0,52 <sup>a</sup>	1,58±0,87 <sup>a</sup>	0,37±0,57 <sup>b</sup>	0,18±0,45 <sup>b</sup>	0,000
Çift çekirdekli hepatosit oluşumları	0,00±0,00 <sup>c</sup>	0,00±0,00 <sup>c</sup>	2,27±0,41 <sup>a</sup>	1,42±0,85 <sup>b</sup>	0,72±0,87 <sup>c</sup>	0,37±0,56 <sup>c</sup>	0,000

#### 4. TARTIŞMA

Karaciğer üzerinde toksik etki gösteren AFB1, bu durumun belirlenmesinde önemli belirteçler olan AST, ALT ve ALP düzeylerinde artış meydana getirmektedir (El-Bahr, 2015). Bu durum ayrıca AFB1 verilen ratlarda yapılan önceki çalışmaların (El-Agamy, 2010; Sharma vd, 2011; Karaca vd., 2019; Yılmaz vd., 2017) bulgularında da ifade edilmektedir. Yapılan çalışmada, oral olarak uygulanan AFB1 rat karaciğerinde ALT, AST ve ALP aktivitelerinde artışa neden olmuştur. Bu sonuçlar AFB1'in karaciğer hasarı meydana getirdiğini ve karaciğerin işlevsel bozukluğunu göstermektedir. Bununla birlikte, AFB1 uygulanan ratlarda oral bor uygulaması sadece AFB1 verilen ratlara kıyasla belirtilen transaminaz enzim aktivitelerinde belirgin bir iyileşme meydana getirdi. Bu durum dokular üzerinde koruyucu etkisinin olduğu belirtilen borun (İnce vd., 2012; 2014), AFB1 ile oluşan karaciğer hasarına karşı da koruyucu etkisinin olduğunu ve bu enzim parametrelerini normale yaklaştırdığını göstermiştir.

Karaciğer üzerinde güçlü bir toksik ve karsinojenik etki gösteren AFB1 oksidatif hasarın ana belirteçlerinden biri olan lipid peroksidasyon ve GSH düzeyleri ile antioksidan enzim aktiviteleri üzerinde önemli bir rol oynamaktadır (El-Bahr, 2015; Abdel-Daim vd, 2021; Karaca vd., 2019; Yılmaz vd., 2017). Fischer 344 ratlarının karaciğerinde AFB1 tarafından lipid peroksidasyonunun indüklenmesinin araştırıldığı bir çalışmada; 100 µg/100 g dozda periton içi AFB1 uygulamasından bir gün sonra karaciğer homojenatında MDA ve konjuge dienlerde bir artışın olduğu, artışın uygulamadan 3 gün sonra en yüksek seviyeye ulaştığı ve 14 güne kadar yüksek bir seviyede kaldığı belirtilmiştir. Çalışmada ayrıca, selenyum (6 ppm 6 hafta süresince), E vitamini (30 mg/100 g, 5 gün) ve spesifik bir demir şelatörü olan deferoksamin (1 mg/100 g, AFB1 uygulamasından 30 dakika önce periton içi) ile uygulamaların karaciğer hücre hasarının yanı sıra lipid peroksidasyonu da önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir. Çalışmanın sonunda AFB1'in rat karaciğerinde lipid peroksidasyona neden olduğu ve bunun AFB1'in neden olduğu oksidatif ve hücresel hasarlar ve sonunda tümör oluşumuna yol açan DNA hasarının altını çizen mekanizmalardan biri olabileceği vurgulanmıştır (Shen, vd.,1994). Ratlara AFB1'in 50 µg/kg dozda haftada iki kez 14 gün süresince verildiği çalışmada kontrole kıyasla

AFB1 uygulanan hayvanların karaciğer ve böbrek dokularında GSH konsantrasyonu ve GPx, SOD ve CAT aktivitelerinde kayda değer düşüşlerin yanı sıra MDA ve nitrik oksit (NO) düzeylerinde dikkate değer artışların fark edildiği ve bu sonuçlar ile oksidatif stresin olduğu bildirilmiştir. Ayrıca çalışmada suda yaşayan kahverengi alglerden ekstrakte edilen suda çözünür sülfatlanmış bir polisakkarit olan fucoidanın AFB1 ile birlikte 100 ve 200 mg/kg olacak şekilde 14 gün verilmesinin AFB1'in oluşturduğu oksidatif hasarı engellediği rapor edilmiştir (Abdel-Daim vd., 2021) AFB1'nin 0,5 mg/kg dozda 7 gün oral olarak ratlara verilmesinin karaciğer dokusunda oluşturduğu oksidatif hasar ile 5 mg/kg miktarda likopenin AFB1 ile birlikte verilmesine başlanıp 15 gün süresince uygulanmış ve likopenin bu hasara karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. Çalışmada AFB1 grubunun karaciğer dokusunda MDA düzeyinde anlamlı artış, GSH düzeyinde ve antioksidan enzim aktivitelerinde anlamlı düzeyde azalma gözlenmiştir. Likopenin ise antioksidan özelliğinden dolayı MDA düzeyinde azalma ve GSH ile antioksidan enzim aktivitelerinde artış meydana getirdiği saptanmıştır (Karaca vd., 2019). Wistar-Albino ratlara 2,5 mg/kg tek doz AFB1 uygulamasına karşı oluşan oksidatif stresin Vit E'nin 100 mg/kg dozda 20 gün uygulaması ile engellenmesine yönelik yapılan çalışmada; AFB1 uygulamasının artan MDA seviyesi ve azalan GSH seviyesi, GST, CAT, GSH-Px, SOD ve glikoz-6-fosfat ile oksidatif strese neden olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, uygulaması yapılan Vit E'nin plazma AFB1'in oluşturduğu oksidatif stres belirteçlerini iyileştirdiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde yapılan bu çalışmada, AFB1 uygulaması sonucu MDA düzeylerinin arttığı, GSH seviyeleri ile SOD ve CAT aktivitelerinde belirgin bir azalışın meydana geldiği, buna karşın AFB1 ile birlikte artan dozlarına bağlı olarak borun antioksidan etkisine bağlı olarak bu değerleri iyileştirdiği belirlendi.

Bazı kanserojenlerin ve mutajenlerin kromozom aberrasyonları ve DNA zincir kırılmaları ürettiği bilinmektedir (Ponti vd., 2019). Bu bakış açısından, mutajenik aktivite ile DNA tek iplikli kopmalarını (ssDNA) ve kromozomu indüklemeye kapasitesinin karşılaştırması rapor edilen bir çalışmada AFB1, chaetoglobosin-B, fusarenon-X, luteoskrin, mikofenolik asit, okratoksin A, patulin, penisilik asit ve sterigmatosininin çeşitli konsantrasyonlarının 2 gün süresince FM3A hücrelerine (bir C3H fare meme kanseri hücre hattı) maruz bırakılması sonucu, AFB1, mikofenolik asit ve sterigmatosininin yüksek konsantrasyonlarda ssDNA üzerinde bir etki

yarattığı ifade edilmiştir (Umeda vd., 1977). Karotenoidlerden beta-karoten, beta-apo-8'-karotenol, kantaksantin, astaksantin, likopen (300 mg/kg diyet) ve A vitamini (21000 RE/kg diyet)'nin ratlarda AFB1 (2 x 1 mg/kg) tarafından karaciğer karsinogenezinin başlatılması üzerindeki etkileri, AFB1 tarafından indüklenen karaciğer DNA tek zincir kırıkları ve [3H] AFB1'in karaciğer DNA'sına ve plazma albüminine *in vivo* bağlanması bakımından incelenmiş ve sonuçta karotenoidlerin DNA tek zincir kırıkları ve AFB1'in karaciğer DNA'sına ve plazma albüminine bağlanmasını azalttığı belirtilmiştir (Gradelet vd., 1998). İnce vd. (2014) yaptıkları çalışmada borun (5, 10 ve 20 mg/kg, i.p.) siklofosfamid (CYC; 75 mg/kg i.p.) ile ratlarda indüklenen oksidatif stres üzerindeki olası koruyucu etkisini değerlendirmişlerdir. CYC uygulamasının oksidatif strese ve mononükleer lökositlerde DNA hasarına neden olduğu belirtilmiş buna karşın borun CYC'nin neden olduğu oksidatif stresin şiddetini ve dokulardaki genotoksisiteyi azalttığı vurgulanmıştır. Benzer şekilde yapılan çalışmada AFB1'in ssDNA miktarını artırdığı buna karşın borun artan dozuna bağlı olarak ssDNA miktarının oluşumunu azalttığı belirlendi. Bu durum borun AFB1 ile indüklenen DNA hasarını azaltıcı etki yaptığını göstermektedir. Abdel-Wahhab vd. (2016) yaptıkları çalışmada, AFB1'in 0,125 mg/kg dozda 3 hafta süresince oral olarak verilmesiyle ratların karaciğer dokularında *Bax* ve *Caspase-3* mRNA ekspresyonlarının arttığı, *Bcl-2* mRNA ekspresyonlarının ise azaldığı belirtilmiştir. Ayrıca AFB1 ile oluşan ekspresyon değişimlerinin kurkumin nanopartiküllerinin verilmesi ile düzeldiği, bu durumun nanopartiküllerin antioksidan etkilerinden kaynaklı olabileceği vurgulanmıştır. *Bacillus amyloliquefaciens* B10'un AFB1'in toksik etkilerini azaltmaya yönelik yapılan çalışmada; spesifik patojen içermeyen (SPF) Kunming farelerine 28 gün boyunca *B. amyloliquefaciens* B10 ve AFB1 gavaj yoluyla uygulanmış ve moleküler mekanizmanın incelenmesi amacıyla *Bax*, *Bcl-2*, *BIP*, *CHOP*, *JNK*, *Caspase-12*, *Caspase-9* ve *Caspase-3* için gen ekspresyonları belirlenmiştir. Çalışmanın sonunda, AFB1'in farelerin karaciğerlerinde oksidatif hasarı ve apoptozu indüklediğini, ancak *B. amyloliquefaciens* B10 verilen fareler için apoptoz ile ilgili gen ifadelerinin önemli ölçüde tersine döndüğü ifade edilmiştir (Li vd., 2021). Yapılan çalışmada AFB1'in rat karaciğerinde apoptozu indükleyip indüklediğini değerlendirmek için mitokondriyal yol ile ilişkili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri araştırıldı ve AFB1 uygulaması ile *Bax*, *Caspase 3*, *Caspase 8* ve *Caspase 9* ile *p53* mRNA



ekspresyon düzeylerinin arttığı, *Bcl-2* ekspresyon düzeylerinin ise azaldığı belirlendi. AFB1 ile tedavi edilen ratların hepatositlerinde apoptotik genlerin mRNA ekspresyonundaki artış AFB1 tarafından mitokondriyal sinyal yolu indüklenen hepatositlerin aşırı apoptozunu düşündürmektedir (Abdel-Wahab ve Al-Harizy, 2013; Abdel-Aziem vd. 2014). Ayrıca bu durum AFB1'in mitokondriyal veya hücre ölümü reseptör yolları yoluyla hücrel apoptoza yol açabileceğini de göstermiştir (Abdel-Aziem vd., 2014; Peng vd., 2014). Bu oluşan apoptotik durum ise serbest radikallerin aşırı oluşumundan kaynaklanan oksidatif stres ve antioksidan enzimlerin azalmasına bağlı olabileceğini gösterebilir (Yener vd., 2009; Kanbur vd., 2011). Apoptozisin önemli nedeni olan serbest radikaller mitokondriyal membran potansiyelini bozmakta ve mitokondriden sitokrom c'nin salınımıyla uyarılan *Bax*'ta mitokondriyal apoptozisi oluşturmaktadır (Dejean vd., 2006). Ayrıca sitoplazmadaki sitokrom c, *Caspase-9*'u ve ardından *caspase-3*'ün aktivasyonunu etkinleştirmekte ve apoptoz sürecini uyarmaktadır (Antonsson, 2004). Benzer şekilde yapılan çalışmada AFB1 uygulamasının karaciğer dokusundan belirlenen apoptotik genlerin ekspresyonlarını artırdığı, antiapoptotik gen olan *Bcl-2*'nin ekspresyonunu azalttığı, hücrel apoptotik mekanizmalar üzerine etki gösterebilen (Cengiz vd., 2020) borun artan dozlarına bağlı olarak bu genlerin ekspresyonlarını düzenlediği belirlenmiştir.

İnflamasyonda akut faz reaksiyonunu oluşturan sitokinlerden biri olan *TNF- $\alpha$* , *NFkB* yoluyla kronik inflamasyon ve tümör gelişiminde rol oynayan diğer sitokinlerin üretimini düzenleyen anahtar bir faktördür (Karabela vd., 2011). AFB1'in yangısal süreçteki önemini gösteren bir çalışmada; ratlarda AFB1'in neden olduğu sitotoksositeye karşı chitosan nanoparçacıklarının tek başına veya quercetin ile kullanımları araştırılmış, bu amaçla 4 hafta süreyle AFB1 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dozda, chitosan nanoparçacıkları 140 ve 280  $\text{mg}/\text{kg}$  dozlarda tek başlarına veya 50  $\text{mg}/\text{kg}$  quercetin ile birlikte uygulanmıştır. Çalışma sonunda AFB1'in *TNF- $\alpha$*  düzeylerini artırdığı ve chitosan nanoparçacıkları veya quercetin'in ise bu düzeyleri düşürdüğü bildirilmiştir (Abdel-Wahhab vd., 2015). Sütten kesilmiş domuz yavrularının diyetlerine 320 ppb miktarında AFB1 ile kontamine yemin 30 gün süresince verilmesi ile pro-inflamatuar sitokinlerin düzeylerinde artışın meydana geldiği, buna karşın aynı süre içerisinde AFB1 ile birlikte antioksidan etkinliği bilinen üzüm çekirdeğinin (%8 üzüm çekirdeği içeren yem) verilmesinin ise bu düzeyleri azalttığı belirtilmiştir (Taranu

vd., 2019). Yapılan çalışmada AFB1 uygulamasının *TNF- $\alpha$*  ve *NFkB* mRNA ekspresyon düzeylerini artırdığı, bor uygulamasının ise bu genlerin ekspresyonlarını azalttığı belirlendi. Bu süreçte borun inflamatuvar sitokinler üzerinde etkinlik gösterdiği (İnce vd., 2020) ve AFB1 ile indüklenen yangısal süreci azaltarak oksidatif stres ve doku hasarının oluşumunu engellediği söylenebilir.

Abdel-Wahhab vd. (2015) yaptıkları çalışmada, oral olarak 0,125 mg/kg dozda 21 gün süreyle AFB1 verilen ratlardan alınan karaciğer bölümlerinin mikroskopik incelemesinde, safra kanallarının dallanması ve portal yol çevresinde çoklu fibrozis alanları, mononükleer hücreli infiltrasyonlar ile düzensiz karaciğer mimarisi, çekirdeklerde düzensiz kontur ve yoğun kromatin yapısının gözlendiğini rapor etmişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada ratlara periton içi 50  $\mu$ g/kg dozda AFB1'in 14 gün uygulaması sonucu karaciğer dokularında piknotik çekirdekte ve hepatositlerde dejenerasyonların, sentral damarlarda konjesyon ve yangısal infiltrasyonların olduğu belirtilmiştir (Abdel-Daim vd., 2021). İnce vd. (2012) CCl<sub>4</sub> karaciğer hasarı meydana getirilen ratlarda 50, 100 ve 200 mg/kg periton içi borik asit uygulamaları ile karaciğerde yağ dejenerasyonlarının ve hepatositlerde gözlenen nekrozun şiddetinin azaldığını belirtmişlerdir. Belirtilen literatürlerle uyumlu olarak yapılan bu çalışmada ratlara 0,125 mg/kg dozda 21 gün süre ile AFB1'in verilmesi sonucu karaciğer dokusunda perisentral bölgedeki hepatositlerde dejenetratif değişiklikler, remark kordon yapısında bozulma, perisentral bölgede mononükleer hücre infiltrasyonu alanı ve çift çekirdekli hepatosit oluşumları gözlenmiştir. Buna karşın doku ve organlar üzerinde koruyucu etki sergilediği belirtilen borun (İnce vd., 2012; 2014) artan dozuna bağlı olarak AFB1 ile gözlenen değişimleri azalttığı ve doku üzerinde koruyucu etki sergilediği belirlenmiştir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan çalışmada AFB1 verilen ratlarda karaciğer enzim aktivitesini gösteren AST, ALT ve ALP düzeylerinin, lipid peroksidasyonun, DNA kırıklarının ve proinflatuvar ile apoptotik gen ekspresyon seviyelerinin arttığı, GSH ve antioksidan enzim aktivitelerinin azaldığı ve karaciğer dokusunda hasara ilişkin histopatolojik değişikliklerin olduğu belirlendi. AFB1 ile birlikte verilen 5, 10 ve 20 mg/kg dozda bor uygulamalarının ise oluşan bu olumsuz değişiklikleri tersine çevirdiği tespit edildi. Sonuçta borun AFB1 ile indüklenen karaciğer hasarına karşı antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkisi ile birlikte hepatoprotektif etki sergilediği ortaya çıkarıldı. Bu açıdan bakıldığında, özellikle bordan zengin besinsel öğelerin (sebzeler, meyveler, sert kabuklu yemişler ve baklagiller başta olmak üzere) tüketilmesinin, insan ve hayvan sağlığı açısından aflatoksinler başta olmak üzere karaciğer hasarına neden olan maddelerin maruziyetine karşı potansiyel koruyucu etkilerinin olabileceği görülmüştür.

Ülkemiz bor rezervi açısından oldukça zengin bir konumdadır. Bu nedenledir ki bor ve bileşiklerinin sanayideki kullanımının yanında sağlık alanında kullanıma sokulması borun kullanım alanlarına ilave bir katkı yapacaktır. Bu çalışmada aflatoksinlerin neden olduğu karaciğer hasarına karşı borun koruyucu etkisinin belirlenmesi literatüre ilave bilgilerin girmesine olanak sağlamış ve ayrıca aflatoksiklerden kaynaklı oluşabilecek olumsuz etkilerin azaltılmasında bor ve bileşiklerin kullanılabilceğini göstermiştir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abdel-Aziem, S.H., Hassan, A.M., El-Denshary, A.S., Hamzawy, M.A., Mannaa, A.F., Abdel-Wahhab, M.A. (2014). Ameliorative effects of thyme and calendula extracts alone or in combination against aflatoxins-induced oxidative stress and genotoxicity in rat liver. *Cytotechnology* 66 (3):457-470.
- Abdel-Daim, M M., Abdeen, A., Jalouli, M., Abdelkader, A., Megahed, A., Alkahtane, A., Almeer, R., Alhoshani, N.M., Al-Johani, N.S., Alkahtani, S., Aleya, L. (2021). Fucoidan supplementation modulates hepato-renal oxidative stress and DNA damage induced by aflatoxin B1 intoxication in rats. *Science of The Total Environment*,768: 144781.
- Abdel-Wahab, A.F., Al-Harizy, W.M. (2013). Propofol protects against ischemia/reperfusion injury associated with reduced apoptosis in rat liver. *ISRN Anesthesiol.*:1-8.
- Abdel-Wahhab, M.A., Abdel-Galil, M.M., El-Lithey, M. (2005). Melatonin Counteracts Oxidative Stress in Rats Fed An Ochratoxin A Contaminated Diet, *J. Pineal. Res.*, 38(2): 130.
- Abdel-Wahhab, M.A., Ahmed, H.H., Hagazi, M.M.(2006) Prevention of Aflatoxin B1-Initiated Hepatotoxicity In Rat by Marine Algae Extracts, *J. Appl. Toxicol.*, 26(3): 229.
- Abdel-Wahhab, M.A., Aljawish, A., El-Nekeety, A.A., Abdel-Aiezm, S.H., Abdel-Kader, H.A., Rihn, B.H., Joubert, O. (2015). Chitosan nanoparticles and quercetin modulate gene expression and prevent the genotoxicity of aflatoxin B1 in rat liver. *Toxicology reports*, 2: 737-747.
- Abdel-Wahhab, M.A., Aly, S.E. (2003). Antioxidants and Radical Scavenging Properties of Vegetable Extracts in Rats Fed Aflatoxin-Contaminated Diet, *J. Agric. Food Chem.*, 9, 51(8): 2409.
- Abdel-Wahhab, M.A., Salman, A.S., Ibrahim, M.I.M., El-Kady, A.A., Abdel-Aziem, S.H., Hassan, N.S., & Waly, A. I. (2016). *Curcumin nanoparticles loaded hydrogels protects against aflatoxin B1-induced genotoxicity in rat liver. Food and Chemical Toxicology*, 94: 159–171.
- Aguillar, F., Hussain, S.P., Ceerutti, P. (1993). Aflatoxin B1 induces the transversion of G-T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90(18): 8586–8590.
- Al-Fartusie, F.S., Mohssan, S.N. (2017). Essential Trace Elements and Their Vital Roles in Human Body. *Indian Journal of Advances in Chemical Science.*; 5(3): 127-136
- Allcroft, R., Lewis, G. (1963). Groundnut toxicity in cattle: experimental poisoning of calves and a report on clinical effects in older cattle. *Vet. Rec.* 75: 487-493.
- Antonsson, B. (2004). Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. *Mol. Cell. Biochem.* 256-257: 141-155.
- Arakawa, Y. (2016). Trace elements maintaining the vital functions. *Nihon Rinsho.*; 74(7):1058-1065. PMID: 27455793.
- Armstrong, T.A., Spears, J.W.(2003). Effect of boron supplementation of pig diets on the production of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *J Anim Sci.*;81(10):2552-2561.

- Asim, M., Sarma, M.P., Thayumanavan, L., Kar, P. (2011). Role of aflatoxin B1 as a risk for primary liver cancer in north Indian population, *Clin. Biochem.* 44; 1235–1240.
- Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Savran, E.Ş., Yılmaz, B. (2019). The Role Of Antioxidant Enzymes İn Oxidative Stress - Superoxide Dismutase (Sod), Catalase (Cat) And Glutathione Peroxidase (Gpx). *Med J SDU*; 26(3): 362-369.
- Aslankoç, R., Gumral, N., Saygın, M., Senol, M., Ascı, H., Cankara, F.N., Comlekci, S. (2018). The impact of electric fields on testis physiopathology, sperm parameters and DNA integrity—The role of resveratrol. *Andrologia*;50: 12971.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2010). Toxicological Profile for Boron. US Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Ayala, A., Munoz, M.F., Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*; Article ID 360438: 31 pages
- Ayhancı, A., Tanrıverdi, D. T., Sahintürk, V., Cengiz, M., Appak-Baskoy, S., Sahin, I. K. (2019). Protective Effects of Boron on Cyclophosphamide-Induced Bladder Damage and Oxidative Stress in Rats. *Biological Trace Element Research*. doi:10.1007/s12011-019-01969-z
- Bakirdere, S., Örenay, S., Korkmaz, M. (2010). Effect of boron on human health. *TOMPJ* 3: 54-59.
- Barranco, W.T., Eckhart, C.D. (2004). Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Lett.*;216(1):21-29.
- Başaran, N., Duydu, Y., Bolt, H.M. (2012). Reproductive toxicity in boron exposed workers in Bandırma, Turkey. *Trace Elem Med Biol.*;26(2-3):165-167.
- Beattie, J.H., Peace, H.S. (1993). The influence of a low-boron diet and boron supplementation on bone, major mineral and sex steroid metabolism in postmenopausal women. *Br J Nutr.* 1993;69(3):871-884.
- Benderdour, M., Van Bui, T., Hess, K., Dicko, A., Belleville, F., Dousset, B. (2000). Effects of boron derivatives on extracellular matrix formation. *J Trace Elem Med Biol.*;14(3):168-173.
- Beutler, E., Duron, O., Kelly, B.M. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 61:882–888.
- Bhatnagar, D. and Garcia, S. (2001). *Aspergillus* in *Guide to Foodborne Pathogens*, pp. 35-50, Eds. Labbe, R.G. & Garcia, S., Wiley Interscience, New York, USA.
- Bingham, A.K., Huebner, H.J., Phillips, T.D., Bauer, J.E. (2004). Identification and reduction of urinary aflatoxin metabolites in dogs. *Food Chem. Toxicol.* 42:1851-1858.
- Blech, M.F., Martin, C., Borrelly, J. (1990). Hartemann P. Treatment of deep wounds with loss of tissue: value of a 3 percent boric acid solution [in French]. *Presse Med.*;19(22):1050-1052.
- Bolaños, L., Lukaszewski, K., Bonilla, I., Blevins, D. (2004). Why boron? *Plant Physiol Biochem.*;42(11):907-912.
- Bourgeois A.C., Scott, M.E., Sabally, K., Koski, K.G. (2007). Low dietary boron reduces parasite (nematoda) survival and alters cytokine profiles but the infection modifies liver minerals in mice, *J. Nutr.* 137: 2080–2086.

- Bruchim, Y., Segev, G., Sela, U., Bdolah-Abram, T., Salomon, A., Aroch, I. (2012). Accidental fatal aflatoxicosis due to contaminated commercial diet in 50 dogs. *Res. Vet. Sci.* 93:279-287.
- Cary, J.W., Bhatnagar, D. and Linz, J. E. (2000). Aflatoxins: Biological significance and regulation of biosynthesis. In *Microbial Foodborne Diseases Mechanisms of pathogenesis and toxin synthesis*. Ed: Cary, J. W.; Bhatnagar, D.; Linz, J. E. Technomic Publishing Company, Pennsylvania, USA pp. 317-330.
- Cavin, C., Holzhauser, D., Constable, A., Huggett, A.C., Schilter, B. (1998) The Coffee-Specific Diterpenes Cafestol and Kahweol Protect Against Aflatoxin B1-Induced Genotoxicity Through A Dual Mechanism, *Carcinogenesis*, 19(8), 1369.
- Cavin, C., Marin-Kuan, M., Langouët, S., Bezençon, C., Guignard, G., Verguet, C., Piguet, D., Holzhäuser, D., Cornaz, R., Schilter, B. (2008). Induction of Nrf2-mediated cellular defenses and alteration of phase I activities as mechanisms of chemoprotective effects of coffee in the liver, *Food Chem. Toxicol.* 46: 1239–1248.
- Cengiz, M., Sahinturk, V., Yildiz, S.C., Şahin, İ.K., Bilici, N., Yaman, S.O., Altuner, Y., Appak-Baskoy, S., Ayhanci, A. (2020). Cyclophosphamide induced oxidative stress, lipid per oxidation, apoptosis and histopathological changes in rats: Protective role of boron. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 62:126574.
- Chacko, S., Samanta, S. (2016). Hepatocellular carcinoma: a life-threatening disease, *Biomed. Pharmacother.* 84:1679–1688.
- Choi, K.-C., Chung, W.-T., Kwon, J.-K., Yu, J.-Y., Jang, Y.-S., Park, S.-M., Lee, S.-Y., Lee, J.-C. (2010). Inhibitory effects of quercetin on aflatoxin B 1-induced hepatic damage in mice, *Food Chem. Toxicol.* 48:2747–2753.
- Chueh, K.S., Huang, S.P., Lee, Y.C., Wang, C.J., Yeh, H.C., Li, W.M., Wu, W.J., Tsai, Y.F., Tsai, C.C., Juan, H.C., Huang, C.H., Liu, C.C. (2012). The comparison of the aging male symptoms (AMS) scale and androgen deficiency in the aging male (ADAM) questionnaire to detect androgen deficiency in middle-aged men. *J Androl.*;33(5):817-823.
- Cikler-Dulger, E., Sogut, I. (2020). Investigation of the protective effects of boric acid on ethanol induced kidney injury. *Biotechnic & Histochemistry*: 1–8.
- Coban, F. K., Ince, S., Kucukkurt, I., Demirel, H. H., Hazman, O. (2015). Boron attenuates malathion-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats. *Drug and chemical Toxicology*, 38(4): 391-399.
- Codner, R.C., Sargeant, K. and Yeo, R. (1963). Production of aflatoxin by the culture of strains of *Aspergillus flavus-oryzae* on sterilized peanuts. *Biotechnology and Bioengineering* 5: 185-192.
- Cook, W.O., Richard, J.L., Osweiler, G.D., Trampel, D.W. (1986). Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis: rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxins B1 and M1. *Am. J. Vet. Res.* 47: 1187-1825.
- Coppock, R.W., Christian, R.G. and Jacobsen, B. J. (2018). Aflatoxins. *Veterinary Toxicology* (Third Edition) Basic and Clinical Principles, 69: Pages:983-994
- Coppock, R.W., Christian, R.G., Jacobsen, B.J. (2012). Aflatoxins. In: Gupta, R.C. (Ed.), *Veterinary Toxicology Basic and Clinical Principles*, second ed. Elsevier, Toronto.
- Coppock, R.W., Dziwenka, M. (2016). Green tea extract. In: Gupta, R.C. (Ed.), *Nutraceuticals. Efficacy, Safety and Toxicity*. Academic Press/Elsevier, Amsterdam: pp. 633-652.

- Coppock, R.W., Jacobsen, B.J. (2009). Mycotoxins in animal and human patients. *Toxicol. Ind. Health.* 25: 637-655.
- Costa, S., Utan, A., Speroni, E., Cervellati, R., Piva, G., Prandini, A., Guerra, M.C. (2007). Carnosic acid from rosemary extracts: a potential chemoprotective agent against aflatoxin B1. An *in vitro* study. *J. Appl. Toxicol.* 27: 152-159.
- Cui, Y., Winton, M.I., Zhang, Z.F., Rainey, C., Marshall, J., De Kernion, J.B., Eckhert, C.D. (2004). Dietary boron intake and prostate cancer risk. *Oncol Rep.*;11(4):887-892.
- Culver, B.D., Shen, P.T., Taylor, T.H., Lee-Feldstein, A., Anton-Culver, H., Strong, P.L. (1994). The relationship of blood- and urine-boron exposure in borax-workers and usefulness of urine-boron as an exposure marker. *Environ. Health Perspect.* 102: 133-137.
- Çöl, M., Çöl, C. (2003). Environmental boron contamination in waters of Hisarcik area in the Kutahya province of Turkey. *Food Chem Toxicol.*; 41(10): 1417-1420.
- De Oliveira, C.A., and Corassin, C.H. (2014). Aflatoxins. *Mycotoxins and Their Implications in Food Safety*: 6-19.
- Dejean, L.M., Martinez-Caballero, S., Manon, S., Kinnally, K.W. (2006). Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by Bcl-2 family proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1762: 191-201.
- Deshpande, S.S. (2002). *Handbook of Food Toxicology*. Marcel Dekker, Inc. NY.
- Doğan, G., Sabah, E., Erkal, T. (2015). Borun çevresel etkileri üzerine Türkiye’de yapılan bilimsel araştırmalar. 19. Uluslararası Madencilik Kongresi; 9-12 Haziran 2015; İzmir, s.: 425-31.
- Drabkin, D.L., Austin, J.H. (1935). Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed 112, blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *J Biol Chem*:51-65.
- Drago, S.R. (2017). Minerals. *In: Nutraceutical and Functional Food Components. Effects of Innovative Processing Techniques.*; 129-157.
- Draize, J.H., Kelley, E.A. (1959). The urinary excretion of boric acid preparations following oral administration and topical applications to intact and damaged skin of rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1: 267-276.
- Draper, H.H., Hardley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186:421-431.
- Dupre, J.N., Keenan, M.J., Hegsted, M., Brudevold, A.M. (1994). Effects of dietary boron in rats fed a vitamin D-deficient diet. *Environ Health Perspect.*;102(suppl 7):55-58.
- Eaton, D.L., Gallagher, E.P. (1994). Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34: 135-172.
- ECHA (European Chemicals Agency), (2010). Annex XV Dossier. Proposal for Identification of a Substance as Substance of Very High Concern (SVHC). Substance Name: Boric Acid. EC Number: 233-139-2/234-343-4. CAS Number: 10043-35-3/11113-50-1. European Chemical Agency, Helsinki.
- Eggler, A.L., Gay, K.A., Mesecar, A.D. (2008). Molecular mechanisms of natural products in chemoprevention: induction of cytoprotective enzymes by Nrf2, *Mol. Nutr. Food Res.* 52: 84-94.
- El-Agamy, D. (2010). Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B1 induced liver injury in rats. *Arch Toxicol* 84: 389-396.

- El-Bahr, S.M. (2015). Effect of Curcumin on Hepatic Antioxidant Enzymes Activities and Gene Expressions in Rats Intoxicated with Aflatoxin B1. *Phytother Res.* 29(1):134-40.
- Fail, P.A., Chapin, R.E., Price, C.J., Heindel, J.J. (1998). General, reproductive, developmental, and endocrinotoxicity of boronated compounds. *Reprod. Toxicol.* 12, 1-18.
- Farr, L.E., Konikowski, T. (1963). The renal clearance of sodium pentaborate in mice and men. *Clin. Chem.* 9, 717-726.
- Fox, J.M., Zimba, P.V. (2018). Minerals and Trace Elements in Microalgae. In: *Microalgae in Health and Disease Prevention.*; 177-193.
- Frankel, E.N., Neff, W.E. (1983). Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochim Biophys Acta*;754(3): 264-270.
- Frisvad, J.C. and Samson, R.A. (2004). *Emericella venezuelensis*, a new species with stellate ascospores producing sterigmatocystin and aflatoxin B1. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 672-680.
- Frisvad, J.C., Skouboe, P. and Samson, R.A. (2005). Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 28: 442-453.
- Frisvad, J.C., Samson, R.A. and Smedsgaard, J. (2004). *Emericella astellata*, a new producer of aflatoxin B1, B2 and sterigmatocystin. *Letters in Applied Microbiology* 38: 440-445.
- Gallardo-Williams, M.T., Maronpot, R.R., Wine, R.N., Brunssen, S.H., Chapin, R.E. (2003). Inhibition of the enzymatic activity of prostate-specific antigen by boric acid and 3-nitrophenyl boronic acid. *Prostate*;54(1):44-49.
- Garabrant, D.H., Bernstein, L., Peters, J.M., Smith, T.J., Wright, W.E. (1985). Respiratory effects of borax dust. *Br. J. Ind. Med.* 42, 831-837.
- Genadieva-Stavric S, Cavallo F, Palumbo A. (2014). New approaches to management of multiple myeloma. *Curr Treat Options Oncol.*;15(2):157-170.
- Gorustovich, A.A., Steimetz, T., Nielsen, F.H., Guglielmotti, M.B. (2008). A histomorphometric study of alveolar bone modelling and remodeling in mice fed a boron-deficient diet. *Arch Oral Biol.*;53(7):677-682.
- Grabon, A., Khan, D., Bankaitis, V.A. (2015). Phosphatidylinositol transfer proteins and instructive regulation of lipid kinase biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*,1851(6):724-735.
- Gradelet, S., Le Bon, A.M., Bergès, R., Suschetet, M., Astorg, P. (1998). Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B1-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat: role of the modulation of aflatoxin B1 metabolism. *Carcinogenesis*, 19(3): 403-411.
- Guyonnet, D., Belloir, C., Suschetet, M., Siess, M.H., Le Bon, A.M. (2002). Mechanisms of Protection Against Aflatoxin B(1) Genotoxicity in Rats Treated by Organosulfur Compounds from Garlic, *Carcinogenesis*, 23(8): 1335.
- Güneş, A., Gezgin, S., Kalinbacak, K., Ozcan, H., Cakmak, İ. (2017). The importance of boron for plants. *Journal of Boron*, 2 (3): 168-174.
- Hakkı, S.S., Bozkurt, B.S., Hakkı, E.E. (2010). Boron regulates mineralized tissue associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *J Trace Elem Med Biol.*;24(4): 243-250.



- Halliwell, B. (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*; 35(5): 1147-1150.
- Hathout, A.S., Mohamed, S.R., El-Nekeety, A.A., Hassan, N.S., Aly, S.E., Abdel-Wahhab, M.A. (2011). Ability of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus reuteri* to protect against oxidative stress in rats fed aflatoxins-contaminated diet. *Toxicon*, 58(2):179–186.
- Hayes, J. D., McMahon, M., Chowdhry, S., Dinkova-Kostova, A.T. (2010). Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1–Nrf2 pathway, *Antioxid. Redox Signal.* 13: 1713–1748.
- Helliwell, T.R., Kelly, S.A., Walsh, H.P., Klenerman, L., Haines, J., Clark, R., Roberts, N.B. (1996). Elemental analysis of femoral bone from patients with fractured neck of femur or osteoarthritis. *Bone.*;18(2):151-157.
- Hubbard, S.A. (1998). Comparative toxicology of borates. *Biol. Trace Elem. Res.* 66, 343-357.
- Hunt, C.D. (1994).The biochemical effects of physiologic amounts of dietary boron in animal nutrition models. *Environ Health Perspect.*;102(suppl 7):35-43.
- Hunt, C.D. (1998). One possible role of dietary boron in higher animals and humans. *Biol. Trace Elem. Res.* 66: 205-225.
- Hussein, A.M.S., Fouda, K.A. Badr, A.N., Abdel-Razek, A.G. (2019). Counteractive role of white pepper extracts for oxidative stress and hepatotoxicity induced by aflatoxin B1 in rats. *Int. J. Pharmacol.*, 15: 177-188.
- Ighodaro, O.M., Akinloye, O.A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*;54: 287–293.
- Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients (2002). Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and of Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes; Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes; Food and Nutrition Board; Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*. Washington, DC: National Academy Press
- Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D.T., Goto, T. (2001). *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycological Research* 105: 233-239.
- İnce S., I. Kucukkurt, H.H. Demirel, D. Arslan Acaröz, E. Akbel, I.H. Cigerci. (2014). Protective effects of boron on cyclophosphamide induced lipid peroxidation and genotoxicity in rats. *Chemosphere*. 108: 197-204
- İnce, S., Keles, H., Erdogan, M., Hazman, O., Kucukkurt, I. (2012). Protective effect of boric acid against carbon tetrachloride–induced hepatotoxicity in mice. *Drug and Chemical Toxicology*, 35(3): 285–292.
- İnce, S., Kucukkurt, I., Cigerci, I.H., Fatih Fidan, A., Eryavuz, A. (2010). The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 24: 161-164.
- İnce, S., Kucukkurt, I., Demirel, H.H., Arslan-Acaroz, D., Varol, N. (2020). Boron, a Trace Mineral, Alleviates Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Biol Tra. Elem Res.* 195(2):515-524.

- İnt. Kay. 1, <https://www.etimaden.gov.tr/bor-elementi>, 23.02.2021
- İnt. Kay. 2, [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Estradiol\\_synthesis.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Estradiol_synthesis.svg), 06.03.2021
- İnt. Kay. 3, <https://www.tenmak.gov.tr/boren/tr/calisma-alanlari/tarihce.html>, 17.04.2021
- Jacobsen, B.J., Coppock, R.W., Mostrom, M.S. (2007). Mycotoxins and Mycotoxicoses (Extension Publication EBO174). Montana State University, Bozeman, MT.
- Jansen, J.A., Schou, J.S., Aggerbeck, B. (1984). Gastro-intestinal absorption and *in vitro* release of boric acid from water-emulsifying ointments. *Food Chem. Toxicol.* 22: 49-53.
- Kalendar, R., Lee, D., Schulman, A.H. (2009). FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. *Genes. Genomes and Genomics*, 3(1): 1-14.
- Kanbur, M., Eraslan, G., Sarıca, Z.S., Aslan, O. (2011). The effects of evening primrose oil on lipid peroxidation induced by subacute aflatoxin exposure in mice. *Food Chem. Toxicol.* 49:1960-1964.
- Karabela, S.P., C.A. Kairi, S. Magkouta, I. Psallidas, C. Moschos, I. Stathopoulos, S.G. Zakyntinos, C. Roussos, I. Kalomenidis, Stathopoulos, G.T. (2011). Neutralization of tumor necrosis factor bioactivity ameliorates urethane-induced pulmonary oncogenesis in mice, *Neoplasia*, 13 (12): 1143–1151.
- Karaca, A., Yılmaz, S., Kaya, E., Altun, S. (2019). The effect of lycopene on hepatotoxicity of aflatoxin B1 in rats, *Archives of Physiology and Biochemistry*, 5: 1-8.
- Karadağ, M., Türközü, D. (2014). Diyetle bor alımının sağlık ile etkileşimi. *GUSBD*; 3: 770-85.
- Kew, M.C. (2002). Epidemiology of hepatocellular carcinoma, *Toxicology* 181: 35–38.
- Kojo, S. (2004). Vitamin C: Basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 11: 1041–1064.
- Korkmaz, M., Şaylı, U., Şaylı, B.S., Bakırdere, S., Titretir, S., Ataman, O.Y., Keskin, S. (2007). Estimation of human daily boron exposure in a boron-rich area. *Br J Nutr.* 98(3): 571-575.
- Ku, W.W., Chapin, R.E., Moseman, R.F., Brink, R.E., Pierce, K.D., Adams, K.Y. (1991). Tissue disposition of boron in male Fischer rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 111: 145-151.
- Kulanthaivel, L., Srinivasan, P., Shanmugam, V., Periyasamy, B.M. (2012). Therapeutic efficacy of kaempferol against AFB 1 induced experimental hepatocarcinogenesis with reference to lipid peroxidation, antioxidants and biotransformation enzymes, *Biomed. Prev. Nutr.* 2: 252–259.
- Kumar, M., Verma, V., Nagpal, R., Kumar, A., Behare, P.V., Singh, B., Aggarwal, P.K. (2012). Anticarcinogenic effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on aflatoxin-B 1-induced liver carcinogenesis in rats, *Br. J. Nutr.* 107: 1006– 1016.
- Kurtzman, C.P., Horn, B.W. and Hesseltine, C.W. (1987). *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53: 147-158.
- Lee, J.-S., Surh, Y.-J. (2005). Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention, *Cancer Lett.* 224: 171–184.
- Leeson, S., Diaz, G.J., Summers, J.D. (1995). *Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins*. Guelph University Books, ON, Canada.

- Li, X., Lv, Z., Chen, J., Nepovimova, E., Long, M., Wu, W., Kuca, K. (2021). *Bacillus amyloliquefaciens* B10 can alleviate liver apoptosis and oxidative stress induced by aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology*, 151: 112124.
- Litovitz, T.L., Klein-Schwartz, W., Oderda, G.M., Schmitz, B.F. (1988). Clinical manifestations of toxicity in a series of 784 boric acid ingestions. *Am. J. Emerg. Med.* 6: 209-213.
- Liu, Y., Wang, W. (2016). Aflatoxin B1 impairs mitochondrial functions, activates ROS generation, induces apoptosis and involves Nrf2 signal pathway in primary broiler hepatocytes. *Anim Sci J*, 87(12): 1490-1500.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 4(8): 118–126.
- Locksley, H.B., Sweet, W.H. (1954). Tissue distribution of boron compounds in relation to neutron-capture therapy of cancer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86: 56-63.
- Lopez-Alarcona, C., Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Anal. Chim. Acta*; 763: 1-10.
- Lotito, S.B., Fraga, C.G. (1998). (+)-Catechin prevents human plasma oxidation. *Free Radic Biol Med.*;24: 435-441
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265–275.
- Mandel, H.G., Manson, M.M., Judah, D.J., Simpson, J.L., Green, J.A., Forrester, L.M., Wolf, C.R., Neal, G.E. (1987). Metabolic Basis For The Protective Effect of the Antioxidant Ethoxyquin on Aflatoxin B1 Hepatocarcinogenesis in the Rat, *Cancer Res.*, 47(19): 5218.
- Meacham, S.L., Taper, L.J., Volpe, S.L. (1994). Effects of boron supplementation on bone mineral density and dietary, blood, and urinary calcium, phosphorus, magnesium, and boron in female athletes. *Environ Health Perspect.*;102(suppl 7): 79-82.
- Miazzo, R., Rosa, C.A., De Queiroz Carvalho, E.C., Magnoli, C., Chiacchiera, S.M., Palacio, G., Saenz, M., Kikot, A., Basaldella, E., Dalcero, A. (2000). Efficacy of Synthetic Zeolite to Reduce the Toxicity of Aflatoxin in Broiler Chicks, *Poult. Sci.*, 79(1): 1.
- Miljkovic, D., Miljkovic, N., Mc.Carty, M.F. (2004). Up-regulatory impact of boron on vitamin D function—does it reflect inhibition of 24-hydroxylase? *MedHypotheses.*2004;63(6): 1054-1056.
- Miljkovic, D., Scorei, R.I., Cimpoișu, V.M., Scorei, I.D. (2009). Calcium fructoborate: plantbased dietary boron for human nutrition. *J Diet Suppl.*;6(3): 211-226.
- Miraglia, M., Debegnach, F. and Berra, C. (2004). Mycotoxins: detection and control, *Pesticide, Veterinary and other residues in food*. Eds. David H., Watson. CRC Woodhead publishing, Cambridge, England, 642-643.
- Moore, J.A. (1997). An assessment of boric acid and borax using the IEHR evaluative process for assessing human developmental and reproductive toxicity of agents. Expert Scientific Committee. *Reprod. Toxicol.* 11: 123-160.
- Morgentaler A. (2009). *Testosterone for Life: Recharge Your Vitality, Sex Drive, Muscle Mass, and Overall Health*. New York, NY: McGraw-Hill; 2009:65.
- Moseman, R.F. (1994). Chemical disposition of boron in animals and humans. *Environ. Health Perspect.* 102: 113-117.

- Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C. and Bryant, C.M. (2006). Food Mycotoxins: An Update. *Journal of Food Science*, 71: 51-65.
- Murray, F.J. (1995). A human health risk assessment of boron (boric acid and borax) in drinking water. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 22: 221-230.
- Naghii, M.R., Mofid, M., Asgari, A.R., Hedayati, M., Daneshpour, M.S. (2011). Comparative effects of daily and weekly boron supplementation on plasma steroid hormones and proinflammatory cytokines. *J Trace Elem Med Biol.* 2011;25(1):54-58.
- Naghii, M.R., Samman, S. (1997). The effect of boron supplementation on its urinary excretion and selected cardiovascular risk factors in healthy male subjects. *Biol Trace Elem Res*; 56: 273-86.
- Neal, G.E., Eaton, D.L., Judah, D.J., Verma, A. (1998). Metabolism and toxicity of aflatoxins M1 and B1 in human-derived *in vitro* systems. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151(1): 152–158.
- Newberne, P.M., Butler, W.H. (1969). Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: a review. *Cancer Res.* 29: 236\_250.
- Newberne, P.M., Russo, R., Hall, A. (1966a). Acute toxicity of aflatoxin B1 in the dog. *Path. Vet.* 3: 331\_340.
- Newberne, P.M., Wogan, G.N., Hall A. 3rd. (1966b). Effects of dietary modifications on response of the duckling to aflatoxin. *J. Nutr.* 90: 123-130.
- Newnham, R. (2004). Discovering the cure for arthritis. *Nutr Health.*;17(4):281-284.
- Newnham, R.E. (1994). Essentiality of boron for healthy bones and joints. *Environ Health Perspect.*;102(suppl 7): 83-85.
- Nielsen, F.H. (1988). Boron—an overlooked element of potential nutritional importance. *Nutr Today.*;23(1): 4-7.
- Nielsen, F.H. (1994). Biochemical and physiologic consequences of boron deprivation in humans. *Environ Health Perspect.*;102 (suppl 7): 59-63.
- Nielsen, F.H. (2000). The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle. *Nutrition.* ;16(7-8): 512-514.
- Nielsen, F.H. (2008). Is boron nutritionally relevant? *Nutr Rev.*;66(4): 183-191.
- Nielsen, F.H. (2014). Update on human health effects of boron. *J Trace Elem Med Biol.*;28(4): 383-387.
- Nielsen, F.H., Hunt, C.D., Mullen, L.M., Hunt, J.R. (1987). Effect of dietary boron on mineral, estrogen and testosterone metabolism in postmenopausal women *FASEB J.* 1987;1(5): 394-397.
- Nielsen, F.H., Mullen, L.M., Gallegher, S.K. (1990). Effect of boron depletion and repletion on blood indicators of calcium status in humans fed a magnesium low diet. *J Trace Elem Exp Med.* 1990;3: 45-54.
- Nielsen, F.H., Stoecker, B.J. (2009). Boron and fish oil have different beneficial effects on strength and trabecular microarchitecture of bone. *J Trace Elem Med Biol.*;23(3): 195-203.
- Nzietchueng, R.M., Dousset, B., Franck, P., Benderdour, M., Nabet, P., Hess, K. (2002). Mechanisms implicated in the effects of boron on wound healing. *J Trace Elem Med Biol.*;16(4): 239-244.

- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351–358.
- Park, D.L. (2002). Effect of processing on Aflatoxin. In: *Mycotoxins and Food Safety*, pp. 175, Eds. J.W. DeVries, M.W. Trucksess and L.S. Jackson. Kluwer Academic/Plenum Publishers, NY, USA.
- Peng, X., Zhang, S., Fang, J., Cui, H., Zuo, Z., Deng, J. (2014). Protective roles of sodium selenite against aflatoxin B1-induced apoptosis of Jejunum in broilers. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11: 13130-13143.
- Penland, J.G. (1998). The importance of boron nutrition for brain and psychological function. *Biol Trace Elem Res.*;66(1-3): 299-317.
- Pepeljnjak, S., Slobodnjak, Z., Segvic, M., Peraica, M., Pavlovic, M. (2004). The ability of fungal isolates from human lung aspergilloma to produce mycotoxins. *Hum. Exp. Toxicol.* 23: 15-19.
- Pesatori, A.C., Carugno, M., Consonni, D., Hung, R.J., Papadopoulos, A., Landi, M.T., Brenner, H., Müller, H., Harris, C.C., Duell, E.J., Andrew, A.S., McLaughlin, J.R., Schwartz, A.G., Wenzlaff, A.S., Stucker, I.(2013). Hormone use and risk for lungcancer: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium(ILCCO). *Br J Cancer.*;109(7): 1954-1964.
- Peterson, S.W., Ito, Y., Horn, B.W. and Goto, T. (2001). *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia* 93: 689-703.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, Vol. 29, No. 9.
- Pildain, M.B., Frisvad, J.C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J. and Samson, R.A. (2008). Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 725-735.
- Pisoschi, A.M., Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*; 97: 55-74.
- Pizzorno, L. (2015). Nothing Boring About Boron. *Integrative Med*: 14(4): 35-48
- Poljsak, B., Jamnik, P., Raspor, P., Pesti, M. (2011). Oxidation-antioxidation-reduction processes in the cell: impacts of environmental pollution, in: N. Jerome (Ed.), *Encyclopedia of Environmental Health*, Elsevier, pp. 300-306.
- Poljsak, B., Suput, D., Milisav, I. (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants, *Oxid. Med. Cell. Longev*;
- Ponti, G., Maccaferri, M., Manfredini, M., Micali, S., Torricelli, F., Milandri, R., del Prete, C., Ciarrocchi, A., Ruini, C., Benassi, L., Bettelli, S., Kaleci, S., Ozben, T., Tomasi, A. (2019). Quick assessment of cell-free DNA in seminal fluid and fragment size for early non-invasive prostate cancer diagnosis. *Clinica Chimica Acta*, 497: 76-80.
- Postaci, I., Coskun, O., Senol, N., Aslankoc, R., Comlekci, S. (2018). The physiopathological effects of quercetin on oxidative stress in radiation of 4.5 g mobile phone exposed liver tissue of rat. *Bratisl Lek Listy.*;119(8): 481-489.
- Prashanth, L., Kattapagari, K.K., Chitturi, R.T., Baddam, V.R.R., Prasad, L.K. (2015). A review on role of essential trace elements in health and disease. *Journal of Dr. NTR University of Health Sciences.*; 4(2): 75-85.
- Price, C.J., Strong, P.L., Murray, F.J. Goldberg, M.M. (1997). Blood boron concentrations in pregnant rats fed boric acid throughout gestation. *Reprod. Toxicol.* 11: 833-842.

- Rainey, C., Nyquist, L. (1998). Multicountry estimation of dietary boron intake. *Biol Trace Elem Res.*;66(1-3): 79-86.
- Richard, J. L.(2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. *Int. J. of Food Micr.*, 119(1-2): 3-10.
- Richard, J.L. (2000). Mycotoxins—an overview. In: Richard, J.L. (Ed.), *Romer Labs' Guide to Mycotoxins*, vol. 1: 1–48.
- Richard, J.L. (2003). Mycotoxins and human disease. In: Anaissie, E.J., McGinnis, M.R., Pfaller, M.A. (Eds.), *Clinical Mycology*. Churchill Livingstone, New York, pp. 589–598.
- Richold, M. (1998). Boron exposure from consumer products. *Biol Trace Elem Res.*; 66(1-3): 121-129.
- Rusch, G.M., Hoffman, G.M., McConnell, R.F., Rinehart, W.E. (1986). Inhalation toxicity studies with borontrifluoride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*83: 69-78.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Lund, F., Filtenborg, O. and Frisvad, J.C. (2002). *Introduction to Food- and Airborne Fungi*. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands.
- Saygin, M., Ozmen, O., Erol, O., Ellidağ, H.Y., Ilhan, I., Aslankoc, R. (2018). The impact of electromagnetic radiation (2.45 GHz, Wi-Fi) on the female reproductive system: The role of vitamin C. *Toxicol Ind Health.*;34(9): 620-630.
- Schroeder, H.W. (1966). Effect of corn steep liquor on mycelial growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. *Applied Microbiology* 14: 381-385.
- Schroeder, T.M., Westendorf, J.J. (2005). Histone deacetylase inhibitors promote osteoblast maturation. *J Bone Miner Res.*;20(12): 2254-2263.
- Scialli, A.R., Bondeb, J.P., Irene, Brüske-Hohlfeldc B., Culverd, D., Li, Y., Sullivanf, F.M. (2010) An over-view of male reproductive studies of boron with an emphasis on studies of highly exposed Chinese workers. *Reprod Toxicol* 29: 10–24
- Scorei, I.D., Scorei, R.I. (2013). Calcium fructoborate helps control inflammation associated with diminished bone health. *Biol Trace Elem Res.*;155(3):315-321.
- Scorei, R., Mitrut, P., Petrisor, I., Scorei, I. (2011). A double-blind, placebo-controlled pilot study to evaluate the effect of calcium fructoborate on systemic inflammation and dyslipidemia markers for middle-aged people with primary osteoarthritis. *Biol Trace Elem Res.*;144(1-3): 253-263.
- Scorei, R.I., Ciofrangeanu, C., Ion, R., Cimpean, A., Galateanu, B., Mitran V., Iordachescu, D.(2010). *In vitro* effects of calcium fructoborate upon production of inflammatory mediators by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biol Trace Elem Res.*;135(1-3): 334-344.
- Scorei, R.I., Popa, R. (2013). Sugar-borate esters—potential chemical agents in prostate cancer chemoprevention. *Anticancer Agents Med Chem.*;13(6): 901-909.
- Scorei, R.I., Popa, R. Jr. (2010). Boron-containing compounds as preventive and chemotherapeutic agents for cancer. *Anticancer Agents Med Chem.*;10(4): 346-351.
- Seitz, L.M., Mohr, H.E., Sauer, D.B. (1982). Storage of high-moisture corn: fungal growth and dry matter loss. *Cereal Chem.* 59: 100-105.
- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y.S.R., De, B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytochemicals: Current status and future prospect. *Int J Pharm Sci Res*; 3(1): 91-100.

- Sharma, V., Sharma, C., Paliwal, R., Pracheta Sharma S. (2011). Ameliorative effects of curcuma Longa and curcumin on aflatoxin B1 induced serological and biochemical Changes in kidney of male mice. *Asian J Biochem Pharmaceut Res* 2: 338–351.
- Sharoni, Y., Danilenko, M., Dubi, N., Ben-Dor, A., Levy, J. (2004). Carotenoids and transcription. *Arch. Biochem. Biophys.*;430: 89–96.
- Shen, H.M., Shi, C.Y., Lee, H.P., Ong, C.N. (1994). Aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicology and applied pharmacology*, 127(1): 145-150.
- Shimizu, K., Maruyama, M., Yasui, Y., Minegishi, H., Ban, H.S., Nakamura, H. (2010). Boron-containing phenoxyacetanilide derivatives as hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.*;20(4): 1453-1456.
- Shuaib, F.M., Ehiri, J., Abdullahi, A., Williams, J.H., Jolly, P.E.(2010). Reproductive health effects of aflatoxins: a review of the literature. *Reprod. Toxicol.* 29: 262-270.
- Sies, H, Cadenas, E.,(1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos. Trans. R. Soc.*; B311: 617–31.
- Sinha, A.K. (1972). Colorimetric assay of catalase. *Anal Biochem.* 47(2):389-394.
- Skinner, C.E., Emmons, C.W., Tsuchiya, H.M. (1947). Fungus diseases of man and animals—general considerations, *Henrici's Molds, Yeasts and Actinomycetes*. Second ed. John Wiley and Sons Inc., New York, pp. 119–140.
- Smith, A.R., Shenvi, S.V., Widlansky, M., Suh, J.H., Hagen, T.M. (2004). Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*; 11: 1135–1146.
- Soni, K.B., Lahiri, M., Chackradeo, P., Bhide, S.V., Kuttan, R. (1997). Protective Effect of Food Additives on Aflatoxin-Induced Mutagenicity and Hepatocarcinogenicity, *Cancer Lett.*,115(2): 129.
- Soyoz, M., Ozcelik, N., Kilinc, I., Altuntas, I. (2004). The Effects of Ochratoxin A on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes: A Protective Role of Melatonin, *Cell Biol. Toxicol.*,20(4): 213.
- Steyn, P.S., Stander, M.A. (1999). Mycotoxins with Special Reference to the Carcinogenic Mycotoxins: Aflatoxins, Ochratoxins and Fumonisin. In: Ballantyne B, Marrs TC, Syversen TLM, eds. *General and Applied Toxicology. 2nd Edition*. United Kingdom: Macmillan Reference Ltd.; 2145-76.
- Stubblefield, R.D., Pier, A.C., Richard, J.L., Shotwell, O.L. (1983). Fate of aflatoxins in tissues, fluids and excrements from cows dosed orally with aflatoxin B1. *Am. J. Vet. Res.* 44: 1750-1752.
- Sun, Y., Oberley L.W., Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxidase dismutase. *Clin Chem* 34: 497–500.
- Sutherland, B., Woodhouse, L.R., Strong, P., King, J.C. (1999). Boron balance in humans. *J Trace Elem Exp Med*; 12: 271-84.
- Sweeney, M.J. and Dobson, A.D.W. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. of Food Micr.*, 43: 141–158.
- Şaylı, B.S. (2000). İnsan sağlığı ve bor mineralleri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi EtiHolding Araştırma Projeleri*. Ankara
- Tang, L., Guan, H., Ding, X., Wang, J.S. (2007). Modulation of Aflatoxin Toxicity and Biomarkers By Lycopene in F344 Rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 219(1): 10.

- Taranu, I., Marin, D.E., Palade, M., Pistol, G.C., Chedea, V.S., Gras, M.A., Rotar, C. (2019). Assessment of the efficacy of a grape seed waste in counteracting the changes induced by aflatoxin B1 contaminated diet on performance, plasma, liver and intestinal tissues of pigs after weaning. *Toxicon*, 162: 24-31.
- Taşdemir, M., Çelikezen, F.Ç., Oto, G., Özbey, F. (2020). The effects of pretreatment with lithium metaborate dihydrate on lipid peroxidation and Ca, Fe, Mg, and K levels in serum of Wistar albino male rats exposed to Cd. *Env. Sci. and Pol. Res.*, 27(7): 7702-7711.
- Travis, N. J., Cocks, E. J. (1984). The Tincal Trail. *A history of borax. Harrap, London*, 311: 115-124.
- Treinen, K.A., Chapin, R.E. (1991). Development of testicular lesions in F344 rats after treatment with boric acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 107: 325-335.
- Turkez, H., Geyikoglu, F. (2010). Boric acid: a potential chemoprotective agent against aflatoxin b1 toxicity in human blood. *Cytotechnology*, 62(2):157–165.
- Turkez, H., Geyikoglu, F., Tatar, A., Keles, M.S., Kaplan, I. (2012). The effects of some boron compounds against heavy metal toxicity in human blood. *Exp Toxicol Pathol.*;64(1-2):93-101.
- Turkez, H., Tatar, A., Hacımuftuoğlu, A., Özdemir, E. (2010). Boric acid as a protector against paclitaxel genotoxicity. *Acta Biochim Pol.*;57(1): 95-97.
- Umeda, M., Tsutsui, T., Saito, M. (1977). Mutagenicity and inducibility of DNA single-strand breaks and chromosome aberrations by various mycotoxins. *Gann Japanese Journal of Cancer Research*, 68(5): 619-625.
- Valadiviva, A.G., Martinez, A., Damian, F.J., Quezada, T., Ortiz, R., Martinez, C., Rodriguez, M.L., Yamamoto, L., Jaramillo, F., Loarca-Pina, M.G., Reyess, J.L. (2001). Efficacy of N-Acetylcysteine to Reduce the Effects of Aflatoxin B1 Intoxication In Broiler Chickens, *Poult. Sci.*, 80: 727.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The Int. J. of Bioche. & Cell Bio.*; 39: 44–84.
- Varanda, E.A., Monti, R., Tavares, D.C. (1999). Inhibitory Effect of Propolis and Bee Venom on the Mutagenicity of Some Direct- and Indirect-Acting Mutagens, *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 19(6): 403.
- Varga, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A. (2009). A reappraisal of fungi producing aflatoxins. *World Mycotoxin. J. 2*: 263-277.
- Varga, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A. (2011). Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Stud. Mycol.* 69: 57-80.
- Verma, R.J., Mathuria, N. (2009). Effect of curcumin on aflatoxin-induced biochemical changes in testis of mice. *Fertility and sterility*, 91(2): 597-601.
- Vipin, A.V., Raksha Rao, K., Nawneet Kumar Kurrey, Anu Appaiah, K.A., Venkateswaran, G. (2017). Protective effects of phenolics rich extract of ginger against Aflatoxin B1-induced oxidative stress and hepatotoxicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 91: 415–424
- WHO, (1996). Trace Elements in Human Nutrition and Health, World Health Organization Copenhagen: 175-179.
- WHO, (2002). *Evaluation of Certain Mycotoxins in Food.*, World Health Organization Geneva, Switzerland.



- WHO, (2018). Mycotoxins, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>, World Health Organization.
- Williams, J.H., Grubb, J.A., Davis, J.W., Wang, Jia-S., Jolly, P.E., Ankrah, Nii-A., Ellis, W.O., Afriyie-Gyawu, E., Johnson, N.M., Robinson, A.G., Phillips, T.D. (2010). HIV and hepatocellular and esophageal carcinomas related to consumption of mycotoxin-prone foods in sub-Saharan Africa. *Am. J. Clin. Nutr.* 92: 154\_160.
- Wimmer, M.A., Lochnit, G., Bassil, E., Mühling, K.H., Goldbach, H.E. (2009). Membrane-associated, boron-interacting proteins isolated by boronate affinity chromatography. *Plant Cell Physiol.*;50(7):1292-1304.
- Winterbourn, C.C., Hawkins, R.E., Brain, M., Carrell, R.W. (1975) The estimation of red cell superoxide activity. *J Lab Clin Med* 55:337–341.
- Woods, W.G. (1994). An introduction to boron: history, sources, uses, and chemistry. *Environ. Health Perspect.* 102, 5-11.
- Yao, Y., Gu, X., Zhu, J., Yuan, D., Song, Y. (2013). Hormone replacement therapy in females can decrease the risk of lung cancer: a meta-analysis. *PLoS One.*;8(8): e71236.
- Yener, Z., Celik, I., Ilhan, F., Bal, R. (2009). Effects of *Urtica dioica* L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats. *Food Chem. Toxicol.* 47: 418-424.
- Yesilbaş, D. (2008). Hayvan Beslemede Bor Elementinin Kullanımı. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* , 27 (1-2): 61-68.
- Yılmaz, S., Kaya, E., Comaklı, S. (2017). Vitamin E ( $\alpha$  tocopherol) attenuates toxicity and oxidative stress induced by aflatoxin in rats. *Adv Clin Exp Med.*;26(6):907-917.
- Yiğitbaşıoğlu, H. (2006), “Türkiye İçin Önemli Bir Maden: Bor”, Dil ve Tarih-Coğrafya Fakültesi, Coğrafya Bölümü, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Ying, X., Cheng, S., Wang, W., Lin, Z., Chen, Q., Zhang, W., Kou, D., Shen, Y., Cheng, X., An Rompis, F., Peng, L., Lu, C.Z. (2011). Effect of boron on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biol Trace Elem Res.*;144(1-3):306-315.
- Young, I.S., Woodside, J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.*; 54: 176-186.
- Yünlü, K. (2016). Bor. 1st ed. Ankara: Değişim Yayınları.
- Zalar, P., Frisvad, J.C., Gunde-Cimerman, N., Varga, J. and Samson, R.A. (2008). Four new species of *Emericella* from the Mediterranean region of Europe. *Mycologia* 100: 779-795.
- Zhu, J., Wang, H., Chen, F., Fu, J., Xu, Y., Hou, Y., Kou, H.H., Zhai, C., Nelson, M.B., Zhang, Q., Andersen, M.E., Pi, J. (2016). An overview of chemical inhibitors of the Nrf2-ARE signaling pathway and their potential applications in cancer therapy, *Free Radic. Biol. Med.*99: 544–556.

