

## DÜNYADA VE TÜRKİYE'DE İNSAN SAĞLIĞINI TEHDİT EDEN MİKOTOKSİNLER

## MYCOTOXINS IN TURKEY AND THE WORLD

Gözde GİRĞİN<sup>1</sup>Nurşen BAŞARAN<sup>1</sup>Gönül ŞAHİN<sup>1</sup>

## GİRİŞ

Mikotoksinler; *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* ve *Claviceps* gibi mantar (küf) cinslerinin sekonder metabolizması sonucu oluşan, düşük molekül ağırlıklı, çok çeşitli kimyasal yapıya sahip doğal toksinlerdir. İnsan ve hayvan sağlığı üzerinde güçlü ve çeşitli toksik etkiler oluşturmaktadırlar (1).

Mikotoksinleri üreten mantarlar rüzgar ve hava akımlarıyla taşınarak her yerde (atmosferin çeşitli katmanları da dahil) bulunabilirler (1,2). Mikotoksin kontaminasyon düzeyi iklim koşullarına, ürünün cinsine ve coğrafi konuma bağlı olarak mevsimden mevsime, yıldan yıla farklılık gösterebilir. Dünyadaki mahsüllerin dörtte birinin mikotoksin ile kontaminasyon riskinin olduğu bildirilmiştir (1).

Kimyasal ve etkinlik açısından farklı olan mikotoksinler, üreten mantarın gelişebildiği vasatalara göre sınıflandırılabilirler. Bu sınıflandırma Tablo 1'de görülebilir (2).

Mikotoksin üreten mantarlar, bitkiyi hasat öncesi dönemde veya hasat sonrasında enfekte edebilirler. Pek çok cins mantar büyüme, gelişme ve mikotoksin üretimi için belli koşullara ihtiyaç duyar. Bu koşullar özetle; nem, sıcaklık, substrat tipi ve besinsel faktörler, atmosfer oksijen ve karbon dioksit düzeyleri, diğer mantar türlerinin varlığı, coğrafi konum, genetik şartlar olarak sıralanabilir. Toksin üretiminin boyutu aynı zamanda eser metaller, böcek faaliyetleri, bitkisel ilaçlar, baharatlar, Krebs döngüsü ara ürünleri, besin katkı maddeleri gibi faktörlerden de etkilenebilir (1,2).

**Tablo 1.** Mikotoksin üreten mantarların gelişebildiği vasatalara göre sınıflandırılmaları

| A. Bitki Enfekte Edenler                   |                                    | B. Depolanmış Ürünü Enfekte Edenler |                             |
|--|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| <i>Claviceps purpurea</i>                  | <i>Helminthosporium biseptatum</i> | <i>Aspergillus flavus</i>           | <i>P. urticae</i>           |
| <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>            |                                    | <i>A. parasiticus</i>               | <i>P. verruculosum</i>      |
| <i>Fusarium graminearum</i>                |                                    | <i>A. ochraceus</i>                 | <i>P. puberulum</i>         |
| ( <i>Gibberella zeae</i> )                 |                                    | <i>A. clavatus</i>                  | <i>P. expansum</i>          |
| <i>Rhizoctonia leguminicola</i>            |                                    | <i>A. fumigatus</i>                 | <i>P. rugulosum</i>         |
| <i>Aspergillus flavus</i>                  |                                    | <i>A. rubrum</i>                    | <i>P. palitans</i>          |
| C. Çürüyen Organik Maddeyi Enfekte Edenler |                                    | <i>A. chevalieri</i>                | <i>P. roqueforti</i>        |
| <i>Pithomyces chartarum</i>                | <i>Fusarium graminearum</i>        | <i>Penicillium islandicum</i>       | <i>P. purpurogenum</i>      |
| <i>Stachybotrys atra</i>                   | <i>Chaetomium globosum</i>         | <i>P. citrinum</i>                  | <i>Chaetomium globosum</i>  |
| <i>Periconia minutissima</i>               | <i>Dendrodochium toxicum</i>       | <i>P. rubrum</i>                    | <i>Fusarium graminearum</i> |
| <i>Fusarium sporotrichoides</i>            | <i>Myrothecium verrucaria</i>      | <i>P. citreoviride</i>              | <i>F. tricinctum</i>        |
| <i>Cladosporium spp.</i>                   | <i>Trichothecium roseum</i>        | <i>P. cyclopium</i>                 | <i>F. nivale</i>            |
| <i>Alternaria longipes</i>                 | <i>Trichoderma viride</i>          | <i>P. viridicatum</i>               | <i>F. moniliforme</i>       |

<sup>1</sup>Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara

Geliş tarihi : 04.09.2001 Kabul edilmiş tarihi : 19.02.2002

Yazışma adresi: Prof.Dr. Gönül ŞAHİN, H.Ü., Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, 06100, Sıhhiye, Ankara

Mikotoksin alımına bağlı olarak gelişen klinik tabloya "mikotoksikoz" denir. Ancak bu klinik tablo; tanımlanması oldukça güç olan ve bir veya çoğunlukla birden fazla hastalıkla karakterize bir durumdur. Mikotoksikozda görülen belirtilerin şiddeti, etkilerin, görülen hastalıkların tipi, genel olarak maruz kalınan mikotoksin türü, miktarı, birden fazla mikotoksin varlığının yanı sıra vücut ağırlığı, fiziksel ve beslenme durumu gibi kişisel özelliklere bağlı olarak farklılıklar gösterebilir. Tablo 2' de bazı mikotoksinlerin çeşitli etkileri ve neden oldukları hastalıklar özetlenmiştir (1).

100.000'den fazla hindinin ölümüne neden olmuştur. Ördek ve sülünleri de etkileyen bu hastalık "Turkey X Disease" olarak adlandırılmıştır. Diyetin değiştirilmesinin morbidite ve mortalite oranını azaltmasıyla bu hastalığın besinsel kaynaklı olduğu farkedilmiş ve etkilenen tüm hayvanların diyetinin *Aspergillus flavus* ile kontamine olduğu ve bu nedenle "a-flavus-toxin" in kısaltılmasıyla elde edilen "aflatoksin" adı verilen toksik maddeyi içeren Brezilya yerfıstığı olduğu saptanmıştır (1,3).

**Tablo 2.** Bazı mikotoksinlerin çeşitli etkileri ve neden oldukları hastalıklar

| Mikotoksin                 | Üreten Cins                              | Oluşturduğu Etki                                       | Neden Olduğu Saptanan Hastalıklar                        |
|----------------------------|--|--|--|
| Aflatoksin B <sub>1</sub>  | <i>Aspergillus</i>                       | Karsinojenite<br>Teratojenite                          | İnsanda primer karaciğer kanseri<br>Turkey-X disease     |
| Sitrinin                   | <i>Penicillium</i><br><i>Aspergillus</i> | Nefrotoksisite   | ----   |
| α-Siklopiyazonik asit      | <i>Penicillium</i><br><i>Aspergillus</i> | Nörotoksisite  | ----   |
| Ergotoksinler (ergotamin)  | <i>Claviceps</i>                         | Vazokonstrüksiyon<br>Nörotoksisite                     | Ergotizm<br>İnsanda St. Anthony Ateşi                    |
| Fumonisin B <sub>1</sub>   | <i>Fusarium</i>                          | Karsinojenite<br>Nörotoksisite                         | Atlarda Ensefalomalazi<br>Domuzlarda Pulmoner Ödem       |
| Okrotoksin A               | <i>Aspergillus</i>                       | Karsinojenite  | Domuzlarda ve Kümes                                      |
| Patulin                    | <i>Penicillium</i><br><i>Penicillium</i> | Nefrotoksisite<br>Mutajenite                           | Hayvanlarında Nefropati<br>----                          |
| Penitrem A                 | <i>Penicillium</i>                       | Antibakteriyal<br>Nörotoksisite                        | ----   |
| Fomopsin A                 | <i>Phomopsis</i>                         | Hepatotoksisite  | Koyunlarda lupinozis                                     |
| Sporidesmin A              | <i>Pithomyces</i>                        | Hepatotoksisite  | Koyunlarda lupinozis                                     |
| Trikotesenler (T-2 toksin) | <i>Fusarium</i>                          | Fotosensitivite<br>Dermatoksisite                      | Alimentary toxic aleukia (ATA)                           |
| Zearalenon                 | <i>Fusarium</i>                          | Hematopoetik Etki<br>Östrojenizm<br>Üreme Bozuklukları | Domuzlarda hiperöstrojenizm,<br>Vulvovajinit ve düşükler |

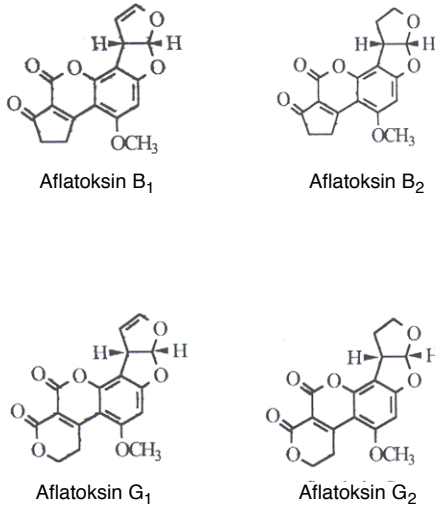
Yazının bu bölümünde, sağlık açısından önemli sorunlara neden olabilen bazı mikotoksinler üzerinde durulacaktır.

### AFLATOKSİNLER

1960 bahar ve yazında gizemli bir hastalık İngiltere'nin kuzey ve güney bölgesinde

Aflatoksinler, *A.nomius* ve *A.tamarii* mantarları tarafından da üretilebilmelerine rağmen esas olarak *A.flavus* ve *A.parasiticus* mantarlarının belli suşlarının sekonder metabolitleridir. Ultraviyole ışık altında mavi floresans verenler aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) ve AFB<sub>2</sub>, yeşil floresans verenler ise AFG<sub>1</sub> ve AFG<sub>2</sub> olarak adlandırılır.

maktadır (3). Benzer yapılarla sahip toksinler olmakla birlikte başlıca aflatoksinler AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> ve AFG<sub>2</sub> dir. Bu toksinler çeşitli besin ve tohumlarda değişen miktarlarda bulunmalarına rağmen; AFB<sub>1</sub> genellikle en etkin olanıdır. Şekil 1'de başlıca aflatoksinler olan AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> ve AFG<sub>2</sub>'nin yapıları görülmektedir (1).



Şekil 1. Bazı aflatoksinlerin yapıları

AFB<sub>1</sub> ve AFB<sub>2</sub> içeren yemlerle beslenen ineklerin sütünde rastlanan, ana moleküle benzer fakat daha az biyolojik etki gösteren bileşikler ise AFM<sub>1</sub> ve AFM<sub>2</sub> olarak adlandırılmışlardır. AFM<sub>1</sub> hayvanlarda AFB<sub>1</sub>'in ana matabolitlerindedir ve genellikle süt ve idrarla itrah edilir (3).

Aflatoksinler kimyasal yapılarına göre difurokumarosiklopentanon ve difurokumarolaktan olmak üzere iki gruba ayrılabilirler. Difurokumarosiklopentanon grubunda AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFB<sub>2a</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFM<sub>2</sub>, AFM<sub>2a</sub> ve aflatoksikol; difurokumarolaktan grubunda ise AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFG<sub>2a</sub>, AFGM<sub>1</sub>, AFGM<sub>2</sub>, AFGM<sub>2a</sub> ve AFB<sub>3</sub> bulunmaktadır.

Yapısal olarak bir çifte bağ içeren dihidrofuran grubu ve kumarin grubuna bağlanan fonksiyonel gruplara göre, oluşan biyolojik etkinin şiddeti değişebilir. AFB<sub>1</sub>'in demetilasyonu toksik

bir türev olan AFP<sub>1</sub> oluşumu ve furan halkalarına köprü konumunda bulunan karbon atomunun hidrosilasyonu da AFB<sub>1</sub> ile benzer etkiler gösteren fakat daha az karsinojenik olan AFM<sub>1</sub> oluşumuyla sonuçlanır (1).

Tablo 3. Bazı aflatoksinlerin ördek yavrularındaki LD<sub>50</sub> değerleri

| Aflatoksin     | LD <sub>50</sub> (µg) |
|----------------|-----------------------|
| B <sub>1</sub> | 18                    |
| G <sub>1</sub> | 39                    |
| B <sub>2</sub> | 84                    |
| G <sub>2</sub> | 173                   |
| M <sub>1</sub> | 17                    |
| M <sub>2</sub> | 62                    |

Mikotoksinler üzerindeki çalışmaların çoğu dihidrofurfuranlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Doğada bulunan dört aflatoksin (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> ve AFG<sub>2</sub>) dihidrofurfuran halkasıyla süstitüe kumarin konfigürasyonundadır. Karsinojenik potansiyalleri AFB<sub>1</sub> > AFG<sub>1</sub> > AFB<sub>2</sub> > AFG<sub>2</sub> şeklinde azalmaktadır (4). Bu sıra, aflatoksinlerle ördek yavrularında yapılan çalışmalardan elde edilen LD<sub>50</sub> değerleriyle de gösterilmiştir. Bu değerler Tablo 3'te gösterilmiştir (1). AFB<sub>1</sub> molekülünde bulunan 8,9 çifte bağının AFB<sub>2</sub> molekülünde doymuş olmasının, AFB<sub>2</sub>'nin daha az karsinojenik etkili olmasının nedeni olarak kabul edilmektedir (4).

Aflatoksinler mısır, yerfıstığı, ceviz, Brezilya fıstığı, keten tohumu, karbonhidrat içeriği yüksek olan diğer gıdalar ve hatta bitki ve baharatların sık görülen kontaminantlarındandır (1,5). Yiyecekleri tarlada ekili oldukları zamandan başlayarak büyüme, hasat, nakliyat, kötü depolama koşulları, üretim sırasındaki koşullar ve hatta hazır gıda olarak kullanılan ürünün raf ömrü esnasında, kısacası ekimden tüketime kadar her aşamada kontamine edebilirler (5,6).

Aflatoksinlerle oluşan zehirlenme tablosuna "aflatoksikoz" adı verilir (6). İnsanlar aflatoksinlere doğrudan, mesleki maruziyet sonucu veya özellikle kontamine yemle beslenmiş hayvanlardan elde edilen ürünler vasıtasıyla maruz kalabilirler

(6-8). Zira insanlar tarafından en çok tüketilen kümes, küçük ve büyükbaş hayvanların et, süt, yumurta ve bazı organlarında yapılan saptamalar sonucu elde edilen veriler; çok az miktarda alınan AFB<sub>1</sub>'in bile başta karaciğer ve diğer dokular olmak üzere süt ve yumurtaya da geçebildiğini göstermektedir. Kontamine süten yapılan peynirlerde, peynirin daha konsantre bir ürün olması nedeniyle yapıldığı süten 3-3,5 kat daha fazla aflatoksin taşıdığı saptanmıştır. Yağlara ise yapıldığı sütün 0,5-0,7 katı kadar aflatoksin geçmektedir.

Bir salgında neden tanımlanamaması, durumun gözden kaçırılmayacak kadar belirgin ve sendromların belirli tipte yiyeceklerle ilişkili olması, antibiyotik veya diğer ilaçlarla tedaviye cevabın düşüklüğü ve salgının mevsimsel olması durumunda aflatoksikozdan şüphelenilmelidir (6).

Aflatoksinler tüm canlı organizmalarda karsinojenite, teratojenite ve mutajeniteye neden olmaktadır. DNA, RNA ve protein sentezi inhibisyonu; çeşitli enzim aktivitelerinde azalma; glukoz metabolizması depresyonu; fosfolipidler, serbest yağ asitleri, trigliseritler ve kolesterol ve esterleri dahil olmak üzere lipid sentezi inhibisyonu ve pıhtılaşma faktörü inhibisyonu gibi metabolik etkileri vardır (3). Bazı hayvan türlerinde akut nekroz, siroz ve karaciğer kanserine yol açarlar. AFB<sub>1</sub>, Uluslararası Kanser Araştırma Vakfı (IARC) tarafından Grup I karsinojen olarak sınıflandırılmıştır. AFB<sub>1</sub>'e maruziyet ile dünyada görülme sıklığında yedinci sırada bulunan primer hepatoselüler karsinoma arasında ilişki olduğu sanılmaktadır (5). Toksik etkilerini göstermek için metabolik aktivasyona gereksinim duyan dolaylı etkili bir mikotoksindir (9). Primer karaciğer kanserinin çok orijinli olduğuna inanılsa da aflatoksin B<sub>1</sub> yiyecek kontaminantı olarak yaygın bulunması nedeniyle en güçlü faktördür (4). Hepatoma ve karaciğer hasarı oluşumuna ilişkin yapılan çalışmalarla AFB<sub>1</sub>'in *K1 ras* protoonkogeninin aktivasyonunu sağladığı ve p53 tümör supresör genini farklılaştırdığı saptanmıştır. Hepatoselüler Karsinoma (HCC) hastalarında, *p53* geninde önemli bir nokta olan 249. kodonun üçüncü bazında guanin→timin (G→T) transversiyonu gözlenmiştir (1,4).

Aflatoksinlerin akut ve kronik toksisitelerinde türlerarası, bireylerarası ve cinsiyete göre önemli farklılıklar vardır. Şimdiye kadar toksisitelerine tamamen dirençli bir hayvan türü bulunmamıştır. (1). Aflatoksinlere olan duyarlılığın cinsiyete bağlı olup olmadığını araştırmak üzere yapılan deneylerde dişi farelerin erkek farelere göre daha az duyarlı olduğu; bu durumun da östrojenik hormonların koruyucu etkisinden kaynaklandığı saptanmıştır. Toksikite; çevresel faktörler, maruziyet doz ve süresi, yaş, sağlık ve beslenme alışkanlığına göre farklılık gösterebilir (6).

Amerikan Gıda İlaç Kurulu (FDA) tarafından bazı yiyeceklerdeki aflatoksin kontaminasyonu için izin verilen maksimum düzeyler Tablo 4'te gösterilmiştir (1). Ülkemizde 16 Kasım 1997 tarihinde yayımlanan 23172 no'lu Resmî Gazete'nin Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Bölümü Ek-14'te aflatoksinler için belirtilen 'müsaade edilen en yüksek değerler' ise Tablo 5'te verilmektedir.

**Tablo 4.** Amerikan Gıda İlaç Kurulu (FDA) tarafından aflatoksin kontaminasyonu için kabul edilen maksimum düzeyler (ppb)

| Substrat                                    | Maksimum Miktar (ppb) |
|---|-----------------------|
| İnsan yiyeceği ve bazı tür hayvan yemleri   | 20                    |
| Süt   | 0.5                   |
| Besi Hayvanı Yemi                           | 300                   |
| Domuz yemi (et için)                        | 200                   |
| Süt veren inek, domuz ve kümes hayvanı yemi | 100                   |

AFB<sub>1</sub>'in mutajenik ve karsinojenik etkileri detaylı bir şekilde çalışılmıştır ve elektronca zengin dihidrobisfuranın, karaciğer sitokrom P450 (CYP 450) izoenzimleri CYP 2C ve daha az olmak üzere farelerde CYP 1A2 ve insanda CYP 3A4 ile AFB<sub>1</sub> 8,9-epoksite dönüşmesinden kaynaklanmaktadır (1,9). CYP 3A4 hepatosit ve enterositlerde bulunduğundan dolayı aflatoksinler için ekstrahepatik metabolizmalarından söz etmek de mümkündür. Daha karaciğere ulaşmadan bileşik biyoaktivasyona uğrayabilmektedir. Bu da afla-

toksinlerin lokal etkileri açısından düşündürücü bir noktadır. CYP 450 haricinde prostoglandin sentetazlarla ko-oksidasyona uğrayarak biyoaktivasyon olasıdır. Bu reaksiyon *in vivo* verileri mevcut olmasa da *in vitro* olarak ispatlanmıştır. Böbrek, akciğer ve bağırsaklar için önemli bir biyoaktivasyon mekanizmasıdır (4,10).

**Tablo 5.** Bazı gıdalarda aflatoksinler için Türk Gıda Kodeksi tarafından kabul edilen limitler

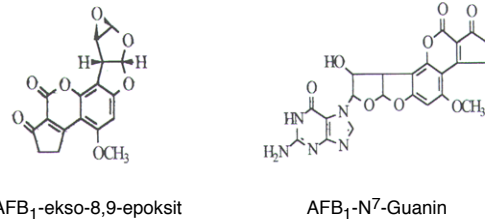
| Aflatoksin Tipi  | Gıda Maddesi                       | Kabul Edilebilir En Yüksek Değer (mg/kg) |
|--|------------------------------------|--|
| B <sub>1</sub>   | Baharatlar                         | 0,005                                    |
| B <sub>1</sub>   | Hububatlar                         | 0,002                                    |
| B <sub>1</sub>   | Hububat Unları                     | 0,002                                    |
| B <sub>1</sub>   | Tüm Gıda Maddeleri                 | 0,005                                    |
| M <sub>1</sub>   | Peynir                             | 0,00025                                  |
| M <sub>1</sub>   | Süt ve Süt Ürünleri                | 0,00005                                  |
| M <sub>1</sub>   | Bebek Mamaları ve Devam Formülleri | 0,00002                                  |
| B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> | Bebek Gıdaları ve Hazır Karışımlar | 0,00001                                  |
| B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> | Tüm Gıda Maddeleri                 | 0,010                                    |

AFB<sub>1</sub> 8,9-epoksit; ekso- ve endo- olmak üzere iki formda oluşur. Farelerde bu iki izomerin oranı 32:1 iken insanda bu oran daha düşüktür. Her iki izomerin de DNA'ya olan afiniteleri farklıdır. Ekso-epoksit oldukça elektrofildir ve DNA'da guaninin N<sup>7</sup> konumuna bağlanır. Endo-izomerden yaklaşık 500 kat daha çok mutajenik aktiviteye sahiptir. AFB<sub>2</sub> ise 8,9 konumunda çifte bağ içermediğinden dolayı pratik olarak inaktiftir. AFB<sub>1</sub> 8,9-epoksit daha sonra 8,9-dihidro AFB<sub>1</sub>'e metabolize olarak Schiff bazı oluşumuyla hücrel proteinlerdeki lizin aminoasitine -amin grubundan bağlanarak modifiye eder ve hücre hasarı ve ölümüne neden olabilir (1,4,5).

Şekil 2'de AFB<sub>1</sub>-ekso-8,9-epoksit ve oluşturduğu DNA katım ürününün yapıları görülmektedir (1).

Metabolitler, DNA dahil olmak üzere nükleofilik hücrel makromoleküllere oksitin biyolojik sis-

temden izole edilmesine olanak vermeyecek bir hızla bağlanmaktadır. Her iki oksitin de, AFB<sub>1</sub>'in adenin ve sitozin gibi diğer bazlara bağlandığına dair kanıtlar olsa da, çok büyük oranda guaninin N<sup>7</sup> pozisyonuna bağlandığı bilinmektedir (4).



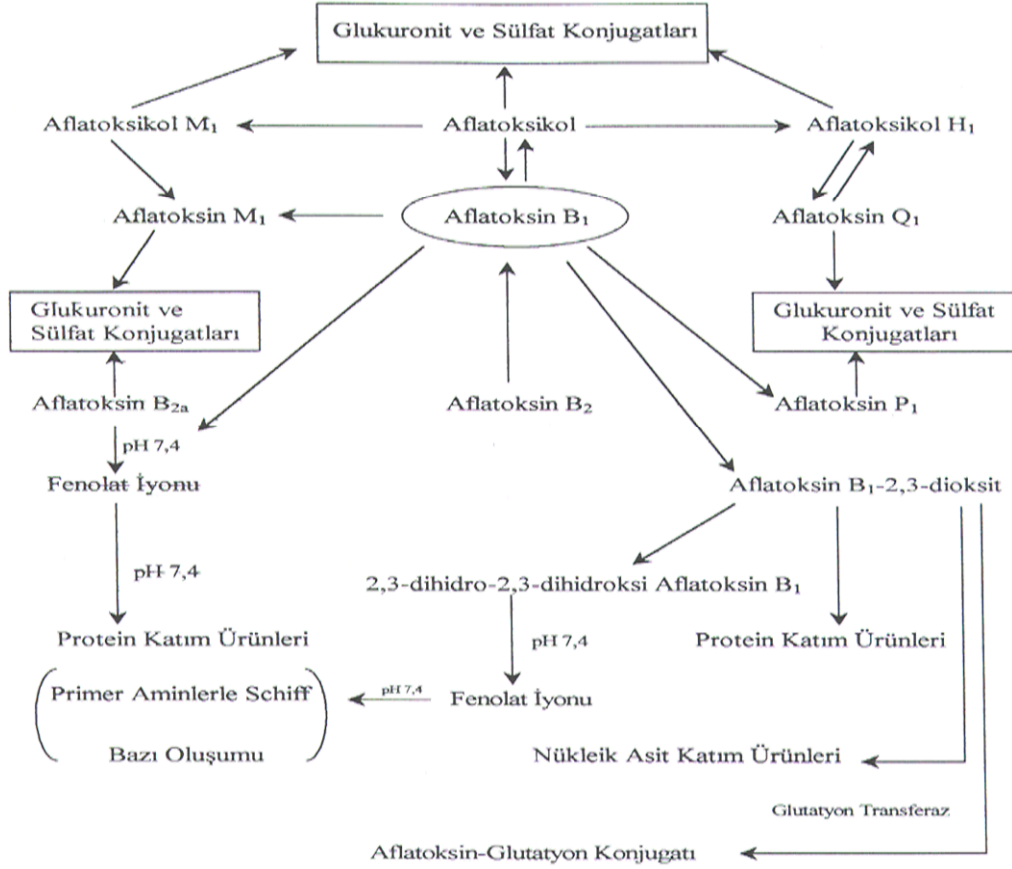
**Şekil 2.** AFB<sub>1</sub>-ekso-8,9-epoksit ve oluşturduğu DNA katım ürünü

AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> ve sterigmatosistin oksitleri guaninin N<sup>7</sup> konumu tarafından nükleofilik atağa uğrarlar ve bunun sonucunda oksit açılarak N<sup>7</sup>-guanin kovalan DNA katım ürünü oluşur. Oluşan bu yapı, üç spontan prosesle kaybolabilir:

- (i) aflatoksin dihidrodolün ayrılarak çıplak guanin molekülünün kalması
- (ii) pürin olmayan kısmını bırakarak guaninin ayrılması
- (iii) imidazol halkasının açılması.

AFB<sub>1</sub>'in uzaklaştırılması *in vivo* olarak DNA onarım enzimleri nedeniyle daha hızlı gerçekleşmektedir.

İmidazol halka açılması guaninin N<sup>7</sup> pozisyonuna olan aşırı bağlanmanın sonucudur. Halka içindeki pozitif yükün artması sonucu 8,9-dihidro-1-8-(2,6-diamino-4-okso-3,4-dihidroprimid-5-ilformamido)-9-hidroksi AFB<sub>1</sub> ve 8,9-dihidro-8-(2-amino-6-formamido-4-okso-3,4-dihidroprimid-5-il-amino)-9-hidroksi AFB<sub>1</sub> olmak üzere iki ürün oluşur. AFB<sub>1</sub> katımı olmuş DNA'nın alkali koşullarda tutulması imidazol halkasının açılması ve diol oluşumu ile sonuçlanırken hafif asidik koşullar AFB<sub>1</sub>-DNA katım ürünlerine dönüşümü sağlar (4).



Şekil 3. Aflatoksinlerin olası biyotransformasyonu

AFB<sub>1</sub>-DNA katım ürünleri idrarla itrah edilirler ve bu itrahın diyet kaynaklı AFB<sub>1</sub> alımı ile doğrusal olarak arttığı düşünülmektedir. Bu nedenle idrarla atılan AFB<sub>1</sub> katım ürünleri; diyetSEL maruziyetin yanı sıra kanser riskini gösteren önemli bir biyogösterge olarak da kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, idrarlarında AFB<sub>1</sub>-DNA katım ürünü bulunan bireylerin, bulunmayanlara oranla kansere yakalanma risklerinin 9,1 kat daha fazla olduğu saptanmıştır (11).

AFB<sub>1</sub> 8,9-epoksit için glutatyon ile konjugasyon en önemli detoksifikasyon yoludur. AFB<sub>1</sub>'in metabolizması sırasında P450 tarafından katalizlenen pek çok hidroksilasyon oluşur ve bu reaksiyonlar sonucunda AFM<sub>1</sub>, AFP<sub>1</sub> ve AFQ<sub>1</sub> gibi ikincil metabolitler oluşur. Faz II konjugasyon işlemleri de primer aflatoksin metabolitlerinin glukronidasyon, sülfatasyon ve asetilasyonunu içerir (1,7). Şekil 3'te aflatoksinlerin olası metabolizma yolları görülmektedir (6).

### **Besinlerde Aflatoksin Oluşumunu Önleme veya Arındırma Çalışmaları:**

Tahıllar dahil birçok ürünün büyüme, hasat, depolama ve işlenmesi esnasında aflatoksinler tarafından kontamine edilmemesini sağlamak günümüzde en önemli amaçlardan biridir. Mantarla kontamine olmamış tohum kullanımı, böcek ve hastalıkların kontrolü, yeterli aşılama, kuraklıktan mümkün olduğunca korunma, ürün olgunken ve çabuk hasat yapma, mekanik hasarı en aza indiren hasat tekniklerinin kullanımı, mantar yerleşimi ve aflatoksin oluşumunu engelleyebilir. Ancak ne yazık ki bazı aflatoksin kontaminasyonları engellenememektedir.

Hasat sonrası aflatoksin kontaminasyonunun önlenmesi hasat edilen ürünün hızlı bir şekilde kurutulması, depolama ve nakliyat işlemlerinin aflatoksin oluşumunu desteklemeyecek nem seviyelerinde yapılması sayesinde kontrol altında tutulabilir. Bunun yanında hasat edilen ürünlerde depolama esnasında bazı basit gereçler (UV lambası veya vakum uygulaması gibi) kullanılarak hasarlı ve olası toksin içeren ürünler teşhis ve ayırdedilerek ürünün sağlam kısmında kontaminasyonun derinleşmesi önlenebilir veya azaltılabilir. Bu uygulamalar sayesinde aynı zamanda yüksek oranda kontamine olmuş tahıl ürünlerinin serilerinin belirlenmesi ve market zincirine girip daha yüksek miktarda yiyecek kontaminasyonuna neden olmadan elimine edilmesi de mümkün olur (6). Aflatoksin üretimi için optimum sıcaklık 20-38°C olmasına rağmen daha uzun süreli inkübasyonlarda 7-12°C'lik sıcaklığa sahip ortamlarda da üretim olduğu gözlenmiştir (1,3). Bu nedenle daha düşük sıcaklıklarda depolama aflatoksin üretimini engellemek için yeterli bir koşul sağlamamaktadır (1). Özellikle hasat öncesi kuraklıkla birleştiğinde hasat sonrası rutubetli depolama koşulları yüksek aflatoksin kontaminasyonu ile sonuçlanır.

Tohum ve yağlar üzerinde etanol (%95), 2-propanol (%80), asetonun (%90) sulu çözeltileri ve hekzanın alkol, sulu alkol veya sulu asetonla olan karışımları gibi bazı çözücüler ile denenen arındırma çalışmalarının aflatoksinleri ayırmada başarılı olduğu bildirilmektedir.

Nemli veya kuru öğütme ile fraksiyonlandırma

yapılarak insan kullanımına sunulacak ürüne aflatoksinlerin çok az bir miktarının geçmiş olması sağlanabilir. Bu miktar yine de izin verilen 20 µg/kg'lık düzeyi aşabileceğinden dolayı dikkatli olunmalıdır (6).

Saf haldeki aflatoksinler genellikle erime dereceleri olan 250°C'ye kadar dayanıklıdır. Isı uygulanan kontamine ürünlerde bir miktar aflatoksin kaybının meydana gelmesi büyük olasılıkla nem, pH ve çevrenin kompleks yapısı nedeniyle. Bu yöntemin pratikte bir detoksifikasyon yöntemi olarak kullanılamamasının nedeni aflatoksinlerin yukarıda belirtildiği gibi ısı uygulamalarına dayanıklı olmaları ve söz konusu yüksek ısı uygulamalarında ürünün besin değerini kaybedecek olmasıdır. Örneğin sütteki AFM<sub>1</sub>'in pastörizasyon, depolama ve çeşitli işlemlere tabi tutulması sürecinde değişen sıcaklıklara dayanıksız olduğuna dair raporlar bulunmaktadır fakat sütteki AFM<sub>1</sub>'in sütün içerdiği besleyici bileşenlere zarar vermeden uzaklaştırarak veya etkisiz hale getirecek bir yöntem henüz bilinmemektedir (6). Yerfıstıklarının kavrulması, mısırların patlatılması gibi bazı pişirme işlemleri de aflatoksin düzeyleri azaltılabilir fakat bu azalma çok az düzeyde olmaktadır (1).

Baharatlarla yapılan çeşitli mikotoksin kontaminasyon çalışmalarında karabiber, tarçın, nane, kekik, zencefil gibi baharatların aflatoksin oluşumunu kısmen veya tamamen inhibe ettiği gözlenmiştir. Bu baharatların küf mantarının çoğalmasından çok aflatoksin oluşumunu engelledikleri düşünülmektedir (12,13).

Aflatoksin molekülü asit, baz ve okside edici ajanlardan oldukça etkilenen bir moleküldür. Kontamine ürünlerin kimyasallarla muamelesinin aflatoksin miktarını azaltmada etkin olması mümkün olsa da diğer olası toksik maddelerin oluşması, besin değeri kaybı ve protein kalitesindeki düşüş, organoleptik özelliklerde istenmeyen değişiklikler ve maddi kayıp gibi diğer faktörler de gözönünde bulundurulmalıdır.

Fındık ve keten tohumu üzerinde yapılan pek çok arındırma çalışmaları sonucunda amonyak, metilamin, sodyum hidroksit ve formaldehitin oldukça etkili kimyasallar oldukları saptanmıştır.

Bu işlemlerden amonyaklamanın en etkin uygulama olduğuna karar verilmiştir.

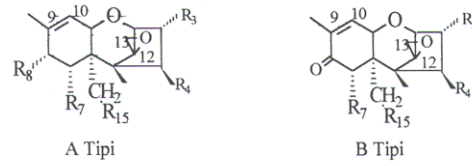
Çalışmalar amonyak uygulamasının aflatoksinlerin tamamına yakınının inaktive edilmesiyle sonuçlandığını ortaya koymuştur. Ancak ürünün kullanımdan önce amonyağın uzaklaştırılması için tamamen kurutulması gerekmektedir. Amonyak pek çok yiyecekte aflatoksinlerin detoksifiye edilmesi için gaz veya amonyum hidroksit çözeltisi halinde kullanılmaktadır (1,6). Amonyak AFB<sub>1</sub> etkileşmesinde AFB<sub>1</sub>'in lakton halkasının açıldığı ve takiben AFD<sub>1</sub> bileşiğinin meydana geldiği gösterilmiştir. Amonyaklanmış ürünler hayvanlarda herhangi bir toksisiteye neden olmamıştır. Amonyaklanmış tahıllarla beslenen inek sütlerinde AFM<sub>1</sub>'e rastlanmamasının yanı sıra karaciğer, böbrek ve kalpte de herhangi bir aflatoksin kalıntısı bulunmadığı gözlenmiştir. Metilaminle yapılan çalışmalarda ise bileşiğin keten tohumu ürünlerinde, özellikle sodyum hidroksit varlığında aflatoksinleri önemli ölçüde etkisiz hale getirirken başta karaciğer büyümesi olmak üzere organizmada istenmeyen bazı etkiler oluşturduğu gözlenmiştir.

Ozonlama yoluyla da AFB<sub>1</sub> ve AFG<sub>1</sub>'in düzeylerinde azalma saptanırken AFB<sub>2</sub> ve AFG<sub>2</sub>'ye herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Sodyum hipoklorit, formaldehit-kalsiyum hidroksit karışımı ve bisülfüt gibi pek çok bileşikle çalışmalar yapılmasına rağmen günlük kullanıma çok az madde girebilmiştir. Örn. Hindistan'da düşük konsantrasyonda hidrojen peroksitin yerfıstığı ürünlerinin mikotoksinlerden arındırılmasında kullanımına izin verilmektedir (6).

Fenolik antioksidanlardan olan bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) ve bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) ile yapılan çalışmalarda, bu iki antioksidanın farelerde karaciğer kanserinin başlatma aşamasını inhibe ettiği gözlenmiştir (14). BHT'in etki mekanizması karaciğer glutatyon-S-transferazlarını (GST) indükleyerek AFB<sub>1</sub> 8,9-epoksitin DNA'ya bağlanmasını etkin olarak inhibe etmesidir (15). Farelerle yapılan çalışmalarda BHA'nın etkisinin

BHT'den daha fazla olduğu belirlenmiştir (14).

Yapılan çalışmalar sonucunda amonyaklamanın arındırma çalışmalarında en etkin kimyasal uygulama olduğu saptanmıştır. Araştırmalar; amonyak uygulanmasının aflatoksinlerin tamamına yakınının inaktive edebildiğini ortaya koymuştur. Ancak ürünün kullanımdan önce amonyağın uzaklaştırılması için tamamen kurutulması gerekmektedir.



|                 | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub>     | R <sub>7</sub> | R <sub>8</sub>                                       | R <sub>15</sub>    |
|-----------------|----------------|--------------------|----------------|--|--------------------|
| <b>A Tipi</b>   |                |                    |                |  |                    |
| Skirpentriol    | OH             | OH                 | H              | H  | OH                 |
| T-2 Toksini     | OH             | OCOCH <sub>3</sub> | H              | OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | OCOCH <sub>3</sub> |
| <b>B Tipi</b>   |                |                    |                |  |                    |
| Nivalenol       | OH             | OH                 | OH             |  | OH                 |
| Deoksinivalenol | OH             | H                  | OH             |  | OH                 |

Şekil 4. A ve B tipi trikotesen örnekleri

Hayvan yemlerine ilave edilen aktif karbon, sodyum bentonit, sodyum alüminosilikat hidrat gibi sekestre edici ajanların aflatoksinlerden arındırma amacıyla yapılan çalışmalarda hidrojene sodyum kalsiyum alüminosilikat (HSCAS)'ın aflatoksinleri bağlamada oldukça etkili olduğu saptanmıştır (1,16,17). Yemlerine HSCAS ilavesi yapılan ineklerin sütlerine itrah edilen AFM<sub>1</sub> miktarında anlamlı bir azalma olduğu bildirilmiştir (17).

Aflatoksin kontaminasyonunun engellenmesi amaçlı bir başka yaklaşımı da *A.flavus* ve *A.parasiticus*'un toksijenik olmayan suşlarının geliştirilip bunlar aracılıklı, toksik olan *Aspergillus* suşlarının üremesinin yavaşlatılabilmesi veya durdurulabilmesidir (1).



### TRİKOTESENLER

Trikotesenler *Fusarium*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Verticimonisporium*, *Stachybotris*' in çeşitli türleri tarafından oluşturulurlar ve seskiterpenoit yapısındadırlar (1,18). Günümüze kadar küf kültürlerinden 140'tan fazla trikotese tipi izole edilmiştir ve bu sayı artmaya devam etmektedir.

Trikotesenler 12,13-epoksitrikotes-9-en halkası temel alınarak kimyasal yapılarına göre A, B, C ve D olmak üzere dört farklı gruba ayrılırlar. B tipi trikotese türlerin A tipinden farkı  $\alpha$  -  $\beta$  bağına sahip olmasıdır. Bu iki alt tip izole edilmiş 140 civarındaki toksinlerin yaklaşık 100'ünü oluşturur. C tipi ilave bir epoksit grubu ile karakterizedir, D tipi ise makrosiklik trikotese türlerden oluşmaktadır. Şekil 4'te sadece önemli olan A ve B tipi trikotese türlerine bazı örnekler gösterilmiştir (19).

Tarım ürünlerinde trikotese kontaminasyonunun büyük kısmını A grubundan olan T-2 toksini ve scirpentriol ile B grubuna dahil olan deoksinivalenol (DON) ve nivalenol (NIV) ve türevleri oluşturmaktadır. T-2 toksini ve scirpentriolün doğada bulunma sıklığı DON ve NIV'e göre daha azdır (20).

Tüm bu doğal toksinler C-9,10'da bir olefinik bağ ve C-12,13'te toksisite etkenleri olan bir epoksi grubu içerirler. Toksik etkilerini göstermek için metabolik aktivasyona gerek yoktur (1,18). Toksin oluşumu için pek çok defa erime-çözünme olaylarının gerçekleşmesi gerekir (2). Trikotese tür (örn. T-2 toksini) daha çok 8-14°C gibi nispeten düşük sıcaklıklarda oluşabilmektedir fakat 25°C civarındaki sıcaklıklarda da *Fusarium acuminatum* tarafından üretilebildiğine dair raporlar da bulunmaktadır (1).

Çoğu trikotese tür hem mikotoksik hem de zootoksik ajanlardır. Bazı trikotese türler antifungal, antiviral ve antibakteriyeldir. Ciltte yanma, kaşıntı, şişlik, peteşik kanama, kuruma, çatlama, pul pul dökülme; ayrıca enterit, kusma, oral nekroz, gastroenterik nekroz gibi toksisite belirtileri göstermektedir (20). Bu bileşikler oldukça güçlü enflamatuvar etkiler ve ödem gibi önemli sistemik etkilere sahiptirler; özellikle abdominal ödem diğer dokularda toksik etki gözlenmeyecek kadar düşük

konsantrasyonlarda toksinle dahi görülebilen bir etkidir. Verrucarın A ile akut ve subakut maruziyette pek çok hayvan türü ile yapılan deneylerde diyare, hematüri, bazen kusma, anoreksi, susuzluk, ataksi, ve kilo kaybı gibi etkiler gözlenmiştir. Bu belirtilere ilaveten bu grup toksinlerin yüksek dozlarda beyinde ve kalp kaslarında dejenerasyon ve kanamalara neden oldukları saptanmıştır. Testis, timus ve lenf nodüllerinde ciddi lezyonlar oluşturmuşlardır ve bazı hayvanlarda gastrointestinal kanal (GİK) enflamasyonları gözlenmiştir. İnsanlarda düşük doz etkileri bulantı, kusma, anemi, hemoraji, diyare ve immüno-supresyondur (19 - 21).

Trikotesenler doğada sık bulunur ve Rusya'da kışı tarlada geçirecek önemli derecede sıcaklık değişimlerine maruz kalmış ve dolayısıyla kontamine olmuş tahıl tüketimine bağlı olarak oluşan "alimentary toxic aleukie" (ATA)'dan sorumlu tutulmuşlardır. ATA'nın klinik bulguları cilt toksisitesi, kemik iliği hasarı, hemorajiler ve diğer bazı sendromlar ile karakterizedir. ATA 1942-47 yılları arasında Sibiryaya yakınlarındaki Orenbur'da popülasyonun %10'undan fazlasının ölümüyle ilişkili bulunmuştur. Semptomları T-2 ile benzer şekilde kusma, diyare, deri enflamasyonu, lökopeni, çoklu hemoraji ve kemik iliği hasarı ile karakterizedir. Bu nedenle T-2 toksinin ATA'daki etiyolojik etmen olduğu tahmin edilmektedir (1).

ATA'nın klinik gelişimi dört aşamadan oluşur. Birinci aşama 3-9 gün sürer ve ağızda ve GİK'da değişikliklerin olduğu gözlenir. Ağız, dil ve GİK'da yanma hissi, baş ağrısı, yorgunluk, bitkinlik ve baş dönmesi ana yakınmalar arasındadır. Bunlar hasta ikinci aşamaya girdiğinde hızlı bir şekilde kaybolabilir. İkinci aşama 3-8 hafta sürer ve hematopoetik sistemdeki değişiklikler dışında hasta kendisini normal aktivitesine devam edecek kadar iyi hissedebilir. Progresif lökopeni, granülopeni, lenfositoz ve anemi görülebilir. İmmün sistemdeki bozukluklar nedeniyle hastada bakteriyel enfeksiyonlar artabilir. Daha ciddi komplikasyonların gözlemlendiği durumlarda hastanın sinir sistemindeki bozukluklar nedeniyle halsizlik, çarpıntı, baş ağrısı, astım benzeri kriz, hipotansiyon, sarılık, pupiller dilatasyon, diyare

veya konstipasyon gelişebilir. Toksik tahıl kullanımı devam ederse hasta üçüncü evreye girer. Bu aşamada daha ciddi ve şiddetli belirtiler gözlenebilir. Bu evre boyunca vücudun çeşitli yerlerinde, ciltte ve ağız içinde, GİK'da ve nazal kısım gibi mukozasında peteşik kanamalar, ağız boşluğunda nekroz ve servikal lenf nodüllerinde büyüme ve ödem oluşabilir. Özefagus ve epiglottisteki lezyonlar ve larinksteki ödem nedeniyle epiglottisin kapanması sonucu ölüm gözlenebilir. Ölüm gözlenmezse hasta dördüncü safhaya girer ve iki ay veya daha uzun bir süreç sonunda hasta iyileşebilir (2).

T-2 toksini ve NIV gibi trikotesenler aktif olarak üreyen hücrelerde karyorheksizi indüklerler, kemik iliği hücrelerinde belirgin azalış oluşturlar ve protein ve DNA sentezini inhibe etme ve HL-60 hücrelerinde programlanmış hücre ölümünü (apoptozis) indüklemeye yetenekleri vardır. T-2 toksini ile insan periferik lenfosit hücrelerinde yapılan *in vitro* bir çalışmada toksinin periferik lenfosit hücrelerini etkilediği, dolaşımdaki beyaz kan hücreleri sayısında azalmaya ve apoptozise neden olduğu saptanmıştır (1).

Trikotesenler aynı zamanda kimyasal savaş silahları olarak da kullanılmaktadırlar. 1970'lerin sonlarında Güneydoğu Asya ve Afganistan'da kimyasal silah olarak kullanıldıkları bildirilmiştir. Daha yakın bir zamanda ise, Irak, Birleşmiş Milletler Özel Komisyonu (UNSCOM) tarafından biyolojik silah olarak kullanmak amacıyla trikotesen üretmekle suçlanmıştır. Kimyasal silah olarak kullanılan trikotesenler; T-2 toksini, DON, diasetilnivalenol ve NIV'dür. Bu bileşiklerin faredeki intraperitoneal LD<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 5.2, 70.0, 9.6 ve 4.0 mg/kg'dır (20). *Kluyveromyces marxianus* ile yapılan çalışmalarda ise toksisitenin T-2 toksini diasetilscirpentriol DON NIV sırasıyla azaldığı tesbit edilmiştir (1).

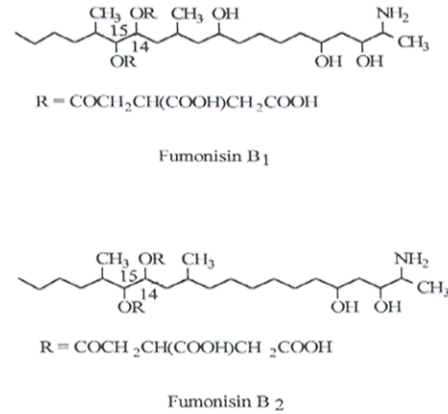
Trikotesenler, tahıllarda sık bulunmaları nedeniyle ekonomiye olduğu kadar insan sağlığı için de tehdit olmayı sürdürmektedirler. Bu nedenle başta tarım ürünleri olmak üzere gıdaları enfekte etmeleri dünya çapında sağlıkla ilgili büyük sorun

olmaya devam etmektedir (20). Amerikan Gıda İlaç Kurulu (FDA) tarafından insan kullanımına sunulan gıdalarda DON için 1 µg/g'lık bir limit belirlenmiştir (22).

## FUMONİSİNLER

*Fumonisinler Fusarium moniliforme, F. dlamini, F. nygamai, F. subglutinans, F. napiforme, F. proliferatum ve F. anthophilum* gibi çeşitli mantarlar tarafından üretilenlerine rağmen en önemli kaynakları *F. moniliforme* küfüdür (1).

Fumonisinler, çeşitli türlerdeki farklı hastalıkların etiyopatogenezesinden sorumlu nongenotoksik karsinojenlerdir (23). Üretimleri için optimum koşullar nem, yaklaşık 20°C sıcaklık ve 11-13 haftalık bir süredir. Yapıca 2-amino-12,16-dimetil polihidroksieikosan iskeletinin C14 ve C15 konumlarından propan-1,2,3-trikarboksilik asit ile esterleşmesiyle oluşmuşlardır (1). Şekil 5'te fumonisin grubunun başlıca toksinleri olan FB<sub>1</sub> ve FB<sub>2</sub>'nin yapıları gözlenebilir (23).



Şekil 5. Fumonisin B<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub>'nin yapıları

Bugüne kadar altı farklı fumonisin tanımlanmıştır. Bunlardan fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) ve FB<sub>2</sub> major toksinler olup, FB<sub>3</sub>, FB<sub>4</sub>, FA<sub>1</sub> ve FA<sub>2</sub> minör olanlardır. FB<sub>1</sub> ve FB<sub>2</sub> yapısal olarak benzer olan ve atlarda lökoensefalomalazi (LEM), domuzlarda pulmoner ödemle ilişkili olan ajanlardır (24). LEM Meksika, ABD, Mısır ve Güney Afrika'da bilinen

bir hastalıktır. Eşeklerde ve atlarda beyin beyaz cevher kısmında nekroz oluşturmaktadır. Ayrıca *F.moniliforme* ile kontamine mısır tüketiminin aynı zamanda Güney Afrika ve Çin'deki özefagal kanser vakaları ile de ilişkili olduğu sanılmaktadır. Bilinen altı fumonisinden FB<sub>1</sub> ve FB<sub>2</sub>'nin N-asetil türevleri olan FA<sub>1</sub> ve FA<sub>2</sub>, *F.moniliforme* kültürleri tarafından en az üretilen ve en az toksisiteye sahip olan türevlerdir. Bu iki yapısal analog ve FB<sub>4</sub> doğada bulunmazlar (1).

Fumonisinler toksik etkilerini göstermek için metabolik aktivasyona ihtiyaç duymayan bileşiklerdir. Bu özellikleri FB<sub>1</sub> ve FB<sub>2</sub> ile beslenen sıçanların idrar, safra, kan ve hepatositlerinde metabolite rastlanmamasıyla doğrulanmıştır. FB<sub>1</sub> ile sıçan ve maymunların kanında yapılan toksikokinetik çalışmalarda eliminasyon yarı ömrünün 18-40 dakika arası olduğu bulunmuştur. FA<sub>1</sub> ve FA<sub>2</sub> toksisitesi düşük olan bileşiklerdir fakat hidrolizleriyle oluşan ürünler (PA<sub>1</sub> ve PA<sub>2</sub>) ana bileşikler kadar toksisite gösterebilirler (1).

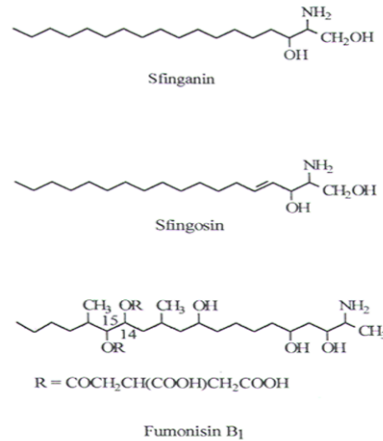
Daha çok FB<sub>1</sub> ve FB<sub>2</sub> olmak üzere fumonisinlerin, hayvanlar üzerinde türe bağlı olarak nörotoksisite, hepatotoksisite, nefrotoksisite, immüno-supresyon (ve bazen de immüno-stimulasyon), gelişim bozuklukları, karaciğer tümörleri olmak üzere çeşitli toksik etkileri vardır. Hayvanlarla yapılan toksikolojik incelemeler en hassas türün atlar olduğunu göstermiştir (20,21). LEM riskini azaltmak için at yemlerinde maksimum 5 µg/g fumonisin miktarına izin verilmesi tavsiye edilmiştir. Pulmoner ödemi engellemek için benzer şekilde domuzlarda maksimum 10 µg/g'lık bir miktara, sığır ve kümes hayvanlarında ise fumonisin etkilerine duyarlılıkları diğer türlere göre daha düşük olduğundan dolayı 50 µg/g'a kadar fumonisine izin verilmektedir (1,25). Tablo 6'da fumonisinler için müsaade edilen düzeyler verilmiştir (1).

**Tablo 6.** Fumonisinler için tavsiye edilen güvenlik limitleri

| Tür                       | Limit (ppb) |
|---------------------------|-------------|
| Sığır ve kümes hayvanları | 50000       |
| Domuzlar                  | 10000       |
| Atlar                     | 5000        |

Fumonisinler kanser başlatmasında ve ilerlemesinde genotoksik karsinojenleri taklit eder. γ-glutamil transpeptidaz (GGT) ve glutatyon-S-transferaz'ın plasental formunu (GSTP) indükler. Bu enzimler genotoksik karsinojenler tarafından başlatılan olası preneoplastik lezyonların histolojik markörleridir. Fumonisinler genotoksik karsinojenlerden kanser başlatma safhaları ve uzun süreli maruziyeti gerektirmesi nedeniyle farklılık gösterirler. Bu safha genotoksik karsinojenler için normalde birkaç saat veya gün içinde tamamlanmaktadır (1).

Fumonisinler, sfinganin (SA) ve sfingosin (SO) olan yapısal benzerlikleri nedeniyle sfingolipid biyosentezini inhibe etmektedirler. Şekil 6'da yapıları verilmiştir (25). Sfingolipidler hücre membranının önemli bileşenlerinden olan uzun zincirli serbest bazlardır ve mekanizmalarının bozulması hücre büyümesi, farklılaşması ve davranışında önemli değişikliklere neden olabilir (1). Fumonisinler sfinganin N-açıl transferaz (seramid sentetaz) enziminin inhibisyonu ile SA'nin N-açilsfinganinlere (dihidroseramidlere) dönüşümünü inhibe eder. Bu olay serbest SA'nin akümüasyonu ve dokulardaki SA/SO oranının artmasıyla sonuçlanır ve toksinlerin alımından sonra erken bir safhada ortaya çıkmaktadır (25,26).



**Şekil 6.** Sfinganin (SA), sfingosin (SO) ve fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) yapıları

FB<sub>1</sub>'in sfingolipid biyosentezinden farklı olarak palmitik asit oluşumunu değiştirerek hücrel lipit sentezini etkilediği gözlenmiştir. Sıçanlarda ana fosfolipidlerin yağ asiti düzeyleri ve lipid triaçilgliseritleri *in vitro* ve *in vivo* olarak izlendiğinde n-6 yağ asitlerinde değişiklikler olduğu bulunmuş, membran kaynaklı kolesterol düzeylerinde düşme olduğu gözlenmiştir. Bu düşüş fosfotidilkolin: kolesterol oranının artmasına ve dolayısıyla membranın katılaşmasına neden olur. Bu nedenle fumonisinler membran bileşenleri, yağ asiti havuzu ve uzun zincirli yağ asitlerinin hücre içinde akümüasyonu üzerinde önemli etkilere neden olabilirler. Bu etkiler membran yapılarının bütünlüğünü bozar ve hücre ölümüyle sonuçlanır. Fumonisinlerin memelilere olan olası toksisite mekanizmalarından en çok çalışılanlarından birisi de bu mekanizmadır. Bazı araştırmacılar fumonisin toksistesinde sfingoid bazlarının birikmesinin sfingosid biyosentezi inhibisyonundan daha önemli rol oynadıklarını belirtmişlerdir. Çeşitli hayvanlarda yapılan çalışmalarda, sfingolipid biyosentezi inhibisyonunun hücre proliferasyonu ve ölümünden daha önce olduğu gözlenmiş ve bu inhibisyonun toksisitenin erken safhasında meydana geldiği doğrulanmıştır (1).

İnsan idrarındaki SA ve SO miktarları değişebilir fakat kişi fumonisine maruz kalmadığı sürece oran aynı kalır (25). Hem kültürdeki hücreler ve hem de FB<sub>1</sub> ile muamele gören hayvanlarda ilk gözlenen biyokimyasal değişiklik SA/SO oranının artması olmuştur. Bu sfingoid bazlarındaki değişikliklerin hücrel etkileri retinoblastoma protein defosforilasyonu ve apoptozis aktivasyonu olduğu düşünülmektedir (26). Çünkü uzun zincirli serbest bazlar ve lisosfingolipidler hücre içi haberleşme sistemini düzenler ve bazı hücrelere sitotoksiktirler. Protein translokasyonunu, ATPaz'ları ve kalsiyum dengesini etkilerler (1).

Çeşitli türlerle yapılan araştırmalarda SA/SO oranları serum, akciğer, karaciğer ve böbreklerde incelenmiş ve en hassas organın böbrek olduğu saptanmıştır. Böbrek ve karaciğerdeki serbest SO, serbest SA ve SA/SO oranlarındaki belirgin

artış idrara da belirgin şekilde yansımakta, serumdan önce idrardaki oran artmaktadır (25).

FB<sub>1</sub>'in tavuklarda karaciğer, böbrek, kalp ve akciğerlerde lezyonlara ve ani ölümlerine neden olduğu gözlenmiştir. Fumonisin alımı makrofajlarda azalma nedeniyle azalmış immun cevap ve neticede enfeksiyon ve FB<sub>1</sub> kaynaklı karsinogenez ile sonuçlanabilir (1). Fumonisinler karaciğer, akciğer ve beyine toksik olmalarının yanı sıra böbrekleri de etkilemektedirler (25,26). Fumonisin uygulaması idrar osmolalitesini azaltmış, idrar konsantre etme kabiliyetini bozmuş ve idrarla protein kaybını arttırmıştır. Total protein, laktat dehidrogenaz,  $\gamma$ -glutamil transpeptidaz ve N-asetil- $\beta$ -D-glukozaminidaz aktivitelerinde artma gözlenmiştir. FB<sub>1</sub>'e maruz bırakılan erkek farelerde yapılan çalışmalarda böbreklerde organik anyon ve katyon alımının azaldığı saptanmıştır (26).

FB<sub>1</sub>'e maruz bırakılan primer hepatositler doymamış yağ asidi birikimi göstermişlerdir. Bu durum uzun zincirli doymamış yağ asitlerinden, özellikle araşidonik asitten sentezlenen prostoglandinlerin düzeylerini etkileyebileceğini düşündürmektedir. Bilindiği üzere prostoglandinler, hücre tipine göre, kanser başlatılmasında ve ilerlemesinde önemli bir faktör olan hücre proliferasyonunu inhibe veya stimüle edebilirler. Ayrıca doymamış yağ asidi miktarındaki artışın normal ve kanserli hücrelerdeki lipid peroksidasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiş ve böylece FB<sub>1</sub>'in OTA gibi dolaylı olarak lipid peroksidasyonuna neden olabileceği belirtilmiştir.

FB<sub>1</sub> normal yiyecek hazırlama işlemlerinin çoğuna dayanıklı olan bir bileşiktir. Su da dahil olmak üzere pek çok polar solventte çözünür ve polar olmayan çözücülerde çözünürlüğü yoktur. Fumonisinlerle kontamine olmuş yiyecek ve yemler için bilinen hiçbir detoksifikasyon yöntemi bulunmamaktadır.

Mısırdaki ince partiküllü materyal (< 3mm) en yüksek miktarda fumonisin düzeyine sahiptir. İnce materyalin ayrılmasıyla fumonisin düzeylerinde belirgin azalma gözlenmiştir. Öğütme işlemi ve amonyak uygulanması da fumonisin düzeylerini düşürmektedir. Bir başka metod da mısırın 0,1 M

kalsiyum hidroksitle 24 saat 25°C'de muamele edilmesidir. Tüm bu farklı uygulamalar fumonisinlerin mısır tohumlarının dış perikarp tabakasında konsantrasyonu göstermektedir (1).

### OKRATOKSİNLER

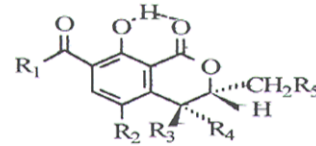
Okratoksinler, *A.ochraceus* (*A.alutaceus*), *A.melleus*, *A.alliaceus*, *A.ostianus*, *A.sclerotium*, *A.albertensis*, *A.wentii*, *A.auricomus*, *A.niger* var. *niger*, *A.sulphureus* (*A.fresenii*) ve *P.viridicatum* (*P.verrucosum*) mantarları tarafından üretilen mikotoksinlerdir (1,28).

Okratoksin A (OTA) doğada sık olarak bulunması ve neden olduğu patolojik durumlar itibarıyla oldukça önemli bir okratoksinidir. OTA'nın Danimarka'da domuzlarda görülen bir tür nefropatiden ve kümes hayvanlarındaki mikotoksikozdan sorumlu olduğu, Balkan endemik nefropatisinde (BEN) ve Kuzey Afrika'da yaygın görülen üriner sistem tümörlerinde rol oynadığı düşünülmektedir (1,28 - 30).

OTA 12-karboksi grubundan L-fenilalanine bağlanmış bir pentaketit türevi hidroksikumarin yapısındadır (1,29,31). OTA'nın doğal dekloro analogu olan OTB, OTA'dan 10 kat daha az toksiktir (1). OTA ile OTB'nin farkı, OTA'nın dihidro-metil-isokumarin halka sisteminde C5 pozisyonunda klor atomu taşımasıdır. Bu klor atomunun varlığına ilaveten, fenolik hidroksil grubu da toksisiteyi arttırmaktadır (32). OTA esterlerinin toksisitesi OTA'ya benzerlik gösterirken OTB'nin esterleri beklendiği şekilde toksik etkili bulunmamıştır. Şekil 7'de okratoksinlerin genel yapıları verilmektedir (1). Tüm bileşikler, sıcaklık ve hidrolize rağmen çok dayanıklı olan, amid bağıyla birleşmiş fenilalanin-dihidroisokumarin bileşikleridir (32).

Okratoksinler; arpa, mısır, buğday, çavdar ve yulafın yanı sıra fasulye, incir, kuru üzüm, zeytin, kabuklu yemişler, kahve tohumu, baharatlar ve greyfurt suyunda da bulunabilmektedirler (29,32,33). Şifalı bitkiler ve bitki çayları, eğer uygunsuz ve mantar üremesine elverişli koşullarda saklanmışsa kullanmadan önce mikotoksin analizi yapılmalıdır. Kahvede olduğu kadar, bira gibi fermentasyon ürünlerinde de OTA kalıntılarında

rastlanmıştır. OTA kontaminasyon düzeyi en çok tahıl (özellikle mısır, buğday, arpa), ve hayvansal ürünlerde gözlenmiştir (32).



|                           | R <sub>1</sub>           | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> | R <sub>5</sub> |
|---------------------------|--------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Okratoksin A              | Fenilalanin              | Cl             | H              | H              | H              |
| Okratoksin B              | Fenilalanin              | H              | H              | H              | H              |
| Okratoksin A Metil Esteri | Fenilalanin Metil Esteri | Cl             | H              | H              | H              |
| Okratoksin B Metil Esteri | Fenilalanin Metil Esteri | H              | H              | H              | H              |
| Okratoksin B Etil Esteri  | Fenilalanin Etil Esteri  | H              | H              | H              | H              |
| Okratoksin α              | OH                       | Cl             | H              | H              | H              |

Şekil 7. Okratoksinlerin genel yapıları

OTA, işlenmemiş kontamine tarım ürünleri yem olarak kullanıldığında geviş getiren yetişkin hayvanlarda sorun oluşturmazken; domuz ve kümes hayvanları gibi geviş getirmeyen hayvanların et ve et ürünlerini de kontamine edebilmektedir (1,32,33). Geviş getiren hayvanlarda OTA ön midelerinde protozoa ve bakteriyel enzimler tarafından hidroliz edilmektedir. Geviş getirenlerin işkembelerindeki bakterilerin molekülde bulunan amid bağı bir dereceye kadar koparabildiği düşünülmektedir. Bu, fenilalanin ve toksik olmayan OTα oluşumuyla sonuçlanır (32,34). OTA'nın aynı zamanda farelerde de çoğunlukla çekum, duodenum, ileum ve pankreas olmak üzere çeşitli organlarda OTα'ya hidroliz edildiği, karaciğer ve böbreklerdeki aktivitesinin ise düşük olduğu veya olmadığı gözlenmiştir.

OTA'nın insan sütünde de gözlenmiş olması emziren annelerin toksini kontamine yiyeceklerden alabileceğini göstermektedir (1). Çok sayıda çalışmada insan kanı, sütü ve böbreğinde OTA bulunması şaşırtıcı değildir (32). İnsanlarda sadece postnatal değil, aynı zamanda prenatal olarak maternal OTA maruziyeti söz konusudur

fakat fetal dönemde maruziyetin sonuçları tam olarak tanımlanmamıştır (31).

OTA'nın yiyecek ve yemlerde bulunduğunu gösteren çalışmalar vardır. Kontaminasyon genellikle ılıman iklim, hasat ve hasat sonrası depolama koşulları ile yakından ilişkilidir (1,32). Üretim başlıca sıcaklık, substratın nem miktarı ve tipi, farklı bir mikroflora varlığı, mevcut mantarın suşu ve tohumun kalitesine bağlıdır (1). Toksinin üretimi pH 5.5'ta demir, bakır ve çinko varlığında maksimumdur. İlıman iklim koşullarında *Penicillium* OTA'nın ana kaynağıdır (32). Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO) tarafından OTA üzerinden belirlenen limitler Tablo 7'de belirtilmiştir. Avrupa Birliği tarafından ise bebek mamaları için müsaade edilen düzey 1 µg/kg; tahıllar için ise 5 µg/kg olarak belirlenmiştir (1). Günlük tolere edilebilir düzey (TDI) olarak ise 5 ng/kg vücut ağırlığı OTA'ya müsaade edilmektedir (32).

**Tablo 7.** Farklı satış ürünlerindeki okratoksin A limitleri

| Ürün                              | Limit (µg/kg) |
|-----------------------------------|---------------|
| Çocuk ve bebek mamaları           | 0,5-5         |
| Yiyecekler                        | 2-50          |
| Hayvan yemi                       | 5-300         |
| Şarap                             | 0,2-1         |
| Bira                              | 0,2           |
| Yeşil kahve tohumu                | 8             |
| Kavrulmuş kahve ve kahve ürünleri | 4             |

1999'da Avrupa Birliği Tarımsal Kontaminantlar Uzman Komisyonu (JECFA) sadece tahıl için değil, aynı zamanda şarap, kahve ve bira için de minimum kalıntı düzeylerinin (MRL) saptanması gerektiğine karar vermiştir. Maruziyet çalışmaları, tahılların OTA maruziyetinde kabaca %50-70'lik bir paya sahip olduğunu şarap, bira ve kahvenin her birinin de %7-15'lik bir payı olduğunu göstermiştir (32).

Farelere oral uygulanan OTA'nın yaklaşık %40-65'i barsaklardan ana olarak jejunumun başlangıç kısmından absorbe edilir. OTA yüksek bağlanma kapasitesine sahiptir ve dolaşım sistemine ulaştığında serum albuminine ve daha özgül

olarak kanın küçük fraksiyonlarına bağlanır. OTA'nın bu özelliği kandan hepatik ve renal hücrelere transferini kısıtlayarak eliminasyon süresini uzatır ve yarı ömrünün uzamasıyla sonuçlanır. Bu yarı ömrün, insanlarda oral alımdan sonra 840 saat olduğu bildirilmiştir. Karaciğer klerensi, karaciğer hücre membranında bulunan organik anyon transfer eden polipeptit taşıyıcı "oatp taşıyıcı" adı verilen bir multispesifik safra asidi taşıyıcısına bağlıdır (1,32,34).

Bir diğer önemli eliminasyon organı ise böbrektir. OTA'nın proteine bağlanma oranı yaklaşık %99'dur. Bu bağlanma oranı doğal olarak bulunan konsantrasyon aralığında (1-100 nM) doygunluğa ulaşmaz. Bu yüzden OTA glomerül filtrasyonla değil, tübül sekresyonla idrara geçmektedir. Bu işlem de proksimal tübül hücrelerinin bazolateral hücre membranında bulunan başka bir multispesifik ksenobiyotik taşıyıcısı para-amino-hippürik-asit (PAH) taşıyıcı sistemi tarafından gerçekleşir. Probenesid bu taşıyıcı sistemin inhibitörüdür ve OTA'nın nefrotoksik etkilerini azaltma eğilimi gösterir. OTA'nın uzun süreli teması sonucu proksimal tübül kökenli böbrek hücrelerinde genel hücre fonksiyonları etkilenmeksizin organik anyon taşıyıcı aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. OTA'nın kendi itrahi da azalmıştır, bu yüzden diğer ksenobiyotik ve ilaçların da itrahi bozulabilir ve OTA dolaylı toksik etki gösterebilir. OTA tüm nefron segmentlerinden reabsorbe olabilir. Bu işlem toksinin renal dokuda birikmesi ve toksisitesinin artması (örn. renal papilladaki pH homeostazının bozulması) ile sonuçlanabilir (32). Böbrek ve karaciğerden elimine edilen relatif OTA miktarı hayvanın türüne, uygulama doz ve yoluna, enterohepatik dolaşıma, toksinin serum makromoleküllerine bağlanma düzeyine bağlıdır.

OTA'nın plazma yarı ömrü absorpsiyon ve serum albuminine bağlanma derecesine bağlıdır. OTA'nın bağlandığı küçük fraksiyonlar normal glomerül membranından kolayca geçebileceğinden ve OTA'nın böbrekte akümülyasyonuna neden olabileceğinden dolayı OTA'nın memelilerdeki nefrotoksik etkileriyle bu bağlanmanın arasında bir ilişki olabileceği düşünülmektedir (1). Toksinin

kandan taşıyıcı aracılığıyla ayrılması organizma için toksisite riskini azaltır, fakat aynı zamanda böbrek ve karaciğer gibi eliminasyon organlarında toksisite artışına neden olur. Safrayla itrah edilen toksini uzaklaştıran bağırsaklar kadar, bu iki organda da en yüksek doku konsantrasyonları gözlenir (32). OTA'nın renal tübüllerden reabsorbsiyonunun kana tekrar geçişini arttırdığı ve böbrekteki bu işlemin farklı hayvan türlerindeki böbrek hasarının nedeni olduğu düşünülmektedir.

OTA'nın bir dizi doğrudan ve pek çok dolaylı etkileri olduğu düşünülmektedir. OTA'nın en iyi bilinen etkileri fenilalanin (Phe) metabolizmasındaki enzimlere, lipid peroksidasyonuna ve mitokondrial solunuma olan etkileridir (1).

**Fenilalanin-tRNA Oluşumunun İnhibisyonu:** OTA, fenilalanin-tRNA (Phe-tRNA) sentez tarafından katalizlenen Phe-tRNA aminoasilyasyon reaksiyonunu Phe ile yarışarak inhibe eder. Bu inhibisyon hepatoma hücrelerine Phe uygulanmasıyla farelerde geri çevrilebilmiştir. Protein sentezi inhibisyonuna ilaveten DNA ve RNA sentezi de inhibe edilebilir. Phe OTA'nın teratojenik etkilerine de kısmen prenatal koruma sağlayabilir ve farelerde OTA'nın immunosupresif etkilerini engelleyebilmektedir (1). Fakat Phe'in diğer aminoasitlerle değiştirilmesiyle yapılan moleküler modifikasyonlar sonucunda da benzer toksisitenin gözlenmesi etkinin Phe yapısından kaynaklanmadığını düşündürmektedir. Bu nedenle günümüzde Phe yapısı içeren aspartamin OTA antagonizma mekanizmasının büyük olasılıkla proteine bağlı fraksiyonun azalması, dolayısıyla depo OTA miktarının azalmasıyla çabuk elimine olması olduğu düşünülmektedir (29).

OTA fosfoenol piruvat karboksikinaz ve  $\gamma$ -glutamil transpeptidaz aktivitelerini de inhibe etmekte ve fosfoenol piruvat karboksikinaz mRNA'sındaki c-AMP aracılıklı artışı engellemektedir (1).

**Lipid Peroksidasyonu:** OTA endoplazmik retikulum membranının yapısını büyük olasılıkla lipid peroksidasyonu ile bozarak hepatik mikrozomal kalsiyum dengesini etkiler. OTA NADPH veya askorbat kaynaklı lipid peroksidasyonunu *in vitro* ve *in vivo* olarak artırır. Lipid peroksidasy-

onu artışının etkinliği farklı okratoksinlerdeki fenolik hidroksil grubu varlığı ve bilinen toksisiteleriyle yakın ilişkilidir. OTA lipid peroksidasyonunu ana olarak ferrik iyonları ( $Fe^{+3}$ ) bağlayarak ferröz iyonuna ( $Fe^{+2}$ ) indirgeyerek oluşturmaktadır. Reoksidasyon  $O_2$  alımı ile olmaktadır.  $Fe^{+3}$ -OTA kompleksi NADPH-sitokrom P450 redüktaz ve NADPH varlığında oldukça reaktif hidroksil radikali oluşturur. Oksijen varlığında OTA- $Fe^{+2}$ - $Fe^{+2}$ -OTA lipid peroksidasyonu arttıran bileşikler oluşturur. Bu işlem bir kez başlatıldığında doymamış yağ asitlerinin ve oksijenin mevcut olduğu hücre içinde çok kolay yayılabilir. Lipidlerin oksijenle oksidasyonu bir radikal reaksiyonları zinciri halinde devam eder. Bu biyokimyasal işlemin sonucu olarak kimyasal olarak oldukça reaktif ve yapısal hasar oluşturan büyük oranda degradasyon ürünleri oluşur (35 - 37).

OTA'nın neden olduğu nefropati ile sitrinin, demir ve lipid peroksidasyonu arasında bir ilişki olabilir. Demir, proteinüri durumunda transferrinin glomerüle sızması nedeniyle tübüler lümende mevcuttur. Demirin, düşük pH ve bikarbonat içeriği nedeniyle tübüler sıvıda transferrinden ayrılması ve hidroksil radikali oluşumunu kataliz edebilecek bir forma dönüşmesi beklenir. Demirin hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ) oluşumunu kataliz edebilecek bir forma dönüşmesinin tübüler hücrelerin lipid peroksidasyonu ile sonuçlanacağı ileri sürülmüştür (1,32). OTA tarafından oluşturulan serbest reaktif oksijen türevlerinin neden olduğu lipid peroksidasyonu Vero hücrelerinde OTA ilavesini takiben ortama süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT), piroksikam veya aspartam ilavesiyle engellenebilmiştir (37).

**Mitokondriyal ATP Oluşumunun İnhibisyonu:** OTA mitokondrial faz 3 ve faz 4 solunumu izole edilmiş sıçan karaciğer mitokondrisinde iç membranda yer alan mitokondrial taşıyıcı proteinleri kompetatif olarak inhibe eder. OTA'nın mitokondrial alımı enerji gerektiren bir işlemdir, intramitokondrial ATP azalmasıyla sonuçlanır ve bu ATP azalışı en çok proksimal tübülün ikinci (S2) ve üçüncü (S3) segmentinde gözlenir (38). Mitokondrial mekanizmanın toksisite üzerindeki önemi toksik olmayan OTA'nın da sıçan karaciğer

mitokondrisindeki solunumu OTA'dan daha fazla inhibe edebilmesi nedeniyle açık değildir.

OTA'nın toksisitesi hakkında çelişkili raporlar bulunmaktadır. Daha önce yayınlanmış olan bazı raporlar OTA'yı ana toksik ajan, metabolitlerini daha az toksik moleküller olarak gösterirken bazı araştırmacılar da toksik etkilerin metabolitlerinden birine bağlı olabileceğini, zira enzim indükleyici fenobarbital verilen hayvanlarda karaciğer tümörü riskinin OTA verilmesiyle arttığını vurgulamaktadırlar.

OTA şimdiye kadar test edilen tüm hayvan türlerine nefrotoksiktir. Böbrekler OTA'ya en duyarlı organlardır. OTA hem akut hem kronik böbrek hasarı oluşturabilir. Hastalıklarla ilişkili renal lezyonlar proksimal tübüllerin dejenerasyonu, renal korteks fibrozu, glomerülün hiyalinizasyonu ve tübüler epitelde atrofidir (1,32). OTA kalıntıları en çok böbrekte, daha sonra azalan sırayla da yağsız et, karaciğer ve yağıdır (1,34). OTA böbrek hücrelerinde hücre bölünmesini inhibe eder ve apoptotik tipte morfolojik lezyonlar oluşturur. Apoptoziste görülen nükleer lezyonlar DNA ayrılmasından sorumlu artmış endonükleaz aktivitesiyle ilişkilidir. OTA insan lenfositlerinde apoptozis ilişkili DNA degradasyonuna neden olur. Farelerde ise doğal öldürücü hücre aktivitesinde azalmaya ve hematopoetik kök hücrelerinde ve lenfositlerde hücre bölünmesi inhibisyonuna neden olur (39).

Bulgaristan, Romanya ve Yugoslavya'nın kırsal kesimlerinde yaşayan insanlarda görülen interstisyel nefropati hastalığının yüksek miktarda OTA maruziyetiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. BEN olarak isimlendirilen bu hastalık ilk defa 1950'lerde tanımlanmış, fatal kronik böbrek hasarı, küçülmüş böbrek ve renal kortekse özgü özelliklerde değişikliklerle karakterize bir hastalıktır. OTA; BEN görülen kasabalardan alınan yiyecek örneklerinde ve bu kasabalarda yaşayan insanların kanında hastalığın olmadığı yerlerde olduğundan çok daha sık olarak saptanmıştır (1).

OTA mikroorganizma ve memeli hücreleriyle yapılan bir dizi gen mutasyon testlerinde non-mutajenik çıkmasına rağmen modifiye edilmiş Ames

testi, insan periferik lenfositleriyle yapılan *in vitro* kardeş kromatit değişimi testi ve *E.coli* ile yapılan SOS DNA onarım testinde mutasyonu indüklemiştir (40). Bunun yanında OTA maruziyeti sonrasında kromozom hasarı gözlemlenmekte; insanlarda karaciğer, böbrek ve geniş getirenlerin içkembelerinde ve maymunların böbrek hücrelerinde DNA katım ürünlerine rastlanmaktadır. Bu katım ürünleri organlar arasında farklılık göstermektedir ki bu da farklı metabolik aktivasyon yolları olduğunu göstermektedir. OTA mutajenitesinin P450 aracılıklı aktivasyon basamağına ihtiyacı olduğu düşünülmektedir (41).

OTA'nın sıçan, fare, hamster ve tavuklarda teratojen olduğu saptanmıştır. Fetus ölüm ve düşüklerinde belirgin bir artışa neden olmakta ve hamile sıçanlara verildiğinde fetal vücut ağırlığında azalışa neden olmaktadır. OTA uygulanan sıçanların yavrularında iskelet ve iç organ anomalileri gözlenmiştir. Farelerin OTA'ya subkronik maruziyeti sonucu plak oluşturucu hücrelerin antikör üretimlerinin baskılandığı ve timosit hücre sayılarında ve CD<sup>4+</sup> veya CD<sup>8+</sup> hücre oranlarında azalma meydana geldiği gözlenmiştir.

OTA'nın indüklediği nefrotoksik etkileri süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) gibi antioksidan enzimlerin engelleyebildiği ve bu tip renal lezyonların önlenmesinde kullanılabileceği belirtilmiştir. Albino farelerde C vitamininin OTA etkilerini belirgin şekilde azalttığı bildirilmiştir. Okratoksikozu önlemede etkili olan diğer bileşikler ise radikal süpürücüler, vitaminler, indometazin ve aspirin gibi prostoglandin sentetaz inhibitörleri, pH düzenleyiciler ve kolestimamin gibi adsorban reçinelerdir (1). Piroksikam gibi plazma proteinlerine bağlanma oranı yüksek olan bileşikler de OTA için potansiyel antidot durumundadırlar. Yapısal olarak OTA'ya benzeyen aspartam da OTA'nın plazma proteinlerine bağlanmasını engellemektedir ve OTA'ya bağlı subkronik toksik etkileri engelleyebilecek en güçlü adaydır (42).

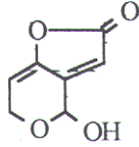
Tahılın OTA ile kontaminasyonu çok değişkendir ve hasat esnasında ve sonrasındaki bölgesel koşullardan etkilenir. OTA tahılların dış



kabuğunda yoğun bulunur. Dış perikarp tabakasının çıkarılması OTA konsantrasyonunu %50'den fazla azaltır (32). Depolanmış ürünlerde okratoksin üreten mantarların üremesi engellenemeyeceğinden dolayı oluşan toksinin radyasyon veya ısı uygulanarak tahrip edilmesi, kontaminasyonun daha dikkatli kontrol edilmesi, eğer vücuda girmişse antagonistlerinin kullanılması gibi toksinin etkilerini önlemeye veya azaltmaya yönelik yaklaşımlar uygulanmaktadır (29).

### PATULİN

Patulin *A.clavatus*, *P.expansum*, *P.patulum*, *P.aspergillus* ve *P.byssochlamys* dahil olmak üzere *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerinin çoğu türleri tarafından üretilen bir mikotoksindir (43,44). 4-hidroksi-4H-furol [3,2-c] piran-2(6H)-on yapısındadır. Pek çok organik solventte ve suda çözünebilir. Şekil 8'de patulinin yapısı görülebilir (45).



Şekil 8. Patulin yapısı

*P.expansum* elmalarda yaygın bir patojen mikroorganizmadır (43,44,46). Patulin esas olarak elma ve elma suyu, elma suyu konsantresi, elma reçeli ve şekerlemesi gibi ürünlerde bulunmakla beraber aynı zamanda armut, kayısı, şeftali, domates, portakal ve bu meyvalardan elde edilen ürünlerde de bulunabilir (45). Yapay olarak kontamine edilmiş meyva suları, komposto ve sebzelerle yapılan deneylerde patulinin 5-25°C sıcaklıklarda *Penicillium* türleri tarafından üretildiği gözlenmiştir (44).

Patulin sülfhidril gruplarına yüksek derecede afineteye sahiptir bu yüzden çoğu enzimi inhibe etmektedir. Yapılan akut toksisite, teratojenite ve mutajenite testlerinde sisteinle oluşturduğu katım

ürünlerinin, değişmemiş bileşikten daha az toksik olduğu gözlenmiştir. Akut ve kısa süreli çalışmalarda patulin gastrointestinal hiperemi, şişkinlik, hemoraji ve ülserasyon oluşturmuştur.

Patulin memeli, bitki ve pek çok yaşam birimine toksik olan geniş spektrumlu bir toksindir. Çok çeşitli biyolojik aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır. Farelerde granülositleri etkilemeksizin lenfosit sayılarında azalmaya neden olmaktadır. Uygulamanın kesilmesini takiben değerler normale dönmektedir. Toksin farelerde idrar oluşumunu baskılamış ve kan glukoz düzeylerini arttırmıştır. Kapiller permeabiliteyi artırarak ödemlere neden olduğu, hücre membranı permeabilitesini de değiştirdiği bilinmektedir. Çoğu laktonla birlikte patulinin subkütan enjeksiyonuyla karsinojen olduğu gösterilmiştir. Bu karsinojen, total veya kısmi kromozom kırıkları gösteren nükleus gelişim bozukluklarından sorumlu tutulmaktadır. Fakat tam ters yönde etkisi olduğuna, farede tümör hücre büyümesini baskıladığına dair veriler de bulunmaktadır.

Kısa ve uzun dönem toksisite testlerinde ve üreme sistemi üzerine yapılan deneylerde kullanılan sıçanlarda mortalite çoğunlukla GİK kaynaklı rahatsızlıklar ve/veya pnömoni nedeniyle gözlenmiştir. Bunun nedeni de büyük olasılıkla patulinin gram pozitif bakteriler üzerindeki antibiyotik etkisi nedeniyle gram negatif bakterilere seçici bir avantaj sağlaması olduğu düşünülmektedir. Bu sonuç benzer doz seviyeleri ile spesifik patojenlerden arındırılmış ortamda yapılan 13 haftalık bir çalışmada bu şekilde bir mortalite görülmemesiyle desteklenmiştir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar patulinin immunosupresif etkileri olduğunu göstermektedir. Fakat her iki kısa dönem ve üreme sistemi toksisitesi/ uzun süreli toksisite/ karsinojenite çalışmalarında, bu etkilerin gözlendiği dozlar NOEL değerinden yüksektir (43,44).

Genotoksisite üzerine olan veriler çok çeşitliyse de memeli hücreleriyle yapılan çalışmalar pozitif sonuç verirken bakterilerle yapılan çalışmalar genellikle negatif çıkmıştır (44). Bazı çalışmalarda patulinin DNA sentezini bozduğu bildirilmiştir. Bu genotoksik etkilerin,

patulinin sülfidril gruplarıyla olan bağlanma yeteneğine ve böylelikle genetik materyalin replikasyonunda yer alan enzimleri inhibe etmesine bağlı olduğu düşünülmektedir.

Sıçanlarda veya farelerde 1,5 mg/kg vücut ağırlığına kadar hiçbir teratojenik etki gözlenmemiştir. Daha yüksek dozlarında ise maternal toksisite ve düşük sıklığında artış gözlenmiştir; bu da patulinin embriyotoksik olduğunu göstermektedir (43).

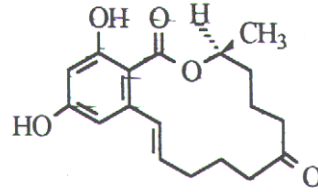
Patulin karsinojenik özellikleri şüpheli olan bir toksik maddedir. Resmi bir risk kanıtı olmasa da, 1995'te Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (JECFA) tarafından 43 µg/kg'lık NOEL değeri ve güvenlik faktörü olarak 100 kullanılmasıyla 0,4 µg/kg vücut ağırlığı olmak üzere geçici bir maksimum tolere edilebilir günlük alım düzeyi (PMTDI) saptanmıştır. Bu, 60 kg ağırlığındaki bir yetişkin için günlük 24 g'a, 20 kg'lık bir çocuk için günlük 8 µg'a ve 10 kg'lık bir çocuk içinse 4 µg'a karşılık gelmektedir. İnsanlar bu toksini sadece işlem görmüş meyve ve daha sıklıkla meyve suyundan alabilmektedir (43,47).

Toksitesisi nedeniyle, sağlık otoriteleri patulin kontaminasyonunu önemli bir problem olarak görmüş ve pek çok ülkede elma sularında maksimum izin verilebilir konsantrasyon (MAK) olarak 20-50 µg/l arası değişen değerler belirlenmiştir. Ülkemizde Türk Gıda Kodeksi tafaından belirlenen en yüksek kabul edilebilir değer 0,05 mg/kg'dır. Dünya Sağlık Örgütü de tavsiye edilebilir limit olarak 50 µg/l konsantrasyonu önermektedir (48). Elma sularındaki patulin miktarı genellikle 50 µg/ml'nin altındadır ve günlük maksimum alım düzeyi olarak çocuklar için 0,2 µg/kg vücut ağırlığı; yetişkinler içinse 0,1 µg/kg vücut ağırlığı değerleri saptanmıştır. Bulunan miktar komite tarafından belirlenen tolere edilebilir düzeylerin altındadır fakat elma suları nadiren de olsa ağır derecede kontamine olmuş olabilir (43). Patulin şarapta yapılan deneyler sonucunda ispatlandığı şekilde fermentasyon esnasında tamamen elimine olurken meyva suyu üretimi esnasındaki alışılagelmiş teknolojik işlemler esnasında sadece %20'si kaybolduğu bulunmuştur

(44). Bu nedenle maruziyeti minimuma indirebilmek için hasarlı veya küflü meyve kullanımı engellemek gerekmektedir (43).

### ZEARALENONLAR

Zearalenon (ZON); mısır, arpa, yulaf, buğday ve darılarda yaygın olarak bulunabilen *Fusarium* türleri tarafından farklı şartlarda üretilebilen bir mikotoksindir. Örn. *F.roseum* tarafından ZON üretimi için yüksek (24-27°C) ve düşük (12-14°C) olmak üzere iki farklı sıcaklık alternatifi bulunmaktadır. Düşük sıcaklık enzim aktivasyonu için şarttır fakat enzim bir kere aktive olduğunda yüksek sıcaklıklarda da toksin üretebilmektedir (2,49). Şekil 9'da ZON'un yapısı görülmektedir (49).



Şekil 9. Zearalenon'un yapısı

ZON'un nispeten düşük akut toksitesisinin yanında çoğu hayvan türünde belirgin östrojenik ve anabolik etkileri vardır (49). Koyun, sığır ve domuzlarda fiziksel gelişimi arttırdığı gözlenmiştir fakat bu etki, toksinin insanlarda östrojenik reseptör üzerine olan argonistik etkileri nedeniyle ortaya çıkan olası ciddi etkileri nedeniyle önemi tartışılır durumdadır (2,49,50).

ZON'a uzun süreli maruziyet vulvovajinit ile sonuçlanır. Vulvovajinite ilaveten, domuzlarda yapılan deneylerde kontamine mısır alımı; düşük, infertilizasyon, hipertrofi ile sonuçlanmıştır. Erkek domuzlarda ise üreme organlarıyla ilgili herhangi bir değişim gözlenmemiştir (2). Çeşitli ülkelerde ZON tolerans sınırları 30-1000 µg/kg aralığında değişmektedir.

ZON'un karsinojenik özellikleri hakkında çok farklı veriler bulunmaktadır ve bu konuda daha detaylı çalışmalara gerek vardır (49).

### DİĞER BAZI FUNGAL TOKSİNLER

#### Ergotoksinler

Ergotoksinler (ergotamin, ergokornin, ergokristin ve ergokriptin gibi) *Claviceps purpurea*'nın ana alkaloidleridir ve farmakolojik aktivitesi en yüksek peptidler arasındadır (1).

Ergotizm, bilinen en eski insan mikotoksikozudur. Orta Çağ'da Avrupa'da *C.purpurea* ile kontamine olmuş çavdar ununun alımı sonucu "St. Anthony ateşi" veya "kutsal ateş" olarak adlandırılan mikotoksikoz oluşmuştur (1,51). Bu hastalık gangren, kramp, konvülsiyon ve halüsinasyonlara neden olmaktadır. Hastalık adını, hastalarla St. Anthony'nin tarikatındaki keşişlerin ilgilenmesi nedeniyle onlardan almıştır (51).

Ergotizm, insan hastalığı olarak hemen hemen ortadan kalkmasına rağmen hayvan hastalığı olarak *C.paspali* ile kontaminasyon sonucu yaygın biçimde gözlenebilmektedir. *C.purpurea* alkaloidleri bitki türleriyle ilişkilidir çünkü neden olan mantar, çavdar bitkisinin spesifik bir patojendir (1).

Bu toksinler günümüzde anjina pektoris tedavisi, hipertoni, migren ağrısı, serebral dolaşım bozuklukları, uterus kontraksiyonu, hipertansiyon, serotonin düzeylerindeki değişikliğe bağlı rahatsızlıklar, prolaktin salgısının inhibisyonu, süt salgılanmasının durması doğum sonrası kanamanın azaltılması ve gebeliğin erken döneminde implantasyonun engellenmesi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Bütün bu fizyolojik etkilerinin yanında bazı ergo alkaloidleri adrenalin, noradrenalin ve serotoninin inhibisyonu ve uterus düz kasların kasılması gibi etkiler gösterirken bazı ergo alkaloidleri de antibiyotik aktivitesi göstermektedir (51).

#### Sporidesminler

Sporidesminler (örn. Sporidesmin A) Yeni Zellanda'da koyunlarda fotosensitivite (yüzde ekzema; "facial eczema") ve Güney Afrika'da

"yellow thick head disease" adı verilen bir hastalığa yol açan epipolitiyodioksopiperazin yapısında bir grup maddedir.

Facial eczema, sporidesminin karaciğer üzerindeki toksik etkilerinin ikincil fotosensitivite reaksiyonlarının göstergesidir. Karaciğer parankimine doğrudan toksik etkisine ilaveten, sporidesminin safra içine itrahi ile safra kanalı duvarında ilerleyen nekroz, periduktal lamellar fibroz ve kanalın tıkanmasına neden olan granülasyonla sonuçlanan safra epiteli iltihabına neden olur. Bu nedenle, klorofilin hepatik degradasyon ürünü olan filoeritrin itrahi kolanjit tarafından bozulmuş olur ve periferel dolaşımdaki aşırı filoeritrin maruziyet olan deride ödem ve inflamasyona neden olan fotosensitivite reaksiyonları oluşur.

#### Fomopsinler

Fomopsinler, fomopsin A gibi  $\beta$ -dehid-roaminoasitler içeren bir grup kompleks hekzapeptittir. Güney Afrika ve Avustralya'da koyunlarda lupinozise neden olmuşlardır. Fomopsinler, doğada *Lupinus* türlerinin spesifik patojen ve saprofiti olan *Phomopsis leptostromiformis* tarafından üretilir. Buna rağmen tahılda ve sıvı ortamda üreyebilirler. Karaciğer ana hedef organdır. Karaciğerde yağ birikmesi sonucu karaciğer yapısal ve boyutsal olarak değişir, özellikle değişir ve kitlesi büyür. Uzun süreli düşük doz temasında karaciğer atrofi, fibroz ve safra kanalı proliferasyonu gelişir. Fomopsin A hem *in vitro* hem *in vivo* olarak mitotik aktivite gösterir ve gözlenen lupinozis semptomları fomopsinin tubulin ve mikrotübüller ile spesifik etkileşmesine dayalı olabilir (1).

Sonuç olarak mikotoksinler sağlığı tehdit eden besinlerde bulunan en önemli ve tehlikeli maddeler olup bütün dünyada ve Türkiye'de de bu açıdan sorun olmaktadır. Bunların gıdalarla tüketimlerini en aza indirmek için oluşumlarını engellemek ve/veya oluşabildikleri her tip besinleri bu tip maddelerden arındırmak üzere yapılan çalışmalar ve bu konu ile ilgili geliştirilen yeni yaklaşımlar büyük öneme sahiptir.

#### KAYNAKLAR

1. Steyn PS, Stander MA. 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, 1999: 2145-76.
2. Concon JM. Mold and Mycotoxin Contamination of Food Products. In: Food Toxicology Part B: Contaminants and Additives. New York: Marcel Dekker Inc, 1988: 677-770.
3. Hendrickse RG. Of sick turkeys, kwashiorkor, malaria, perinatal mortality, heroin addicts and food poisoning: research on the influence of aflatoxins on child health in the tropics. *Ann Trop Med Parasitol* 1997; 91 (7): 787-93.
4. Mc Connell IR, Garner RC. DNA Adducts of Aflatoxins, sterigmatocystin and other mycotoxins. In: Hemminki K, Dipple A, Shuker DEG, Kadlubar FF, Segerbäck D, Bartsch H, eds. DNA Adducts: Identification and Biological Significance. Lyon: IARC Scientific Publications No.125, 1994: 49-55.
5. Vidyasagar T, Sujatha N, Sashidhar RB. Determination of aflatoxin B1-DNA adduct in rat liver by enzyme immunoassay. *Analyst* 1997; 122: 609-13.
6. Busby WF Jr, Wogan GN. Aflatoxins. In: Edwards F, ed. Chemical Carcinogens. York: Maple Press Co, 1984: 945-1136.
7. Kussak A, Andersson B, Andersson K. Immunoaffinity column clean-up for the high-performance liquid chromatographic determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and Q1 in urine. *J Chromatogr B* 1995; 672: 253-9.
8. Simon P, Delsaut P, Lafontaine M, Morele Y, Nicot T. Automated column switching high performance liquid chromatography for the determination of aflatoxin M1. *J Chromatogr B* 1998; 712: 95-104.
9. Guerre P, Burgat V, Galtier P. Dose-related increase in liver heme catabolism during rabbit aflatoxicosis. *Toxicol Lett* 1997; 92: 101-8.
10. Watkins PB. Intestinal Drug Metabolism. European Society for Biochemical Pharmacology. 14th European Workshop on Drug Metabolism. July 3-8, 1994. Abstract Book P: 49.
11. Poirier MC. DNA adducts as exposure biomarkers and indicators of cancer risk [Abstract]. *Environ Health Perspect* 1997; 105 (Suppl 4): 907-12.
12. Tantaoui-Elaraki A, Beraoud L. Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* by essential oils of selected plant materials. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1994; 13 (1): 67-72.
13. Mabrouk SS, El-Shayeb NM. Inhibition of aflatoxin formation by some spices. *Z Lebensm Unters Forsch* 1980; 171 (5): 344-7.
14. Williams GM, Iatropoulos MJ. Inhibition of the hepatocarcinogenicity of aflatoxin B1 in rats by low levels of the phenolic antioxidants butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Cancer Lett* 1996; 104 (1): 49-53.
15. Allameh A. Comparison of the effect of low- and high-dose dietary butylated hydroxytoluene on microsome-mediated aflatoxin B1-DNA binding. *Cancer Lett* 1997; 114 (1-2): 217-20.
16. Galvano F, Pietri A, Bertuzzi T, Piva A, Chies L, Galvano M. Activated carbons: in vitro affinity for ochratoxin A and deoxynivalenol and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. *J Food Prot* 1998; 61 (4): 469-75.
17. Edrington TS, Sarr AB, Kubena LF, Harvey RB, Philips TD. Hydrated sodium calcium aluminosilicate (HSCAS), acidic HSCAS, and activated charcoal reduce urinary excretion of aflatoxin M1 in turkey poults. Lack of effect by activated charcoal on aflatoxicosis. *Toxicol Lett* 1996; 89: 115-22.
18. Josephs RD, Kraska R, Grasserbauer M, Broekaert JAC. Determination of trichothecene mycotoxins in wheat by use of supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detection or gas chromatography with electron capture detection. *J Chromatogr A* 1998; 795: 297-304.
19. Berger U, Oehme M, Kuhn F. Quantitative determination and structure elucidation of type A- and B- trichothecenes by HPLC/ ion trap multiple mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 4240-5.

20. Hsueh C-C, Liu Y, Freund MS. Indirect electrochemical detection of type-B trichothecene mycotoxins. *Anal Chem* 1999; 71: 4075-80.
21. Razzazi-Fazeli E, Böhm J, Luf W. Determination of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using liquid chromatography-mass spectrometry with negative ion atmospheric pressure chemical ionisation. *J Chromatogr A* 1999; 854: 45-55.
22. Cahill LM, Kruger SC, McAlice BT, Ramsey CS, Prioli R, Kohn B. Quantification of deoxynivalenol in wheat using immunoaffinity column and liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1999; 859: 23-8.
23. Smith JS, Thakur RA. Occurrence and fate of fumonisins in beef. In: Jackson L, ed. *Fumonisin in Food*. New York: Plenum Press, 1996: 39-55.
24. Tseng T-C, Liu C-Y. Natural occurrence of fumonisin B1 and B2 in domestic maize of Taiwan. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 4799-4801.
25. Solfrizzo M, Avantiaggiato G, Visconti A. Rapid method to determine sphinganine/sphingosine in human and animal urine as a biomarker for fumonisin exposure. *J Chromatogr B* 1997; 692: 87-93.
26. Wang E, Riley RT, Meredith FI, Merrill Jr AH. Fumonisin B1 consumption by rats causes reversible, dose-dependent increases in urinary sphinganine and sphingosine. *J Nutr* 1999; 129(1): 214-20.
27. Shephard GS, Snijman PW. Elimination and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B2 in a non-human primate. *Food Chem Tox* 1999; 37: 111-6.
28. Lau BP-Y, Scott Pm, Lewis DA, Kanhere SR. Quantitative determination of ochratoxin A by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2000; 25: 23-32.
29. McMasters DR, Vedani A. Ochratoxin binding to phenylalanine-tRNA synthetase: Computational Approach to the mechanism of ochratoxicosis and its antagonism. *J Med Chem* 1999; 42: 3075-86.
30. Ruprich J, Ostry V. Study of human exposure to ochratoxin A and assessment of possible sources. *Cent Eur J Public Health* 1993; 46-8.
31. Bruinink A, Sidler C. The neurotoxic effects of ochratoxin A are reduced by protein binding but are not affected by l-phenylalanine. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 146: 173-9.
32. Petzinger E, Ziegler K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. *J Vet Pharmacol Therap* 2000; 23: 91-8.
33. De Saeger S, Van Peteghem C. Flow-through membrane-based enzyme immunoassay for rapid detection of ochratoxin A in wheat. *J Food Prot* 1999; 62 (1): 65-9.
34. World Health Organ Tech Rep Ser 1991; 806: 29-31.
35. Omar RF, Rahimtula AD, Bartsch H. Role of cytochrome P-450 in ochratoxin A stimulated lipid peroxidation. *J Biochem Toxicol* 1991; 6(3): 203-9.
36. Omar RF, Hasinoff BB, Mejilla F, Rahimtula AD. Mechanism of ochratoxin A stimulated lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1990; 40(6): 1183.
37. Baudrimont I, Ahouandjivo R, Creppy EE. Prevention of lipid peroxidation induced by ochratoxin A in Vero cells in culture by several agents. *Chem-Biol Interact* 1997; 104(1): 29.
38. Aleo MD, Wyatt RD, Schnellmann RG. Mitochondrial dysfunction is an early event ochratoxin A but not oosporein toxicity to rat renal proximal tubules. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991; 107(1): 73-80.
39. Seegers JC, Lottering M-L, Garlinski PJ. The mycotoxin ochratoxin A causes apoptosis-associated DNA degradation in human lymphocytes. *Med Sci Res* 1994; 22: 417.
40. Neal GE. Genetic implications in the metabolism and toxicity of mycotoxins. *Toxicol Lett* 1995; 82-83: 861-7.
41. De Groene EM, Hassing GIA, Blom MJ, Seinen W, Fink-Gremmels J, Horbach GJ. Development of human cytochrome P450 expressing cell lines: application in mutagenicity testing of ochratoxin A. *Cancer Res* 1996; 56(2): 299-304.
42. Creppy EE, Boudrimont I, Betbeder AM. Prevention of nephrotoxicity of ochratoxin A, a food contaminant. *Toxicol Lett* 1995; 82-83: 869-77.
43. World Health Organ Tech Rep Ser 1995; 859: 36-8.

44. Beretta B, Gaiaschi A, Galli CL, Restani P. Patulin in apple-based foods: Occurrence and safety evaluation. *Food Addit Contam* 2000; 17 (5): 399-406.
45. Gökmen V, Acar L. Rapid reversed-phase liquid chromatographic determination of patulin in apple juice. *J Chromatogr A* 1996; 730: 53-8.
46. Rychlik M, Schieberle P. Quantification of the mycotoxin patulin by a stable isotope dilution assay. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 3749-55.
47. Verger P, Garnier-Sagne I, Leblanc J-C. Identification of risk groups for intake of food chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999; 30(2 Pt 2): 103-8.
48. Gökmen V, Acar J. Incidence of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey. *J Chromatogr A* 1998; 815: 99-102.
49. Zöllner P, Jodlbauer J, Lindler W. Determination of zearalenone in grains by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction with RP-18 columns or immunoaffinity columns. *J Chromatogr A* 1999; 858: 167-74.
50. Jiménez M, Mateo R. Determination of mycotoxins produced by *Fusarium* isolates from banana fruits by capillary gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1997; 778: 363-72.
51. Demain AL. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999; 52: 455-63.